(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-512313
(P2025-512313A)
(43)公表日　令和7年4月17日(2025.4.17)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/0783(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0783	ＺＮＡ	４Ｂ０６５
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ	*35/17 (2025.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17		４Ｃ０８７
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	
Ａ６１Ｋ	*45/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全1437頁）

(21)出願番号　特願2024-559177(P2024-559177)
(86)(22)出願日　令和5年4月5日(2023.4.5)
(85)翻訳文提出日　令和6年12月3日(2024.12.3)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/065404
(87)国際公開番号　WO2023/196877
(87)国際公開日　令和5年10月12日(2023.10.12)
(31)優先権主張番号　63/328,236
(32)優先日　令和4年4月6日(2022.4.6)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　519006377
アイオバンス バイオセラピューティクス，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０７０ サン カルロス インダストリアル ロード ８２５ スイート ４００
(71)出願人　506346347
ファーディス， マリア
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０７０， サンカルロス， アバディーン ドライブ １０５
(71)出願人　524368060
ヴォン フィンケンシュタイン，フリードリヒ グラフ フィンク
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　腫瘍浸潤リンパ球療法によるＮＳＣＬＣ患者の治療

(57)【要約】
（ｉ）ＣＤ４０アゴニストの有無にかかわらず、かつ抗ＣＴＬＡ－４抗体の有無にかかわらず、インターフェロンガンマ（ＩＦＮγ）及び抗ＰＤ－１抗体の組み合わせによるＲＥＰ前刺激、（ｉｉ）低濃度ＩＬ－２の有無にかかわらず、ＡＫＴ阻害剤（ＡＫＴｉ）の有無にかかわらず、ＲＥＰ拡張及び／またはＲＥＰ前拡張中の様々な濃度のＩＬ－１５及びＩＬ－２１、（ｉｉｉ）ＲＥＰ拡張及び／またはＲＥＰ前拡張中の低濃度のＩＬ－２及びＡＫＴｉ、（ｉｖ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせ、または（ｖ）（ｉ）及び（ｉｉｉ）の組み合わせを介してＴＩＬを産生する方法が、本明細書で提供される。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、前記方法が、
（ａ）がん患者から腫瘍を取得するステップであって、前記腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、前記取得するステップと、
（ｂ）前記腫瘍を複数の腫瘍断片に処理するステップと、
（ｃ）前記複数の腫瘍断片を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）前記第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第１の拡張の３日目、前記第１の拡張の４日目、前記第１の拡張の５日目、前記第１の拡張の６日目、または前記第１の拡張の７日目に置き換えられる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第２の拡張の３日目、前記第２の拡張の４日目、前記第２の拡張の５日目、前記第２の拡張の６日目、または前記第２の拡張の７日目に置き換えられる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｆ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｇ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こる、前記移すことと、を含む、前記方法。
【請求項２】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、前記方法が、
（ａ）がん患者から腫瘍を取得するステップであって、前記腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、前記取得するステップと、
（ｂ）前記腫瘍を腫瘍消化物に処理するステップと、
（ｃ）前記腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）前記第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第１の拡張の３日目、前記第１の拡張の４日目、前記第１の拡張の５日目、前記第１の拡張の６日目、または前記第１の拡張の７日目に置き換えられる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こり

、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第２の拡張の３日目、前記第２の拡張の４日目、前記第２の拡張の５日目、前記第２の拡張の６日目、または前記第２の拡張の７日目に置き換えられる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｆ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｇ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こる、前記移すことと、を含む、前記方法。
【請求項３】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、前記方法が、
（ａ）がん患者から腫瘍を取得するステップであって、前記腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、前記取得するステップと、
（ｂ）前記腫瘍を腫瘍断片または腫瘍消化物に処理するステップと、
（ｃ）前記腫瘍断片または前記腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）前記第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第１の拡張の３日目、前記第１の拡張の４日目、前記第１の拡張の５日目、前記第１の拡張の６日目、または前記第１の拡張の７日目に置き換えられる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第２の拡張の３日目、前記第２の拡張の４日目、前記第２の拡張の５日目、前記第２の拡張の６日目、または前記第２の拡張の７日目に置き換えられる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｆ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｇ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こる、前記移すことと、を含む、前記方法。
【請求項４】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、前記方法が、
（ａ）がん患者から腫瘍を取得するステップであって、前記腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、前記取得するステップと、
（ｂ）前記腫瘍を腫瘍消化物に処理し、前記腫瘍消化物を凍結保存するステップと、
（ｃ）前記凍結保存した腫瘍消化物を解凍し、前記腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）前記第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第１の

拡張の３日目、前記第１の拡張の４日目、前記第１の拡張の５日目、前記第１の拡張の６日目、または前記第１の拡張の７日目に置き換えられる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第２の拡張の３日目、前記第２の拡張の４日目、前記第２の拡張の５日目、前記第２の拡張の６日目、または前記第２の拡張の７日目に置き換えられる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

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

（ｇ）ステップ（ｇ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こる、前記移すことと、を含む、前記方法。

【請求項５】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、前記方法が、

（ａ）がん患者から取得された腫瘍から取得された腫瘍断片を培養することによって第１の拡張を行い、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を生成して、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第１の拡張の３日目、前記第１の拡張の４日目、前記第１の拡張の５日目、前記第１の拡張の６日目、または前記第１の拡張の７日目に置き換えられる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｂ）前記第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第２の拡張の３日目、前記第２の拡張の４日目、前記第２の拡張の５日目、前記第２の拡張の６日目、または前記第２の拡張の７日目に置き換えられる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

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

（ｄ）ステップ（ｇ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こる、前記移すステップと、を含む、前記方法。

【請求項６】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、前記方法が、

（ａ）がん患者から取得された腫瘍から取得された腫瘍消化物を培養することによって第１の拡張を行い、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を生成して、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くこ

となく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第１の拡張の３日目、前記第１の拡張の４日目、前記第１の拡張の５日目、前記第１の拡張の６日目、または前記第１の拡張の７日目に置き換えられる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｂ）前記第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第２の拡張の３日目、前記第２の拡張の４日目、前記第２の拡張の５日目、前記第２の拡張の６日目、または前記第２の拡張の７日目に置き換えられる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

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

（ｄ）ステップ（ｇ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こる、前記移すステップと、を含む、前記方法。

【請求項７】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、前記方法が、

（ａ）がん患者から取得された腫瘍から取得された腫瘍断片または腫瘍消化物を培養することによって第１の拡張を行い、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を生成して、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第１の拡張の３日目、前記第１の拡張の４日目、前記第１の拡張の５日目、前記第１の拡張の６日目、または前記第１の拡張の７日目に置き換えられる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｂ）前記第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第２の拡張の３日目、前記第２の拡張の４日目、前記第２の拡張の５日目、前記第２の拡張の６日目、または前記第２の拡張の７日目に置き換えられる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

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

（ｄ）ステップ（ｇ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こる、前記移すステップと、を含む、前記方法。

【請求項８】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、前記方法が、

（ａ）がん患者から取得された腫瘍から取得された凍結保存した腫瘍消化物を解凍し、前記腫瘍消化物を培養することによって第１の拡張を行い、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を生成して、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張

が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第１の拡張の３日目、前記第１の拡張の４日目、前記第１の拡張の５日目、前記第１の拡張の６日目、または前記第１の拡張の７日目に置き換えられる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｂ）前記第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第２の拡張の３日目、前記第２の拡張の４日目、前記第２の拡張の５日目、前記第２の拡張の６日目、または前記第２の拡張の７日目に置き換えられる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

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

（ｄ）ステップ（ｇ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こる、前記移すステップと、を含む、前記方法。

【請求項９】

凍結乾燥プロセスを使用して、採取された前記第３のＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結乾燥するステップをさらに含む、請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１０】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、前記方法が、

（ａ）がん患者から腫瘍を取得するステップであって、前記腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、前記取得するステップと、

（ｂ）前記腫瘍を、複数の腫瘍断片に処理するステップと、

（ｃ）前記複数の腫瘍断片を閉鎖系に付加するステップと、

（ｄ）前記第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第１の拡張の３日目、前記第１の拡張の４日目、前記第１の拡張の５日目、前記第１の拡張の６日目、または前記第１の拡張の７日目に置き換えられる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第２の拡張の３日目、前記第２の拡張の４日目、前記第２の拡張の５日目、前記第２の拡張の６日目、または前記第２の拡張の７日目に置き換えられる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、を含む、前記方法。

【請求項１１】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、前記方法が、

（ａ）がん患者から腫瘍を取得するステップであって、前記腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、前記取得するステップと、

（ｂ）前記腫瘍を腫瘍消化物に処理するステップと、
（ｃ）前記腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）前記第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第１の拡張の３日目、前記第１の拡張の４日目、前記第１の拡張の５日目、前記第１の拡張の６日目、または前記第１の拡張の７日目に置き換えられる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第２の拡張の３日目、前記第２の拡張の４日目、前記第２の拡張の５日目、前記第２の拡張の６日目、または前記第２の拡張の７日目に置き換えられる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、を含む、前記方法。
【請求項１２】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、前記方法が、
（ａ）がん患者から腫瘍を取得するステップであって、前記腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、前記取得するステップと、
（ｂ）前記腫瘍を腫瘍断片または腫瘍消化物に処理するステップと、
（ｃ）前記腫瘍断片または前記腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）前記第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第１の拡張の３日目、前記第１の拡張の４日目、前記第１の拡張の５日目、前記第１の拡張の６日目、または前記第１の拡張の７日目に置き換えられる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第２の拡張の３日目、前記第２の拡張の４日目、前記第２の拡張の５日目、前記第２の拡張の６日目、または前記第２の拡張の７日目に置き換えられる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、を含む、前記方法。
【請求項１３】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、前記方法が、
（ａ）がん患者から腫瘍を取得するステップであって、前記腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、前記取得するステップと、
（ｂ）前記腫瘍を腫瘍消化物に処理し、前記腫瘍消化物を凍結保存するステップと、
（ｃ）前記凍結保存した腫瘍消化物を解凍し、前記腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）前記第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で培養することによって

第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第１の拡張の３日目、前記第１の拡張の４日目、前記第１の拡張の５日目、前記第１の拡張の６日目、または前記第１の拡張の７日目に置き換えられる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第２の拡張の３日目、前記第２の拡張の４日目、前記第２の拡張の５日目、前記第２の拡張の６日目、または前記第２の拡張の７日目に置き換えられる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

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

（ｇ）ステップ（ｇ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こる、前記移すステップと、を含む、前記方法。

【請求項１４】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、前記方法が、

（ａ）がん患者から取得された腫瘍から取得された腫瘍断片を培養することによって第１の拡張を行い、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を生成して、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第１の拡張の３日目、前記第１の拡張の４日目、前記第１の拡張の５日目、前記第１の拡張の６日目、または前記第１の拡張の７日目に置き換えられる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｂ）前記第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第２の拡張の３日目、前記第２の拡張の４日目、前記第２の拡張の５日目、前記第２の拡張の６日目、または前記第２の拡張の７日目に置き換えられる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、を含む、前記方法。

【請求項１５】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、前記方法が、

（ａ）がん患者から取得された腫瘍から取得された腫瘍消化物を培養することによって第１の拡張を行い、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を生成して、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第１の拡張の３日目、前記第１の拡張の４日目、前記第１の拡張の５日目、前記第１の拡張の６日目、または前記第１の拡張

の７日目に置き換えられる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｂ）前記第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第２の拡張の３日目、前記第２の拡張の４日目、前記第２の拡張の５日目、前記第２の拡張の６日目、または前記第２の拡張の７日目に置き換えられる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、を含む、前記方法。

【請求項１６】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、前記方法が、
（ａ）がん患者から取得された腫瘍から取得された腫瘍断片または腫瘍消化物を培養することによって第１の拡張を行い、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を生成して、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第１の拡張の３日目、前記第１の拡張の４日目、前記第１の拡張の５日目、前記第１の拡張の６日目、または前記第１の拡張の７日目に置き換えられる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｂ）前記第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第２の拡張の３日目、前記第２の拡張の４日目、前記第２の拡張の５日目、前記第２の拡張の６日目、または前記第２の拡張の７日目に置き換えられる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、を含む、前記方法。

【請求項１７】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、前記方法が、
（ａ）がん患者から取得された腫瘍から取得された凍結保存した腫瘍消化物を解凍し、前記腫瘍消化物を培養することによって第１の拡張を行い、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を生成して、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第１の拡張の３日目、前記第１の拡張の４日目、前記第１の拡張の５日目、前記第１の拡張の６日目、または前記第１の拡張の７日目に置き換えられる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｂ）前記第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第２の拡張の３日目、前記第２の拡張の４日目、前記第２の拡張の５日目、前記第２の拡張の６日目、または前記第２の拡張の７日目に置き換えられる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、を含む、前記方法。

【請求項１８】
ステップ（ｄ）の前記培養培地が、３０００ＩＵ／ｍＬ以下のＩＬ－２、及び／またはタンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤を含む、請求項１～４及び１０～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
ステップ（ｅ）の前記培養培地が、タンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤を含む、請求項１～４及び１０～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０】
ステップ（ｄ）またはステップ（ｅ）の前記培養培地が、約０．１μＭ～約１０μＭの濃度の前記ＡＫＴ阻害剤を含む、請求項１８または１９に記載の方法。
【請求項２１】
ステップ（ｄ）またはステップ（ｅ）の前記培養培地が、約１μＭの濃度の前記ＡＫＴ阻害剤を含む、請求項１８または１９に記載の方法。
【請求項２２】
ステップ（ｄ）及び／またはステップ（ｅ）の前記培養培地が、ＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む、請求項１～４及び１０～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３】
ステップ（ｄ）及び／またはステップ（ｅ）の前記培養培地が、約１ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬの濃度のＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
ステップ（ｄ）及び／またはステップ（ｅ）の前記培養培地が、約１０ｎｇ／ｍＬの濃度のＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む、請求項２２に記載の方法。
【請求項２５】
ステップ（ｄ）のＤ０、Ｄ１またはＤ２中に、２００ｎｇ／ｍｌの濃度のＩＦＮγ及び抗ＰＤ－１抗体を添加することをさらに含む、請求項１～４及び１０～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２６】
ステップ（ｄ）のＤ０、Ｄ１またはＤ２中に、ＣＤ４０アゴニスト及び／またはＣＴＬＡ－４の阻害剤を添加することをさらに含む、請求項１～４及び１０～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２７】
前記ＡＫＴ阻害剤が、イパタセルチブ、ＧＳＫ６９０６９３、ＧＳＫ２１４１７９５、ＧＳＫ２１１０１８３、ＡＺＤ５３６３、ＧＤＣ－００６８、ＡＴ７８６７、ＣＣＴ１２８９３０、ＭＫ－２２０６、ＢＡＹ１１２５９７６、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド（Ｔｅｈｒａｎｏｌｉｄｅ）、イソリキリゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択される、請求項１～４及び１０～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２８】
前記ＡＫＴ阻害剤が、ＡＺＤ５３６３である、請求項１～４及び１０～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２９】
ステップ（ｂ）の後かつステップ（ｃ）の前に、前記方法が、前記複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍消化物を取得するステップを含み、ステップ（ｃ）が、前記腫瘍消化物を閉鎖系に付加することによって行われる、請求項１～４及び１０～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３０】
前記第１のＴＩＬ集団が、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から取得される、請求項１～２９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３１】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、前記方法が、
（ａ）がん患者から腫瘍を取得するステップであって、前記腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、前記取得するステップと、
（ｂ）前記腫瘍を、複数の腫瘍断片に処理するステップと、
（ｃ）前記複数の腫瘍断片を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）前記第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む細胞培養培地中で培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第１の拡張の３日目、前記第１の拡張の４日目、前記第１の拡張の５日目、前記第１の拡張の６日目、または前記第１の拡張の７日目に置き換えられる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第２の拡張の３日目、前記第２の拡張の４日目、前記第２の拡張の５日目、前記第２の拡張の６日目、または前記第２の拡張の７日目に置き換えられる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｆ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｇ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記閉鎖系を開くことなく起こる、前記移すステップと、を含む、前記方法。
【請求項３２】
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存することをさらに含む、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
ステップ（ｄ）またはステップ（ｅ）の前記培養培地が、ＩＬ－２を含む、請求項３１または３２に記載の方法。
【請求項３４】
前記ＩＬ－２が、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度にある、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
ステップ（ｄ）またはステップ（ｅ）の前記培養培地が、添加されたＩＬ－２を含まない、請求項３１または３２に記載の方法。
【請求項３６】
ステップ（ｄ）及び／またはステップ（ｅ）の前記培養培地が、約１ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬの濃度のＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む、請求項３１～３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３７】
ステップ（ｄ）及び／またはステップ（ｅ）の前記培養培地が、約１０ｎｇ／ｍＬの濃度のＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む、請求項３１～３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３８】

ステップ（ｄ）の前記培養培地が、ＩＬ－２及びＩＬ－２１を含む、請求項３１～３７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３９】
ステップ（ｄ）の前記培養培地が、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び約１０ｎｇ／ｍＬの濃度のＩＬ－２１を含む、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
ステップ（ｅ）の前記培養培地が、ＩＬ－２及びＩＬ－２１を含む、請求項３１～３９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４１】
ステップ（ｅ）の前記培養培地が、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び約１０ｎｇ／ｍＬの濃度のＩＬ－２１を含む、請求項３９に記載の方法。
【請求項４２】
ステップ（ｅ）の前記培養培地が、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１を含む、請求項３１～３８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４３】
ステップ（ｅ）の前記培養培地が、約１０ｎｇ／ｍＬの濃度のＩＬ－１５及び約１０ｎｇ／ｍＬの濃度のＩＬ－２１を含む、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
ステップ（ｅ）の前記培養培地が、添加されたＩＬ－２を含まない、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
ステップ（ｄ）及び／またはステップ（ｅ）の前記培養培地が、タンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤を含む、請求項３１～４４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４６】
前記ＡＫＴ阻害剤が、イパタセルチブ、ＧＳＫ６９０６９３、ＧＳＫ２１４１７９５、ＧＳＫ２１１０１８３、ＡＺＤ５３６３、ＧＤＣ－００６８、ＡＴ７８６７、ＣＣＴ１２８９３０、ＭＫ－２２０６、ＢＡＹ１１２５９７６、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択される、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記ＡＫＴ阻害剤が、ＡＺＤ５３６３である、請求項４５に記載の方法。
【請求項４８】
ステップ（ｄ）及び／またはステップ（ｅ）の前記培養培地が、約０．１μＭ～約１０μＭの濃度の前記ＡＫＴ阻害剤を含む、請求項４５～４７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４９】
ステップ（ｄ）及び／またはステップ（ｅ）の前記培養培地が、約１μＭの濃度の前記ＡＫＴ阻害剤を含む、請求項４５～４７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５０】
ステップ（ｄ）のＤ０、Ｄ１またはＤ２中に、２００ｎｇ／ｍｌの濃度のＩＦＮγ及び抗ＰＤ－１抗体を添加することをさらに含む、請求項３１～４９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５１】
ステップ（ｄ）のＤ０、Ｄ１またはＤ２中に、ＣＤ４０アゴニスト及び／またはＣＴＬＡ－４の阻害剤を添加することをさらに含む、請求項３１～５０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５２】
ステップ（ａ）の後かつステップ（ｂ）の前に、前記方法が、前記複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第１のＴＩＬ集団を取得するステップを含む、請求項３１～５１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５３】

前記第１のＴＩＬ集団が、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から取得される、請求項３１～５２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５４】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、前記方法が、

（ａ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で、がん患者からの腫瘍から取得された第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第１の拡張の３日目、前記第１の拡張の４日目、前記第１の拡張の５日目、前記第１の拡張の６日目または前記第１の拡張の７日目に置き換えられる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｂ）前記第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第２の拡張の３日目、前記第２の拡張の４日目、前記第２の拡張の５日目、前記第２の拡張の６日目、または前記第２の拡張の７日目に置き換えられる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｃ）ステップ（ｂ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

（ｄ）ステップ（ｃ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップと、を含む、前記方法。

【請求項５５】

（ｅ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｄ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存することをさらに含む、請求項５４に記載の方法。

【請求項５６】

ステップ（ｄ）の前記培養培地が、３０００ＩＵ／ｍＬ以下のＩＬ－２、及び／またはタンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤を含む、請求項５４または５５に記載の方法。

【請求項５７】

ステップ（ａ）またはステップ（ｂ）の前記培養培地が、タンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤を含む、請求項５４または５６に記載の方法。

【請求項５８】

ステップ（ａ）またはステップ（ｂ）の前記培養培地が、約０．１μＭ～約１０μＭの濃度の前記ＡＫＴ阻害剤を含む、請求項５７に記載の方法。

【請求項５９】

ステップ（ａ）またはステップ（ｂ）の前記培養培地が、約１μＭの濃度の前記ＡＫＴ阻害剤を含む、請求項５８に記載の方法。

【請求項６０】

ステップ（ａ）及び／またはステップ（ｂ）の前記培養培地が、ＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む、請求項５４～５９に記載の方法。

【請求項６１】

ステップ（ａ）及び／またはステップ（ｂ）の前記培養培地が、約１ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬの濃度のＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む、請求項６０に記載の方法。

【請求項６２】

ステップ（ａ）及び／またはステップ（ｂ）の前記培養培地が、約１０ｎｇ／ｍＬの濃度のＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む、請求項６０に記載の方法。

【請求項６３】

ステップ（ａ）及び／またはステップ（ｂ）のＤ０、Ｄ１またはＤ２中に、２００ｎｇ／ｍｌの濃度のＩＦＮγ及び抗ＰＤ－１抗体を添加することをさらに含む、請求項５４～

６２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６４】
ステップ（ａ）及び／またはステップ（ｂ）のＤ０、Ｄ１またはＤ２中に、ＣＤ４０アゴニスト及び／またはＣＴＬＡ－４の阻害剤を添加することをさらに含む、請求項５４～６３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６５】
前記ＡＫＴ阻害剤が、イパタセルチブ、ＧＳＫ６９０６９３、ＧＳＫ２１４１７９５、ＧＳＫ２１１０１８３、ＡＺＤ５３６３、ＧＤＣ－００６８、ＡＴ７８６７、ＣＣＴ１２８９３０、ＭＫ－２２０６、ＢＡＹ１１２５９７６、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択される、請求項５４～６４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６６】
前記ＡＫＴ阻害剤が、ＡＺＤ５３６３である、請求項５４～６４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６７】
前記方法が、複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍消化物を取得するステップを含む、請求項５４～６６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６８】
前記第１のＴＩＬ集団が、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から取得される、請求項５４～６７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６９】
前記がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされたがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７０】
前記第１のＴＩＬ集団が、ＩＦＮｇ（インターフェロンガンマ）、ＰＤ－１の阻害剤（例えば、抗ＰＤ－１抗体）、ＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌ、抗ＣＤ４０アゴニスト抗体）、及び／またはＣＴＬＡ－４アゴニスト（例えば、抗ＣＴＬＡ－４アゴニスト抗体）で、前記第１の拡張前に最大約４８時間、及び任意選択で、前記第１の拡張前に２４時間または４８時間刺激される、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７１】
抗原提示細胞（ＡＰＣ）が、前記第１のＴＩＬ集団、前記第２のＴＩＬ集団、または両方に添加される、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７２】
前記ＣＤ４０またはＣＤ４０Ｌが、前記刺激中に前記細胞培養培地中に約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７３】
ＩＦＮｇが、前記刺激中に前記細胞培養培地中に約２００ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７４】
前記第１の拡張が、約１１日の期間にわたって行われる、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７５】
前記第２の拡張が、約１１日の期間にわたって行われる、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７６】
前記第１の拡張及び前記第２の拡張が、各々、５日、６日、または７日の期間内で個別に行われる、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７７】
前記第１の拡張が、７日、８日、または９日の期間内で行われる、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７８】
前記第２の拡張が、７日、８日、または９日の期間内で行われる、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７９】
前記第１の拡張及び前記第２の拡張が、各々、７日の期間内で個別に行われる、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８０】
前記治療的ＴＩＬ集団の前記採取をとおした前記第１の拡張のステップが、約１４日～約１６日の期間内で行われる、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８１】
前記治療用ＴＩＬ集団の前記採取をとおした前記第１の拡張のステップが、約１５日～約１６日の期間内で行われる、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８２】
前記治療的ＴＩＬ集団の前記採取をとおした前記第１の拡張のステップが、約１４日の期間内で行われる、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８３】
前記治療的ＴＩＬ集団の前記採取をとおした前記第１の拡張のステップが、約１５日の期間内で行われる、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８４】
前記治療的ＴＩＬ集団の前記採取をとおした前記第１の拡張のステップが、約１６日の期間内で行われる、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８５】
凍結保存プロセスを使用して、採取された前記治療的ＴＩＬ集団を凍結保存するステップをさらに含み、前記治療的ＴＩＬ集団の前記採取をとおしたプライミングによる第１の拡張のステップ及び凍結保存のステップが、１６日以内で行われる、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８６】
前記第１の拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８７】
前記第２の拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８８】
前記ガス透過性容器が、Ｇ容器及びＸｕｒｉセルバッグからなる群から選択される、請求項８６または８７に記載の方法。
【請求項８９】
先行請求項のいずれか１項に記載の方法を使用して製造された、治療的ＴＩＬ集団。
【請求項９０】
約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}ＴＩＬを含む、請求項８９に記載の治療的ＴＩＬ集団。
【請求項９１】
約１×10^{9}～約１×10^{11}ＴＩＬを含む、請求項８９に記載の治療的ＴＩＬ集団。
【請求項９２】
前記治療的ＴＩＬ集団が、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、増強された多官能性を示す、請求項８９～９１のいずれか１項に記載の治療的ＴＩＬ集団。
【請求項９３】

前記治療的ＴＩＬ集団が、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、より幹様の表現型を示す、請求項８９～９２のいずれか１項に記載の治療的ＴＩＬ集団。

【請求項９４】

前記治療的ＴＩＬ集団が、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、活性化及び／または分化のより少ないＴＩＬの頻度の増加を示す、請求項８９～９３のいずれか１項に記載の治療的ＴＩＬ集団。

【請求項９５】

前記治療的ＴＩＬ集団が、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、同種異系設定において改善された腫瘍細胞殺傷を示す、請求項８９～９４のいずれか１項に記載の治療的ＴＩＬ集団。

【請求項９６】

前記治療的ＴＩＬ集団が、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ６２Ｌ、及びＩＬ－７Ｒからなる群から選択されるメモリー関連マーカーの増加した発現を示す、請求項８９～９５のいずれか１項に記載の治療的ＴＩＬ集団。

【請求項９７】

前記治療的ＴＩＬ集団が、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、ＣＤ３８、ＣＤ３９、及びＣＤ６９からなる群から選択される活性化マーカーの発現の低下を示す、請求項８９～９６のいずれか１項に記載の治療的ＴＩＬ集団。

【請求項９８】

前記治療的ＴＩＬ集団が、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＴＩＧＩＴ、及びＴＯＸからなる群から選択される阻害／枯渇関連マーカーの発現の低下を示す、請求項８９～９７のいずれか１項に記載の治療的ＴＩＬ集団。

【請求項９９】

前記治療的ＴＩＬ集団が、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、ＧＺＭＢ、ＣＸＣＲ３、ＩＦＮｇ、ＴＮＦａ、及びＩＬ－２からなる群から選択される機能的マーカーの増加した発現を示す、請求項８９～９８のいずれか１項に記載の治療的ＴＩＬ集団。

【請求項１００】

請求項８９～９９のいずれか１項に記載の治療的ＴＩＬ集団を含む、薬学的組成物。

【請求項１０１】

がん患者を治療する方法であって、請求項８９～９９のいずれか１項に記載のＴＩＬ集団または請求項１００に記載の薬学的組成物を前記がん患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項１０２】

前記ＴＩＬ集団または前記薬学的組成物を前記がん患者に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで前記がん患者を治療するステップをさらに含む、請求項１０１に記載の方法。

【請求項１０３】

前記骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む、請求項１０２に記載の方法。

【請求項１０４】

前記骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、及びフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む、請求項１０２に記載の方法。

【請求項１０５】

前記骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、及びフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で１日間投与するステップを含む、請求項１０２に記載の方法。

【請求項１０６】

前記シクロホスファミドが、メスナとともに投与される、請求項１０３～１０５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１０７】

前記がん患者に前記ＴＩＬを投与した翌日に開始するＩＬ－２レジメンで前記がん患者を治療するステップをさらに含む、請求項１０１～１０６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１０８】

前記がん患者へのＴＩＬの投与と同じ日に開始するＩＬ－２レジメンで前記がん患者を治療するステップをさらに含む、請求項１０１～１０６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１０９】

前記ＩＬ－２レジメンが、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される、６００，０００もしくは７２０，０００ＩＵ／ｋｇのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを含む高用量ＩＬ－２レジメンである、請求項１０７または１０８に記載の方法。

【請求項１１０】

治療上有効なＴＩＬ集団が投与され、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}ＴＩＬを含む、請求項１０１～１０９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１１１】

治療上有効なＴＩＬ集団が投与され、約１×１０^9～約１×１０^{11}ＴＩＬを含む、請求項１０１～１０９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１１２】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、

（ａ）ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で、がん患者からの腫瘍から取得された第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第１の拡張が、約１～７／８日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団の数が、前記第１のＴＩＬ集団よりも多く、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第１の拡張の３日目、前記第１の拡張の４日目、前記第１の拡張の５日目、前記第１の拡張の６日目、または前記第１の拡張の７日目に置き換えられる、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｂ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣで補充することによって第２の急速拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記第２の急速拡張に追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）で追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、前記第２の急速拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、前記第２の急速拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、任意選択で、前記細胞培養培地が、前記第２の拡張の３日目、前記第２の拡張の４日目、前記第２の拡張の５日目、前記第２の拡張の６日目、または前記第２の拡張の７日目に置き換えられる、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、

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

【請求項１１３】

（ｄ）ステップ（ｃ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すことと、

（ｅ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｄ）からの採取された前記第３のＴＩＬ

集団を含む前記注入バッグを凍結保存することをさらに含む、請求項１１２に記載の方法。

【請求項１１４】

ステップ（ａ）の前記培養培地が、３０００ＩＵ／ｍＬ以下のＩＬ－２、及び／またはタンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤を含む、請求項１１２または１１３に記載の方法。

【請求項１１５】

ステップ（ａ）またはステップ（ｂ）の前記培養培地が、タンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤を含む、請求項１１２または１１３に記載の方法。

【請求項１１６】

ステップ（ａ）またはステップ（ｂ）の前記培養培地が、約０．１μＭ～約１０μＭの濃度の前記ＡＫＴ阻害剤を含む、請求項１１５に記載の方法。

【請求項１１７】

ステップ（ａ）またはステップ（ｂ）の前記培養培地が、約１μＭの濃度の前記ＡＫＴ阻害剤を含む、請求項１１６に記載の方法。

【請求項１１８】

ステップ（ａ）及び／またはステップ（ｂ）の前記培養培地が、ＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む、請求項１１２～１１７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１１９】

ステップ（ａ）及び／またはステップ（ｂ）の前記培養培地が、約１ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬの濃度のＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む、請求項１１８に記載の方法。

【請求項１２０】

ステップ（ａ）及び／またはステップ（ｂ）の前記培養培地が、約１０ｎｇ／ｍＬの濃度のＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む、請求項１１８に記載の方法。

【請求項１２１】

ステップ（ａ）及び／またはステップ（ｂ）のＤ０、Ｄ１またはＤ２中に、２００ｎｇ／ｍｌの濃度のＩＦＮγ及び抗ＰＤ－１抗体を添加することをさらに含む、請求項１１２～１２０のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２２】

ステップ（ａ）及び／またはステップ（ｂ）のＤ０、Ｄ１またはＤ２中に、ＣＤ４０アゴニスト及び／またはＣＴＬＡ－４の阻害剤を添加することをさらに含む、請求項１１２～１２１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２３】

前記ＡＫＴ阻害剤が、イパタセルチブ、ＧＳＫ６９０６９３、ＧＳＫ２１４１７９５、ＧＳＫ２１１０１８３、ＡＺＤ５３６３、ＧＤＣ－００６８、ＡＴ７８６７、ＣＣＴ１２８９３０、ＭＫ－２２０６、ＢＡＹ１１２５９７６、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択される、請求項１１５～１２２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２４】

前記ＡＫＴ阻害剤が、ＡＺＤ５３６３である、請求項１１５～１２２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２５】

前記方法が、複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍消化物を取得するステップを含む、請求項１１２～１２３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２６】

前記第１のＴＩＬ集団が、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から取得される、請求項１１２～１２５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２７】

前記第２の拡張中に、前記第２のＴＩＬ集団を１つ以上の培養物に分割し、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む追加の細胞培養培地で補充する、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２８】

前記第２のＴＩＬ集団が、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の培養物に分割される、請求項１２７に記載の方法。

【請求項１２９】

前記第２のＴＩＬ集団が、前記第２の拡張の２日目、前記第２の拡張の３日目、前記第２の拡張の４日目、または前記第２の拡張の５日目に分割される、請求項１２７または１２８に記載の方法。

【請求項１３０】

前記閉鎖系が、任意選択である、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１３１】

前記系が、閉鎖していない、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本出願は、２０２２年９月９日に出願された米国仮出願第６３／３７５，２０９号、及び２０２２年４月１５日に出願された米国仮出願第６３／３３１，７５７号の優先権を主張し、これらのすべては、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【０００２】

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

【０００３】

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

【０００４】
本発明は、治療効果が増加し、エフェクター分化が減少し、記憶及び幹様属性が改善され、機能性が増加した治療的ＴＩＬ集団を調製するために、サイトカイン及び他の細胞培養培地成分の特定の組み合わせを有するＴＩＬを調製するための改善されたプロセス及び方法を提供する。
【発明の概要】
【０００５】
（ｉ）インターフェロンガンマ（ＩＦＮγ）、抗ＰＤ－１、ＣＤ４０アゴニズム、及び／またはＣＴＬＡ－４アゴニズムの組み合わせによるＲＥＰ前刺激、（ｉｉ）ＲＥＰ拡張及び／またはＲＥＰ前拡張中のＩＬ－２１、ＩＬ－１５、低濃度ＩＬ－２、及びＡＫＴ阻害剤（ＡＫＴｉ）の様々な組み合わせ、（ｉｉｉ）ＲＥＰ拡張及び／またはＲＥＰ前拡張中の低濃度ＩＬ－２及び／またはＡＫＴｉ、（ｉｖ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせ、または（ｖ）（ｉ）及び（ｉｉｉ）の組み合わせを介して、ＴＩＬ集団を産生する方法が、本明細書で提供される。
【０００６】
本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、この方法は、
（ａ）がん患者から腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、切除するステップと、
（ｂ）腫瘍を複数の腫瘍断片に処理するステップと、
（ｃ）複数の腫瘍断片を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、Ｄ３、Ｄ４、Ｄ５、Ｄ６またはＤ７に置き換えられる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下のＩＬ－２、及び／またはタンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、Ｄ３、Ｄ４、Ｄ５、Ｄ６またはＤ７に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｆ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｇ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すステップと、
（ｈ）任意選択で、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、を含む、方法を提供する。
【０００７】
本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、この方法は、
（ａ）がん患者から腫瘍を取得するステップであって、腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、取得するステップと、
（ｂ）腫瘍を腫瘍消化物に処理するステップと、
（ｃ）腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガ

ス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第１の拡張の３日目、第１の拡張の４日目、第１の拡張の５日目、第１の拡張の６日目、または第１の拡張の７日目に置き換えられる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第２の拡張の３日目、第２の拡張の４日目、第２の拡張の５日目、第２の拡張の６日目、または第２の拡張の７日目に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｆ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｇ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こる、移すステップと、を含む、方法を提供する。

【０００８】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、この方法は、
（ａ）がん患者から腫瘍を取得するステップであって、腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、取得するステップと、
（ｂ）腫瘍を腫瘍断片または腫瘍消化物に処理するステップと、
（ｃ）腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第１の拡張の３日目、第１の拡張の４日目、第１の拡張の５日目、第１の拡張の６日目、または第１の拡張の７日目に置き換えられる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第２の拡張の３日目、第２の拡張の４日目、第２の拡張の５日目、第２の拡張の６日目、または第２の拡張の７日目に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｆ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｇ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こる、移すステップと、を含む、方法を提供する。

【０００９】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、この方法は、

（ａ）がん患者から腫瘍を取得するステップであって、腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、取得するステップと、
（ｂ）腫瘍を腫瘍消化物に処理し、腫瘍消化物を凍結保存するステップと、
（ｃ）凍結保存した腫瘍消化物を解凍し、腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第１の拡張の３日目、第１の拡張の４日目、第１の拡張の５日目、第１の拡張の６日目、または第１の拡張の７日目に置き換えられる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第２の拡張の３日目、第２の拡張の４日目、第２の拡張の５日目、第２の拡張の６日目、または第２の拡張の７日目に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｆ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｇ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すステップと、を含む、方法を提供する。

【００１０】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、この方法は、
（ａ）がん患者から取得された腫瘍から取得された腫瘍断片を培養することによって第１の拡張を行い、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を生成して、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第１の拡張の３日目、第１の拡張の４日目、第１の拡張の５日目、第１の拡張の６日目、または第１の拡張の７日目に置き換えられる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｂ）第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第２の拡張の３日目、第２の拡張の４日目、第２の拡張の５日目、第２の拡張の６日目、または第２の拡張の７日目に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）ステップ（ｂ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｄ）ステップ（ｇ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、閉鎖系を開くことなく起こ

る、移すステップと、を含む、方法を提供する。
【００１１】
本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、この方法は、
（ａ）がん患者から取得された腫瘍から取得された腫瘍消化物を培養することによって第１の拡張を行い、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を生成して、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第１の拡張の３日目、第１の拡張の４日目、第１の拡張の５日目、第１の拡張の６日目、または第１の拡張の７日目に置き換えられる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｂ）第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行が、鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第２の拡張の３日目、第２の拡張の４日目、第２の拡張の５日目、第２の拡張の６日目、または第２の拡張の７日目に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）ステップ（ｂ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｄ）ステップ（ｇ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、閉鎖系を開くことなく起こる、移すステップと、を含む、方法を提供する。
【００１２】
本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、この方法は、
（ａ）がん患者から取得された腫瘍から取得された腫瘍断片または腫瘍消化物を培養することによって第１の拡張を行い、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を生成して、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第１の拡張の３日目、第１の拡張の４日目、第１の拡張の５日目、第１の拡張の６日目、または第１の拡張の７日目に置き換えられる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｂ）第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行が、鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第２の拡張の３日目、第２の拡張の４日目、第２の拡張の５日目、第２の拡張の６日目、または第２の拡張の７日目に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）ステップ（ｂ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｄ）ステップ（ｇ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、閉鎖系を開くことなく起こ

る、移すステップと、を含む、方法を提供する。
【００１３】
本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、この方法は、
（ａ）がん患者から取得された腫瘍から取得された凍結保存した腫瘍消化物を解凍し、腫瘍消化物を培養することによって第１の拡張を行い、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を生成して、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第１の拡張の３日目、第１の拡張の４日目、第１の拡張の５日目、第１の拡張の６日目、または第１の拡張の７日目に置き換えられる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｂ）第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行が、鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第２の拡張の３日目、第２の拡張の４日目、第２の拡張の５日目、第２の拡張の６日目、または第２の拡張の７日目に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）ステップ（ｂ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｄ）ステップ（ｇ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、閉鎖系を開くことなく起こる、移すステップと、を含む、方法を提供する。
【００１４】
凍結保存プロセスを使用して、採取された第３のＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップをさらに含む、請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。
【００１５】
本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、この方法は、
（ａ）がん患者から腫瘍を取得するステップであって、腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、取得するステップと、
（ｂ）腫瘍を複数の腫瘍断片に処理するステップと、
（ｃ）複数の腫瘍断片を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第１の拡張の３日目、第１の拡張の４日目、第１の拡張の５日目、第１の拡張の６日目、または第１の拡張の７日目に置き換えられる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第２の拡張の３日目、第２の拡張の４日目、第２の拡張の５日目、第２の拡張の６日目、または第２の拡張の７日目に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップ

と、を含む、方法を提供する。
【００１６】
本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、この方法は、
（ａ）がん患者から腫瘍を取得するステップであって、腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、取得するステップと、
（ｂ）腫瘍を腫瘍消化物に処理するステップと、
（ｃ）腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第１の拡張の３日目、第１の拡張の４日目、第１の拡張の５日目、第１の拡張の６日目、または第１の拡張の７日目に置き換えられる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第２の拡張の３日目、第２の拡張の４日目、第２の拡張の５日目、第２の拡張の６日目、または第２の拡張の７日目に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、を含む、方法を提供する。
【００１７】
本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、この方法は、
（ａ）がん患者から腫瘍を取得するステップであって、腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、取得するステップと、
（ｂ）腫瘍を腫瘍断片または腫瘍消化物に処理するステップと、
（ｃ）腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第１の拡張の３日目、第１の拡張の４日目、第１の拡張の５日目、第１の拡張の６日目、または第１の拡張の７日目に置き換えられる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第２の拡張の３日目、第２の拡張の４日目、第２の拡張の５日目、第２の拡張の６日目、または第２の拡張の７日目に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、を含む、方法を提供する。
【００１８】
本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、この方法は、
（ａ）がん患者から腫瘍を取得するステップであって、腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、取得するステップと、
（ｂ）腫瘍を腫瘍消化物に処理し、腫瘍消化物を凍結保存するステップと、

（ｃ）凍結保存した腫瘍消化物を解凍し、腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第１の拡張の３日目、第１の拡張の４日目、第１の拡張の５日目、第１の拡張の６日目、または第１の拡張の７日目に置き換えられる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第２の拡張の３日目、第２の拡張の４日目、第２の拡張の５日目、第２の拡張の６日目、または第２の拡張の７日目に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｆ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｇ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こる、移すステップと、を含む、方法を提供する。

【００１９】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、この方法は、
（ａ）がん患者から取得された腫瘍から取得された腫瘍断片を培養することによって第１の拡張を行い、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を生成して、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第１の拡張の３日目、第１の拡張の４日目、第１の拡張の５日目、第１の拡張の６日目、または第１の拡張の７日目に置き換えられる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｂ）第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第２の拡張の３日目、第２の拡張の４日目、第２の拡張の５日目、第２の拡張の６日目、または第２の拡張の７日目に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、を含む、方法を提供する。

【００２０】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、この方法は、
（ａ）がん患者から取得された腫瘍から取得された腫瘍消化物を培養することによって第１の拡張を行い、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を生成して、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第１の拡張の３日目、第１の拡張の４日目、第１の拡張の５日

目、第１の拡張の６日目、または第１の拡張の７日目に置き換えられる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｂ）第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第２の拡張の３日目、第２の拡張の４日目、第２の拡張の５日目、第２の拡張の６日目、または第２の拡張の７日目に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、を含む、方法を提供する。

【００２１】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、この方法は、
（ａ）がん患者から取得された腫瘍から取得された腫瘍断片または腫瘍消化物を培養することによって第１の拡張を行い、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を生成して、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第１の拡張の３日目、第１の拡張の４日目、第１の拡張の５日目、第１の拡張の６日目、または第１の拡張の７日目に置き換えられる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｂ）第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第２の拡張の３日目、第２の拡張の４日目、第２の拡張の５日目、第２の拡張の６日目、または第２の拡張の７日目に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、を含む、方法を提供する。

【００２２】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、この方法は、
（ａ）がん患者から取得された腫瘍から取得された凍結保存した腫瘍消化物を解凍し、腫瘍消化物を培養することによって第１の拡張を行い、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を生成して、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第１の拡張の３日目、第１の拡張の４日目、第１の拡張の５日目、第１の拡張の６日目、または第１の拡張の７日目に置き換えられる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｂ）第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ以下の濃度のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行が、閉鎖系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、第２の拡張の３日目、第２の拡張の４日目、第２の拡張の５日目、第２の拡張の６日目、または第２の拡張の７日目に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、を含む、方法を提供する。

【００２３】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、より低い用量のＩＬ－２である。
【００２４】
いくつかの実施形態では、ステップ（ｄ）の培養培地は、３０００ＩＵ／ｍＬ以下のＩＬ－２、及び／またはタンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤を含む。
【００２５】
いくつかの実施形態では、ステップ（ｅ）の培養培地は、タンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤を含む。
【００２６】
いくつかの実施形態では、ステップ（ｄ）及び／またはステップ（ｅ）の培養培地は、ＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む。
【００２７】
いくつかの実施形態では、方法は、ステップ（ｄ）のＤ０、Ｄ１またはＤ２中に、２００ｎｇ／ｍｌの濃度のＩＦＮγ及び抗ＰＤ－１抗体を添加することをさらに含む。
【００２８】
いくつかの実施形態では、方法は、ステップ（ｄ）のＤ０、Ｄ１またはＤ２中に、ＣＤ４０アゴニスト及び／またはＣＴＬＡ－４の阻害剤を添加することをさらに含む。
【００２９】
いくつかの実施形態では、ステップ（ａ）の後かつステップ（ｂ）の前に、方法は、複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、第１のＴＩＬ集団を取得するステップを含む。
【００３０】
いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団は、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から取得される。
【００３１】
いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イパタセルチブ、ＧＳＫ６９０６９３、ＧＳＫ２１４１７９５、ＧＳＫ２１１０１８３、ＡＺＤ５３６３、ＧＤＣ－００６８、ＡＴ７８６７、ＣＣＴ１２８９３０、ＭＫ－２２０６、ＢＡＹ１１２５９７６、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド（Ｔｅｈｒａｎｏｌｉｄｅ）、イソリキリゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択される。
【００３２】
本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、この方法は、
（ａ）がん患者から腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、切除するステップと、
（ｂ）腫瘍を複数の腫瘍断片に処理するステップと、
（ｃ）複数の腫瘍断片を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、Ｄ３、Ｄ４、Ｄ５、Ｄ６またはＤ７に置き換えられる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団を含み、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、Ｄ３、Ｄ４、Ｄ５、Ｄ６またはＤ７に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｆ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ス

テップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｇ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すステップと、
（ｈ）任意選択で、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、を含む、方法を提供する。
【００３３】
いくつかの実施形態では、ステップ（ｄ）における培養培地は、ＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む。
【００３４】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、より低い用量のＩＬ－２である。
【００３５】
いくつかの実施形態では、ステップ（ｄ）及び／またはステップ（ｅ）における培養培地は、３０００ＩＵ／ｍＬ以下のＩＬ－２、及び／またはタンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤を含む。
【００３６】
いくつかの実施形態では、方法は、ステップ（ｄ）におけるＤ０、Ｄ１またはＤ２中に、２００ｎｇ／ｍｌの濃度のＩＦＮγ及び抗ＰＤ－１抗体を添加することをさらに含む。
【００３７】
いくつかの実施形態では、方法は、ステップ（ｄ）におけるＤ０、Ｄ１またはＤ２中に、ＣＤ４０アゴニスト及び／またはＣＴＬＡ－４の阻害剤を添加することをさらに含む。
【００３８】
いくつかの実施形態では、ステップ（ａ）の後かつステップ（ｂ）の前に、方法は、複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、第１のＴＩＬ集団を取得するステップを含む。
【００３９】
いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団は、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から取得される。
【００４０】
いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イパタセルチブ、ＧＳＫ６９０６９３、ＧＳＫ２１４１７９５、ＧＳＫ２１１０１８３、ＡＺＤ５３６３、ＧＤＣ－００６８、ＡＴ７８６７、ＣＣＴ１２８９３０、ＭＫ－２２０６、ＢＡＹ１１２５９７６、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択される。
【００４１】
本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、この方法は、
（ａ）がん患者から腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、切除するステップと、
（ｂ）腫瘍を複数の腫瘍断片に処理するステップと、
（ｃ）複数の腫瘍断片を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張は、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張は、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ＩＦＮγ及び／またはＰＤ－１の阻害剤は、ステップ（ｄ）のＤ０、Ｄ１またはＤ２中に添加され、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地は、Ｄ３、Ｄ４、Ｄ５、Ｄ６またはＤ７に置き換えられる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を有する細胞培養培地中で培養することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップ

であって、第２の拡張は、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団は、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張は、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行は、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地は、Ｄ３、Ｄ４、Ｄ５、Ｄ６またはＤ７に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

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

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

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

【００４２】

いくつかの実施形態では、ステップ（ｄ）のＤ０、Ｄ１またはＤ２中に、ＣＤ４０アゴニスト及び／またはＣＴＬＡ－４の阻害剤を添加することをさらに含む。

【００４３】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、より低い用量のＩＬ－２である。

【００４４】

いくつかの実施形態では、ステップ（ｄ）及び／またはステップ（ｅ）の培養培地は、３０００ＩＵ／ｍＬ以下のＩＬ－２、及び／またはタンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤を含む。

【００４５】

いくつかの実施形態では、ステップ（ｄ）及び／またはステップ（ｅ）の培養培地は、ＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む。

【００４６】

いくつかの実施形態では、ステップ（ａ）の後かつステップ（ｂ）の前に、方法は、複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、第１のＴＩＬ集団を取得するステップを含む。

【００４７】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団は、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から取得される。

【００４８】

いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イパタセルチブ、ＧＳＫ６９０６９３、ＧＳＫ２１４１７９５、ＧＳＫ２１１０１８３、ＡＺＤ５３６３、ＧＤＣ－００６８、ＡＴ７８６７、ＣＣＴ１２８９３０、ＭＫ－２２０６、ＢＡＹ１１２５９７６、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択される。

【００４９】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、この方法は、

（ａ）がん患者から腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、切除するステップと、

（ｂ）第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）を含み、任意選択でＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む細胞培養培地中で培養することによって初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行うステップであって、プライミングによる第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が、約１～８日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、Ｄ３、Ｄ４、Ｄ５、Ｄ６またはＤ７に置き換えられる、初期拡張を行うステップと、

（ｃ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２の細胞培養培地が、３０００ＩＵ／ｍＬ以下のＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、ＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１、ＡＰＣ、及び／またはタンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤を含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日にわたって進行することができ、任意選択で、細胞培養培地が、Ｄ３、Ｄ４、Ｄ５、Ｄ６またはＤ７に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

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

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

【００５０】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、より低い用量のＩＬ－２である。

【００５１】

いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）の培養培地は、３０００ＩＵ／ｍＬ以下のＩＬ－２、及び／またはタンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤を含む。

【００５２】

いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）及び／またはステップ（ｃ）の培養培地は、ＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む。

【００５３】

いくつかの実施形態では、方法は、ステップ（ｂ）のＤ０、Ｄ１またはＤ２中に、２００ｎｇ／ｍｌの濃度のＩＦＮγ及びＰＤ－１の阻害剤を添加することをさらに含む。

【００５４】

いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）のＤ０、Ｄ１またはＤ２中に、ＣＤ４０アゴニスト及び／またはＣＴＬＡ－４の阻害剤を添加することをさらに含む。

【００５５】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団は、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から取得される。

【００５６】

いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イパタセルチブ、ＧＳＫ６９０６９３、ＧＳＫ２１４１７９５、ＧＳＫ２１１０１８３、ＡＺＤ５３６３、ＧＤＣ－００６８、ＡＴ７８６７、ＣＣＴ１２８９３０、ＭＫ－２２０６、ＢＡＹ１１２５９７６、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択される。

【００５７】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、この方法は、

（ａ）がん患者から腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、切除するステップと、

（ｂ）第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）を含み、任意選択でＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む細胞培養培地中で培養することによって初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行うステップであって、プライミングによる第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が、約１～８日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、Ｄ３、Ｄ４、Ｄ５、Ｄ６またはＤ７に置き換えられる、初期拡張を行うステップと、

（ｃ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、ＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１、ＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日にわたって進行することができ、任意選択で、細胞培養培地が、Ｄ３、Ｄ４、Ｄ５、Ｄ６またはＤ７に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

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

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

【００５８】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、より低い用量のＩＬ－２である。

【００５９】

いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）及び／またはステップ（ｃ）の培養培地は、３０００ＩＵ／ｍＬ以下のＩＬ－２、及び／またはタンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤を含む。

【００６０】

いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）及び／またはステップ（ｃ）の培養培地は、ＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む。

【００６１】

いくつかの実施形態では、方法は、ステップ（ｂ）のＤ０、Ｄ１またはＤ２中に、２００ｎｇ／ｍｌの濃度のＩＦＮｇ及びＰＤ－１の阻害剤を添加することをさらに含む。

【００６２】

いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）のＤ０、Ｄ１またはＤ２中に、ＣＤ４０アゴニスト及び／またはＣＴＬＡ－４の阻害剤を添加することをさらに含む。

【００６３】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団は、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から取得される。

【００６４】

いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イパタセルチブ、ＧＳＫ６９０６９３、ＧＳＫ２１４１７９５、ＧＳＫ２１１０１８３、ＡＺＤ５３６３、ＧＤＣ－００６８、ＡＴ７８６７、ＣＣＴ１２８９３０、ＭＫ－２２０６、ＢＡＹ１１２５９７６、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択される。

【００６５】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を作製する方法であって、この方法は、

（ａ）がん患者から腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、切除するステップと、

（ｂ）第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）を含み、任意選択でＩＬ－１５またはＩＬ－２１を含む細胞培養培地中で培養することによって初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行うステップであって、プライミングによる第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が、約１～８日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ＩＦＮγ及び／またはＰＤ－１の阻害剤が、ステップ（ｂ）のＤ０、Ｄ１またはＤ２中に添加され、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、任意選択で、細胞培養培地が、Ｄ３、Ｄ４、Ｄ５、Ｄ６またはＤ７に置

き換えられる、初期拡張を行うステップと、
（ｃ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）を含み、かつ任意選択で、ＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１、ＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日にわたって進行することができる、任意選択で、細胞培養培地が、Ｄ３、Ｄ４、Ｄ５、Ｄ６またはＤ７に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｇ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すステップと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、を含む、方法を提供する。

【００６６】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、より低い用量のＩＬ－２である。

【００６７】
いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）及び／またはステップ（ｃ）の培養培地は、３０００ＩＵ／ｍＬ以下のＩＬ－２、及び／またはタンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤を含む。

【００６８】
いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）及び／またはステップ（ｃ）の培養培地は、ＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む。

【００６９】
いくつかの実施形態では、方法は、ステップ（ｄ）のＤ０、Ｄ１またはＤ２中に、２００ｎｇ／ｍｌの濃度のＩＦＮγ及びＰＤ－１の阻害剤を添加することをさらに含む。

【００７０】
いくつかの実施形態では、方法は、ステップ（ｄ）におけるＤ０、Ｄ１またはＤ２中に、ＣＤ４０アゴニスト及び／またはＣＴＬＡ－４の阻害剤を添加することをさらに含む。

【００７１】
いくつかの実施形態では、ステップ（ａ）の後かつステップ（ｂ）の前に、方法は、複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、第１のＴＩＬ集団を取得するステップを含む。

【００７２】
いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団は、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から取得される。

【００７３】
いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イパタセルチブ、ＧＳＫ６９０６９３、ＧＳＫ２１４１７９５、ＧＳＫ２１１０１８３、ＡＺＤ５３６３、ＧＤＣ－００６８、ＡＴ７８６７、ＣＣＴ１２８９３０、ＭＫ－２２０６、ＢＡＹ１１２５９７６、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択される。

【００７４】
いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされたがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される。

【００７５】
いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団は、ＩＦＮｇ（インターフェロンガンマ）

、ＰＤ－１の阻害剤（例えば、抗ＰＤ－１抗体）、ＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌ、抗ＣＤ４０アゴニスト抗体）、及び／またはＣＴＬＡ－４アゴニスト（例えば、抗ＣＴＬＡ－４アゴニスト抗体）で、第１の拡張前に最大約４８時間、及び任意選択で、第１の拡張前に２４時間または４８時間刺激される。

【００７６】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張ステップでは、細胞培養培地は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）をさらに含み、急速な第２の拡張ステップにおける培養培地中のＡＰＣの数は、プライミングによる第１の拡張ステップにおける培養培地中のＡＰＣの数より多い。

【００７７】

いくつかの実施形態では、抗原提示細胞（ＡＰＣ）は、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、または両方に添加される。

【００７８】

いくつかの実施形態では、ＣＤ４０またはＣＤ４０Ｌは、刺激中、細胞培養培地中に約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する。

【００７９】

いくつかの実施形態では、ＩＦＮｇは、刺激中、細胞培養培地中に約２００ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する。

【００８０】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１００００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。

【００８１】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第２の拡張において、細胞培養培地中に１００００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。

【００８２】

いくつかの実施形態では、低用量のＩＬ－２は、１０００ＩＵ／ｍＬ以下を含む。

【００８３】

いくつかの実施形態では、第１の拡張の細胞培養培地は、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。

【００８４】

いくつかの実施形態では、第２の拡張の細胞培養培地は、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。

【００８５】

いくつかの実施形態では、刺激の細胞培養培地は、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。

【００８６】

いくつかの実施形態では、第１の拡張は、約１１日の期間にわたって行われる。

【００８７】

いくつかの実施形態では、第１の拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。

【００８８】

いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。

【００８９】

いくつかの実施形態では、刺激は、ガス透過性容器を使用して行われる。

【００９０】

本発明はまた、本明細書に記載の方法を使用して製造されるＴＩＬ集団を提供する。

【００９１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}

のＴＩＬを含む。
【００９２】
本発明はまた、本明細書に記載のＴＩＬ集団を含む薬学的組成物を提供する。
【００９３】
本発明はまた、本明細書に記載のＴＩＬ集団またはその薬学的組成物を投与することを含む、がん患者を治療する方法を提供する。
【００９４】
いくつかの実施形態では、方法は、第３のＴＩＬ集団を患者に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。
【００９５】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む。
【００９６】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、及びフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む。
【００９７】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、及びフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で１日間投与するステップを含む。
【００９８】
いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。
【００９９】
いくつかの実施形態では、方法は、ＴＩＬを患者に投与した翌日に開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。
【０１００】
いくつかの実施形態では、方法は、ＴＩＬを患者に投与したのと同じ日に開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。
【０１０１】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される、６００，０００もしくは７２０，０００ＩＵ／ｋｇのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを含む高用量ＩＬ－２レジメンである。
【０１０２】
いくつかの実施形態では、治療上有効なＴＩＬ集団が投与され、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}のＴＩＬを含む。
【０１０３】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子修飾されたＴＩＬを含み、任意選択で、第１のＴＩＬ集団及び／または第２のＴＩＬ集団は、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現を減少させるように遺伝子修飾される。
【０１０４】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡ

Ｄ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、及びＴＯＸを含む群から選択される免疫チェックポイント遺伝子のうちの１つ以上の発現を減少させる、遺伝子修飾をさらに含む。

【０１０５】

いくつかの実施形態では、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＢＬ－Ｂ、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβ、及びＰＫＡを含む群から選択される。

【０１０６】

いくつかの実施形態では、遺伝子修飾されたＴＩＬは、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる遺伝子修飾をさらに含み、免疫チェックポイント遺伝子（複数可）は、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ　１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）、及び／またはＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１を含む群から選択される。

【０１０７】

いくつかの実施形態では、遺伝子修飾ステップは、当該１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼを使用して行われる。

【０１０８】

いくつかの実施形態では、遺伝子修飾は、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、ジンクフィンガー法、及びそれらの組み合わせから選択される１つ以上の方法を使用して行われる。

【０１０９】

いくつかの実施形態では、方法は、ＣＲＩＳＰＲ法を含む。

【０１１０】

いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ法は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９法である。

【０１１１】

いくつかの実施形態では、遺伝子修飾は、ＴＡＬＥ法を含む。

【０１１２】

いくつかの実施形態では、遺伝子修飾は、ジンクフィンガー法を含む。

【０１１３】

いくつかの実施形態では、対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することは、腫瘍試料を酵素培地中でインキュベートすることを含む。

【０１１４】

いくつかの実施形態では、対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することは、腫瘍試料を機械的に破壊して腫瘍試料を解離することをさらに含む。

【０１１５】

いくつかの実施形態では、対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することは、密度勾配分離を使用して解離された腫瘍試料を精製することをさらに含む。

【０１１６】

いくつかの実施形態では、酵素培地は、ＤＮａｓｅを含む。

【０１１７】

いくつかの実施形態では、酵素培地は、３０単位／ｍＬのＤＮａｓｅを含む。

【０１１８】

いくつかの実施形態では、酵素培地は、コラゲナーゼを含む。

【０１１９】

いくつかの実施形態では、酵素培地は、１．０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼを含む。

【０１２０】

いくつかの実施形態では、採取された治療的ＴＩＬ集団は、治療上有効な投与量を対象

に投与する際に使用するのに十分なＴＩＬを含む。
【０１２１】
いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約１×１０^{9}～約９×１０^{10}のＴＩＬを含む。
【０１２２】
いくつかの実施形態では、ＡＰＣは、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を含む。
【０１２３】
いくつかの実施形態では、ステップ（ｅ）で採取された治療的ＴＩＬ集団は、第１及び／または第２のＴＩＬ集団と比較して増加したＣＤ４＋細胞の亜集団を示す。
【０１２４】
いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、約１：２５のＴＩＬ：ＰＢＭＣの比で補充される。
【０１２５】
いくつかの実施形態では、第１の拡張ステップは、約３～１１日で行われる。
【０１２６】
いくつかの実施形態では、第２の拡張ステップは、約７～１１日で行われる。
【０１２７】
いくつかの実施形態では、第１の拡張及び第２の拡張は、各々、１１日の期間内で個別に行われる。
【０１２８】
いくつかの実施形態では、ステップにおける第１の拡張及びステップにおける第２の拡張は、各々、１１～１２日の期間内で個別に行われる。
【０１２９】
いくつかの実施形態では、ステップ（ａ）～（ｅ）、（ｆ）、（ｇ）、または（ｈ）は、約１０日～約２４日で行われる。
【０１３０】
いくつかの実施形態では、ステップ（ａ）～（ｅ）、（ｆ）、（ｇ）、（ｈ）は、約１５日～約２４日で行われる。
【０１３１】
いくつかの実施形態では、ステップ（ａ）～（ｅ）、（ｆ）、（ｇ）、または（ｈ）は、約２０日～約２４日で行われる。
【０１３２】
いくつかの実施形態では、ステップ（ａ）～（ｅ）、（ｆ）、（ｇ）、（ｈ）は、約２０日～約２２日で行われる。
【０１３３】
いくつかの実施形態では、拡張プロセス（ステップ（ａ）～（ｆ））は、約２２日以内で行われる。
【０１３４】
いくつかの実施形態では、拡張プロセス（ステップ（ａ）～（ｆ））は、約２４日以内で行われる。
【０１３５】
いくつかの実施形態では、拡張プロセス（ステップ（ａ）～（ｆ））は、約２６日以内で行われる。
【０１３６】
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張及び急速な第２の拡張は、２１日以内の期間にわたって行われる。
【０１３７】
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張及び急速な第２の拡張は、１６日または１７日以内の期間にわたって行われる。
【０１３８】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、７日または８日以内の期間にわたって行われる。

【０１３９】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、１１日以内の期間にわたって行われる。

【０１４０】

いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数が少なくとも５０倍多い。

【０１４１】

いくつかの実施形態では、低用量のＩＬ－２は、１００～３０００ＩＵ／ｍＬ、任意選択で１０００ＩＵ／ｍＬ未満である。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５の濃度は、約１０ｎｇ／ｍＬである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、約１ｎｇ／ｍＬ、約２ｎｇ／ｍＬ、約３ｎｇ／ｍＬ、約４ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約４５ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約５５ｎｇ／ｍＬ、または約６０ｎｇ／ｍＬ、任意選択で、約１０ｎｇ／ｍＬで添加される。

【０１４３】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１の濃度は、約１ｎｇ／ｍＬ、約２ｎｇ／ｍＬ、約３ｎｇ／ｍＬ、約４ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約４５ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約５５ｎｇ／ｍＬ、または約６０ｎｇ／ｍＬ、任意選択で、約１０ｎｇ／ｍＬである。

【０１４４】

いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤の濃度は、約１ｕＭ、約２ｕＭ、約３ｕＭ、約４ｕＭ、約５ｕＭ、約１０ｕＭ、約２０ｕＭ、約３０ｕＭ、約４０ｕＭ、約５０ｕＭ、または約１００ｕＭ、任意選択で約５ｕＭである。

【０１４５】

いくつかの実施形態では、刺激のためのＩＦＮｇ（インターフェロンガンマ）の濃度は、２００ｎｇ／ｍｌである。

【０１４６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１の阻害剤は、抗ＰＤ－１抗体である。

【０１４７】

いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、ペムブロリズマブまたはニボルマブである。

【０１４８】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４の阻害剤は、抗ＣＴＬＡ－４抗体である。

【０１４９】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４アゴニストは、ＣＴＬＡ－４抗体である。

【０１５０】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４抗体は、イピリムマブ、トレメリムマブ、またはザリフレリマブである。

【０１５１】

本発明はまた、本明細書に記載の方法のうちのいずれかによるＴＩＬ集団を提供する。

【０１５２】

本発明はまた、本明細書に記載の方法のうちのいずれかによる凍結保存されたＴＩＬ集団を提供する。

【０１５３】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は１０００ＩＵ／ｍｌであり、ＩＬ－２１は、１０

ｎｇ／ｍｌであり、ＡＫＴｉは、５ｕＭである。
【０１５４】
本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、
（ａ）ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で、がん患者からの腫瘍から取得された第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が、約１～７／８日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多く、任意選択で、細胞培養培地が、第１の拡張の３日目、第１の拡張の４日目、第１の拡張の５日目、第１の拡張の６日目、または第１の拡張の７日目に置き換えられる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｂ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣで補充することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張に追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）で追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、任意選択で、細胞培養培地が、第２の拡張の３日目、第２の拡張の４日目、第２の拡張の５日目、第２の拡張の６日目、または第２の拡張の７日目に置き換えられる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）ステップ（ｂ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、方法を提供する。
【０１５５】
いくつかの実施形態では、方法は、
（ｄ）ステップ（ｃ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すことと、
（ｅ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｄ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、をさらに含む。
【０１５６】
いくつかの実施形態では、ステップ（ａ）における培養培地は、３０００ＩＵ／ｍＬ以下のＩＬ－２、及び／またはタンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤を含む。
【０１５７】
いくつかの実施形態では、ステップ（ａ）またはステップ（ｂ）における培養培地は、タンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤を含む。
【０１５８】
いくつかの実施形態では、ステップ（ａ）またはステップ（ｂ）における培養培地は、約０．１μＭ～約１０μＭの濃度のＡＫＴ阻害剤を含む。
【０１５９】
いくつかの実施形態では、ステップ（ａ）またはステップ（ｂ）における培養培地は、約１μＭの濃度のＡＫＴ阻害剤を含む。
【０１６０】
いくつかの実施形態では、ステップ（ａ）及び／またはステップ（ｂ）の培養培地は、ＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む。
【０１６１】
いくつかの実施形態では、ステップ（ａ）及び／またはステップ（ｂ）の培養培地は、約１ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬの濃度のＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む。
【０１６２】
いくつかの実施形態では、ステップ（ａ）及び／またはステップ（ｂ）の培養培地は、約１０ｎｇ／ｍＬの濃度のＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む。
【０１６３】

いくつかの実施形態では、方法は、ステップ（ａ）及び／またはステップ（ｂ）のＤ０、Ｄ１またはＤ２中に、２００ｎｇ／ｍｌの濃度のＩＦＮγ及び抗ＰＤ－１抗体を添加することをさらに含む。

【０１６４】

いくつかの実施形態では、ステップ（ａ）及び／またはステップ（ｂ）のＤ０、Ｄ１またはＤ２中に、ＣＤ４０アゴニスト及び／またはＣＴＬＡ－４の阻害剤を添加することをさらに含む。

【０１６５】

いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イパタセルチブ、ＧＳＫ６９０６９３、ＧＳＫ２１４１７９５、ＧＳＫ２１１０１８３、ＡＺＤ５３６３、ＧＤＣ－００６８、ＡＴ７８６７、ＣＣＴ１２８９３０、ＭＫ－２２０６、ＢＡＹ１１２５９７６、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択される。

【０１６６】

いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＡＺＤ５３６３である。

【０１６７】

いくつかの実施形態では、方法は、複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍消化物を取得するステップを含む。

【０１６８】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団は、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から取得される。

【０１６９】

いくつかの実施形態では、第２の拡張中に、第２のＴＩＬ集団を１つ以上の培養物に分割し、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む追加の細胞培養培地で補充する。

【０１７０】

第２のＴＩＬ集団が、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の培養物に分割される、請求項１１９に記載の方法。

【０１７１】

いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団は、第２の拡張の２日目、第２の拡張の３日目、第２の拡張の４日目、または第２の拡張の５日目に分割される。

【０１７２】

いくつかの実施形態では、閉鎖系が、任意選択である、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。

【０１７３】

いくつかの実施形態では、系が、閉鎖していない、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。

【０１７４】

本開示のいくつかの実施形態は、本明細書に開示される方法を使用して製造される治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【０１７５】

いくつかの実施形態では、治療的ＴＩＬ集団は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}のＴＩＬを含む。

【０１７６】

いくつかの実施形態では、治療的ＴＩＬ集団は、約１×10^{9}～約１×10^{11}のＴＩＬを含む。

【０１７７】

いくつかの実施形態では、治療的ＴＩＬ集団は、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、増強された多官能性を示す。

【０１７８】

いくつかの実施形態では、治療的ＴＩＬ集団は、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、より幹様の表現型を示す。

【０１７９】

いくつかの実施形態では、治療的ＴＩＬ集団は、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、活性化及び／または分化の少ないＴＩＬの頻度の増加を示す。

【０１８０】

いくつかの実施形態では、治療的ＴＩＬ集団は、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、同種異系設定で改善された腫瘍細胞殺傷を示す。

【０１８１】

いくつかの実施形態では、治療的ＴＩＬ集団は、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ６２Ｌ、及びＩＬ－７Ｒからなる群から選択されるメモリー関連マーカーの増加した発現を示す。

【０１８２】

いくつかの実施形態では、治療的ＴＩＬ集団は、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、ＣＤ３８、ＣＤ３９、及びＣＤ６９からなる群から選択される活性化マーカーの発現の低下を示す。

【０１８３】

いくつかの実施形態では、治療的ＴＩＬ集団は、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＴＩＧＩＴ、及びＴＯＸからなる群から選択される阻害／枯渇関連マーカーの発現の低下を示す。

【０１８４】

いくつかの実施形態では、治療的ＴＩＬ集団は、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、ＧＺＭＢ、ＣＸＣＲ３、ＩＦＮｇ、ＴＮＦａ、及びＩＬ－２からなる群から選択される機能的マーカーの発現の増加を示す。

【図面の簡単な説明】

【０１８５】

【図１】ステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的なＧｅｎ２（プロセス２Ａ）チャート。

【図２Ａ】ＴＩＬ製造のためのＧｅｎ２（プロセス２Ａ）の実施形態のプロセスフローチャート。

【図２Ｂ】ＴＩＬ製造のためのＧｅｎ２（プロセス２Ａ）の実施形態のプロセスフローチャート。

【図２Ｃ】ＴＩＬ製造のためのＧｅｎ２（プロセス２Ａ）の実施形態のプロセスフローチャート。

【図３】凍結保存されたＴＩＬの例示的な製造プロセス（約２２日）の実施形態の図を示す。

【図４】ＴＩＬ製造のための２２日プロセスである、Ｇｅｎ２（プロセス２Ａ）の実施形態の図を示す。

【図５】ＴＩＬ製造のためのプロセス１Ｃ及びＧｅｎ２（プロセス２Ａ）の例示的な実施形態からのステップＡ～Ｆの比較表。

【図６】ＴＩＬ製造のためのプロセス１Ｃの実施形態とＧｅｎ２（プロセス２Ａ）の実施形態との詳細な比較。

【図７】例示的なＧｅｎ３型ＴＩＬ製造プロセス。

【図８Ａ】ＴＩＬ製造のための２Ａプロセス（およそ２２日プロセス）とＧｅｎ３プロセス（およそ１４日～１６日プロセス）の実施形態との比較を示す。

【図８Ｂ】ステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的なプロセスＧｅｎ３チャート（およそ１４日～１６日プロセス）。

【図８Ｃ】３つのプロセスバリエーションの各々について、ステップＡ～Ｆ（およそ１４日～１６日プロセス）の概要とともに３つの例示的なＧｅｎ３プロセスを提供するチャート。

【図８Ｄ】ステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的な修正Ｇｅｎ２様プロセス（およそ２２日プロセス）。
【図８Ｅ】２Ａプロセス（およそ２２日プロセス）とＴＩＬ製造のためのＧｅｎ３プロセス（およそ１４日～２２日プロセス）の実施形態との比較を示す。
【図８Ｆ】例示的なプロセス（ａ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性、（ｂ）ＣＤ３９／ＣＤ６９^{ＬＯ}／$_{ＬＯ}$、またはステップＡ～Ｆ（およそ１４日～２２日プロセス）の概要を提供する（ｉ）及び（ｉｉ）ＴＩＬ拡張方法Ｇｅｎ３チャートの組み合わせ。
【図８Ｇ】（ａ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性、（ｂ）ＣＤ３９／ＣＤ６９^{ＬＯ}／$_{ＬＯ}$、または本明細書に記載の事前選択を用いる（ｉ）及び（ｉｉ）ＴＩＬ拡張方法の組み合わせの例示的な実施形態。
【図８Ｈ】ステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的なＴＳ－ＴＩＬプロセス（およそ２２日プロセス）。
【図８Ｉ】ステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的な修正Ｉ－ＴＩＬプロセス（およそ２２日プロセス）。
【図８Ｊ】ステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的な修正ＴＳ－ＴＩＬプロセス（およそ２２日プロセス）。
【図９】Ｇｅｎ２（プロセス２Ａ）とＧｅｎ３プロセスとの比較のための実験フローチャートを提供する。
【図１０】様々なＧｅｎ２（プロセス２Ａ）とＧｅｎ３．１プロセス実施形態との比較を示す。
【図１１】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１及びＧｅｎ３．０プロセスの実施形態の様々な特徴を説明する表。
【図１２】Ｇｅｎ３．１と称される、Ｇｅｎ３プロセスの実施形態のための培地条件の概要。
【図１３】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１及びＧｅｎ３．０プロセスの実施形態の様々な特徴を説明する表。
【図１４】Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３．０プロセスの実施形態の様々な特徴を比較する表。
【図１５】記載された拡張プロセスの様々な実施形態における培地の使用を提供する表。
【図１６】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図１７】Ｇｅｎ３拡張プラットフォームを使用して造血器悪性腫瘍からＴ細胞を拡張するための方法の例示的な実施形態の概略図。
【図１８】構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂを提供する。円筒は、個々のポリペプチド結合ドメインを指す。構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂは、例えば、４－１ＢＢＬまたは４－１ＢＢに結合する抗体から誘導される３つの線形に結合したＴＮＦＲＳＦ結合ドメインを含み、これらを折り畳んで三価タンパク質を形成し、次いでこれをＩｇＧ１－Ｆｃ（ＣＨ３及びＣＨ２ドメインを含む）によって第２の三価タンパク質に結合し、次いでこれを使用して、三価タンパク質のうちの２つをジスルフィド結合（小さい長楕円）によって一緒に結合し、構造を安定化し、６つの受容体及びシグナル伝達タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを一緒にして、シグナル伝達複合体を形成することができるアゴニストを提供する。円筒として示されるＴＮＦＲＳＦ結合ドメインは、例えば、親水性残基及び柔軟性のためのＧｌｙ及びＳｅｒ配列、ならびに溶解性のためのＧｌｕ及びＬｙｓを含み得るリンカーによって結合された$Ｖ_{Ｈ}$鎖及び$Ｖ_{Ｌ}$鎖を含む、ｓｃＦｖドメインであり得る。
【図１９】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２０】Ｇｅｎ３．１プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態のプロセス概要を提供する。
【図２１】Ｇｅｎ３．１試験プロセス（１６～１７日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２２】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２３Ａ】例示的なＧｅｎ２プロセス及び例示的なＧｅｎ３プロセスの比較表。
【図２３Ｂ】例示的なＧｅｎ２プロセス及び例示的なＧｅｎ３プロセスの比較表。

【図２４】Ｇｅｎ３プロセス（１６／１７日プロセス）の調製タイムラインの例示的な実施形態の概略図。
【図２５】Ｇｅｎ３プロセス（１４～１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２６Ａ】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２６Ｂ】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２７】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２８】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１、及びＧｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の実施形態の比較。
【図２９】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１、及びＧｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の実施形態の比較。
【図３０】Ｇｅｎ３実施形態の構成要素。
【図３１】Ｇｅｎ３実施形態のフローチャート比較（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、Ｇｅｎ３．１試験）。
【図３２】Ｇｅｎ３プロセス（１６～１７日プロセス）の例示的な実施形態の構成要素が示される。
【図３３】承認基準表
【図３４】実施例１５のワークフローの概略図。
【図３５】実施例１７のワークフローの概略図。
【図３６Ａ】ＲＥＰ拡張プロセス中に１回または２回与えられるＩＬ－２またはＩＬ－１５の異なる濃度を含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。
【図３６Ｂ】ＲＥＰ拡張プロセス中に１回または２回与えられるＩＬ－２またはＩＬ－１５の異なる濃度を含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。
【図３７－１】ＲＥＰ拡張プロセス中に１回または２回与えられる異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）、及び生ＴＩＬの頻度。
【図３７－２】ＲＥＰ拡張プロセス中に１回または２回与えられる異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）、及び生ＴＩＬの頻度。
【図３８Ａ】ＲＥＰ拡張プロセス中に１回または２回与えられる異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図３８Ｂ】ＲＥＰ拡張プロセス中に１回または２回与えられる異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図３８Ｃ】ＲＥＰ拡張プロセス中に１回または２回与えられる異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図３８Ｄ】ＲＥＰ拡張プロセス中に１回または２回与えられる異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。

【図３８Ｅ】ＲＥＰ拡張プロセス中に１回または２回与えられる異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図３９Ａ】ＲＥＰ拡張プロセス中に１回または２回与えられる異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。
【図３９Ｂ】ＲＥＰ拡張プロセス中に１回または２回与えられる異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。
【図４０Ａ】拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらず、ＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。
【図４０Ｂ】拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらず、ＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。
【図４１】拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらず、ＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＮＫ、ＮＫＴ細胞及び生細胞の頻度。
【図４２Ａ】拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらず、ＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図４２Ｂ】拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらず、ＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図４２Ｃ】拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらず、ＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図４２Ｄ】拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらず、ＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図４２Ｅ】拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８

もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらず、ＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。

【図４３Ａ】拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらず、ＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５（Ｂ）ＣＤ３８及び（Ｃ）ＮＫＧ２Ｄの発現を測定した。

【図４３Ｂ】拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらず、ＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５（Ｂ）ＣＤ３８及び（Ｃ）ＮＫＧ２Ｄの発現を測定した。

【図４３Ｃ】拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらず、ＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５（Ｂ）ＣＤ３８及び（Ｃ）ＮＫＧ２Ｄの発現を測定した。

【図４４Ａ】拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらず、ＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。

【図４４Ｂ】拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらず、ＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。

【図４５Ａ】拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらず、ＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。

【図４５Ｂ】拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらず、ＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。

【図４６Ａ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。

【図４６Ｂ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。

【図４７Ａ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリ

ーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図４７Ｂ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図４７Ｃ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図４７Ｄ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図４７Ｅ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図４８Ａ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせた標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５及び（Ｂ）ＣＤ３８の発現を測定した。
【図４８Ｂ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせた標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５及び（Ｂ）ＣＤ３８の発現を測定した。
【図４９Ａ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。
【図４９Ｂ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。
【図５０Ａ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ＴｒａｎｓＡｃｔによる一晩の刺激及び４時間培養後の、（Ａ）ＣＤ８＋（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＣＤ４０Ｌ発現の頻度。ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図５０Ｂ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ＴｒａｎｓＡｃｔによる一晩の刺激及び４時間培養後の、（Ａ）ＣＤ８＋（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＣＤ４０Ｌ発現の頻度。ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図５１Ａ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。
【図５１Ｂ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。

【図５２Ａ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図５２Ｂ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図５２Ｃ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図５２Ｄ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図５２Ｅ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図５３Ａ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。
【図５３Ｂ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。
【図５４】Ｉ－ＴＩＬプロセスの実施形態の培地条件の概要。
【図５５】Ｉ－ＴＩＬプロセスの実施形態の培地条件の概要。
【図５６Ａ】ＩＬ－２１（３０ｎｇ／ｍｌ）単独、またはＰａｎｏｂｉｎｏｓｔａｔの有無にかかわらず異なる用量のＩＬ－２もしくはＩＬ－１５と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。
【図５６Ｂ】ＩＬ－２１（３０ｎｇ／ｍｌ）単独、またはＰａｎｏｂｉｎｏｓｔａｔの有無にかかわらず異なる用量のＩＬ－２もしくはＩＬ－１５と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。
【図５７】ＩＬ－２１（３０ｎｇ／ｍｌ）単独、またはＰａｎｏｂｉｎｏｓｔａｔの有無にかかわらず異なる用量のＩＬ－２もしくはＩＬ－１５と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８＋、ＣＤ４＋及び生ＴＩＬの頻度。
【図５８Ａ】ＩＬ－２１（３０ｎｇ／ｍｌ）単独、またはＰａｎｏｂｉｎｏｓｔａｔの有無にかかわらず異なる用量のＩＬ－２もしくはＩＬ－１５と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図５８Ｂ】ＩＬ－２１（３０ｎｇ／ｍｌ）単独、またはＰａｎｏｂｉｎｏｓｔａｔの有

無にかかわらず異なる用量のＩＬ－２もしくはＩＬ－１５と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。

【図５８Ｃ】ＩＬ－２１（３０ｎｇ／ｍｌ）単独、またはＰａｎｏｂｉｎｏｓｔａｔの有無にかかわらず異なる用量のＩＬ－２もしくはＩＬ－１５と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。

【図５８Ｄ】ＩＬ－２１（３０ｎｇ／ｍｌ）単独、またはＰａｎｏｂｉｎｏｓｔａｔの有無にかかわらず異なる用量のＩＬ－２もしくはＩＬ－１５と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。

【図５８Ｅ】ＩＬ－２１（３０ｎｇ／ｍｌ）単独、またはＰａｎｏｂｉｎｏｓｔａｔの有無にかかわらず異なる用量のＩＬ－２もしくはＩＬ－１５と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。

【図５９Ａ】ＩＬ－２１（３０ｎｇ／ｍｌ）単独、またはＰａｎｏｂｉｎｏｓｔａｔの有無にかかわらず異なる用量のＩＬ－２もしくはＩＬ－１５と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。

【図５９Ｂ】ＩＬ－２１（３０ｎｇ／ｍｌ）単独、またはＰａｎｏｂｉｎｏｓｔａｔの有無にかかわらず異なる用量のＩＬ－２もしくはＩＬ－１５と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。

【図６０Ａ】ＩＬ－２１または２－ＨＣと組み合わせて異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。

【図６０Ｂ】ＩＬ－２１または２－ＨＣと組み合わせて異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。

【図６１－１】ＩＬ－２１または２－ＨＣと組み合わせて異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生ＴＩＬの頻度。

【図６１－２】ＩＬ－２１または２－ＨＣと組み合わせて異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生ＴＩＬの頻度。

【図６２Ａ】ＩＬ－２１または２－ＨＣと組み合わせて異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。

【図６２Ｂ】ＩＬ－２１または２－ＨＣと組み合わせて異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。

【図６２Ｃ】ＩＬ－２１または２－ＨＣと組み合わせて異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ

）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図６２Ｄ】ＩＬ－２１または２－ＨＣと組み合わせて異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図６２Ｅ】ＩＬ－２１または２－ＨＣと組み合わせて異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３及び（Ｅ）ＴＩＭ３の発現を測定した。
【図６３Ａ】拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらず、ＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件下のＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。
【図６３Ｂ】拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらず、ＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件下のＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。
【図６４－１】ＩＬ－２１または２－ＨＣと組み合わせて異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。
【図６４－２】ＩＬ－２１または２－ＨＣと組み合わせて異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。
【図６４－３】ＩＬ－２１または２－ＨＣと組み合わせて異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。
【図６５Ａ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ＴｒａｎｓＡｃｔによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらずＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図６５Ｂ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ＴｒａｎｓＡｃｔによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらずＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図６５Ｃ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ＴｒａｎｓＡｃｔによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらずＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図６５Ｄ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ＴｒａｎｓＡｃｔによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。拡張プ

ロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらずＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図６５Ｅ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ＴｒａｎｓＡｃｔによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらずＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図６５Ｆ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ＴｒａｎｓＡｃｔによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。拡張プロセス中に１回または２回添加した場合、１ｕＭのＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－１５単独で、またはＩＬ－２１との組み合わせの有無にかかわらずＩＬ－２１と組み合わせた異なる濃度のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図６６－１】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）、ＮＫ、ＮＫＴ細胞及び生細胞の頻度。
【図６６－２】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）、ＮＫ、ＮＫＴ細胞及び生細胞の頻度。
【図６６－３】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）、ＮＫ、ＮＫＴ細胞及び生細胞の頻度。
【図６６－４】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）、ＮＫ、ＮＫＴ細胞及び生細胞の頻度。
【図６６－５】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）、ＮＫ、ＮＫＴ細胞及び生細胞の頻度。
【図６６－６】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）、ＮＫ、ＮＫＴ細胞及び生細胞の頻度。
【図６７Ａ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。
【図６７Ｂ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。
【図６８Ａ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ＴｒａｎｓＡｃｔによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－

２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図６８Ｂ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ＴｒａｎｓＡｃｔによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図６８Ｃ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ＴｒａｎｓＡｃｔによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図６８Ｄ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ＴｒａｎｓＡｃｔによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図６８Ｅ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ＴｒａｎｓＡｃｔによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図６８Ｆ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ＴｒａｎｓＡｃｔによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図６９Ａ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ＴｒａｎｓＡｃｔによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ４＋ＴＩＬ上の（Ａ）Ｋｉ－６７（Ｂ）ＰＤ－１及び（Ｃ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図６９Ｂ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ＴｒａｎｓＡｃｔによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ４＋ＴＩＬ上の（Ａ）Ｋｉ－６７（Ｂ）ＰＤ－１及び（Ｃ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図６９Ｃ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ＴｒａｎｓＡｃｔによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ４＋ＴＩＬ上の（Ａ）Ｋｉ－６７（Ｂ）ＰＤ－１及び（Ｃ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図７０－１】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。
【図７０－２】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。

【図７１Ａ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５及び（Ｂ）ＣＤ３８の発現を測定した。

【図７１Ｂ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５及び（Ｂ）ＣＤ３８の発現を測定した。

【図７２Ａ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。

【図７２Ｂ】ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。

【図７３Ａ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図７３Ｂ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図７３Ｃ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図７３Ｄ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図７３Ｅ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図７３Ｆ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図７４Ａ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ４＋ＴＩＬ上の（Ａ）Ｋｉ－６７（Ｂ）ＰＤ－１及び（Ｃ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図７４Ｂ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ４＋ＴＩＬ上の（Ａ）Ｋｉ－６７（Ｂ）ＰＤ－１及び（Ｃ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図７４Ｃ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ４＋ＴＩＬ上の（Ａ）Ｋｉ－６７（Ｂ）ＰＤ－１及び（Ｃ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図７５Ａ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間培養後の、（Ａ）ＣＤ８＋（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＣＤ４０Ｌ発現の頻度。ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図７５Ｂ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間培養後の、（Ａ）ＣＤ８＋（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＣＤ４０Ｌ発現の頻度。ＩＬ－２もしくはＩＬ－１５単独、または拡張プロセス中に２回添加された５ｕＭ　ＡＫＴｉ（ＧＤＣ－００６８）の有無にかかわらず異なる濃度のＩＬ－２１と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図７６Ａ】異なる濃度のＩＬ－２単独、またはＲＥＰ前拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）と組み合わせて含む、修正ＲＥＰ前条件下での倍率拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。

【図７６Ｂ】異なる濃度のＩＬ－２単独、またはＲＥＰ前拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）と組み合わせて含む、修正ＲＥＰ前条件下での倍率拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。

【図７７Ａ】異なる濃度のＩＬ－２単独、またはＲＥＰ前拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）と組み合わせて含む、修正ＲＥＰ前条件下でのＣＤ８　ＴＩＬ上の（Ａ）ＣＤ１２７及び（Ｂ）ＣＤ６２Ｌの頻度。

【図７７Ｂ】異なる濃度のＩＬ－２単独、またはＲＥＰ前拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）と組み合わせて含む、修正ＲＥＰ前条件下でのＣＤ８　ＴＩＬ上の（Ａ）ＣＤ１２７及び（Ｂ）ＣＤ６２Ｌの頻度。

【図７８Ａ】異なる濃度のＩＬ－２単独、またはＲＥＰ前拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）と組み合わせて含む、修正ＲＥＰ前条件下でのＣＤ８　ＴＩＬ上の（Ａ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－及び（Ｂ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋ＣＤ８　ＴＩＬの頻度。

【図７８Ｂ】異なる濃度のＩＬ－２単独、またはＲＥＰ前拡張プロセス中に２回添加され

た異なる濃度のＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）と組み合わせて含む、修正ＲＥＰ前条件下でのＣＤ８　ＴＩＬ上の（Ａ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－及び（Ｂ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋ＣＤ８　ＴＩＬの頻度。

【図７９】異なる濃度のＩＬ－２単独、またはＲＥＰ前拡張プロセス中に２回添加された異なる濃度のＧＤＣ－００６８もしくはＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）と組み合わせて含む、修正ＲＥＰ前条件下でのＴｃｍ様ＣＤ８　ＴＩＬの頻度。

【図８０Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。

【図８０Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。

【図８１Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。

【図８１Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。

【図８１Ｃ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。

【図８１Ｄ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。

【図８２Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。

【図８２Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。

【図８２Ｃ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。

【図８２Ｄ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）

ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図８２Ｅ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図８２Ｆ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図８３Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５及び（Ｂ）ＣＤ３８の発現を測定した。
【図８３Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを解凍し、染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５及び（Ｂ）ＣＤ３８の発現を測定した。
【図８４Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。
【図８４Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。
【図８５Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。
【図８５Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。
【図８６Ａ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図８６Ｂ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（

Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図８６Ｃ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図８６Ｄ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図８６Ｅ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図８６Ｆ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図８７Ａ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ４＋ＴＩＬ上の（Ａ）Ｋｉ－６７（Ｂ）ＰＤ－１及び（Ｃ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図８７Ｂ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ４＋ＴＩＬ上の（Ａ）Ｋｉ－６７（Ｂ）ＰＤ－１及び（Ｃ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図８７Ｃ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ４＋ＴＩＬ上の（Ａ）Ｋｉ－６７（Ｂ）ＰＤ－１及び（Ｃ）ＴＯＸ発現の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図８８Ａ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間培養後の、（Ａ）ＣＤ８＋（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＣＤ４０Ｌ発現の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図８８Ｂ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間培養後の、（Ａ）ＣＤ８＋（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＣＤ４０Ｌ

発現の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）単独、または拡張プロセス中に２回添加された以前に滴定した濃度の異なるＡＫＴ阻害剤と組み合わせて含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図８９Ａ】様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。
【図８９Ｂ】様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。
【図９０Ａ】様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件に続くＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。
【図９０Ｂ】様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件に続くＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。
【図９０Ｃ】様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件に続くＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。
【図９０Ｄ】様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件に続くＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。
【図９１Ａ】様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図９１Ｂ】様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図９１Ｃ】様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図９１Ｄ】様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図９１Ｅ】様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図９１Ｆ】様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）Ｔ

ＩＧＩＴの発現を測定した。
【図９２Ａ】様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５及び（Ｂ）ＣＤ３８の発現を測定した。
【図９２Ｂ】様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５及び（Ｂ）ＣＤ３８の発現を測定した。
【図９３Ａ】様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。
【図９３Ｂ】様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。
【図９４Ａ】様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。
【図９４Ｂ】様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。
【図９５Ａ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件下でＴＩＬを拡張した。
【図９５Ｂ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件下でＴＩＬを拡張した。
【図９５Ｃ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件下でＴＩＬを拡張した。
【図９５Ｄ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件下でＴＩＬを拡張した。
【図９５Ｅ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件下でＴＩＬを拡張した。
【図９５Ｆ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ８＋ＴＩＬ上の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ（

Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）Ｋｉ－６７（Ｅ）ＰＤ－１及び（Ｆ）ＴＯＸ発現の頻度。様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件下でＴＩＬを拡張した。

【図９６Ａ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ４＋ＴＩＬ上の（Ａ）Ｋｉ－６７（Ｂ）ＰＤ－１及び（Ｃ）ＴＯＸ発現の頻度。様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件下でＴＩＬを拡張した。

【図９６Ｂ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ４＋ＴＩＬ上の（Ａ）Ｋｉ－６７（Ｂ）ＰＤ－１及び（Ｃ）ＴＯＸ発現の頻度。様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件下でＴＩＬを拡張した。

【図９６Ｃ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間の培養後のＣＤ４＋ＴＩＬ上の（Ａ）Ｋｉ－６７（Ｂ）ＰＤ－１及び（Ｃ）ＴＯＸ発現の頻度。様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件下でＴＩＬを拡張した。

【図９７Ａ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間培養後の、（Ａ）ＣＤ８＋（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＣＤ４０Ｌ発現の頻度。様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件下でＴＩＬを拡張した。

【図９７Ｂ】翌日のＢｒｅｆｅｌｄｉｎＡの存在下での、ａＣＤ３／ＣＤ２８ビーズによる一晩の刺激及び４時間培養後の、（Ａ）ＣＤ８＋（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＣＤ４０Ｌ発現の頻度。様々な用量のＩＬ－２１またはＡＫＴ阻害剤ＭＫ－２２０６の有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を含む、標準または修正ＲＥＰ前条件下でＴＩＬを拡張した。

【図９８Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。

【図９８Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。

【図９９Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。

【図９９Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。

【図９９Ｃ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。

【図９９Ｄ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。

【図１００Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの

発現を測定した。
【図１００Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１００Ｃ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１００Ｄ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１００Ｅ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１００Ｆ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１０１Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５及び（Ｂ）ＣＤ３８の発現を測定した。
【図１０１Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５及び（Ｂ）ＣＤ３８の発現を測定した。
【図１０２Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。
【図１０２Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。
【図１０３Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。
【図１０３Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。
【図１０４Ａ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＣＤ８＋ＴＩＬを

発現するＩＬ－２の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図１０４Ｂ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＣＤ８＋ＴＩＬを発現するＩＬ－２の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図１０４Ｃ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＣＤ８＋ＴＩＬを発現するＩＬ－２の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図１０５Ａ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＣＤ４＋ＴＩＬを発現するＩＬ－２の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図１０５Ｂ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＣＤ４＋ＴＩＬを発現するＩＬ－２の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図１０５Ｃ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＣＤ４＋ＴＩＬを発現するＩＬ－２の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図１０６Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ８＋及び（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＣＸＣＲ３発現の頻度。

【図１０６Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なるＡＫＴ阻害剤とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ８＋及び（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＣＸＣＲ３発現の頻度。

【図１０７Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。

【図１０７Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。

【図１０８Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。

【図１０８Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。

【図１０８Ｃ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。

【図１０８Ｄ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異な

る濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。
【図１０９Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１０９Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１０９Ｃ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１０９Ｄ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１０９Ｅ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１０９Ｆ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１１０Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５及び（Ｂ）ＣＤ３８の発現を測定した。
【図１１０Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５及び（Ｂ）ＣＤ３８の発現を測定した。
【図１１１Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。
【図１１１Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。
【図１１２Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。

【図１１２Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。
【図１１３Ａ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＣＤ８＋ＴＩＬを発現するＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図１１３Ｂ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＣＤ８＋ＴＩＬを発現するＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図１１３Ｃ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＣＤ８＋ＴＩＬを発現するＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図１１４Ａ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＣＤ４＋ＴＩＬを発現するＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図１１４Ｂ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＣＤ４＋ＴＩＬを発現するＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図１１４Ｃ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＣＤ４＋ＴＩＬを発現するＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図１１５Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ８＋及び（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＧＺＭＢ発現の頻度。
【図１１５Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ８＋及び（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＧＺＭＢ発現の頻度。
【図１１６Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ８＋及び（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＣＸＣＲ３発現の頻度。
【図１１６Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ８＋及び（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＣＸＣＲ３発現の頻度。
【図１１７Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なる濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ８＋及び（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＴＯＸ発現の頻度。
【図１１７Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌを異なる

濃度のＡＺＤ５３６３とともに含む、標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ８＋及び（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＴＯＸ発現の頻度。
【図１１８Ａ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。
【図１１８Ｂ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。
【図１１９Ａ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。
【図１１９Ｂ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。
【図１１９Ｃ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。
【図１１９Ｄ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。
【図１２０Ａ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１２０Ｂ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１２０Ｃ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１２０Ｄ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１２０Ｅ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１２０Ｆ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。

【図１２１Ａ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５及び（Ｂ）ＣＤ３８の発現を測定した。
【図１２１Ｂ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５及び（Ｂ）ＣＤ３８の発現を測定した。
【図１２２Ａ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。
【図１２２Ｂ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。
【図１２３Ａ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。
【図１２３Ｂ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。
【図１２４Ａ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）ＣＤ８＋ＴＩＬを発現するＩＬ－２の頻度。異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図１２４Ｂ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）ＣＤ８＋ＴＩＬを発現するＩＬ－２の頻度。異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図１２４Ｃ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）ＣＤ８＋ＴＩＬを発現するＩＬ－２の頻度。異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図１２４Ｄ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）ＣＤ８＋ＴＩＬを発現するＩＬ－２の頻度。異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図１２５Ａ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ（Ｄ）ＣＤ４＋ＴＩＬを発現するＩＬ－２の頻度。異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図１２５Ｂ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ（Ｄ）ＣＤ４＋ＴＩＬを発現するＩＬ－２の頻度。異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－

１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図１２５Ｃ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ（Ｄ）ＣＤ４＋ＴＩＬを発現するＩＬ－２の頻度。異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図１２５Ｄ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ（Ｄ）ＣＤ４＋ＴＩＬを発現するＩＬ－２の頻度。異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。
【図１２６Ａ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ８＋及び（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＧＺＭＢ発現の頻度。
【図１２６Ｂ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ８＋及び（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＧＺＭＢ発現の頻度。
【図１２７Ａ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ８＋及び（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＣＸＣＲ３発現の頻度。
【図１２７Ｂ】異なる濃度のＩＬ－２またはＩＬ－１５の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ８＋及び（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＣＸＣＲ３発現の頻度。
【図１２８Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。
【図１２８Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。
【図１２９Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。
【図１２９Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。
【図１２９Ｃ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。
【図１２９Ｄ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。
【図１３０Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（

Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１３０Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１３０Ｃ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１３０Ｄ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１３０Ｅ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１３０Ｆ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８（Ｂ）ＣＤ１２７（Ｃ）ＰＤ－１（Ｄ）ＬＡＧ３（Ｅ）ＴＩＭ３及び（Ｆ）ＴＩＧＩＴの発現を測定した。
【図１３１Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５及び（Ｂ）ＣＤ３８の発現を測定した。
【図１３１Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５及び（Ｂ）ＣＤ３８の発現を測定した。
【図１３２Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。
【図１３２Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。
【図１３３Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。
【図１３３Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。

【図１３４Ａ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）ＣＤ８＋ＴＩＬを発現するＩＬ－２の頻度。ＴＩＬは、ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件であった。

【図１３４Ｂ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）ＣＤ８＋ＴＩＬを発現するＩＬ－２の頻度。ＴＩＬは、ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件であった。

【図１３４Ｃ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）ＣＤ８＋ＴＩＬを発現するＩＬ－２の頻度。ＴＩＬは、ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件であった。

【図１３４Ｄ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）ＣＤ８＋ＴＩＬを発現するＩＬ－２の頻度。ＴＩＬは、ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件であった。

【図１３５Ａ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ（Ｄ）ＣＤ４＋ＴＩＬを発現するＩＬ－２の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図１３５Ｂ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ（Ｄ）ＣＤ４＋ＴＩＬを発現するＩＬ－２の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図１３５Ｃ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ（Ｄ）ＣＤ４＋ＴＩＬを発現するＩＬ－２の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図１３５Ｄ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ（Ｄ）ＣＤ４＋ＴＩＬを発現するＩＬ－２の頻度。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でＴＩＬを拡張した。

【図１３６Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ８＋及び（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＧＺＭＢ発現の頻度。

【図１３６Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ８＋及び（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＧＺＭＢ発現の頻度。

【図１３７Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ８＋及び（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＣＸＣＲ３発現の頻度。

【図１３７Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の

存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ８＋及び（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＣＸＣＲ３発現の頻度。
【図１３８Ａ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、ＴＩＬの収率及び生存率を増加させる。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。
【図１３８Ｂ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、ＴＩＬの収率及び生存率を増加させる。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でのＴＩＬ拡張（Ａ）及び生存率（Ｂ）。
【図１３９Ａ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、Ｆｏｘｐ３＋細胞の数を減少させながら、ＣＤ４＋（Ｆｏｘｐ３－）細胞の数を増加させる。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。
【図１３９Ｂ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、Ｆｏｘｐ３＋細胞の数を減少させながら、ＣＤ４＋（Ｆｏｘｐ３－）細胞の数を増加させる。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。
【図１３９Ｃ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、Ｆｏｘｐ３＋細胞の数を減少させながら、ＣＤ４＋（Ｆｏｘｐ３－）細胞の数を増加させる。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。
【図１３９Ｄ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、Ｆｏｘｐ３＋細胞の数を減少させながら、ＣＤ４＋（Ｆｏｘｐ３－）細胞の数を増加させる。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件下でのＣＤ８、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３－）、ＣＤ４（Ｆｏｘｐ３＋）及び生細胞の頻度。
【図１４０Ａ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、メモリー関連マーカーの発現を増加させ、阻害性受容体の発現を減少させる。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８、（Ｂ）ＣＤ１２７、（Ｃ）ＰＤ－１、（Ｄ）ＬＡＧ３、（Ｅ）ＴＩＭ３、（Ｆ）ＴＩＧＩＴ、（Ｇ）ＣＤ２７、（Ｈ）ＣＤ６２Ｌ、（Ｉ）ＩＬ－７Ｒ、及び（Ｊ）ＴＯＸの発現を測定した。
【図１４０Ｂ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、メモリー関連マーカーの発現を増加させ、阻害性受容体の発現を減少させる。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８、（Ｂ）ＣＤ１２７、（Ｃ）ＰＤ－１、（Ｄ）ＬＡＧ３、（Ｅ）ＴＩＭ３、（Ｆ）ＴＩＧＩＴ、（Ｇ）ＣＤ２７、（Ｈ）ＣＤ６２Ｌ、（Ｉ）ＩＬ－７Ｒ、及び（Ｊ）ＴＯＸの発現を測定した。
【図１４０Ｃ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、メモリー関連マーカーの発現を増加させ、阻害性受容体の発現を減少させる。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８、（Ｂ）ＣＤ１２７、（Ｃ）ＰＤ－１、（Ｄ）ＬＡＧ３、（Ｅ）ＴＩＭ３、（Ｆ）ＴＩＧＩＴ、（Ｇ）ＣＤ２７、（

Ｈ）ＣＤ６２Ｌ、（Ｉ）ＩＬ－７Ｒ、及び（Ｊ）ＴＯＸの発現を測定した。
【図１４０Ｄ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、メモリー関連マーカーの発現を増加させ、阻害性受容体の発現を減少させる。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８、（Ｂ）ＣＤ１２７、（Ｃ）ＰＤ－１、（Ｄ）ＬＡＧ３、（Ｅ）ＴＩＭ３、（Ｆ）ＴＩＧＩＴ、（Ｇ）ＣＤ２７、（Ｈ）ＣＤ６２Ｌ、（Ｉ）ＩＬ－７Ｒ、及び（Ｊ）ＴＯＸの発現を測定した。
【図１４０Ｅ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、メモリー関連マーカーの発現を増加させ、阻害性受容体の発現を減少させる。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８、（Ｂ）ＣＤ１２７、（Ｃ）ＰＤ－１、（Ｄ）ＬＡＧ３、（Ｅ）ＴＩＭ３、（Ｆ）ＴＩＧＩＴ、（Ｇ）ＣＤ２７、（Ｈ）ＣＤ６２Ｌ、（Ｉ）ＩＬ－７Ｒ、及び（Ｊ）ＴＯＸの発現を測定した。
【図１４０Ｆ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、メモリー関連マーカーの発現を増加させ、阻害性受容体の発現を減少させる。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８、（Ｂ）ＣＤ１２７、（Ｃ）ＰＤ－１、（Ｄ）ＬＡＧ３、（Ｅ）ＴＩＭ３、（Ｆ）ＴＩＧＩＴ、（Ｇ）ＣＤ２７、（Ｈ）ＣＤ６２Ｌ、（Ｉ）ＩＬ－７Ｒ、及び（Ｊ）ＴＯＸの発現を測定した。
【図１４０Ｇ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、メモリー関連マーカーの発現を増加させ、阻害性受容体の発現を減少させる。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８、（Ｂ）ＣＤ１２７、（Ｃ）ＰＤ－１、（Ｄ）ＬＡＧ３、（Ｅ）ＴＩＭ３、（Ｆ）ＴＩＧＩＴ、（Ｇ）ＣＤ２７、（Ｈ）ＣＤ６２Ｌ、（Ｉ）ＩＬ－７Ｒ、及び（Ｊ）ＴＯＸの発現を測定した。
【図１４０Ｈ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、メモリー関連マーカーの発現を増加させ、阻害性受容体の発現を減少させる。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８、（Ｂ）ＣＤ１２７、（Ｃ）ＰＤ－１、（Ｄ）ＬＡＧ３、（Ｅ）ＴＩＭ３、（Ｆ）ＴＩＧＩＴ、（Ｇ）ＣＤ２７、（Ｈ）ＣＤ６２Ｌ、（Ｉ）ＩＬ－７Ｒ、及び（Ｊ）ＴＯＸの発現を測定した。
【図１４０Ｉ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、メモリー関連マーカーの発現を増加させ、阻害性受容体の発現を減少させる。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８、（Ｂ）ＣＤ１２７、（Ｃ）ＰＤ－１、（Ｄ）ＬＡＧ３、（Ｅ）ＴＩＭ３、（Ｆ）ＴＩＧＩＴ、（Ｇ）ＣＤ２７、（Ｈ）ＣＤ６２Ｌ、（Ｉ）ＩＬ－７Ｒ、及び（Ｊ）ＴＯＸの発現を測定した。
【図１４０Ｊ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、メモリー関連マーカーの発現を増加させ、阻害性受容体の発現を減少させる。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２８、（Ｂ）ＣＤ１２７、（Ｃ）ＰＤ－１、（Ｄ）ＬＡＧ３、（Ｅ）ＴＩＭ３、（Ｆ）ＴＩＧＩＴ、（Ｇ）ＣＤ２７、（Ｈ）ＣＤ６２Ｌ、（Ｉ）ＩＬ－７Ｒ、及び（Ｊ）ＴＯＸの発現を測定した。

【図１４１Ａ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、ＴＩＬの活性化状態を低下させる。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５、（Ｂ）ＣＤ３８、（Ｃ）ＣＤ３９、及び（Ｄ）ＣＤ６９の発現を測定した。

【図１４１Ｂ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、ＴＩＬの活性化状態を低下させる。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５、（Ｂ）ＣＤ３８、（Ｃ）ＣＤ３９、及び（Ｄ）ＣＤ６９の発現を測定した。

【図１４１Ｃ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、ＴＩＬの活性化状態を低下させる。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５、（Ｂ）ＣＤ３８、（Ｃ）ＣＤ３９、及び（Ｄ）ＣＤ６９の発現を測定した。

【図１４１Ｄ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、ＴＩＬの活性化状態を低下させる。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上のマーカー発現。ＴＩＬを染色して、フローサイトメトリーによって（Ａ）ＣＤ２５、（Ｂ）ＣＤ３８、（Ｃ）ＣＤ３９、及び（Ｄ）ＣＤ６９の発現を測定した。

【図１４２Ａ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、刺激後のＴＩＬで活性化状態の低下を維持する。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。ＣＤ３８（Ｃ）及びＣＤ３９（Ｄ）の発現は、Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａの存在下で６時間１ｕｇ／ｍｌでのＯＫＴ３刺激後のＲＥＰ後ＦＡＣＳによって評価された。

【図１４２Ｂ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、刺激後のＴＩＬで活性化状態の低下を維持する。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。ＣＤ３８（Ｃ）及びＣＤ３９（Ｄ）の発現は、Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａの存在下で６時間１ｕｇ／ｍｌでのＯＫＴ３刺激後のＲＥＰ後ＦＡＣＳによって評価された。

【図１４２Ｃ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、刺激後のＴＩＬで活性化状態の低下を維持する。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。ＣＤ３８（Ｃ）及びＣＤ３９（Ｄ）の発現は、Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａの存在下で６時間１ｕｇ／ｍｌでのＯＫＴ３刺激後のＲＥＰ後ＦＡＣＳによって評価された。

【図１４２Ｄ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、刺激後のＴＩＬで活性化状態の低下を維持する。ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ６９＋ＣＤ３９＋及び（Ｂ）ＣＤ６９－ＣＤ３９－ＣＤ８＋ＴＩＬの発現。ＣＤ３８（Ｃ）及びＣＤ３９（Ｄ）の発現は、Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａの存在下で６時間１ｕｇ／ｍｌでのＯＫＴ３刺激後のＲＥＰ後ＦＡＣＳによって評価された。

【図１４３Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ

条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。

【図１４３Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続くＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬにおけるＰＤ－１及びＴＩＭ３サブセットの頻度。（Ａ）ＰＤ－１＋ＴＩＭ３＋ＴＩＬの頻度及び（Ｂ）ＰＤ－１－ＴＩＭ３－ＴＩＬ。

【図１４４Ａ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）ＩＬ－２及び（Ｅ）ＣＤ８＋ＴＩＬを発現するＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋ＩＬ－２＋の頻度。ＴＩＬは、ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件であった。

【図１４４Ｂ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）ＩＬ－２及び（Ｅ）ＣＤ８＋ＴＩＬを発現するＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋ＩＬ－２＋の頻度。ＴＩＬは、ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件であった。

【図１４４Ｃ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）ＩＬ－２及び（Ｅ）ＣＤ８＋ＴＩＬを発現するＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋ＩＬ－２＋の頻度。ＴＩＬは、ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件であった。

【図１４４Ｄ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）ＩＬ－２及び（Ｅ）ＣＤ８＋ＴＩＬを発現するＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋ＩＬ－２＋の頻度。ＴＩＬは、ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件であった。

【図１４４Ｅ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋（Ｄ）ＩＬ－２及び（Ｅ）ＣＤ８＋ＴＩＬを発現するＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋ＩＬ－２＋の頻度。ＴＩＬは、ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件であった。

【図１４５Ａ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ（Ｄ）ＩＬ－２及び（Ｅ）ＣＤ４＋ＴＩＬを発現するＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋ＩＬ－２＋の頻度。ＴＩＬは、ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件であった。

【図１４５Ｂ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ（Ｄ）ＩＬ－２及び（Ｅ）ＣＤ４＋ＴＩＬを発現するＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋ＩＬ－２＋の頻度。ＴＩＬは、ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件であった。

【図１４５Ｃ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦ

ａ（Ｄ）ＩＬ－２及び（Ｅ）ＣＤ４＋ＴＩＬを発現するＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋ＩＬ－２＋の頻度。ＴＩＬは、ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件であった。

【図１４５Ｄ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ（Ｄ）ＩＬ－２及び（Ｅ）ＣＤ４＋ＴＩＬを発現するＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋ＩＬ－２＋の頻度。ＴＩＬは、ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件であった。

【図１４５Ｅ】Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａ及びＭｏｎｅｎｓｉｎの存在下、プレート結合ＯＫＴ３による６時間刺激後の（Ａ）ＩＦＮｇ（Ｂ）ＴＮＦａ及び（Ｃ）ＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ（Ｄ）ＩＬ－２及び（Ｅ）ＣＤ４＋ＴＩＬを発現するＩＦＮｇ＋ＴＮＦａ＋ＩＬ－２＋の頻度。ＴＩＬは、ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件であった。

【図１４６Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ８＋及び（Ｂ）ＣＤ４＋及び（Ｃ）ＣＤ１０７ａ＋ＴＩＬ上のＧＺＭＢ発現の頻度。

【図１４６Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ８＋及び（Ｂ）ＣＤ４＋及び（Ｃ）ＣＤ１０７ａ＋ＴＩＬ上のＧＺＭＢ発現の頻度。

【図１４６Ｃ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ８＋及び（Ｂ）ＣＤ４＋及び（Ｃ）ＣＤ１０７ａ＋ＴＩＬ上のＧＺＭＢ発現の頻度。

【図１４７Ａ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ８＋及び（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＣＸＣＲ３発現の頻度。

【図１４７Ｂ】ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）またはＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＡＺＤ５３６３を含む標準または修正ＲＥＰ条件に続く（Ａ）ＣＤ８＋及び（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上のＣＸＣＲ３発現の頻度。

【図１４８Ａ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、ＴＩＬの多機能性を増加させる。示される各プロセスによって拡張されたＣＤ８＋ＴＩＬについて、Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａの存在下で６時間、１ｕｇ／ｍｌでのＯＫＴ３刺激後に、ＲＥＰ後ＦＡＣＳによってサイトカイン発現を評価した。ＣＤ４＋ＴＩＬについて同様の結果が観察された（図示せず）。

【図１４８Ｂ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、ＴＩＬの多機能性を増加させる。示される各プロセスによって拡張されたＣＤ８＋ＴＩＬについて、Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａの存在下で６時間、１ｕｇ／ｍｌでのＯＫＴ３刺激後に、ＲＥＰ後ＦＡＣＳによってサイトカイン発現を評価した。ＣＤ４＋ＴＩＬについて同様の結果が観察された（図示せず）。

【図１４８Ｃ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、ＴＩＬの多機能性を増加させる。示される各プロセスによって拡張されたＣＤ８＋ＴＩＬについて、Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａの存在下で６時間、１ｕｇ／ｍｌでのＯＫＴ３刺激後に、ＲＥＰ後ＦＡＣＳによってサイトカイン発現を評価した。ＣＤ４＋ＴＩＬについて同様の結果が観察された（図示せず）。

【図１４９Ａ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、同種異系設定においてＴＩＬ細胞傷害性を増加させる。示されたプロセスによって産生されたＴＩＬを（Ａ）１０：１のエフェクター対標的細胞の比でＫＩＬＲ（登録商標）ＴＨＰ－１細胞と２４時間共培養して、同種異系設定における細胞傷害性を測定し、（Ｂ、Ｃ）を３日毎にＴｒａｎｓＡｃｔで刺激

した後、ＫＩＬＲ（登録商標）ＴＨＰ－１細胞と２４時間共培養し、フローサイトメトリー染色した。対照及びＩｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＴＩＬを、自己腫瘍細胞と２４時間共培養した。ＩＦＮｇレベルを、２４時間後にＥＬＩＳＡによって測定した（Ｄ、Ｅ）。

【図１４９Ｂ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、同種異系設定においてＴＩＬ細胞傷害性を増加させる。示されたプロセスによって産生されたＴＩＬを（Ａ）１０：１のエフェクター対標的細胞の比でＫＩＬＲ（登録商標）ＴＨＰ－１細胞と２４時間共培養して、同種異系設定における細胞傷害性を測定し、（Ｂ、Ｃ）を３日毎にＴｒａｎｓＡｃｔで刺激した後、ＫＩＬＲ（登録商標）ＴＨＰ－１細胞と２４時間共培養し、フローサイトメトリー染色した。対照及びＩｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＴＩＬを、自己腫瘍細胞と２４時間共培養した。ＩＦＮｇレベルを、２４時間後にＥＬＩＳＡによって測定した（Ｄ、Ｅ）。

【図１４９Ｃ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、同種異系設定においてＴＩＬ細胞傷害性を増加させる。示されたプロセスによって産生されたＴＩＬを（Ａ）１０：１のエフェクター対標的細胞の比でＫＩＬＲ（登録商標）ＴＨＰ－１細胞と２４時間共培養して、同種異系設定における細胞傷害性を測定し、（Ｂ、Ｃ）を３日毎にＴｒａｎｓＡｃｔで刺激した後、ＫＩＬＲ（登録商標）ＴＨＰ－１細胞と２４時間共培養し、フローサイトメトリー染色した。対照及びＩｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＴＩＬを、自己腫瘍細胞と２４時間共培養した。ＩＦＮｇレベルを、２４時間後にＥＬＩＳＡによって測定した（Ｄ、Ｅ）。

【図１４９Ｄ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、同種異系設定においてＴＩＬ細胞傷害性を増加させる。示されたプロセスによって産生されたＴＩＬを（Ａ）１０：１のエフェクター対標的細胞の比でＫＩＬＲ（登録商標）ＴＨＰ－１細胞と２４時間共培養して、同種異系設定における細胞傷害性を測定し、（Ｂ、Ｃ）を３日毎にＴｒａｎｓＡｃｔで刺激した後、ＫＩＬＲ（登録商標）ＴＨＰ－１細胞と２４時間共培養し、フローサイトメトリー染色した。対照及びＩｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＴＩＬを、自己腫瘍細胞と２４時間共培養した。ＩＦＮｇレベルを、２４時間後にＥＬＩＳＡによって測定した（Ｄ、Ｅ）。

【図１４９Ｅ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、同種異系設定においてＴＩＬ細胞傷害性を増加させる。示されたプロセスによって産生されたＴＩＬを（Ａ）１０：１のエフェクター対標的細胞の比でＫＩＬＲ（登録商標）ＴＨＰ－１細胞と２４時間共培養して、同種異系設定における細胞傷害性を測定し、（Ｂ、Ｃ）を３日毎にＴｒａｎｓＡｃｔで刺激した後、ＫＩＬＲ（登録商標）ＴＨＰ－１細胞と２４時間共培養し、フローサイトメトリー染色した。対照及びＩｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＴＩＬを、自己腫瘍細胞と２４時間共培養した。ＩＦＮｇレベルを、２４時間後にＥＬＩＳＡによって測定した（Ｄ、Ｅ）。

【図１５０Ａ】（Ａ）ＣＤ８＋ＴＩＬ上及び（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上で、Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔで観察された全体的な表現型変化。

【図１５０Ｂ】（Ａ）ＣＤ８＋ＴＩＬ上及び（Ｂ）ＣＤ４＋ＴＩＬ上で、Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔで観察された全体的な表現型変化。

【図１５１Ａ】対照またはＩｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張したＴＩＬのバルクＴＣＲｓｅｑからの結果。バルクＴＣＲｂ配列決定は、対照またはＩｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＴＩＬ上で行った。図示されるのは、（Ａ）対照対Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔのシャノン多様性指数（Ｂ）及びシンプソンクローン性指数である。データは、群当たり平均±ＳＤ及びｎ＝５として示される。

【図１５１Ｂ】対照またはＩｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張したＴＩＬのバルクＴＣＲｓｅｑからの結果。バルクＴＣＲｂ配列決定は、対照またはＩｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＴＩＬ上で行った。図示されるのは、（Ａ）対照対Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔのシャノン多様性指数（Ｂ）及びシンプソンクローン性指数である。データは、群当たり平均±ＳＤ及びｎ＝５として示される。

【図１５２Ａ】ＣＴＲＬ試料とＩｎｖｉｇｏ－Ｔ　ｓｃＲＮＡｓｅｑ試料との間の異なる予測細胞型分布。単一細胞ＲＮＡ配列決定（ｓｃＲＮＡｓｅｑ）を、対照及びＩｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＴＩＬ上で行った。（Ａ）自動化参照アトラス予測細胞型アノテーションに基づいてラベル付けされたＵＭＡＰ次元削減可視化。（Ｂ）対照（左）対Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ（右）の参照マッピング結果のＵＭＡＰ可視化。（Ｃ）対照群対Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ群

の平均クラスター頻度のバープロット可視化。
【図１５２Ｂ】ＣＴＲＬ試料とＩｎｖｉｇｏ－Ｔ　ｓｃＲＮＡｓｅｑ試料との間の異なる予測細胞型分布。単一細胞ＲＮＡ配列決定（ｓｃＲＮＡｓｅｑ）を、対照及びＩｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＴＩＬ上で行った。（Ａ）自動化参照アトラス予測細胞型アノテーションに基づいてラベル付けされたＵＭＡＰ次元削減可視化。（Ｂ）対照（左）対Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ（右）の参照マッピング結果のＵＭＡＰ可視化。（Ｃ）対照群対Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ群の平均クラスター頻度のバープロット可視化。
【図１５２Ｃ】ＣＴＲＬ試料とＩｎｖｉｇｏ－Ｔ　ｓｃＲＮＡｓｅｑ試料との間の異なる予測細胞型分布。単一細胞ＲＮＡ配列決定（ｓｃＲＮＡｓｅｑ）を、対照及びＩｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＴＩＬ上で行った。（Ａ）自動化参照アトラス予測細胞型アノテーションに基づいてラベル付けされたＵＭＡＰ次元削減可視化。（Ｂ）対照（左）対Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ（右）の参照マッピング結果のＵＭＡＰ可視化。（Ｃ）対照群対Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ群の平均クラスター頻度のバープロット可視化。
【図１５３】ＣＴＲＬとＩｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張ＴＩＬとの間の別個のＣＤ８　Ｔ細胞クラスター分布。群（左）及びＳｅｕｒａｔ定義クラスター（右）に基づいて着色されたＣＤ８　Ｔ細胞ＵＭＡＰ次元削減可視化。
【図１５４Ａ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔは、ＣＤ８＋ＴＩＬ上の疲弊関連遺伝子を低減しながら、幹様細胞に関連する遺伝子を濃縮する。（Ａ）対照群とＩｎｖｉｇｏ－Ｔ群とを比較した、ＣＤ８　Ｔ細胞サブセットにおける上位２０個の差異的に発現された遺伝子のヒートマップ可視化。（Ｂ）対照群とＩｎｖｉｇｏ－Ｔ群とを比較した、幹細胞性（左）疲弊（中）または代謝（右）に関連する特定の目的の遺伝子のＣＤ８　Ｔ細胞サブセットヒートマップ可視化。（Ｃ）対照対ＩｎｖｉｇｏＴによってグループ化された各試料についてのＵＣｅｌｌスコア平均の行ｚスコアを示す、幹または疲弊遺伝子シグネチャのＣＤ８　Ｔ細胞サブセット遺伝子セットヒートマップ可視化。
【図１５４Ｂ－１】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔは、ＣＤ８＋ＴＩＬ上の疲弊関連遺伝子を低減しながら、幹様細胞に関連する遺伝子を濃縮する。（Ａ）対照群とＩｎｖｉｇｏ－Ｔ群とを比較した、ＣＤ８　Ｔ細胞サブセットにおける上位２０個の差異的に発現された遺伝子のヒートマップ可視化。（Ｂ）対照群とＩｎｖｉｇｏ－Ｔ群とを比較した、幹細胞性（左）疲弊（中）または代謝（右）に関連する特定の目的の遺伝子のＣＤ８　Ｔ細胞サブセットヒートマップ可視化。（Ｃ）対照対ＩｎｖｉｇｏＴによってグループ化された各試料についてのＵＣｅｌｌスコア平均の行ｚスコアを示す、幹または疲弊遺伝子シグネチャのＣＤ８　Ｔ細胞サブセット遺伝子セットヒートマップ可視化。
【図１５４Ｂ－２】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔは、ＣＤ８＋ＴＩＬ上の疲弊関連遺伝子を低減しながら、幹様細胞に関連する遺伝子を濃縮する。（Ａ）対照群とＩｎｖｉｇｏ－Ｔ群とを比較した、ＣＤ８　Ｔ細胞サブセットにおける上位２０個の差異的に発現された遺伝子のヒートマップ可視化。（Ｂ）対照群とＩｎｖｉｇｏ－Ｔ群とを比較した、幹細胞性（左）疲弊（中）または代謝（右）に関連する特定の目的の遺伝子のＣＤ８　Ｔ細胞サブセットヒートマップ可視化。（Ｃ）対照対ＩｎｖｉｇｏＴによってグループ化された各試料についてのＵＣｅｌｌスコア平均の行ｚスコアを示す、幹または疲弊遺伝子シグネチャのＣＤ８　Ｔ細胞サブセット遺伝子セットヒートマップ可視化。
【図１５４Ｂ－３】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔは、ＣＤ８＋ＴＩＬ上の疲弊関連遺伝子を低減しながら、幹様細胞に関連する遺伝子を濃縮する。（Ａ）対照群とＩｎｖｉｇｏ－Ｔ群とを比較した、ＣＤ８　Ｔ細胞サブセットにおける上位２０個の差異的に発現された遺伝子のヒートマップ可視化。（Ｂ）対照群とＩｎｖｉｇｏ－Ｔ群とを比較した、幹細胞性（左）疲弊（中）または代謝（右）に関連する特定の目的の遺伝子のＣＤ８　Ｔ細胞サブセットヒートマップ可視化。（Ｃ）対照対ＩｎｖｉｇｏＴによってグループ化された各試料についてのＵＣｅｌｌスコア平均の行ｚスコアを示す、幹または疲弊遺伝子シグネチャのＣＤ８　Ｔ細胞サブセット遺伝子セットヒートマップ可視化。
【図１５４Ｃ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔは、ＣＤ８＋ＴＩＬ上の疲弊関連遺伝子を低減しながら、幹様細胞に関連する遺伝子を濃縮する。（Ａ）対照群とＩｎｖｉｇｏ－Ｔ群とを比較し

た、ＣＤ８　Ｔ細胞サブセットにおける上位２０個の差異的に発現された遺伝子のヒートマップ可視化。（Ｂ）対照群とＩｎｖｉｇｏ－Ｔ群とを比較した、幹細胞性（左）疲弊（中）または代謝（右）に関連する特定の目的の遺伝子のＣＤ８　Ｔ細胞サブセットヒートマップ可視化。（Ｃ）対照対ＩｎｖｉｇｏＴによってグループ化された各試料についてのＵＣｅｌｌスコア平均の行ｚスコアを示す、幹または疲弊遺伝子シグネチャのＣＤ８　Ｔ細胞サブセット遺伝子セットヒートマップ可視化。

【図１５５Ａ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔは、応答に関連するＣＤ３９－ＣＤ６９－遺伝子クラスターを濃縮する。対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、Ｋｒｉｓｈｎａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２０２０　Ｄｅｃ　１１；３７０（６５２２）：１３２８－１３３４からの（Ａ）ＣＤ３９－ＣＤ６９－及び（Ｂ）ＣＤ３９＋ＣＤ６９＋遺伝子シグネチャについてのＣＤ８　Ｔ細胞サブセットＵＣｅｌｌスコアのバイオリンプロット。（Ｃ）対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、目的の他の遺伝子シグネチャについてのＣＤ８　Ｔ細胞サブセットＵＣｅｌｌスコアのバイオリンプロット。

【図１５５Ｂ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔは、応答に関連するＣＤ３９－ＣＤ６９－遺伝子クラスターを濃縮する。対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、Ｋｒｉｓｈｎａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２０２０　Ｄｅｃ　１１；３７０（６５２２）：１３２８－１３３４からの（Ａ）ＣＤ３９－ＣＤ６９－及び（Ｂ）ＣＤ３９＋ＣＤ６９＋遺伝子シグネチャについてのＣＤ８　Ｔ細胞サブセットＵＣｅｌｌスコアのバイオリンプロット。（Ｃ）対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、目的の他の遺伝子シグネチャについてのＣＤ８　Ｔ細胞サブセットＵＣｅｌｌスコアのバイオリンプロット。

【図１５５Ｃ－１】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔは、応答に関連するＣＤ３９－ＣＤ６９－遺伝子クラスターを濃縮する。対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、Ｋｒｉｓｈｎａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２０２０　Ｄｅｃ　１１；３７０（６５２２）：１３２８－１３３４からの（Ａ）ＣＤ３９－ＣＤ６９－及び（Ｂ）ＣＤ３９＋ＣＤ６９＋遺伝子シグネチャについてのＣＤ８　Ｔ細胞サブセットＵＣｅｌｌスコアのバイオリンプロット。（Ｃ）対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、目的の他の遺伝子シグネチャについてのＣＤ８　Ｔ細胞サブセットＵＣｅｌｌスコアのバイオリンプロット。

【図１５５Ｃ－２】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔは、応答に関連するＣＤ３９－ＣＤ６９－遺伝子クラスターを濃縮する。対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、Ｋｒｉｓｈｎａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２０２０　Ｄｅｃ　１１；３７０（６５２２）：１３２８－１３３４からの（Ａ）ＣＤ３９－ＣＤ６９－及び（Ｂ）ＣＤ３９＋ＣＤ６９＋遺伝子シグネチャについてのＣＤ８　Ｔ細胞サブセットＵＣｅｌｌスコアのバイオリンプロット。（Ｃ）対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、目的の他の遺伝子シグネチャについてのＣＤ８　Ｔ細胞サブセットＵＣｅｌｌスコアのバイオリンプロット。

【図１５５Ｃ－３】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔは、応答に関連するＣＤ３９－ＣＤ６９－遺伝子クラスターを濃縮する。対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、Ｋｒｉｓｈｎａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２０２０　Ｄｅｃ　１１；３７０（６５２２）：１３２８－１３３４からの（Ａ）ＣＤ３９－ＣＤ６９－及び（Ｂ）ＣＤ３９＋ＣＤ６９＋遺伝子シグネチャについてのＣＤ８　Ｔ細胞サブセットＵＣｅｌｌスコアのバイオリンプロット。（Ｃ）対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、目的の他の遺伝子シグネチャについてのＣＤ８　Ｔ細胞サブセットＵＣｅｌｌスコアのバイオリンプロット。

【図１５５Ｃ－４】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔは、応答に関連するＣＤ３９－ＣＤ６９－遺伝子クラスターを濃縮する。対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、Ｋｒｉｓｈｎａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２０２０　Ｄｅｃ　１１；３７０（６５２２）：１３２８－１３３４からの（Ａ）ＣＤ３９－ＣＤ６９－及び（Ｂ）ＣＤ３９＋ＣＤ６９＋遺伝子シグネチャについてのＣＤ８　Ｔ細胞サブセットＵＣｅｌｌスコアのバイオリンプロット。（Ｃ）対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、目的の他の遺伝子シグネチャについてのＣＤ８　Ｔ細胞サブセットＵＣｅｌｌスコアのバイオリンプロット。

【図１５５Ｃ－５】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔは、応答に関連するＣＤ３９－ＣＤ６９－遺伝子クラスターを濃縮する。対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、Ｋｒｉｓｈｎａ　ｅｔ　ａ

ｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２０２０　Ｄｅｃ　１１；３７０（６５２２）：１３２８－１３３４からの（Ａ）ＣＤ３９－ＣＤ６９－及び（Ｂ）ＣＤ３９＋ＣＤ６９＋遺伝子シグネチャについてのＣＤ８　Ｔ細胞サブセットＵＣｅｌｌスコアのバイオリンプロット。（Ｃ）対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、目的の他の遺伝子シグネチャについてのＣＤ８　Ｔ細胞サブセットＵＣｅｌｌスコアのバイオリンプロット。

【図１５６－１】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＣＤ８ＴＩＬは、メモリー関連遺伝子の発現の増加を示す。対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、目的の特定の遺伝子のＣＤ８　Ｔ細胞サブセットの正規化した発現のバイオリンプロット。

【図１５６－２】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＣＤ８ＴＩＬは、メモリー関連遺伝子の発現の増加を示す。対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、目的の特定の遺伝子のＣＤ８　Ｔ細胞サブセットの正規化した発現のバイオリンプロット。

【図１５６－３】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＣＤ８ＴＩＬは、メモリー関連遺伝子の発現の増加を示す。対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、目的の特定の遺伝子のＣＤ８　Ｔ細胞サブセットの正規化した発現のバイオリンプロット。

【図１５７Ａ】擬時間軌道分析は、より分化した細胞のサブセットを伴う、低分化状態でのＩｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＣＤ８　ＴＩＬの大部分を示す。Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔは、ＣＤ８＋ＴＩＬ上のクラスター３対２を比較すると、改善された表現型を示す。（Ａ）群（左）及びＭｏｎｏｃｌｅ３定義の擬時間（右）に基づいて着色されたＣＤ８　Ｔ細胞ＵＭＡＰ次元削減可視化。（Ｂ）対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、ＣＤ８　Ｔ細胞サブセットＭｏｎｏｃｌｅ３擬時間のバイオリンプロット。（Ｃ）赤色のボックスを介して強調表示された最も分化したクラスター（２及び３）のうちの２つを有する、群（左）及びＳｅｕｒａｔ定義されたクラスター（右）に基づいて着色された、ＣＤ８　Ｔ細胞ＵＭＡＰ次元削減可視化。（Ｄ）対照（クラスター２）とＩｎｖｉｇｏ－Ｔ（クラスター３）とを比較した、強調表示されたクラスターにおける上位２０個の差異的に発現された遺伝子のヒートマップ可視化。データは、他に言及されない限り、すべての値の分布として示され、群当たりｎ＝５であり、ｐ値は、マン－ホイットニーＵ検定に基づいている。

【図１５７Ｂ】擬時間軌道分析は、より分化した細胞のサブセットを伴う、低分化状態でのＩｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＣＤ８　ＴＩＬの大部分を示す。Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔは、ＣＤ８＋ＴＩＬ上のクラスター３対２を比較すると、改善された表現型を示す。（Ａ）群（左）及びＭｏｎｏｃｌｅ３定義の擬時間（右）に基づいて着色されたＣＤ８　Ｔ細胞ＵＭＡＰ次元削減可視化。（Ｂ）対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、ＣＤ８　Ｔ細胞サブセットＭｏｎｏｃｌｅ３擬時間のバイオリンプロット。（Ｃ）赤色のボックスを介して強調表示された最も分化したクラスター（２及び３）のうちの２つを有する、群（左）及びＳｅｕｒａｔ定義されたクラスター（右）に基づいて着色された、ＣＤ８　Ｔ細胞ＵＭＡＰ次元削減可視化。（Ｄ）対照（クラスター２）とＩｎｖｉｇｏ－Ｔ（クラスター３）とを比較した、強調表示されたクラスターにおける上位２０個の差異的に発現された遺伝子のヒートマップ可視化。データは、他に言及されない限り、すべての値の分布として示され、群当たりｎ＝５であり、ｐ値は、マン－ホイットニーＵ検定に基づいている。

【図１５７Ｃ】擬時間軌道分析は、より分化した細胞のサブセットを伴う、低分化状態でのＩｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＣＤ８　ＴＩＬの大部分を示す。Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔは、ＣＤ８＋ＴＩＬ上のクラスター３対２を比較すると、改善された表現型を示す。（Ａ）群（左）及びＭｏｎｏｃｌｅ３定義の擬時間（右）に基づいて着色されたＣＤ８　Ｔ細胞ＵＭＡＰ次元削減可視化。（Ｂ）対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、ＣＤ８　Ｔ細胞サブセットＭｏｎｏｃｌｅ３擬時間のバイオリンプロット。（Ｃ）赤色のボックスを介して強調表示された最も分化したクラスター（２及び３）のうちの２つを有する、群（左）及びＳｅｕｒａｔ定義されたクラスター（右）に基づいて着色された、ＣＤ８　Ｔ細胞ＵＭＡＰ次元削減可視化。（Ｄ）対照（クラスター２）とＩｎｖｉｇｏ－Ｔ（クラスター３）とを比較した、強調表示されたクラスターにおける上位２０個の差異的に発現された遺伝子のヒートマップ可視化。データは、他に言及されない限り、すべての値の分布として示され、群当たりｎ＝５であり、ｐ値は、マン－ホイットニーＵ検定に基づいている。

【図１５７Ｄ】擬時間軌道分析は、より分化した細胞のサブセットを伴う、低分化状態でのＩｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＣＤ８　ＴＩＬの大部分を示す。Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔは、ＣＤ８＋ＴＩＬ上のクラスター３対２を比較すると、改善された表現型を示す。（Ａ）群（左）及びＭｏｎｏｃｌｅ３定義の擬時間（右）に基づいて着色されたＣＤ８　Ｔ細胞ＵＭＡＰ次元削減可視化。（Ｂ）対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、ＣＤ８　Ｔ細胞サブセットＭｏｎｏｃｌｅ３擬時間のバイオリンプロット。（Ｃ）赤色のボックスを介して強調表示された最も分化したクラスター（２及び３）のうちの２つを有する、群（左）及びＳｅｕｒａｔ定義されたクラスター（右）に基づいて着色された、ＣＤ８　Ｔ細胞ＵＭＡＰ次元削減可視化。（Ｄ）対照（クラスター２）とＩｎｖｉｇｏ－Ｔ（クラスター３）とを比較した、強調表示されたクラスターにおける上位２０個の差異的に発現された遺伝子のヒートマップ可視化。データは、他に言及されない限り、すべての値の分布として示され、群当たりｎ＝５であり、ｐ値は、マン－ホイットニーＵ検定に基づいている。

【図１５８】ＣＤ４　ＴＩＬ上の差異的遺伝子発現分析。対照群とＩｎｖｉｇｏ－Ｔ群とを比較した、ＣＤ４　Ｔ細胞サブセットにおける上位２０個の差異的に発現された遺伝子のヒートマップ可視化。

【図１５９Ａ】擬時間軌道分析は、対照ＴＩＬと比較して、低分化状態でのＩｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＣＤ４　ＴＩＬの大部分を示す。（Ａ）群（左）及びＭｏｎｏｃｌｅ３定義の擬時間（右）に基づいて着色されたＣＤ４　Ｔ細胞ＵＭＡＰ次元削減可視化。（Ｂ）対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、ＣＤ４　Ｔ細胞サブセットＭｏｎｏｃｌｅ３擬時間のバイオリンプロット。

【図１５９Ｂ】擬時間軌道分析は、対照ＴＩＬと比較して、低分化状態でのＩｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＣＤ４　ＴＩＬの大部分を示す。（Ａ）群（左）及びＭｏｎｏｃｌｅ３定義の擬時間（右）に基づいて着色されたＣＤ４　Ｔ細胞ＵＭＡＰ次元削減可視化。（Ｂ）対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、ＣＤ４　Ｔ細胞サブセットＭｏｎｏｃｌｅ３擬時間のバイオリンプロット。

【図１６０Ａ】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＣＤ４　ＴＩＬは、対照処理したＴＩＬと比較して、メモリー関連遺伝子の発現の増加及び疲弊関連遺伝子シグネチャの発現の低下を示す。（Ａ）対照対Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔによってグループ化された各試料についてのＵＣｅｌｌスコア平均の行ｚスコアを示す、幹または疲弊遺伝子シグネチャのＣＤ４　Ｔ細胞サブセット遺伝子セットヒートマップ可視化。（Ｂ）対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、目的の特定の遺伝子のＣＤ４　Ｔ細胞サブセットの正規化発現のバイオリンプロット。データは、他に言及されない限り、すべての値の分布として示され、群当たりｎ＝５である。

【図１６０Ｂ－１】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＣＤ４　ＴＩＬは、対照処理したＴＩＬと比較して、メモリー関連遺伝子の発現の増加及び疲弊関連遺伝子シグネチャの発現の低下を示す。（Ａ）対照対Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔによってグループ化された各試料についてのＵＣｅｌｌスコア平均の行ｚスコアを示す、幹または疲弊遺伝子シグネチャのＣＤ４　Ｔ細胞サブセット遺伝子セットヒートマップ可視化。（Ｂ）対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、目的の特定の遺伝子のＣＤ４　Ｔ細胞サブセットの正規化発現のバイオリンプロット。データは、他に言及されない限り、すべての値の分布として示され、群当たりｎ＝５である。

【図１６０Ｂ－２】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＣＤ４　ＴＩＬは、対照処理したＴＩＬと比較して、メモリー関連遺伝子の発現の増加及び疲弊関連遺伝子シグネチャの発現の低下を示す。（Ａ）対照対Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔによってグループ化された各試料についてのＵＣｅｌｌスコア平均の行ｚスコアを示す、幹または疲弊遺伝子シグネチャのＣＤ４　Ｔ細胞サブセット遺伝子セットヒートマップ可視化。（Ｂ）対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、目的の特定の遺伝子のＣＤ４　Ｔ細胞サブセットの正規化発現のバイオリンプロット。データは、他に言及されない限り、すべての値の分布として示され、群当たりｎ＝５である。

【図１６０Ｂ－３】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＣＤ４　ＴＩＬは、対照処理したＴＩＬと

比較して、メモリー関連遺伝子の発現の増加及び疲弊関連遺伝子シグネチャの発現の低下を示す。（Ａ）対照対Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔによってグループ化された各試料についてのＵＣｅｌｌスコア平均の行ｚスコアを示す、幹または疲弊遺伝子シグネチャのＣＤ４　Ｔ細胞サブセット遺伝子セットヒートマップ可視化。（Ｂ）対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、目的の特定の遺伝子のＣＤ４　Ｔ細胞サブセットの正規化発現のバイオリンプロット。データは、他に言及されない限り、すべての値の分布として示され、群当たりｎ＝５である。

【図１６０Ｂ－４】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＣＤ４　ＴＩＬは、対照処理したＴＩＬと比較して、メモリー関連遺伝子の発現の増加及び疲弊関連遺伝子シグネチャの発現の低下を示す。（Ａ）対照対Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔによってグループ化された各試料についてのＵＣｅｌｌスコア平均の行ｚスコアを示す、幹または疲弊遺伝子シグネチャのＣＤ４　Ｔ細胞サブセット遺伝子セットヒートマップ可視化。（Ｂ）対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、目的の特定の遺伝子のＣＤ４　Ｔ細胞サブセットの正規化発現のバイオリンプロット。データは、他に言及されない限り、すべての値の分布として示され、群当たりｎ＝５である。

【図１６０Ｂ－５】Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ処理したＣＤ４　ＴＩＬは、対照処理したＴＩＬと比較して、メモリー関連遺伝子の発現の増加及び疲弊関連遺伝子シグネチャの発現の低下を示す。（Ａ）対照対Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔによってグループ化された各試料についてのＵＣｅｌｌスコア平均の行ｚスコアを示す、幹または疲弊遺伝子シグネチャのＣＤ４　Ｔ細胞サブセット遺伝子セットヒートマップ可視化。（Ｂ）対照とＩｎｖｉｇｏ－Ｔとを比較した、目的の特定の遺伝子のＣＤ４　Ｔ細胞サブセットの正規化発現のバイオリンプロット。データは、他に言及されない限り、すべての値の分布として示され、群当たりｎ＝５である。

【０１８６】

配列表の簡単な説明

配列番号１は、ムロモナブの重鎖のアミノ酸配列である。

【０１８７】

配列番号２は、ムロモナブの軽鎖のアミノ酸配列である。

【０１８８】

配列番号３は、組換えヒトＩＬ－２タンパク質のアミノ酸配列である。

【０１８９】

配列番号４は、アルデスロイキンのアミノ酸配列である。

【０１９０】

配列番号５は、ＩＬ－２形態である。

【０１９１】

配列番号６は、ネムバロイキンアルファのアミノ酸配列である。

【０１９２】

配列番号７は、ＩＬ－２形態である。

【０１９３】

配列番号８は、ムチンドメインポリペプチドである。

【０１９４】

配列番号９は、組換えヒトＩＬ－４タンパク質のアミノ酸配列である。

【０１９５】

配列番号１０は、組換えヒトＩＬ－７タンパク質のアミノ酸配列である。

【０１９６】

配列番号１１は、組換えヒトＩＬ－１５タンパク質のアミノ酸配列である。

【０１９７】

配列番号１２は、組換えヒトＩＬ－２１タンパク質のアミノ酸配列である。

【０１９８】

配列番号１３は、ＩＬ－２配列である。

【０１９９】
配列番号１４は、ＩＬ－２ムテイン配列である。
【０２００】
配列番号１５は、ＩＬ－２ムテイン配列である。
【０２０１】
配列番号１６は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２である。
【０２０２】
配列番号１７は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ２である。
【０２０３】
配列番号１８は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ３である。
【０２０４】
配列番号１９は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２カバットである。
【０２０５】
配列番号２０は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ２カバットである。
【０２０６】
配列番号２１は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ３カバットである。
【０２０７】
配列番号２２は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２クロチアである。
【０２０８】
配列番号２３は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ２クロチアである。
【０２０９】
配列番号２４は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ３クロチアである。
【０２１０】
配列番号２５は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２　ＩＭＧＴである。
【０２１１】
配列番号２６は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ２　ＩＭＧＴである。
【０２１２】
配列番号２７は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ３　ＩＭＧＴである。
【０２１３】
配列番号２８は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のV_H鎖である。
【０２１４】
配列番号２９は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１の重鎖である。
【０２１５】
配列番号３０は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ１カバットである。
【０２１６】
配列番号３１は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ２カバットである。
【０２１７】
配列番号３２は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ３カバットである。
【０２１８】
配列番号３３は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ１　ｃｈｏｔｈｉａである。
【０２１９】
配列番号３４は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ２　ｃｈｏｔｈｉａである。
【０２２０】
配列番号３５は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ３　ｃｈｏｔｈｉａである。
【０２２１】
配列番号３６は、V_L鎖である。
【０２２２】

配列番号３７は、軽鎖である。
【０２２３】
配列番号３８は、軽鎖である。
【０２２４】
配列番号３９は、軽鎖である。
【０２２５】
配列番号４０は、ヒト４－１ＢＢのアミノ酸配列である。
【０２２６】
配列番号４１は、マウス４－１ＢＢのアミノ酸配列である。
【０２２７】
配列番号４２は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖である。
【０２２８】
配列番号４３は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖である。
【０２２９】
配列番号４４は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖可変領域（V_H）である。
【０２３０】
配列番号４５は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２３１】
配列番号４６は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖ＣＤＲ１である。
【０２３２】
配列番号４７は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖ＣＤＲ２である。
【０２３３】
配列番号４８は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖ＣＤＲ３である。
【０２３４】
配列番号４９は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０２３５】
配列番号５０は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０２３６】
配列番号５１は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０２３７】
配列番号５２は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖である。
【０２３８】
配列番号５３は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖である。
【０２３９】
配列番号５４は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０２４０】
配列番号５５は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６

３５１３）の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０２４１】
配列番号５６は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖ＣＤＲ１である。
【０２４２】
配列番号５７は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖ＣＤＲ２である。
【０２４３】
配列番号５８は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖ＣＤＲ３である。
【０２４４】
配列番号５９は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０２４５】
配列番号６０は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０２４６】
配列番号６１は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０２４７】
配列番号６２は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のＦｃドメインである。
【０２４８】
配列番号６３は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０２４９】
配列番号６４は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０２５０】
配列番号６５は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０２５１】
配列番号６６は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０２５２】
配列番号６７は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０２５３】
配列番号６８は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０２５４】
配列番号６９は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０２５５】
配列番号７０は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０２５６】
配列番号７１は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０２５７】
配列番号７２は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０２５８】
配列番号７３は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のＦｃドメインである。
【０２５９】
配列番号７４は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０２６０】
配列番号７５は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０２６１】
配列番号７６は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０２６２】

配列番号７７は、４－１ＢＢリガンド（４－１ＢＢＬ）アミノ酸配列である。
【０２６３】
配列番号７８は、４－１ＢＢＬポリペプチドの可溶性部分である。
【０２６４】
配列番号７９は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン１の重鎖可変領域（V_H）である。
【０２６５】
配列番号８０は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン１の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２６６】
配列番号８１は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン２の重鎖可変領域（V_H）である。
【０２６７】
配列番号８２は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン２の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２６８】
配列番号８３は、４－１ＢＢアゴニスト抗体Ｈ３９Ｅ３－２の重鎖可変領域（V_H）である。
【０２６９】
配列番号８４は、４－１ＢＢアゴニスト抗体Ｈ３９Ｅ３－２の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２７０】
配列番号８５は、ヒトＯＸ４０のアミノ酸配列である。
【０２７１】
配列番号８６は、マウスＯＸ４０のアミノ酸配列である。
【０２７２】
配列番号８７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖である。
【０２７３】
配列番号８８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖である。
【０２７４】
配列番号８９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖可変領域（V_H）である。
【０２７５】
配列番号９０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２７６】
配列番号９１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖ＣＤＲ１である。
【０２７７】
配列番号９２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖ＣＤＲ２である。
【０２７８】
配列番号９３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖ＣＤＲ３である。
【０２７９】
配列番号９４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０２８０】

配列番号９５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖ＣＤＲ２である。

【０２８１】

配列番号９６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖ＣＤＲ３である。

【０２８２】

配列番号９７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖である。

【０２８３】

配列番号９８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖である。

【０２８４】

配列番号９９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖可変領域（V_H）である。

【０２８５】

配列番号１００は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖可変領域（V_L）である。

【０２８６】

配列番号１０１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ１である。

【０２８７】

配列番号１０２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ２である。

【０２８８】

配列番号１０３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ３である。

【０２８９】

配列番号１０４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ１である。

【０２９０】

配列番号１０５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ２である。

【０２９１】

配列番号１０６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ３である。

【０２９２】

配列番号１０７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖である。

【０２９３】

配列番号１０８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖である。

【０２９４】

配列番号１０９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖可変領域（V_H）である。

【０２９５】

配列番号１１０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖可変領域（V_L）である。

【０２９６】

配列番号１１１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ１である。

【０２９７】

配列番号１１２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ２である。

【０２９８】

配列番号１１３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ３である。

【０２９９】

配列番号１１４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ１である。

【０３００】

配列番号１１５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ２である。

【０３０１】

配列番号１１６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ３である。

【０３０２】

配列番号１１７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖可変領域（V_H）である。

【０３０３】

配列番号１１８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖可変領域（V_L）である。

【０３０４】

配列番号１１９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖ＣＤＲ１である。

【０３０５】

配列番号１２０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖ＣＤＲ２である。

【０３０６】

配列番号１２１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖ＣＤＲ３である。

【０３０７】

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

【０３０８】

配列番号１２３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖ＣＤＲ２である。

【０３０９】

配列番号１２４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖ＣＤＲ３である。

【０３１０】

配列番号１２５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖可変領域（V_H）である。

【０３１１】

配列番号１２６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖可変領域（V_L）である。

【０３１２】

配列番号１２７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖ＣＤＲ１である。

【０３１３】

配列番号１２８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖ＣＤＲ２である。

【０３１４】

配列番号１２９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖ＣＤＲ３である。

【０３１５】
配列番号１３０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０３１６】
配列番号１３１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０３１７】
配列番号１３２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０３１８】
配列番号１３３は、ＯＸ４０リガンド（ＯＸ４０Ｌ）アミノ酸配列である。
【０３１９】
配列番号１３４は、ＯＸ４０Ｌポリペプチドの可溶性部分である。
【０３２０】
配列番号１３５は、ＯＸ４０Ｌポリペプチドの代替可溶性部分である。
【０３２１】
配列番号１３６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体００８の重鎖可変領域（V_H）である。
【０３２２】
配列番号１３７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体００８の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０３２３】
配列番号１３８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０１１の重鎖可変領域（V_H）である。
【０３２４】
配列番号１３９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０１１の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０３２５】
配列番号１４０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２１の重鎖可変領域（V_H）である。
【０３２６】
配列番号１４１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２１の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０３２７】
配列番号１４２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２３の重鎖可変領域（V_H）である。
【０３２８】
配列番号１４３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２３の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０３２９】
配列番号１４４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０３３０】
配列番号１４５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０３３１】
配列番号１４６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０３３２】
配列番号１４７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）で

ある。
【０３３３】
配列番号１４８は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０３３４】
配列番号１４９は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０３３５】
配列番号１５０は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０３３６】
配列番号１５１は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０３３７】
配列番号１５２は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０３３８】
配列番号１５３は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０３３９】
配列番号１５４は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０３４０】
配列番号１５５は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０３４１】
配列番号１５６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０３４２】
配列番号１５７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０３４３】
配列番号１５８は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０３４４】
配列番号１５９は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０３４５】
配列番号１６０は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０３４６】
配列番号１６１は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０３４７】
配列番号１６２は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３４８】
配列番号１６３は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３４９】
配列番号１６４は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０３５０】
配列番号１６５は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３５１】

配列番号１６６は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３５２】
配列番号１６７は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０３５３】
配列番号１６８は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０３５４】
配列番号１６９は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０３５５】
配列番号１７０は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０３５６】
配列番号１７１は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０３５７】
配列番号１７２は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３５８】
配列番号１７３は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３５９】
配列番号１７４は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０３６０】
配列番号１７５は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３６１】
配列番号１７６は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３６２】
配列番号１７７は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０３６３】
配列番号１７８は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０３６４】
配列番号１７９は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０３６５】
配列番号１８０は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０３６６】
配列番号１８１は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０３６７】
配列番号１８２は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３６８】
配列番号１８３は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３６９】
配列番号１８４は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。

【０３７０】
配列番号１８５は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３７１】
配列番号１８６は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３７２】
配列番号１８７は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０３７３】
配列番号１８８は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０３７４】
配列番号１８９は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０３７５】
配列番号１９０は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０３７６】
配列番号１９１は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０３７７】
配列番号１９２は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３７８】
配列番号１９３は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３７９】
配列番号１９４は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０３８０】
配列番号１９５は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３８１】
配列番号１９６は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３８２】
配列番号１９７は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０３８３】
配列番号１９８は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０３８４】
配列番号１９９は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０３８５】
配列番号２００は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０３８６】
配列番号２０１は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０３８７】
配列番号２０２は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３８８】
配列番号２０３は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３８９】
配列番号２０４は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。

【０３９０】
配列番号２０５は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３９１】
配列番号２０６は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３９２】
配列番号２０７は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０３９３】
配列番号２０８は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０３９４】
配列番号２０９は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０３９５】
配列番号２１０は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０３９６】
配列番号２１１は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０３９７】
配列番号２１２は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３９８】
配列番号２１３は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３９９】
配列番号２１４は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０４００】
配列番号２１５は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０４０１】
配列番号２１６は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０４０２】
配列番号２１７は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０４０３】
配列番号２１８は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０４０４】
配列番号２１９は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０４０５】
配列番号２２０は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０４０６】
配列番号２２１は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０４０７】
配列番号２２２は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。

【０４０８】
配列番号２２３は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０４０９】
配列番号２２４は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０４１０】
配列番号２２５は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０４１１】
配列番号２２６は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０４１２】
配列番号２２７は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０４１３】
配列番号２２８は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０４１４】
配列番号２２９は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０４１５】
配列番号２３０は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０４１６】
配列番号２３１は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０４１７】
配列番号２３２は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０４１８】
配列番号２３３は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０４１９】
配列番号２３４は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０４２０】
配列番号２３５は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０４２１】
配列番号２３６は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０４２２】
配列番号２３７は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０４２３】
配列番号２３８は、ＣＤ４０アゴニストＣＤ４０Ｌである。

【発明を実施するための形態】
【０４２４】
Ｉ．導入
（ｉ）インターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）及び抗ＰＤ－１の組み合わせによる、ＣＤ４０アゴニズムの有無にかかわらず、かつＣＴＬＡ－４アゴニズムの有無にかかわらず

、ＲＥＰ前刺激、（ｉｉ）ＲＥＰ拡張及び／またはＲＥＰ前拡張中に、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、低濃度ＩＬ－２などの様々なサイトカイン組み合わせを、ＡＫＴ阻害（ＡＫＴｉ）の有無にかかわらず添加すること、及び／または（ｉｉｉ）ＲＥＰ拡張及び／またはＲＥＰ前拡張中に低濃度ＩＬ－２及びＡＫＴｉを添加することによる、ＴＩＬを産生する方法が、本明細書で提供される。かかるＴＩＬを使用する治療方法もまた、本明細書で提供される。

【０４２５】

定義

他に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味と同じである。本明細書で参照されるすべての特許及び刊行物は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。

【０４２６】

本明細書で使用される「同時投与」、「同時投与すること」、「組み合わせて投与される」、「組み合わせて投与すること」、「同時（ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓ）」、及び「同時（ｃｏｎｃｕｒｒｅｎｔ）」という用語は、対象への２つ以上の医薬品有効成分（本発明のいくつかの実施形態では、例えば、複数のＴＩＬ）の投与を包含し、医薬品有効成分及び／またはそれらの代謝物の両方が、対象において同時に存在するようにする。同時投与には、別々の組成物での同時投与、別々の組成物での異なる時間での投与、または２つ以上の医薬品有効成分が存在する組成物での投与が含まれる。別々の組成物での同時投与及び両方の薬剤が存在する組成物での投与が好ましい。

【０４２７】

「インビボ」という用語は、対象の体内で起こる事象を指す。

【０４２８】

「インビトロ」という用語は、対象の体外で起こる事象を指す。インビトロアッセイには、生きている細胞または死んでいる細胞が用いられる細胞ベースのアッセイが包含され、無傷の細胞が用いられない無細胞アッセイも含み得る。

【０４２９】

「エクスビボ」という用語は、対象の体から除去された細胞、組織、及び／または器官に対する治療または処置の実施を伴う事象を指す。適切には、細胞、組織、及び／または器官は、外科手術または治療の方法で対象の体に戻され得る。

【０４３０】

「急速拡張」という用語は、１週間の期間にわたって少なくとも約３倍（または４、５、６、７、８、もしくは９倍）、より好ましくは１週間の期間にわたって少なくとも約１０倍（または２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、もしくは９０倍）、あるいは最も好ましくは１週間の期間にわたって少なくとも約１００倍の抗原特異的ＴＩＬの数の増加を意味する。本明細書では、いくつかの急速拡張プロトコルが説明されている。

【０４３１】

本明細書における「腫瘍浸潤リンパ球」または「ＴＩＬ」とは、対象の血流を離れて腫瘍に移動した白血球として最初に取得された細胞の集団を意味する。ＴＩＬには、ＣＤ８$^+$細胞傷害性Ｔ細胞（リンパ球）、Ｔｈ１及びＴｈ１７　ＣＤ４$^+$Ｔ細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、ならびにＭ１マクロファージが含まれるが、これらに限定されない。ＴＩＬには、一次ＴＩＬ及び二次ＴＩＬの両方が含まれる。「一次ＴＩＬ」は、本明細書に概説されるように患者組織試料から得られるもの（「新たに採取された」と称されることもある）であり、「二次ＴＩＬ」は、本明細書で考察される拡張または増殖された任意のＴＩＬ細胞集団であり、バルクＴＩＬ及び拡張ＴＩＬ（「ＲＥＰ　ＴＩＬ」または「ｐｏｓｔ－ＲＥＰ　ＴＩＬ」）が含まれるが、これらに限定されない。ＴＩＬ細胞集団には、遺伝子修飾ＴＩＬが含まれ得る。

【０４３２】

ＴＩＬは、一般に、細胞表面マーカーを使用して生化学的に定義されるか、または腫瘍に浸潤して治療を達成するそれらの能力によって機能的に定義されるかのいずれかであり

得る。ＴＩＬは、一般に、ＣＤ４、ＣＤ８、ＴＣＲαβ、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ５６、ＣＣＲ７、ＣＤ４５Ｒａ、ＣＤ９５、ＰＤ－１、及びＣＤ２５のうちの１つ以上のバイオマーカーの発現によって分類され得る。追加として及び代替的に、ＴＩＬは、患者への再導入時に固形腫瘍に浸潤する能力により機能的に定義され得る。ＴＩＬは、効力によってさらに特徴付けられ得、例えば、インターフェロン（ＩＦＮ）放出が、約５０ｐｇ／ｍＬを超える、約１００ｐｇ／ｍＬを超える、約１５０ｐｇ／ｍＬを超える、または約２００ｐｇ／ｍＬを超える場合、ＴＩＬは強力であるとみなされ得る。例えば、インターフェロン（ＩＦＮγ）放出が、約５０ｐｇ／ｍＬを超える、約１００ｐｇ／ｍＬを超える、約１５０ｐｇ／ｍＬを超える、または約２００ｐｇ／ｍＬを超える、約３００ｐｇ／ｍＬを超える、約４００ｐｇ／ｍＬを超える、約５００ｐｇ／ｍＬを超える、約６００ｐｇ／ｍＬを超える、約７００ｐｇ／ｍＬを超える、約８００ｐｇ／ｍＬを超える、約９００ｐｇ／ｍＬ、約１０００ｐｇ／ｍＬを超える場合、ＴＩＬは強力であるとみなされ得る。

【０４３３】

「ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ」または「ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団」または前述のうちのいずれかの文法的変型は、参照されるＴＩＬまたはＴＩＬ集団が取得される任意のＴＩＬ／ＴＩＬ集団と比較して、平均して検出不能な、低い、または低下したレベルの細胞表面タンパク質ＣＤ３９及びＣＤ６９を示すＴＩＬまたはＴＩＬ集団を意味する。

【０４３４】

「ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}濃縮ＴＩＬ」または「ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}濃縮ＴＩＬ集団」または前述のうちのいずれかの文法的変型は、参照されるＴＩＬまたはＴＩＬ集団が取得される任意のＴＩＬ／ＴＩＬ集団と比較して、平均して検出不能な、低い、または低下したレベルの細胞表面タンパク質ＣＤ３９及びＣＤ６９を有するＴＩＬについて濃縮されたＴＩＬまたはＴＩＬ集団を意味する。任意の濃縮手段を使用して、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}濃縮ＴＩＬを取得することができ、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬの選別または選択が含まれる。

【０４３５】

本明細書における「細胞の集団」（ＴＩＬを含む）とは、共通の形質を共有するいくつかの細胞を意味する。一般に、集団は、概して１×１０^{6}～１×１０^{10}の数の範囲であり、異なるＴＩＬ集団は、異なる数を含む。例えば、ＩＬ－２の存在下での一次ＴＩＬの初期成長は、およそ１×１０^{8}細胞のバルクＴＩＬ集団をもたらす。ＲＥＰ拡張は、一般に、注入用の１．５×１０^{9}～１．５×１０^{10}細胞の集団を提供するために行われる。

【０４３６】

本明細書における「凍結保存されたＴＩＬ」とは、一次、バルク、または拡張（ＲＥＰＴＩＬ）のいずれかのＴＩＬが、約－１５０℃～－６０℃の範囲で処理及び保管されることを意味する。凍結保存のための一般的な方法は、実施例を含む本明細書の他の場所にも記載されている。明確にするために、「凍結保存されたＴＩＬ」は、一次ＴＩＬのソースとして使用される可能性のある凍結組織試料と区別することができる。

【０４３７】

本明細書における「解凍された凍結保存ＴＩＬ」とは、以前に凍結保存され、その後、細胞培養温度またはＴＩＬが患者に投与され得る温度を含むがこれらに限定されない、室温以上に戻るように処理されたＴＩＬ集団を意味する。

【０４３８】

ＴＩＬは、一般に、細胞表面マーカーを使用して生化学的に定義されるか、または腫瘍に浸潤して治療を達成するそれらの能力によって機能的に定義されるかのいずれかであり得る。ＴＩＬは、一般に、ＣＤ４、ＣＤ８、ＴＣＲαβ、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ５６、ＣＣＲ７、ＣＤ４５Ｒａ、ＣＤ９５、ＰＤ－１、及びＣＤ２５のうちの１つ以上のバイ

オマーカーの発現によって分類され得る。追加として及び代替的に、ＴＩＬは、患者への再導入時に固形腫瘍に浸潤する能力により機能的に定義され得る。

【０４３９】

「凍結保存培地（ｃｒｙｏｐｒｅｓｅｒｖａｔｉｏｎ ｍｅｄｉａ）」または「凍結保存培地（ｃｒｙｏｐｒｅｓｅｒｖａｔｉｏｎ ｍｅｄｉｕｍ）」という用語は、細胞の凍結保存に使用できる任意の培地を指す。かかる培地は、７％～１０％のＤＭＳＯを含む培地を含むことができる。例示的な培地には、ＣｒｙｏＳｔｏｒ ＣＳ１０、Ｈｙｐｅｒｔｈｅｒｍａｓｏｌ、及びそれらの組み合わせが含まれる。「ＣＳ１０」という用語は、Ｓｔｅｍｃｅｌｌ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓまたはＢｉｏｌｉｆｅ Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓから入手した凍結保存培地を指す。ＣＳ１０培地は、商品名「ＣｒｙｏＳｔｏｒ（登録商標）ＣＳ１０」と称され得る。ＣＳ１０培地は、ＤＭＳＯを含む無血清の動物成分を含まない培地である。

【０４４０】

「セントラルメモリーＴ細胞」という用語は、ヒトではＣＤ４５ＲＯ＋であり、ＣＣＲ７（ＣＣＲ７^{高}）及びＣＤ６２Ｌ（ＣＤ６２^{高}）を構成的に発現するＴ細胞のサブセットを指す。セントラルメモリーＴ細胞の表面表現型には、ＴＣＲ、ＣＤ３、ＣＤ１２７（ＩＬ－７Ｒ）、及びＩＬ－１５Ｒも含まれる。セントラルメモリーＴ細胞の転写因子には、ＢＣＬ－６、ＢＣＬ－６Ｂ、ＭＢＤ２、及びＢＭＩ１が含まれる。セントラルメモリーＴ細胞は、ＴＣＲトリガー後、エフェクター分子としてＩＬ－２及びＣＤ４０Ｌを主に分泌する。セントラルメモリーＴ細胞は、血液中のＣＤ４コンパートメントで優勢であり、ヒトではリンパ節及び扁桃腺において比例して濃縮される。

【０４４１】

「エフェクターメモリーＴ細胞」という用語は、セントラルメモリーＴ細胞と同様にＣＤ４５ＲＯ＋であるが、ＣＣＲ７の構成的発現を失い（ＣＣＲ７^{低}）、ＣＤ６２Ｌ発現が不均一であるかまたは低い（ＣＤ６２Ｌ^{低}）、ヒトまたは哺乳動物Ｔ細胞のサブセットを指す。セントラルメモリーＴ細胞の表面表現型には、ＴＣＲ、ＣＤ３、ＣＤ１２７（ＩＬ－７Ｒ）、及びＩＬ－１５Ｒも含まれる。セントラルメモリーＴ細胞の転写因子には、ＢＬＩＭＰ１が含まれる。エフェクターメモリーＴ細胞は、インターフェロンガンマ、ＩＬ－４、及びＩＬ－５を含む、抗原刺激後に高レベルの炎症性サイトカインを急速に分泌する。エフェクターメモリーＴ細胞は、血液中のＣＤ８コンパートメントで優勢であり、ヒトでは肺、肝臓、及び腸において比例して濃縮される。ＣＤ８＋エフェクターメモリーＴ細胞は、大量のパーフォリンを担持する。

【０４４２】

「閉鎖系」という用語は、外部環境に対して閉鎖されている系を指す。細胞培養法に適した任意の閉鎖系を、本発明の方法で用いることができる。閉鎖系には、例えば、密閉Ｇ容器が含まれるが、これに限定されない。腫瘍セグメントが閉鎖系に付加されると、ＴＩＬを患者に投与する準備ができるまで、系は外部環境に開かれない。

【０４４３】

腫瘍を破壊するためのプロセスを説明するために本明細書で使用される「断片化すること」、「断片」、及び「断片化された」という用語は、腫瘍組織を破砕、スライス、分割、及び細切するなどの機械的断片化法、ならびに腫瘍組織の物理的構造を破壊するための任意の他の方法を含む。

【０４４４】

「末梢血単核細胞」及び「ＰＢＭＣ」という用語は、リンパ球（Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞）及び単球を含む、丸い核を有する末梢血細胞を指す。抗原提示細胞として使用される場合（ＰＢＭＣは抗原提示細胞の一種である）、末梢血単核細胞は、好ましくは、放射線照射された同種異系末梢血単核細胞である。

【０４４５】

「末梢血リンパ球」及び「ＰＢＬ」という用語は、末梢血から拡張したＴ細胞を指す。いくつかの実施形態では、ＰＢＬは、ドナーからの全血またはアフェレーシス産物から分

離される。いくつかの実施形態では、ＰＢＬは、ＣＤ３＋ＣＤ４５＋のＴ細胞表現型などのＴ細胞表現型の正または負の選択によって、ドナー由来の全血またはアフェレーシス産物から分離される。

【０４４６】

「抗ＣＤ３抗体」という用語は、成熟Ｔ細胞のＴ細胞抗原受容体におけるＣＤ３受容体に対するヒト、ヒト化、キメラ、またはマウス抗体を含む、抗体またはそのバリアント、例えば、モノクローナル抗体を指す。抗ＣＤ３抗体には、ムロモナブとしても知られるＯＫＴ－３が含まれる。抗ＣＤ３抗体には、Ｔ３及びＣＤ３εとしても知られるＵＨＣＴ１クローンも含まれる。他の抗ＣＤ３抗体には、例えば、オテリキシズマブ、テプリズマブ、及びビシリズマブが含まれる。

【０４４７】

「ＯＫＴ－３」（本明細書では「ＯＫＴ３」とも称される）という用語は、成熟Ｔ細胞のＴ細胞抗原受容体におけるＣＤ３受容体に対するヒト、ヒト化、キメラ、またはマウス抗体を含む、モノクローナル抗体またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを指し、市販の形態、例えば、ＯＫＴ－３（３０ｎｇ／ｍＬ、ＭＡＣＳ ＧＭＰ ＣＤ３ ｐｕｒｅ、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）及びムロモナブ、またはそれらのバリアント、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、またはバイオシミラーを含む。ムロモナブの重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を表１に示す（配列番号１及び配列番号２）。ＯＫＴ－３を産生することができるハイブリドーマは、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎに寄託され、ＡＴＣＣ受託番号ＣＲＬ８００１が割り当てられている。ＯＫＴ－３を産生することができるハイブリドーマは、Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ａｕｔｈｅｎｔｉｃａｔｅｄ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ（ＥＣＡＣＣ）にも寄託され、カタログ番号８６０２２７０６が割り当てられている。

【０４４８】

【表１】

表１．ムロモナブのアミノ酸配列（例示的なＯＫＴ－３抗体）

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）	
配列番号１ ムロモナブ重鎖	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS EEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
配列番号２ ムロモナブ軽鎖	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC	60 120 180 213

【０４４９】

「ＩＬ－２」（本明細書では「ＩＬ２」とも称される）という用語は、インターロイキン－２として知られるＴ細胞成長因子を指し、ヒト及び哺乳動物形態、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、バイオシミラー、及びバリアントを含む、ＩＬ－２のすべての形態を含む。ＩＬ－２は、例えば、Ｎｅｌｓｏｎ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００４，１７２，３９８３－８８及びＭａｌｅｋ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００８，２６，４５３－７９に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－２のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号３）。例えば、ＩＬ－２という用語は、アルデスロイキン（ＰＲＯＬＥＵＫＩＮ、単回使用バイアル当たり２２００万ＩＵで複数の供給業者から市販されている）などのヒト組換えＩＬ－２形態、ならびにＣｅｌｌＧｅｎｉｘ，Ｉｎｃ．，Ｐｏｒｔｓｍｏｕｔｈ，ＮＨ，ＵＳＡ

（ＣＥＬＬＧＲＯ　ＧＭＰ）またはＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ　ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ　Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ　Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡによって市販されている組換えＩＬ－２形態（カタログ番号ＣＹＴ－２０９－ｂ）及び他のベンダーからの他の商用同等物を包含する。アルデスロイキン（デス－アラニル－１、セリン－１２５ヒトＩＬ－２）は、およそ１５ｋＤａの分子量を有する非グリコシル化ヒト組換えＩＬ－２形態である。本発明での使用に好適なアルデスロイキンのアミノ酸配列を表２に示す（配列番号４）。ＩＬ－２という用語はまた、ペグ化ＩＬ２プロドラッグベンペガルデスロイキン（ＮＫＴＲ－２１４、平均６個のリジン残基が［（２，７－ビス｛［メチルポリ（オキシエチレン）］カルバモイル｝－９Ｈ－フルオレン－９－イル）メトキシ］カルボニル）で置換されたＮ^{6}である、配列番号４のようなペグ化ヒト組換えＩＬ－２）を含む、本明細書に記載のＩＬ－２のペグ化形態も包含し、Ｎｅｋｔａｒ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（Ｓｏｕｔｈ　Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）から入手可能であるか、または国際特許出願公開第ＷＯ２０１８／１３２４９６　Ａ１号の実施例１９に記載の方法、または米国特許出願公開第２０１９／０２７５１３３　Ａ１号の実施例１に記載の方法など、当該技術分野で知られている方法によって調製することができ、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適なベンペガルデスロイキン（ＮＫＴＲ－２１４）及び他のペグ化ＩＬ－２分子は、米国特許出願公開第２０１４／０３２８７９１　Ａ１号及び国際特許出願公開第ＷＯ２０１２／０６５０８６　Ａ１号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適な複合化ＩＬ－２の代替形態は、米国特許第４，７６６，１０６号、同第５，２０６，３４４号、同第５，０８９，２６１号、及び同第４，９０２，５０２号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適なＩＬ－２の製剤は、米国特許第６，７０６，２８９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０４５０】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、Ｓｙｎｔｈｏｒｘ，Ｉｎｃ．から入手可能なＴＨＯＲ－７０７である。本発明での使用に好適なＴＨＯＲ－７０７及びＩＬ－２の追加の代替形態の調製ならびに特性は、米国特許出願公開第２０２０／０１８１２２０　Ａ１号及び同第２０２０／０３３０６０１　Ａ１号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、単離及び精製ＩＬ－２ポリペプチドと、Ｋ３５、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｋ４３、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｋ６４、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択されるアミノ酸位置で単離及び精製ＩＬ　－　２ポリペプチドに結合する複合部分と、を含む、インターロイキン２（ＩＬ－２）複合体であり、アミノ酸残基の番号付けは配列番号５に対応する。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｋ６４、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｔ３７、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｒ３８及びＫ６４から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｅ６１、Ｅ６２、及びＥ６８から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｅ６２である。いくつかの実施形態では、Ｋ３５、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｋ４３、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｋ６４、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択されるアミノ酸残基は、リジン、システイン、またはヒスチジンにさらに変異する。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基は、システインに変異する。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基は、リジンに変異する。いくつかの実施形態では、Ｋ３５、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｋ４３、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｋ６４、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択されるアミノ酸

残基は、非天然アミノ酸にさらに変異する。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）、Ｎ６－プロパルギルエトキシ－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、ＢＣＮ－Ｌ－リジン、ノルボルネンリジン、ＴＣＯ－リジン、メチルテトラジンリジン、アリルオキシカルボニルリジン、２－アミノ－８－オキソノナン酸、２－アミノ－８－オキソオクタン酸、ｐ－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジドメチル－Ｌ－フェニルアラニン（ｐＡＭＦ）、ｐ－ヨード－Ｌ－フェニルアラニン、ｍ－アセチルフェニルアラニン、２－アミノ－８－オキソノナン酸、ｐ－プロパルギルオキシフェニルアラニン、ｐ－プロパルギル－フェニルアラニン、３－メチル－フェニルアラニン、Ｌ－ドーパ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジド－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アシル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ベンゾイル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ブロモフェニルアラニン、ｐ－アミノ－Ｌ－フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、Ｏ－アリルチロシン、Ｏ－メチル－Ｌ－チロシン、Ｏ－４－アリル－Ｌ－チロシン、４－プロピル－Ｌ－チロシン、ホスホノチロシン、トリ－Ｏ－アセチル－ＧｌｃＮＡｃｐ－セリン、Ｌ－ホスホセリン、ホスホノセリン、Ｌ－３－（２－ナフチル）アラニン、２－アミノ－３－（（２－（（３－（ベンジルオキシ）－３－オキソプロピル）アミノ）エチル）セラニル）プロパン酸、２－アミノ－３－（フェニルセラニル）プロパン酸、またはセレノシステインを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２複合体は、野生型ＩＬ－２ポリペプチドと比較して、ＩＬ－２受容体α（ＩＬ－２Ｒα）サブユニットに対する減少した親和性を有する。いくつかの実施形態では、減少した親和性は、野生型ＩＬ－２ポリペプチドと比較して、ＩＬ－２Ｒαに対する結合親和性の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、または９９％を超える減少である。いくつかの実施形態では、減少した親和性は、野生型ＩＬ－２ポリペプチドと比較して、約１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、３０倍、５０倍、１００倍、２００倍、３００倍、５００倍、１０００倍以上である。いくつかの実施形態では、複合部分は、ＩＬ－２とＩＬ－２Ｒαとの結合を損なうかまたは遮断する。いくつかの実施形態では、複合部分は、水溶性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、水溶性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリ（プロピレングリコール）（ＰＰＧ）、エチレングリコール及びプロピレングリコールのコポリマー、ポリ（オキシエチル化ポリオール）、ポリ（オレフィンアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリルアミド）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリレート）、ポリ（サッカライド）、ポリ（α－ヒドロキシ酸）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン（ＰＯＺ）、ポリ（Ｎ－アクリロイルモルホリン）、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ＰＥＧを含む。いくつかの実施形態では、ＰＥＧは、直鎖状ＰＥＧまたは分岐状ＰＥＧである。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ポリサッカライドを含む。いくつかの実施形態では、ポリサッカライドは、デキストラン、ポリシアル酸（ＰＳＡ）、ヒアルロン酸（ＨＡ）、アミロース、ヘパリン、ヘパランサルフェート（ＨＳ）、デキストリン、またはヒドロキシエチルデンプン（ＨＥＳ）を含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、グリカンを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ポリアミンを含む。いくつかの実施形態では、複合部分は、タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、アルブミン、トランスフェリン、またはトランスサイレチンを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、Ｆｃ部分を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、ＩｇＧのＦｃ部分を含む。いくつかの実施形態では、複合部分は、ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、ＸＴＥＮペプチド、グリシンリッチホモアミノ酸ポリマー（ＨＡＰ）、ＰＡＳポリペプチド、エラスチン様ポリペプチド（ＥＬＰ）、ＣＴＰペプチド

、またはゼラチン様タンパク質（ＧＬＫ）ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、単離及び精製ＩＬ－２ポリペプチドは、グルタミル化によって修飾される。いくつかの実施形態では、複合部分は、単離及び精製ＩＬ－２ポリペプチドと直接的に結合される。いくつかの実施形態では、複合部分は、リンカーを介して単離及び精製されたＩＬ－２ポリペプチドと間接的に結合される。いくつかの実施形態では、リンカーは、ホモ二官能性リンカーを含む。いくつかの実施形態では、ホモ二官能性リンカーは、ロマント試薬ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）ＤＳＰ、３′３′－ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（ＤＴＳＳＰ）、ジスクシンイミジルスベラート（ＤＳＳ）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベラート（ＢＳ）、ジスクシンイミジルタータラート（ＤＳＴ）、ジスルホスクシンイミジルタータラート（スルホＤＳＴ）、エチレングリコビス（スクシンイミジルスクシネート）（ＥＧＳ）、ジスクシンイミジルグルタラート（ＤＳＧ）、Ｎ，Ｎ′－ジスクシンイミジルカーボナート（ＤＳＣ）、ジメチルアジピミデート（ＤＭＡ）、ジメチルピメリミデート（ＤＭＰ）、ジメチルスベリミデート（ＤＭＳ）、ジメチル－３，３′－ジチオビスプロピオンイミデート（ＤＴＢＰ）、１，４－ジ－（３′－（２′－ピリジルジチオ）プロピオンアミド）ブタン（ＤＰＤＰＢ）、ビスマレイミドヘキサン（ＢＭＨ）、ハロゲン化アリール含有化合物（ＤＦＤＮＢ）、例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼンまたは１，３－ジフルオロ－４，６－ジニトロベンゼン、４，４′－ジフルオロ－３，３′－ジニトロフェニルスルホン（ＤＦＤＮＰＳ）、ビス－［β－（４－アジドサリチルアミド）エチル］ジスルフィド（ＢＡＳＥＤ）、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、１，４－ブタンジオールジグリシジルエーテル、アジピン酸ジヒドラジド、カルボヒドラジド、ｏ－トルイジン、３，３′－ジメチルベンジジン、ベンジジン、α，α′－ｐ－ジアミノジフェニル、ジヨード－ｐ－キシレンスルホン酸、Ｎ，Ｎ′－エチレン－ビス（ヨードアセトアミド）、またはＮ，Ｎ′－ヘキサメチレンビス（ヨードアセトアミド）を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、ヘテロ二官能性リンカーを含む。いくつかの実施形態では、ヘテロ二官能性リンカーは、Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ｓＰＤＰ）、長鎖Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＬＣ－ｓＰＤＰ）、水溶性長鎖Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（スルホ－ＬＣ－ｓＰＤＰ）、スクシンイミジルオキシカルボニル－α－メチル－α－（２－ピリジルジチオ）トルエン（ｓＭＰＴ）、スルホスクシンイミジル－６－［α－メチル－α－（２－ピリジルジチオ）トルアミド］ヘキサノエート（スルホ－ＬＣ－ｓＭＰＴ）、スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ｓＭＣＣ）、スルホスクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（スルホ－ｓＭＣＣ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル（スルホ－ＭＢ）、Ｎ－スクシンイミジル（４－ヨードアセチル）アミノベンゾエート（ｓＩＡＢ）、スルホスクシンイミジル（４－ヨードアセチル）アミノベンゾエート（スルホ－ｓＩＡＢ）、スクシンイミジル－４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート（ｓＭＰＢ）、スルホスクシンイミジル－４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート（スルホ－ｓＭＰＢ）、Ｎ－（γ－マレイミドブチリルオキシ）スクシンイミドエステル（ＧＭＢ）、Ｎ－（γ－マレイミドブチリルオキシ）スルホスクシンイミドエステル（スルホ－ＧＭＢ）、スクシンイミジル６－（（ヨードアセチル）アミノ）ヘキサノエート（ｓＩＡＸ）、スクシンイミジル６－［６－（（（ヨードアセチル）アミノ）ヘキサノイル）アミノ］ヘキサノエート（ｓｌＡＸＸ）、スクシンイミジル４－（（（ヨードアセチル）アミノ）メチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ｓＩＡＣ）、スクシンイミジル６－（（（（（４－ヨードアセチル）アミノ）メチル）シクロヘキサン－１－カルボニル）アミノ）ヘキサノエート（ｓＩＡＣＸ）、ｐ－ニトロフェニルヨードアセテート（ＮＰＩＡ）、カルボニル反応性及びスルフヒドリル反応性架橋剤、例えば、４－（４－Ｎ－マレイミドフェニル）酪酸ヒドラジド（ＭＰＢＨ）、４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシル－ヒドラジド－８（Ｍ２Ｃ２Ｈ）、３－（

２－ピリジルジチオ）プロピオニルヒドラジド（ＰＤＰＨ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジル－４－アジドサリチル酸（ＮＨｓ－ＡｓＡ）、Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミジル－４－アジドサリチル酸（スルホ－ＮＨｓ－ＡｓＡ）、スルホスクシンイミジル－（４－アジドサリチルアミド）ヘキサノエート（スルホ－ＮＨｓ－ＬＣ－ＡｓＡ）、スルホスクシンイミジル－２－（ｐ－アジドサリチルアミド）エチル－１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡｓＤ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジル－４－アジドベンゾエート（ＨｓＡＢ）、Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミジル－４－アジドベンゾエート（スルホ－ＨｓＡＢ）、Ｎ－スクシンイミジル－６－（４’－アジド－２’－ニトロフェニルアミノ）ヘキサノエート（ｓＡＮＰＡＨ）、スルホスクシンイミジル－６－（４’－アジド－２’－ニトロフェニルアミノ）ヘキサノエート（スルホ－ｓＡＮＰＡＨ）、Ｎ－５－アジド－２－ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド（ＡＮＢ－ＮＯ）、スルホスクシンイミジル－２－（ｍ－アジド－ｏ－ニトロベンズアミド）－エチル－１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡＮＤ）、Ｎ－スクシンイミジル－４（４－アジドフェニル）１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡＤＰ）、Ｎ－スルホスクシンイミジル（４－アジドフェニル）－１，３’－ジチオプロピオネート（スルホ－ｓＡＤＰ）、スルホスクシンイミジル４－（ρ－アジドフェニル）ブチレート（スルホ－ｓＡＰＢ）、スルホスクシンイミジル２－（７－アジド－４－メチルクマリン－３－アセトアミド）エチル－１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡＥＤ）、スルホスクシンイミジル７－アジド－４－メチルクマリン－３－アセテート（スルホ－ｓＡＭＣＡ）、ｐ－ニトロフェニルジアゾピルベート（ｐＮＰＤＰ）、ｐ－ニトロフェニル－２－ジアゾ－３，３，３－トリフルオロプロピオネート（ＰＮＰ－ＤＴＰ）、１－（ρ－アジドサリチルアミド）－４－（ヨードアセトアミド）ブタン（ＡｓＩＢ）、Ｎ－［４－（ρ－アジドサリチルアミド）ブチル］－３’－（２’－ピリジルジチオ）プロピオンアミド（ＡＰＤＰ）、ベンゾフェノン－４－ヨードアセトアミド、ｐ－アジドベンゾイルヒドラジド（ＡＢＨ）、４－（ρ－アジドサリチルアミド）ブチルアミン（ＡｓＢＡ）、またはｐ－アジドフェニルグリオキサール（ＡＰＧ）を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、任意選択でジペプチドリンカーを含む、切断可能なリンカーを含む。いくつかの実施形態では、ジペプチドリンカーは、Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｖａｌ－Ａｌａ、またはＶａｌ－Ｌｙｓを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、切断不可能なリンカーを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、任意選択で、マレイミドカプロイル（ｍｃ）、スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ｓＭＣＣ）、またはスルホスクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（スルホ－ｓＭＣＣ）を含むマレイミド基を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、スペーサーをさらに含む。いくつかの実施形態では、スペーサーは、ｐ－アミノベンジルアルコール（ＰＡＢ）、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢＣ）、その誘導体、または類似体を含む。いくつかの実施形態では、複合部分は、ＩＬ－２複合体の血清半減期を延長することができる。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、ＩＬ－２複合体の血清半減期を延長することができる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、本明細書に記載のＩＬ－２形態のうちのいずれかの断片である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、米国特許出願公開第２０２０／０１８１２２０　Ａ１号及び米国特許出願公開第２０２０／０３３０６０１　Ａ１号に開示されているようにペグ化されている。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む複合部分に共有結合したＮ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含むＩＬ－２ポリペプチドを含む、ＩＬ－２複合体であり、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５と少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＡｚＫは、配列番号５内のアミノ酸位置に関して、Ｋ３５位、Ｆ４２位、Ｆ４４位、Ｋ４３位、Ｅ６２位、Ｐ６５位、Ｒ３８位、Ｔ４１位、Ｅ６８位、Ｙ４５位、Ｖ６９位、またはＬ７２位でアミノ酸を置換する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５に対して１残基のＮ末端欠失を含む。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ＩＬ－２Ｒアルファ鎖会合

を欠いているが、中間親和性ＩＬ－２Ｒベーターガンマシグナル伝達複合体との正常な結合を保持している。

【０４５１】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む複合部分に共有結合したＮ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含むＩＬ－２ポリペプチドを含む、ＩＬ－２複合体であり、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５と少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＡｚＫは、配列番号５内のアミノ酸位置に関して、Ｋ３５位、Ｆ４２位、Ｆ４４位、Ｋ４３位、Ｅ６２位、Ｐ６５位、Ｒ３８位、Ｔ４１位、Ｅ６８位、Ｙ４５位、Ｖ６９位、またはＬ７２位でアミノ酸を置換する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む複合部分に共有結合したＮ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含むＩＬ－２ポリペプチドを含む、ＩＬ－２複合体であり、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５と少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＡｚＫは、配列番号５内のアミノ酸位置に関して、Ｋ３５位、Ｆ４２位、Ｆ４４位、Ｋ４３位、Ｅ６２位、Ｐ６５位、Ｒ３８位、Ｔ４１位、Ｅ６８位、Ｙ４５位、Ｖ６９位、またはＬ７２位でアミノ酸を置換する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む複合部分に共有結合したＮ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含むＩＬ－２ポリペプチドを含む、ＩＬ－２複合体であり、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５と少なくとも９８％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＡｚＫは、配列番号５内のアミノ酸位置に関して、Ｋ３５位、Ｆ４２位、Ｆ４４位、Ｋ４３位、Ｅ６２位、Ｐ６５位、Ｒ３８位、Ｔ４１位、Ｅ６８位、Ｙ４５位、Ｖ６９位、またはＬ７２位でアミノ酸を置換する。

【０４５２】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ＡＬＫＳ－４２３０（配列番号６）としても知られるネムバロイキンアルファであり、Ａｌｋｅｒｍｅｓ，Ｉｎｃ．から入手可能である。ネムバロイキンアルファは、ペプチジルリンカー（^{60}ＧＧ^{61}）を介してヒトインターロイキン２断片（６２－１３２）と融合し、ペプチジルリンカー（^{133}ＧＳＧＧＧＳ^{138}）を介してヒトインターロイキン２受容体α鎖断片（１３９－３０３）と融合し、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞で産生され、グリコシル化されている、ヒトインターロイキン２断片（１－５９）、バリアント（Ｃｙｓ^{125}＞Ｓｅｒ^{51}）；G_2ペプチドリンカー（６０－６１）を介してヒトインターロイキン２（ＩＬ－２）（４－７４）－ペプチド（６２－１３２）と融合し、ＧＳＧ$_3$Ｓペプチドリンカー（１３３－１３８）を介してヒトインターロイキン２受容体α鎖（ＩＬ２Ｒサブユニットアルファ、ＩＬ２Ｒα、ＩＬ２ＲＡ）（１－１６５）－ペプチド（１３９－３０３）と融合し、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞で産生され、アルファグリコシル化されている、ヒトインターロイキン２（ＩＬ－２）（７５－１３３）－ペプチド［Ｃｙｓ^{125}（５１）＞Ｓｅｒ］－変異体（１－５９）としても知られている。ネムバロイキンアルファのアミノ酸配列は、配列番号６に示されている。いくつかの実施形態では、ネムバロイキンアルファは、以下の翻訳後修飾を示す：以下の位置でのジスルフィド架橋：３１－１１６、１４１－２８５、１８４－２４２、２６９－３０１、１６６－１９７、または１６６－１９９、１６８－１９９または１６８－１９７（配列番号６の番号付けを使用する）、及び以下の位置でのグリコシル化部位：配列番号６の番号付けを使用する、Ｎ１８７、Ｎ２０６、Ｔ２１２。ネムバルイキン　アルファの調製及び特性、ならびに本発明での使用に好適な追加の代替形態のＩＬ－２は、米国特許出願公開第２０２１／００３８６８４　Ａ１号及び米国特許第１０，１８３，９７９号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、配列番号６と少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または少なくとも９０％の配列同一性を有するタンパク質である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、配列番号６で示されるアミノ酸配列またはその保存的アミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態では、本発明での

使用に好適なＩＬ－２形態は、配列番号７のアミノ酸２４～４５２、またはそのバリアント、断片、もしくは誘導体を含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、配列番号７のアミノ酸２４～４５２と少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列、またはそのバリアント、断片、もしくは誘導体を含む融合タンパク質である。本発明での使用に好適な他のＩＬ－２形態は、米国特許第１０，１８３，９７９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。任意選択で、いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ムチンドメインポリペプチドリンカーによって第２の融合パートナーと連結された第１の融合パートナーを含む融合タンパク質であり、第１の融合パートナーは、ＩＬ－１Ｒα、またはＩＬ－１Ｒαと少なくとも９８％のアミノ酸配列同一性を有し、ＩＬ－Ｒαの受容体アンタゴニスト活性を有するタンパク質であり、第２の融合パートナーは、Ｆｃ領域を含む免疫グロブリンの全部または一部を含み、ムチンドメインポリペプチドリンカーは、配列番号８、または配列番号８と少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、融合タンパク質の半減期は、ムチンドメインポリペプチドリンカーの非存在下での第２の融合パートナーとの第１の融合パートナーの融合と比較して改善される。

【０４５３】

【表２】

表２．インターロイキンのアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号３ 組換えヒトＩＬ－２ （ｒｈＩＬ－２）	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
配列番号４ アルデスロイキン	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
配列番号５ ＩＬ－２形態	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLT 133
配列番号６ ネムバロイキン アルファ	SKNFHLRPRD LISNINVIVL ELKGSETTFM CEYADETATI VEFLNRWITF SQSIISTLTG 60 GSSSTKKTQL QLEHLLLDLQ MILNGINNYK NPKLTRMLTF KFYMPKKATE LKHLQCLEEE 120 LKPLEEVLNL AQGSGGGSEL CDDDPPEIPH ATFKAMAYKE GTMLNCECKR GFRRIKSGSL 180 YMLCTGNSSH SSWDNQCQCT SSATRNTTKQ VTPQPEEQKE RKTTEMQSPM QPVDQASLPG 240 HCREPPPWEN EATERIYHFV VGQMVYYQCV QGYRALHRGP AESVCKMTHG KTRWTQPQLI 300 CTG 303
配列番号７ ＩＬ－２形態	MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SARRPSGRKS SKMQAFRIWD VNQKTFYLRN NQLVAGYLQG 60 PNVNLEEKID VVPIEPHALF LGIHGGKMCL SCVKSGDETR LQLEAVNITD LSENRKQDKR 120 FAFIRSDSGP TTSFESAACP GWFLCTAMEA DQPVSLTNMP DEGVMVTKFY FQEDESGSGG 180 ASSESSASSD GPHPVITESR ASSESSASSD GPHPVITESR EPKSSDKTHT CPPCPAPELL 240 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ 300 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR 360 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS 420 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK 452
配列番号８ ムチンドメインポリペプチド	SESSASSDGP HPVITP 16
配列番号９ 組換えヒトＩＬ－４ （ｒｈＩＬ－４）	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREKYSKCSS 130
配列番号１０ 組換えヒトＩＬ－７ （ｒｈＩＬ－７）	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH 153
配列番号１１ 組換えヒトＩＬ－１５ （ｒｈＩＬ－１５）	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115
配列番号１２ 組換えヒトＩＬ－２１ （ｒｈＩＬ－２１）	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132

【０４５４】
いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（V_H）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（V_L）と、V_HまたはV_LのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含む抗体サイトカイン移植タンパク質を含み、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（V_H）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（V_L）と、V_HまたはV_LのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含み、ＩＬ－２分子は、ムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、米国特許出願公開第２０２０／０２７０３３４　Ａ１号に記載されている抗体の投与を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）と、V_HまたはV_LのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含み、ＩＬ－２分子は、ムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させ、抗体は、配列番号３９を含むＩｇＧクラス軽鎖及び配列番号３８を含むＩｇＧクラス重鎖、配列番号３７を含むＩｇＧクラスの軽鎖及び配列番号２９を含むＩｇＧクラスの重鎖、配列番号３９を含むＩｇＧクラス軽鎖及び配列番号２９を含むＩｇＧクラス重鎖、配列番号３７を含むＩｇＧクラス軽鎖及び配列番号３８を含むＩｇＧクラス重鎖からなる群から選択されるＩｇＧクラスの重鎖及びＩｇＧクラスの軽鎖をさらに含む。
【０４５５】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、V_HのＨＣＤＲ１に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、V_HのＨＣＤＲ２に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、V_HのＨＣＤＲ３に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、V_LのＬＣＤＲ１に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、V_LのＬＣＤＲ２に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、V_LのＬＣＤＲ３に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。
【０４５６】
ＩＬ－２分子の挿入は、ＣＤＲのＮ末端領域もしくはその近く、ＣＤＲの中間領域、またはＣＤＲのＣ末端領域もしくはその近くであり得る。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、ＣＤＲに組み込まれたＩＬ－２分子を含み、ＩＬ２配列はＣＤＲ配列をフレームシフトしない。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、ＣＤＲに組み込まれたＩＬ－２分子を含み、ＩＬ－２配列はＣＤＲ配列のすべてまたは一部を置き換える。ＩＬ－２分子による置き換えは、ＣＤＲのＮ末端領域、ＣＤＲの中間領域、またはＣＤＲのＣ末端領域もしくはその近くであり得る。ＩＬ－２分子による置き換えは、ＣＤＲ配列のわずか１個もしくは２個のアミノ酸、またはＣＤＲ配列全体であり得る。
【０４５７】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子は、ペプチドリンカーなしで、ＣＤＲ配列とＩＬ－２配列との間に追加のアミノ酸なしで、ＣＤＲに直接的に移植される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子は、ペプチドリンカーを用いて、ＣＤＲ配列とＩＬ－２配列との間に１つ以上の追加のアミノ酸を伴って、ＣＤＲに間接的に移植される。
【０４５８】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＩＬ－２分子は、ＩＬ－２ムテインである

。いくつかの事例では、ＩＬ－２ムテインは、Ｒ６７Ａ置換を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ムテインは、配列番号１４または配列番号１５のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ムテインは、米国特許出願公開第２０２０／０２７０３３４　Ａ１号の表１のアミノ酸配列を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０４５９】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号１６、配列番号１９、配列番号２２及び配列番号２５からなる群から選択されるＨＣＤＲ１を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号７、配列番号１０、配列番号１３及び配列番号１６からなる群から選択されるＨＣＤＲ１を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号１７、配列番号２０、配列番号２３、及び配列番号２６からなる群から選択されるＨＣＤＲ２からなる群から選択されるＨＣＤＲ１を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号１８、配列番号２１、配列番号２４、及び配列番号２７からなる群から選択されるＨＣＤＲ３を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号２８のアミノ酸配列を含むV_H領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号３６のアミノ酸配列を含むV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号３７のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号２８のアミノ酸配列を含むV_H領域及び配列番号３６のアミノ酸配列を含むV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号３７のアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号３９のアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号３８のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号３７のアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号３８のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号３９のアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、米国特許出願公開第２０２０／０２７０３３４　Ａ１号のＩｇＧ．ＩＬ２Ｆ７１Ａ．Ｈ１もしくはＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１、またはそのバリアント、誘導体、もしくは断片、またはその保存的アミノ酸置換体、またはそれと少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または少なくとも９８％の配列同一性を有するタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質の抗体成分は、免疫グロブリン配列、フレームワーク配列、またはパリビズマブのＣＤＲ配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質は、アルデスロイキンまたは同等の分子などであるがこれらに限定されない野生型ＩＬ－２分子よりも長い血清半減期を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質は、表３に記載される配列を有する。

【０４６０】

【表３－１】

表３： 例示的なパリビズマブ抗体－ＩＬ－２移植タンパク質の配列

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号１３	MYRMQLLSCI ALSLALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML	60
ＩＬ－２	TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE	120
	TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT 153	
配列番号１４	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE	60
ＩＬ－２ムテイン	EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR	120
	WITFCQSIIS TLT 133	
配列番号１５	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TAKFYMPKKA TELKHLQCLE	60
ＩＬ－２ムテイン	EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR	120
	WITFCQSIIS TLT 133	
配列番号１６	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL	60
ＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２	QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE	120
	FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMSVG 145	
配列番号１７	DIWWDDKKDY NPSLKS 16	
ＨＣＤＲ２		
配列番号１８	SMITNWYFDV 10	
ＨＣＤＲ３		
配列番号１９	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE	60
ＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２	EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR	120
カバット	WITFCQSIIS TLTSTSGMSV G 141	
配列番号２０	DIWWDDKKDY NPSLKS 16	
ＨＣＤＲ２カバット		
配列番号２１	SMITNWYFDV 10	
ＨＣＤＲ３カバット		
配列番号２２	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL	60
ＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２	QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE	120
クロチア	FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GM 142	
配列番号２３	WWDDK	5
ＨＣＤＲ２クロチア		
配列番号２４	SMITNWYFDV 10	
ＨＣＤＲ３クロチア		
配列番号２５	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL	60
ＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２	QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE	120
ＩＭＧＴ	FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMS 143	
配列番号２６	IWWDDKK	7
ＨＣＤＲ２　ＩＭＧＴ		
配列番号２７	ARSMITNWYF DV 12	
ＨＣＤＲ３　ＩＭＧＴ		
配列番号２８	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMIINGINNY	60
V_H	KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV	120
	IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL	180
	EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWYF	240
	DVWGAGTTVT VSS 253	
配列番号２９	QMILNGINNY KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR	60
重鎖	PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG	120
	WIRQPPGKAL EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC	180
	ARSMITNWYF DVWGAGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV	240
	TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR	300

【表３－２】

	VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV AVSHEDPEVK	360
	FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALAAPIEK	420
	TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT	480
	PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK	533
配列番号３０	KAQLSVGYMH 10	
ＬＣＤＲ１カバット		
配列番号３１	DTSKLAS	7
ＬＣＤＲ２カバット		
配列番号３２	FQGSGYPFT 9	
ＬＣＤＲ３カバット		
配列番号３３	QLSVGY	6
ＬＣＤＲ１クロチア		
配列番号３４	DTS	3
ＬＣＤＲ２クロチア		
配列番号３５	GSGYPF	6
ＬＣＤＲ３クロチア		
配列番号３６	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR	60
V_L	FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIK 106	
配列番号３７	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR	60
軽鎖	FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS	120
	DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL	180
	SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	
	213	
配列番号３８	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY	60
軽鎖	KNPKLTRMLT AKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV	120
	IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL	180
	EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWYF	240
	DVWGAGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT	300
	SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH	360
	TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV AVSHEDPEVK FNWYVDGVEV	420
	HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALAAPIEK TISKAKGQPR	480
	EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF	540
	FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK	583
配列番号３９	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR	60
軽鎖	FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS	120
	DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL	180
	SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	
	213	

【０４６１】

「ＩＬ－４」（本明細書では「ＩＬ４」とも称される）という用語は、インターロイキン４として知られるサイトカインを指し、これは、Ｔｈ２　Ｔ細胞、ならびに好酸球、好塩基球、及び肥満細胞によって産生される。ＩＬ－４は、ナイーブヘルパーＴ細胞（Ｔｈ０細胞）からＴｈ２　Ｔ細胞への分化を調節する。Ｓｔｅｉｎｋｅ　ａｎｄ　Ｂｏｒｉｓｈ，Ｒｅｓｐｉｒ．Ｒｅｓ．２００１，２，６６－７０。ＩＬ－４によって活性化されると、Ｔｈ２　Ｔ細胞は、その後、正のフィードバックループで追加のＩＬ－４を産生する。ＩＬ－４は、Ｂ細胞増殖及びクラスＩＩ　ＭＨＣ発現も刺激し、Ｂ細胞からのＩｇＥ及びＩｇＧ$_1$発現へのクラス切り替えを誘導する。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－４は、ＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ　ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ　Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ　Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡ（カタログ番号ＣＹＴ－２１１）及びＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ（ヒトＩＬ－１５組換えタンパク質、カタログ番号Ｇｉｂｃｏ　ＣＴＰ００４３）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－４のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号９）。

【０４６２】

「ＩＬ－７」（本明細書では「ＩＬ７」とも称される）という用語は、インターロイキン７として知られるグリコシル化組織由来のサイトカインを指し、これは、間質細胞及び上皮細胞、ならびに樹状細胞から得ることができる。Ｆｒｙ　ａｎｄ　Ｍａｃｋａｌｌ，Ｂｌｏｏｄ　２００２，９９，３８９２－９０４。ＩＬ－７は、Ｔ細胞の発達を刺激することができる。ＩＬ－７は、ＩＬ－７受容体アルファ及び共通ガンマ鎖受容体からなるヘテロ二量体であるＩＬ－７受容体に結合し、これは、胸腺内でのＴ細胞発生及び末梢内での生存に重要な一連のシグナルである。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－７は、

ＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡ（カタログ番号ＣＹＴ－２５４）及びＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ（ヒトＩＬ－１５組換えタンパク質、カタログ番号Ｇｉｂｃｏ ＰＨＣ００７１）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－７のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号１０）。

【０４６３】

「ＩＬ－１５」（本明細書では「ＩＬ１５」とも称される）という用語は、インターロイキン－１５として知られるＴ細胞成長因子を指し、ヒト及び哺乳動物形態、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、バイオシミラー、及びバリアントを含む、ＩＬ－２のすべての形態を含む。ＩＬ－１５は、例えば、Ｆｅｈｎｉｇｅｒ ａｎｄ Ｃａｌｉｇｉｕｒｉ，Ｂｌｏｏｄ ２００１，９７，１４－３２に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＩＬ－１５は、β及びγシグナル伝達受容体サブユニットをＩＬ－２と共有する。組換えヒトＩＬ－１５は、１２．８ｋＤａの分子量を有する１１４個のアミノ酸（及びＮ末端メチオニン）を含む単一の非グリコシル化ポリペプチド鎖である。組換えヒトＩＬ－１５は、ＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡ（カタログ番号ＣＹＴ－２３０－ｂ）及びＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ（ヒトＩＬ－１５組換えタンパク質、カタログ番号３４－８１５９－８２）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－１５のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号１１）。

【０４６４】

「ＩＬ－２１」（本明細書では「ＩＬ２１」とも称される）という用語は、インターロイキン－２１として知られる多面発現性サイトカインタンパク質を指し、ヒト及び哺乳動物形態、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、バイオシミラー、及びバリアントを含む、ＩＬ－２１のすべての形態を含む。ＩＬ－２１は、例えば、Ｓｐｏｌｓｋｉ ａｎｄ Ｌｅｏｎａｒｄ，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｄｒｕｇ．Ｄｉｓｃ．２０１４，１３，３７９－９５に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＩＬ－２１は、主にナチュラルキラーＴ細胞及び活性化ヒトＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞によって産生される。組換えヒトＩＬ－２１は、１５．４ｋＤａの分子量を有する１３２個のアミノ酸を含む単一の非グリコシル化ポリペプチド鎖である。組換えヒトＩＬ－２１は、ＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡ（カタログ番号ＣＹＴ－４０８－ｂ）及びＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ（ヒトＩＬ－２１組換えタンパク質、カタログ番号１４－８２１９－８０）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号２１）。

【０４６５】

「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」、または「治療量」が示される場合、投与される本発明の組成物の正確な量は、患者（対象）の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染または転移の程度、及び健康状態の個人差を考慮して、医師によって決定され得る。一般に、本明細書に記載される腫瘍浸潤リンパ球（例えば、二次ＴＩＬまたは遺伝子改変された細胞傷害性リンパ球）は、体重１ｋｇ当たり10^{4}～10^{11}細胞（例えば、体重１ｋｇ当たり10^{5}～10^{6}、10^{5}～10^{10}、10^{5}～10^{11}、10^{6}～10^{10}、10^{6}～10^{11}、10^{7}～10^{11}、10^{7}～10^{10}、10^{8}～10^{11}、10^{8}～10^{10}、10^{9}～10^{11}、または10^{9}～10^{10}細胞）（それらの範囲内のすべての整数値を含む）の投与量で投与され得る。ＴＩＬ（場合によっては、遺伝子修飾細胞傷害性リンパ球を含む）組成物もまた、これらの投与量で複数回投与され得る。腫瘍ＴＩＬ（場合によっては、遺伝子操作したＴＩＬを含む）は、免疫療法で一般的に知られている注入技法を使用することによって投与することができる（例えば、Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｗ Ｅｎｇ．Ｊ．ｏｆ Ｍｅｄ．１９８８，３１９，１６７６を参照されたい）

。特定の患者に最適な投薬量及び治療レジーム（ｒｅｇｉｍｅ）は、患者を疾患の兆候について監視し、適宜に治療を調整することによって、医学分野の技術者によって容易に決定され得る。

【０４６６】

「血液学的悪性腫瘍」、「血液系悪性腫瘍」という用語または相関する意味の用語は、血液、骨髄、リンパ節、及びリンパ系の組織を含むが、これらに限定されない、哺乳動物の造血組織及びリンパ組織のがん及び腫瘍を指す。血液学的悪性腫瘍は、「液体腫瘍」とも称される。血液学的悪性腫瘍には、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ性リンパ腫（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、多発性骨髄腫、急性単球性白血病（ＡＭｏＬ）、ホジキンリンパ腫、及び非ホジキンリンパ腫が含まれ得るが、これらに限定されない。「Ｂ細胞血液学的悪性腫瘍」という用語は、Ｂ細胞を冒す血液学的悪性腫瘍を指す。

【０４６７】

「液体腫瘍」という用語は、本来流体である異常な細胞塊を指す。液体腫瘍癌には、白血病、骨髄腫、及びリンパ腫、ならびに他の血液学的悪性腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。液体腫瘍から取得されたＴＩＬは、本明細書では骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）とも称され得る。末梢血中で循環する液体腫瘍を含む液体腫瘍から得られるＴＩＬは、本明細書ではＰＢＬとも称され得る。ＭＩＬ、ＴＩＬ、及びＰＢＬという用語は、本明細書で互換的に使用され、細胞が由来する組織タイプに基づいてのみ異なる。

【０４６８】

本明細書で使用される「微小環境」という用語は、全体としての固形もしくは血液学的腫瘍微小環境、または微小環境内の細胞の個々のサブセットを指し得る。本明細書で使用される腫瘍微小環境は、Ｓｗａｒｔｚ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，２０１２，７２，２４７３に記載されるように、「腫瘍性形質転換を促進し、腫瘍成長及び浸潤を支持し、腫瘍を宿主免疫から保護し、治療抵抗性を助長し、かつ優勢な転移を成功させるニッチを提供する、細胞、可溶性因子、シグナル伝達分子、細胞外マトリックス、及び機械的手がかり」の複合混合物を指す。腫瘍はＴ細胞によって認識されるべき抗原を発現するが、微小環境による免疫抑制のため、免疫系による腫瘍クリアランスはまれである。

【０４６９】

いくつかの実施形態では、本発明は、ＴＩＬ集団でがんを治療する方法を含み、患者は、本発明によるＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団が提供され得、患者は、本発明によるＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド６０ｍｇ／ｋｇ／日で２日間（ＴＩＬ注入の２７日前及び２６日前）、ならびにフルダラビン２５ｍｇ／ｍ２／日で５日間（ＴＩＬ注入の２７日前～２３日前）である。いくつかの実施形態では、本発明による骨髄非破壊的化学療法及びＴＩＬ注入（０日目）後、患者は、生理学的許容範囲まで８時間毎に７２０，０００ＩＵ／ｋｇでＩＬ－２の静脈内注入を受ける。

【０４７０】

実験的発見は、腫瘍特異的Ｔリンパ球の養子移入前のリンパ球枯渇が、制御性Ｔ細胞及び免疫系の競合要素（「サイトカインシンク」）を排除することによって治療有効性を増強する上で重要な役割を果たすことを示す。したがって、本発明のいくつかの実施形態は、本発明のＴＩＬを導入する前に、患者に対してリンパ球枯渇ステップ（「免疫抑制コンディショニング」と称されることもある）を利用する。

【０４７１】

「有効量」または「治療有効量」という用語は、疾患治療を含むが、これに限定されない、意図された用途を達成するのに十分である、本明細書に記載の化合物または化合物の組み合わせの量を指す。治療有効量は、意図される用途（インビトロもしくはインビボ）、または治療される対象及び病状（例えば、対象の体重、年齢、及び性別）、病状の重症度、または投与方法に応じて異なり得る。この用語は、標的細胞において特定の応答（例

えば、血小板粘着及び／または細胞遊走の低減）を誘導する用量にも適用される。特定の用量は、選択された特定の化合物、従うべき投薬レジメン、化合物が他の化合物と組み合わせて投与されるか、投与のタイミング、それが投与される組織、及び化合物が運ばれる物理的送達系に応じて異なる。

【０４７２】

「治療」、「治療すること」、「治療する」などの用語は、所望の薬理学的及び／または生理学的効果を得ることを指す。その効果は、その疾患または症状を完全にまたは部分的に予防するという観点において予防的であり得、及び／または疾患及び／またはその疾患に起因する副作用の部分的または完全な治癒という観点において治療的であり得る。「治療」は、本明細書で使用される場合、哺乳動物、特にヒトにおける疾患の任意の治療を包含し、（ａ）疾患にかかりやすい可能性があるが、まだ疾患を有すると診断されていない対象に疾患が生じるのを予防すること、（ｂ）疾患を抑制すること、すなわち、その発症または進行を抑止すること、及び（ｃ）疾患を軽減すること、すなわち、疾患の退行を引き起こし、及び／または１つ以上の疾患症状を軽減することを含む。「治療」は、疾患または状態がない場合でさえも、薬理学的効果を提供するための薬剤の送達を包含するようにも意図されている。例えば、「治療」は、病状がない場合、例えば、ワクチンの場合に免疫応答を誘発するか、または免疫を与えることができる組成物の送達を包含する。

【０４７３】

「異種」という用語は、核酸またはタンパク質の一部に関して使用される場合、核酸またはタンパク質が、自然界では互いに同じ関係では見出されない２つ以上の部分配列を含むことを示す。例えば、核酸は、典型的には、組換え的に産生され、新たな機能的核酸、例えば、ある供給源からのプロモーター及び別の供給源からのコード領域、または異なる供給源からのコード領域を作製するように配置された無関係の遺伝子由来の２つ以上の配列を有する。同様に、異種タンパク質は、そのタンパク質が、自然界では互いに同じ関係では見出されない２つ以上の部分配列を含むことを示す（例えば、融合タンパク質）。

【０４７４】

２つ以上の核酸またはポリペプチドの文脈における「配列同一性」、「同一性パーセント」、及び「配列同一性パーセント」（もしくはそれらの同義語、例えば「９９％同一」）という用語は、同じであるか、または配列同一性の一部としていかなる保存的アミノ酸置換も考慮せずに、最大一致のために比較し整列させた場合（必要に応じてギャップを導入する）、特定のパーセンテージの同じヌクレオチドもしくはアミノ酸残基を有する２つ以上の配列または部分配列を指す。同一性パーセントは、配列比較ソフトウェアもしくはアルゴリズムを使用して、または目視検査によって測定することができる。アミノ酸またはヌクレオチド配列のアラインメントを取得するために使用され得る様々なアルゴリズム及びソフトウェアが当該技術分野で知られている。配列同一性パーセントの決定に好適なプログラムには、例えば、米国政府の国立生物工学情報センターのＢＬＡＳＴウェブサイトから入手可能なＢＬＡＳＴプログラム一式が含まれる。２つの配列間の比較は、ＢＬＡＳＴＮまたはＢＬＡＳＴＰアルゴリズムのいずれかを使用して実行することができる。ＢＬＡＳＴＮは、核酸配列を比較するために使用され、ＢＬＡＳＴＰは、アミノ酸配列を比較するために使用される。ＤＮＡＳＴＡＲから入手可能なＡＬＩＧＮ、ＡＬＩＧＮ－２（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）、またはＭｅｇＡｌｉｇｎは、配列を整列させるために使用することができる追加の公的に入手可能なソフトウェアプログラムである。当業者であれば、特定のアラインメントソフトウェアによって最大アラインメントに適切なパラメータを決定することができる。ある特定の実施形態では、アラインメントソフトウェアのデフォルトパラメータが使用される。

【０４７５】

本明細書で使用される場合、「バリアント」という用語は、参照抗体のアミノ酸配列内または隣接する特定の位置における１つ以上の置換、欠失、及び／または付加により参照抗体のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む抗体または融合タンパク質を包含する

が、これらに限定されない。バリアントは、参照抗体のアミノ酸配列と比較して、そのアミノ酸配列に１つ以上の保存的置換を含み得る。保存的置換は、例えば、同様に荷電したまたは非荷電のアミノ酸の置換を含み得る。バリアントは、参照抗体の抗原に特異的に結合する能力を保持している。バリアントという用語は、ペグ化抗体またはタンパク質も含む。

【０４７６】

本明細書における「腫瘍浸潤リンパ球」または「ＴＩＬ」とは、対象の血流を離れて腫瘍に移動した白血球として最初に取得された細胞の集団を意味する。ＴＩＬには、ＣＤ８$^+$細胞傷害性Ｔ細胞（リンパ球）、Ｔｈ１及びＴｈ１７　ＣＤ４$^+$Ｔ細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、ならびにＭ１マクロファージが含まれるが、これらに限定されない。ＴＩＬには、一次ＴＩＬ及び二次ＴＩＬの両方が含まれる。「一次ＴＩＬ」は、本明細書に概説されるように患者組織試料から得られるもの（「新たに採取された」と称されることもある）であり、「二次ＴＩＬ」は、本明細書で考察されるように拡張または増殖された任意のＴＩＬ細胞集団であり、本明細書で考察されるバルクＴＩＬ、拡張ＴＩＬ（「ＲＥＰ　ＴＩＬ」）、ならびに「ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬ」が含まれるが、これらに限定されない。ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬは、例えば、第２の拡張ＴＩＬまたは第２の追加の拡張ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬと称されるＴＩＬを含む、図８のステップＤに記載されているものなど）を含み得る。

【０４７７】

ＴＩＬは、一般に、細胞表面マーカーを使用して生化学的に定義されるか、または腫瘍に浸潤して治療を達成するそれらの能力によって機能的に定義されるかのいずれかであり得る。ＴＩＬは、一般に、ＣＤ４、ＣＤ８、ＴＣＲαβ、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ５６、ＣＣＲ７、ＣＤ４５Ｒａ、ＣＤ９５、ＰＤ－１、及びＣＤ２５のうちの１つ以上のバイオマーカーの発現によって分類され得る。追加として及び代替的に、ＴＩＬは、患者への再導入時に固形腫瘍に浸潤する能力により機能的に定義され得る。ＴＩＬは、効力によってさらに特徴付けられ得、例えば、インターフェロン（ＩＦＮ）放出が、約５０ｐｇ／ｍＬを超える、約１００ｐｇ／ｍＬを超える、約１５０ｐｇ／ｍＬを超える、または約２００ｐｇ／ｍＬを超える場合、ＴＩＬは強力であるとみなされ得る。例えば、インターフェロン（ＩＦＮγ）放出が、約５０ｐｇ／ｍＬを超える、約１００ｐｇ／ｍＬを超える、約１５０ｐｇ／ｍＬを超える、または約２００ｐｇ／ｍＬを超える、約３００ｐｇ／ｍＬを超える、約４００ｐｇ／ｍＬを超える、約５００ｐｇ／ｍＬを超える、約６００ｐｇ／ｍＬを超える、約７００ｐｇ／ｍＬを超える、約８００ｐｇ／ｍＬを超える、約９００ｐｇ／ｍＬ、約１０００ｐｇ／ｍＬを超える場合、ＴＩＬは強力であるとみなされ得る。

【０４７８】

「デオキシリボヌクレオチド」という用語は、天然及び合成の、未修飾及び修飾デオキシリボヌクレオチドを包含する。修飾には、糖部分、塩基部分、及び／またはオリゴヌクレオチド中のデオキシリボヌクレオチド間の連結への変更が含まれる。

【０４７９】

「ＲＮＡ」という用語は、少なくとも１つのリボヌクレオチド残基を含む分子を定義する。「リボヌクレオチド」という用語は、ｂ－Ｄ－リボフラノース部分の２′位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドを定義する。ＲＮＡという用語には、二本鎖ＲＮＡ、一本鎖ＲＮＡ、部分的に精製されたＲＮＡなどの単離されたＲＮＡ、本質的に純粋なＲＮＡ、合成ＲＮＡ、組換え的に産生されたＲＮＡ、ならびに１つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換、及び／または変化によって天然に存在するＲＮＡとは異なる変化したＲＮＡが含まれる。本明細書に記載のＲＮＡ分子のヌクレオチドはまた、非天然に存在するヌクレオチドまたは化学的に合成されたヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドなどの非標準ヌクレオチドを含み得る。これらの変化したＲＮＡは、類似体または天然に存在するＲＮＡの類似体と称され得る。

【０４８０】

「薬学的に許容される担体」または「薬学的に許容される賦形剤」という用語は、あり

とあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤、ならびに不活性成分を含むよう意図されている。医薬品有効成分のためのかかる薬学的に許容される担体または薬学的に許容される賦形剤の使用は、当該技術分野で周知である。任意の従来の薬学的に許容される担体または薬学的に許容される賦形剤が医薬品有効成分と適合しない場合を除いて、本発明の治療用組成物におけるその使用が企図される。他の薬物などの追加の医薬品有効成分を、記載された組成物及び方法に組み込むこともできる。

【０４８１】

「約」及び「およそ」という用語は、値の統計的に有意な範囲内を意味する。かかる範囲は、所与の値または範囲の１桁以内、好ましくは５０％以内、より好ましくは２０％以内、なおより好ましくは１０％以内、さらにより好ましくは５％以内であり得る。「約」または「およそ」という用語によって包含される許容偏差は、研究中の特定の系に依存し、当業者によって容易に理解され得る。さらに、本明細書で使用される場合、「約」及び「およそ」という用語は、寸法、サイズ、配合、パラメータ、形状、ならびに他の量及び特徴が正確でなく、かつ正確である必要はないが、公差、変換係数、四捨五入、測定誤差など、及び当業者に知られている他の要因を反映して、必要に応じて、およそであってもよく、及び／またはそれよりも大きくても小さくてもよいことを意味する。一般に、寸法、サイズ、配合、パラメータ、形状、または他の量もしくは特徴は、そのように明示的に述べられているかにかかわらず、「約」または「およそ」である。非常に異なるサイズ、形状、及び寸法の実施形態が記載された配置を採用し得ることに留意されたい。

【０４８２】

添付の特許請求の範囲で使用される場合、「含む」、「から本質的になる」、及び「からなる」という移行用語は、元の形式及び補正された形式で、存在する場合、列挙されていない追加のクレーム要素またはステップが特許請（複数可）求の範囲から除外されるかに関して特許請求の範囲を定義する。「含む」という用語は、包括的または自由形式であるよう意図されており、いずれの追加の列挙されていない要素、方法、ステップ、または材料も除外しない。「からなる」という用語は、特許請求の範囲で指定されたもの以外のいずれの要素、ステップ、または材料も除外し、後者の場合、指定された材料（複数可）に通常関連する不純物も除外する。「から本質的になる」という用語は、特許請求の範囲を、特定の要素、ステップ、または材料（複数可）、及び特許請求された本発明の基本的及び新規の特徴（複数可）に実質的に影響を及ぼさないに限定する。本発明を具体化する本明細書に記載のすべての組成物、方法、及びキットは、代替の実施形態では、「含む」、「から本質的になる」、及び「からなる」という移行用語のうちのいずれかによってより具体的に定義され得る。

【０４８３】

「抗体」及びその複数形の「抗体」という用語は、免疫グロブリン全体及び任意の抗原結合断片（「抗原結合部分」）またはその一本鎖を指す。「抗体」はさらに、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも２つの重鎖（Ｈ）鎖及び２つの軽（Ｌ）鎖を含む糖タンパク質、またはその抗原結合部分を指す。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではV_Hと略される）及び重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は、ＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３の３つのドメインで構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではV_Lと略される）及び軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は、１つのドメイン、C_Lで構成される。抗体のV_H及びV_L領域は、相補性決定領域（ＣＤＲ）または超可変領域（ＨＶＲ）と称され、フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる、より保存された領域が点在し得る、超可変性の領域にさらに細分化することができる。各V_H及びV_Lは、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序で配列された３つのＣＤＲ及び４つのＦＲで構成される：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４。重鎖及び軽鎖の可変領域は、１つまたは複数の抗原エピトープと相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）及び古典的な補体系の第１の成分（Ｃｌｑ）を含む宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得

る。

【０４８４】

「抗原」という用語は、免疫応答を誘導する物質を指す。いくつかの実施形態では、抗原は、主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）分子によって提示される場合、抗体またはＴＣＲによって結合されることができる分子である。本明細書で使用される「抗原」という用語はまた、Ｔ細胞エピトープを包含する。抗原は、追加として免疫系によって認識されることができる。いくつかの実施形態では、抗原は、体液性免疫応答または細胞性免疫応答を誘導することができ、Ｂリンパ球及び／またはＴリンパ球の活性化につながる。場合によっては、これは、抗原がＴｈ細胞エピトープを含むか、またはそれに結合されることを必要とし得る。抗原はまた、１つ以上のエピトープ（例えば、Ｂ－及びＴ－エピトープ）を有し得る。いくつかの実施形態では、抗原は、好ましくは、典型的には非常に特異的かつ選択的な方法で、対応する抗体またはＴＣＲと反応し、他の抗原によって誘導され得る多数の他の抗体またはＴＣＲとは反応しない。

【０４８５】

「モノクローナル抗体」、「ｍＡｂ」、「モノクローナル抗体組成物」という用語、またはそれらの複数形は、単一分子組成の抗体分子の調製物を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性及び親和性を示す。特定の受容体に特異的なモノクローナル抗体は、試験対象に好適な抗原を注入し、次いで、所望の配列または機能的特徴を有する抗体を発現するハイブリドーマを単離するという当該技術分野における知識及び技術を使用して作製することができる。モノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、従来の手順を使用して（例えば、モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離され、配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、かかるＤＮＡの好ましい供給源として機能する。一旦単離されると、ＤＮＡは、発現ベクターに入れられ、次いで、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、または免疫グロブリンタンパク質を産生しない骨髄腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトされて、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を取得することができる。抗体の組換え産生については、以下でより詳細に説明する。

【０４８６】

本明細書で使用される、抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合断片」（または単に「抗体部分」もしくは「断片」）という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の１つ以上の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって行われ得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例には、（ｉ）V_L、V_H、C_L、及びＣＨ１ドメインからなる一価断片である、Ｆａｂ断片、（ｉｉ）ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合された２つのＦａｂ断片を含む二価断片である、Ｆ（ａｂ′）２断片、（ｉｉｉ）V_H及びＣＨ１ドメインからなるＦｄ断片、（ｉｖ）抗体の単一アームのV_L及びV_HドメインからなるＦｖ断片、（ｖ）V_HまたはV_Lドメインからなり得るドメイン抗体（ｄＡｂ）断片（Ｗａｒｄ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，１９８９，３４１，５４４－５４６）、ならびに（ｖｉ）単離した相補性決定領域（ＣＤＲ）が含まれる。さらに、Ｆｖ断片の２つのドメイン、V_L及びV_Hは、別々の遺伝子によってコードされるが、これらは、組換え方法を使用して、V_L及びV_H領域が対合して、一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）として知られる一価分子を形成する単一タンパク質鎖としてそれらを作製することを可能にする合成リンカーによって接合され得、例えば、Ｂｉｒｄ，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　１９８８，２４２，４２３－４２６、及びＨｕｓｔｏｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　１９８８，８５，５８７９－５８８３）を参照されたい。かかるｓｃＦｖ抗体はまた、抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合断片」という用語に包含されることを意図している。これらの抗体断片は、当業者に知られている従来の技法を使用して得られ、断片は、無傷の抗体と同じ方法で有用性についてスクリーニングされる。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖタンパク質ドメインは、V_H部分及びV_L部分を含む。ｓｃＦｖ分子は、V_Lド

メインがｓｃＦｖ分子のＮ末端部分である場合、V_L－Ｌ－V_H、またはV_HドメインがｓｃＦｖ分子のＮ末端部分である場合、V_H－Ｌ－V_Lのいずれかとして示される。ｓｃＦｖ分子を作製し、好適なペプチドリンカーを設計するための方法は、米国特許第４，７０４，６９２号、米国特許第４，９４６，７７８号、Ｒ．Ｒａａｇ ａｎｄ Ｍ．Ｗｈｉｔｌｏｗ，“Ｓｉｎｇｌｅ Ｃｈａｉｎ Ｆｖｓ．”ＦＡＳＥＢ Ｖｏｌ ９：７３－８０（１９９５）及びＲ．Ｅ．Ｂｉｒｄ ａｎｄ Ｂ．Ｗ．Ｗａｌｋｅｒ，Ｓｉｎｇｌｅ Ｃｈａｉｎ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｖａｒｉａｂｌｅ Ｒｅｇｉｏｎｓ，ＴＩＢＴＥＣＨ，Ｖｏｌ ９：１３２－１３７（１９９１）に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０４８７】

本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、フレームワーク及びＣＤＲ領域の両方が、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する抗体を含むことを意図している。さらに、抗体が定常領域を含む場合、定常領域はまた、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基を含み得る（例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的変異誘発によって、またはインビボでの体細胞変異によって導入される変異）。本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系に由来するＣＤＲ配列が、ヒトフレームワーク配列に移植されている抗体を含むことを意図しない。

【０４８８】

「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、フレームワーク領域及びＣＤＲ領域の両方がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する単一の結合特異性を示す抗体を指す。いくつかの実施形態では、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合したヒト重鎖導入遺伝子及び軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、トランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスから取得されたＢ細胞を含むハイブリドーマによって産生される。

【０４８９】

本明細書で使用される「組換えヒト抗体」という用語は、組換え手段によって調製、発現、作成、または単離されるすべてのヒト抗体、例えば（ａ）ヒト免疫グロブリン遺伝子またはそれから調製されたハイブリドーマ（以下でさらに説明される）についてトランスジェニックまたはトランス染色体である動物（マウスなど）から単離された抗体、（ｂ）ヒト抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から、例えば、トランスフェクトーマから単離された抗体、（ｃ）組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体、及び（ｄ）ヒト免疫グロブリン遺伝子配列を他のＤＮＡ配列にスプライシングすることを含む、任意の他の手段によって調製、発現、作成、または単離された抗体を含む。かかる組換えヒト抗体は、フレームワーク及びＣＤＲ領域がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する。しかしながら、ある特定の実施形態では、かかる組換えヒト抗体は、インビトロ変異誘発（または、ヒトＩｇ配列についてトランスジェニックな動物が使用される場合、インビボ体細胞変異誘発）に供され得、したがって、組換え抗体のV_H及びV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系V_H及びV_L配列に由来し、関連しているが、インビボでヒト抗体生殖細胞系レパートリー内に自然に存在しない可能性がある配列である。

【０４９０】

本明細書で使用される場合、「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス（例えば、ＩｇＭまたはＩｇＧ１）を指す。

【０４９１】

「抗原を認識する抗体」及び「抗原に特異的な抗体」という句は、本明細書では「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と交換可能に使用される。

【０４９２】

「ヒト抗体誘導体」という用語は、抗体と別の医薬品有効成分または抗体とのコンジュ

ゲートを含む、ヒト抗体の任意の修飾形態を指す。「コンジュゲート」、「抗体薬物コンジュゲート」、「ＡＤＣ」、または「免疫コンジュゲート」という用語は、別の治療部分にコンジュゲートされた抗体またはその断片を指し、これは当該技術分野において使用可能な方法を使用して、本明細書に記載の抗体にコンジュゲートされ得る。

【０４９３】

「ヒト化抗体」、「ヒト化抗体（複数）」、及び「ヒト化」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系に由来するＣＤＲ配列が、ヒトフレームワーク配列に移植されている抗体を指すことを意図している。追加のフレームワーク領域の修飾は、ヒトフレームワーク配列内で行うことができる。非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、レシピエントの超可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、ウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）または非ヒト霊長類の１５超可変領域からの残基によって置き換えられる。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク（ＦＲ）残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体には見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体の性能をさらに向上させるために行われる。一般に、ヒト化抗体は、超可変ループのすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、ＦＲ領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的すべてを含むことになる。ヒト化抗体はまた、任意選択で、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含むであろう。さらなる詳細については、Ｊｏｎｅｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ１９８６，３２１，５２２－５２５、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ１９８８，３３２，３２３－３２９、及びＰｒｅｓｔａ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．１９９２，２，５９３－５９６を参照されたい。本明細書に記載される抗体はまた、エフェクター機能及び／またはＦｃＲ結合の改善（例えば、低減）を与えることが知られている任意のＦｃバリアントを用いるように修飾され得る。Ｆｃバリアントは、例えば、国際特許出願公開第ＷＯ１９８８／０７０８９Ａ１号、同第ＷＯ１９９６／１４３３９Ａ１号、同第ＷＯ１９９８／０５７８７Ａ１号、同第ＷＯ１９９８／２３２８９Ａ１号、同第ＷＯ１９９９／５１６４２Ａ１号、同第ＷＯ９９／５８５７２Ａ１号、同第ＷＯ２０００／０９５６０Ａ２号、同第ＷＯ２０００／３２７６７Ａ１号、同第ＷＯ２０００／４２０７２Ａ２号、同第ＷＯ２００２／４４２１５Ａ２号、同第ＷＯ２００２／０６０９１９Ａ２号、同第ＷＯ２００３／０７４５６９Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０１６７５０Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０２９２０７Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０３５７５２Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０６３３５１Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０７４４５５Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０９９２４９Ａ２号、同第ＷＯ２００５／０４０２１７Ａ２号、同第ＷＯ２００５／０７０９６３Ａ１号、同第ＷＯ２００５／０７７９８１Ａ２号、同第ＷＯ２００５／０９２９２５Ａ２号、同第ＷＯ２００５／１２３７８０Ａ２号、同第ＷＯ２００６／０１９４４７Ａ１号、同第ＷＯ２００６／０４７３５０Ａ２号、及び同第ＷＯ２００６／０８５９６７Ａ２号、ならびに米国特許第５，６４８，２６０号、同第５，７３９，２７７号、同第５，８３４，２５０号、同第５，８６９，０４６号、同第６，０９６，８７１号、同第６，１２１，０２２号、同第６，１９４，５５１号、同第６，２４２，１９５号、同第６，２７７，３７５号、同第６，５２８，６２４号、同第６，５３８，１２４号、同第６，７３７，０５６号、同第６，８２１，５０５号、同第６，９９８，２５３号、及び同第７，０８３，７８４号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるアミノ酸置換のうちのいずれか１つを含み得る。

【０４９４】

「キメラ抗体」という用語は、可変領域配列が１つの種に由来し、定常領域配列が別の種に由来する抗体、例えば、可変領域配列がマウス抗体に由来し、定常領域配列がヒト抗体に由来する抗体を指すことを意図している。

【０４９５】
「二重特異性抗体（ｄｉａｂｏｄｙ）」は、２つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片である。断片は、同じポリペプチド鎖（V_H－V_LまたはV_L－V_H）中に軽鎖可変ドメイン（V_L）に接続された重鎖可変ドメイン（V_H）を含む。同じ鎖上の２つのドメインをペアリングするには短すぎるリンカーを使用すると、ドメインは別のチェーンの相補ドメインとペアリングさせられ、２つの抗原結合部位が作成される。二重特異性抗体は、例えば、欧州特許第４０４，０９７号、国際特許公開第ＷＯ９３／１１１６１号、及びＢｏｌｌｉｇｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ１９９３，９０，６４４４－６４４８においてより完全に記載されている。

【０４９６】
「グリコシル化」という用語は、抗体の修飾誘導体を指す。非グリコシル化抗体は、グリコシル化を欠いている。グリコシル化は、例えば、抗原に対する抗体の親和性を増加させるように変化され得る。かかる炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内の１つ以上のグリコシル化部位を変化させることによって達成され得る。例えば、１つ以上の可変領域フレームワークのグリコシル化部位の排除をもたらす、１つ以上のアミノ酸置換を行い、それによってその部位でのグリコシル化を排除することができる。米国特許第５，７１４，３５０号及び同第６，３５０，８６１号に記載されているように、非グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を高める可能性がある。追加としてまたは代替的に、改変した種類のグリコシル化を有する抗体、例えば、フコシル残基の量が低減した低フコシル化抗体または二分ＧｌｃＮａｃ構造が増加した抗体が作製され得る。かかるグリコシル化パターンの変化は、抗体の能力を増加させることが実証されている。かかる炭水化物修飾は、例えば、抗体をグリコシル化機構が変化した宿主細胞で発現させることによって達成され得る。グリコシル化機構が変化した細胞については、当該技術分野で説明されており、本発明の組換え抗体を発現させ、それによりグリコシル化が変化した抗体を産生する宿主細胞として使用され得る。例えば、Ｍｓ７０４、Ｍｓ７０５、及びＭｓ７０９細胞株で発現される抗体が、それらの炭水化物上のフコースを欠くように、細胞株Ｍｓ７０４、Ｍｓ７０５、及びＭｓ７０９は、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子ＦＵＴ８（アルファ（１，６）フコシルトランスフェラーゼ）を欠く。Ｍｓ７０４、Ｍｓ７０５、及びＭｓ７０９ ＦＵＴ８－／－細胞株は、２つの置換ベクターを使用したＣＨＯ／ＤＧ４４細胞中のＦＵＴ８遺伝子の標的破壊によって作成された（例えば、米国特許公開第２００４／０１１０７０４号またはＹａｍａｎｅ－Ｏｈｎｕｋｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．，２００４，８７，６１４－６２２を参照）。別の例として、欧州特許第１，１７６，１９５号は、フコシルトランスフェラーゼをコードし、それによりかかる細胞株で発現される抗体が、アルファ１，６結合関連酵素を低減または排除することによって低フコシル化を示す、機能的に破壊されたＦＵＴ８遺伝子を有する細胞株を説明しており、抗体のＦｃ領域に結合するＮ－アセチルグルコサミンにフコースを付加するための酵素活性が低いか、または酵素活性を有しない細胞株、例えばラット骨髄腫細胞株ＹＢ２／０（ＡＴＣＣ ＣＲＬ １６６２）についても説明している。国際特許公開第ＷＯ０３／０３５８３５号は、フコースをＡｓｎ（２９７）結合型炭水化物に付着させる能力が低減し、さらにその宿主細胞で発現される抗体の低フコシル化ももたらすバリアントＣＨＯ細胞株、Ｌｅｃ１３細胞について説明している（Ｓｈｉｅｌｄｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２００２，２７７，２６７３３－２６７４０も参照されたい。国際特許公開第ＷＯ９９／５４３４２号は、糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ（例えば、ベータ（１，４）－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩＩ（ＧｎＴＩＩＩ））を発現するように操作され、それにより操作された細胞株で発現される抗体が、二分性ＧｌｃＮａｃ構造の増加を示し、抗体のＡＤＣＣ活性の増加をもたらす、細胞株について記載している（Ｕｍａｎａ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１９９，１７，１７６－１８０も参照）。代替的に、フコシダーゼ酵素を使用して、抗体のフコース残基を切断でき得る。例えば、フコシダーゼアルファ－Ｌ－フコシダーゼは、Ｔａｒｅｎｔｉｎｏ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．１９７５，１４，５５１６－５５２３に記載

されているように、抗体からフコシル残基を除去する。

【０４９７】

「ペグ化」は、１つ以上のＰＥＧ基が抗体または抗体断片に付着する条件下で、ＰＥＧの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体などのポリエチレングリコール（ＰＥＧ）と反応させる、修飾抗体またはその断片を指す。ペグ化は、例えば、抗体の生物学的（例えば、血清）半減期を増加させることができる。好ましくは、ペグ化は、反応性ＰＥＧ分子（または類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実行される。本明細書で使用される場合、「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{10}$）アルコキシ－もしくはアリールオキシ－ポリエチレングリコール、またはポリエチレングリコール－マレイミドなどの、他のタンパク質を誘導体化するために使用されているＰＥＧの形態のうちのいずれかを包含することが意図される。ペグ化される抗体は、非グリコシル化抗体であり得る。ペグ化のための方法は、当該技術分野で知られており、例えば欧州特許第０１５４３１６号及び同第０４０１３８４号、ならびに米国特許第５，８２４，７７８号（各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、本発明の抗体に適用することができる。

【０４９８】

「バイオシミラー」という用語は、モノクローナル抗体またはタンパク質を含む、臨床的に不活性な成分にわずかな違いがあるにもかかわらず、米国で認可された参照バイオ製品と非常に類似しており、製品の安全性、純度、及び効力に関してバイオ製品と参照製品との間に臨床的に意味のある差異がない、バイオ製品を意味する。さらに、類似のバイオまたは「バイオシミラー」医薬品は、欧州医薬品庁によって既に使用が許可されている別のバイオ医薬品に類似したバイオ医薬品である。「バイオシミラー」という用語は、他の国及び地域の規制機関によっても同義的に使用されている。バイオ製品またはバイオ医薬品は、細菌または酵母などの生物源によって作製された、またはそれに由来する医薬品である。それらは、ヒトインスリンもしくはエリスロポエチンなどの比較的小さな分子、またはモノクローナル抗体などの複雑な分子からなり得る。例えば、参照ＩＬ－２タンパク質がアルデスロイキン（ＰＲＯＬＥＵＫＩＮ）である場合、アルデスロイキンに関して薬物規制当局によって承認されたタンパク質は、アルデスロイキンの「バイオシミラー」であるか、またはアルデスロイキンの「そのバイオシミラー」である。欧州では、類似のバイオまたは「バイオシミラー」医薬品は、欧州医薬品庁（ＥＭＡ）によって既に使用が許可されている別のバイオ医薬品に類似したバイオ医薬品である。欧州における同様の生物学的用途に関連する法的根拠は、補正されたＲｅｇｕｌａｔｉｏｎ（ＥＣ）Ｎｏ ７２６／２００４の第６条及びＤｉｒｅｃｔｉｖｅ ２００１／８３／ＥＣの第１０（４）条であり、したがって欧州では、バイオシミラーは、Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ（ＥＣ）Ｎｏ ７２６／２００４の第６条及びＤｉｒｅｃｔｉｖｅ ２００１／８３／ＥＣの第１０（４）条の下で、認可または認可申請の対象について認可、承認され得る。既に認可されているオリジナルのバイオ医薬品は、欧州では「参照医薬品」と称されることがある。バイオシミラーとみなされる製品に対する要件のうちのいくつかは、バイオシミラー医薬品に関するＣＨＭＰガイドラインに概説されている。さらに、モノクローナル抗体バイオシミラーに関連するガイドラインを含む製品固有のガイドラインは、ＥＭＡによって製品毎に提供され、そのウェブサイトで公開されている。本明細書に記載のバイオシミラーは、品質特徴、生物活性、作用機序、安全性プロファイル、及び／または有効性の点で、参照医薬品に類似している可能性がある。さらに、バイオシミラーは、参照医薬品と同じ状態を治療するために使用され得るか、または使用を意図され得る。したがって、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した品質特徴を有するとみなされ得る。代替的に、またはさらに、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した生物活性を有するとみなされ得る。代替的に、またはさらに、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した安全性プロファイルを有するとみなされ得る。代替的に、またはさらに、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した効力を有するとみなされ得る。本明細書に

記載されているように、欧州におけるバイオシミラーは、ＥＭＡによって認可された参照医薬品と比較される。しかしながら、場合によっては、バイオシミラーは、特定の研究で欧州経済領域外で認可されたバイオ医薬品（ＥＥＡ認可されていない「コンパレーター」）と比較される場合がある。かかる研究には、例えば、特定の臨床研究及びインビボ非臨床研究が含まれる。本明細書で使用される場合、「バイオシミラー」という用語は、ＥＥＡ認可されていないコンパレーターと比較された、または比較され得るバイオ医薬品にも関する。特定のバイオシミラーは、抗体、抗体断片（例えば、抗原結合部分）、及び融合タンパク質などのタンパク質である。タンパク質バイオシミラーは、ポリペプチドの機能に有意な影響を及ぼさない、アミノ酸構造にわずかな修飾（例えば、アミノ酸の欠失、付加、及び／または置換を含む）を有するアミノ酸配列を有し得る。バイオシミラーは、その参照医薬品のアミノ酸配列に対して９７％以上、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。バイオシミラーは、その違いが医薬品の安全性及び／または有効性の変化をもたらさないならば、１つ以上の翻訳後修飾、例えば、限定されないが、参照医薬品の翻訳後修飾とは異なる、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び／または切断を含み得る。バイオシミラーは、参照医薬品と同一または異なるグリコシル化パターンを有し得る。特に、排他的ではないが、バイオシミラーは、その違いが参照医薬品に関連する安全性の懸念に対処するか、対処することを意図している場合、異なるグリコシル化パターンを有し得る。追加として、バイオシミラーは、医薬品の安全性及び有効性が損なわれないならば、例えば、その強度、剤形、製剤、賦形剤、及び／または提示において参照医薬品から逸脱する可能性がある。バイオシミラーは、参照医薬品と比較して、例えば薬物動態（ＰＫ）及び／または薬力学的（ＰＤ）プロファイルの違いを含み得るが、それでも、認可される、または認可に適しているとみなされるように、参照医薬品と十分に類似しているとみなされる。特定の状況において、バイオシミラーは、参照医薬品と比較して異なる結合特徴を示し、異なる結合特徴は、ＥＭＡなどの規制当局によって類似のバイオ製品としての認可の障壁ではないとみなされる。「バイオシミラー」という用語は、他の国及び地域の規制機関によっても同義的に使用されている。

【０４９９】

ＩＩ　．遺伝子編集プロセス

Ａ．概要：ＴＩＬ拡張＋遺伝子編集

ＴＩＬ集団（例えば、ＣＤ３９／ＣＤ６９陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}濃縮ＴＩＬ集団）を拡張するための方法に関する本発明のいくつかの実施形態では、本方法は、それらの治療効果を増強するために、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集する１つ以上のステップを含む。本明細書で使用される場合、「遺伝子編集」、「遺伝子編集」、及び「ゲノム編集」は、ＤＮＡが細胞のゲノム内で永続的に修飾され、例えば、ＤＮＡが細胞のゲノム内で挿入、欠失、修飾、または置換される遺伝子修飾のタイプを指す。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ＤＮＡ配列の発現をサイレンシング（遺伝子ノックアウトと称されることもある）または阻害／低減（遺伝子ノックダウンと称されることもある）させる。他の実施形態では、遺伝子編集は、ＤＮＡ配列の発現を増強させる（例えば、過剰発現を引き起こすことによって）。本発明の実施形態によれば、遺伝子編集技術は、ＴＩＬの治療的集団の有効性を増強するために使用される。

【０５００】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、１つ以上の細胞表面受容体の発現をサイレンシングまたは低減するように遺伝子修飾される。例示的な実施形態では、細胞表面受容体は、ＣＤ３９及び／またはＣＤ６９である。本明細書で使用される場合、「ＣＤ３９」、「ＥＮＴＰＤ１」、「ＡＴＰＤａｓｅ」、「ＮＴＰＤａｓｅ－１」、「ＳＰＧ６４」、及び「エクトヌクレオシドトリホスホヒドロラーゼ１」はすべて、トリホスホ及びジホスホヌクレオシドのγ－及びβ－リン酸残基の、モノホスホヌクレオシド誘導体への加水分解を触媒する細胞表面酵素を指す。ＣＤ３９の高い発現または活性は、免疫系ががんの進行を阻害するのを防ぐことができる。本明細書で使用される場合、「ＣＤ６９」、「ＡＩＭ

」、「ＢＬ－ＡＣ／Ｐ２６」、「ＣＬＥＣ２Ｃ」、「ＥＡ１」、「ＧＰ３２／２８」、「ＭＬＲ－３」はすべて、ＣＤ６９遺伝子によってコードされるヒト膜貫通Ｃ型レクチンタンパク質を指す。ＣＤ６９は、免疫系の多くの細胞型で発現する活性化マーカーであり、リンパ球増殖及びリンパ球におけるシグナル伝達に関与する。したがって、いかなる特定の操作理論にも縛られることなく、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現をサイレンシングまたは減少させるように遺伝子修飾されたＴＩＬは、増加した抗腫瘍活性を示すと考えられる。ＴＩＬは、本明細書に記載の遺伝子修飾方法を含む当該技術分野で知られている任意の好適な方法を使用して、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現をサイレンシングまたは減少させるように修飾され得る。例示的な遺伝子修飾技法としては、例えば、本明細書に記載のＣＲＩＳＰＲ、ＴＡＬＥ、及びジンクフィンガー法が挙げられる。

【０５０１】

いくつかの実施形態では、遺伝子修飾されたＴＩＬ集団は、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性発現について最初に事前選択され、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性濃縮ＴＩＬ集団は、その後、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現をサイレンシングまたは減少させるように遺伝子修飾される。いかなる特定の操作理論にも縛られることなく、かかるＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性濃縮ＴＩＬ集団は、その後、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現をサイレンシングまたは減少させるように遺伝子修飾され、対照ＴＩＬ集団（例えば、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性発現について事前選択されていない及び／またはその後、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現を減少させるように修飾されたＴＩＬ集団）と比較して、増強された抗腫瘍活性を示すと考えられる。ＴＩＬは、例えば、本明細書で提供されるＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性事前選択法を含む任意の好適な方法を使用して、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性発現のために事前選択される。

【０５０２】

いくつかの実施形態では、その後、サイレンシングまたは減少したＣＤ３９及びＣＤ６９の発現を有する遺伝子修飾されたＴＩＬ集団を拡張して、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現をサイレンシングまたは減少させるように遺伝子修飾された治療的ＴＩＬ集団の集団を作成する。任意の好適な拡張方法を使用して、遺伝子修飾されたＴＩＬ集団を拡張することができる。

【０５０３】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のうちのいずれかの実施形態に従って実行することができ、この方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。さらなる実施形態によれば、ＴＩＬを治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、ＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３（これらは参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている方法のいずれかの実施形態に従って実行され、この方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。したがって、本発明のある実施形態は、本明細書に記載される任意の実施形態に従って拡張された治療的ＴＩＬ集団を提供し、治療的集団の少なくとも一部は遺伝子編集されており、例えば、注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部は、永続的に遺伝子編集される。

【０５０４】

Ｂ．ＴＩＬ拡張中の遺伝子編集のタイミング

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、本明細書で提供される拡張方法の過程で遺伝子修飾される。拡張方法（例えば、本明細書に記載の２Ａプロセス及びＧｅｎ３プロセス、または図３４に示されるプロセス）は、概して、第１の拡張及び第２の拡張を含む。ある特定の実施形態では、ＴＩＬは、拡張方法の第１の拡張の前に、特定のマーカー（例えば、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性発現）について事前選択される。いくつかの実施形態では、この濃縮集団は、第１の拡張（例えば、本明細書に記載の２ＡまたはＧｅｎ３プロセスの第１の拡張、または図３４に示される第１の拡張）を受ける前に、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現をサイレンシングまたは最小化するように遺伝子修飾される。いくつかの実施

形態では、濃縮された集団は、第１の拡張を受け、第１の拡張で産生された細胞は、第２の拡張（例えば、本明細書に記載の２ＡもしくはＧｅｎ３プロセスの第２の拡張、または図３４に示される第１の拡張）を受ける前に、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現をサイレンシングまたは減少させるように遺伝子修飾される。いくつかの実施形態では、濃縮集団は、第１の拡張及び第２の拡張を受け、第２の拡張の結果として産生されたＴＩＬは、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現をサイレンシングまたは減少させるように遺伝子修飾される。

【０５０５】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者または対象におけるがんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料である第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

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

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

（ｄ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の培養培地中で培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、急速な第２の拡張が、約１４日以下の第２の期間行われ、治療的ＴＩＬ集団を取得することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団を採取することと、

（ｆ）採取された第３のＴＩＬ集団が、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現を減少させる遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、方法中の任意の時点でＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}濃縮ＴＩＬ集団を遺伝子修飾することと、を含む。

【０５０６】

上記の実施形態のステップ（ｆ）に記載されるように、遺伝子修飾プロセスは、方法において任意のＴＩＬ集団で実行されてもよく、これは、遺伝子編集が、拡張方法におけるステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｅ）のうちのいずれかの間に、ＴＩＬ上で実行されてもよいことを意味する。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、拡張方法中に収集され、収集されたＴＩＬは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、拡張プロセスを継続するために拡張方法に再導入され（例えば、培養培地に戻され）、それにより治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。ある実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬを活性化し、活性化されたＴＩＬに対して遺伝子編集ステップを行い、本明細書に記載のプロセスに従って遺伝子編集ＴＩＬを拡張することによって、拡張の前に実行されてもよい。

【０５０７】

拡張プロセスの代替実施形態は、上記に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｇ）を有し得ないか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える拡張を含み得、第３または第４の拡張中にＴＩＬに対して遺伝子修飾が実施され得ることなどが可能である。

【０５０８】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子修飾プロセスは、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団、第２の集団、及び第３の集団のうちの１つ以上からのＴＩＬ上で実行される。例えば、遺伝子修飾は、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団上で、またはＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}集団から収集されたＴＩＬの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらのＴＩＬをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。代替的に、遺伝子修飾は、第２もしくは第３の集団からのＴＩＬ上で、または第２もしくは第３の集団から収集されたＴＩＬの一部上で、それぞれ、実行されてもよく、遺伝子修飾プロセスに続いて、それらのＴＩＬをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。他の実施形態によれば、遺伝子修飾は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び拡張が実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも拡張から「除去」されるわけではない。

【０５０９】

他の実施形態によれば、遺伝子修飾プロセスは、第１の拡張からのＴＩＬ、または第２の拡張からのＴＩＬ、またはその両方で実行される。例えば、第１の拡張または第２の拡張中に、遺伝子修飾は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され得、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、例えば、それらを培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

【０５１０】

他の実施形態によれば、遺伝子修飾プロセスは、第１の拡張後かつ第２の拡張前にＴＩＬの少なくとも一部上で実行される。例えば、第１の拡張後に、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され得、遺伝子修飾プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、例えば、それらを第２の拡張のための培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

【０５１１】

代替実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、ステップ（ｃ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｂ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ（ｄ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｃ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、またはステップ（ｅ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｄ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）に実行される。

【０５１２】

他の実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

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

（ｄ）ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３（例えば、ＯＫＴ－３は拡張プロセスの開始日に開始して培養培地中に存在し得る）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過

性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取することと、

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

（ｈ）採取されたＴＩＬ集団が、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現を減少させる遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）において注入バッグに移す前の任意の時点で、ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}及び／またはＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性濃縮ＴＩＬ集団を任意選択で遺伝子修飾することと、を含む。

【０５１３】

上記の実施形態のステップ（ｇ）に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ステップ（ｆ）における注入バッグへの移送前のＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよく、これは、遺伝子編集が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）のうちのいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｅ）のうちのいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行されてもよいことを意味する。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、拡張方法中に収集され（例えば、拡張方法は、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、拡張プロセスを継続するために拡張方法に戻され（例えば、培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。ある実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬを活性化し、活性化されたＴＩＬに対して遺伝子編集ステップを行い、本明細書に記載のプロセスに従って遺伝子編集ＴＩＬを拡張することによって、拡張の前に実行されてもよい。

【０５１４】

拡張プロセスの代替実施形態は、上記に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｇ）を有し得ないか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える拡張を含み得、第３または第４の拡張中にＴＩＬに対して遺伝子編集が実施され得ることなどが可能である。

【０５１５】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第１の集団、第２の集団、及び第３の集団のうちの１つ以上からのＴＩＬ上で実行される。例えば、遺伝子編集は、第１のＴＩＬ集団上で、または第１の集団から収集されたＴＩＬの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらのＴＩＬをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。代替的に、遺伝子編集は、第２もしくは第３の集団からのＴＩＬ上で、または第２もしくは第３の集団から収集されたＴＩＬの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらのＴＩＬをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。他の実施形態によれば、遺伝子編集は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び拡張が実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも拡張から「除去」されるわけではない。

【０５１６】

他の実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第１の拡張からのＴＩＬ、または第２の拡張からのＴＩＬ、またはその両方で実行される。例えば、第１の拡張または第２の拡張中に、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され得、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、例えば、それらを培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

【０５１７】
他の実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第１の拡張後及び第２の拡張前にＴＩＬの少なくとも一部上で実行される。例えば、第１の拡張後に、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され得、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、例えば、それらを第２の拡張のための培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。
【０５１８】
代替実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、ステップ（ｃ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｂ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ（ｄ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｃ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ（ｅ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｄ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、またはステップ（ｆ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｅ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）に実行される。
【０５１９】
ＯＫＴ－３に関しては、ある特定の実施形態によれば、細胞培養培地は、開始日（０日目）、または第１の拡張の１日目に開始するＯＫＴ－３を含んでもよく、その結果、遺伝子編集は、０日目及び／または１日目に細胞培養培地中でＯＫＴ－３に曝露した後にＴＩＬ上で実行されることに留意されたい。他の実施形態によれば、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＯＫＴ－３を含み、ＯＫＴ－３が細胞培養培地に導入される前に、遺伝子編集が実行される。代替的に、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＯＫＴ－３を含み、ＯＫＴ－３が細胞培養培地中に導入された後に、遺伝子編集が実行される。
【０５２０】
４－１ＢＢアゴニストに関しては、ある特定の実施形態によれば、細胞培養培地は、開始日（０日目）、または第１の拡張の１日目に開始する４－１ＢＢを含んでもよく、その結果、遺伝子編集は、０日目及び／または１日目に細胞培養培地中で４－１ＢＢアゴニストに曝露した後にＴＩＬ上で実行されることにも留意されたい。他の実施形態によれば、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中に４－１ＢＢを含み、４－１ＢＢが細胞培養培地に導入される前に、遺伝子編集が実行される。代替的に、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中に４－１ＢＢを含み得、４－１ＢＢアゴニストが細胞培養培地中に導入された後に、遺伝子編集が実行される。
【０５２１】
ＩＬ－２に関しては、ある特定の実施形態によれば、細胞培養培地は、開始日（０日目）、または第１の拡張の１日目に開始するＩＬ－２を含んでもよく、その結果、遺伝子編集は、０日目及び／または１日目に細胞培養培地中でＩＬ－２に曝露した後にＴＩＬ上で実行されることにも留意されたい。他の実施形態によれば、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＩＬ－２を含み、ＩＬ－２が細胞培養培地に導入される前に、遺伝子編集が実行される。代替的に、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＩＬ－２を含み得、ＩＬ－２が細胞培養培地中に導入された後に、遺伝子編集が実行される。
【０５２２】
上述のように、ＯＫＴ－３、４－１ＢＢアゴニスト及びＩＬ－２のうちの１つ以上は、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれてもよい。いくつかの実施形態によれば、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれ、及び／または４－１ＢＢアゴニストは、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれ、及び／またはＩＬ－２は、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれる。実施例によれば、細胞培養培地は、第１の拡張の０日目または１日目に開始するＯＫＴ－３及び４－１ＢＢアゴニストを含む。別の実施例によれば、細胞培養培地は、第１の拡張の０日目または１日目に開始するＯＫＴ－３、４－１ＢＢアゴニスト、及びＩＬ－２を含む。当然のことながら、本明細書に記載の様々な実施

形態に記載されるように、ＯＫＴ－３、４－１ＢＢアゴニスト及びＩＬ－２のうちの１つ以上を、拡張プロセス中の１つ以上の追加の時点で細胞培地に添加してもよい。

【０５２３】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

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

（ｄ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させることと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｈ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｉ）ステップ（ｈ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｈ）からステップ（ｉ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、

（ｊ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、第２のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの無菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現を減少させる、移すことと、を含む。

【０５２４】

いくつかの実施形態によれば、前述の方法は、凍結保存培地を使用して採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することをさらに含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地はジメチルスルホキシド系凍結保存培地である。他の実施形態では、凍結保存培地は、ＣＳ１０である。

【０５２５】

他の実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者または対象におけるがんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料である第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）（ａ）における第１のＴＩＬ集団からＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性ＴＩＬを選択して、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性濃縮ＴＩＬ集団を取得することと、

（ｃ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性濃縮ＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる

第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が、約１～１１日間の第１の期間行われ、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をＯＫＴ－３で再刺激するステップと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を遺伝子修飾して、修飾された第２のＴＩＬ集団を産生することであって、修飾された第２のＴＩＬ集団が、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現を減少させる遺伝子修飾を含む、修飾された第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）修飾された第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の細胞培養培地中で培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が約１４日以内の第２の期間行われて、治療的ＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現を減少させる遺伝子修飾を含む治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｇ）第３のＴＩＬ集団を採取することと、を含む。

【０５２６】

いくつかの実施形態では、遺伝子修飾ステップは、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）系、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）系、またはジンクフィンガー系からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系のエレクトロポレーション及び送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系は、修飾された第２のＴＩＬ集団においてＣＤ３９及び／またはＣＤ６９の発現を減少させる。

【０５２７】

いくつかの実施形態によれば、前述の方法を使用して、がんを有するヒト対象の治療のために自己採取されたＴＩＬ集団を提供することができる。

【０５２８】

Ｃ．遺伝子編集法

上記で考察されたように、本発明の実施形態は、それらの治療効果（例えば、細胞表面上で免疫調節融合タンパク質の発現）を増強するために遺伝子編集を介して遺伝子修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を提供する。本発明の実施形態は、１つ以上のタンパク質の発現の促進及び１つ以上のタンパク質の発現の阻害の両方、ならびにそれらの組み合わせのために、ＴＩＬ集団へのヌクレオチド挿入（ＲＮＡまたはＤＮＡ）による遺伝子編集を包含する。本発明の実施形態は、ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法も提供し、方法は、ＴＩＬを遺伝子編集することを含む。ＴＩＬ集団を遺伝子修飾するために使用され得るいくつかの遺伝子編集技術が存在し、それらは本発明による使用に好適である。

【０５２９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、１つ以上のタンパク質の産生のために遺伝子の安定した組み込みステップを含む。ある実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レトロウイルス形質導入ステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レンチウイルス形質導入ステップを含む。レンチウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｌｅｖｉｎｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ′ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．２００６，１０３，１７３７２－７７、Ｚｕｆｆｅｒｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９７，１５，８７１－７５、Ｄｕｌｌ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９９８，７２，８４６３－７１、及び米国特許第６，６２７，４４２号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、ガンマレトロウイルス形質導入ステップを含む。ガンマレトロウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｃｅｐｋｏ ａｎｄ Ｐｅａｒ，Ｃｕｒ．Ｐｒｏｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９６，９．９．１－９．９．１６に記載されており、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入ステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入系は、当該技術分野で知られており、トランスポザーゼが

、ＤＮＡ発現ベクターとしてまたは発現可能なＲＮＡもしくはタンパク質として提供される系を含み、これにより、トランスポザーゼ、例えば、ｍＲＮＡ（例えば、キャップ及びポリＡ尾部を含むｍＲＮＡ）として提供されるトランスポザーゼの長期発現がトランスジェニック細胞で起こらないようになる。ＳＢ１０、ＳＢ１１、及びＳＢ１００ｘなどのサケ科型Ｔｅｌ様トランスポザーゼ（ＳＢまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼ）を含む好適なトランスポゾン媒介遺伝子導入系、ならびに増加した酵素活性を有する操作された酵素は、例えば、Ｈａｃｋｅｔｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ　２０１０，１８，６７４－８３及び米国特許第６，４８９，４５８号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０５３０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、１つ以上のタンパク質の産生または阻害（例えば、サイレンシング）のために遺伝子の安定した組み込みステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、エレクトロポレーションステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｔｓｏｎｇ，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．１９９１，６０，２９７－３０６及び米国特許出願公開第２０１４／０２２７２３７Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。米国特許第５，０１９，０３４号、同第５，１２８，２５７号、同第５，１３７，８１７号、同第５，１７３，１５８号、同第５，２３２，８５６号、同第５，２７３，５２５号、同第５，３０４，１２０号、同第５，３１８，５１４号、同第６，０１０，６１３号、及び同第６，０７８，４９０号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどの当該技術分野で知られている他のエレクトロポレーション法が使用され得る。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、滅菌エレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルスエレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる、及び（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つの第１のセットの

第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬにおける細孔形成を誘導するステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる、及び（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なり、これにより、誘導された細孔が比較的長期間にわたって持続され、ＴＩＬの生存率が維持される。

【０５３１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法（リン酸カルシウムＤＮＡ沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス）は、当該技術分野で知られており、Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９７３，５２，４５６－４６７、Ｗｉｇｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１９７９，７６，１３７３－１３７６、及びＣｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｒｅａ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１９８７，７，２７４５－２７５２、ならびに米国特許第５，５９３，８７５号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、リポソームトランスフェクションステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－ｎ，ｎ，ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）及びジオレオイルホスホチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム製剤を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Ｒｏｓｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １９９１，１０，５２０－５２５及びＦｅｌｇｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８７，８４，７４１３－７４１７、ならびに米国特許第５，２７９，８３３号、同第５，９０８，６３５号、同第６，０５６，９３８号、同第６，１１０，４９０号、同第６，５３４，４８４号、及び同第７，６８７，０７０号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、米国特許第５，７６６，９０２号、同第６，０２５，３３７号、同第６，４１０，５１７号、同第６，４７５，９９４号、及び同第７，１８９，７０５号に記載の方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０５３２】

ある実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。かかるプログラム可能なヌクレアーゼは、特定のゲノム遺伝子座に切断を導入することによって正確なゲノム編集を可能にし、すなわち、ゲノム内の特定のＤＮＡ配列の認識に依存して、ヌクレアーゼドメインをこの位置に標的し、標的配列での二本鎖切断の生成を媒介する。ＤＮＡの二本鎖切断は、その後、内因性修復機構を切断部位に動員して、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）または相同指向修復（ＨＤＲ）のいずれかによるゲノム編集を媒介する。したがって、切断の修復は、標的遺伝子産物を破壊する（例えば、サイレンス、抑制、または増強する）挿入／欠失変異の導入をもたらす可能性がある。

【０５３３】

部位特異的ゲノム編集を可能にするために開発されたヌクレアーゼの主要なクラスには、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写活性化因子様ヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、及びＣＲＩＳＰＲ関連ヌクレアーゼ（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９）が含まれる。これらのヌクレアーゼ系は、ＤＮＡ認識のモードに基づいて大きく２つのカテゴリー

に分類され得、ＺＦＮ及びＴＡＬＥＮは、タンパク質－ＤＮＡ相互作用を介して特定のＤＮＡ結合を達成するが、Ｃａｓ９などのＣＲＩＳＰＲ系は、標的ＤＮＡと直接塩基対を形成する短いＲＮＡガイド分子によって、かつタンパク質－ＤＮＡ相互作用によって特定のＤＮＡ配列を標的とする。例えば、Ｃｏｘ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２０１５，Ｖｏｌ．２１，Ｎｏ．２を参照されたい。

【０５３４】

本発明のＴＩＬ拡張方法に従って使用され得る遺伝子編集法の非限定的な例には、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、及びＺＦＮ法が含まれ、これらの実施形態は以下でより詳細に説明される。いくつかの実施形態によれば、ＴＩＬを治療用集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、もしくはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、方法は、増強された治療効果を提供することができるＴＩＬを生成するために、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはＺＦＮ法のうちの１つ以上によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集されたＴＩＬは、インビトロでそれらを修飾されていないＴＩＬと比較することによって、例えば、修飾されていないＴＩＬと比較してインビトロでのエフェクター機能、サイトカインプロファイルなどを評価することによって、治療効果の改善について評価され得る。

【０５３５】

本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションは、ＣＲＩＳＰＲ系、ＴＡＬＥＮ系、及びＺＦＮ系などの遺伝子編集系の送達のために使用される。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーション系は、フローエレクトロポレーション系である。本発明のいくつかの実施形態との使用に好適な、好適なフローエレクトロポレーション系の例は、市販のＭａｘＣｙｔｅ　ＳＴＸ系である。本発明との使用に好適であり得る、ＢＴＸ－Ｈａｒｖａｒｄ　Ａｐｐａｒａｔｕｓから入手可能なＡｇｉｌｅＰｕｌｓｅ系もしくはＥＣＭ８３０、Ｃｅｌｌａｘｅｓｓ　Ｅｌｅｋｔｒａ（Ｃｅｌｌｅｃｔｒｉｃｏｎ）、Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（Ｌｏｎｚａ／Ａｍａｘａ）、ＧｅｎｅＰｕｌｓｅｒ　ＭＸｃｅｌｌ（ＢＩＯＲＡＤ）、ｉＰｏｒａｔｏｒ－９６（Ｐｒｉｍａｘ）、またはｓｉＰＯＲＴｅｒ９６（Ａｍｂｉｏｎ）などのいくつかの代替の市販エレクトロポレーション機器が存在する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーション系は、ＴＩＬ拡張法の残りとともに、滅菌閉鎖系を形成する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーション系は、本明細書に記載のパルスエレクトロポレーション系であり、ＴＩＬ拡張法の残りとともに、滅菌閉鎖系を形成する。

【０５３６】

ａ．ＣＲＩＳＰＲ法

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、もしくはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、この方法は、ＣＲＩＳＰＲ法（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１）によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣＲＩＳＰＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の細胞表面での少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子を治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは減少させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣＲＩＳＰＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の細胞表面での少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子を治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１からなる群から選択される。

【０５３７】
ＣＲＩＳＰＲは、「Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ Ｓｈｏｒｔ Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ Ｒｅｐｅａｔｓ（クラスター化された定期的に間隔をあけた短いパリンドロミックリピート）」の略語である。遺伝子編集のためにＣＲＩＳＰＲ系を使用する方法は、本明細書ではＣＲＩＳＰＲ法とも称される。ＣＲＩＳＰＲ系は、クラス１及びクラス２の２つの主要なクラスに分類され得、これらは、異なるタイプ及びサブタイプにさらに分類される。ＣＲＩＳＰＲ系の分類は、特定の核酸を切断することができるエフェクターＣａｓタンパク質に基づいている。クラス１ＣＲＩＳＰＲ系では、エフェクターモジュールは、マルチタンパク質複合体からなるが、クラス２の系は、１つのエフェクタータンパク質のみを使用する。クラス１ＣＲＩＳＰＲには、Ｉ型、ＩＩＩ型、及びＩＶ型が含まれ、クラス２　ＣＲＩＳＰＲには、ＩＩ型、Ｖ型、及びＶＩ型が含まれる。これらの型のＣＲＩＳＰＲ系のうちのいずれかは、本発明に従って使用され得るが、ＲＮＡ及びＣａｓタンパク質を組み込み、かつ本発明に従って使用されることが好ましいＣＲＩＳＰＲ系には、３つの型：Ｉ型（Ｃａｓ３によって例示される）、ＩＩ型（Ｃａｓ９によって例示される）、及びＩＩＩ型（Ｃａｓ１０によって例示される）がある。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲは、最もよく特徴付けられている系のうちの１つである。
【０５３８】
ＣＲＩＳＰＲ技術は、細菌及び古細菌（単細胞微生物のドメイン）の自然防御機構から適合された。これらの生物は、ＣＲＩＳＰＲ由来のＲＮＡ及びＣａｓ９を含む様々なＣａｓタンパク質を使用して、外来侵入物のＤＮＡを切り刻んで破壊することによって、ウイルス及び他の異物による攻撃を阻止する。ＣＲＩＳＰＲは、ヌクレオチド反復配列及びスペーサーの存在という２つの異なる特徴を有するＤＮＡの特殊な領域である。ヌクレオチドの反復配列は、ＣＲＩＳＰＲ領域全体に分布しており、外来ＤＮＡ（スペーサー）の短いセグメントが反復配列の間に散在している。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系では、スペーサーは、ＣＲＩＳＰＲゲノム遺伝子座内に組み込まれ、転写され、短いＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）に処理される。これらのｃｒＲＮＡは、トランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）にアニーリングし、Ｃａｓタンパク質による病原性ＤＮＡの配列特異的切断及びサイレンシングを指示する。Ｃａｓ９タンパク質による標的認識には、ｃｒＲＮＡ内の「シード」配列、及びｃｒＲＮＡ結合領域の上流にある保存されたジヌクレオチドを含むプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列が必要である。これにより、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系が再標的されて、ｃｒＲＮＡを再設計することにより、実質的にいずれのＤＮＡ配列も切断することができる。したがって、ある特定の実施形態によれば、Ｃａｓ９は、ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡ認識時にＤＮＡを切断するＲＮＡ誘導ＤＮＡエンドヌクレアーゼとして機能する。天然系におけるｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、遺伝子操作で使用するために、およそ１００ヌクレオチドの単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）に簡略化され得る。ｓｇＲＮＡは、Ｃａｓ結合に必要な足場配列と、修飾されるゲノム標的を定義するユーザ定義のおよそ１７～２０ヌクレオチドスペーサーとを含む合成ＲＮＡである。したがって、ユーザは、ｓｇＲＮＡに存在する標的配列を変更することによって、Ｃａｓタンパク質のゲノム標的を変更することができる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼを発現するプラスミドとＲＮＡ成分（例えば、ｓｇＲＮＡ）を同時送達することにより、ヒト細胞に直接運搬可能である。Ｃａｓタンパク質の異なるバリアント（例えば、Ｃｐｆ１などのＣａｓ９のオルソログ）を使用して、標的の制限を低減することができる。
【０５３９】
いくつかの実施形態によれば、操作された、プログラム可能な、天然に存在しないＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、Ｃａｓ９タンパク質及びＴＩＬにおいてＤＮＡ分子の標的配列を標的とし、それにハイブリダイズする少なくとも１つのガイドＲＮＡを含み、ＤＮＡ分子が少なくとも１つの免疫チェックポイント分子をコードし、ＴＩＬが少なくとも１つの免疫チェックポイント分子を発現し、Ｃａｓ９タンパク質がＤＮＡ分子を切断し、それによって、少なくとも１つの免疫チェックポイント分子の発現が改変され、Ｃａｓ９タ

ンパク質及びガイドＲＮＡが、天然に一緒に存在しない。ある実施形態によれば、２つ以上の免疫チェックポイント分子の発現が改変される。ある実施形態によれば、ガイドＲＮＡ（複数可）は、ｔｒａｃｒ配列に融合したガイド配列を含む。例えば、ガイドＲＮＡは、ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡまたはｓｇＲＮＡを含み得る。本発明の態様によれば、「ガイドＲＮＡ」、「単一ガイドＲＮＡ」及び「合成ガイドＲＮＡ」という用語は、互換的に使用され得、ガイド配列を含むポリヌクレオチド配列を指し、これは、標的部位を特定するガイドＲＮＡ内の約１７～２０ｂｐの配列である。

【０５４０】

Ｃａｓ９と比較して改善されたオンターゲット特異性を有するＣａｓ９のバリアントもまた、本発明の実施形態に従って使用され得る。そのようなバリアントは、高忠実度Ｃａｓ－９と称され得る。ある実施形態によれば、デュアルニッカーゼアプローチを利用してもよく、反対のＤＮＡ鎖を標的とする２つのニッカーゼは、標的ＤＮＡ内でＤＳＢを生成する（多くの場合、ダブルニッカーゼまたはデュアルニッカーゼＣＲＩＳＰＲ系と称される）。例えば、このアプローチは、２つのＣａｓ９ヌクレアーゼドメインのうちの１つの変異を伴い、Ｃａｓ９をヌクレアーゼからニッカーゼに変えることを伴い得る。高忠実度Ｃａｓ９の非限定的な例としては、ｅＳｐＣａｓ９、ＳｐＣａｓ９－ＨＦ１及びＨｙｐａＣａｓ９が挙げられる。そのようなバリアントは、非標的ＤＮＡ部位における望ましくない変化を低減または排除し得る。例えば、Ｓｌａｙｍａｋｅｒ ＩＭ，ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ．２０１５ Ｄｅｃ １、Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ ＢＰ，ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ．２０１６ Ｊａｎ ６、及びＲａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｐｒｏｔｏｃ．２０１３ Ｎｏｖ；８（１１）：２２８１－２３０８（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【０５４１】

追加として、特定の実施形態によれば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２０１６／０１０２３２４号に開示されているものなどの、細胞へのＣａｓ９の遺伝子送達を改善し、標的特異性を改善する、Ｃａｓ９足場を使用することができる。例えば、Ｃａｓ９足場は、（Ｄ－［Ｉ／Ｌ］－Ｇ－Ｘ－Ｘ－Ｓ－Ｘ－Ｇ－Ｗ－Ａ）によって定義されるＲｕｖＣモチーフ及び／または（Ｙ－Ｘ－Ｘ－Ｄ－Ｈ－Ｘ－Ｘ－Ｐ－Ｘ－Ｓ－Ｘ－Ｘ－Ｘ－Ｄ－Ｘ－Ｓ）によって定義されるＨＮＨモチーフを含んでよく、Ｘは、２０個の天然に存在するアミノ酸のうちのいずれか１つを表し、［Ｉ／Ｌ］は、イソロイシンまたはロイシンを表す。ＨＮＨドメインは、標的ｄｓＤＮＡの一方の鎖をニッキングすることに関与し、ＲｕｖＣドメインは、ｄｓＤＮＡの他方の鎖の切断に関与する。したがって、これらのドメインの各々は、ＰＡＭのすぐ近くのプロトスペーサー内の標的ＤＮＡの鎖をニックし、ＤＮＡの鈍い切断をもたらす。これらのモチーフを互いに組み合わせて、よりコンパクト及び／またはより特異的なＣａｓ９足場を作製してもよい。さらに、モチーフを使用して、分割されたＣａｓ９タンパク質（すなわち、ＲｕｖＣドメインまたはＨＮＨドメインのいずれかを含むＣａｓ９タンパク質またはＣａｓ９バリアントの還元型または切断型）を作製してもよく、分割されたＣａｓ９タンパク質は、２つの別個のＲｕｖＣドメイン及びＨＮＨドメインに分割され、標的ＤＮＡを一緒にまたは別個に処理することができる。

【０５４２】

特定の実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ法は、Ｃａｓ９ヌクレアーゼ及び免疫チェックポイント遺伝子（複数可）の標的ＤＮＡ配列に特異的なおよそ１７～２０ヌクレオチドの配列を含むガイドＲＮＡ（例えば、ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡまたはｓｇＲＮＡ）を導入することによって、ＴＩＬにおける１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。ガイドＲＮＡは、ＲＮＡとして、またはプロモーターの下でガイドＲＮＡコード配列を有するプラスミドを形質転換することによって送達されてもよい。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ酵素は、ｓｇＲＮＡにより定義された標的配列に基づいて、特定の位置に二本鎖切断（ＤＳＢ）を導入する。ＤＳＢは、ＤＮＡの挿入または欠失（インデル）を頻繁に引き起こす機序である、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）に

よって細胞内で修復され得る。インデルは、多くの場合、フレームシフトをもたらし、例えば、標的遺伝子のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）内で早期停止コドンを引き起こすことによって、機能対立遺伝子の喪失を引き起こす。ある特定の実施形態によれば、結果は、標的免疫チェックポイント遺伝子内の機能喪失変異である。

【０５４３】

代替的に、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ酵素によって誘導されるＤＳＢは、ＮＨＥＪの代わりに相同性指向修復（ＨＤＲ）によって修復されてもよい。ＮＨＥＪ媒介ＤＳＢ修復は、しばしば遺伝子のオープンリーディングフレームを破壊するが、相同指向修復（ＨＤＲ）を使用して、単一ヌクレオチド変化から大きな挿入までの範囲の特異的なヌクレオチド変化を生成することができる。ある実施形態によれば、ＨＤＲは、ｓｇＲＮＡ（複数可）及びＣａｓ９またはＣａｓ９ニッカーゼを有するＴＩＬに所望の配列を含むＤＮＡ修復テンプレートを送達することによって、免疫チェックポイント遺伝子を遺伝子編集するために使用される。修復テンプレートは、好ましくは、所望の編集、ならびに標的遺伝子のすぐ上流及び下流の追加の相同配列（多くの場合、左及び右の相同アームと称される）を含む。

【０５４４】

特定の実施形態によれば、酵素的に不活性なバージョンのＣａｓ９（ｄｅａｄＣａｓ９またはｄＣａｓ９）は、開始を遮断することによって転写を抑制するために、転写開始部位を標的とし得る。したがって、標的とされた免疫チェックポイント遺伝子は、ＤＳＢを使用せずに抑制され得る。ｄＣａｓ９分子は、ｓｇＲＮＡ標的化配列に基づいて標的ＤＮＡに結合する能力を保持している。本発明のある実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ法は、標的遺伝子（複数可）の転写を阻害または防止することによって、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法は、Ｋｒｕｐｐｅｌ関連ボックス（ＫＲＡＢ）ドメインなどの転写リプレッサードメインをＣａｓ９の酵素不活性バージョンに融合させ、それによって、例えば、免疫チェックポイント遺伝子の転写開始部位を標的とするｄＣａｓ９－ＫＲＡＢを形成し、遺伝子の転写の阻害または防止をもたらすことを含み得る。好ましくは、リプレッサードメインは、転写開始部位の下流、例えば、約５００ｂｐ下流のウィンドウを標的とする。ＣＲＩＳＰＲ干渉（ＣＲＩＳＰＲｉ）と称され得るこのアプローチは、標的ＲＮＡの転写還元を介して堅牢な遺伝子ノックダウンをもたらす。

【０５４５】

特定の実施形態によれば、酵素的に不活性なバージョンのＣａｓ９（ｄｅａｄＣａｓ９またはｄＣａｓ９）は、転写を活性化するために、転写開始部位を標的とし得る。このアプローチは、ＣＲＩＳＰＲ活性化（ＣＲＩＳＰＲａ）と称され得る。ある実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ法は、標的遺伝子（複数可）の転写を活性化することによって１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を増加させることを含む。そのような実施形態によれば、標的とされた免疫チェックポイント遺伝子は、ＤＳＢを使用せずに活性化され得る。ＣＲＩＳＰＲ法は、例えば、ＶＰ６４などの転写活性化因子をｄＣａｓ９に融合させ、それによって例えば、免疫チェックポイント遺伝子の転写開始部位を標的とするｄＣａｓ９－ＶＰ６４を形成することによって、転写活性化ドメインを転写開始部位に標的化することを含み得、遺伝子の転写の活性化をもたらす。好ましくは、活性化因子ドメインは、転写開始部位から上流のウィンドウ、例えば、約５０～４００ｂｐ下流を標的とする。

【０５４６】

本発明の追加の実施形態は、哺乳動物細胞における標的遺伝子の強力な活性化のために開発された活性化戦略を利用し得る。非限定的な例としては、エピトープタグ付きｄＣａｓ９及び抗体活性化剤エフェクタータンパク質（例えば、ＳｕｎＴａｇ系）の共発現、複数の異なる活性化ドメインに直列に融合したｄＣａｓ９（例えば、ｄＣａｓ９－ＶＰＲ）、またはｄＣａｓ９－ＶＰ６４と修飾された足場ｇＲＮＡ及び追加のＲＮＡ結合ヘルパー活性化因子（例えば、ＳＡＭ活性化因子）との共発現が挙げられる。

【０５４７】

他の実施形態によれば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第９，９８２，

２７８号に開示されるように、ＣＲＩＳＰＲ支援合理的タンパク質操作（ＣＡＲＰＥ）と称されるＣＲＩＳＰＲ媒介ゲノム編集方法を、本発明の実施形態に従って使用してもよい。ＣＡＲＰＥは、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）または二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）編集カセットからの指向性変異をゲノムに直接組み込む「ドナー」及び「デスティネーション」ライブラリーの生成を伴う。ドナーライブラリーの構築は、標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズするガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を用いて、合理的に設計された編集オリゴヌクレオチドを細胞に同時形質転換することを伴う。編集オリゴヌクレオチドは、ＰＡＭの欠失または変異を、隣接遺伝子内の１つ以上の所望のコドンの変異とカップリングするように設計される。これにより、ドナーライブラリー全体を単一の形質転換で生成することができる。ドナーライブラリーは、編集オリゴヌクレオチドからの合成特徴、すなわち、遺伝子の３’末端に同時に組み込まれる第２のＰＡＭ欠失または変異を使用して、ＰＣＲ反応などによる組換え染色体の増幅によって回収される。これは、ＰＡＭ欠失に指向されたコドン標的変異を共有結合する。次いで、ドナーライブラリーを、デスティネーションｇＲＮＡベクターを有する細胞に同時形質転換して、合理的に設計されたタンパク質ライブラリーを発現する細胞の集団を作製する。

【０５４８】

他の実施形態によれば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第９，９８２，２７８号に開示されるように、追跡可能なＣＲＩＳＰＲ濃縮組換えによるゲノム操作（ＧＥｎ－ＴｒａＣＥＲ）と称されるＣＲＩＳＰＲ媒介系を使用する、追跡可能な精密ゲノム編集のための方法を、本発明の実施形態に従って使用してもよい。ＧＥｎ－ＴｒａＣＥＲ方法及びベクターは、編集カセットを、単一のベクター上のｇＲＮＡをコードする遺伝子と組み合わせる。カセットは、所望の変異及びＰＡＭ変異を含有する。Ｃａｓ９もコードし得るベクターは、細胞または細胞集団に導入される。これは、細胞または細胞集団におけるＣＲＩＳＰＲ系の発現を活性化し、ｇＲＮＡにＣａｓ９を標的領域に動員させ、ｄｓＤＮＡ切断が発生し、ＰＡＭ変異の組み込みを可能にする。

【０５４９】

ＣＲＩＳＰＲ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンシングまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、及びＴＯＸが含まれる。

【０５５０】

ＣＲＩＳＰＲ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）、及び／またはＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１が含まれる。

【０５５１】

ＣＲＩＳＰＲ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得る系、方法、及び組成物の例は、米国特許第８，６９７，３５９号、同第８，９９３，２３３号、同第８，７９５，９６５号、同第８，７７１，９４５号、同第８，８８９，３５６号、同第８，８６５，４０６号、同第８，９９９，６４１号、同第８，９４５，８３９号、同第８，９３２，８１４号、同第８，８７１，４４５号、同第８，９０６，６１６号、及び同第８，８９５，３０８号に記載されており、これらは参照に

より本明細書に組み込まれる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１を発現するためのプラスミドなどのＣＲＩＳＰＲ法を行うための資源は、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔなどの企業から市販されている。

【０５５２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＴＩＬ集団の遺伝子修飾は、米国特許第９，７９０，４９０号に記載されているＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１系を使用して行うことができ、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１系は、Ｃｐｆ１関連ＣＲＩＳＰＲアレイが追加のｔｒａｃｒＲＮＡを必要とすることなく成熟したｃｒＲＮＡに処理されるという点で、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系とは機能的に異なる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１系で使用されるｃｒＲＮＡは、スペーサーまたはガイド配列及び直接反復配列を有する。この方法を使用して形成されるＣｐｆ１ｐ－ｃｒＲＮＡ複合体は、それ自体で標的ＤＮＡを切断するのに十分である。

【０５５３】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）任意選択で、腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

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

（ｄ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｈ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｉ）ステップ（ｈ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｈ）からステップ（ｉ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、

（ｊ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｉ）から（ｊ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｋ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップは、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）／Ｃａｓ９系及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１系からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディターは、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現を減少させる。

【０５５４】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）任意選択で、腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）（ａ）における第１のＴＩＬ集団からＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}及び／またはＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性ＴＩＬを選択して、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性濃縮ＴＩＬ集団を取得することと、
（ｄ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｈ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｉ）ステップ（ｈ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｈ）からステップ（ｉ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｊ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｉ）から（ｊ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｋ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップは、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）／Ｃａｓ９系及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１系からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系は、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現を減少させる。
【０５５５】
ｂ．ＴＡＬＥ法
ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、もしくはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、この方法は、ＴＡＬＥ法によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、細胞表面での少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは減少させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、細胞表面での少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。

【０５５６】
ＴＡＬＥは、ＴＡＬＥＮ（「転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ」）を含む、「Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ａｃｔｉｖａｔｏｒ－Ｌｉｋｅ Ｅｆｆｅｃｔｏｒ（転写活性化因子様エフェクター）」タンパク質の略語である。遺伝子編集のためにＴＡＬＥ系を使用する方法は、本明細書ではＴＡＬＥ法とも称され得る。ＴＡＬＥは、植物病原菌Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ属由来の天然に存在するタンパク質であり、各々単一の塩基対を認識する一連の３３～３５アミノ酸反復ドメインで構成されるＤＮＡ結合ドメインを含む。ＴＡＬＥ特異性は、反復可変二残基（ＲＶＤ）として知られる２つの超可変アミノ酸によって決定される。モジュラーＴＡＬＥ反復配列は、隣接するＤＮＡ配列を認識するために一緒に結合される。ＤＮＡ結合ドメイン内の特定のＲＶＤは、標的遺伝子座内の塩基を認識し、予測可能なＤＮＡ結合ドメインを組み立てるための構造的特徴を提供する。ＴＡＬＥのＤＮＡ結合ドメインは、ＩＩＳ型ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼの触媒ドメインに融合して、標的可能なＴＡＬＥヌクレアーゼを作製する。部位特異的変異を誘導するために、１４～２０塩基対のスペーサー領域によって分離された２つの個々のＴＡＬＥＮアームがＦｏｋＩモノマーを密接に接近させて二量体化し、標的とされる二本鎖切断を産生する。

【０５５７】
様々な組み立て方法を利用したいくつかの大規模な系統的研究により、ＴＡＬＥ反復配列を組み合わせて、実質的にすべてのユーザ定義配列を認識することができることが示されている。カスタムＴＡＬＥアレイの迅速な組み立てを可能にする戦略には、ゴールデンゲート分子クローニング、高スループット固相組み立て、及びライゲーション非依存性クローニング技術が含まれる。カスタム設計されたＴＡＬＥアレイも、Ｃｅｌｌｅｃｔｉｓ Ｂｉｏｒｅｓｅａｒｃｈ（Ｐａｒｉｓ，Ｆｒａｎｃｅ）、Ｔｒａｎｓｐｏｓａｇｅｎ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ，ＫＹ，ＵＳＡ）、及びＬｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ，ＵＳＡ）から市販されている。追加として、所望の標的のためのカスタムＴＡＬエフェクター反復アレイの設計を可能にし、また、予測されるＴＡＬエフェクター結合部位を提供する、ＴＡＬエフェクター－ヌクレオチドターゲット２．０などのウェブベースのツールが利用可能である。Ｄｏｙｌｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１２，Ｖｏｌ．４０，Ｗ１１７－Ｗ１２２を参照されたい。本発明での使用に好適なＴＡＬＥ法及びＴＡＬＥＮ法の例は、米国特許公開第２０１１／０２０１１１８Ａ１号、同第２０１３／０１１７８６９Ａ１号、同第２０１３／０３１５８８４Ａ１号、同第２０１５／０２０３８７１Ａ１号、同第２０１６／０１２０９０６Ａ１号に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０５５８】
本発明のいくつかの実施形態によれば、ＴＡＬＥ法は、標的遺伝子（複数可）の転写を阻害または防止することによって、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンスまたは減少させることを含む。例えば、ＴＡＬＥ法は、ＫＲＡＢ－ＴＡＬＥを利用することを含み得、この方法は、転写Ｋｒｕｐｐｅｌ関連ボックス（ＫＲＡＢ）ドメインを、遺伝子の転写開始部位を標的とするＤＮＡ結合ドメインに融合することを含み、遺伝子の転写の阻害または防止につながる。

【０５５９】
他の実施形態によれば、ＴＡＬＥ法は、標的遺伝子（複数可）に変異を導入することによって１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンスまたは減少させることを含む。例えば、ＴＡＬＥ法は、Ｆｏｋｌなどのヌクレアーゼエフェクタードメインを ＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメインに融合させ、ＴＡＬＥＮをもたらすことを含み得る。Ｆｏｋｌは、二量体として活性であり、したがって、この方法は、ＦＯＫＬヌクレアーゼドメインを隣接するゲノム標的部位に位置決めするためのＴＡＬＥＮ対を構築することを含み、ＤＮＡ二本鎖切断を導入する。Ｆｏｋｌの正しい位置決め及び二量体化後、二本鎖切断が完了し得る。二本鎖切断が導入されると、ＤＮＡ修復は、高忠実度相同組換え対（ＨＲＲ

）（相同性指向修復またはＨＤＲとしても知られる）またはエラーが発生しやすい非相同性末端結合（ＮＨＥＪ）の２つの異なる機序を介して達成することができる。ＮＨＥＪを介した二本鎖切断の修復は、好ましくは、ＤＮＡ標的部位の欠失、挿入または置換をもたらす、すなわち、ＮＨＥＪは、典型的には、切断部位での小さな挿入及び欠失の導入をもたらし、多くの場合、遺伝子機能をノックアウトするフレームシフトを誘導する。特定の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮ対は、遺伝子の最５’エクソンを標的とし、早期フレームシフト変異または早期停止コドンを促進する。ＴＡＬＥＮによって導入される遺伝子変異（複数可）は、好ましくは永続的である。したがって、いくつかの実施形態によれば、この方法は、二量体化ＴＡＬＥＮを利用して、エラーが発生しやすいＮＨＥＪを介して修復される部位特異的二本鎖切断を誘導し、標的免疫チェックポイント遺伝子に１つ以上の変異をもたらすことによって、免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。

【０５６０】

追加の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮは、非ランダム点変異、標的欠失、またはＤＮＡ断片の付加などのＨＲＲを介して遺伝子改変を導入するために利用される。ＤＮＡ二本鎖切断の導入は、好適なドナーＤＮＡの存在下での相同組換えを介した遺伝子編集を可能にする。いくつかの実施形態によれば、この方法は、部位特異的二本鎖切断を誘導し、１つ以上の導入遺伝子をＤＮＡに組み込むために、二量体化ＴＡＬＥＮ及び遺伝子座特異的相同性アームを有するドナープラスミドを同時送達することを含む。

【０５６１】

他の実施形態によれば、米国特許公開第２０１１／０２０１１１８号に開示されているように、ＦｏｋＩ及びＡｖｒＸａ７に由来するハイブリッドタンパク質であるＴＡＬＥＮを、本発明の実施形態に従って使用してもよい。このＴＡＬＥＮは、ＡｖｒＸａ７の標的ヌクレオチド及びＦｏｋＩの二本鎖ＤＮＡ切断活性に対する認識特異性を保持する。同じ方法を使用して、異なる認識特異性を有する他のＴＡＬＥＮを調製することができる。例えば、コンパクトＴＡＬＥＮは、ＤＮＡ結合特異性を変化させ、特定の単一のｄｓＤＮＡ標的配列を標的とするために、ＲＶＤの異なるセットを有するコアＴＡＬＥ足場を操作することによって生成され得る。米国特許公開第２０１３／０１１７８６９号を参照されたい。触媒ドメインの選択は、ＤＮＡ処理をもたらすために足場に付着させることができ、これは、触媒ドメインが、コアＴＡＬＥ足場に融合されたときに、単一のｄｓＤＮＡ標的配列の近くでＤＮＡを処理することができることを確実にするように操作され得る。ペプチドリンカーはまた、触媒ドメインを足場に融合させて、特定の単一のｄｓＤＮＡ配列を標的とするために二量体化を必要としない単一のポリペプチド鎖からなるコンパクトなＴＡＬＥＮを作製するように操作されてもよい。コアＴＡＬＥ足場はまた、ＴＡＬモノマーであり得る触媒ドメインをそのＮ末端に融合させることによって修飾され得、この触媒ドメインが別のＴＡＬモノマーに融合された別の触媒ドメインと相互作用する可能性を可能にし、それによって標的配列の近傍でＤＮＡを処理する可能性が高い触媒エンティティを作製する。米国特許公開第２０１５／０２０３８７１号を参照されたい。このアーキテクチャは、１つのＤＮＡ鎖のみを標的とすることを可能にするが、これは古典的なＴＡＬＥＮアーキテクチャの選択肢ではない。

【０５６２】

本発明のある実施形態によれば、従来のＲＶＤを使用して、遺伝子発現を顕著に低減することができるＴＡＬＥＮを作製してもよい。ある実施形態では、４つのＲＶＤ、ＮＩ、ＨＤ、ＮＮ、及びＮＧを使用して、それぞれ、アデニン、シトシン、グアニン、及びチミンを標的とする。これらの従来のＲＶＤを使用して、例えば、ＰＤ－１遺伝子を標的とするＴＡＬＥＮを作製することができる。従来のＲＶＤを使用するＴＡＬＥＮの例としては、Ｇａｕｔｒｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ：Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｄｅｃ．２０１７，Ｖｏｌ．９：３１２－３２１（Ｇａｕｔｒｏｎ）（これは参照により本明細書に組み込まれる）に開示されているＴ３ｖ１及びＴ１ ＴＡＬＥＮが挙げられる。Ｔ３ｖ１及びＴ１ ＴＡＬＥＮは、ＰＤ－Ｌ１結合部位が位置するＰ

ＤＣＤ１遺伝子座の第２のエクソンを標的とし、ＰＤ－１産生を著しく低減することができる。ある実施形態では、Ｔ１　ＴＡＬＥＮは、標的配列番号２３８を使用することによってそれを行い、Ｔ３ｖ１　ＴＡＬＥＮは、標的配列番号２３９を使用することによってそれを行う。

【０５６３】

他の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮは、Ｇａｕｔｒｏｎに開示されるような、標的遺伝子に対するそれらの活性及び特異性を改善するために、非従来型ＲＶＤを使用して修飾される。天然に存在するＲＶＤは、超可変アミノ酸位置の潜在的な多様性レパートリーのごく一部のみをカバーする。非従来のＲＶＤは、天然のＲＶＤの代替物を提供し、ＴＡＬＥＮによるオフサイト標的（標的配列に対していくつかのミスマッチを含むゲノム内の配列）の標的化を除外するために使用され得る、新規の固有の標的化特異性特徴を有する。非従来型ＲＶＤは、Ｊｕｉｌｌｅｒａｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｒｅｐｏｒｔｓ　５，Ａｒｔｉｃｌｅ　Ｎｕｍｂｅｒ　８１５０（２０１５）（これは参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるようなアレイの定義された位置における２つの超可変アミノ酸位置にアミノ酸の代替組み合わせを含むＴＡＬＥＮの集合を生成及びスクリーニングすることによって同定され得る。次に、ミスマッチの位置に存在するヌクレオチドを区別する非従来型ＲＶＤを選択してもよく、これにより、標的位置の適切な処理を依然として可能にしながら、オフサイト配列でのＴＡＬＥＮ活性を防止することができる。次いで、選択された非従来型ＲＶＤは、ＴＡＬＥＮ内の従来のＲＶＤを置き換えるために使用され得る。従来のＲＶＤが非従来型ＲＶＤに置き換えられたＴＡＬＥＮの例としては、Ｇａｕｔｒｏｎによって産生されたＴ３ｖ２及びＴ３ｖ３　ＰＤ－１　ＴＡＬＥＮが挙げられる。これらのＴＡＬＥＮは、従来のＲＶＤを使用したＴＡＬＥＮと比較した場合、特異性が増加していた。

【０５６４】

追加の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮを利用して、２つの遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させるための遺伝子改変を導入してもよい。例えば、２つの異なる遺伝子を標的とするために２つの別個のＴＡＬＥＮを生成し、次いで一緒に使用してもよい。２つのＴＡＬＥＮによってそれぞれの遺伝子座及び潜在的なオフターゲット部位で生成される分子事象は、ハイスループットＤＮＡ配列決定によって特徴付けられ得る。これにより、オフターゲット部位の分析、及び両方のＴＡＬＥＮの使用から生じる可能性のある部位の特定が可能になる。この情報に基づいて、一緒に使用されても特異性及び活性が増加したＴＡＬＥＮを操作するために、適切な従来型及び非従来型のＲＶＤが選択され得る。例えば、Ｇａｕｔｒｏｎは、Ｔ３ｖ４　ＰＤ－１及びＴＲＡＣ　ＴＡＬＥＮを併用して、強力なインビトロ抗腫瘍機能を維持したダブルノックアウトＣＡＲ　Ｔ細胞を産生することを開示する。

【０５６５】

いくつかの実施形態では、Ｇａｕｔｒｏｎの方法または本明細書に記載の他の方法は、ＴＩＬを遺伝子編集するために用いられてもよく、このＴＩＬは、次いで、本明細書に記載の手順のうちのいずれかによって拡張されてもよい。ある実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬの第１の集団を１～５日間活性化するステップと、

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

（ｃ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼのエレクトロポレーションを使用して第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、遺伝子編集が、第２のＴＩＬ集団の細胞の一部においてＣＤ３９及びＣＤ６９を減少させる、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｄ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップと、

（ｅ）ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得する、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｆ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｇ）ステップ（ｆ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、

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

（ｉ）任意選択で、ステップ（ａ）～（ｈ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われるステップと、を含む。

【０５６６】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬの第１の集団を１～５日間活性化するステップと、

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

（ｃ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼのエレクトロポレーションを使用して第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、遺伝子編集が、第２のＴＩＬ集団の細胞の一部において、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現を減少させる、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｄ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップと、

（ｅ）ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第６のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～９日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得する、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｆ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約９～１１日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｇ）ステップ（ｆ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、

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

（ｉ）任意選択で、ステップ（ａ）～（ｈ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われるステップと、を含む。

【０５６７】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬの第１の集団を１～５日間活性化するステップと、

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

（ｃ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼのエレクトロポレーションを使用して第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、遺伝子編集が、第２のＴＩＬ集団の細胞の一部において、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現を減少させる、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｄ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートするステップと、

（ｅ）ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約６～９日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得する、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｆ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約９～１１日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｇ）ステップ（ｆ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、

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

（ｉ）任意選択で、ステップ（ａ）～（ｈ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われるステップと、を含む。

【０５６８】

他の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮは特異的に設計されてもよく、これにより、遺伝子の特異的選択を標的とすることができる標的細胞（複数可）内の、より高い割合のＤＳＢ事象が可能になる。米国特許公開第２０１３／０３１５８８４号を参照されたい。そのようなまれな切断エンドヌクレアーゼの使用は、トランスフェクトされた細胞内で標的遺伝子の二重不活性化を得る可能性を高め、Ｔ細胞などの操作された細胞の産生を可能にする。さらに、変異誘発を増加させ、標的遺伝子不活性化を強化するために、追加の触媒ドメインをＴＡＬＥＮで導入することができる。米国特許公開第２０１３／０３１５８８４号に記載されているＴＡＬＥＮは、免疫療法に適するようにＴ細胞を操作するために首尾よく使用された。ＴＡＬＥＮを使用して、単一のＴ細胞内の少なくとも２つの遺伝子の不活性化を含む、Ｔ細胞内の様々な免疫チェックポイント遺伝子を不活性化することもできる。米国特許公開第２０１６／０１２０９０６号を参照されたい。追加として、ＴＡＬＥＮを使用して、参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開第２０１８／００２１３７９号に開示されるように、免疫抑制剤及びＴ細胞受容体の標的をコードする遺伝子を不活性化することができる。さらに、ＴＡＬＥＮは、米国特許公開第２０１９／００１０５１４号（これは参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるように、ベータ２－ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）及び／またはクラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーター（ＣＩＩＴＡ）の発現を阻害するために使用され得る。

【０５６９】

ＴＡＬＥ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンシングまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７

、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、及びＧＵＣＹ１Ｂ３が含まれる。

【０５７０】

ＰＤ－１遺伝子を標的とするＴＡＬＥヌクレアーゼの非限定的な例を、以下の表に提供する。これらの実施例では、標的化ゲノム配列は、１５ｂｐのスペーサー（小文字で示される）によって分離された２つの１７塩基対（ｂｐ）の長い配列（大文字で示される、半分の標的と称される）を含有する。各半分の標的は、表に列挙される半分のＴＡＬＥヌクレアーゼの反復によって認識される。したがって、特定の実施形態によれば、本発明によるＴＡＬＥヌクレアーゼは、配列番号２３８及び配列番号２３９からなる群から選択される標的配列を認識し、切断する。ＴＡＬＥＮ配列及び遺伝子編集方法はまた、上述のＧａｕｔｒｏｎに記載されている。

【０５７１】

【表４－１】

表４４－ＴＡＬＥＮ　ＰＤ－１配列。

TALEN PD-1 No. 1 配列	
標的ＰＤ－１配列（配列番号２３８）	TTCTCCCCAGCCCTGCT cgtggtgaccgaaggGGACAACGCCACCTTCA
反復ＰＤ－１－左（配列番号２４０）	LTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASH DGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQ RLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASH DGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQ RLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGL TPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASH DGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQ RLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG LTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIAS NNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETV QRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALE
反復ＰＤ－１－右（配列番号２４１）	LTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQAL ETVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQ QVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQ RLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVA IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLP VLCQAHGLTPEQVVAIASNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNN GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQ ALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT PEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALE
ＰＤ－１－左　ＴＡＬＥＮ（配列番号２４４）	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCATACGATGTTCC AGATTACGCTATCGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGC AACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTCGTTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAG GCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCCAACA CCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGT TGCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGC GCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACC GTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGA CCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTC AACTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCA GGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCT TGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGAC CCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGG AGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCG GAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGAC GGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGC AGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTC CAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGT

【表４－２】

	GGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGC GGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTG GCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCT GTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCA TCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTG CCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGC CAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGG TGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGC CACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCT GTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACG ATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGC CAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGG CGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGG CCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGC AAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCA CGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGC AGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGC TTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGC GCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGA CCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCAGGCCGGCGCTG GAGAGCATTGTTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGAC CAACGACCACCTCGTCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGGCGTCCTGCGCTGGATG CAGTGAAAAAGGGATTGGGGGATCCTATCAGCCGTTCCCAGCTGGTGAAGTCC GAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCA CGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCACCCAGGACCGTATCC TGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAG CACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCGACGGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCC CATCGACTACGGCGTGATCGTGGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTACAACC TGCCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACCAGACC AGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGGAAGGTGTACCCCTCCAGCGT GACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCGTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGG CCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCGCCGTGCTGTCC GTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGCACCCTGACCCT GGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGGCCGACT GATAA
PD－１－右　TALEN （配列番号２４５）	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGAGACCGCCGCTGC CAAGTTCGAGAGACAGCACATGGACAGCATCGATATCGCCGATCTACGCACGC TCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTCGTTCGACA GTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCGCACAT CGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATC AGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTC GGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGG AGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTG CAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCA CTGACGGGTGCCCCGCTCAACTTGACCCCCCAGCAAGTCGTCGCAATCGCCAG CAATAACGGAGGGAAGCAAGCCCTCGAAACCGTGCAGCGGTTGCTTCCTGTGC TCTGCCAGGCCCACGGCGTTACCCCTGAGCAGGTGGTGGCCATCGCAAGTAAC ATTGGAGGAAAGCAAGCCTTGGAGACAGTGCAGGCCCTGTTGCCCGTGCTGTG CCAGGCACACGGCCTCACACCAGAGCAGGTCGTGGCCATTGCCTCCAACATCG GGGGGAAACAGGCTCTGGAGACCGTCCAGGCCCTGCTGCCCGTCCTCTGTCAA GCTCACGGCCTGACTCCCCAACAAGTGGTCGCCATCGCCTCTAATAACGGCGG GAAGCAGGCACTGGAAACAGTGCAGAGACTGCTCCCTGTGCTTTGCCAAGCTC ATGGGTTGACCCCCCAACAGGTCGTCGCTATTGCCTCAAACAACGGGGGCAAG CAGGCCCTTGAGACTGTGCAGAGGCTGTTGCCAGTGCTGTGTCAGGCTCACGG GCTCACTCCACAACAGGTGGTCGCAATTGCCAGCAACGGCGGCGGAAAGCAAG CTCTTGAAACCGTGCAACGCCTCCTGCCCGTGCTCTGTCAGGCTCATGGCCTG ACACCACAACAAGTCGTGGCCATCGCCAGTAATAATGGCGGGAAACAGGCTCT TGAGACCGTCCAGAGGCTGCTCCCAGTGCTCTGCCAGGCACACGGGCTGACCC CCCAGCAGGTGGTGGCTATCGCCAGCAATAATGGGGGCAAGCAGGCCCTGGAA

10　20　30　40　50

【表４－３】

	ACAGTCCAGCGCCTGCTGCCAGTGCTTTGCCAGGCTCACGGGCTCACTCCCGA ACAGGTCGTGGCAATCGCCTCCAACGGAGGGAAGCAGGCTCTGGAGACCGTGC AGAGACTGCTGCCCGTCTTGTGCCAGGCCCACGGACTCACACCTCAGCAGGTC GTCGCCATTGCCTCTAACAACGGGGGCAAACAAGCCCTGGAGACAGTGCAGCG GCTGTTGCCTGTGTTGTGCCAAGCCCACGGCTTGACTCCTCAACAAGTGGTCG CCATCGCCTCAAATGGCGGCGGAAAACAAGCTCTGGAGACAGTGCAGAGGTTG CTGCCCGTCCTCTGCCAAGCCCACGGCCTGACTCCCCAACAGGTCGTCGCCAT TGCCAGCAACGGCGGAGGAAAGCAGGCTCTCGAAACTGTGCAGCGGCTGCTTC CTGTGCTGTGTCAGGCTCATGGGCTGACCCCCCAGCAAGTGGTGGCTATTGCC TCTAACAATGGAGGCAAGCAAGCCCTTGAGACAGTCCAGAGGCTGTTGCCAGT GCTGTGCCAGGCCCACGGGCTCACACCCCAGCAGGTGGTCGCCATCGCCAGTA ACGGCGGGGGCAAACAGGCATTGGAAACCGTCCAGCGCCTGCTTCCAGTGCTC TGCCAGGCACACGGACTGACACCCGAACAGGTGGTGGCCATTGCATCCCATGA TGGGGGCAAGCAGGCCCTGGAGACCGTGCAGAGACTCCTGCCAGTGTTGTGCC AAGCTCACGGCCTCACCCCTCAGCAAGTCGTGGCCATCGCCTCAAACGGGGGG GGCCGGCCTGCACTGGAGAGCATTGTTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGC GTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGGC GTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGGGGGATCCTATCAGCCGTTCC CAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCT GAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCA CCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTAC GGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCGACGGCGCCATCTA CACCGTGGGCTCCCCCATCGACTACGGCGTGATCGTGGACACCAAGGCCTACT CCGGCGGCTACAACCTGCCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGTG GAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGGAAGGT GTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCGTGTCCGGCCACTTCA AGGGCAACTACAAGGCCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAAC GGCGCCGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGC CGGCACCCTGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCA ACTTCGCGGCCGACTGATAA
TALEN PD-1 No. 2 配列	
標的ＰＤ－１配列 （配列番号２３９	TACCTCTGTGGGGCCATctccctggcccccaaGGCGCAGATCAAAGAGA
反復ＰＤ－１－左 （配列番号２４２）	LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQAL ETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQ QVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQ RLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVA IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLP VLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASN NGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQ AHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGK QALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL TPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALE
反復ＰＤ－１－右 （配列番号２４３）	LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQAL ETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQ QVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQ RLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVA IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLP VLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASH DGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQ AHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGKQ ALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT PEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALE

【表４－４】

ＰＤ－１－左　ＴＡＬＥＮ（配列番号２４６）	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCATACGATGTTCC AGATTACGCTATCGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGC AACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTCGTTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAG GCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCCAACA CCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGT TGCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGC GCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACC GTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGA CCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTC AACTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCA GGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCT TGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGAC CCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGG AGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCC CAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGAC GGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGC AGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTC CAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGT GGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGC GGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTG GCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCT GTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCA TCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTG CCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGC CAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGG TGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGC AATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCT GTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATA ATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGC CAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGG TGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGG CCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGC AAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCA CGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGC AGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGC TTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGC GCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGA CCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCAGGCCGGCGCTG GAGAGCATTGTTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGAC CAACGACCACCTCGTCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGGCGTCCTGCGCTGGATG CAGTGAAAAAGGGATTGGGGGATCCTATCAGCCGTTCCCAGCTGGTGAAGTCC GAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCA CGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCACCCAGGACCGTATCC TGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAG CACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCGACGGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCC CATCGACTACGGCGTGATCGTGGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTACAACC TGCCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACCAGACC AGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGGAAGGTGTACCCCTCCAGCGT GACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCGTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGG CCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCGCCGTGCTGTCC GTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGCACCCTGACCCT GGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGGCCGACT GATAA
ＰＤ－１－右　ＴＡＬＥＮ（配列番号２４７）	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGAGACCGCCGCTGC CAAGTTCGAGAGACAGCACATGGACAGCATCGATATCGCCGATCTACGCACGC TCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTCGTTCGACA GTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCGCACAT CGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATC AGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTC

【表４－５】

	GGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGG AGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTG CAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCA CTGACGGGTGCCCCGCTCAACTTGACCCCCGAGCAAGTCGTCGCAATCGCCAG CCATGATGGAGGGAAGCAAGCCCTCGAAACCGTGCAGCGGTTGCTTCCTGTGC TCTGCCAGGCCCACGGCCTTACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATCGCAAGTAAC GGAGGAGGAAAGCAAGCCTTGGAGACAGTGCAGCGCCTGTTGCCCGTGCTGTG CCAGGCACACGGCCTCACACCAGAGCAGGTCGTGGCCATTGCCTCCCATGACG GGGGGAAACAGGCTCTGGAGACCGTCCAGAGGCTGCTGCCCGTCCTCTGTCAA GCTCACGGCCTGACTCCCCAACAAGTGGTCGCCATCGCCTCTAATGGCGGCGG GAAGCAGGCACTGGAAACAGTGCAGAGACTGCTCCCTGTGCTTTGCCAAGCTC ATGGGTTGACCCCCCAACAGGTCGTCGCTATTGCCTCAAACGGGGGGGGCAAG CAGGCCCTTGAGACTGTGCAGAGGCTGTTGCCAGTGCTGTGTCAGGCTCACGG GCTCACTCCACAACAGGTGGTCGCAATTGCCAGCAACGGCGGCGGAAAGCAAG CTCTTGAAACCGTGCAACGCCTCCTGCCCGTGCTCTGTCAGGCTCATGGCCTG ACACCACAACAAGTCGTGGCCATCGCCAGTAATAATGGCGGGAAACAGGCTCT TGAGACCGTCCAGAGGCTGCTCCCAGTGCTCTGCCAGGCACACGGGCTGACCC CCGAGCAGGTGGTGGCTATCGCCAGCAATATTGGGGGCAAGCAGGCCCTGGAA ACAGTCCAGGCCCTGCTGCCAGTGCTTTGCCAGGCTCACGGGCTCACTCCCCA GCAGGTCGTGGCAATCGCCTCCAACGGCGGAGGGAAGCAGGCTCTGGAGACCG TGCAGAGACTGCTGCCCGTCTTGTGCCAGGCCCACGGACTCACACCTGAACAG GTCGTCGCCATTGCCTCTCACGATGGGGGCAAACAAGCCCTGGAGACAGTGCA GCGGCTGTTGCCTGTGTTGTGCCAAGCCCACGGCTTGACTCCTCAACAAGTGG TCGCCATCGCCTCAAATGGCGGCGGAAAACAAGCTCTGGAGACAGTGCAGAGG TTGCTGCCCGTCCTCTGCCAAGCCCACGGCCTGACTCCCCAACAGGTCGTCGC CATTGCCAGCAACAACGGAGGAAAGCAGGCTCTCGAAACTGTGCAGCGGCTGC TTCCTGTGCTGTGTCAGGCTCATGGGCTGACCCCCGAGCAAGTGGTGGCTATT GCCTCTAATGGAGGCAAGCAAGCCCTTGAGACAGTCCAGAGGCTGTTGCCAGT GCTGTGCCAGGCCCACGGGCTCACACCCCAGCAGGTGGTCGCCATCGCCAGTA ACAACGGGGGCAAACAGGCATTGGAAACCGTCCAGCGCCTGCTTCCAGTGCTC TGCCAGGCACACGGACTGACACCCGAACAGGTGGTGGCCATTGCATCCCATGA TGGGGGCAAGCAGGCCCTGGAGACCGTGCAGAGACTCCTGCCAGTGTTGTGCC AAGCTCACGGCCTCACCCCTCAGCAAGTCGTGGCCATCGCCTCAAACGGGGGG GGCCGGCCTGCACTGGAGAGCATTGTTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGC GTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGGC GTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGGGGGATCCTATCAGCCGTTCC CAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCT GAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCA CCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTAC GGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCGACGGCGCCATCTA CACCGTGGGCTCCCCCATCGACTACGGCGTGATCGTGGACACCAAGGCCTACT CCGGCGGCTACAACCTGCCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGTG GAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGGAAGGT GTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCGTGTCCGGCCACTTCA AGGGCAACTACAAGGCCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAAC GGCGCCGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGC CGGCACCCTGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCA ACTTCGCGGCCGACTGATAA

【０５７２】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集するステップであって、遺伝子編集が、サイトポレーション培地中のＣＤ３９及びＣＤ６９を標的とする転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼのエレクトロポレーションを使用して、第２のＴＩＬ集団を取得することを含み、遺伝子編集が、第２のＴＩＬ集団の細胞の一部においてＣＤ３９及びＣＤ６９の発現を減少させる、遺伝子編集するステップと、

（ｂ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートするステップと、

（ｃ）ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約６～９日間行われて、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約９～１１日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｅ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、

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

（ｇ）任意選択で、ステップ（ａ）～（ｆ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われるステップと、をさらに含む。

いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－２１からなる群から選択される。

【０５７３】

ＴＡＬＥ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の他の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）、及び／またはＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１が含まれる。

【０５７４】

ＴＡＬＥ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得る系、方法、及び組成物の例は、米国特許第８，５８６，５２６号に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。これらの開示される例は、反復ＲＶＤを含有する２つ以上のＴＡＬＥ反復単位を有する天然に存在しないＤＮＡ結合ポリペプチド、ＴＡＬＥタンパク質の残基からなるＮ－キャップポリペプチド、及びＴＡＬＥタンパク質の全長Ｃ末端領域の断片からなるＣ－キャップポリペプチドの使用を含む。

【０５７５】

ＴＡＬＥＮ介在性遺伝子組み込み及び不活性化を効率的に行うために使用することができ、本発明の実施形態に従って使用することができるＴＡＬＥＮ設計及び設計戦略、活性評価、スクリーニング戦略、ならびに方法の例は、Ｖａｌｔｏｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ，２０１４，６９，１５１－１７０（これは参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０５７６】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＦＮ－γ及びＰＤ－１（及び任意選択でＣＤ４０Ｌ及び／または抗ＣＴＬＡ－４）による拡張前刺激を行うことと、

（ｄ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｈ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｉ）ステップ（ｈ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｈ）からステップ（ｉ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｊ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｉ）から（ｊ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｋ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップが、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現を減少させるＴＡＬＥヌクレアーゼ系の送達を含む。

【０５７７】

ｃ．ジンクフィンガー法

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、もしくはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、この方法は、ジンクフィンガーまたはジンクフィンガーヌクレアーゼ法によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、細胞表面での少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは減少させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、細胞表面での少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。

【０５７８】

個々のジンクフィンガーは、保存されたββα立体配置でおよそ３０個のアミノ酸を含む。αらせんの表面上のいくつかのアミノ酸は、典型的には、異なる選択性レベルでＤＮＡの主溝の３ｂｐと接触する。ジンクフィンガーは、２つのタンパク質ドメインを有する。第１のドメインは、ＤＮＡ結合ドメインであり、真核生物転写因子を含み、ジンクフィンガーを含む。第２のドメインは、ヌクレアーゼドメインであり、ＦｏｋＩ制限酵素を含み、ＤＮＡの触媒的切断を担っている。

【０５７９】

個々のＺＦＮのＤＮＡ結合ドメインは、典型的には、３～６個の個々のジンクフィンガー反復配列を含み、各々９～１８塩基対を認識することができる。ジンクフィンガードメインが目的の標的部位に特異的である場合、合計１８塩基対を認識する３フィンガーＺＦＮの対でさえ、理論的には、哺乳動物ゲノムの単一遺伝子座を標的とすることができる。新たなジンクフィンガーアレイを生成するための１つの方法は、既知の特異性を有するより小さいジンクフィンガー「モジュール」を組み合わせることである。最も一般的なモジュラーアセンブリプロセスは、各々３塩基対のＤＮＡ配列を認識することができる３つの別個のジンクフィンガーを組み合わせて、９塩基対の標的部位を認識することができる３フィンガーアレイを生成することを含む。代替的に、オリゴマー化プールエンジニアリング（ＯＰＥＮ）などの選択ベースのアプローチを使用して、隣接するフィンガー間のコンテキスト依存的相互作用を考慮したランダム化ライブラリーから新たなジンクフィンガー

アレイを選択することができる。設計されたジンクフィンガーは市販されており、Ｓａｎｇａｍｏ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｒｉｃｈｍｏｎｄ，ＣＡ，ＵＳＡ）は、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＵＳＡ）と協同して、ジンクフィンガー構築のための独自のプラットフォーム（ＣｏｍｐｏＺｒ（登録商標））を開発した。

【０５８０】

ジンクフィンガー法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンシングまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、及びＧＵＣＹ１Ｂ３が含まれる。

【０５８１】

ジンクフィンガー法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）、及び／またはＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１が含まれる。

【０５８２】

ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得る系、方法、及び組成物の例は、米国特許第６，５３４，２６１号、同第６，６０７，８８２号、同第６，７４６，８３８号、同第６，７９４，１３６号、同第６，８２４，９７８号、同第６，８６６，９９７号、同第６，９３３，１１３号、同第６，９７９，５３９号、同第７，０１３，２１９号、同第７，０３０，２１５号、同第７，２２０，７１９号、同第７，２４１，５７３号、同第７，２４１，５７４号、同第７，５８５，８４９号、同第７，５９５，３７６号、同第６，９０３，１８５号、及び同第６，４７９，６２６号に記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。

【０５８３】

ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得る系、方法、及び組成物の他の例は、Ｂｅａｎｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１５，２３　１３８０－１３９０に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０５８４】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

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

（ｄ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｈ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｉ）ステップ（ｈ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｈ）からステップ（ｉ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｊ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｉ）から（ｊ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｋ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップが、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現を減少させるジンクフィンガーヌクレアーゼ系の送達を含む。
【０５８５】
いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）（ａ）における第１のＴＩＬ集団からＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}及び／またはＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性ＴＩＬを選択して、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性濃縮ＴＩＬ集団を取得することと、
（ｄ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｈ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｉ）ステップ（ｈ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｈ）からステップ（ｉ）への移行が、任意選択

で、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｊ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｉ）から（ｊ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｋ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップが、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現を低減するジンクフィンガーヌクレアーゼ系の送達を含む。
【０５８６】
Ｄ．免疫チェックポイント
本発明の特定の実施形態によれば、ＴＩＬ集団は、ＴＩＬ集団におけるＴＩＬ細胞の細胞表面で１つ以上の免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ集団における１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子を遺伝子修飾するように遺伝子編集される。別の言い方をすると、細胞表面で１つ以上の免疫調節組成物を発現させるようにＴＩＬ集団を改変することに加えて、ＴＩＬの１つ以上の免疫チェックポイントをコードするＴＩＬ内のＤＮＡ配列が、ＴＩＬのゲノム内で永続的に修飾される、例えば、挿入される、欠失される、もしくは置換される。免疫チェックポイントは、阻害経路または刺激経路を介して免疫応答を調節するリンパ球によって発現される分子である。がんの場合、免疫チェックポイント経路は、しばしば活性化されて抗腫瘍応答を阻害する、すなわち、悪性細胞によるある特定の免疫チェックポイントの発現は、抗腫瘍免疫を阻害し、がん細胞の成長を促進する。例えば、Ｍａｒｉｎ－Ａｃｅｖｅｄｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ＆Ｏｎｃｏｌｏｇｙ（２０１８）１１：３９を参照されたい。したがって、ある特定の阻害チェックポイント分子は、本発明の免疫療法の標的として機能する。特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、ある特定の免疫チェックポイント経路を遮断または刺激し、それによって腫瘍に対する体の免疫学的活性を増強するように遺伝子編集される。
【０５８７】
本明細書で使用される場合、免疫チェックポイント遺伝子は、免疫チェックポイント分子をコードするＤＮＡ配列を含む。本発明の特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張法中の遺伝子編集ＴＩＬは、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは減少させる。例えば、遺伝子編集は、免疫反応を増強するために、ＰＤ－１またはＣＴＬＡ－４などの阻害性受容体の発現をサイレンスまたは減少させ得る。
【０５８８】
最も広く研究されているチェックポイントには、プログラムされた細胞死受容体－１（ＰＤ－１）及び細胞傷害性Ｔリンパ球関連分子－４（ＣＴＬＡ－４）が含まれ、これらは、それらが阻害リガンドと相互作用するときに、主要なエフェクター機能（例えば、活性化、増殖、サイトカイン放出、細胞傷害性など）を阻害する免疫細胞上の阻害性受容体である。以下でさらに詳細に論じられるように、ＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４に加えて、多数のチェックポイント分子が免疫療法の潜在的な標的として浮上している。
【０５８９】
本発明のＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンシングまたは阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、Ｇ

ＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、及びＧＵＣＹ１Ｂ３が含まれる。例えば、本発明のＴＩＬにおいてサイレンシングまたは阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、及びＰＫＡを含む群から選択されてもよい。ＢＡＦＦ（ＢＲ３）は、Ｂｌｏｏｍ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２０１８，ｉｎ　ｐｒｅｓｓに記載されている。別の実施例によれば、本発明のＴＩＬにおいてサイレンシングまたは阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせを含む群から選択されてもよい。

【０５９０】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

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

（ｄ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｈ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われ、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｉ）ステップ（ｈ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｈ）からステップ（ｉ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、

（ｊ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｉ）から（ｊ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｋ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップは、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）系、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）系、またはジンクフィンガー系からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系は、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現を減少させる。

【０５９１】

１．ＰＤ－１

チェックポイント遮断の誘導のために最も研究されている標的のうちの１つは、Ｔ細胞調節因子のＣＤ２８スーパーファミリーのメンバーであるプログラム死受容体（ＰＤ１ま

たはＰＤ－１、ＰＤＣＤ１としても知られている）である。そのリガンドであるＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２は、メラノーマを含む様々な腫瘍細胞上で発現する。ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１との相互作用は、Ｔ細胞エフェクター機能を阻害し、慢性刺激の設定においてＴ細胞疲弊をもたらし、腫瘍微小環境においてＴ細胞アポトーシスを誘導する。ＰＤ－１はまた、免疫監視からの腫瘍特異的エスケープにおいても役割を果たし得る。

【０５９２】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＤ－１の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＰＤ－１の発現をサイレンシングまたは抑制することによって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＰＤ－１などの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ－１の発現をサイレンシングまたは減少させることができる。

【０５９３】

２．ＣＴＬＡ－４

ＣＴＬＡ－４発現は、活性化Ｔ細胞上でのＴ細胞活性化時に誘導され、抗原提示細胞活性化抗原ＣＤ８０及びＣＤ８６との結合について競合する。ＣＴＬＡ－４とＣＤ８０またはＣＤ８６との相互作用は、Ｔ細胞阻害を引き起こし、免疫応答のバランスを維持するのに役立つ。しかしながら、ＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４相互作用の阻害は、Ｔ細胞の活性化を延長し、したがって、がん抗原に対する免疫応答のレベルを増加させ得る。

【０５９４】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＣＴＬＡ－４の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＣＴＬＡ－４の発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＣＴＬＡ－４などの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＣＴＬＡ－４の発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１からなる群から選択される。

【０５９５】

３．ＬＡＧ－３

リンパ球活性化遺伝子－３（ＬＡＧ－３、ＣＤ２２３）は、主要組織適合複合体（ＭＨＣ）クラスＩＩのライゲーション後に、Ｔ細胞及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞によって発現される。その機序は不明なままであるが、その調節は、Ｔ細胞機能に対して負の調節効果を引き起こし、組織損傷及び自己免疫を防止する。ＬＡＧ－３及びＰＤ－１は、ＴＩＬ上でしばしば共発現及び上方制御され、免疫疲弊及び腫瘍成長につながる。したがって、ＬＡＧ－３遮断は、抗腫瘍応答を改善する。例えば、Ｍａｒｉｎ－Ａｃｅｖｅｄｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ＆Ｏｎｃｏｌｏｇｙ（２０１８）１１：３９を参照されたい。

【０５９６】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＬＡＧ－３の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＬＡＧ－３の発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＬＡＧ－３などの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。特定の実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬにおけるＬＡＧ－３の発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１からなる群から選択される。

【０５９７】

４．ＴＩＭ－３

Ｔ細胞免疫グロブリン－３（ＴＩＭ－３）は、Ｔ細胞の直接的な負の調節因子であり、ＮＫ細胞及びマクロファージ上で発現する。ＴＩＭ－３は、骨髄由来サプレッサー細胞（ＭＤＳＣ）の増殖を誘導することにより、間接的に免疫抑制を促進する。そのレベルは、機能不全及び疲弊したＴ細胞で特に上昇することが見出されており、悪性腫瘍における重要な役割を示唆している。

【０５９８】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＴＩＭ－３の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＴＩＭ－３の発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＭ－３などの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＴＩＭ－３の発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１からなる群から選択される。

【０５９９】

５．Ｃｉｓｈ

サイトカインシグナル伝達（ＳＯＣＳ）ファミリーのサプレッサーのメンバーであるＣｉｓｈは、ＣＤ８＋Ｔ細胞におけるＴＣＲ刺激によって誘導され、腫瘍に対するそれらの機能的不活性を阻害する。ＣＤ８＋Ｔ細胞におけるＣｉｓｈの遺伝的欠失は、それらの拡大、機能的親和性、及びサイトカイン多機能性を増強し得、確立された腫瘍の顕著で持続的な退縮をもたらす。例えば、Ｐａｌｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２１２（１２）：２０９５（２０１５）を参照されたい。

【０６００】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＣｉｓｈの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実

行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＣｉｓｈの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、Ｃｉｓｈなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＣｉｓｈの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１からなる群から選択される。

【０６０１】

６．ＴＧＦβ

ＴＧＦβシグナル伝達経路は、細胞増殖、分化、アポトーシス、運動性及び侵入、細胞外マトリックス産生、血管新生、ならびに免疫応答を調節することにおいて複数の機能を有する。ＴＧＦβシグナル伝達の調節解除は、腫瘍において頻繁に行われ、腫瘍の開始、発達及び転移において重要な役割を有する。微小環境レベルでは、ＴＧＦβ経路は、発がん全体にわたる腫瘍成長及び転移のための好ましい微小環境を生成することに寄与する。例えば、Ｎｅｕｚｉｌｌｅｔ ｅｔ ａｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ＆Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｖｏｌ．１４７，ｐｐ．２２－３１（２０１５）を参照されたい。

【０６０２】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＴＧＦβの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＴＧＦβの発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＧＦβなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＴＧＦβの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１からなる群から選択される。

【０６０３】

いくつかの実施形態では、ＴＧＦβＲ２（ＴＧＦベータ受容体２）は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９系を使用してＴＧＦβＲ２をサイレンシングすることによって、または当該技術分野で知られている方法を使用してＴＧＦβＲ２優性陰性細胞外トラップを使用することによって抑制され得る。

【０６０４】

７．ＰＫＡ

タンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）は、セリン－トレオニンタンパク質キナーゼスーパーファミリーの周知のメンバーである。ｃＡＭＰ依存性タンパク質キナーゼとしても知られるＰＫＡは、ｃＡＭＰ結合時の活性化を介してＧタンパク質結合受容体のシグナル伝達を媒介するマルチユニットプロテインキナーゼである。それは、代謝からイオンチャネル活性化、細胞成長及び分化、遺伝子発現及びアポトーシスまでの多種多様な細胞プロセスの制御に関与する。重要なことに、ＰＫＡは、多くの腫瘍の開始及び進行に関与している。例えば、Ｓａｐｉｏ ｅｔ ａｌ．，ＥＸＣＬＩ Ｊｏｕｒｎａｌ；２０１４；１３：８４３－８５５を参照されたい。

【０６０５】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＫＡの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＰＫＡの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＰＫＡなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＰＫＡの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１からなる群から選択される。

【０６０６】

８．ＣＢＬＢ

ＣＢＬＢ（またはＣＢＬ－Ｂ）は、Ｅ３ユビキチン－タンパク質リガーゼであり、Ｔ細胞活性化の負の制御因子である。Ｂａｃｈｍａｉｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２０００，４０３，２１１－２１６、Ｗａｌｌｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２，６９２６３９。

【０６０７】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＣＢＬＢの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＣＢＬＢの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＣＢＬＢなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＰＫＡの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＣＢＬＢは、ＴＡＬＥＮノックアウトを使用してサイレンシングされる。いくつかの実施形態では、ＣＢＬＢは、ＴＡＬＥ－ＫＲＡＢ転写阻害剤ノックインを使用してサイレンシングされる。これらの方法のさらなる詳細は、Ｂｏｅｔｔｃｈｅｒ ａｎｄ ＭｃＭａｎｕｓ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｒｅｖｉｅｗ，２０１５，５８，５７５－５８５に見出すことができる。

【０６０８】

９．ＴＩＧＩＴ

Ｉｇ及びＩＴＩＭ（免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ）ドメインまたはＴＩＧＩＴを有するＴ細胞免疫受容体は、Ｉｇ様Ｖ型ドメインを有し、その細胞質ドメイン内にＩＴＩＭを有する膜貫通糖タンパク質受容体である。Ｋｈａｌｉｌ，ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１５，１２８，１－６８、Ｙｕ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２００９，Ｖｏｌ．１０，Ｎｏ．１，４８－５７。ＴＩＧＩＴは、いくつかのＴ細胞及びナチュラルキラー細胞によって発現される。追加として、ＴＩＧＩＴは、特にメラノーマを有する個体から、抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞及びＣＤ８＋ＴＩＬ上で過剰発現することが示されている。研究では、ＴＩＧＩＴ経路が腫瘍免疫回避に寄与し、ＴＩＧＩＴ阻害がポリクローナル及び抗原特異的刺激に応答して、Ｔ細胞の活性化及び増殖を増加させることが示されている。Ｋｈａ

ｌｉｌ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｄｖａｎｃｅｓ　ｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１５，１２８，１－６８．さらに、ＰＤ－１またはＴＩＭ３のいずれかとのＴＩＧＩＴの共遮断は、マウスモデルにおいて固形腫瘍に対する相乗効果を示している。Ｉｄ．；Ｋｕｒｔｕｌｕｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｔｈｅ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ，２０１５，Ｖｏｌ．１２５，Ｎｏ．１１，４０５３－４０６２も参照されたい。

【０６０９】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＴＩＧＩＴの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＴＩＧＩＴの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＧＩＴなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＴＩＧＩＴの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１からなる群から選択される。

【０６１０】

１０．ＴＯＸ

胸腺細胞選択関連高移動度群（ＨＭＧ）ボックス（ＴＯＸ）は、ＨＭＧボックスＤＮＡ結合ドメインを含有する転写因子である。ＴＯＸは、配列非依存であるが構造依存的な方法でＤＮＡに結合すると考えられるＨＭＧボックススーパーファミリーのメンバーである。

【０６１１】

ＴＯＸは、腫瘍特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞機能障害またはＴ細胞枯渇の重要な調節因子として同定され、例えば、Ｓｃｏｔｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２０１９，５７１，２７０－２７４及びＫｈａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２０１９，５７１，２１１－２１８（これらの両方は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞疲弊を転写的かつ後成的にプログラムすることが見出された。ＴＯＸはまた、Ａｌｆｅｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２０１９，５７１，２６５－２６９（これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように、慢性感染中のＴ細胞機能不全の進行及び疲弊したＴ細胞の維持に対する重要な因子であることが見出された。ＴＯＸは、腫瘍及び慢性ウイルス感染からの機能不全または疲弊したＴ細胞において高度に発現される。インビトロでのエフェクターＴ細胞におけるＴＯＸの異所発現は、Ｔ細胞疲弊に関連する転写プログラムを誘導したが、Ｔ細胞におけるＴＯＸの欠失は、Ｔ疲弊プログラムを廃止した。

【０６１２】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＴＯＸの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＯＸの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＯＸなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、

またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＴＯＸの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１からなる群から選択される。

【０６１３】

Ｅ．共刺激受容体または接着分子の過剰発現

追加の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張法中の遺伝子編集ＴＩＬは、細胞表面における少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、１つ以上の共刺激受容体、接着分子及び／またはサイトカインの発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。例えば、遺伝子編集は、共刺激受容体、接着分子またはサイトカインの発現を増強させ得、これは、遺伝子修飾されていない共刺激受容体、接着分子またはサイトカインの発現と比較して、それが過剰発現されることを意味する。本発明のＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強された発現を示し得る共刺激性受容体、接着分子またはサイトカイン遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）、及び／またはＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１などのある特定のケモカイン受容体及びインターロイキンが含まれる。

【０６１４】

１．ＣＣＲ

養子Ｔ細胞免疫療法が有効であるためには、Ｔ細胞をケモカインによって腫瘍内に適切に輸送する必要がある。腫瘍細胞によって分泌されるケモカイン、末梢に存在するケモカイン、及びＴ細胞によって発現されるケモカイン受容体との間の一致は、Ｔ細胞の腫瘍床への輸送を成功させるために重要である。

【０６１５】

特定の実施形態によれば、本発明の遺伝子編集方法を使用して、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３及びＣＸ３ＣＲ１のうちの１つ以上などのＴＩＬにおけるある特定のケモカイン受容体の発現を増加させてもよい。ＣＣＲの過剰発現は、エフェクター機能及び養子移植後のＴＩＬの増殖を促進するのに役立ち得る。

【０６１６】

特定の実施形態によれば、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３及びＣＸ３ＣＲ１のうちの１つ以上のＴＩＬにおける発現は、本発明の組成物及び方法に従って増強される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧｅｎ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬ中のＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３及びＣＸ３ＣＲ１のうちの１つ以上の細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、発現を増強することを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－２１からなる群から選択される。

【０６１７】

以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ケモカイン受容体遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬにおけるある特定のケモカイン受容体の発現を増強することができる。

【０６１８】

いくつかの実施形態では、ＣＣＲ４及び／またはＣＣＲ５接着分子は、本明細書に記載のガンマ－レトロウイルスまたはレンチウイルス法を使用して、ＴＩＬ集団に挿入される。ある実施形態では、ＣＸＣＲ２接着分子は、Ｆｏｒｇｅｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｆｒｏｎｔ

ｉｅｒｓ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２０１７，８，９０８またはＰｅｎｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１０，１６，５４５８（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるようなガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法を使用して、ＴＩＬ集団に挿入される。

【０６１９】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

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

（ｄ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が少なくとも５０倍多く、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｈ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われ、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｉ）ステップ（ｈ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｈ）からステップ（ｉ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、

（ｊ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｉ）から（ｊ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｋ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップが、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）系、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）系、またはジンクフィンガー系からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系が、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現を減少させ、さらに少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞の細胞表面でＣＸＣＲ２接着分子を発現させるか、またはＣＸＣＲ２接着分子が、ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法によって第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団に挿入される。

【０６２０】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者か

ら切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）（ａ）における第１のＴＩＬ集団からＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}及び／またはＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性ＴＩＬを選択して、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性濃縮ＴＩＬ集団を取得することと、
（ｄ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｈ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われ、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｉ）ステップ（ｈ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｈ）からステップ（ｉ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｊ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｉ）から（ｊ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｋ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップが、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）系、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）系、またはジンクフィンガー系からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系が、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現を減少させ、さらに少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞の細胞表面でＣＣＲ４及び／またはＣＣＲ５接着分子を発現させるか、またはＣＸＣＲ２接着分子が、ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法によって第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団に挿入される。
【０６２１】
いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）（ａ）における第１のＴＩＬ集団からＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}及び／またはＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性ＴＩＬを選択して、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性濃縮ＴＩＬ集団を取得することと、
（ｄ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｈ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われ、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｉ）ステップ（ｈ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｈ）からステップ（ｉ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、

（ｊ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｉ）から（ｊ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｋ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップが、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）系、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）系、またはジンクフィンガー系からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系が、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現を減少させ、さらに少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞の細胞表面でＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される接着分子を発現させるか、または接着分子が、ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法によって第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団に挿入される。

【０６２２】

２．インターロイキン

追加の実施形態によれば、本発明の遺伝子編集方法を使用して、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８及びＩＬ－２１のうちの１つ以上などのある特定のインターロイキンの発現を増加させてもよい。ある特定のインターロイキンは、Ｔ細胞のエフェクター機能を増加させ、腫瘍制御を媒介することが実証されている。

【０６２３】

特定の実施形態によれば、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－２１のうちの１つ以上のＴＩＬにおける発現は、本発明の組成物及び方法に従って増強される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧｅｎ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８及びＩＬ－２１のうちの１つ以上の発現を増強することによって遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、インターロイキン遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬにおけるある特定のインターロイキンの発現を増強することができる。

【０６２４】

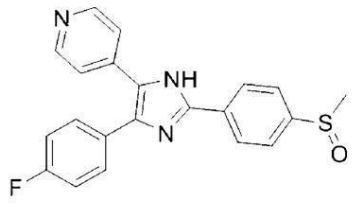
いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）（ａ）における第１のＴＩＬ集団からＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}及び／またはＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性ＴＩＬを選択して、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性濃縮ＴＩＬ集団を取得することと、
（ｄ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを移入させることと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団を、第２のＴＩＬ集団内の複数の細胞内に約１日間静置することと、
（ｈ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われ、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｉ）ステップ（ｈ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｈ）からステップ（ｉ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｊ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｉ）から（ｊ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｋ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップが、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）系、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）系、またはジンクフィンガー系からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系が、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現を減少させ、さらに少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞の細胞表面でＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるインターロイキンを発現させるか、またはインターロイキンが、ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法によって第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団に挿入される。

【０６２５】

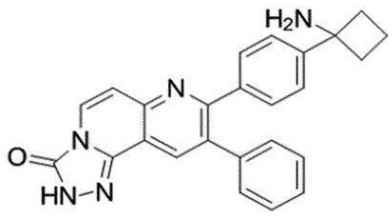
Ｄ．タンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤

いくつかの実施形態によれば、第１の拡張ステップ、第２の拡張ステップ、または第１の拡張ステップ及び第２の拡張ステップの両方は、培養培地中にプロテインキナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤（ＡＫＴｉ）を添加することを含む。いくつかの実施形態によれば、プライミングによる第１の拡張ステップ、急速な第２の拡張ステップ、またはプライミングによる第１の拡張ステップ及び急速な第２の拡張ステップの両方は、培養培地中にプロテイ

ンキナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤（ＡＫＴｉ）を添加することを含む。
【０６２６】
ＡＫＴ阻害剤
ＳＢ－２０３５８０
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＳＢ－２０３５８０である。ＳＢ－２０３５８０は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。４－［４－（４－フルオロフェニル）－２－（４－メチルスルフィニルフェニル）－１Ｈ－イミダゾール－５－イル］ピリジン
【０６２７】
【化１】



【０６２８】
ＭＫ－２２０６
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＭＫ－２２０６である。ＭＫ－２２０６は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。８－［４－（１－アミノシクロブチル）フェニル］－９－フェニル－２Ｈ－［１，２，４］トリアゾロ［３，４－ｆ］［１，６］ナフチリジン－３－オン
【０６２９】
【化２】



【０６３０】
ＳＣ７９
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＳＣ７９である。ＳＣ７９は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。２－アミノ－６－クロロ－４－（１－シアノ－２－エトキシ－２－オキソエチル）－４Ｈ－クロメン－３－カルボン酸エチル
【０６３１】
【化３】

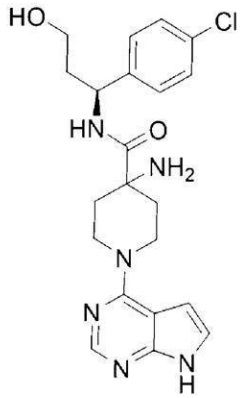


【０６３２】
カピバセルチブ（ＡＺＤ５３６３）
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、カピバセルチブである。カピバセルチブは、以下

のように示される化学構造及び名称を有する。４－アミノ－Ｎ－［（１Ｓ）－１－（４－クロロフェニル）－３－ヒドロキシプロピル］－１－（７Ｈ－ピロロ［２，３－ｄ］ピリミジン－４－イル）ピペリジン－４－カルボキサミド

【０６３３】

【化４】



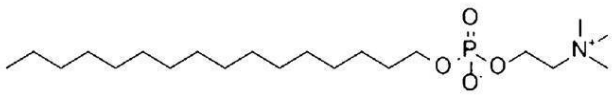
【０６３４】

ミルテフォシン

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ミルテフォシンである。ミルテフォシンは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。２－（トリメチルアザニウムイル）エチルリン酸ヘキサデシル

【０６３５】

【化５】



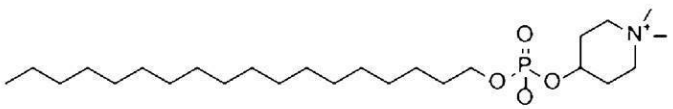
【０６３６】

ペリフォシン

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ペリフォシンである。ペリフォシンは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。（１，１－ジメチルピペリジン－１－イウム－４－イル）オクタデシルホスフェート

【０６３７】

【化６】



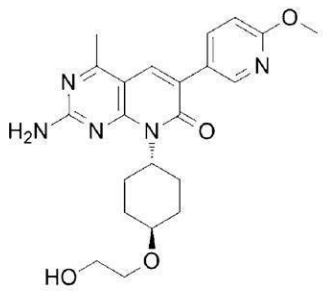
【０６３８】

ＰＦ－０４６９１５０２

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＰＦ－０４６９１５０２である。ＰＦ－０４６９１５０２は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。２－アミノ－８－［４－（２－ヒドロキシエトキシ）シクロヘキシル］－６－（６－メトキシピリジン－３－イル）－４－メチルピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７－オン

【０６３９】

【化７】



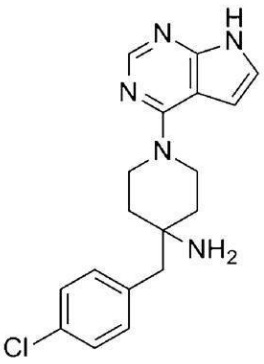
【０６４０】

ＣＣＴ１２８９３０

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＣＣＴ１２８９３０である。ＣＣＴ１２８９３０は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。４－［（４－クロロフェニル）メチル］－１－（７Ｈ－ピロロ［２，３－ｄ］ピリミジン－４－イル）ピペリジン－４－アミン

【０６４１】

【化８】



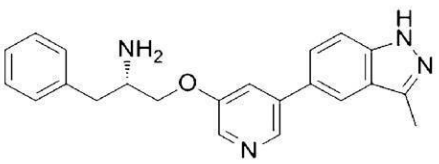
【０６４２】

Ａ－６７４５６３

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、Ａ－６７４５６３である。Ａ－６７４５６３は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。（２Ｓ）－１－［５－（３－メチル－２Ｈ－インダゾール－５－イル）ピリジン－３－イル］オキシ－３－フェニルプロパン－２－アミン

【０６４３】

【化９】

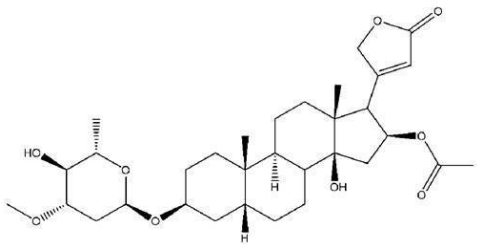


【０６４４】

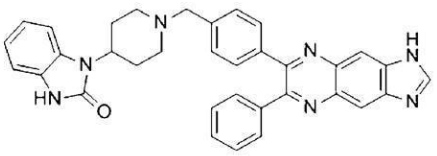
アルケキシン（ＲＸ－０２０１）

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、アルケキシンである。ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、５’　ｇｃｔｇｃａｔｇａｔｃｔｃｃｔｔｇｇｃｇ　３’の配列を有するオリゴデオキシヌクレオチドである。

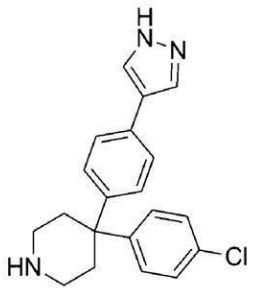
【０６４５】
オレアンドリン（ＰＢＩ－０５２０４）
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、オレアンドリンである。オレアンドリンは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。［（３Ｓ，５Ｒ，８Ｒ，９Ｓ，１０Ｓ，１３Ｒ，１４Ｓ，１６Ｓ，１７Ｒ）－１４－ヒドロキシ－３－［（２Ｒ，４Ｓ，５Ｓ，６Ｓ）－５－ヒドロキシ－４－メトキシ－６－メチルオキサン－２－イル］オキシ－１０，１３－ジメチル－１７－（５－オキソ－２Ｈ－フラン－３－イル）－１，２，３，４，５，６，７，８，９，１１，１２，１５，１６，１７－テトラデカヒドロシクロペンタ［ａ］フェナントレン－１６－イル］アセテート
【０６４６】
【化１０】



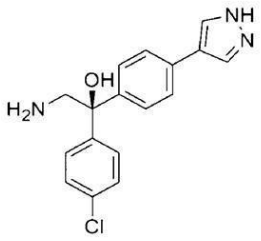
【０６４７】
ＡＫＴ阻害剤ＶＩＩＩ
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＡＫＴ阻害剤ＶＩＩＩである。ＡＫＴ阻害剤ＶＩＩＩは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。３－［１－［［４－（７－フェニル－３Ｈ－イミダゾ［４，５－ｇ］キノキサリン－６－イル）フェニル］メチル］ピペリジン－４－イル］－１Ｈ－ベンズイミダゾール－２－オン
【０６４８】
【化１１】



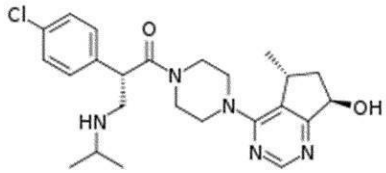
【０６４９】
ＡＴ７８６７
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＡＴ７８６７である。ＡＴ７８６７は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。４－（４－クロロフェニル）－４－［４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル］ピペリジン
【０６５０】
【化１２】



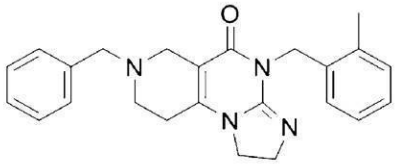
【０６５１】
ＡＴ１３１４８
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＡＴ１３１４８である。ＡＴ１３１４８は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。（１Ｓ）－２－アミノ－１－（４－クロロフェニル）－１－［４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル］エタノール
【０６５２】
【化１３】



【０６５３】
イパタセルチブ（ＧＤＣ－００６８）
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イパタセルチブである。イパタセルチブは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。（Ｓ）－２－（４－クロロフェニル）－１－（４－（（５Ｒ，７Ｒ）－７－ヒドロキシ－５－メチル－６，７－ジヒドロ－５Ｈ－シクロペンタ［ｄ］ピリミジン－４－イル）ピペラジン－１－イル）－３－（イソプロピルアミノ）プロパン－１－オン
【０６５４】
【化１４】

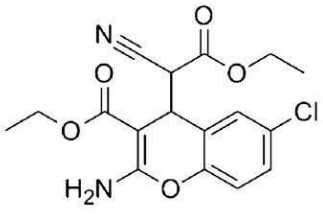


【０６５５】
ＴＩＣ１０
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＴＩＣ１０である。ＴＩＣ１０は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。７－ベンジル－４－（２－メチルベンジル）－１，２，６，７，８，９－ヘキサヒドロイミダゾ［１，２－ａ］ピリド［３，４－ｅ］ピリミジン－５（４Ｈ）－オン
【０６５６】
【化１５】

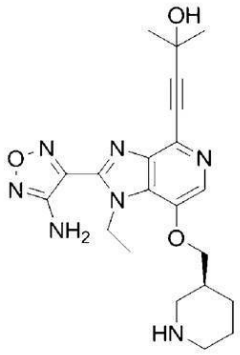


【０６５７】
ＳＣ７９
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＳＣ７９である。ＳＣ７９は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。２－アミノ－６－クロロ－４－（１－シアノ－２－エト

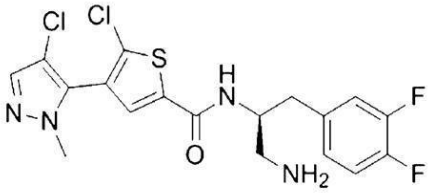
キシ－２－オキソエチル）－４Ｈ－クロメン－３－カルボン酸エチル
【０６５８】
【化１６】



【０６５９】
ＧＳＫ６９０６９３
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＧＳＫ６９０６９３である。ＧＳＫ６９０６９３は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。４－［２－（４－アミノ－１，２，５－オキサジアゾール－３－イル）－１－エチル－７－［［（３Ｓ）－ピペリジン－３－イル］メトキシ］イミダゾ［４，５－ｃ］ピリジン－４－イル］－２－メチルブタ－３－イン－２－オール
【０６６０】
【化１７】



【０６６１】
アフレセルチブ（ＧＳＫ２１１０１８３）
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、アフレセルチブである。アフレセルチブは、次のように示される化学構造及び名前を有する。Ｎ－［（２Ｓ）－１－アミノ－３－（３，４－ジフルオロフェニル）プロパン－２－イル］－５－クロロ－４－（４－クロロ－２－メチルピラゾール－３－イル）チオフェン－２－カルボキサミド
【０６６２】
【化１８】

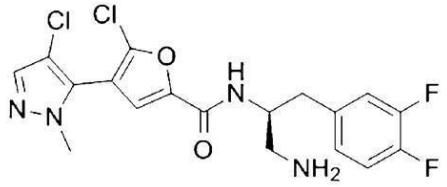


【０６６３】
ウプロセルチブ（ＧＳＫ２１４１７９５）
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ウプロセルチブである。ウプロセルチブは、以下

のように示される化学構造及び名称を有する。Ｎ－［（２Ｓ）－１－アミノ－３－（３，４－ジフルオロフェニル）プロパン－２－イル］－５－クロロ－４－（４－クロロ－２－メチルピラゾール－３－イル）フラン－２－カルボキサミド

【０６６４】

【化１９】



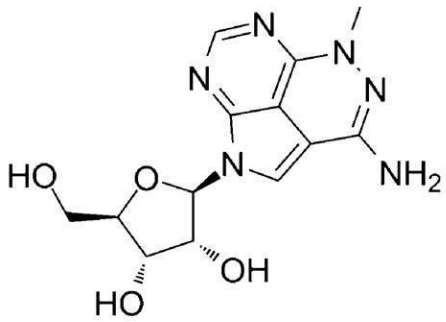
【０６６５】

トリシリビン

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、トリシリビンである。トリシリビンは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。（２Ｒ，３Ｒ，４Ｓ，５Ｒ）－２－（５－アミノ－７－メチル－２，６，７，９，１１－ペンタザトリシクロ［６．３．１．０４，１２］ドデカ－１（１２），３，５，８，１０－ペンタエン－２－イル）－５－（ヒドロキシメチル）オキソラン－３，４－ジオール

【０６６６】

【化２０】



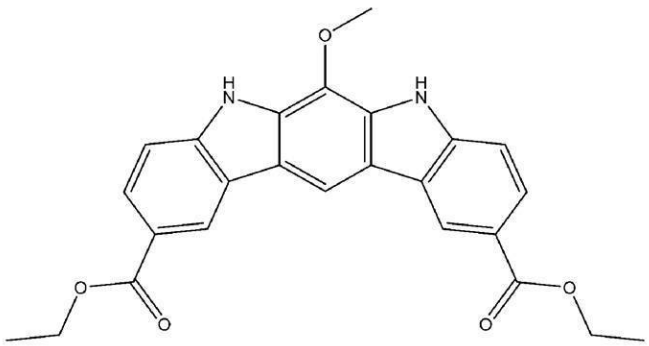
【０６６７】

ＳＲ１３６６８

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＳＲ１３６６８である。ＳＲ１３６６８は、次のように示される化学構造及び名称を有する。６－メトキシ－５，７－ジヒドロインドロ［２，３－ｂ］カルバゾール－２，１０－ジカルボン酸ジエチル

【０６６８】

【化２１】



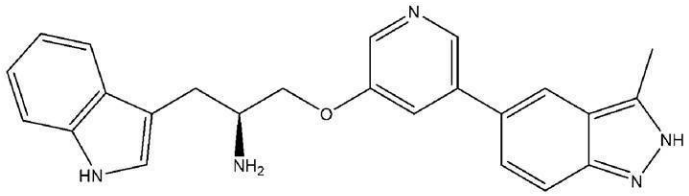
【０６６９】

Ａ－４４３６５４

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、Ａ－４４３６５４である。Ａ－４４３６５４は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。（２Ｓ）－１－（１Ｈ－インドール－３－イル）－３－［５－（３－メチル－２Ｈ－インダゾール－５－イル）ピリジン－３－イル］オキシプロパン－２－アミン

【０６７０】

【化２２】



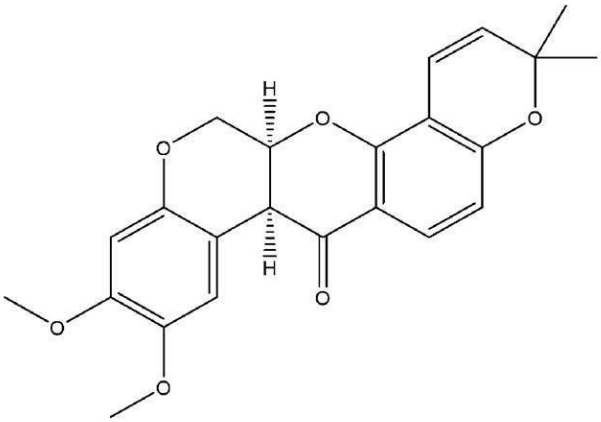
【０６７１】

デグエリン

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、デグエリンである。デグエリンは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。（１Ｓ，１４Ｓ）－１７，１８－ジメトキシ－７，７－ジメチル－２，８，２１－トリオキサペンタシクロ［１２．８．０．$0^{3,12}$．$0^{4,9}$．$0^{15,20}$］ドコサ－３（１２），４（９），５，１０，１５，１７，１９－ヘプタエン－１３－オン

【０６７２】

【化２３】



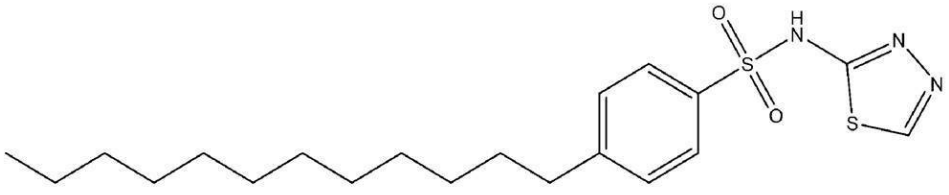
【０６７３】

ＰＨＴ－４２７

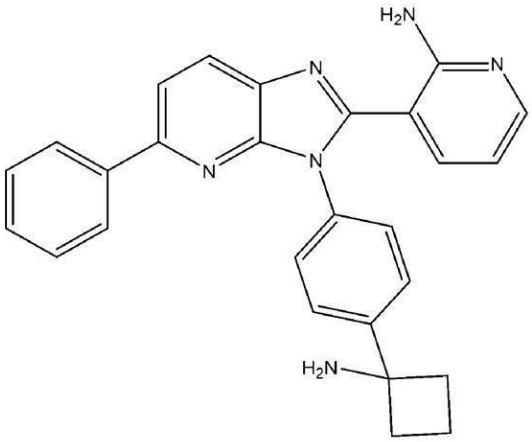
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＰＨＴ－４２７である。ＰＨＴ－４２７は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。４－ドデシル－Ｎ－（１，３，４－チアジアゾール－２－イル）ベンゼンスルホンアミド

【０６７４】

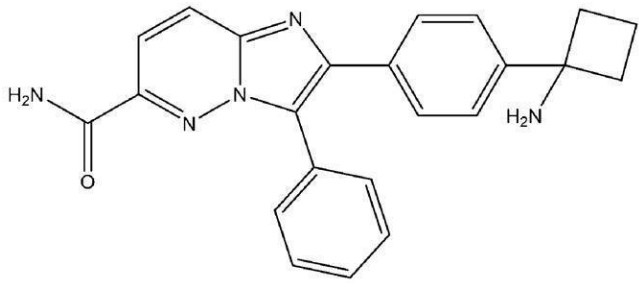
【化２４】



【０６７５】
ミランセルチブ（ＡＲＱ－０９２）
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ミランセルチブである。ミランセルチブは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。３－［３－［４－（１－アミノシクロブチル）フェニル］－５－フェニルイミダゾ［４，５－ｂ］ピリジン－２－イル］ピリジン－２－アミン
【０６７６】
【化２５】

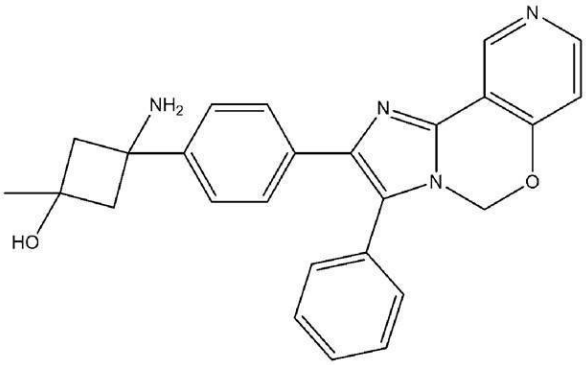


【０６７７】
ＢＡＹ１１２５９７６
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＢＡＹ１１２５９７６である。ＢＡＹ１１２５９７６は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。２－［４－（１－アミノシクロブチル）フェニル］－３－フェニルイミダゾ［１，２－ｂ］ピリダジン－６－カルボキサミド
【０６７８】
【化２６】



【０６７９】
ＴＡＳ－１１７
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＴＡＳ－１１７である。ＴＡＳ－１１７は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。３－アミノ－１－メチル－３－［４－（５－フェニル－８－オキサ－３，６，１２－トリアザトリシクロ［７．４．０．０２，６］トリデカ－１（９），２，４，１０，１２－ペンタエン－４－イル）フェニル］シクロブタン－１－オール
【０６８０】

【化２７】



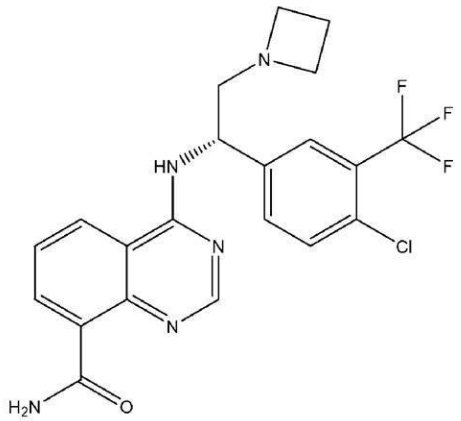
【０６８１】

ＭＳＣ２３６３３１８Ａ

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＭＳＣ２３６３３１８Ａである。ＭＳＣ２３６３３１８Ａは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。４－［［（１Ｓ）－２－（アゼチジン－１－イル）－１－［４－クロロ－３－（トリフルオロメチル）フェニル］エチル］アミノ］キナゾリン－８－カルボキサミド

【０６８２】

【化２８】



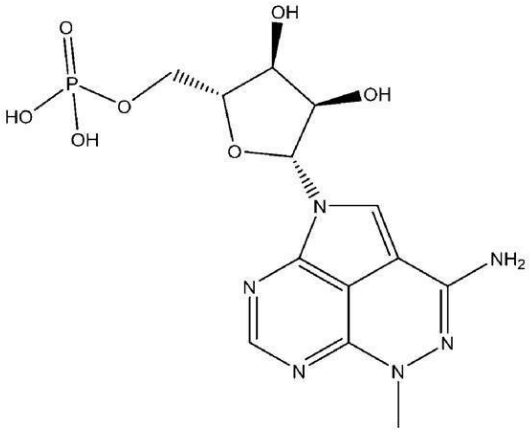
【０６８３】

トリシリビンホスフェート（ＶＱＤ－００２）

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、トリシリビンホスフェートである。トリシリビンホスフェートは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。［（２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，５Ｒ）－５－（５－アミノ－７－メチル－２，６，７，９，１１－ペンタザトリシクロ［６．３．１．０４，１２］ドデカ－１（１２），３，５，８，１０－ペンタエン－２－イル）－３，４－ジヒドロキシオキソラン－２－イル］メチルリン酸二水素

【０６８４】

【化２９】



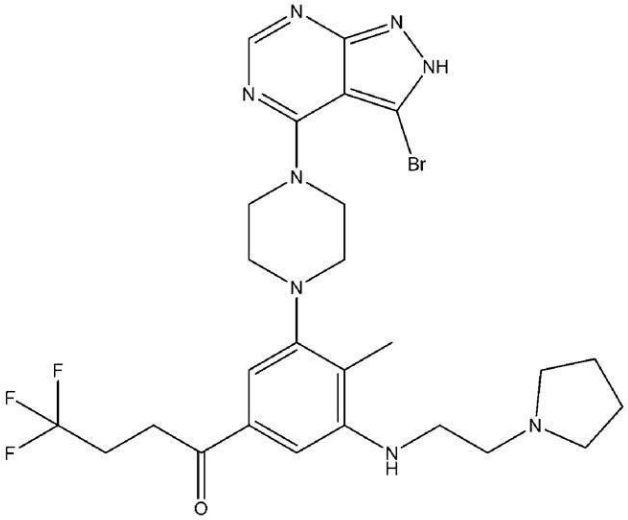
【０６８５】

ＸＬ４１８

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＸＬ４１８である。ＸＬ４１８は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。１－［３－［４－（３－ブロモ－２Ｈ－ピラゾロ［３，４－ｄ］ピリミジン－４－イル）ピペラジン－１－イル］－４－メチル－５－（２－ピロリジン－１－イルエチルアミノ）フェニル］－４，４，４－トリフルオロブタン－１－オン

【０６８６】

【化３０】



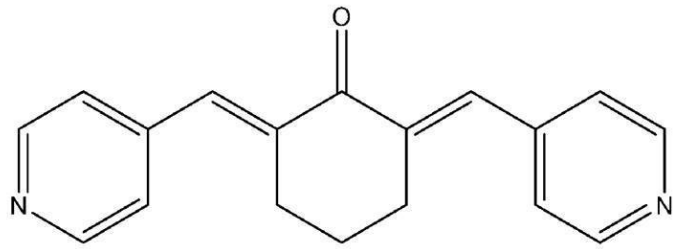
【０６８７】

ＳＣ６６

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＳＣ６６である。ＳＣ６６は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。（２Ｅ，６Ｅ）－２，６－ビス（ピリジン－４－イルメチリデン）シクロヘキサン－１－オン

【０６８８】

【化３１】



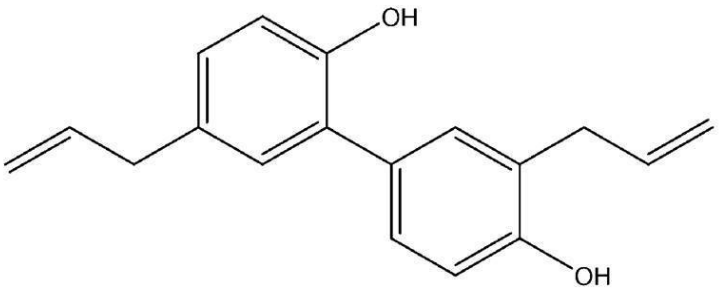
【０６８９】

ホノキオール

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ホノキオールである。ホノキオールは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。２－（４－ヒドロキシ－３－プロパ－２－エニルフェニル）－４－プロパ－２－エニルフェノール

【０６９０】

【化３２】



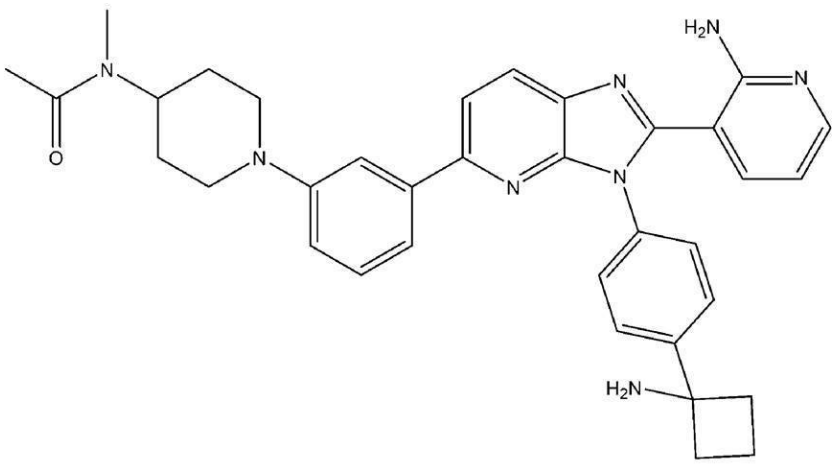
【０６９１】

ベボリセルチブ（ＡＲＱ７５１）

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ベボリセルチブである。ベボリセルチブは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。Ｎ－［１－［３－［３－［４－（１－アミノシクロブチル）フェニル］－２－（２－アミノピリジン－３－イル）イミダゾ［４，５－ｂ］ピリジン－５－イル］フェニル］ピペリジン－４－イル］－Ｎ－メチルアセトアミド

【０６９２】

【化３３】



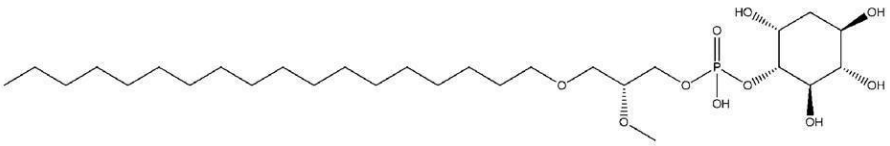
【０６９３】

ＰＸ－３１６

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＰＸ－３１６である。ＰＸ－３１６は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。［（２Ｒ）－２－メトキシ－３－オクタデコキシプロピル］［（１Ｒ，２Ｒ，３Ｓ，４Ｒ，６Ｒ）－２，３，４，６－テトラヒドロキシシクロヘキシル］リン酸水素

【０６９４】

【化３４】



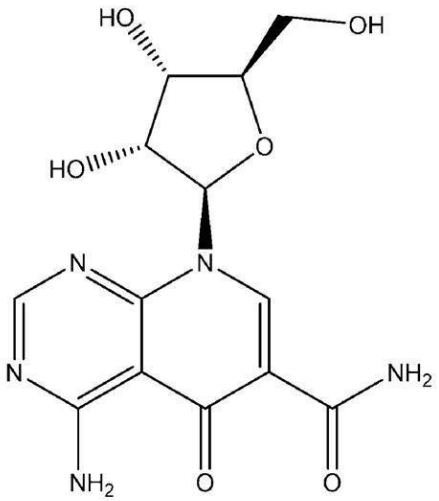
【０６９５】

ＡＰＩ－１

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＡＰＩ－１である。ＡＰＩ－１は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。４－アミノ－８－［（２Ｒ，３Ｒ，４Ｓ，５Ｒ）－３，４－ジヒドロキシ－５－（ヒドロキシメチル）オキソラン－２－イル］－５－オキソピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－６－カルボキサミド

【０６９６】

【化３５】



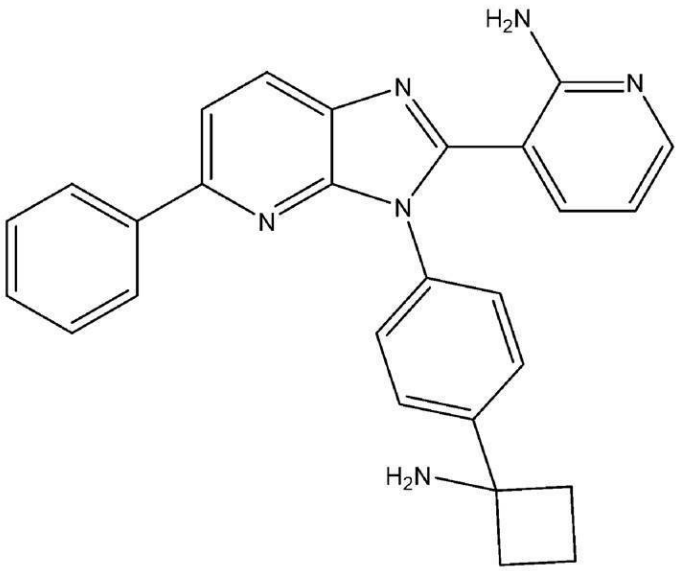
【０６９７】

ＡＬＭ３０１

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＡＬＭ３０１である。ＡＬＭ３０１は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。３－（３－（４－（１－アミノシクロブチル）フェニル）－５－フェニル－３Ｈ－イミダゾ［４，５－ｂ］ピリジン－２－イル）ピリジン－２－アミン

【０６９８】

【化３６】



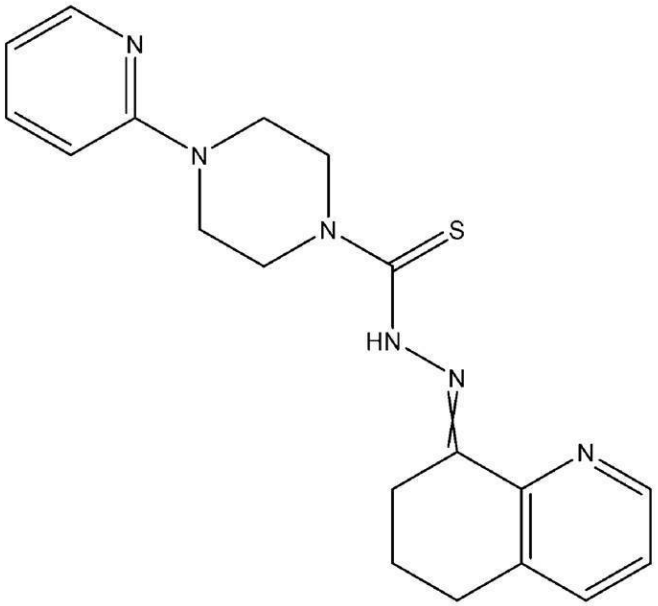
【０６９９】

ＣＯＴＩ－２

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＣＯＴＩ－２である。ＣＯＴＩ－２は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。Ｎ－（６，７－ジヒドロ－５Ｈ－キノリン－８－イリデンアミノ）－４－ピリジン－２－イルピペラジン－１－カルボチオアミド

【０７００】

【化３７】



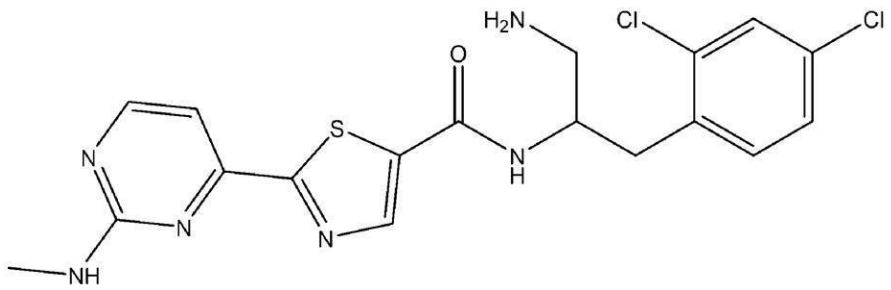
【０７０１】

ＤＣ１２０

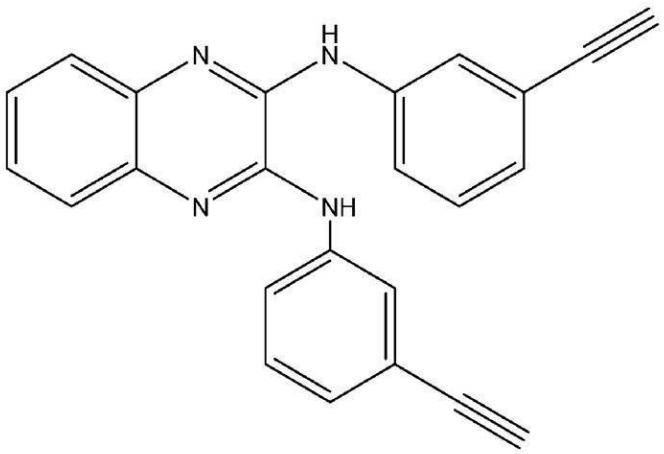
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＤＣ１２０である。ＤＣ１２０は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。Ｎ－［１－アミノ－３－（２，４－ジクロロフェニル）プロパン－２－イル］－２－［２－（メチルアミノ）ピリミジン－４－イル］－１，３－チアゾール－５－カルボキサミド

【０７０２】

【化３８】

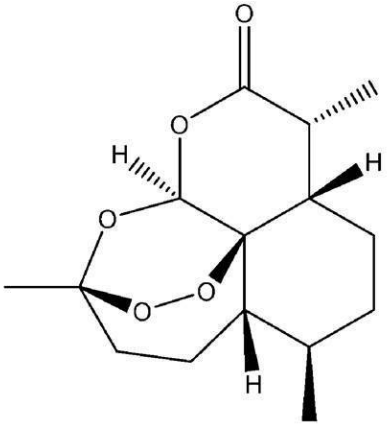


【０７０３】
ＴＤ５２
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＴＤ５２である。ＴＤ５２は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。２－Ｎ，３－Ｎ－ビス（３－エチニルフェニル）キノキサリン－２，３－ジアミン
【０７０４】
【化３９】



【０７０５】
アルテミシニン
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、アルテミシニンである。アルテミシニンは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。（１Ｒ，４Ｓ，５Ｒ，８Ｓ，９Ｒ，１２Ｓ，１３Ｒ）－１，５，９－トリメチル－１１，１４，１５，１６－テトラオキサテトラシクロ［１０．３．１．０^{4,13}．０^{8,13}］ヘキサデカン－１０－オン
【０７０６】

【化４０】



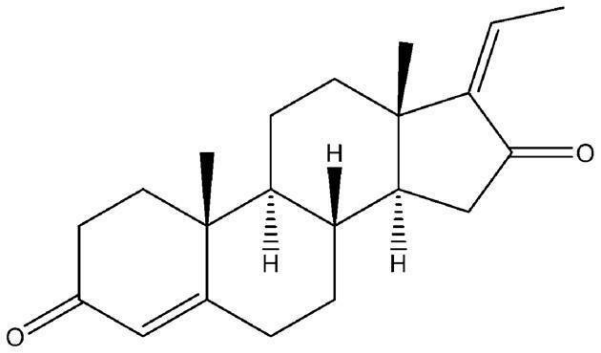
【０７０７】

ググルステロン

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ググルステロンである。ググルステロンは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。（８Ｒ，９Ｓ，１０Ｒ，１３Ｓ，１４Ｓ，１７Ｚ）－１７－エチリデン－１０，１３－ジメチル－１，２，６，７，８，９，１１，１２，１４，１５－デカヒドロシクロペンタ［ａ］フェナントレン－３，１６－ジオン

【０７０８】

【化４１】



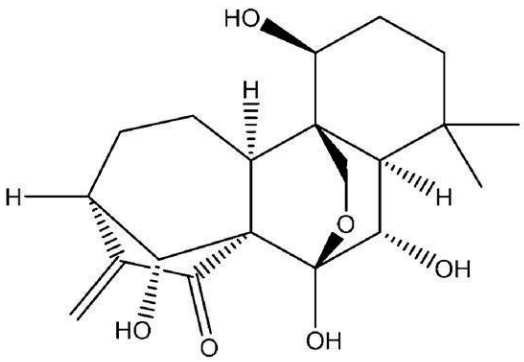
【０７０９】

オリドニン（ＮＳＣ－２５０６８２）

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、オリドニンである。オリドニンは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。（１Ｓ，２Ｓ，５Ｓ，８Ｒ，９Ｓ，１０Ｓ，１１Ｒ，１５Ｓ，１８Ｒ）－９，１０，１５，１８－テトラヒドロキシ－１２，１２－ジメチル－６－メチリデン－１７－オキサペンタシクロ［７．６．２．１^{5,8}．０^{1,11}．０^{2,8}］オクタデカン－７－オン

【０７１０】

【化４２】



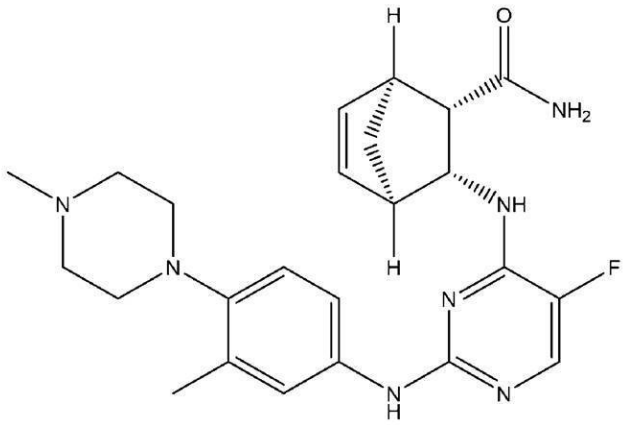
【０７１１】

セニセルチブ（ＡＳ－７０３５６９）

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、セニセルチブである。セニセルチブｎは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。（１Ｓ，２Ｓ，３Ｒ，４Ｒ）－３－［［５－フルオロ－２－［３－メチル－４－（４－メチルピペラジン－１－イル）アミノ］ピリミジン－４－イル］アミノ］ビシクロ［２．２．１］ヘプター５－エン－２－カルボキサミド

【０７１２】

【化４３】



【０７１３】

３ＣＡＩ

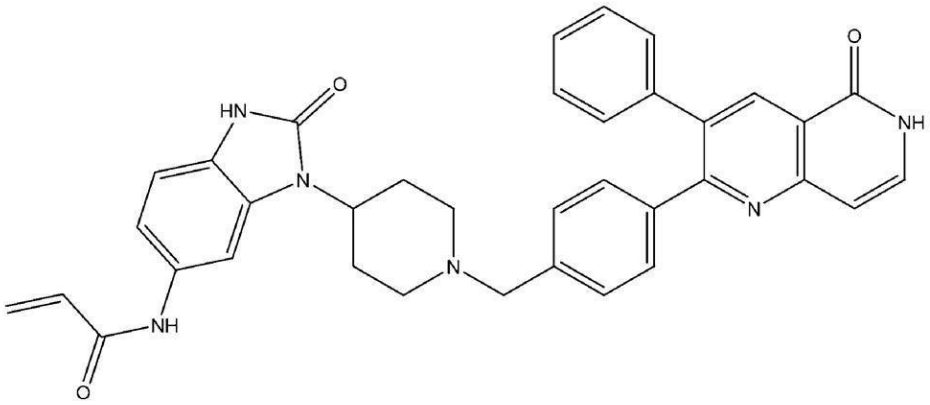
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、３ＣＡＩである。３ＣＡＩは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。２－クロロ－１－（１Ｈ－インドール－３－イル）エタノン

【０７１４】

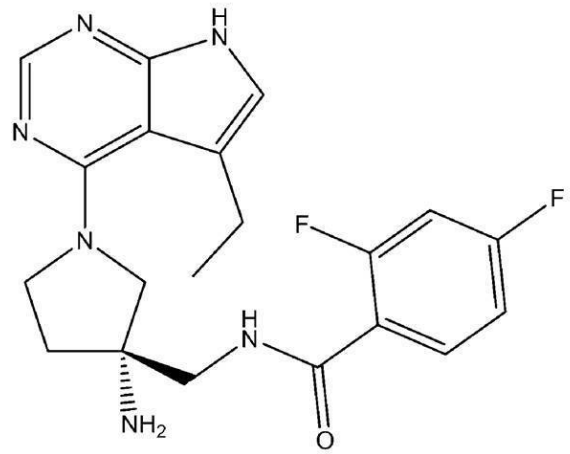
【化４４】



【０７１５】
ボルセルチブ（Ｂｏｒｕｓｓｅｒｔｉｂ）
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ボルセルチブである。ボルセルチブは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。Ｎ－［２－オキソ－３－［１－［［４－（５－オキソ－３－フェニル－６Ｈ－１，６－ナフチリジン－２－イル）フェニル］メチル］ピペリジン－４－イル］－１Ｈ－ベンズイミダゾール－５－イル］プロパ－２－エンアミド
【０７１６】
【化４５】

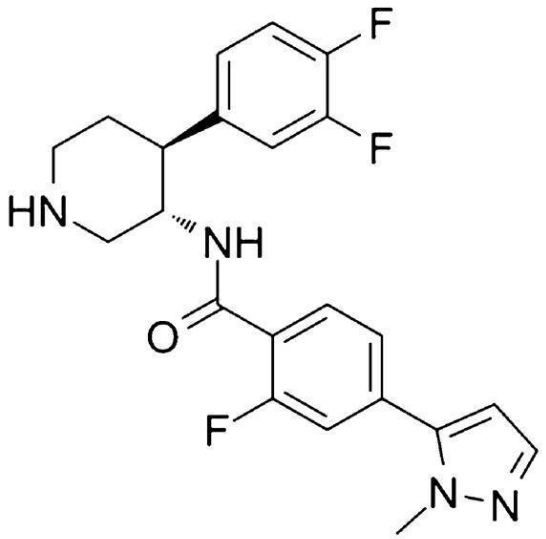


【０７１７】
ＰＦ－ＡＫＴ４００
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ＰＦ－ＡＫＴ４００である。ＰＦ－ＡＫＴ４００は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。Ｎ－［［（３Ｓ）－３－アミノ－１－（５－エチル－７Ｈ－ピロロ［２，３－ｄ］ピリミジン－４－イル）ピロリジン－３－イル］メチル］－２，４－ジフルオロベンズアミド
【０７１８】
【化４６】



【０７１９】
Ｈｕ７６９１
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、Ｈｕ７６９１である。Ｈｕ７６９１は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。Ｎ－（（３Ｓ，４Ｓ）－４－（３，４－ジフルオロフェニル）ピペリジン－３－イル）－２－フルオロ－４－（１－メチル－１Ｈ－ピラゾール－５－イル）ベンズアミド
【０７２０】

【化４７】



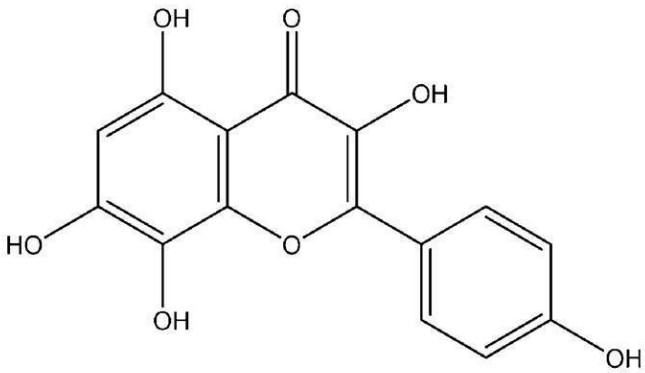
【０７２１】

ヘルバセチン

ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、ヘルバセチンである。ヘルバセチンは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。３，５，７，８－テトラヒドロキシ－２－（４－ヒドロキシフェニル）クロメン－４－オン

【０７２２】

【化４８】



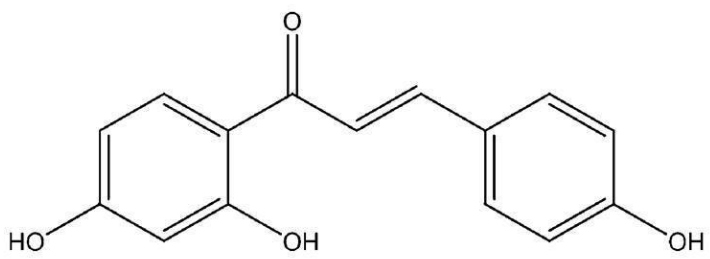
【０７２３】

イソリキリチゲニン

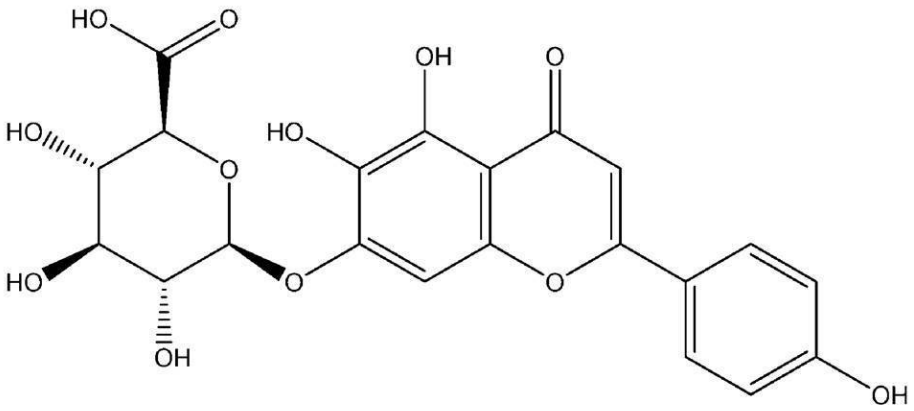
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イソリキリチゲニンである。イソリキリチゲニンは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。（Ｅ）－１－（２，４－ジヒドロキシフェニル）－３－（４－ヒドロキシフェニル）プロパ－２－エン－１－オン

【０７２４】

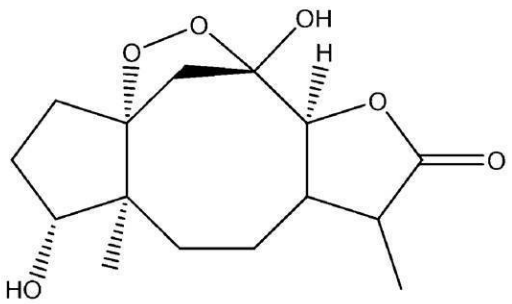
【化４９】



【０７２５】
スクテラリン
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、スクテラリンである。スクテラリンは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。（２Ｓ，３Ｓ，４Ｓ，５Ｒ，６Ｓ）－６－［５，６－ジヒドロキシ－２－（４－ヒドロキシフェニル）－４－オキソクロメン－７－イル］オキシ－３，４，５－トリヒドロキシオキサン－２－カルボン酸
【０７２６】
【化５０】



【０７２７】
テヘラノリド
ある実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、テヘラノリドである。テヘラノリドは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。（１Ｒ，４Ｒ，５Ｓ，１２Ｓ，１３Ｓ）－４，１３－ジヒドロキシ－５，９－ジメチル－１１，１４，１５－トリオキサテトラシクロ［１１．２．１．０^{1,5}．０^{8,12}］ヘキサデカン－１０－オン
【０７２８】
【化５１】



【０７２９】
いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イパタセルチブ、ＧＳＫ６９０６９３、ＧＳＫ２１４１７９５、ＧＳＫ２１１０１８３、ＡＺＤ５３６３、ＧＤＣ－００６８、ＡＴ７８６７、ＣＣＴ１２８９３０、ＭＫ－２２０６、ＢＡＹ１１２５９７６、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、ホノキオール、及びそれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される。
【０７３０】
ＩＩＩ．ＴＩＬ製造プロセス－２Ａ
これらの特徴のうちのいくつかを含むプロセス２Ａとして知られる例示的なＴＩＬプロセスが図２に示され、プロセス１Ｃに対する本発明のこの実施形態の利点のうちのいくつかが、国際特許公開第ＷＯ２０１８／０８１４７３号に記載されている。プロセス２Ａの

実施形態を図１に示す。

【０７３１】

本明細書で考察されるように、本発明は、患者への移植前に凍結保存されたＴＩＬを再刺激して、それらの代謝活性、ひいては相対的健康を向上させることに関するステップ、及び当該代謝健康を試験する方法を含み得る。本明細書で一般に概説されるように、ＴＩＬは、一般に、患者試料から採取され、患者への移植前にそれらの数を拡張するように操作される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、以下で考察されるように、任意で遺伝子操作され得る。

【０７３２】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、凍結保存され得る。解凍した時点で、それらが再刺激されて、患者への注入前に代謝を高めることができる。

【０７３３】

いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図で詳細に考察されるように、第１の拡張（ＲＥＰ前と称されるプロセス、ならびに図１にステップＡとして示されるプロセスを含む）は、３～１４日に短縮され、第２の拡張（ＲＥＰと称されるプロセス、ならびに図１にステップＢとして示されるプロセスを含む）は、７～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、第１の拡張（例えば、図１にステップＢとして記載される拡張）は、１１日に短縮され、第２の拡張（例えば、図１にステップＤとして記載される拡張）は、１１日に短縮される。いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図で詳細に考察されるように、第１の拡張と第２の拡張との組み合わせ（例えば、図１にステップＢ及びステップＤとして記載される拡張）は、２２日に短縮される。

【０７３４】

以下の「ステップ」表記Ａ、Ｂ、Ｃなどは、図１を参照し、本明細書に記載のある特定の実施形態を参照する。以下及び図１におけるステップの順序は例示であり、ステップの任意の組み合わせまたは順序、ならびに追加のステップ、ステップの繰り返し、及び／またはステップの省略は、本出願及び本明細書に開示される方法によって企図される。

【０７３５】

Ａ．ステップＡ：患者の腫瘍試料を取得する

一般に、ＴＩＬは、最初に患者の腫瘍試料から取得され、その後、本明細書に記載されるさらなる操作のためにより大きい集団に拡張され、任意選択で凍結保存され、本明細書に概説されるように再刺激され、任意選択でＴＩＬ健康の指標として表現型及び代謝パラメータについて評価される。

【０７３６】

患者の腫瘍試料は、一般に外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段を介して、当該技術分野で知られている方法を使用して取得することができる。いくつかの実施形態では、多病変サンプリングが使用される。いくつかの実施形態では、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段は、多病変サンプリングを含む（すなわち、患者の１つ以上の腫瘍部位及び／または場所、ならびに同じ場所または近接した１つ以上の腫瘍から試料を取得する）。一般に、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍試料は、血液系悪性腫瘍から取得された腫瘍などの液体腫瘍であり得る。固形腫瘍は、肺組織のものであり得る。いくつかの実施形態では、有用なＴＩＬは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）から得られる。固形腫瘍は、皮膚組織のものであり得る。いくつかの実施形態では、有用なＴＩＬは、黒色腫から取得される。

【０７３７】

取得された時点で、腫瘍試料は、一般に、鋭的解剖を使用して１～約８mm^3の小片に断片化され、約２～３mm^3が特に有用である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、酵素腫瘍消化物を使用してこれらの断片から培養される。かかる腫瘍消化物は、酵素培地（例えば、Ｒｏｓｗｅｌｌ　Ｐａｒｋ　Ｍｅｍｏｒｉａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＲＰＭＩ

）１６４０緩衝液、２ｍＭグルタミン酸、１０ｍｃｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０単位／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（例えば、組織解離機を使用する）によって産生され得る。腫瘍消化物は、腫瘍を酵素培地に入れ、腫瘍をおよそ１分間機械的に解離させ、続いて５％　CO_2中３７℃で３０分間インキュベートし、続いて小さな組織片のみが存在するまで、前述の条件下で機械的解離及びインキュベーションのサイクルを繰り返すことによって産生することができる。このプロセスの最後に、細胞懸濁液中に多数の赤血球または死細胞が含まれている場合、ＦＩＣＯＬＬ分岐親水性多糖類を使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。米国特許出願公開第２０１２／０２４４１３３Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものなどの当該技術分野で知られている代替の方法を使用することができる。前述の方法のうちのいずれかが、ＴＩＬを拡張する方法またはがんを治療する方法について本明細書に記載される実施形態のうちのいずれかにおいて使用され得る。

【０７３８】

腫瘍解離酵素混合物には、１つ以上の解離（消化）酵素、例えば、限定されないが、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはコラゲナーゼの種類を含む）、Ａｃｃｕｔａｓｅ（商標）、Ａｃｃｕｍａｘ（商標）、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、キモトリプシン、キモパパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパイン、ＸＩＶ型プロテアーゼ（プロナーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）、トリプシン阻害剤、任意の他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びそれらの任意の組み合わせが含まれ得る。

【０７３９】

いくつかの実施形態では、解離酵素は、凍結乾燥酵素から再構成される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥酵素は、ＨＢＳＳなどの滅菌緩衝液の量で再構成される。

【０７４０】

いくつかの事例では、コラゲナーゼ（アニマルフリー１型コラゲナーゼなど）を、１０ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液で再構成する。凍結乾燥ストック酵素は、２８９２ＰＺ　Ｕ／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、５ｍＬ～１５ｍＬの緩衝液中で再構成される。いくつかの実施形態では、再構成後のコラゲナーゼストックは、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬの範囲、例えば、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約３５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約３００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２１０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２２０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２３０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２４０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２６０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２７０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２８０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２８９．２ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約３００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約３５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、または約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬである。

【０７４１】

いくつかの実施形態では、中性プロテアーゼは、１ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥ストック酵素は、１７５ＤＭＣＵ／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、再構成後の中性プロテアーゼストックは、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬの範囲、例えば、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約３５０ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約３００ＤＭＣ／ｍＬ、約１５０ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ、約１１０ＤＭＣ／ｍＬ、約１２０ＤＭＣ／ｍＬ、約１３０ＤＭＣ／ｍＬ、約１４０ＤＭＣ／ｍＬ、約１５０ＤＭＣ／ｍＬ、約１６０ＤＭＣ／ｍＬ、約１７０ＤＭＣ／ｍＬ、約１７５ＤＭＣ／ｍＬ、約１８０ＤＭＣ／ｍＬ、約１９０ＤＭＣ／ｍＬ、約２００ＤＭＣ／ｍＬ、約２５０ＤＭＣ／ｍＬ、約３００ＤＭＣ／ｍＬ、約３５０ＤＭＣ／ｍＬ、または約４００ＤＭＣ／ｍＬである。

【０７４２】
いくつかの実施形態では、ＤＮＡｓｅ　Ｉは、１ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥したストック酵素は、４ＫＵ／バイアルの濃度であった。いくつかの実施形態では、再構成後のＤＮａｓｅ　Ｉストックは、約１ＫＵ／ｍＬ～１０ＫＵ／ｍＬ、例えば、約１ＫＵ／ｍＬ、約２ＫＵ／ｍＬ、約３ＫＵ／ｍＬ、約４ＫＵ／ｍＬ、約５ＫＵ／ｍＬ、約６ＫＵ／ｍＬ、約７ＫＵ／ｍＬ、約８ＫＵ／ｍＬ、約９ＫＵ／ｍＬ、または約１０ＫＵ／ｍＬの範囲である。
【０７４３】
いくつかの実施形態では、酵素のストックは可変であり、濃度を決定する必要があり得る。いくつかの実施形態では、凍結乾燥ストックの濃度を検証することができる。いくつかの実施形態では、消化カクテルに添加される酵素の最終量は、決定されたストック濃度に基づいて調整される。
【０７４４】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、約４．７ｍＬの無菌ＨＢＳＳ中に約１０．２ｕｌの中性プロテアーゼ（０．３６ＤＭＣ　Ｕ／ｍＬ）、２１．３μＬのコラゲナーゼ（１．２ＰＺ／ｍＬ）及び２５０ｕｌのＤＮＡｓｅ　Ｉ（２００Ｕ／ｍＬ）を含む。
【０７４５】
上に示されるように、いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、固形腫瘍に由来する。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、断片化されない。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は断片化されず、全腫瘍として酵素消化に供される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％CO_2で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％CO_2で回転を伴って消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、３７℃、５％CO_2で一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、全腫瘍が酵素と組み合わされて、腫瘍消化反応混合物が形成される。
【０７４６】
いくつかの実施形態では、腫瘍は、滅菌緩衝液中の凍結乾燥酵素で再構成される。いくつかの実施形態では、緩衝液は、滅菌ＨＢＳＳである。
【０７４７】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、コラゲナーゼを含む。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、コラゲナーゼＩＶである。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼの作業ストックは、１００ｍｇ／ｍＬの１０倍作業ストックである。
【０７４８】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ＤＮＡｓｅを含む。いくつかの実施形態では、ＤＮＡｓｅの作業ストックは、１０，０００ＩＵ／ｍＬの１０倍作業ストックである。
【０７４９】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ヒアルロニダーゼを含む。いくつかの実施形態では、ヒアルロニダーゼの作業ストックは、１０ｍｇ／ｍＬの１０倍作業ストックである。
【０７５０】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、１０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼ、１０００ＩＵ／ｍＬのＤＮＡｓｅ、及び１ｍｇ／ｍＬのヒアルロニダーゼを含む。
【０７５１】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、１０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼ、５００ＩＵ／ｍＬのＤＮＡｓｅ、及び１ｍｇ／ｍＬのヒアルロニダーゼを含む。

【０７５２】
一般に、採取された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに採取された」細胞集団と呼ばれる。
【０７５３】
いくつかの実施形態では、断片化は、例えば、解剖及び消化を含む物理的断片化を含む。いくつかの実施形態では、断片化は、物理的断片化である。いくつかの実施形態では、断片化は、解剖である。いくつかの実施形態では、断片化は、消化によるものである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、患者から取得された腫瘍試料を消化または断片化することから取得された酵素腫瘍消化物及び腫瘍断片から最初に培養され得る。
【０７５４】
腫瘍が固形腫瘍であるいくつかの実施形態では、腫瘍試料が、例えば、ステップＡ（図１または図８に提供される）で取得された後、腫瘍は物理的断片化を受ける。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存前に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存後に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、腫瘍を得た後に、いずれの凍結保存もない場合に起こる。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、１０、２０、３０、４０個またはそれ以上の断片または小片が、第１の拡張のために各容器内に配置される。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、３０または４０個の断片または小片が、第１の拡張のために各容器内に配置される。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、４０個の断片または小片が、第１の拡張のために各容器内に配置される。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約４～約５０個の断片を含み、各断片は、約２７mm^3の体積を有する。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１３００mm^3～約１５００mm^3の総体積を伴う約３０～約６０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１３５０mm^3の総体積を伴う約５０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１グラム～約１．５グラムの総質量を伴う約５０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約４個の断片を含む。
【０７５５】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍断片から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、鋭的解剖によって取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3～１０mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3～８mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約２mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約３mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約４mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約５mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約６mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約７mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約８mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約９mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１０mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、１～４ｍｍ×１～４ｍｍ×１～４ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍は、１ｍｍ×１ｍｍ×１ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍は、２ｍｍ×２ｍｍ×２ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍は、３ｍｍ×３ｍｍ×３ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍は、４ｍｍ×４ｍｍ×４ｍｍである。
【０７５６】
いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性、壊死性、及び／または脂肪性組織の量を最小化するために切除される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性組織の量を最小化するために切除される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の壊死性組織の量を最小化するために切除される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の脂肪性組織の量を最小化するために切除される。
【０７５７】
いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、腫瘍の内部構造を維持するために行われる。いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、メスでのこ引き動作を行うことなく行われる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から取得される。いくつかの実施形

態では、腫瘍消化物は、例えば、ＲＰＭＩ１６４０（２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）であるが、これに限定されない酵素培地中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって生成された。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍は、およそ１分間機械的に解離され得る。その後、溶液が５％CO_2中３７℃で３０分間インキュベートされ、その後、およそ１分間再び機械的に破壊され得る。５％　CO_2中３７℃で３０分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ１分間、３回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きい組織片が存在する場合、３回目の機械的破壊後、５％CO_2中３７℃でさらに３０分間インキュベートするかにかかわらず、１回または２回の追加の機械的解離が試料に適用された。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、Ｆｉｃｏｌｌを使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。

【０７５８】

いくつかの実施形態では、第１の拡張ステップの前に採取された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに採取された」細胞集団と呼ばれる。

【０７５９】

いくつかの実施形態では、細胞は、試料採取後に任意選択で凍結され、ステップＢに記載される拡張に入る前に凍結保存され得、これは、以下でさらに詳細に説明され、図１及び図８にも例示される。

【０７６０】

１．胸水Ｔ細胞及びＴＩＬ

いくつかの実施形態では、試料は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのＴ細胞またはＴＩＬの供給源は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、試料は、胸水由来試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのＴＩＬの供給源は、胸水由来試料である。例えば、米国特許公開第２０１４／０２９５４２６号に記載されている方法を参照されたく、これはすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０７６１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬと思われる、及び／またはＴＩＬを含む任意の胸腔内液または胸水を利用することができる。かかる試料は、ＮＳＣＬＣもしくはＳＣＬＣなどの原発性または転移性肺癌に由来し得る。いくつかの実施形態では、試料は、別の臓器、例えば、乳房、卵巣、結腸、または前立腺に由来する二次転移性がん細胞に由来し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜浸出液である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜漏出液である。他の生体試料は、例えば、腹部からの腹水または膵嚢胞液を含む、ＴＩＬを含有する他の漿液を含み得る。腹水及び胸腔内液は、非常に類似した化学系を伴い、腹部及び肺の両方が、悪性腫瘍における同じ物質の胸膜空間及び腹部空間に中皮線及び流体形態を有し、いくつかの実施形態では、かかる流体は、ＴＩＬを含有する。開示される方法が胸水を利用するいくつかの実施形態では、同じ方法が、ＴＩＬを含有する他の嚢胞液を使用して同様の結果で行われてもよい。

【０７６２】

いくつかの実施形態では、胸腔内液は、患者から直接除去された未処理の形態である。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、さらなる処理ステップの前に、ＥＤＴＡまたはヘパリンチューブなどの標準的な採血管に入れられる。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、さらなる処理ステップの前に、標準的なＣｅｌｌＳａｖｅ（登録商標）チューブ（Ｖｅｒｉｄｅｘ）に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、生存ＴＩＬの数の減少を避けるために、患者から採取した直後にＣｅｌｌＳａｖｅチューブに入れられる。生存ＴＩＬの数は、４℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置されると、２４時間以内に大幅に減少する可能性がある。いくつかの実施形態では、試料は、患者か

らの除去後１時間、５時間、１０時間、１５時間、または最大２４時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、４℃で、患者からの除去後１時間、５時間、１０時間、１５時間、または最大２４時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

【０７６３】

いくつかの実施形態では、選択された対象からの胸腔内液試料は、希釈され得る。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：１０である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：９である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：８である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：５である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：２である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：１である。いくつかの実施形態では、希釈剤には、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、別の緩衝液、または生理学的に許容される希釈剤が含まれる。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの収集及び希釈の直後にＣｅｌｌＳａｖｅチューブ内に入れられ、生存ＴＩＬの減少を回避し、これは、４℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置された場合、２４～４８時間以内に有意に生じ得る。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、患者からの除去及び希釈後１時間、５時間、１０時間、１５時間、２４時間、３６時間、最大４８時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、４℃で、患者からの除去及び希釈後１時間、５時間、１０時間、１５時間、２４時間、３６時間、最大４８時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

【０７６４】

さらに他の実施形態では、胸腔内液試料は、さらなる処理ステップの前に、従来の手段によって濃縮される。いくつかの実施形態では、胸腔内液のこの前処理は、方法を実施する実験室への輸送のために、またはその後の分析のために（例えば、採取後２４～４８時間より後に）胸水を凍結保存しなければならない状況において好ましい。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、それが対象から採取された後に胸腔内液試料を遠心分離し、遠心分離物またはペレットを緩衝液中に再懸濁することによって調製される。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、輸送または後の分析及び／または処理のために凍結保存される前に、複数の遠心分離及び再懸濁に供される。

【０７６５】

いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、濾過法を使用することによって、さらなる処理ステップの前に濃縮される。いくつかの実施形態では、さらなる処理で使用される胸腔内液試料は、胸腔内液が膜を通過することを可能にするが腫瘍細胞を保持する、既知で本質的に均一な孔径を含むフィルターを通して流体を濾過することによって調製される。いくつかの実施形態では、膜の細孔の直径は、少なくとも４μＭであり得る。他の実施形態では、細孔直径は、５μＭ以上であり得、他の実施形態では、６、７、８、９、または１０μＭのうちのいずれかであり得る。濾過後、膜によって保持されたＴＩＬを含む細胞を、膜から適切な生理学的に許容される緩衝液にすすいでもよい。次いで、このように濃縮されたＴＩＬを含む細胞は、方法のさらなる処理ステップで使用することができる。

【０７６６】

いくつかの実施形態では、胸腔内液試料（例えば、未処理の胸腔内液を含む）、希釈胸腔内液、または再懸濁細胞ペレットは、試料中に存在する無核赤血球を特異的に溶解する溶解試薬と接触させる。いくつかの実施形態では、このステップは、胸腔内液がかなりの数のＲＢＣを含む状況で、さらなる処理ステップの前に行われる。好適な溶解試薬には、単一の溶解試薬もしくは溶解試薬及びクエンチ試薬、または溶解剤、クエンチ試薬及び固定試薬が含まれる。好適な溶解系は市販されており、ＢＤ　Ｐｈａｒｍ　Ｌｙｓｅ（商標）系（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ）が含まれる。他の溶解系には、Ｖｅｒｓａｌｙｓｅ（商標）系、ＦＡＣＳｌｙｓｅ（商標）系（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ）、Ｉｍｍｕｎｏｐｒｅｐ（商標）系、またはＥｒｙｔｈｒｏｌｙｓｅ　ＩＩ系（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）、または塩化アンモニウム系が含まれる。いくつか

の実施形態では、溶解試薬は、赤血球の効率的な溶解、ならびに胸水におけるＴＩＬ及びＴＩＬの表現型特性の保存のような主要な要件によって異なり得る。溶解のための単一の試薬を利用することに加えて、本明細書に記載の方法に有用な溶解系は、第２の試薬、例えば、方法の残りのステップ中に溶解試薬の効果をクエンチまたは遅延させるもの、例えばＳｔａｂｉｌｙｓｅ（商標）試薬（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）を含むことができる。溶解試薬の選択または方法の好ましい実施に応じて、従来の固定試薬を使用することもできる。

【０７６７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、未処理、希釈または多重遠心分離または処理された胸腔内液試料は、本明細書で提供されるようにさらに処理及び／または拡張される前に、約－１４０℃の温度で凍結保存される。

【０７６８】

２．ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性の事前選択選択

本発明のいくつかの方法によれば、ＴＩＬは、例えば、第１の拡張前に（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性、（ｉｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９^{LO}／^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせであるように事前選択される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１についての任意選択の事前選択ステップも存在する。

【０７６９】

いくつかの実施形態では、最低３，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低３，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低４，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低４，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低５，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低５，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低６，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低６，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低７，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低７，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低８，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低８，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低９，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低９，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低１０，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低１０，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低２０，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低２０，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低３０，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低３０，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低４０，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低４０，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低５０，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低５０，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低６０，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低６０，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低７０，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低７０，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低８０，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前

選択ステップは、最低８０，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低９０，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低９０，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低１００，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低１００，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、細胞を、２００，０００個の密度まで成長または拡張させる。いくつかの実施形態では、細胞を、２００，０００個の密度まで成長または拡張させて、第２の拡張を開始するための約２ｅ８個のＴＩＬを提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、１５０，０００個の密度まで成長または拡張させる。いくつかの実施形態では、細胞を、１５０，０００個の密度まで成長または拡張させて、第２の拡張を開始するための約２ｅ８個のＴＩＬを提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、２５０，０００個の密度まで成長または拡張させる。いくつかの実施形態では、細胞を、２５０，０００個の密度まで成長または拡張させて、第２の拡張を開始するための約２ｅ８個のＴＩＬを提供する。いくつかの実施形態では、最小細胞密度は、第２の拡張を開始するための１０ｅ６個を与えるために、１０，０００個の細胞である。いくつかの実施形態では、第２の拡張を開始するための１０ｅ６個の播種密度は、１ｅ９個を超えるＴＩＬをもたらし得る。

【０７７０】

いくつかの実施形態では、第１の拡張において使用するためのＴＩＬは、（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせ（例えば、事前選択後、及び第１の拡張前）である。いくつかの実施形態では、第１の拡張で使用するためのＴＩＬは、少なくとも７５％が（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせ、少なくとも８０％が（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせ、少なくとも８５％が（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせ、少なくとも９０％が（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせ、少なくとも９５％が（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせ、少なくとも９８％が（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせ、または少なくとも９９％が（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせ（例えば、事前選択後及び第１の拡張前）である。

【０７７１】

いくつかの実施形態では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬの事前選択は、一次細胞集団、全腫瘍消化物、及び／または全腫瘍細胞懸濁液ＴＩＬを抗ＣＤ３９抗体及び抗ＣＤ６９抗体で染色することによって行われる。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３９及び抗ＣＤ６９抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、マウス抗ヒトＣＤ３９及びＣＤ６９ポリクローナル抗体、ヤギ抗ヒトＣＤ３９及びＣＤ６９ポリクローナル抗体などである。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３９及び抗ＣＤ６９抗体は、モノクローナル抗体である。

【０７７２】

いくつかの実施形態では、事前選択で使用するための抗ＣＤ３９抗体は、ＣＤ３９を発現する細胞の少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または少なくとも１００％に結合する。いくつかの実施形態では、事前選択で使用するための抗ＣＤ６９抗体は、ＣＤ６９を発現する細胞の少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少

なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または少なくとも１００％に結合する。

【０７７３】

いくつかの実施形態では、患者は、抗ＰＤ－１抗体で治療されている。いくつかの実施形態では、対象は、抗ＰＤ－１抗体治療未経験である。いくつかの実施形態では、対象は、抗ＰＤ－１抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、対象は、以前に化学療法剤で治療されている。いくつかの実施形態では、対象は、以前に化学療法剤で治療されているが、もはや化学療法剤で治療されていない。いくつかの実施形態では、対象は、化学療法治療後または抗ＰＤ－１抗体治療後である。いくつかの実施形態では、対象は、化学療法治療後及び抗ＰＤ－１抗体治療後である。いくつかの実施形態では、患者は、抗ＰＤ－１抗体治療未経験である。いくつかの実施形態では、対象は、治療未経験のがんを有するか、または化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１抗体未経験である。いくつかの実施形態では、対象は、治療未経験であり、かつ化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１抗体治療未経験である。

【０７７４】

いくつかの実施形態では、事前選択は、細胞選別法を使用して行われる。いくつかの実施形態では、細胞選別法は、フローサイトメトリー法、例えば、フロー活性化細胞選別法（ＦＡＣＳ）である。いくつかの実施形態では、陰性は、ＦＭＯに基づいてゲーティングされる。いくつかの実施形態では、ＦＡＣＳゲートは、対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することにより、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップの後に設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングは、各選別に対して設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングは、ＰＢＭＣの各試料に対して設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングは、ＰＢＭＣの各試料に対して設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングテンプレートは、ＰＢＭＣから１０日、２０日、３０日、４０日、５０日、または６０日毎に設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングテンプレートは、ＰＢＭＣから６０日毎に設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングテンプレートは、１０日、２０日、３０日、４０日、５０日、または６０日毎にＰＢＭＣの各試料に対して設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングテンプレートは、６０日毎にＰＢＭＣの各試料に対して設定される。

【０７７５】

いくつかの実施形態では、事前選択は、第１のＴＩＬ集団から（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせを選択して、ＴＩＬ集団を取得することを伴い、少なくとも１１．２７％～７４．４％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬであるＴＩＬ集団を第１のＴＩＬ集団から選択することを含む。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団は、少なくとも１０％～８０％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ、少なくとも２０％～８０％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ、少なくとも２０％～８０％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ、少なくとも３０％～８０％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ、少なくとも４０％～８０％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ、少なくとも５０％～８０％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ、少なくとも１０％～７０％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ、少なくとも２０％～７０％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ、少なくとも３０％～７０％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ、少なくとも４０％～７０％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬである。

【０７７６】

いくつかの実施形態では、選択ステップ（例えば、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性細胞の事前選択及び／または選択）は、
（ｉ）第１のＴＩＬ集団及びＰＢＭＣ集団を、ＣＤ３９及びＣＤ６９に結合する過剰のモノクローナル抗ＣＤ３９　ＩｇＧ及び抗ＣＤ６９　ＩｇＧ抗体に曝露するステップと、
（ｉｉ）フルオロフォアにコンジュゲートした過剰の抗ＩｇＧ抗体を添加するステップと、
（ｉｉｉ）蛍光活性化細胞選別法（ＦＡＣＳ）によって行われた場合のＰＢＭＣ集団で検出されたフルオロフォアの強度と比較して、第１のＴＩＬ集団中のＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬで検出されたフルオロフォアの強度に基づいて、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団を取得するステップと、を含む。

【０７７７】

いくつかの実施形態では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団の少なくとも７０％が、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}濃縮ＴＩＬ集団の少なくとも８０％が、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}濃縮ＴＩＬ集団の少なくとも９０％が、ＰＤ－１陽性ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}濃縮ＴＩＬ集団の少なくとも９５％が、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}濃縮ＴＩＬ集団の少なくとも９９％が、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}濃縮ＴＩＬ集団の１００％が、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬである。

【０７７８】

いくつかの実施形態では、図８のステップＡ２として例示される選択ステップは、（ｉ）第１のＴＩＬ集団を過剰のモノクローナル抗ＣＤ３９及び抗ＣＤ６９　ＩｇＧ抗体に曝露するステップと、（ｉｉ）フルオロフォアにコンジュゲートした過剰の抗ＩｇＧ抗体を追加するステップと、（ｉｉｉ）フルオロフォアに基づいてフローベースの細胞選別を実施して、（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）濃縮ＴＩＬ集団の組み合わせを取得するステップと、を含む。

【０７７９】

いくつかの実施形態では、実施例１５のゲーティング法が用いられる。腫瘍試料に由来するＴＩＬがＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}であるかどうかを決定するために、当業者は、１人以上の健康なヒト対象由来の血液試料から取得された末梢Ｔ細胞におけるＣＤ３９及び／またはＣＤ６９の発現レベルに対応する参照値を利用することができる。参照試料中のＣＤ３９／ＣＤ６９陽性細胞は、蛍光から１つの対照を差し引いたものと、一致するアイソタイプ対照とを使用して定義することができる。いくつかの実施形態では、健康な対象由来のＣＤ３＋／ＣＤ３９＋／ＣＤ６９＋末梢Ｔ細胞（例えば、参照細胞）において測定されたＣＤ３９／ＣＤ６９の発現レベルを使用して、腫瘍から取得されたＴＩＬにおけるＣＤ３９／ＣＤ６９の免疫染色強度の閾値またはカットオフ値を確立する。閾値は、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬのＣＤ３９／ＣＤ６９免疫染色の最大強度として定義することができる。そのため、ＣＤ３９／ＣＤ６９発現が閾値と同じかそれを下回るＴＩＬは、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}細胞であるとみなすことができる。いくつかの事例では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３

９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬは、全ＣＤ３＋細胞の最大１％以下に相当するＣＤ３９／ＣＤ６９免疫染色の最低強度を有するものを表す。他の事例では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬは、全ＣＤ３＋細胞の最大０．７５％以下に相当するＣＤ３９／ＣＤ６９免疫染色の最低強度を有するものを表す。いくつかの事例では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬは、全ＣＤ３＋細胞の最大０．５０％以下に相当するＣＤ３９／ＣＤ６９免疫染色の最低強度を有するものを表す。一事例では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬは、全ＣＤ３＋細胞の最大０．２５％以下に相当するＣＤ３９／ＣＤ６９免疫染色の最低強度を有するものを表す。

【０７８０】

いくつかの実施形態では、実施例１６のタンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤（ＡＫＴｉ）法が用いられる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、ＡＫＴ阻害剤を含む培地中で培養され、ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}及び／またはＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性濃縮ＴＩＬ集団を取得する。いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イパタセルチブ、ＧＳＫ６９０６９３、ＧＳＫ２１４１７９５、ＧＳＫ２１１０１８３、ＡＺＤ５３６３、ＧＤＣ－００６８、ＡＴ７８６７、ＣＣＴ１２８９３０、ＭＫ－２２０６、ＢＡＹ１１２５９７６、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、ホノキオール、及びそれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イパタセルチブである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を、約０．１μＭ、約０．２μＭ、約０．３μＭ、約０．４μＭ、約０．５μＭ、約０．６μＭ、約０．７μＭ、約０．８μＭ、約０．９μＭ、約１μＭ、約１．１μＭ、約１．２μＭ、約１．３μＭ、約１．４μＭ、約１．５μＭ、約１．６μＭ、約１．７μＭ、約１．８μＭ、約１．９μＭ、約２μＭ、約２．１μＭ、約２．２μＭ、約２．３μＭ、約２．４μＭ、約２．５μＭ、約２．６μＭ、約２．７μＭ、約２．８μＭ、約２．９μＭ、約３μＭ、約３．５μＭ、約４μＭ、約４．５μＭ、または約５μＭのイパタセルチブを含む培地中で培養する。

【０７８１】

ａ．フルオロフォア

いくつかの実施形態では、一次ＴＩＬ細胞集団は、フルオロフォアに連結された抗ＣＤ３９及び抗ＣＤ６９抗体及びフルオロフォアに連結された抗ＣＤ３抗体を含むカクテルで染色される。いくつかの実施形態では、一次ＴＩＬ細胞集団は、フルオロフォアに連結された抗ＣＤ３９及び抗ＣＤ６９抗体（例えば、ＰＥ、ｌｉｖｅ／ｄｅａｄバイオレット）及び抗ＣＤ３－ＦＩＴＣを含むカクテルで染色される。いくつかの実施形態では、一次ＴＩＬ細胞集団は、第１のフルオロフォアにコンジュゲートした抗ＣＤ３９及び第２のフルオロフォアにコンジュゲートした抗ＣＤ６９抗体、第３のフルオロフォアにコンジュゲートした抗ＣＤ３抗体、及びｌｉｖｅ／ｄｅａｄ青色染色（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ，ＭＡ、カタログ番号Ｌ２３１０５から市販されているものなど）を含むカクテルで染色され、第１、第２、及び第３の抗体は異なり、個別の検出が可能である。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３９及び抗ＣＤ６９抗体とのインキュベーション後、（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）細胞の組み合わせは、本明細書、例えば、図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇに記載の第１の拡張による拡張のために選択される。

【０７８２】

いくつかの実施形態では、一次ＴＩＬ細胞集団は、フルオロフォアに連結された抗ＣＤ３９及び抗ＣＤ６９抗体及びフルオロフォアに連結された抗ＣＤ３抗体を含むカクテルで染色される。いくつかの実施形態では、一次ＴＩＬ細胞集団は、フルオロフォアに連結された抗ＣＤ３９及び抗ＣＤ６９抗体（例えば、ＰＥ、ｌｉｖｅ／ｄｅａｄバイオレット）及び抗ＣＤ３－ＰＥ－Ｃｙ７を含むカクテルで染色される。いくつかの実施形態では、一次ＴＩＬ細胞集団は、抗ＣＤ３９－ＦＩＴＣ及び抗ＣＤ６９－ＰＥ、抗ＣＤ３－ＰＥ－Ｃｙ７、及びｌｉｖｅ／ｄｅａｄ青色染色（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ，ＭＡ、カタログ番

号Ｌ２３１０５）を含むカクテルで染色される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３９及び抗ＣＤ６９抗体とのインキュベーション後、（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）細胞の組み合わせは、本明細書、例えば、図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８ＧのプロセスＣＤ３９／ＣＤ６９　ＧＥＮ３のステップＢに記載のプライミングによる第１の拡張による拡張のために選択される。

【０７８３】

いくつかの実施形態では、フルオロフォアには、ＰＥ（フィコエリトリン）、ＡＰＣ（アロフィコシアニン）、ＰｅｒＣＰ（ペリジニンクロロフィルタンパク質）、ＤｙＬｉｇｈｔ　４０５、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４０５、Ｐａｃｉｆｉｃ　Ｂｌｕｅ、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８、ＦＩＴＣ（フルオレセインイソチオシアネート）、ＤｙＬｉｇｈｔ　５５０、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７、ＤｙＬｉｇｈｔ　６５０、及びＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　７００が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、フルオロフォアには、ＰＥ－Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７、ＰＥ－Ｃｙ５、ＰｅｒＣＰ－Ｃｙ５．５、ＰＥ－Ｃｙ５．５、ＰＥ－Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）７５０、ＰＥ－Ｃｙ７、及びＡＰＣ－Ｃｙ７が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、フルオロフォアには、フルオレセイン色素が含まれるが、これに限定されない。フルオレセイン色素の例には、５－カルボキシフルオレセイン、フルオレセイン－５－イソチオシアネート及び６－カルボキシフルオレセイン、５，６－ジカルボキシフルオレセイン、５－（及び６）－スルホフルオレセイン、スルホンフルオレセイン、スクシニルフルオレセイン、５－（及び６）－カルボキシＳＮＡＲＦ－１、カルボキシフルオレセインスルホネート、カルボキシフルオレセイン双性イオン、カルボキシフルオレセイン四級アンモニウム、カルボキシフルオレセインホスホネート、カルボキシフルオレセインＧＡＢＡ、５’（６’）－カルボキシフルオレセイン、カルボキシフルオレセイン－ｃｙｓ－Ｃｙ５、ならびにフルオレセイングルタチオンが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、蛍光部分は、ローダミン色素である。ローダミン色素の例には、テトラメチルローダミン－６－イソチオシアネート、５－カルボキシテトラメチルローダミン、５－カルボキシロードール誘導体、カルボキシローダミン１１０、テトラメチル及びテトラエチルローダミン、ジフェニルジメチル及びジフェニルジエチルローダミン、ジナフチルローダミン、ローダミン１０１スルホニルクロリド（ＴＥＸＡＳ　ＲＥＤ（登録商標）の商品名で販売される）が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、蛍光部分は、シアニン色素である。シアニン色素の例には、Ｃｙ３、Ｃｙ３Ｂ、Ｃｙ３．５、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、及びＣｙ７が含まれるが、これらに限定されない。

【０７８４】

Ｂ．ステップＢ：第１の拡張

いくつかの実施形態では、本方法は、対象／患者への投与時に複製サイクルを増加させることができ、したがって、より古いＴＩＬ（すなわち、対象／患者への投与前により多くの複製ラウンドをさらに受けたＴＩＬ）よりも追加の治療的利益を提供し得る、若いＴＩＬを得ることを提供する。若いＴＩＬの特徴は、文献、例えば、Ｄｏｎｉａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃａｎｄ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２，７５，１５７－１６７、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１０，１６，６１２２－６１３１、Ｈｕａｎｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００５，２８，２５８－２６７、Ｂｅｓｓｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１３，１９，ＯＦ１－ＯＦ９、Ｂｅｓｓｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００９，３２：４１５－４２３、Ｒｏｂｂｉｎｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００４，１７３，７１２５－７１３０、Ｓｈｅｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００７，３０，１２３－１２９、Ｚｈｏｕ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００５，２８，５３－６２、及びＴｒａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００８，３１，７４２－７５１に記載されており、これらの各々は参照

により本明細書に組み込まれる。

【０７８５】

Ｔリンパ球及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、及びＣ（一定）は、免疫グロブリン及びＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬ及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬ及び／または図５及び／または図６に例示されるようにプロセス１Ｃと称される方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第１の拡張で取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加する。

【０７８６】

例えば、図１または図８のステップＡに記載されるものなどの腫瘍断片の解剖または消化後に、結果として得られた細胞は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長を好む条件下で、ＩＬ－２を含む血清中で培養される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、６００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を有する不活性化ヒトＡＢ血清を含む培地中２ｍＬのウェル中でインキュベートされる。他の実施形態では、腫瘍消化物は、１０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を有する不活性化ヒトＡＢ血清を含む培地中２ｍＬのウェル中でインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に３～１４日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約1×10^{8}バルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、７～１４日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約1×10^{8}バルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、１０～１４日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約1×10^{8}バルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、約１１日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約1×10^{8}バルクＴＩＬ細胞を生じる。

【０７８７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの拡張は、第１の拡張の直前の追加の刺激ステップを含んでもよく、本明細書に記載の腫瘍試料からＴＩＬを調製し、少なくともインターフェロンガンマ（（ＩＦＮ－γ）２００ｎｇ／ｍＬ、例えば、Ｉ１７００１、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）及び抗ＰＤ－１（例えば、ニボルマブ）で第１の単離（または凍結保存試料の場合は凍結解凍）から培養する。いくつかの実施形態では、拡張前刺激培養物は、ＣＤ４０アゴニスト、例えば、可溶性ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０抗体（例えば、セリクレルマブ）をさらに含む。いくつかの実施形態では、拡張前刺激培養物は、ＣＴＬＡ－４アゴニスト、例えば、抗ＣＴＬＡ－４（例えば、イピリムマブ）をさらに含む。いくつかの実施形態では、拡張前刺激は、４８～７２時間持続する。いくつかの実施形態では、拡張前刺激は、４８時間、５０時間、５２時間、５４時

間、５６時間、５８時間、６０時間、６２時間、６４時間、６６時間、６８時間、７０時間、または７２時間持続する。様々な実施形態では、拡張前刺激は、６、８、１０、１２、１６、２０、２４、３６または４０時間持続する。

【０７８８】

好ましい実施形態では、ＴＩＬの拡張は、以下及び本明細書に記載の初期バルクＴＩＬ拡張ステップ（例えば、ＲＥＰ前と称されるプロセスを含み得る、図１または図８のステップＢに記載のものなど）、続いて以下のステップＤ及び本明細書に記載の第２の拡張（ステップＤ、急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）ステップと称されるプロセスを含む）、続いて任意の凍結保存、続いて以下及び本明細書に記載の第２のステップＤ（再刺激ＲＥＰステップと称されるプロセスを含む）を使用して行われ得る。このプロセスから取得されたＴＩＬは、本明細書に記載の表現型特徴及び代謝パラメータについて任意で特徴付けられ得る。

【０７８９】

ＴＩＬ培養物が２４ウェルプレートで開始される実施形態では、例えば、Ｃｏｓｔａｒ２４ウェル細胞培養クラスター、平底（Ｃｏｒｎｉｎｇ Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｅｄ，Ｃｏｒｎｉｎｇ，ＮＹ）を使用して、ＩＬ－２（６０００ＩＵ／ｍＬ、Ｃｈｉｒｏｎ Ｃｏｒｐ．，Ｅｍｅｒｙｖｉｌｌｅ，ＣＡ）を含む２ｍＬの完全培地（ＣＭ）中の1×10^6個の腫瘍消化細胞または１つの腫瘍断片を、各ウェルに播種することができる。他の実施形態では、各ウェルは、ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍＬ）を含む２ｍＬの完全培地（ＣＭ）中の1×10^6個の腫瘍消化細胞または１つの腫瘍断片を播種することができる。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約$1\ mm^3$～$10\ mm^3$である。

【０７９０】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、ステップＢのＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭ Ｈｅｐｅｓ、及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充した、ＧｌｕｔａＭＡＸを含むＲＰＭＩ １６４０からなる。培養物が４０ｍＬ容量及び$10\ cm^2$ガス透過性シリコン底部（例えば、Ｇ－ＲＥＸ１０、Ｗｉｌｓｏｎ Ｗｏｌｆ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ，Ｎｅｗ Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ）を有するガス透過性フラスコ内で開始される実施形態では、各フラスコに、ＩＬ－２を含む１０～４０ｍＬのＣＭ中の$10\sim40\times10^6$個の生きた腫瘍消化細胞または５～３０個の腫瘍断片を装填した。Ｇ－ＲＥＸＲＥＸ１０及び２４ウェルプレートの両方を、５％ CO_2中３７℃の加湿インキュベーター内でインキュベートし、培養開始から５日後、培地の半分を取り除き、新たなＣＭ及びＩＬ－２と交換し、５日後、培地の半分を２～３日毎に交換した。

【０７９１】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される拡張プロセスで使用される培地は、無血清培地または合成培地である。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、血清含有培地のロット間の変動に部分的に起因する実験変動を防止及び／または減少させるために使用される。

【０７９２】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。

【０７９３】
いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｅｒｕｍ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ、ＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代用物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代用物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代用物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の抗生物質、及び１つ以上の微量元素のうちの１つ以上が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／または２－メルカプトエタノールをさらに含む。
【０７９４】
いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔは、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＳＴ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。
【０７９５】
いくつかの実施形態では、無血清または合成培地中の総血清代替物濃度（ｖｏｌ％）は、総無血清または合成培地の約１体積％、２体積％、３体積％、４体積％、５体積％、６体積％、７体積％、８体積％、９体積％、１０体積％、１１体積％、１２体積％、１３体積％、１４体積％、１５体積％、１６体積％、１７体積％、１８体積％、１９体積％、または２０体積％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約３％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約５％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約１０％である。
【０７９６】
いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐ

ａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【０７９７】

いくつかの実施形態では、合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカ

プトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【０７９８】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約０．１ｍＭ～約１０ｍＭ、０．５ｍＭ～約９ｍＭ、１ｍＭ～約８ｍＭ、２ｍＭ～約７ｍＭ、３ｍＭ～約６ｍＭ、または４ｍＭ～約５ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約２ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。

【０７９９】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５ｍＭ～約１５０ｍＭ、１０ｍＭ～約１４０ｍＭ、１５ｍＭ～約１３０ｍＭ、２０ｍＭ～約１２０ｍＭ、２５ｍＭ～約１１０ｍＭ、３０ｍＭ～約１００ｍＭ、３５ｍＭ～約９５ｍＭ、４０ｍＭ～約９０ｍＭ、４５ｍＭ～約８５ｍＭ、５０ｍＭ～約８０ｍＭ、５５ｍＭ～約７５ｍＭ、６０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約６５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【０８００】

いくつかの実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる国際ＰＣＴ公開第ＷＯ／１９９８／０３０６７９号に記載されている合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上の微量元素、及び１つ以上の抗生物質からなる群から選択される１つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベータ－メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、及び１つ以上の微量元素からなる群から選択される１つ以上の成分と

、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

【０８０１】

いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌの範囲であり、Ｌ－ヒスチジンの濃度は、約５～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－イソロイシンの濃度は、約５～３００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－メチオニンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－フェニルアラニンの濃度は、約５～４００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－プロリンの濃度は、約１～１０００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－ヒドロキシプロリンの濃度は、約１～４５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－セリンの濃度は、約１～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－スレオニンの濃度は、約１０～５００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－トリプトファンの濃度は、約２～１１０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－チロシンの濃度は、約３～１７５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－バリンの濃度は、約５～５００ｍｇ／Ｌであり、チアミンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、還元型グルタチオンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩の濃度は、約１～２００ｍｇ／Ｌであり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約１～５０ｍｇ／Ｌであり、インスリンの濃度は、約１～１００ｍｇ／Ｌであり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約０．０００００１～０．０００１ｍｇ／Ｌであり、アルブミン（例えば、ＡｌｂｕＭＡＸ（登録商標）Ｉ）の濃度は、約５０００～５０，０００ｍｇ／Ｌである。

【０８０２】

いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、以下の表４の「１×培地中の濃度範囲」という見出しの下の列にリストされた濃度範囲で存在する。他の実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされた最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかでは、無血清サプリメントは、以下の表４の「サプリメント中の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。

【０８０３】

【表５】

表４： 非微量元素部分成分の濃度

成分	サプリメント中の好ましい実施形態 (mg/L) (約)	1×培地中の濃度範囲 (mg/L) (約)	1×培地中の好ましい実施形態 (mg/L) (約)
グリシン	150	5-200	53
L-ヒスチジン	940	5-250	183
L-イソロイシン	3400	5-300	615
L-メチオニン	90	5-200	44
L-フェニルアラニン	1800	5-400	336
L-プロリン	4000	1-1000	600
L-ヒドロキシプロリン	100	1-45	15
L-セリン	800	1-250	162
L-スレオニン	2200	10-500	425
L-トリプトファン	440	2-110	82
L-チロシン	77	3-175	84
L-バリン	2400	5-500	454
チアミン	33	1-20	9
還元型グルタチオン	10	1-20	1.5
アスコルビン酸-2-PO_4(Mg 塩)	330	1-200	50
トランスフェリン(鉄飽和)	55	1-50	8
インスリン	100	1-100	10
亜セレン酸ナトリウム	0.07	0.000001-0.0001	0.00001
AlbuMAX(登録商標)I	83,000	5000-50,000	12,500

【０８０４】

いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約２６０～３５０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約２８０～３１０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、合成培地には、最大約３．７ｇ／Ｌ、または約２．２ｇ／Ｌの重炭酸ナトリウムが補充されている。合成培地には、Ｌ－グルタミン（最終濃度約２ｍＭ）、１つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ、最終濃度約１００μＭ）、２－メルカプトエタノール（最終濃度約１００μＭ）がさらに補充されていてもよい。

【０８０５】

いくつかの実施形態では、Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｔｒａｎｓｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，４（１）２０１５（ｄｏｉ：１０．１０３８／ｃｔｉ．２０１４．３１）に記載の合成培地が、本発明において有用である。簡潔には、ＲＰＭＩまたはＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）を基礎細胞培地として使用し、０、２％、５％、または１０％のいずれかのＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａ

ｃｅｍｅｎｔを補充した。

【０８０６】

いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ベーターメルカプトエタノール（ＢＭＥまたはβＭＥ、２－メルカプトエタノールとしても知られる、ＣＡＳ６０－２４－２）を欠いている。

【０８０７】

腫瘍断片の調製（及び任意の拡張前刺激）後、結果として得られた細胞（すなわち、断片）は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長を好む条件下で、ＩＬ－２を含む血清中で培養される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を有する不活性化ヒトＡＢ血清を含む培地中２ｍＬのウェル中（または、いくつかの事例では、本明細書で概説されるように、ＡＰＣ細胞集団の存在下）でインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に１０～１４日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約1×10^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、第１の拡張中の成長培地は、ＩＬ－２またはそのバリアントを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬは、組換えヒトＩＬ－２（ｒｈＩＬ－２）である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき$20\sim30\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき20×10^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき25×10^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき30×10^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、$4\sim8\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、$5\sim7\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、6×10^{6}ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、実施例５に記載されるように調製される。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約１０，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、または約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、約４０００ＩＵ／ｍＬ、約４５００ＩＵ／ｍＬ、約５０００ＩＵ／ｍＬ、約５５００ＩＵ／ｍＬ、約６０００ＩＵ／ｍＬ、約６５００ＩＵ／ｍＬ、約７０００ＩＵ／ｍＬ、約７５００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬ、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬ、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【０８０８】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、抗ＣＤ３アゴニスト抗体、例えば、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、及び約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇの間、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含まない。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３抗体は、ムロモナブである。例えば、表１を参照されたい。

【０８０９】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、細胞培養培地中に１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは４－１ＢＢアゴニストであり、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、ＥＵ－１０１、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリアント、バイオシミラー、及び組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、０．１μｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。

【０８１０】

いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、細胞培養培地は、ＩＬ－２を約３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、及びＯＫＴ－３を約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０８１１】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、それは、ＣＭ１（培養培地１）と称される。いくつかの実施形態では、ＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充した、ＧｌｕｔａＭＡＸを含むＲＰＭＩ１６４０からなる。培養物が４０ｍＬ容量及び１０ｃｍ^{2}ガス透過性シリコン底部（例えば、Ｇ－ＲＥＸ１０、Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ　Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ，Ｎｅｗ　Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ）を有するガス透過性フラスコ内で開始される実施形態では（図１）、ＩＬ－２を含む１０～４０ｍＬのＣＭ中の１０～４０×１０^{6}個の生きた腫瘍消化細胞または５～３０個の腫瘍断片を、各フラスコに入れた。Ｇ－ＲＥＸ１０及び２４ウェルプレートの両方を、５％　CO_2中３７℃の加湿インキュベーター内でインキュベートし、培養開始から５日後、培地の半分を取り除き、新たなＣＭ及びＩＬ－２と交換し、５日後、培地の半分を２～３日毎に交換した。いくつかの実施形態では、ＣＭは、実施例に記載されるＣＭ１であり、実施例１を参照されたい。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地は、ＩＬ－２を含む。

【０８１２】

いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、第１の拡張（例えば、ＲＥＰ前と称されることもあるものを含み得る、図１または図８のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含む）プロセスは、３～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、実施例で考察され、かつ図４及び図５に示されるように、例えば、図１または図８

のステップＢに記載される拡張も含む、第１の拡張（例えば、ＲＥＰ前と称されることもあるものを含み得る、図１または図８のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含む）は、７～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、ステップＢの第１の拡張は、１０～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、例えば、図１または図８のステップＢに記載される拡張において考察されるように、１１日に短縮される。

【０８１３】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、または１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、３日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、４日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、５日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、６日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、７日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、８日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、９日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１０日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１１日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１２日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１３日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、３日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、４日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、５日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、６日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、７日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、８日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、９日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１０日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１１日間続行することができる。

【０８１４】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１の組み合わせは、第１の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図１または図８による、かつ本明細書に記載のステップＢのプロセス中を含む、第１の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の組み合わせは、第１の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図１または図８による、かつ本明細書に記載のステップＢのプロセス中に含まれ得る。

【０８１５】

いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、第１の拡張（ＲＥＰ前と称されるプロセスを含む、例えば、図１または図８によるステップＢ）プロセスは、３～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、ステップＢの第１の拡張は、７～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、ステップＢの第１の拡張は、１０～１４日に短

縮される。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、１１日に短縮される。
【０８１６】
いくつかの実施形態では、第１の拡張、例えば、図１または図８によるステップＢは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。
【０８１７】
１．サイトカイン及び他の添加物
いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第２０１７／０１０７４９０Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせを用いて可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２及びＩＬ－１５、ＩＬ－２及びＩＬ－２１、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１及びＩＬ－２、またはＩＬ－１５及びＩＬ－２１が含まれる。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにＴ細胞の生成に特に有利に働く。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、低濃度、例えば、約１０ＩＵ／ｍＬ、約２０ＩＵ／ｍＬ、約３０ＩＵ／ｍＬ、約４０ＩＵ／ｍＬ、約５０ＩＵ／ｍＬ、約１００ＩＵ／ｍＬ、約２００ＩＵ／ｍＬ、約３００ＩＵ／ｍＬ、約４００ＩＵ／ｍＬ、約５００ＩＵ／ｍＬ、約６００ＩＵ／ｍＬ、約７００ＩＵ／ｍＬ、約８００ＩＵ／ｍＬ、約９００ＩＵ／ｍＬ、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、または約４０００ＩＵ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、約１０～４０００ＩＵ／ｍＬ、約１００～３０００ＩＵ／ｍＬ、約５００～２０００ＩＵ／ＭＬ、または約１０００～１５００ＩＵ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、約１０００ＩＵ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、約１ｎｇ／ｍＬ、約２ｎｇ／ｍＬ、約３ｎｇ／ｍＬ、約４ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、または約１００ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、約１０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、約１ｎｇ／ｍＬ、約２ｎｇ／ｍＬ、約３ｎｇ／ｍＬ、約４ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約１５０ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約２５０ｎｇ／ｍＬ、または約３００ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、約１０ｎｇ／ｍＬで添加され、ＩＬ－２１は、約３０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のうちの１つ以上は、ステップＢ中、例えば、ステップＢのＤ０及びＤ３、Ｄ０及びＤ４、Ｄ０及びＤ５、Ｄ０及びＤ６、Ｄ０及びＤ７、Ｄ０及びＤ８に２回添加される。
【０８１８】
いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＫＴ－３抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、４－１ＢＢアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＸ－４０アゴニストの、培養培地への添加を含み得る。他の実施形態では、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（ＰＰＡＲ）－ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーターＩ－アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第２０１９

／０３０７７９６　Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップＢ中に培養培地で使用されてもよい。

【０８１９】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、培養培地中のタンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤（ＡＫＴｉ）の添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、ＡＫＴ阻害剤を含む培地中で培養され、ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}及び／またはＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性濃縮ＴＩＬ集団を取得する。いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イパタセルチブ、ＧＳＫ６９０６９３、ＧＳＫ２１４１７９５、ＧＳＫ２１１０１８３、ＡＺＤ５３６３、ＧＤＣ－００６８、ＡＴ７８６７、ＣＣＴ１２８９３０、ＭＫ－２２０６、ＢＡＹ１１２５９７６、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、ホノキオール、及びそれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イパタセルチブである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を、約０．１μＭ、約０．２μＭ、約０．３μＭ、約０．４μＭ、約０．５μＭ、約０．６μＭ、約０．７μＭ、約０．８μＭ、約０．９μＭ、約１μＭ、約１．１μＭ、約１．２μＭ、約１．３μＭ、約１．４μＭ、約１．５μＭ、約１．６μＭ、約１．７μＭ、約１．８μＭ、約１．９μＭ、約２μＭ、約２．１μＭ、約２．２μＭ、約２．３μＭ、約２．４μＭ、約２．５μＭ、約２．６μＭ、約２．７μＭ、約２．８μＭ、約２．９μＭ、約３μＭ、約３．５μＭ、約４μＭ、約４．５μＭ、約５μＭ、約６μＭ、約７μＭ、約８μＭ、約９μＭ、約１０μＭ、約２０μＭ、約３０μＭ、約４０μＭ、約５０μＭ、約６０μＭ、約７０μＭ、約８０μＭ、約９０μＭ、または約１００μＭのＡＫＴ阻害剤を含む培地中で培養する。

【０８２０】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、Ｄ０、Ｄ１またはＤ２において、ＣＤ４０アゴニスト、例えば、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０アゴニスト抗体の添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０Ｌが添加される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ４０アゴニスト抗体が添加される。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約４５ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約５５ｎｇ／ｍＬ、または約６０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、約３０ｎｇ／ｍＬで添加される。

【０８２１】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、Ｄ０、Ｄ１またはＤ２において、ＩＦＮγの添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ＩＦＮγが添加される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮγは、約５０ｎｇ／ｍＬ、約５５ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約６５ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約７５ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約８５ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約９５ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約１０５ｎｇ／ｍＬ、約１１０ｎｇ／ｍＬ、約１１５ｎｇ／ｍＬ、約１２０ｎｇ／ｍＬ、約１２５ｎｇ／ｍＬ、約１３０ｎｇ／ｍＬ、約１３５ｎｇ／ｍＬ、約１４０ｎｇ／ｍＬ、約１４５ｎｇ／ｍＬ、約１５０ｎｇ／ｍＬ、約１５５ｎｇ／ｍＬ、約１６０ｎｇ／ｍＬ、約１６５ｎｇ／ｍＬ、約１７０ｎｇ／ｍＬ、約１７５ｎｇ／ｍＬ、約１８０ｎｇ／ｍＬ、約１８５ｎｇ／ｍＬ、約１９０ｎｇ／ｍＬ、約１９５ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約２０５ｎｇ／ｍＬ、約２１０ｎｇ／ｍＬ、約２１５ｎｇ／ｍＬ、約２２０ｎｇ／ｍＬ、約２２５ｎｇ／ｍＬ、約２３０ｎｇ／ｍＬ、約２３５ｎｇ／ｍＬ、約２４０ｎｇ／ｍＬ、約２４５ｎｇ／ｍＬ、約２５０ｎｇ／ｍＬ、約２５５ｎｇ／ｍＬ、約２６０ｎｇ／ｍＬ、約２６５ｎｇ／ｍＬ、約２７０ｎｇ／ｍＬ、約２７５ｎｇ／ｍＬ、約２８０ｎｇ／ｍＬ、約２８５ｎｇ／ｍＬ、約２９０ｎｇ／ｍＬ、約２９５ｎｇ／ｍＬ、または約３００ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮγは、約２００ｎｇ／ｍＬで添加される。

【０８２２】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、Ｄ０、Ｄ１またはＤ２において、抗ＰＤ－１抗体の添加を含み得る。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、約５μｇ／ｍ

Ｌ、約１０μｇ／ｍＬ、約１５μｇ／ｍＬ、約２０μｇ／ｍＬ、約２５μｇ／ｍＬ、約３０μｇ／ｍＬ、約３５μｇ／ｍＬ、約４０μｇ／ｍＬ、約４５μｇ／ｍＬ、約５０μｇ／ｍＬ、約５５μｇ／ｍＬ、または約６０μｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、約１０μｇ／ｍＬで添加される。

【０８２３】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、Ｄ０、Ｄ１またはＤ２において、抗ＣＴＬＡ－４抗体の添加を含み得る。いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、約５μｇ／ｍＬ、約１０μｇ／ｍＬ、約１５μｇ／ｍＬ、約２０μｇ／ｍＬ、約２５μｇ／ｍＬ、約３０μｇ／ｍＬ、約３５μｇ／ｍＬ、約４０μｇ／ｍＬ、約４５μｇ／ｍＬ、約５０μｇ／ｍＬ、約５５μｇ／ｍＬ、または約６０μｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、約１０μｇ／ｍＬで添加される。

【０８２４】

Ｃ．ステップＣ：第１の拡張から第２の拡張へと移行

いくつかの事例では、例えば、図１または図８に示されるステップＢから取得されたＴＩＬ集団を含む、第１の拡張から取得されたバルクＴＩＬ集団は、以下で考察されるプロトコルを使用して、直ちに凍結保存され得る。代替的に、第２のＴＩＬ集団と称される第１の拡張から取得されたＴＩＬ集団は、以下で考察されるように、第２の拡張（ＲＥＰと称されることもある拡張を含み得る）に供され、その後、凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾ＴＩＬが治療に使用される場合、第１のＴＩＬ集団（バルクＴＩＬ集団と称されることもある）または第２のＴＩＬ集団（いくつかの実施形態では、ＲＥＰ　ＴＩＬ集団と称される集団を含み得る）は、拡張前または第１の拡張後及び第２の拡張前に、好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。

【０８２５】

いくつかの実施形態では、第１の拡張から（例えば、図１または図８に示されるステップＢから）取得されたＴＩＬは、選択のために表現型決定されるまで保管される。いくつかの実施形態では、第１の拡張から（例えば、図１または図８に示されるステップＢから）取得されたＴＩＬは保管されず、第２の拡張に直接進む。いくつかの実施形態では、第１の拡張から取得されたＴＩＬは、第１の拡張後及び第２の拡張前に凍結保存されない。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、または１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約３日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約４日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約４日～１０日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約７日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約１４日で起こる。

【０８２６】

いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、または１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから３日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから４日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから５日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから６日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから７日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってか

ら８日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから９日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１０日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１１日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１２日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１３日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから２日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから３日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから４日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから５日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから６日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから７日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから８日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから９日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１０日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１１日で起こる。

【０８２７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、第１の拡張後及び第２の拡張前に保管されず、ＴＩＬは、第２の拡張に直接進む（例えば、いくつかの実施形態では、図１及び／または図８に示されるステップＢからステップＤへの移行中に保管されない）。いくつかの実施形態では、移行は、本明細書に記載されるように、閉鎖系内で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張由来のＴＩＬである第２のＴＩＬ集団は、移行期間なしで第２の拡張に直接進む。

【０８２８】

いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行、例えば、図１または図８によるステップＣは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００バイオリアクターである。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【０８２９】

Ｄ．ステップＤ：第２の拡張

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ細胞集団は、採取及び初期バルク処理後、例えば、図１または図８に示される、ステップＡ及びステップＢ、ならびにステップＣと称される移行後に数が拡張される）。このさらなる拡張は、本明細書では第２の拡張と称され、これは、当該技術分野で一般に急速拡張プロセス（ＲＥＰ）と称される拡張プロセス、ならびに図１または図８のステップＤに示されるプロセスを含み得る。第２の拡張は、一般に、フィーダー細胞、サイトカイン源、及び抗ＣＤ３抗体を含むいくつかの成分を含む培養培地を使用して、ガス透過性容器内で達成される。

【０８３０】

いくつかの実施形態では、第２の拡張または第２のＴＩＬ拡張（ＲＥＰと称されることもある拡張、ならびに図１のステップＤに示されるプロセスを含み得る）は、当業者に知られている任意のＴＩＬフラスコまたは容器を使用して行われ得る。いくつかの実施形態

では、第２のＴＩＬ拡張は、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、または１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約７日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約８日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約９日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１０日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１１日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１２日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１３日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１４日間続行することができる。

【０８３１】

いくつかの実施形態では、第２の拡張は、本開示の方法（例えば、ＲＥＰと称される拡張、ならびに図１または図８のステップＤに示されるプロセスを含む）を使用して、ガス透過性容器内で行われ得る。例えば、ＴＩＬは、インターロイキン－２（ＩＬ－２）またはインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）の存在下で非特異的Ｔ細胞受容体刺激を使用して、急速に拡張され得る。非特異的Ｔ細胞受容体刺激は、例えば、抗ＣＤ３抗体、例えば約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３、マウスモノクローナル抗ＣＤ３抗体（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ，Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪもしくはＭｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡから市販）またはＵＨＣＴ－１（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡから市販）を含み得る。ＴＩＬは、がんのエピトープ（複数可）などの抗原性部分を含む、第２の拡張中に１つ以上の抗原を含むことによって、インビトロでＴＩＬのさらなる刺激を誘導するように拡張することができ、これは、ベクター、例えば、ヒト白血球抗原Ａ２（ＨＬＡ－Ａ２）結合ペプチド、例えば、０．３μＭ　ＭＡＲＴ－１：２６－３５（２７Ｌ）またはｇｐｌ００：２０９－２１７（２１０Ｍ）から、任意選択で３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２またはＩＬ－１５などのＴ細胞成長因子の存在下で任意で発現され得る。他の好適な抗原には、例えば、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、チロシナーゼがん抗原、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＳＳＸ－２、及びＶＥＧＦＲ２、またはそれらの抗原性部分が含まれ得る。ＴＩＬは、ＨＬＡ－Ａ２を発現する抗原提示細胞にパルスされたがんの同じ抗原（複数可）で再刺激することによっても急速に拡張され得る。代替的に、ＴＩＬは、例えば、例として放射線照射された自己リンパ球または放射線照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２でさらに再刺激され得る。いくつかの実施形態では、再刺激は、第２の拡張の一部として起こる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、放射線照射された自己リンパ球の存在下で、または放射線照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２を用いて起こる。

【０８３２】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１０ＩＵ／ｍＬ、約２０ＩＵ／ｍＬ、約３０ＩＵ／ｍＬ、約４０ＩＵ／ｍＬ、約５０ＩＵ／ｍＬ、約１００ＩＵ／ｍＬ、約２００ＩＵ／ｍＬ、約３００ＩＵ／ｍＬ、約４００ＩＵ／ｍＬ、約５００ＩＵ／ｍＬ、約６００ＩＵ／ｍＬ、約７００ＩＵ／ｍＬ、約８００ＩＵ／ｍＬ、約９００ＩＵ／ｍＬ、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、約４０００ＩＵ／ｍＬ、約４５００ＩＵ／ｍＬ、約５０００ＩＵ／ｍＬ、約５５００ＩＵ／ｍＬ、約６０００ＩＵ／ｍＬ、約６５００ＩＵ／ｍＬ、約７０００ＩＵ／ｍＬ、約７５００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、１０～１００ＩＵ／ｍＬ、１００～２００ＩＵ／ｍＬ、２００～３００ＩＵ／ｍＬ、３００～４００ＩＵ／ｍＬ、４００～５００ＩＵ／ｍＬ、５００～１０００ＩＵ／ｍＬ、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬ、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬ、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、または７０００～８０

００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【０８３３】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、及び約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇの間、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含まない。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３抗体は、ムロモナブである。

【０８３４】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、細胞培養培地中に１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは４－１ＢＢアゴニストであり、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、ＥＵ－１０１、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリアント、バイオシミラー、及び組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、０．１μｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。

【０８３５】

いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、細胞培養培地は、ＩＬ－２を約３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、及びＯＫＴ－３を約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０８３６】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１の組み合わせは、第２の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図１または図８による、かつ本明細書に記載のステップＤのプロセス中を含む、第２の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の組み合わせは、第２の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図１または図８による、かつ本明細書に記載のステップＤのプロセス中に含まれ得る。

【０８３７】

いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、抗原提示フィーダー細胞、及び任意でＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む補充された細胞培養培地において実施され得る。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、補充された細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、補充された細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、第２の細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ、抗原提示フィーダー細胞とも称される）を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞（すなわち、抗原提示細胞）を含む細胞培養培地中で起こる。

【０８３８】
いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１６０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１４０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、または約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－１５をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。

【０８３９】
いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約４ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、または約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２１をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。

【０８４０】
いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣ及び／または抗原提示細胞に対する比は、約１：２５、約１：５０、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００、約１：３２５、約１：３５０、約１：３７５、約１：４００、または約１：５００である。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣに対する比は、１：５０～１：３００である。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣに対する比は、１：１００～１：２００である。

【０８４１】
いくつかの実施形態では、ＲＥＰ及び／または第２の拡張は、バルクＴＩＬが１５０ｍＬの培地中の１００倍または２００倍過剰の不活性化フィーダー細胞、３０ｍｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗ＣＤ３抗体、及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２と混合されているフラスコ内で行われる。細胞が代替の成長チャンバに移されるまで、培地交換が行われる（一般に、新鮮な培地との呼吸による３分の２の培地交換）。代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、Ｇ－ＲＥＸフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【０８４２】

いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、第２の拡張（ＲＥＰプロセスと称されるプロセスを含み得る）は、７～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、１１日に短縮される。

【０８４３】

いくつかの実施形態では、ＲＥＰ及び／または第２の拡張は、以前に記載されたＴ－１７５フラスコ及びガス透過性バッグ（Ｔｒａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００８，３１，７４２－５１、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００３，２６，３３２－４２）またはガス透過性培養器具（Ｇ－ＲＥＸフラスコ）を使用して行われ得る。いくつかの実施形態では、第２の拡張（急速拡張と称される拡張を含む）は、Ｔ－１７５フラスコ内で行われ、１５０ｍＬの培地に懸濁された約１×１０^{6}個のＴＩＬが、各Ｔ－１７５フラスコに添加され得る。ＴＩＬは、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３を補充した、１：１のＣＭとＡＩＭ－Ｖ培地との混合物中で培養され得る。Ｔ－１７５フラスコを、５％　CO_2中３７℃でインキュベートすることができる。培地の半分が、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む５０／５０培地を使用して５日目に交換され得る。いくつかの実施形態では、７日目に、２つのＴ－１７５フラスコからの細胞が３Ｌバッグ内で組み合わせられ得、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む３００ｍＬのＡＩＭ　Ｖが、３００ｍＬのＴＩＬ懸濁液に添加された。各バッグ内の細胞の数を、毎日または隔日カウントし、新鮮な培地を添加して、０．５～２．０×１０^{6}細胞／ｍＬの間の細胞数を維持した。

【０８４４】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張、ならびに図１または図８のステップＤで参照される拡張を含み得る）は、１００ｃｍのガス透過性シリコン底部（Ｇ－ＲＥＸ－１００、Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ　Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｎｅｗ　Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ，ＵＳＡから市販されている）を有する５００ｍＬ容量のガス透過性フラスコ内で行われ得る。５×１０^{6}または１０×１０^{6}ＴＩＬは、５％ヒトＡＢ血清、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）を補充した４００ｍＬの５０／５０培地中、ＰＢＭＣで培養され得る。Ｇ－ＲＥＸ－１００フラスコを、５％　CO_2中３７℃でインキュベートすることができる。５日目に、２５０ｍＬの上清が除去され、遠心分離ボトルに入れられ、１５００ｒｐｍ（４９１×ｇ）で１０分間遠心分離される。ＴＩＬペレットが、５％ヒトＡＢ血清、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬの新鮮な培地で再懸濁され、元のＧ－ＲＥＸ－１００フラスコに戻し追加され得る。ＴＩＬがＧ－ＲＥＸ－１００フラスコ内で連続的に拡張される場合、７日目に、各Ｇ－ＲＥＸ－１００内のＴＩＬが、各フラスコに存在する３００ｍＬの培地に懸濁され得、細胞懸濁液が３つの１００ｍＬアリコートに分割され得、それを使用して、３つのＧ－ＲＥＸ－１００フラスコに播種することができる。その後、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのＡＩＭ－Ｖが各フラスコに添加され得る。Ｇ－ＲＥＸ－１００フラスコが５％　CO_2中３７℃でインキュベートされ得、４日後に、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのＡＩＭ－Ｖが、各Ｇ－ＲＥＸ－１００フラスコに添加され得る。培養１４日目に、細胞が採取され得る。

【０８４５】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）は、バルクＴＩＬが１５０ｍＬの培地中の１００倍または２００倍過剰の不活性化フィーダー細胞、３０ｍｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗ＣＤ３抗体、及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２と混合されているフラスコで行われる。いくつかの実施形態では、培地交換は、細胞が代替の成長チャンバに移されるまで行われる。いくつかの実施形態では、培地の３分の２が、新鮮な培地と呼吸によって交換される。いくつかの実施形態では、代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、Ｇ－ＲＥＸフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【０８４６】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される増殖を含む）が行われ、優れ

た腫瘍反応性のためにＴＩＬが選択されるステップをさらに含む。当該技術分野で知られている任意の選択方法が使用され得る。例えば、米国特許出願公開第２０１６／００１００５８Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている方法が、優れた腫瘍反応性のためのＴＩＬの選択に使用され得る。

【０８４７】

任意選択で、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準的なアッセイを使用して、第２の拡張（ＲＥＰ拡張と称される拡張を含む）後に行われ得る。例えば、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンブルー排除アッセイが、バルクＴＩＬの試料上で行われ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ試料は、Ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２自動セルカウンター（Ｎｅｘｃｅｌｏｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｌａｗｒｅｎｃｅ，ＭＡ）を使用して計数され、生存率が決定され得る。いくつかの実施形態では、生存率は、標準のＣｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２　Ｉｍａｇｅ　Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ　Ａｕｔｏｍａｔｉｃ　Ｃｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｅｒプロトコルに従って決定される。

【０８４８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）は、以前に記載されているＴ－１７５フラスコ及びガス透過性バッグ（Ｔｒａｎ，ｅｔ　ａｌ．，２００８，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，３１：７４２－７５１及びＤｕｄｌｅｙ，ｅｔ　ａｌ．２００３，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２６：３３２－３４２）またはガス透過性Ｇ－ＲＥＸフラスコを使用して行われ得る。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、フラスコを使用して行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ガス透過性Ｇ－ＲＥＸフラスコを使用して行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、Ｔ－１７５フラスコ内で行われ、約１×１０^{6}個のＴＩＬが約１５０ｍＬの培地に懸濁され、これが各Ｔ－１７５フラスコに添加される。ＴＩＬは、「フィーダー」細胞として１対１００の比で放射線照射された（５０Ｇｙ）同種異系ＰＢＭＣと培養され、細胞が、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３を補充した、１：１のＣＭとＡＩＭ－Ｖ培地との混合物（５０／５０培地）中で培養された。Ｔ－１７５フラスコを、５％ＣＯ$_{2}$中３７℃でインキュベートする。いくつかの実施形態では、培地の半分が、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む５０／５０培地を使用して５日目に交換される。いくつかの実施形態では、７日目に、２つのＴ－１７５フラスコからの細胞が３Ｌバッグ内で組み合わせられ、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む３００ｍＬのＡＩＭ－Ｖが、３００ｍＬのＴＩＬ懸濁液に添加される。各バッグ内の細胞の数が毎日または隔日計数され得、新鮮な培地が添加されて、約０．５～約２．０×１０^{6}細胞／ｍＬの細胞数を維持することができる。

【０８４９】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）は、１００ｃｍ^{2}のガス透過性シリコン底部（Ｇ－ＲＥＸ－１００、Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ）を有する５００ｍＬ容量のフラスコ内で行われ、約５×１０^{6}または１０×１０^{6}ＴＩＬが、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３を補充した、４００ｍＬの５０／５０培地中、１対１００の比で放射線照射された同種異系ＰＢＭＣと培養される。Ｇ－ＲＥＸ－１００フラスコを、５％　ＣＯ$_{2}$中３７℃でインキュベートする。いくつかの実施形態では、５日目に、２５０ｍＬの上清を除去し、遠心分離ボトルに入れ、１５００ｒｐｍ（４９１ｇ）で１０分間遠心分離する。その後、ＴＩＬペレットが、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬの新鮮な５０／５０培地に再懸濁され、元のＧ－ＲＥＸ－１００フラスコに戻し追加され得る。ＴＩＬがＧ－ＲＥＸ－１００フラスコ内で連続的に拡張される実施形態では、７日目に、各Ｇ－ＲＥＸ－１００内のＴＩＬを、各フラスコ内に存在する３００ｍＬの培地に懸濁し、細胞懸濁液を３つの１００ｍＬアリコートに分割し、それを使用して３つのＧ－ＲＥＸ－１００フラスコに播種する。その後、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのＡＩＭ－Ｖが各フラスコに添加される。Ｇ－ＲＥＸ－１００フラスコが５％　ＣＯ$_{2}$中３７℃でインキュベートされ、４日後に、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのＡＩＭ－Ｖが、各Ｇ－

ＲＥＸ－１００フラスコに添加される。培養１４日目に、細胞が採取される。

【０８５０】

Ｔリンパ球及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、及びＣ（一定）は、免疫グロブリン及びＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第２の拡張において取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加する。

【０８５１】

いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地と称されることもある）は、以下でさらに詳細に考察されるように、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、ならびに抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。

【０８５２】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される拡張プロセスで使用される培地は、無血清培地または合成培地である。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、血清含有培地のロット間の変動に部分的に起因する実験変動を防止及び／または減少させるために使用される。

【０８５３】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。

【０８５４】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｅｒｕｍ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ、ＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代用物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代用物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代用物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の抗生物質、及び１つ以上の微量元素のうちの１つ以上が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロ

キシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／または２－メルカプトエタノールをさらに含む。

【０８５５】

いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔは、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＳＴ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。

【０８５６】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地中の総血清代替物濃度（ｖｏｌ％）は、総無血清または合成培地の約１体積％、２体積％、３体積％、４体積％、５体積％、６体積％、７体積％、８体積％、９体積％、１０体積％、１１体積％、１２体積％、１３体積％、１４体積％、１５体積％、１６体積％、１７体積％、１８体積％、１９体積％、または２０体積％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約３％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約５％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約１０％である。

【０８５７】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【０８５８】

いくつかの実施形態では、合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆ

ｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形

態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【０８５９】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約０．１ｍＭ～約１０ｍＭ、０．５ｍＭ～約９ｍＭ、１ｍＭ～約８ｍＭ、２ｍＭ～約７ｍＭ、３ｍＭ～約６ｍＭ、または４ｍＭ～約５ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約２ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。

【０８６０】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５ｍＭ～約１５０ｍＭ、１０ｍＭ～約１４０ｍＭ、１５ｍＭ～約１３０ｍＭ、２０ｍＭ～約１２０ｍＭ、２５ｍＭ～約１１０ｍＭ、３０ｍＭ～約１００ｍＭ、３５ｍＭ～約９５ｍＭ、４０ｍＭ～約９０ｍＭ、４５ｍＭ～約８５ｍＭ、５０ｍＭ～約８０ｍＭ、５５ｍＭ～約７５ｍＭ、６０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約６５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【０８６１】

いくつかの実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる国際ＰＣＴ公開第ＷＯ／１９９８／０３０６７９号に記載されている合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の微量元素、及び１つ以上の抗生物質からなる群から選択される１つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベータ－メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、及び１つ以上の微量元素からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥ

Ｍ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

【０８６２】

いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌの範囲であり、Ｌ－ヒスチジンの濃度は、約５～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－イソロイシンの濃度は、約５～３００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－メチオニンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－フェニルアラニンの濃度は、約５～４００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－プロリンの濃度は、約１～１０００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－ヒドロキシプロリンの濃度は、約１～４５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－セリンの濃度は、約１～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－スレオニンの濃度は、約１０～５００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－トリプトファンの濃度は、約２～１１０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－チロシンの濃度は、約３～１７５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－バリンの濃度は、約５～５００ｍｇ／Ｌであり、チアミンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、還元型グルタチオンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩の濃度は、約１～２００ｍｇ／Ｌであり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約１～５０ｍｇ／Ｌであり、インスリンの濃度は、約１～１００ｍｇ／Ｌであり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約０．０００００１～０．０００１ｍｇ／Ｌであり、アルブミン（例えば、ＡｌｂｕＭＡＸ（登録商標）Ｉ）の濃度は、約５０００～５０，０００ｍｇ／Ｌである。

【０８６３】

いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地中の濃度範囲」という見出しの下の列にリストされた濃度範囲で存在する。他の実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされた最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかでは、無血清サプリメントは、表４の「サプリメント中の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。

【０８６４】

いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約２６０～３５０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約２８０～３１０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、合成培地には、最大約３．７ｇ／Ｌ、または約２．２ｇ／Ｌの重炭酸ナトリウムが補充されている。合成培地には、Ｌ－グルタミン（最終濃度約２ｍＭ）、１つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ、最終濃度約１００μＭ）、２－メルカプトエタノール（最終濃度約１００μＭ）がさらに補充されていてもよい。

【０８６５】

いくつかの実施形態では、Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｔｒａｎｓｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，４（１）２０１５（ｄｏｉ：１０．１０３８／ｃｔｉ．２０１４．３１）に記載の合成培地が、本発明において有用である。簡潔には、ＲＰＭＩまたはＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）を基礎細胞培地として使用し、０、２％、５％、または１０％のいずれかのＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔを補充した。

【０８６６】

いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ベーターメルカプトエタノール（ＢＭＥまたはβＭＥ、２－メルカプトエタノールとしても知られる、ＣＡＳ６０－２４－２）を欠いている。

【０８６７】

いくつかの実施形態では、第２の拡張、例えば、図１または図８によるステップＤは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイ

オリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【０８６８】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～７日間培養することによって急速なまたは第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養でのＴＩＬを、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００－ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来のＴＩＬを、第２の容器内でのより大規模な培養で約４～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。

【０８６９】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～７日間培養することによって急速なまたは第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴＩＬの一部が、第２の小規模培養で約４～７日間培養される。

【０８７０】

いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、ＴＩＬの複数の約２～５亜集団に配分される。

【０８７１】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～７日間培養することによって急速なまたは第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴＩＬの一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。

【０８７２】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約５日間培養することによって急速なまたは第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴＩＬの一部が、より大規模な培養で約６日間培養される。

【０８７３】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第２の拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速なまたは第２の拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個のＴＩＬ、少なくとも10^9個のＴＩＬ、または少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。例示的な一実施形態では、各第２の容器は、少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。

【０８７４】

いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の亜集団に配分される。

いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２～５亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２、３、４、または５亜集団に配分される。

【０８７５】

いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の完了後、複数の亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の完了後、１つ以上のＴＩＬの亜集団を一緒にプールして、治療有効量のＴＩＬを産生する。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、ＴＩＬの各亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。

【０８７６】

いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張は、複数のステップに分割される前に、約３～７日間行われる。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の分裂は、急速または第２の拡張の開始後約３日目、４日目、５日目、６日目、または７日目に起こる。

【０８７７】

いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の分裂は、第１の拡張（すなわち、ＲＥＰ前拡張）の開始後の約７日目、８日目、９日目、１０日目、１１日目、１２日目、１３日目、１４日目、１５日目、または１６日目、１７日目、または１８日目に起こる。例示的な一実施形態では、急速または第２の拡張の分裂は、第１の拡張の開始後約１６日目に起こる。

【０８７８】

いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張は、分裂後約７～１１日間、さらに行われる。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張は、分裂後約５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日間、さらに行われる。

【０８７９】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地と同じ成分を含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地とは異なる成分を含む。

【０８８０】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む。

【０８８１】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な細胞培養培地で置き換えることによって生成される。

【０８８２】

いくつかの実施形態では、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速

または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。

【０８８３】

いくつかの実施形態では、急速な膨張の分裂は、閉鎖系において起こる。

【０８８４】

いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張中のＴＩＬ培養物のスケールアップは、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に添加すること（ＴＩＬを供給することとも称される）を含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に頻繁に添加することを含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に一定の間隔で添加することを含む。いくつかの実施形態では、新鮮な細胞培養培地は、一定の流れを介してＴＩＬに供給される。いくつかの実施形態では、ＸｕｒｉＷ２５などの自動細胞拡張系は、急速な膨張及び供給のために使用される。

【０８８５】

１．フィーダー細胞及び抗原提示細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順（例えば、図１または図８のステップＤに記載されるような拡張、ならびにＲＥＰと称されるものを含む）は、ＲＥＰ　ＴＩＬ拡張中及び／または第２の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な献血者由来の標準の全血単位から得られる末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。

【０８８６】

一般に、同種異系ＰＢＭＣは、放射線照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、実施例に記載されるように、ＲＥＰ手順で使用され、これは、放射線照射された同種異系ＰＢＭＣの複製無能力を評価するための例示的なプロトコルを提供する。

【０８８７】

いくつかの実施形態では、１４日目の生細胞の総数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数よりも少ない場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。

【０８８８】

いくつかの実施形態では、７日目及び１４日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【０８８９】

いくつかの実施形態では、７日目及び１４日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、５～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び１０００～６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１０～５０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～５０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２０～４０ｎｇ／ｍＬ

のＯＫＴ３抗体及び２０００～４０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２５～３５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２５００～３５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【０８９０】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、約１：２５、約１：５０、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００、約１：３２５、約１：３５０、約１：３７５、約１：４００、または約１：５００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：５０～１：３００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：１００～１：２００である。

【０８９１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約２．５×10^9フィーダー細胞：約１００×10^6ＴＩＬの比を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約２．５×10^9フィーダー細胞：約５０×10^6ＴＩＬの比を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約２．５×10^9フィーダー細胞：約２５×10^6ＴＩＬを必要とする。

【０８９２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、第２の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な献血者由来の標準の全血単位から得られる末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、人工抗原提示（ａＡＰＣ）細胞がＰＢＭＣの代わりに使用される。

【０８９３】

一般に、同種異系ＰＢＭＣは、放射線照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、図及び実施例に記載される例示的な手順を含む、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順で使用される。

【０８９４】

いくつかの実施形態では、人工抗原提示細胞は、ＰＢＭＣの代替物として、またはＰＢＭＣと組み合わせて、第２の拡張において使用される。

【０８９５】

２．サイトカイン及び他の添加物

本明細書に記載の拡張方法は、一般に、当該技術分野で知られているように、高用量のサイトカイン、特にＩＬ－２を含む培養培地を使用する。

【０８９６】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの急速拡張及び／または第２の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第２０１７／０１０７４９０Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせを用いて可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２及びＩＬ－１５、ＩＬ－２及びＩＬ－２１、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１及びＩＬ－２、またはＩＬ－１５及びＩＬ－２１が含まれる。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにＴ細胞の生成に特に有利に働く。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、低濃度、例えば、約１０ＩＵ／ｍＬ、約２０ＩＵ／ｍＬ、約３０ＩＵ／ｍＬ、約４０ＩＵ／ｍＬ、約５０ＩＵ／ｍＬ、約１００ＩＵ／ｍＬ、約２００ＩＵ／ｍＬ、約３００ＩＵ／ｍＬ、約４００ＩＵ／ｍＬ、約５００ＩＵ／ｍＬ、約６００ＩＵ／ｍＬ、約７００ＩＵ／ｍＬ、約８００ＩＵ／ｍＬ、約９００ＩＵ／ｍＬ、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、または

約４０００ＩＵ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、約１０～４０００ＩＵ／ｍＬ、約１００～３０００ＩＵ／ｍＬ、約５００～２０００ＩＵ／ＭＬ、または約１０００～１５００ＩＵ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、約１０００ＩＵ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、約１ｎｇ／ｍＬ、約２ｎｇ／ｍＬ、約３ｎｇ／ｍＬ、約４ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、または約１００ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、約１０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、約１ｎｇ／ｍＬ、約２ｎｇ／ｍＬ、約３ｎｇ／ｍＬ、約４ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約１５０ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約２５０ｎｇ／ｍＬ、または約３００ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、約１０ｎｇ／ｍＬで添加され、ＩＬ－２１は、約３０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のうちの１つ以上は、ステップＢ中、例えば、ステップＢのＤ０及びＤ３、Ｄ０及びＤ４、Ｄ０及びＤ５、Ｄ０及びＤ６、Ｄ０及びＤ７、Ｄ０及びＤ８に２回添加される。

【０８９７】

いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＫＴ－３抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、４－１ＢＢアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＸ－４０アゴニストの、培養培地への添加を含み得る。加えて、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（ＰＰＡＲ）－ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーターＩ－アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第２０１９／０３０７７９６　Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップＤ中の培養培地で使用されてもよい。

【０８９８】

いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、培養培地中のタンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤（ＡＫＴｉ）の添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、ＡＫＴ阻害剤を含む培地中で培養され、ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}及び／またはＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性濃縮ＴＩＬ集団を取得する。いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イパタセルチブ、ＧＳＫ６９０６９３、ＧＳＫ２１４１７９５、ＧＳＫ２１１０１８３、ＡＺＤ５３６３、ＧＤＣ－００６８、ＡＴ７８６７、ＣＣＴ１２８９３０、ＭＫ－２２０６、ＢＡＹ１１２５９７６、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、ホノキオール、及びそれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イパタセルチブである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を、約０．１μＭ、約０．２μＭ、約０．３μＭ、約０．４μＭ、約０．５μＭ、約０．６μＭ、約０．７μＭ、約０．８μＭ、約０．９μＭ、約１μＭ、約１．１μＭ、約１．２μＭ、約１．３μＭ、約１．４μＭ、約１．５μＭ、約１．６μＭ、約１．７μＭ、約１．８μＭ、約１．９μＭ、約２μＭ、約２．１μＭ、約２．２μＭ、約２．３μＭ、約２．４μＭ、約２．５μＭ、約２．６μＭ、約２．７μＭ、約２．８μＭ、約２．９μＭ、約３μＭ、約３．５μＭ、約４μＭ、約４．５μＭ、約５μＭ、約６μＭ、約７μＭ、約８μＭ、約９μＭ、約１０μＭ、約２０μＭ、約３０μＭ、約４０μＭ、約５０μＭ、約６０μＭ、約７０μＭ、約８０μＭ、約９０μＭ、または約１００μＭのＡＫＴ阻害剤を含む培地中で培養する。

【０８９９】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７

．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１２．５ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、または約２０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、約１０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約４５ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約５５ｎｇ／ｍＬ、または約６０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、約３０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、約１０ｎｇ／ｍＬで添加され、ＩＬ－２１は、約３０ｎｇ／ｍＬで添加される。

【０９００】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、Ｄ０、Ｄ１またはＤ２において、ＣＤ４０アゴニスト、例えば、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０アゴニスト抗体の添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０Ｌが添加される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ４０アゴニスト抗体が添加される。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約４５ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約５５ｎｇ／ｍＬ、または約６０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、約３０ｎｇ／ｍＬで添加される。

【０９０１】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、Ｄ０、Ｄ１またはＤ２において、ＩＦＮγの添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ＩＦＮγが添加される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮγは、約５０ｎｇ／ｍＬ、約５５ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約６５ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約７５ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約８５ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約９５ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約１０５ｎｇ／ｍＬ、約１１０ｎｇ／ｍＬ、約１１５ｎｇ／ｍＬ、約１２０ｎｇ／ｍＬ、約１２５ｎｇ／ｍＬ、約１３０ｎｇ／ｍＬ、約１３５ｎｇ／ｍＬ、約１４０ｎｇ／ｍＬ、約１４５ｎｇ／ｍＬ、約１５０ｎｇ／ｍＬ、約１５５ｎｇ／ｍＬ、約１６０ｎｇ／ｍＬ、約１６５ｎｇ／ｍＬ、約１７０ｎｇ／ｍＬ、約１７５ｎｇ／ｍＬ、約１８０ｎｇ／ｍＬ、約１８５ｎｇ／ｍＬ、約１９０ｎｇ／ｍＬ、約１９５ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約２０５ｎｇ／ｍＬ、約２１０ｎｇ／ｍＬ、約２１５ｎｇ／ｍＬ、約２２０ｎｇ／ｍＬ、約２２５ｎｇ／ｍＬ、約２３０ｎｇ／ｍＬ、約２３５ｎｇ／ｍＬ、約２４０ｎｇ／ｍＬ、約２４５ｎｇ／ｍＬ、約２５０ｎｇ／ｍＬ、約２５５ｎｇ／ｍＬ、約２６０ｎｇ／ｍＬ、約２６５ｎｇ／ｍＬ、約２７０ｎｇ／ｍＬ、約２７５ｎｇ／ｍＬ、約２８０ｎｇ／ｍＬ、約２８５ｎｇ／ｍＬ、約２９０ｎｇ／ｍＬ、約２９５ｎｇ／ｍＬ、または約３００ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮγは、約２００ｎｇ／ｍＬで添加される。

【０９０２】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、Ｄ０、Ｄ１またはＤ２において、抗ＰＤ－１抗体の添加を含み得る。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、約５μｇ／ｍＬ、約１０μｇ／ｍＬ、約１５μｇ／ｍＬ、約２０μｇ／ｍＬ、約２５μｇ／ｍＬ、約３０μｇ／ｍＬ、約３５μｇ／ｍＬ、約４０μｇ／ｍＬ、約４５μｇ／ｍＬ、約５０μｇ／ｍＬ、約５５μｇ／ｍＬ、または約６０μｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、約１０μｇ／ｍＬで添加される。

【０９０３】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、Ｄ０、Ｄ１またはＤ２において、抗ＣＴＬＡ－４抗体の添加を含み得る。いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、約５μｇ／ｍＬ、約１０μｇ／ｍＬ、約１５μｇ／ｍＬ、約２０μｇ／ｍＬ、約２５μｇ／ｍＬ、約３０μｇ／ｍＬ、約３５μｇ／ｍＬ、約４０μｇ／ｍＬ、約４５μｇ／ｍＬ、約５０μｇ／ｍＬ、約５５μｇ／ｍＬ、または約６０μｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、約１０μｇ／ｍＬで添加される。

【０９０４】

Ｅ．ステップＥ：ＴＩＬを採取する

第２の拡張ステップ後、細胞が採取され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図１または図８に提供されるように、１、２、３、４つ、またはそれ以上の拡張ステップ後に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図１または図８に提供されるように、２つの拡張ステップ後に採取される。

【０９０５】

ＴＩＬは、例えば、遠心分離を含む、任意の適切な滅菌様式で採取され得る。ＴＩＬを採取するための方法は、当該技術分野で周知であり、いずれかのかかる既知の方法が本プロセスで用いられ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、自動化系を使用して採取される。

【０９０６】

細胞採取機及び／または細胞処理系は、例えば、Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ　Ｋａｂｉ、Ｔｏｍｔｅｃ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ、及びＩｎｏｔｅｃｈ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃを含む、様々な供給源から市販されている。任意の細胞ベースの採取機が本方法とともに用いられ得る。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理系は、膜ベースの細胞採取機である。いくつかの実施形態では、細胞採取は、ＬＯＶＯ系（Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ　Ｋａｂｉによって製造されたもの）などの細胞処理系によるものである。「ＬＯＶＯ細胞処理系」という用語は、細胞を含む溶液を、滅菌及び／または閉鎖系環境で回転膜または回転フィルターなどの膜またはフィルターをとおしてポンプ輸送し、連続フローを可能にし、細胞を処理して、ペレット化せずに上清または細胞培養培地を除去する、任意のベンダーによって製造された任意の機器または装置も指す。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理系は、滅菌閉鎖系内で、細胞分離、洗浄、流体交換、濃縮、及び／または他の細胞処理ステップを行うことができる。

【０９０７】

いくつかの実施形態では、採取、例えば、図１または図８によるステップＥは、閉鎖系バイオリアクターから行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【０９０８】

いくつかの実施形態では、図１または図８によるステップＥは、本明細書に記載のプロセスに従って行われる。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、閉鎖系の無菌性及び閉鎖性を維持するために、滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、実施例に記載の閉鎖系が用いられる。

【０９０９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、実施例に記載の方法に従って採取される。いくつかの実施形態では、１日目～１１日目の間のＴＩＬは、実施例における１１日目のＴＩＬ採取のような、本明細書で言及されるステップにおいて記載される方法を使用して採取される。いくつかの実施形態では、１２日目～２４日目の間のＴＩＬは、実施例における２２日目のＴＩＬ採取のような、本明細書で言及されるステップにおいて記載される方法を使用して採取される。いくつかの実施形態では、本発明は、（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）ＴＩＬの組み合わせについて、本明細書に記載の採取ステップに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を評価または選別することを提供する。（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせであるＴＩＬを選別するための方法は、米国出願第２０１９／０２１２３３２号（これは参照により本明細書に組み込まれる）に見出すことができる。いくつかの実施形態では、細胞選別は、Ｚｈａｎｇ，Ｘ　ｅｔ．ａｌ．，Ｓｕｒｆａｃｅ　Ｆｒｅｅ　Ｅｎｅｒｇｙ　Ａｃｔｉｖａｔｅｄ　Ｈｉｇｈ－Ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ

Ｃｅｌｌ Ｓｏｒｔｉｎｇ，Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（２０１４），８６：９３５０－９３５５（これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載される方法を使用して行われる。実施例１５及び図３５は、本発明の方法での使用に好適な選別プロトコルの追加の例示を提供する。

【０９１０】

Ｆ．ステップＦ：最終製剤及び輸液容器への移行

図１または図８に例示的な順序で提供され、かつ上及び本明細書で詳細に概説されるステップＡ～Ｅが完了した後、細胞は、注入バッグまたは無菌バイアルなどの患者への投与に使用するために容器に移される。いくつかの実施形態では、治療的に十分な数のＴＩＬが上記の拡張方法を使用して得られると、それらは、患者への投与に使用するために容器に移される。

【０９１１】

いくつかの実施形態では、本開示のＡＰＣを使用して拡張されたＴＩＬは、薬学的組成物として患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌緩衝液中のＴＩＬ懸濁液である。本開示のＰＢＭＣを使用して拡張されたＴＩＬは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、単回の動脈内または静脈内注入として投与され、これは、好ましくは、およそ３０～６０分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内投与が含まれる。

【０９１２】

いくつかの実施形態では、本発明は、（ａ）選別ステップ（ｉ）の前に、腫瘍断片または試料中のバルクＴＩＬ、または第１のＴＩＬ集団が、ＩＬ－２及び任意選択で腫瘍断片または試料から出るＴＩＬを産生するための抗生物質の第１の組み合わせを含有する細胞培養培地中で培養され、（ｉｉ）腫瘍断片または試料から出る少なくとも複数のＴＩＬが、腫瘍断片または試料から分離して、腫瘍断片または試料、腫瘍断片または試料中に残存するＴＩＬ、及び腫瘍断片または試料から出て、分離後に残存する任意のＴＩＬの混合物を産生し、（ｉｉｉ）腫瘍断片または試料、腫瘍断片または試料中に残存するＴＩＬ、及び腫瘍断片または試料から出て、分離後に残存する任意のＴＩＬの混合物を消化して、かかる混合物の消化物を産生し、（ｂ）混合物の消化物を選別して、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{ＬＯ}／ＣＤ６９^{ＬＯ}ＴＩＬ集団を産生し、（ｂ）第１の拡張を、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{ＬＯ}／ＣＤ６９^{ＬＯ}ＴＩＬ集団を使用して行うように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載される方法を提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍断片または試料から出るＴＩＬの少なくとも約１％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％以上が、腫瘍断片または試料から分離されて、混合物を産生する。

【０９１３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１の拡張前の培養ステップが、約１日～約３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９１４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１の拡張前の培養ステップが、約１、２、３、４、５、６または７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９１５】

いくつかの実施形態では、本発明は、（ａ）消化、選別、刺激、及び第１の拡張ステップが、（ｉ）腫瘍断片または試料中のバルクＴＩＬ、または第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２を含有する細胞培養培地中で培養して、腫瘍断片または試料から出るＴＩＬを産生することと、（ｉｉ）腫瘍断片または試料から出る少なくとも複数のＴＩＬを腫瘍断片または試料から分離して、腫瘍断片または試料、腫瘍断片または試料中に残存するＴＩＬ、及び腫瘍断片または試料から出て、分離後に残存する任意のＴＩＬの混合物を産生することと

、（ｉｉｉ）腫瘍断片または試料、腫瘍断片または試料中に残存するＴＩＬ、及び腫瘍断片または試料から出て、分離後に残存する任意のＴＩＬの混合物を消化して、かかる混合物の消化物を産生することと、（任意選択で、（ｉｖ）混合物の消化物を選別して、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団を産生する）を含み、（ｂ）第２の拡張が、選別されたＴＩＬ集団で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載される方法を提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍断片または試料から出るＴＩＬの少なくとも約１％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％以上が、腫瘍断片または試料から分離されて、混合物を産生する。

【０９１６】

ＩＶ．Ｇｅｎ３　ＴＩＬ製造プロセス

いかなる特定の理論にも限定されることなく、本発明の方法に記載される、Ｔ細胞の活性化をプライミングする、プライミングによる第１の拡張と、それに続くＴ細胞の活性化を促進する急速な第２の拡張により、「より若い」表現型を保持する拡張されたＴ細胞の調製が可能になると考えられ、したがって、本発明の拡張されたＴ細胞が、他の方法によって拡張されたＴ細胞よりも高いがん細胞に対する細胞傷害性を示すことが予想される。特に、本発明の方法によって教示される、抗ＣＤ３抗体（例えば、ＯＫＴ－３）、ＩＬ－２、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）への曝露によってプライミングされ、その後、追加の抗ＣＤ－３抗体（例えば、ＯＫＴ－３）、ＩＬ－２、及びＡＰＣへのその後の曝露によって促進されるＴ細胞の活性化が、培養下でＴ細胞の成熟を限定または回避し、成熟度の低い表現型を有するＴ細胞集団を産生し、これらのＴ細胞が、培養下での拡張によってあまり疲弊せず、より高いがん細胞に対する細胞傷害性を示すと考えられる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養でのＴ細胞を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来のＴ細胞を、第２の容器内でのより大規模な培養で約４～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来のＴ細胞を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴ細胞の一部が、第２の小規模培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴ細胞を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴ細胞の一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳ容器内での小規模培養で約４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴ細胞を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００　ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各

第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴ細胞の一部が、より大規模な培養で約５日間培養される。

【０９１７】

いくつかの実施形態では、急速拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個のＴＩＬ、少なくとも10^9個のＴＩＬ、または少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。例示的な一実施形態では、各第２の容器は、少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。

【０９１８】

いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２～５亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２、３、４、または５亜集団に配分される。

【０９１９】

いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、複数の亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、１つ以上のＴＩＬの亜集団を一緒にプールして、治療有効量のＴＩＬを産生する。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、ＴＩＬの各亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。

【０９２０】

いくつかの実施形態では、急速拡張は、複数のステップに分割される前に、約１～５日間行われる。いくつかの実施形態では、急速拡張の分裂は、急速拡張の開始後約１日目、２日目、３日目、４日目、または５日目に起こる。

【０９２１】

いくつかの実施形態では、急速拡張の分裂は、第１の拡張（すなわち、ＲＥＰ前拡張）の開始後約８日目、９日目、１０日目、１１日目、１２日目、または１３日目に起こる。例示的な一実施形態では、急速拡張の分裂は、プライミングによる第１の拡張の開始後約１０日目に起こる。例示的な一実施形態では、急速拡張の分裂は、第１の拡張の開始後約１１日目に起こる。

【０９２２】

いくつかの実施形態では、急速拡張は、分裂後約４～１１日間、さらに行われる。いくつかの実施形態では、急速拡張は、分裂後約３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日間、さらに行われる。

【０９２３】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地と同じ成分を含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地とは異なる成分を含む。

【０９２４】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む。

【０９２５】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培

養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な細胞培養培地で置き換えることによって生成される。

【０９２６】

いくつかの実施形態では、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。

【０９２７】

いくつかの実施形態では、急速な膨張の分裂は、閉鎖系において起こる。

【０９２８】

いくつかの実施形態では、急速拡張中のＴＩＬ培養物のスケールアップは、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に添加すること（ＴＩＬを供給することとも称される）を含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に頻繁に添加することを含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に一定の間隔で添加することを含む。いくつかの実施形態では、新鮮な細胞培養培地は、一定の流れを介してＴＩＬに供給される。いくつかの実施形態では、Ｘｕｒｉ　Ｗ２５などの自動細胞拡張系は、急速な膨張及び供給のために使用される。

【０９２９】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が減少、軽減、衰退、または沈静化し始めた後に行われる。

【０９３０】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、正確にまたは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％減少した後に行われる。

【０９３１】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、正確にまたは約１％～１００％の範囲のパーセンテージ減少した後に行われる。

【０９３２】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、正確にまたは約１％～１０％、１０％～２０％、２０％～３０％、３０％～４０％、４０％～５０％、５０％～６０％、６０％～７０％、７０％～８０％、８０％～９０％、または９０％～１００％の範囲のパーセンテージ減少した後に行われる。

【０９３３】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によっ

てもたらされるＴ細胞の活性化が、少なくとも正確にまたは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％減少した後に行われる。

【０９３４】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、最大で正確にまたは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％減少した後に行われる。

【０９３５】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化の減少は、抗原による刺激に応答してＴ細胞によって放出されるインターフェロンガンマの量の減少によって決定される。

【０９３６】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、最大で正確にまたは約７日または約８日の期間中に行われる。

【０９３７】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、最大で正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日の期間中に行われる。

【０９３８】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日の期間中に行われる。

【０９３９】

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

【０９４０】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、最大で正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間中に行われる。

【０９４１】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間中に行われる。

【０９４２】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約７日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約１１日の期間中に行われる。

【０９４３】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、最大で正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日の期間中に行われ、Ｔ細

胞の急速な第２の拡張は、最大で正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間中に行われる。

【０９４４】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約８日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約９日の期間中に行われる。

【０９４５】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、８日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、９日の期間中に行われる。

【０９４６】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約７日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約９日の期間中に行われる。

【０９４７】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、７日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、９日の期間中に行われる。

【０９４８】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）である。

【０９４９】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）である。

【０９５０】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、末梢血リンパ球（ＰＢＬ）である。

【０９５１】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、がんに罹患しているドナーから取得される。

【０９５２】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、がんに罹患している患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬである。

【０９５３】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、血液系悪性腫瘍に罹患している患者の骨髄から取得されたＭＩＬである。

【０９５４】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ドナー由来の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）から取得されたＰＢＬである。いくつかの実施形態では、ドナーは、がんに罹患している。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされたがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択されるがんである。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされたがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ドナーは、腫瘍に罹患している。いくつかの実施形態では、腫瘍は、液体腫瘍である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、ドナーは、血液系悪性腫瘍に罹患している。

【０９５５】

本開示の特定の態様では、免疫エフェクター細胞、例えば、Ｔ細胞は、ＦＩＣＯＬＬ分離などの当業者に知られている任意の数の技法を使用して対象から収集された血液の単位から得ることができる。好ましい一態様では、個体の循環血液由来の細胞は、アフェレーシスによって取得される。アフェレーシス産物は、典型的には、リンパ球、例えば、Ｔ細胞、単球、顆粒球、Ｂ細胞、他の有核白血球、赤血球、血小板を含む。一態様では、アフ

ェレーシスによって収集された細胞が洗浄されて、血漿画分が除去され、任意選択で、その後の処理ステップのために細胞を適切な緩衝液または培地に入れられ得る。いくつかの実施形態では、細胞は、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で洗浄される。代替の実施形態では、洗浄溶液は、カルシウムを欠き、マグネシウムを欠き得るか、またはすべてではないが多くの二価カチオンを欠き得る。一態様では、Ｔ細胞は、赤血球を溶解し、かつ単球を枯渇させることによって、例えば、ＰＥＲＣＯＬＬ勾配による遠心分離によって、または対向流遠心溶出法によって末梢血リンパ球から単離される。

【０９５６】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ドナー由来のリンパ球が濃縮された全血またはアフェレーシス産物から分離されたＰＢＬである。いくつかの実施形態では、ドナーは、がんに罹患している。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされたがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択されるがんである。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされたがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ドナーは、腫瘍に罹患している。いくつかの実施形態では、腫瘍は、液体腫瘍である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、ドナーは、血液系悪性腫瘍に罹患している。いくつかの実施形態では、ＰＢＬは、正または負の選択法を使用することによって、すなわち、Ｔ細胞表現型について、マーカー（複数可）、例えば、ＣＤ３＋ＣＤ４５＋を使用してＰＢＬを除去することによって、または非Ｔ細胞表現型細胞を除去してＰＢＬを残すことによって、リンパ球が濃縮された全血またはアフェレーシス産物から単離される。他の実施形態では、ＰＢＬは、勾配遠心分離によって単離される。ドナー組織からＰＢＬを単離した時点で、ＰＢＬのプライミングによる第１の拡張は、本明細書に記載される方法のうちのいずれかのプライミングによる第１の拡張ステップに従って、プライミングによる第１の拡張培養下で好適な数の単離されたＰＢＬ（いくつかの実施形態では、およそ1×10^{7}ＰＢＬ）を播種することによって開始され得る。

【０９５７】

これらの特徴のうちのいくつかを含む、プロセス３として知られる（本明細書ではＧｅｎ３とも称される）例示的なＴＩＬプロセスが、図８（特に、例えば図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に示され、本発明のこの実施形態の、Ｇｅｎ２を超える利点のうちのいくつかが、図１、２、８、３０、及び３１（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に記載される。Ｇｅｎ３の実施形態は、図１、８、及び３０（特に、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に示される。プロセス２ＡまたはＧｅｎ２またはＧｅｎ２Ａはまた、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開第２０１８／０２８０４３６号にも記載されている。Ｇｅｎ３プロセスはまた、国際特許公開第ＷＯ２０２０／０９６９８８号に記載されている。

【０９５８】

本明細書で考察され、かつ一般に概説されるように、ＴＩＬは、患者試料から採取され、本明細書に記載され、かつＧｅｎ３と称されるＴＩＬ拡張プロセスを使用して患者に移植する前に、それらの数を拡張するように操作される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、以下で考察されるように、任意で遺伝子操作され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、拡張前または拡張後に凍結保存され得る。解凍した時点で、それらが再刺激されて、患者への注入前に代謝を高めることができる。

【０９５９】
いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図において詳細に考察されるように、プライミングによる第１の拡張（本明細書において急速拡張前（ＲＥＰ前）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＢとして示されるプロセスを含む）は、１～８日に短縮され、急速な第２の拡張（本明細書において急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＤとして示されるプロセスを含む）は、１～９日に短縮される。いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図において詳細に考察されるように、プライミングによる第１の拡張（本明細書において急速拡張前（ＲＥＰ前）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＢとして示されるプロセスを含む）は、１～８日に短縮され、急速な第２の拡張（本明細書において急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＤとして示されるプロセスを含む）は、１～８日に短縮される。いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図において詳細に考察されるように、プライミングによる第１の拡張（本明細書において急速拡張前（ＲＥＰ前）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＢとして示されるプロセスを含む）は、１～７日に短縮され、急速な第２の拡張（本明細書において急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＤとして示されるプロセスを含む）は、１～９日に短縮される。いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図において詳細に考察されるように、プライミングによる第１の拡張（本明細書において急速拡張前（ＲＥＰ前）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば図１Ｂ及び／または図８Ｃ）においてステップＢとして示されるプロセスを含む）は、１～７日に短縮され、急速な第２の拡張（本明細書において急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＤとして示されるプロセスを含む）は、１～１０日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＢとして記載される拡張）は、８日に短縮され、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＤに記載される拡張）は、７～９日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＢとして記載される拡張）は、８日間であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＤに記載される拡張）は、８～９日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＢとして記載される拡張）は、７日に短縮され、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及

び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＤに記載される拡張）は、７～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＢとして記載される拡張）は、８日に短縮され、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＤに記載される拡張）は、８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＢとして記載される拡張）は、８日間であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＤに記載される拡張）は、９日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＢとして記載される拡張）は、８日間であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＤに記載される拡張）は、１０日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＢとして記載される拡張）は、７日間であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＤに記載される拡張）は、７～１０日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＢとして記載される拡張）は、７日間であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＤに記載される拡張）は、８～１０日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＢとして記載される拡張）は、７日間であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＤに記載される拡張）は、９～１０日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＢとして記載される拡張）は、７日間であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）においてステップＤに記載される拡張）は、７～９日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張と急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図１Ｂ及び／または図８Ｃ）においてステップＢ及びステップＤとして記載される拡張）との組み合わせは、以下ならびに実施例及び図面において詳細に考察されるように、１４～１６日間である。特に、本発明のある特定の実施形態が、ＩＬ－２の存在下での抗ＣＤ３抗体、例えば、ＯＫＴ－３への曝露、または少なくともＩＬ－２及び抗ＣＤ３抗体、例えば、ＯＫＴ－３の存在下での抗原への曝露によってＴＩＬが活性化される、プライミングによる第１の拡張ステップを含むと考えられる。ある特定の実施形態では

、上記のようにプライミングによる第１の拡張ステップで活性化されるＴＩＬは、第１のＴＩＬ集団であり、すなわち、一次細胞集団である。

【０９６０】

以下の「ステップ」指定Ａ、Ｂ、Ｃなどは、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）における非限定的な例を参照し、本明細書に記載のある特定の非限定的な実施形態を参照している。以下及び図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）におけるステップの順序は例示であり、ステップの任意の組み合わせまたは順序、ならびに追加のステップ、ステップの繰り返し、及び／またはステップの省略は、本出願及び本明細書に開示される方法によって企図される。

【０９６１】

Ａ．ステップＡ：患者の腫瘍試料を取得する

一般に、ＴＩＬは、最初に患者の腫瘍試料（「一次ＴＩＬ」）から、またはＴＩＬ様の特徴を有する末梢血リンパ球を含む末梢血リンパ球などの循環リンパ球から得られ、その後、本明細書に記載されるように、さらなる操作のためにより大きな集団に拡張され、任意選択で凍結保存され、任意選択でＴＩＬの健康の指標として表現型及び代謝パラメータについて評価される。

【０９６２】

患者の腫瘍試料は、一般に、外科的切除、針生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を得るための他の手段により、当該技術分野で知られている方法を使用して得ることができる。一般に、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍試料は、血液系悪性腫瘍から取得された腫瘍などの液体腫瘍であり得る。固形腫瘍は、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、大腸癌、肺癌、脳癌、腎癌、胃癌、及び皮膚癌を含むが、これらに限定されない（扁平上皮癌、基底細胞癌、及び黒色腫を含むが、これらに限定されない）、任意の種類のがんであり得る。いくつかの実施形態では、がんは、子宮頸癌、頭頸部癌（例えば、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭ）、胃腸癌、卵巣癌、肉腫、膵臓癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、及び非小細胞肺癌から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。いくつかの実施形態では、悪性黒色腫腫瘍が特に高レベルのＴＩＬを有することが報告されているため、有用なＴＩＬは、悪性黒色腫腫瘍から取得される。

【０９６３】

取得された時点で、腫瘍試料は、一般に、鋭的解剖を使用して１～約８mm^3の小片に断片化され、約２～３mm^3が特に有用である。ＴＩＬは、酵素腫瘍消化物を使用してこれらの断片から培養される。かかる腫瘍消化物は、酵素培地（例えば、Ｒｏｓｗｅｌｌ Ｐａｒｋ Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＲＰＭＩ）１６４０緩衝液、２ｍＭグルタミン酸、１０ｍｃｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０単位／ｍＬ ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（例えば、組織解離機を使用する）によって産生され得る。腫瘍消化物は、腫瘍を酵素培地に入れ、腫瘍をおよそ１分間機械的に解離させ、続いて５％ CO_2中３７℃で３０分間インキュベートし、続いて小さな組織片のみが存在するまで、前述の条件下で機械的解離及びインキュベーションのサイクルを繰り返すことによって産生することができる。このプロセスの最後に、細胞懸濁液中に多数の赤血球または死細胞が含まれている場合、ＦＩＣＯＬＬ分岐親水性多糖類を使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。米国特許出願公開第２０１２／０２４４１３３Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものなどの当該技術分野で知られている代替の方法を使用することができる。前述の方法のうちのいずれかが、ＴＩＬを拡張する方法またはがんを治療する方法について本明細書に記載される実施形態のうちのいずれかにおいて使用され得る。

【０９６４】
上に示されるように、いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、固形腫瘍に由来する。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、断片化されない。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は断片化されず、全腫瘍として酵素消化に供される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％CO_2で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％CO_2で回転を伴って消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、３７℃、５％CO_2で一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、全腫瘍が酵素と組み合わされて、腫瘍消化反応混合物が形成される。
【０９６５】
いくつかの実施形態では、腫瘍は、滅菌緩衝液中の凍結乾燥酵素で再構成される。いくつかの実施形態では、緩衝液は、滅菌ＨＢＳＳである。
【０９６６】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、コラゲナーゼを含む。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、コラゲナーゼＩＶである。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼの作業ストックは、１００ｍｇ／ｍＬの１０倍作業ストックである。
【０９６７】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ＤＮＡｓｅを含む。いくつかの実施形態では、ＤＮＡｓｅの作業ストックは、１０，０００ＩＵ／ｍＬの１０倍作業ストックである。
【０９６８】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ヒアルロニダーゼを含む。いくつかの実施形態では、ヒアルロニダーゼの作業ストックは、１０ｍｇ／ｍＬの１０倍作業ストックである。
【０９６９】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、１０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼ、１０００ＩＵ／ｍＬのＤＮＡｓｅ、及び１ｍｇ／ｍＬのヒアルロニダーゼを含む。
【０９７０】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、１０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼ、５００ＩＵ／ｍＬのＤＮＡｓｅ、及び１ｍｇ／ｍＬのヒアルロニダーゼを含む。
【０９７１】
一般に、腫瘍から取得された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに取得された」または「新たに単離された」細胞集団と呼ばれる。ある特定の実施形態では、新たに取得されたＴＩＬ細胞集団は、抗原提示細胞、ＩＬ－１２、及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地に曝露される。
【０９７２】
いくつかの実施形態では、断片化には、例えば、解剖及び消化を含む物理的断片化が含まれる。いくつかの実施形態では、断片化は、物理的断片化である。いくつかの実施形態では、断片化は、解剖である。いくつかの実施形態では、断片化は、消化によるものである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、最初に、患者から取得された酵素腫瘍消化物及び腫瘍断片から培養され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、最初に、患者から取得された酵素腫瘍消化物及び腫瘍断片から培養され得る。
【０９７３】
腫瘍が固形腫瘍であるいくつかの実施形態では、腫瘍試料が、例えば、ステップＡ（図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に提供される）で取得された後

、腫瘍は物理的断片化を受ける。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存前に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存後に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、腫瘍を得た後に、いずれの凍結保存もない場合に起こる。いくつかの実施形態では、断片化ステップは、インビトロまたはエクスビボプロセスである。いくつかの実施形態では、腫瘍が断片化され、１０、２０、３０、４０個、またはそれ以上の断片または小片が、プライミングによる第１の拡張のために各容器に入れられる。いくつかの実施形態では、腫瘍が断片化され、３０個または４０個の断片または小片が、プライミングによる第１の拡張のために各容器に入れられる。いくつかの実施形態では、腫瘍が断片化され、４０個の断片または小片が、プライミングによる第１の拡張のために各容器に入れられる。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約４～約５０個の断片を含み、各断片は、約２７mm^3の体積を有する。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１３００mm^3～約１５００mm^3の総体積を伴う約３０～約６０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１３５０mm^3の総体積を伴う約５０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１グラム～約１．５グラムの総質量を伴う約５０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約４個の断片を含む。

【０９７４】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍断片から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、鋭的解剖によって取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3～１０mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3～８mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約２mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約３mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約４mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約５mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約６mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約７mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約８mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約９mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１０mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、１～４ｍｍ×１～４ｍｍ×１～４ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、１ｍｍ×１ｍｍ×１ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、２ｍｍ×２ｍｍ×２ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、３ｍｍ×３ｍｍ×３ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、４ｍｍ×４ｍｍ×４ｍｍである。

【０９７５】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性、壊死性、及び／または脂肪性組織の量を最小限に抑えるために断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性組織の量を最小限に抑えるために断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の壊死性組織の量を最小限に抑えるために断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の脂肪性組織の量を最小限に抑えるために断片化される。ある特定の実施形態では、腫瘍の断片化ステップは、インビトロまたはエクスビボ方法である。

【０９７６】

いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、腫瘍の内部構造を維持するために行われる。いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、メスでのこ引き動作を行うことなく行われる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、ＲＰＭＩ１６４０（２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）であるが、これに限定されない酵素培地中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって生成された。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍は、およそ１分間機械的に解離され得る。その後、溶液が５％CO_2中３７℃で３０分間インキュベートされ、その後、およそ１分間再び機械的に破壊され得る。５％　CO_2中３７℃で３０分間再びインキュベ

ートした後、腫瘍を、およそ１分間、３回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きい組織片が存在する場合、３回目の機械的破壊後、５％CO_2中３７℃でさらに３０分間インキュベートするかにかかわらず、１回または２回の追加の機械的解離が試料に適用された。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、Ｆｉｃｏｌｌを使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。

【０９７７】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張ステップ前の細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに取得された」または「新たに単離された」細胞集団と呼ばれる。

【０９７８】

いくつかの実施形態では、細胞は、試料単離後（例えば、腫瘍試料を得た後及び／または腫瘍試料から細胞懸濁液を得た後）、任意選択で凍結され得、ステップＢに記載の拡張に入る前に凍結保存され得、これは以下でさらに詳細に説明されるとともに、図８（特に、例えば図８Ｂ）に例示される。

【０９７９】

１．コア／小生検由来のＴＩＬ

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、最初に、コア生検または同様の手順によって取得された患者腫瘍試料（「一次ＴＩＬ」）から得られ、その後、本明細書に記載されるように、さらなる操作のためにより大きい集団に拡張され、任意で凍結保存され、任意で表現型及び代謝パラメータについて評価される。

【０９８０】

いくつかの実施形態では、患者の腫瘍試料は、一般に、小生検、コア生検、針生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を得るための他の手段により、当該技術分野で知られている方法を使用して取得することができる。一般に、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍試料は、血液系悪性腫瘍から取得された腫瘍などの液体腫瘍であり得る。いくつかの実施形態では、試料は、複数の小さい腫瘍試料または生検に由来し得る。いくつかの実施形態では、試料は、同じ患者由来の単一の腫瘍からの複数の腫瘍試料を含むことができる。いくつかの実施形態では、試料は、同じ患者由来の１、２、３、または４つの腫瘍からの複数の腫瘍試料を含むことができる。いくつかの実施形態では、試料は、同じ患者由来の複数の腫瘍からの複数の腫瘍試料を含むことができる。固形腫瘍は、肺癌及び／または非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）であり得る。

【０９８１】

一般に、腫瘍コアまたは断片から取得された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに取得された」または「新たに単離された」細胞集団と呼ばれる。ある特定の実施形態では、新たに取得されたＴＩＬ細胞集団は、抗原提示細胞、ＩＬ－２、及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地に曝露される。

【０９８２】

いくつかの実施形態では、腫瘍が転移性であり、かつ原発性病変が過去に効率的に治療／除去された場合、転移性病変のうちの１つの除去が必要とされ得る。いくつかの実施形態では、最も侵襲性の低いアプローチは、皮膚病変、または利用可能な場合、首または腋窩領域のリンパ節を除去することである。いくつかの実施形態では、皮膚病変が除去されるか、またはその小生検が除去される。いくつかの実施形態では、リンパ節またはその小生検が除去される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、黒色腫である。いくつかの実施形態では、黒色腫の小生検は、ほくろまたはその一部を含む。

【０９８３】

いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検である。いくつかの実施形態では、パンチ生検は、皮膚に押し込まれた円形の刃で取得される。いくつかの実施形態では、パンチ生検は、疑わしいほくろの周りの皮膚に押し込まれた円形の刃で得られる。いくつかの

実施形態では、パンチ生検は、皮膚に押し込まれた円形の刃で得られ、丸い皮膚片が採取される。いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検であり、腫瘍の丸い部分が採取される。

【０９８４】

いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検であり、ほくろまたは増殖全体が除去される。いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検であり、ほくろまたは増殖全体が、正常に見える皮膚の小縁とともに除去される。

【０９８５】

いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検であり、ほくろまたは増殖の最も不規則な部分のみが採取される。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検であり、切開生検は、疑わしいほくろが非常に大きい場合など、他の技法を達成することができない場合に使用される。

【０９８６】

いくつかの実施形態では、小生検は、肺生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、気管支鏡検査によって取得される。一般に、気管支鏡検査では、患者は麻酔をかけられ、小さい用具が鼻または口を通り、喉を下って気管支通路に入り、そこで小さい用具を使用していくらかの組織を採取する。気管支鏡検査によって腫瘍または成長に到達できないいくつかの実施形態では、経胸腔針生検が用いられ得る。一般に、経胸腔針生検の場合も、患者は麻酔をかけられ、針が皮膚をとおして疑わしい場所に直接挿入されて、小さい組織試料を採取する。いくつかの実施形態では、経胸壁針生検は、介入放射線医学（例えば、針をガイドするためのＸ線またはＣＴ走査の使用）を必要とし得る。いくつかの実施形態では、小生検は、針生検によって取得される。いくつかの実施形態では、小生検は、超音波内視鏡検査によって得られる（例えば、照明を備えた内視鏡であり、口をとおして食道に配置される）。いくつかの実施形態では、小生検は、外科的に取得される。

【０９８７】

いくつかの実施形態では、小生検は、頭頸部生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検であり、小さい組織片が異常に見える領域から切り取られる。いくつかの実施形態では、異常な領域に容易にアクセスできる場合、試料は、入院することなく採取され得る。いくつかの実施形態では、腫瘍が口または喉のより深くにある場合、生検は、全身麻酔を用いて手術室で行われる必要があり得る。いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、全領域が除去される切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、細針吸引（ＦＮＡ）である。いくつかの実施形態では、小生検は、細針吸引（ＦＮＡ）であり、シリンジに取り付けられた非常に細い針を使用して、腫瘍または塊から細胞を抽出（吸引）する。いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検であり、パンチ鉗子を使用して、疑わしい領域の一片を採取する。

【０９８８】

いくつかの実施形態では、小生検は、子宮頸部生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、膣鏡検査によって取得される。一般に、膣鏡検査は、拡大双眼鏡に取り付けられた照明付き拡大器具（膣鏡）の使用を採用し、その後、これを使用して、子宮頸部の表面の小さい切片を生検する。いくつかの実施形態では、小生検は、円錐切除／錐体生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、円錐切除／錐体生検であり、子宮頸部からより大きい組織片を採取するために外来手術が必要になる場合がある。いくつかの実施形態では、錐体生検は、診断の確認を助けることに加えて、錐体生検が初期治療となり得る。

【０９８９】

「固形腫瘍」という用語は、通常、嚢胞または液体領域を含まない異常な組織塊を指す。固形腫瘍は、良性または悪性であり得る。「固形腫瘍癌」という用語は、悪性、腫瘍性、またはがん性の固形腫瘍を指す。固形腫瘍癌には、肺の癌が含まれる。いくつかの実施

形態では、がんは、黒色腫である。いくつかの実施形態では、がんは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）である。固形腫瘍の組織構造には、実質（がん細胞）を含む相互依存的組織区画、及びがん細胞が分散しており、かつ支持微小環境を提供し得る支持間質細胞が含まれる。

【０９９０】

いくつかの実施形態では、腫瘍由来の試料は、細針吸引物（ＦＮＡ）、コア生検、小生検（例えば、パンチ生検を含む）として取得される。いくつかの実施形態では、試料は、最初にＧ－ＲＥＸ－１０に入れられる。いくつかの実施形態では、１つまたは２つのコア生検及び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初にＧ－ＲＥＸ－１０に入れられる。いくつかの実施形態では、３、４、５、６、８、９、または１０個以上のコア生検及び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初にＧ－ＲＥＸ－１００に入れられる。いくつかの実施形態では、３、４、５、６、８、９、または１０個以上のコア生検及び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初にＧ－ＲＥＸ－５００に入れられる。

【０９９１】

ＦＮＡは、例えば、黒色腫を含む皮膚腫瘍から取得することができる。いくつかの実施形態では、ＦＮＡは、転移性黒色腫を有する患者からの皮膚腫瘍などの皮膚腫瘍から取得される。いくつかの事例では、黒色腫を有する患者は、外科的治療を以前に受けたことがある。

【０９９２】

ＦＮＡは、例えば、ＮＳＣＬＣを含む肺腫瘍から得ることができる。いくつかの実施形態では、ＦＮＡは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を有する患者由来の肺腫瘍などの肺腫瘍から取得される。いくつかの事例では、ＮＳＣＬＣを有する患者は、外科的治療を以前に受けたことがある。

【０９９３】

本明細書に記載のＴＩＬは、ＦＮＡ試料から得られ得る。いくつかの事例では、ＦＮＡ試料は、１８ゲージ針～２５ゲージ針の範囲の細いゲージ針を使用して、患者から得られるか、または単離される。細いゲージ針は、１８ゲージ、１９ゲージ、２０ゲージ、２１ゲージ、２２ゲージ、２３ゲージ、２４ゲージ、または２５ゲージであり得る。いくつかの実施形態では、患者由来のＦＮＡ試料は、少なくとも４００，０００個のＴＩＬ、例えば、４００，０００個のＴＩＬ、４５０，０００個のＴＩＬ、５００，０００個のＴＩＬ、５５０，０００個のＴＩＬ、６００，０００個のＴＩＬ、６５０，０００個のＴＩＬ、７００，０００個のＴＩＬ、７５０，０００個のＴＩＬ、８００，０００個のＴＩＬ、８５０，０００個のＴＩＬ、９００，０００個のＴＩＬ、９５０，０００個のＴＩＬ、またはそれ以上を含み得る。

【０９９４】

いくつかの事例では、本明細書に記載のＴＩＬは、コア生検試料から取得される。いくつかの事例では、コア生検試料は、１１ゲージ針～１６ゲージ針の範囲の外科用または医療用針を使用して、患者から得られるか、または単離される。針は、１１ゲージ、１２ゲージ、１３ゲージ、１４ゲージ、１５ゲージ、または１６ゲージであり得る。いくつかの実施形態では、患者由来のコア生検試料は、少なくとも４００，０００個のＴＩＬ、例えば、４００，０００個のＴＩＬ、４５０，０００個のＴＩＬ、５００，０００個のＴＩＬ、５５０，０００個のＴＩＬ、６００，０００個のＴＩＬ、６５０，０００個のＴＩＬ、７００，０００個のＴＩＬ、７５０，０００個のＴＩＬ、８００，０００個のＴＩＬ、８５０，０００個のＴＩＬ、９００，０００個のＴＩＬ、９５０，０００個のＴＩＬ、またはそれ以上を含み得る。

【０９９５】

一般に、採取された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに採取された」細胞集団と呼ばれる。

【０９９６】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から得られない。いくつかの実施形態では、固形腫瘍コアは、断片化されない。

【０９９７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、ＲＰＭＩ１６４０（２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）であるが、これに限定されない酵素培地中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって生成された。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍は、およそ１分間機械的に解離され得る。その後、溶液が５％CO_2中３７℃で３０分間インキュベートされ、その後、およそ１分間再び機械的に破壊され得る。５％　CO_2中３７℃で３０分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ１分間、３回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きい組織片が存在する場合、３回目の機械的破壊後、５％CO_2中３７℃でさらに３０分間インキュベートするかにかかわらず、１回または２回の追加の機械的解離が試料に適用された。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、Ｆｉｃｏｌｌを使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。

【０９９８】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を取得することは、多病変サンプリング法を含む。

【０９９９】

腫瘍解離酵素混合物には、１つ以上の解離（消化）酵素、例えば、限定されないが、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはコラゲナーゼの種類を含む）、Ａｃｃｕｔａｓｅ（商標）、Ａｃｃｕｍａｘ（商標）、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、キモトリプシン、キモパパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパイン、ＸＩＶ型プロテアーゼ（プロナーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）、トリプシン阻害剤、任意の他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びそれらの任意の組み合わせが含まれ得る。

【１０００】

いくつかの実施形態では、解離酵素は、凍結乾燥酵素から再構成される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥酵素は、ハンクス平衡塩溶液（ＨＢＳＳ）などの滅菌緩衝液の量で再構成される。

【１００１】

いくつかの事例では、コラゲナーゼ（アニマルフリー１型コラゲナーゼなど）を、１０ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液で再構成する。凍結乾燥ストック酵素は、２８９２ＰＺ　Ｕ／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、５ｍＬ～１５ｍＬの緩衝液中で再構成される。いくつかの実施形態では、再構成後のコラゲナーゼストックは、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬの範囲、例えば、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約３５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約３００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２１０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２２０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２３０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２４０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２６０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２７０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２８０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２８９．２ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約３００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約３５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、または約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬである。

【１００２】

いくつかの実施形態では、中性プロテアーゼは、１ｍｌの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥ストック酵素は、１７５ＤＭＣＵ／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、再構成後の中性プロテアーゼストックは、約１００ＤＭ

Ｃ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬの範囲、例えば、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約３５０ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約３００ＤＭＣ／ｍＬ、約１５０ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ、約１１０ＤＭＣ／ｍＬ、約１２０ＤＭＣ／ｍＬ、約１３０ＤＭＣ／ｍＬ、約１４０ＤＭＣ／ｍＬ、約１５０ＤＭＣ／ｍＬ、約１６０ＤＭＣ／ｍＬ、約１７０ＤＭＣ／ｍＬ、約１７５ＤＭＣ／ｍＬ、約１８０ＤＭＣ／ｍＬ、約１９０ＤＭＣ／ｍＬ、約２００ＤＭＣ／ｍＬ、約２５０ＤＭＣ／ｍＬ、約３００ＤＭＣ／ｍＬ、約３５０ＤＭＣ／ｍＬ、または約４００ＤＭＣ／ｍＬである。

【１００３】

いくつかの実施形態では、ＤＮＡｓｅ　Ｉは、１ｍｌの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥したストック酵素は、４ＫＵ／バイアルの濃度であった。いくつかの実施形態では、再構成後のＤＮａｓｅ　Ｉストックは、約１ＫＵ／ｍＬ～１０ＫＵ／ｍＬ、例えば、約１ＫＵ／ｍＬ、約２ＫＵ／ｍＬ、約３ＫＵ／ｍＬ、約４ＫＵ／ｍＬ、約５ＫＵ／ｍＬ、約６ＫＵ／ｍＬ、約７ＫＵ／ｍＬ、約８ＫＵ／ｍＬ、約９ＫＵ／ｍＬ、または約１０ＫＵ／ｍＬの範囲である。

【１００４】

いくつかの実施形態では、酵素のストックは変化する可能性があるため、凍結乾燥ストックの濃度を確認し、それに応じて消化カクテルに追加される酵素の最終量を修正する。

【１００５】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、約４．７ｍｌの滅菌ＨＢＳＳ中に約１０．２ｕｌの中性プロテアーゼ（０．３６ＤＭＣ　Ｕ／ｍＬ）、２１．３ｕｌのコラゲナーゼ（１．２ＰＺ／ｍＬ）及び２５０ｕｌのＤＮＡｓｅ　Ｉ（２００Ｕ／ｍＬ）を含む。

【１００６】

２．胸水Ｔ細胞及びＴＩＬ

いくつかの実施形態では、試料は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのＴ細胞またはＴＩＬの供給源は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、試料は、胸水由来試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのＴＩＬの供給源は、胸水由来試料である。例えば、米国特許公開第２０１４／０２９５４２６号に記載されている方法を参照されたく、これはすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【１００７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬと思われる、及び／またはＴＩＬを含む任意の胸腔内液または胸水を利用することができる。かかる試料は、ＮＳＣＬＣもしくはＳＣＬＣなどの原発性または転移性肺癌に由来し得る。いくつかの実施形態では、試料は、別の臓器、例えば、乳房、卵巣、結腸、または前立腺に由来する二次転移性がん細胞であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜浸出液である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜漏出液である。他の生体試料は、例えば、腹部からの腹水または膵嚢胞液を含む、ＴＩＬを含有する他の漿液を含み得る。腹水及び胸腔内液は、非常に類似した化学系を伴い、腹部及び肺の両方が、悪性腫瘍における同じ物質の胸膜空間及び腹部空間に中皮線及び流体形態を有し、いくつかの実施形態では、かかる流体は、ＴＩＬを含有する。本開示が胸水を例示するいくつかの実施形態では、同じ方法が、胸腔内液またはＴＩＬを含有する他の嚢胞液を使用して同様の結果で実行されてもよい。

【１００８】

いくつかの実施形態では、胸腔内液は、患者から直接除去された未処理の形態である。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、接触ステップの前に、ＥＤＴＡまたはヘパリンチューブなどの標準的な採血管に入れられる。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、接触ステップの前に、標準的なＣｅｌｌＳａｖｅ（登録商標）チューブ（Ｖｅｒｉｄｅｘ）に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、生存ＴＩＬの数の減少を避けるために、患者から採取した直後にＣｅｌｌＳａｖｅチューブに入れられる。生存

ＴＩＬの数は、４℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置されると、２４時間以内に大幅に減少する可能性がある。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの除去後１時間、５時間、１０時間、１５時間、または最大２４時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、４℃で、患者からの除去後１時間、５時間、１０時間、１５時間、または最大２４時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

【１００９】

いくつかの実施形態では、選択された対象からの胸腔内液試料は、希釈され得る。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：１０である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：９である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：８である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：５である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：２である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：１である。いくつかの実施形態では、希釈剤には、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、別の緩衝液、または生理学的に許容される希釈剤が含まれる。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの収集及び希釈の直後にＣｅｌｌＳａｖｅチューブ内に入れられ、生存ＴＩＬの減少を回避し、これは、４℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置された場合、２４～４８時間以内に有意に生じ得る。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、患者からの除去及び希釈後１時間、５時間、１０時間、１５時間、２４時間、３６時間、最大４８時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、４℃で、患者からの除去及び希釈後１時間、５時間、１０時間、１５時間、２４時間、３６時間、最大４８時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

【１０１０】

さらに他の実施形態では、胸腔内液試料は、さらなる処理ステップの前に、従来の手段によって濃縮される。いくつかの実施形態では、胸腔内液のこの前処理は、方法を実施する実験室への輸送のために、またはその後の分析のために（例えば、採取後２４～４８時間より後に）胸水を凍結保存しなければならない状況において好ましい。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、それが対象から採取された後に胸腔内液試料を遠心分離し、遠心分離物またはペレットを緩衝液中に再懸濁することによって調製される。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、輸送または後の分析及び／または処理のために凍結保存される前に、複数の遠心分離及び再懸濁に供される。

【１０１１】

いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、濾過法を使用することによって、さらなる処理ステップの前に濃縮される。いくつかの実施形態では、接触ステップで使用される胸腔内液試料は、胸腔内液が膜を通過することを可能にするが腫瘍細胞を保持する、既知で本質的に均一な孔径を含むフィルターをとおして流体を濾過することによって調製される。いくつかの実施形態では、膜の細孔の直径は、少なくとも４μＭであり得る。他の実施形態では、細孔直径は、５μＭ以上であり得、他の実施形態では、６、７、８、９、または１０μＭのうちのいずれかであり得る。濾過後、膜によって保持されたＴＩＬを含む細胞を、膜から適切な生理学的に許容される緩衝液にすすいでもよい。次いで、このように濃縮されたＴＩＬを含む細胞は、方法の接触ステップで使用することができる。

【１０１２】

いくつかの実施形態では、胸腔内液試料（例えば、未処理の胸腔内液を含む）、希釈胸腔内液、または再懸濁細胞ペレットは、試料中に存在する無核赤血球を特異的に溶解する溶解試薬と接触させる。いくつかの実施形態では、このステップは、胸腔内液がかなりの数のＲＢＣを含む状況で、さらなる処理ステップの前に行われる。好適な溶解試薬には、単一の溶解試薬もしくは溶解試薬及びクエンチ試薬、または溶解剤、クエンチ試薬及び固定試薬が含まれる。好適な溶解系は市販されており、ＢＤ　Ｐｈａｒｍ　Ｌｙｓｅ（商標）系（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ）が含まれる。他の溶解系には、Ｖｅｒｓａｌｙｓｅ（商標）系、ＦＡＣＳｌｙｓｅ（商標）系（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ）、Ｉｍｍｕｎｏｐｒｅｐ（商標）系、またはＥｒｙｔｈｒｏｌｙｓｅ　ＩＩ系（Ｂｅｃｋ

ｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）、または塩化アンモニウム系が含まれる。いくつかの実施形態では、溶解試薬は、赤血球の効率的な溶解、ならびに胸水におけるＴＩＬ及びＴＩＬの表現型特性の保存のような主要な要件によって異なり得る。溶解のための単一の試薬を利用することに加えて、本明細書に記載の方法に有用な溶解系は、第２の試薬、例えば、方法の残りのステップ中に溶解試薬の効果をクエンチまたは遅延させるもの、例えばＳｔａｂｉｌｙｓｅ（商標）試薬（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）を含むことができる。溶解試薬の選択または方法の好ましい実施に応じて、従来の固定試薬を使用することもできる。

【１０１３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、未処理、希釈または多重遠心分離または処理された胸腔内液試料は、本明細書で提供されるようにさらに処理及び／または拡張される前に、約－１４０℃の温度で凍結保存される。

【１０１４】

３．ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性の事前選択

本発明のいくつかの方法によれば、ＴＩＬは、プライミングによる第１の拡張前に（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせであるように事前選択される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１についての任意選択の事前選択ステップも存在する。

【１０１５】

いくつかの実施形態では、最低３，０００個のＴＩＬが、プライミングによる第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低３，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低４，０００個のＴＩＬが、プライミングによる第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低４，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低５，０００個のＴＩＬが、プライミングによる第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低５，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低６，０００個のＴＩＬが、プライミングによる第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低６，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低７，０００個のＴＩＬが、プライミングによる第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低７，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低８，０００個のＴＩＬが、プライミングによる第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低８，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低９，０００個のＴＩＬが、プライミングによる第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低９，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低１０，０００個のＴＩＬが、プライミングによる第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低１０，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低２０，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低２０，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低３０，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低３０，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低４０，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低４０，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低５０，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低５０，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低６０，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低６０，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低７０，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種する

ために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低７０，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低８０，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低８０，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低９０，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低９０，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、最低１００，０００個のＴＩＬが、第１の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低１００，０００個のＴＩＬをもたらす。いくつかの実施形態では、細胞を、２００，０００個の密度まで成長または拡張させる。いくつかの実施形態では、細胞を、２００，０００個の密度まで成長または拡張させて、急速な第２の拡張を開始するための約２ｅ８個のＴＩＬを提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、１５０，０００個の密度まで成長または拡張させる。いくつかの実施形態では、細胞を、１５０，０００個の密度まで成長または拡張させて、急速な第２の拡張を開始するための約２ｅ８個のＴＩＬを提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、２５０，０００個の密度まで成長または拡張させる。いくつかの実施形態では、細胞を、２５０，０００個の密度まで成長または拡張させて、急速な第２の拡張を開始するための約２ｅ８個のＴＩＬを提供する。いくつかの実施形態では、最小細胞密度は、急速な第２の拡張を開始するための１０ｅ６個を与えるために、１０，０００個の細胞である。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張を開始するための１０ｅ６個の播種密度は、１ｅ９個を超えるＴＩＬをもたらし得る。

【１０１６】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張において使用するためのＴＩＬは、（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせ（例えば、事前選択後、及びプライミングによる第１の拡張前）である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張で使用するためのＴＩＬは、少なくとも７５％が（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせ、少なくとも８０％が（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせ、少なくとも９０％が（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせ、少なくとも９５％が（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせ、少なくとも９８％が（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせ、または少なくとも９９％が（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせ（例えば、事前選択後及びプライミングによる第１の拡張前）である。

【１０１７】

いくつかの実施形態では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬの事前選択は、一次細胞集団、全腫瘍消化物、及び／または全腫瘍細胞懸濁液ＴＩＬを抗ＣＤ３９抗体及び抗ＣＤ６９抗体で染色することによって行われる。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３９及び抗ＣＤ６９抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、マウス抗ヒトＣＤ３９及びＣＤ６９ポリクローナル抗体、ヤギ抗ヒトＣＤ３９及びＣＤ６９ポリクローナル抗体などである。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３９及び抗ＣＤ６９抗体は、モノクローナル抗体である。

【１０１８】

いくつかの実施形態では、事前選択で使用するための抗ＣＤ３９抗体は、ＣＤ３９を発現する細胞の少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または少なくとも１００

％に結合する。いくつかの実施形態では、事前選択で使用するための抗ＣＤ６９抗体は、ＣＤ６９を発現する細胞の少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または少なくとも１００％に結合する。

【１０１９】

いくつかの実施形態では、患者は、抗ＰＤ－１抗体で治療されている。いくつかの実施形態では、対象は、抗ＰＤ－１抗体治療未経験である。いくつかの実施形態では、対象は、抗ＰＤ－１抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、対象は、以前に化学療法剤で治療されている。いくつかの実施形態では、対象は、以前に化学療法剤で治療されているが、もはや化学療法剤で治療されていない。いくつかの実施形態では、対象は、化学療法治療後または抗ＰＤ－１抗体治療後である。いくつかの実施形態では、対象は、化学療法治療後及び抗ＰＤ－１抗体治療後である。いくつかの実施形態では、患者は、抗ＰＤ－１抗体治療未経験である。いくつかの実施形態では、対象は、治療未経験のがんを有するか、または化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１抗体未経験である。いくつかの実施形態では、対象は、治療未経験であり、かつ化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１抗体治療未経験である。

【１０２０】

いくつかの実施形態では、陰性は、ＦＭＯに基づいてゲーティングされる。いくつかの実施形態では、ＦＡＣＳゲートは、対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することにより、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップの後に設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングは、各選別に対して設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングは、ＰＢＭＣの各試料に対して設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングは、ＰＢＭＣの各試料に対して設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングテンプレートは、ＰＢＭＣから１０日、２０日、３０日、４０日、５０日、または６０日毎に設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングテンプレートは、ＰＢＭＣから６０日毎に設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングテンプレートは、１０日、２０日、３０日、４０日、５０日、または６０日毎にＰＢＭＣの各試料に対して設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングテンプレートは、６０日毎にＰＢＭＣの各試料に対して設定される。

【１０２１】

いくつかの実施形態では、事前選択は、第１のＴＩＬ集団から（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせを選択して、ＴＩＬ集団を取得することを伴い、少なくとも１１．２７％～７４．４％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬであるＴＩＬ集団を第１のＴＩＬ集団から選択することを含む。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団は、少なくとも１０％～８０％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、少なくとも２０％～８０％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ、少なくとも２０％～８０％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ、少なくとも３０％～８０％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ、少なくとも４０％～８０％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ、少なくとも５０％～８０％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ、少なくとも１０％～７０％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ、少なくとも２０％～７０％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ、少なくとも３０％～７０％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ、少なくとも４０％～７０％がＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬである。

【１０２２】

いくつかの実施形態では、選択ステップ（例えば、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性細胞の

事前選択及び／または選択）は、
（ｉ）第１のＴＩＬ集団及びＰＢＭＣ集団を、ＣＤ３９及びＣＤ６９に結合する過剰のモノクローナル抗ＣＤ３９　ＩｇＧ及び抗ＣＤ６９　ＩｇＧ抗体に曝露するステップと、
（ｉｉ）フルオロフォアにコンジュゲートした過剰の抗ＩｇＧ抗体を添加するステップと、
（ｉｉｉ）蛍光活性化細胞選別法（ＦＡＣＳ）によって行われた場合のＰＢＭＣ集団で検出されたフルオロフォアの強度と比較して、第１のＴＩＬ集団中のＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬで検出されたフルオロフォアの強度に基づいて、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性集団を取得するステップと、を含む。

【１０２３】

いくつかの実施形態では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}濃縮ＴＩＬ集団の少なくとも７０％が、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}濃縮ＴＩＬ集団の少なくとも８０％が、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}濃縮ＴＩＬ集団の少なくとも９０％が、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}濃縮ＴＩＬ集団の少なくとも９５％が、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}濃縮ＴＩＬ集団の少なくとも９９％が、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}濃縮ＴＩＬ集団の１００％が、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬである。

【１０２４】

いくつかの実施形態では、図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８ＧにおけるプロセスＣＤ３９／ＣＤ６９　ＧＥＮ３のステップＡ３として例示される選択ステップは、（ｉ）第１のＴＩＬ集団を過剰のモノクローナル抗ＣＤ３９及び抗ＣＤ６９　ＩｇＧ抗体に曝露するステップと、（ｉｉ）フルオロフォアにコンジュゲートした過剰の抗ＩｇＧ抗体を追加するステップと、（ｉｉｉ）フルオロフォアに基づいてフローベースの細胞選別を行って、（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）濃縮ＴＩＬ集団の組み合わせを取得するステップと、を含む。

【１０２５】

腫瘍試料に由来するＴＩＬがＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}であるかどうかを決定するために、当業者は、１人以上の健康なヒト対象由来の血液試料から取得された末梢Ｔ細胞におけるＣＤ３９及び／またはＣＤ６９の発現レベルに対応する参照値を利用することができる。参照試料中のＣＤ３９／ＣＤ６９陽性細胞は、蛍光から１つの対照を差し引いたものと、一致するアイソタイプ対照とを使用して定義することができる。いくつかの実施形態では、健康な対象由来のＣＤ３＋／ＣＤ３９＋／ＣＤ６９＋末梢Ｔ細胞（例えば、参照細胞）において測定されたＣＤ３９／ＣＤ６９の発現レベルを使用して、腫瘍から取得されたＴＩＬにおけるＣＤ３９／ＣＤ６９の免疫染色強度の閾値またはカットオフ値を確立する。閾値は、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}Ｔ細胞のＣＤ３９／ＣＤ６９免疫染色の最大強度として定義することができる。そのため、ＣＤ３９／ＣＤ６９発現が閾値と同じかそれを下回るＴＩＬは、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}細胞であるとみなすことができる。いくつかの事例では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬは、全ＣＤ３＋細胞の最大１％以下に相当

するＣＤ３９／ＣＤ６９免疫染色の最低強度を有するものを表す。他の事例では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬは、全ＣＤ３＋細胞の最大０．７５％以下に相当するＣＤ３９／ＣＤ６９免疫染色の最低強度を有するものを表す。いくつかの事例では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬは、全ＣＤ３＋細胞の最大０．５０％以下に相当するＣＤ３９／ＣＤ６９免疫染色の最低強度を有するものを表す。他の事例では、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬは、全ＣＤ３＋細胞の最大０．２５％以下に相当するＣＤ３９／ＣＤ６９免疫染色の最低強度を有するものを表す。

【１０２６】

いくつかの実施形態では、実施例１６のタンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤（ＡＫＴｉ）法が用いられる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、ＡＫＴ阻害剤を含む培地中で培養され、ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}及び／またはＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性濃縮ＴＩＬ集団を取得する。いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イパタセルチブ、ＧＳＫ６９０６９３、ＧＳＫ２１４１７９５、ＧＳＫ２１１０１８３、ＡＺＤ５３６３、ＧＤＣ－００６８、ＡＴ７８６７、ＣＣＴ１２８９３０、ＭＫ－２２０６、ＢＡＹ１１２５９７６、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、ホノキオール、及びそれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イパタセルチブである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を、約０．１μＭ、約０．２μＭ、約０．３μＭ、約０．４μＭ、約０．５μＭ、約０．６μＭ、約０．７μＭ、約０．８μＭ、約０．９μＭ、約１μＭ、約１．１μＭ、約１．２μＭ、約１．３μＭ、約１．４μＭ、約１．５μＭ、約１．６μＭ、約１．７μＭ、約１．８μＭ、約１．９μＭ、約２μＭ、約２．１μＭ、約２．２μＭ、約２．３μＭ、約２．４μＭ、約２．５μＭ、約２．６μＭ、約２．７μＭ、約２．８μＭ、約２．９μＭ、約３μＭ、約３．５μＭ、約４μＭ、約４．５μＭ、または約５μＭのイパタセルチブを含む培地中で培養する。

【１０２７】

ｂ．フルオロフォア

いくつかの実施形態では、一次ＴＩＬ細胞集団は、フルオロフォアに連結された抗ＣＤ３９及び抗ＣＤ６９抗体及びフルオロフォアに連結された抗ＣＤ３抗体を含むカクテルで染色される。いくつかの実施形態では、一次ＴＩＬ細胞集団は、フルオロフォアに連結された抗ＣＤ３９及び抗ＣＤ６９抗体（例えば、ＰＥ、ｌｉｖｅ／ｄｅａｄバイオレット）及び抗ＣＤ３－ＦＩＴＣを含むカクテルで染色される。いくつかの実施形態では、一次ＴＩＬ細胞集団は、第１のフルオロフォアにコンジュゲートした抗ＣＤ３９及び第２のフルオロフォアにコンジュゲートした抗ＣＤ６９抗体、第３のフルオロフォアにコンジュゲートした抗ＣＤ３抗体、及びｌｉｖｅ／ｄｅａｄ青色染色（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ，ＭＡ、カタログ番号Ｌ２３１０５から市販されているものなど）を含むカクテルで染色され、第１、第２、及び第３の抗体は異なり、個別の検出が可能である。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３９及び抗ＣＤ６９抗体とのインキュベーション後、（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）細胞の組み合わせは、本明細書、例えば、図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇのステップ Ｂに記載の第１の拡張による拡張のために選択される。

【１０２８】

いくつかの実施形態では、一次ＴＩＬ細胞集団は、フルオロフォアに連結された抗ＣＤ３９及び抗ＣＤ６９抗体及びフルオロフォアに連結された抗ＣＤ３抗体を含むカクテルで染色される。いくつかの実施形態では、一次ＴＩＬ細胞集団は、フルオロフォアに連結された抗ＣＤ３９及び抗ＣＤ６９抗体（例えば、ＰＥ、ｌｉｖｅ／ｄｅａｄバイオレット）及び抗ＣＤ３－ＰＥ－Ｃｙ７を含むカクテルで染色される。いくつかの実施形態では、一次ＴＩＬ細胞集団は、抗ＣＤ３９－ＦＩＴＣ及び抗ＣＤ６９－ＰＥ、抗ＣＤ３－ＰＥ－Ｃｙ７、及びｌｉｖｅ／ｄｅａｄ青色染色（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ，ＭＡ、カタログ番号Ｌ２３１０５）を含むカクテルで染色される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３９及

び抗ＣＤ６９抗体とのインキュベーション後、（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）細胞の組み合わせは、本明細書、例えば、図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇのプロセス ＣＤ３９／ＣＤ６９　ＧＥＮ３のステップＢに記載のプライミングによる第１の拡張による拡張のために選択される。

【１０２９】

いくつかの実施形態では、フルオロフォアには、ＰＥ（フィコエリトリン）、ＡＰＣ（アロフィコシアニン）、ＰｅｒＣＰ（ペリジニンクロロフィルタンパク質）、ＤｙＬｉｇｈｔ　４０５、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４０５、Ｐａｃｉｆｉｃ　Ｂｌｕｅ、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８、ＦＩＴＣ（フルオレセインイソチオシアネート）、ＤｙＬｉｇｈｔ　５５０、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７、ＤｙＬｉｇｈｔ　６５０、及びＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　７００が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、フルオロフォアには、ＰＥ－Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７、ＰＥ－Ｃｙ５、ＰｅｒＣＰ－Ｃｙ５．５、ＰＥ－Ｃｙ５．５、ＰＥ－Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）７５０、ＰＥ－Ｃｙ７、及びＡＰＣ－Ｃｙ７が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、フルオロフォアには、フルオレセイン色素が含まれるが、これに限定されない。フルオレセイン色素の例には、５－カルボキシフルオレセイン、フルオレセイン－５－イソチオシアネート及び６－カルボキシフルオレセイン、５，６－ジカルボキシフルオレセイン、５－（及び６）－スルホフルオレセイン、スルホンフルオレセイン、スクシニルフルオレセイン、５－（及び６）－カルボキシＳＮＡＲＦ－１、カルボキシフルオレセインスルホネート、カルボキシフルオレセイン双性イオン、カルボキシフルオレセイン四級アンモニウム、カルボキシフルオレセインホスホネート、カルボキシフルオレセインＧＡＢＡ、５’（６’）－カルボキシフルオレセイン、カルボキシフルオレセイン－ｃｙｓ－Ｃｙ５、ならびにフルオレセイングルタチオンが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、蛍光部分は、ローダミン色素である。ローダミン色素の例には、テトラメチルローダミン－６－イソチオシアネート、５－カルボキシテトラメチルローダミン、５－カルボキシロードール誘導体、カルボキシローダミン１１０、テトラメチル及びテトラエチルローダミン、ジフェニルジメチル及びジフェニルジエチルローダミン、ジナフチルローダミン、ローダミン１０１スルホニルクロリド（ＴＥＸＡＳ　ＲＥＤ（登録商標）の商品名で販売される）が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、蛍光部分は、シアニン色素である。シアニン色素の例には、Ｃｙ３、Ｃｙ３Ｂ、Ｃｙ３．５、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、及びＣｙ７が含まれるが、これらに限定されない。

【１０３０】

４．末梢血から末梢血リンパ球（ＰＢＬ）を拡張する方法

ＰＢＬ法１。本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬは、本明細書に記載のプロセスを使用して拡張される。本発明のいくつかの実施形態では、方法は、全血からＰＢＭＣ試料を取得することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、非ＣＤ１９＋画分の負の選択を使用して、ＰＢＭＣから純粋なＴ細胞を単離することによってＴ細胞を濃縮することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、非ＣＤ１９＋画分の磁気ビーズベースの負の選択を使用して、ＰＢＭＣから純粋なＴ細胞を単離することによってＴ細胞を濃縮することを含む。

【１０３１】

本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬ法１は、以下のように行われる：０日目に、凍結保存されたＰＢＭＣ試料を解凍し、ＰＢＭＣを計数する。Ｔ細胞を、ヒトＰａｎ　Ｔ細胞単離キット及びＬＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して単離する。

【１０３２】

ＰＢＬ法２。本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬは、全血からＰＢＭＣ試料を得ることを含むＰＢＬ法２を使用して拡張される。ＰＢＭＣ由来のＴ細胞は、ＰＢＭＣを３７℃で少なくとも３時間インキュベートし、その後、非接着細胞を単離することによって

濃縮される。
【１０３３】
本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬ法２は、以下のように行われる：０日目に、凍結保存されたＰＭＢＣ試料を解凍し、ＰＢＭＣ細胞を、ＣＭ－２培地中の６ウェルプレートに６００万細胞／ウェルで播種し、３７℃で３時間インキュベートする。３時間後、ＰＢＬである非接着細胞を取り出し、計数する。
【１０３４】
ＰＢＬ法３。本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬは、末梢血からＰＢＭＣ試料を得ることを含むＰＢＬ法３を使用して拡張される。Ｂ細胞は、ＣＤ１９＋選択を使用して単離され、Ｔ細胞は、ＰＢＭＣ試料の非ＣＤ１９＋画分の負の選択を使用して選択される。
【１０３５】
本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬ法３は、以下のように行われる：０日目に、末梢血から取得された凍結保存されたＰＢＭＣを解凍し、計数する。ＣＤ１９＋Ｂ細胞を、ＣＤ１９　Ｍｕｌｔｉｓｏｒｔキット、ヒト（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して選別する。非ＣＤ１９＋細胞画分のうち、Ｔ細胞を、ヒトＰａｎ　Ｔ細胞単離キット及びＬＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して精製する。
【１０３６】
いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、全血試料から単離される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、ＰＢＬを拡張するための出発材料として使用される。いくつかの実施形態では、試料は、拡張プロセス前に凍結保存される。他の実施形態では、新鮮な試料が、ＰＢＬを拡張するための出発材料として使用される。本発明のいくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、当該技術分野で知られている方法を使用してＰＢＭＣから単離される。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ヒトＴ汎細胞単離キット及びＬＳカラムを使用して単離される。本発明のいくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、当該技術分野で知られている抗体選択方法、例えば、ＣＤ１９の負の選択を使用して、ＰＢＭＣから単離される。
【１０３７】
本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、非接着細胞を特定するのに有効な所望の温度である期間インキュベートされる。本発明のいくつかの実施形態では、インキュベーション時間は、約３時間である。本発明のいくつかの実施形態では、温度は、約３７℃である。その後、非接着細胞は、上記のプロセスを使用して拡張される。
【１０３８】
いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで任意選択で前治療された対象または患者由来のものである。いくつかの実施形態では、腫瘍試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療された対象または患者由来のものである。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療されており、少なくとも１ヶ月間、少なくとも２ヶ月間、少なくとも３ヶ月間、少なくとも４ヶ月間、少なくとも５ヶ月間、少なくとも６ヶ月間、または１年間、またはそれ以上治療を受けた対象または患者由来のものである。他の実施形態では、ＰＢＭＣは、イブルチニブなどのＩＴＫ阻害剤レジメンを現在受けている患者に由来する。
【１０３９】
いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療されており、キナーゼ阻害剤またはイブルチニブなどのＩＴＫ阻害剤での治療に不応性である対象または患者由来のものである。
【１０４０】
いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療されたが、もはやキナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤での治療を受けていない対象または患者由来のものである。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療されたが、もはやキナーゼ阻害

剤またはＩＴＫ阻害剤での治療を受けておらず、少なくとも１ヶ月間、少なくとも２ヶ月間、少なくとも３ヶ月間、少なくとも４ヶ月間、少なくとも５ヶ月間、少なくとも６ヶ月間、または少なくとも１年間、またはそれ以上治療を受けていない対象または患者由来のものである。他の実施形態では、ＰＢＭＣは、ＩＴＫ阻害剤に以前に曝露されたが、少なくとも３ヶ月、少なくとも６ヶ月、少なくとも９ヶ月、または少なくとも１年以内に治療されていない患者に由来する。

【１０４１】

本発明のいくつかの実施形態では、０日目に、細胞がＣＤ１９＋について選択され、それに応じて選別される。本発明のいくつかの実施形態では、選択は、抗体結合ビーズを使用して行われる。本発明のいくつかの実施形態では、純粋なＴ細胞が、０日目にＰＢＭＣから単離される。

【１０４２】

本発明のいくつかの実施形態では、イブルチニブまたは他のＩＴＫ阻害剤で前治療されていない患者の場合、１０～１５ｍＬのバフィーコートは、約５×１０^{9}のＰＢＭＣを産生し、これは、次いで、約５．５×１０^{7}のＰＢＬを産生する。

【１０４３】

本発明のいくつかの実施形態では、イブルチニブまたは他のＩＴＫ阻害剤で前治療された患者の場合、拡張プロセスは、約２０×１０^{9}のＰＢＬを産生する。本発明のいくつかの実施形態では、４０．３×１０^{6}のＰＢＭＣは、約４．７×１０^{5}のＰＢＬを産生する。

【１０４４】

前述の実施形態のうちのいずれにおいても、ＰＢＭＣは、全血試料から、アフェレーシスによって、バフィーコートから、またはＰＢＭＣを得るための当該技術分野で知られている任意の他の方法から得られ得る。

【１０４５】

いくつかの実施形態では、ＰＢＬは、米国特許出願公開第２０２０／０３４７３５０Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載される方法を使用して調製される。

【１０４６】

５．骨髄由来のＰＢＭＣから骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）を拡張する方法

ＭＩＬ法３。本発明のいくつかの実施形態では、方法は、骨髄からＰＢＭＣを取得することを含む。０日目に、ＰＢＭＣがＣＤ３＋／ＣＤ３３＋／ＣＤ２０＋／ＣＤ１４＋について選択され、選別され、非ＣＤ３＋／ＣＤ３３＋／ＣＤ２０＋／ＣＤ１４＋細胞画分が超音波処理され、超音波処理された細胞画分の一部が選択された細胞画分に戻し追加される。

【１０４７】

本発明のいくつかの実施形態では、ＭＩＬ法３は、以下のように行われる：０日目に、凍結保存されたＰＢＭＣ試料を解凍し、ＰＢＭＣを計数する。細胞を、ＣＤ３、ＣＤ３３、ＣＤ２０、及びＣＤ１４抗体で染色し、選別されたＳ３ｅ細胞（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して選別する。細胞を、免疫細胞画分（またはＭＩＬ画分）（ＣＤ３＋ＣＤ３３＋ＣＤ２０＋ＣＤ１４＋）及びＡＭＬ芽球画分（非ＣＤ３＋ＣＤ３３＋ＣＤ２０＋ＣＤ１４＋）の２つの画分に選別する。

【１０４８】

本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、骨髄から取得される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、アフェレーシス、吸引、針生検、または当該技術分野で知られている他の同様の手段により骨髄から取得される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、新鮮である。他の実施形態では、ＰＢＭＣは、凍結保存される。

【１０４９】

本発明のいくつかの実施形態では、ＭＩＬは、１０～５０ｍＬの骨髄穿刺液から拡張される。本発明のいくつかの実施形態では、１０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。

他の実施形態では、２０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、３０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、４０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、５０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。

【１０５０】

本発明のいくつかの実施形態では、約１０～５０ｍＬの骨髄穿刺液から産生されたＰＢＭＣの数は、約5×10^{7}～約10×10^{7}ＰＢＭＣである。他の実施形態では、産生されたＰＭＢＣの数は、約7×10^{7}ＰＢＭＣである。

【１０５１】

本発明のいくつかの実施形態では、約5×10^{7}～約10×10^{7}ＰＢＭＣが、約0.5×10^{6}～約1.5×10^{6}ＭＩＬを産生する。本発明のいくつかの実施形態では、約1×10^{6}ＭＩＬが産生される。

【１０５２】

本発明のいくつかの実施形態では、骨髄穿刺液から誘導された12×10^{6}ＰＢＭＣは、およそ1.4×10^{5}ＭＩＬを産生する。

【１０５３】

前述の実施形態のうちのいずれにおいても、ＰＢＭＣは、全血試料から、骨髄から、アフェレーシスによって、バフィーコートから、またはＰＢＭＣを得るための当該技術分野で知られている任意の他の方法から得られ得る。

【１０５４】

いくつかの実施形態では、ＭＩＬは、米国特許出願公開第２０２０／０３４７３５０Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載される方法を使用して調製される。

【１０５５】

Ｂ．ステップＢ：プライミングによる第１の拡張

いくつかの実施形態では、本方法は、より古いＴＩＬ（すなわち、対象／患者への投与前により多くの複製ラウンドをさらに受けたＴＩＬ）よりも追加の治療的利益を提供し得る、より若いＴＩＬを提供する。若いＴＩＬの特徴は、文献、例えば、Ｄｏｎｉａ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃａｎｄ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２，７５，１５７－１６７、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１０，１６，６１２２－６１３１、Ｈｕａｎｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００５，２８，２５８－２６７、Ｂｅｓｓｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１３，１９，ＯＦ１－ＯＦ９、Ｂｅｓｓｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００９，３２：４１５－４２３、Ｒｏｂｂｉｎｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００４，１７３，７１２５－７１３０、Ｓｈｅｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００７，３０，１２３－１２９、Ｚｈｏｕ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００５，２８，５３－６２、及びＴｒａｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００８，３１，７４２－７５１に記載されており、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。

【１０５６】

例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ）のステップＡに記載されるものなどの腫瘍断片及び／または腫瘍断片の解剖または消化後に、結果として得られた細胞は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長を好む条件下で、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びフィーダー細胞（例えば、抗原提示フィーダー細胞）を含む血清中で培養される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びフィーダー細胞は、腫瘍消化物及び／または腫瘍断片とともに培養開始時に（例えば、０日目に）追加される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物及び／または腫瘍断片は、１容器当たり最大６０個の断片及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む容器内でインキュベートされる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に１～８日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約1×10^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に１～７日間培養され、その結果、バ

ルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、１～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、１～７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、５～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、５～７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約６～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に、約１×１０ ^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約６～７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に、約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約７～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に、約１×１０ ^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞をもたらす。

【１０５７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの拡張は、以下及び本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張ステップ（例えば、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるプロセスを含み得、０日目及び／または培養開始からのフィーダー細胞を含有する、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）のステップＢに記載されるものなど）、続いて以下のステップＤ及び本明細書に記載される急速な第２の拡張（ステップＤ、急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）ステップと称されるプロセスを含む）、続いて任意選択の凍結保存、続いて以下及び本明細書に記載される第２のステップＤ（再刺激ＲＥＰステップと称されるプロセスを含む）を使用して行うことができる。このプロセスから取得されたＴＩＬは、本明細書に記載の表現型特徴及び代謝パラメータについて任意で特徴付けられ得る。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１ｍｍ^{3}～１０ｍｍ^{3}である。

【１０５８】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、ステップＢのＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭ Ｈｅｐｅｓ、及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充した、ＧｌｕｔａＭＡＸを含むＲＰＭＩ １６４０からなる。

【１０５９】

いくつかの実施形態では、２４０個以下の腫瘍断片が存在する。いくつかの実施形態では、４つ以下の容器に入れられた２４０個以下の腫瘍断片が存在する。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００ ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、６０個以下の腫瘍断片が１つの容器に入れられる。いくつかの実施形態では、各容器は、１容器当たり５００ｍＬ以下の培地を含む。いくつかの実施形態では、培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、抗原提示フィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００ ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇのＯＫＴ－３、及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び２．５×１０^{8}の抗

原提示フィーダー細胞を含む。

【１０６０】

腫瘍断片の調製後、結果として得られた細胞（すなわち、一次細胞集団である断片）は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長を好み、かつ０日目の培養開始からＴＩＬプライミング及び加速された成長を可能にする条件下で、ＩＬ－２、抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む培地中で培養される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物及び／または腫瘍断片は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、ならびに抗原提示フィーダー細胞及びＯＫＴ－３とインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に１～８日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約1×10^{8}のバルクＴＩＬ細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張中の成長培地は、ＩＬ－２またはそのバリアント、ならびに抗原提示フィーダー細胞及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に１～７日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約1×10^{8}のバルクＴＩＬ細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張中の成長培地は、ＩＬ－２またはそのバリアント、ならびに抗原提示フィーダー細胞及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、組換えヒトＩＬ－２（ｒｈＩＬ－２）である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき２０～３０×10^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき２０×10^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき２５×10^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき３０×10^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、４～８×10^{6}ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、５～７×10^{6}ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、６×10^{6}ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、実施例Ｃに記載されるように調製される。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約１０，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、または約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、約４０００ＩＵ／ｍＬ、約４５００ＩＵ／ｍＬ、約５０００ＩＵ／ｍＬ、約５５００ＩＵ／ｍＬ、約６０００ＩＵ／ｍＬ、約６５００ＩＵ／ｍＬ、約７０００ＩＵ／ｍＬ、約７５００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬ、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬ、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【１０６１】
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１６０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１４０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、または約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、ＩＬ－１５をさらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。

【１０６２】
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約４ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、または約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２１をさらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。

【１０６３】
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、及び約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇの間、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細

胞培養培地は、１５ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３抗体は、ムロモナブである。例えば、表１を参照されたい。

【１０６４】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、細胞培養培地中に１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは４－１ＢＢアゴニストであり、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、ＥＵ－１０１、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリアント、バイオシミラー、及び組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、０．１μｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。

【１０６５】

いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、ＩＬ－２を約３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、及びＯＫＴ－３を約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、ＩＬ－２を約６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、及びＯＫＴ－３を約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【１０６６】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、それは、ＣＭ１（培養培地１）と称される。いくつかの実施形態では、ＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充した、ＧｌｕｔａＭＡＸを含むＲＰＭＩ１６４０からなる。いくつかの実施形態では、ＣＭは、実施例に記載されるＣＭ１である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培地または初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞（本明細書ではフィーダー細胞とも称される）を含む。

【１０６７】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される拡張プロセスで使用される培地は、無血清培地または合成培地である。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、血清含有培地のロット間の変動に部分的に起因する実験変動を防止及び／または減少させるために使用される。

【１０６８】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　Ｂａｓａｌ　Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ　Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ　ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ　Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。

【１０６９】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｅｒｕｍ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ、ＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代用物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代用物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代用物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の抗生物質、及び１つ以上の微量元素のうちの１つ以上が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／または２－メルカプトエタノールをさらに含む。

【１０７０】

いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔは、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＳＴ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。

【１０７１】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地中の総血清代替物濃度（ｖｏｌ％）は、総無血清または合成培地の約１体積％、２体積％、３体積％、４体積％、５体積％、６体積％、７体積％、８体積％、９体積％、１０体積％、１１体積％、１２体積％、１３体積％、１４体積％、１５体積％、１６体積％、１７体積％、１８体積％、１９体積％、または２０体積％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約３％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約５％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約１０％である。

【１０７２】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣ

ＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【１０７３】

いくつかの実施形態では、合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ

－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【１０７４】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約０．１ｍＭ～約１０ｍＭ、０．５ｍＭ～約９ｍＭ、１ｍＭ～約８ｍＭ、２ｍＭ～約７ｍＭ、３ｍＭ～約６ｍＭ、または４ｍＭ～約５ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約２ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。

【１０７５】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５ｍＭ～約１５０ｍＭ、１０ｍＭ～約１４０ｍＭ、１５ｍＭ～約１３０ｍＭ、２０ｍＭ～約１２０ｍＭ、２５ｍＭ～約１１０ｍＭ、３０ｍＭ～約１００ｍＭ、３５ｍＭ～約９５ｍＭ、４０ｍＭ～約９０ｍＭ、４５ｍＭ～約８５ｍＭ、５０ｍＭ～約８０ｍＭ、５５ｍＭ～約７５ｍＭ、６０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約６５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【１０７６】

いくつかの実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる国際ＰＣＴ公開第ＷＯ／１９９８／０３０６７９号に記載されている合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の微量元素、及び１つ以上の抗生物質からなる群から選択される１つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベータ－メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、及び１つ以上の微量元素からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチ

ジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

【１０７７】

いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌの範囲であり、Ｌ－ヒスチジンの濃度は、約５～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－イソロイシンの濃度は、約５～３００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－メチオニンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－フェニルアラニンの濃度は、約５～４００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－プロリンの濃度は、約１～１０００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－ヒドロキシプロリンの濃度は、約１～４５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－セリンの濃度は、約１～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－スレオニンの濃度は、約１０～５００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－トリプトファンの濃度は、約２～１１０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－チロシンの濃度は、約３～１７５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－バリンの濃度は、約５～５００ｍｇ／Ｌであり、チアミンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、還元型グルタチオンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩の濃度は、約１～２００ｍｇ／Ｌであり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約１～５０ｍｇ／Ｌであり、インスリンの濃度は、約１～１００ｍｇ／Ｌであり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約０．０００００１～０．０００１ｍｇ／Ｌであり、アルブミン（例えば、ＡｌｂｕＭＡＸ（登録商標）Ｉ）の濃度は、約５０００～５０，０００ｍｇ／Ｌである。

【１０７８】

いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地中の濃度範囲」という見出しの下の列にリストされた濃度範囲で存在する。他の実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされた最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかでは、無血清サプリメントは、表４の「サプリメント中の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。

【１０７９】

いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約２６０～３５０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約２８０～３１０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、合成培地には、最大約３．７ｇ／Ｌ、または約２．２ｇ／Ｌの重炭酸ナトリウムが補充されている。合成培地には、Ｌ－グルタミン（最終濃度約２ｍＭ）、１つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ、最終濃度約１００μＭ）、２－メルカプトエタノール（最終濃度約１００μＭ）がさらに補充されていてもよい。

【１０８０】

いくつかの実施形態では、Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ ａｌ．，ＣｌｉｎＴｒａｎｓｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，４（１）２０１５（ｄｏｉ：１０．１０３８／ｃｔｉ．２０１４．３１）に記載の合成培地が、本発明において有用である。簡潔には、ＲＰＭＩまたはＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）を基礎細胞培地として使用し、０、２％、５％、または１０％のいずれかのＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔを補充した。

【１０８１】

いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ベーターメルカプトエタノール（ＢＭＥまたはβＭＥ、２－メルカプトエタノールとしても知られる、ＣＡＳ６０－２４－２）を欠いている。

【１０８２】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、１～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、２～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、３～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、４～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、５～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、６～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図１または図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）のステップＢに提供されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、７～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）のステップＢに提供されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、１～７日間である。い

くつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、２～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、３～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、４～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂ及び／または図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、５～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、６～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）のステップＢに提供されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、７日間である。

【１０８３】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから２日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから２日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから３日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから３日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから４日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから４日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステ

ップが開始されたときから５日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから５日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから６日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから６日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから７日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから７日間続行することができる。

【１０８４】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬのプライミングによる第１の拡張は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、３日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、３日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、４日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、４日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、５日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、５日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、６日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、６日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、７日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、７日間続行することができる。

【１０８５】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１の組み合わせは、プライミングによる第１の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）による、ならびに本明細書に記載のステップＢプロセス中を含む、プライミングによる第１の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の組み合わせは、プライミングによる第１の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）による、及び本明細書に記載のステップＢプロセス中に含まれ得る。

【１０８６】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張、例えば、図８によるステップＢ（特に、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）は、閉鎖系バイオリアクターにおい

て行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが容器として用いられる。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－１０である。

【１０８７】

１．フィーダー細胞及び抗原提示細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ４～８日目の間の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ４～７日目の間の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ５～８日目の間の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ５～７日目の間の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ６～８日目の間の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含

む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ６～７日目の間の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ７日目または８日目の間の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ７日目の間の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ８日目の間の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。

【１０８８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時及びプライミングによる第１の拡張中にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要する。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者由来の標準の全血単位から取得される末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、2.5×10^{8}のフィーダー細胞が、プライミングによる第１の拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、容器当たり2.5×10^{8}のフィーダー細胞が、プライミングによる第１の拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、ＧＲＥＸ－１０当たり2.5×10^{8}のフィーダー細胞が、プライミングによる第１の拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、ＧＲＥＸ－１００当たり2.5×10^{8}のフィーダー細胞が、プライミングによる第１の拡張中に使用される。

【１０８９】

一般に、同種異系ＰＢＭＣは、放射線照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、実施例に記載されるように、ＲＥＰ手順で使用され、これは、放射線照射された同種異系ＰＢＭＣの複製無能力を評価するための例示的なプロトコルを提供する。

【１０９０】

いくつかの実施形態では、１４日目の総生細胞数が、プライミングによる第１の拡張の０日目に培養された初期の生細胞数よりも少ない場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。

【１０９１】

いくつかの実施形態では、７日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された総生細胞数が、プライミングによる第１の拡張の０日目に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の

存在下で培養される。

【１０９２】

いくつかの実施形態では、７日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された総生細胞数が、プライミングによる第１の拡張の０日目に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、５～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び１０００～６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１０～５０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～５０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２０～４０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～４０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２５～３５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２５００～３５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【１０９３】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、約１：２５、約１：５０、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００、約１：３２５、約１：３５０、約１：３７５、約１：４００、または約１：５００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：５０～１：３００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：１００～１：２００である。

【１０９４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順は、約２．５×10^8フィーダー細胞：約１００×10^6ＴＩＬの比を必要とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順は、約２．５×10^8フィーダー細胞：約５０×10^6ＴＩＬの比を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順は、約２．５×10^8フィーダー細胞：約２５×10^6ＴＩＬを必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張は、約２．５×10^8フィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、急速な第２の拡張で使用されるフィーダー細胞の数の４分の１、３分の１、１２分の５、または半分を必要とする。

【１０９５】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、容器当たり２．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり３０ｎｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び２．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び２．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、

容器当たり５００ｍＬの培養培地及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞当たり１５μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地及び１５μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、５００ｍＬの培養培地、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、１５μｇのＯＫＴ－３、及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞当たり１５μｇのＯＫＴ－３を含む。

【１０９６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順は、第２の拡張中にＴＩＬを超える過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者由来の標準の全血単位から取得される末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、人工抗原提示（ａＡＰＣ）細胞がＰＢＭＣの代わりに使用される。

【１０９７】

一般に、同種異系ＰＢＭＣは、放射線照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、図及び実施例に記載される例示的な手順を含む、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順で使用される。

【１０９８】

いくつかの実施形態では、人工抗原提示細胞は、ＰＢＭＣの代替物として、またはＰＢＭＣと組み合わせて、プライミングによる第１の拡張において使用される。

【１０９９】

２．サイトカイン及び他の添加物

本明細書に記載の拡張方法は、一般に、当該技術分野で知られているように、高用量のサイトカイン、特にＩＬ－２を含む培養培地を使用する。

【１１００】

代替

いくつかの実施形態では、ＴＩＬのプライミングによる第１の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第２０１７／０１０７４９０　Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせを用いて可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２及びＩＬ－１５、ＩＬ－２及びＩＬ－２１、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１及びＩＬ－２、またはＩＬ－１５及びＩＬ－２１が含まれる。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにＴ細胞の生成に特に有利に働く。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、低濃度、例えば、約１０ＩＵ／ｍＬ、約２０ＩＵ／ｍＬ、約３０ＩＵ／ｍＬ、約４０ＩＵ／ｍＬ、約５０ＩＵ／ｍＬ、約１００ＩＵ／ｍＬ、約２００ＩＵ／ｍＬ、約３００ＩＵ／ｍＬ、約４００ＩＵ／ｍＬ、約５００ＩＵ／ｍＬ、約６００ＩＵ／ｍＬ、約７００ＩＵ／ｍＬ、約８００ＩＵ／ｍＬ、約９００ＩＵ／ｍＬ、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、または約４０００ＩＵ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、約１０～４０００ＩＵ／ｍＬ、約１００～３０００ＩＵ／ｍＬ、約５００～２０００ＩＵ／ＭＬ、または約１０００～１５００ＩＵ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、約１０００ＩＵ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、約１ｎｇ／ｍＬ、約２ｎｇ／ｍＬ、約３ｎｇ／ｍＬ、約４ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約

９０ｎｇ／ｍＬ、または約１００ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、約１０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、約１ｎｇ／ｍＬ、約２ｎｇ／ｍＬ、約３ｎｇ／ｍＬ、約４ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約１５０ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約２５０ｎｇ／ｍＬ、または約３００ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、約１０ｎｇ／ｍＬで添加され、ＩＬ－２１は、約３０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のうちの１つ以上は、ステップＢ中、例えば、ステップＢのＤ０及びＤ３、Ｄ０及びＤ４、Ｄ０及びＤ５、Ｄ０及びＤ６、Ｄ０及びＤ７、Ｄ０及びＤ８に２回添加される。例えば、表２を参照されたい。

【１１０１】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＫＴ－３抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、４－１ＢＢアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＸ－４０アゴニストの、培養培地への添加を含み得る。加えて、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（ＰＰＡＲ）－ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーターＩ－アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第２０１９／０３０７７９６　Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップＢ中の培養培地で使用されてもよい。

【１１０２】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、培養培地中のタンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤（ＡＫＴｉ）の添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、ＡＫＴ阻害剤を含む培地中で培養され、ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}及び／またはＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性濃縮ＴＩＬ集団を取得する。いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イパタセルチブ、ＧＳＫ６９０６９３、ＧＳＫ２１４１７９５、ＧＳＫ２１１０１８３、ＡＺＤ５３６３、ＧＤＣ－００６８、ＡＴ７８６７、ＣＣＴ１２８９３０、ＭＫ－２２０６、ＢＡＹ１１２５９７６、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、ホノキオール、及びそれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イパタセルチブである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を、約０．１μＭ、約０．２μＭ、約０．３μＭ、約０．４μＭ、約０．５μＭ、約０．６μＭ、約０．７μＭ、約０．８μＭ、約０．９μＭ、約１μＭ、約１．１μＭ、約１．２μＭ、約１．３μＭ、約１．４μＭ、約１．５μＭ、約１．６μＭ、約１．７μＭ、約１．８μＭ、約１．９μＭ、約２μＭ、約２．１μＭ、約２．２μＭ、約２．３μＭ、約２．４μＭ、約２．５μＭ、約２．６μＭ、約２．７μＭ、約２．８μＭ、約２．９μＭ、約３μＭ、約３．５μＭ、約４μＭ、約４．５μＭ、約５μＭ、約６μＭ、約７μＭ、約８μＭ、約９μＭ、約１０μＭ、約２０μＭ、約３０μＭ、約４０μＭ、約５０μＭ、約６０μＭ、約７０μＭ、約８０μＭ、約９０μＭ、または約１００μＭのＡＫＴ阻害剤を含む培地中で培養する。

【１１０３】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１２．５ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、または約２０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、約１０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約４５ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約５５ｎｇ／ｍＬ、または約６０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、約３０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、約１０

ｎｇ／ｍＬで添加され、ＩＬ－２１は、約３０ｎｇ／ｍＬで添加される。

【１１０４】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、Ｄ０、Ｄ１またはＤ２において、ＣＤ４０アゴニスト、例えば、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０アゴニスト抗体の添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０Ｌが添加される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ４０アゴニスト抗体が添加される。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約４５ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約５５ｎｇ／ｍＬ、または約６０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、約３０ｎｇ／ｍＬで添加される。

【１１０５】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、Ｄ０、Ｄ１またはＤ２において、ＩＦＮγの添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ＩＦＮγが添加される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮγは、約５０ｎｇ／ｍＬ、約５５ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約６５ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約７５ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約８５ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約９５ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約１０５ｎｇ／ｍＬ、約１１０ｎｇ／ｍＬ、約１１５ｎｇ／ｍＬ、約１２０ｎｇ／ｍＬ、約１２５ｎｇ／ｍＬ、約１３０ｎｇ／ｍＬ、約１３５ｎｇ／ｍＬ、約１４０ｎｇ／ｍＬ、約１４５ｎｇ／ｍＬ、約１５０ｎｇ／ｍＬ、約１５５ｎｇ／ｍＬ、約１６０ｎｇ／ｍＬ、約１６５ｎｇ／ｍＬ、約１７０ｎｇ／ｍＬ、約１７５ｎｇ／ｍＬ、約１８０ｎｇ／ｍＬ、約１８５ｎｇ／ｍＬ、約１９０ｎｇ／ｍＬ、約１９５ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約２０５ｎｇ／ｍＬ、約２１０ｎｇ／ｍＬ、約２１５ｎｇ／ｍＬ、約２２０ｎｇ／ｍＬ、約２２５ｎｇ／ｍＬ、約２３０ｎｇ／ｍＬ、約２３５ｎｇ／ｍＬ、約２４０ｎｇ／ｍＬ、約２４５ｎｇ／ｍＬ、約２５０ｎｇ／ｍＬ、約２５５ｎｇ／ｍＬ、約２６０ｎｇ／ｍＬ、約２６５ｎｇ／ｍＬ、約２７０ｎｇ／ｍＬ、約２７５ｎｇ／ｍＬ、約２８０ｎｇ／ｍＬ、約２８５ｎｇ／ｍＬ、約２９０ｎｇ／ｍＬ、約２９５ｎｇ／ｍＬ、または約３００ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮγは、約２００ｎｇ／ｍＬで添加される。

【１１０６】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、Ｄ０、Ｄ１またはＤ２において、抗ＰＤ－１抗体の添加を含み得る。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、約５μｇ／ｍＬ、約１０μｇ／ｍＬ、約１５μｇ／ｍＬ、約２０μｇ／ｍＬ、約２５μｇ／ｍＬ、約３０μｇ／ｍＬ、約３５μｇ／ｍＬ、約４０μｇ／ｍＬ、約４５μｇ／ｍＬ、約５０μｇ／ｍＬ、約５５μｇ／ｍＬ、または約６０μｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、約１０μｇ／ｍＬで添加される。

【１１０７】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、Ｄ０、Ｄ１またはＤ２において、抗ＣＴＬＡ－４抗体の添加を含み得る。いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、約５μｇ／ｍＬ、約１０μｇ／ｍＬ、約１５μｇ／ｍＬ、約２０μｇ／ｍＬ、約２５μｇ／ｍＬ、約３０μｇ／ｍＬ、約３５μｇ／ｍＬ、約４０μｇ／ｍＬ、約４５μｇ／ｍＬ、約５０μｇ／ｍＬ、約５５μｇ／ｍＬ、または約６０μｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、約１０μｇ／ｍＬで添加される。

【１１０８】

Ｃ．ステップＣ：プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行

場合によっては、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に示されるようにステップＢから取得されるＴＩＬ集団を含む、プライミングによる第１の拡張から取得されたバルクＴＩＬ母集団（ＲＥＰ前と称されることもある拡張を含み得る）は、急速な第２の拡張（これは、急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されることもある拡張を含み得る）に供され、次いで、以下で考察されるように凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾ＴＩＬが療法に使用される場合、プライミングによる第１の拡張由来の拡張

ＴＩＬ集団または急速な第２の拡張由来の拡張ＴＩＬ集団は、拡張ステップ前またはプライミングによる第１の拡張後及び急速な第２の拡張前に好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。

【１１０９】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に示されるステップＢから）取得されたＴＩＬは、選択のために表現型決定されるまで保管される。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に示されるステップＢから）取得されたＴＩＬは保管されず、急速な第２の拡張に直接進む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から取得されたＴＩＬは、プライミングによる第１の拡張後及び急速な第２の拡張前に凍結保存されない。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、腫瘍の断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約３日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約３日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約４日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約４日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約５日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約５日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約６日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約６日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約７日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約８日で起こる。

【１１１０】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによ

る第１の拡張ステップが開始されたときから１日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから２日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから２日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから３日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから３日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから４日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから４日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから５日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから５日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから６日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから６日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから７日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから８日で起こる。

【１１１１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、初期第１の拡張後、及び急速な第２の拡張前に保存されず、ＴＩＬは、急速な第２の拡張に直接進行する（例えば、いくつかの実施形態では、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に示されるようにステップＢからステップＤへの移行中の保存がない）。いくつかの実施形態では、移行は、本明細書に記載されるように、閉鎖系内で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張由来のＴＩＬである第２のＴＩＬ集団は、移行期間なしで急速な第２の拡張に直接進む。

【１１１２】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）によるステップＣは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、ＧＲＥＸ－１０またはＧＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。いくつかの実施形

態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、容器サイズのスケールアップを伴う。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、急速な第２の拡張よりも小さい容器内で行われる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、ＧＲＥＸ－１００内で行われ、急速な第２の拡張は、ＧＲＥＸ－５００内で行われる。

【１１１３】

Ｄ．ステップＤ：急速な第２の拡張

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ細胞集団は、採取及びプライミングによる第１の拡張後、ステップＡ及びステップＢ、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に示されるように、ステップＣと称される移行後に数がさらに拡張される。このさらなる拡張は、本明細書では急速な第２の拡張または急速拡張と称され、これは、当該技術分野で一般に急速拡張プロセス（急速拡張プロトコルまたはＲＥＰ、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）のステップＤに示されるプロセス）と称される拡張プロセスを含み得る。急速な第２の拡張は、一般に、フィーダー細胞、サイトカイン源、及び抗ＣＤ３抗体を含む、いくつかの成分を含む培養培地を使用して、ガス透過性容器内で達成される。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張開始の１日、２日、３日、または４日後（すなわち、Ｇｅｎ３プロセス全体の８、９、１０、または１１日目）に、ＴＩＬは、より大容量の容器に移される。

【１１１４】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの急速な第２の拡張（ＲＥＰと称されることもある拡張、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）のステップＤに示されるプロセスを含み得る）は、当業者に知られている任意のＴＩＬフラスコまたは容器を使用して行うことができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、または１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約１日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約１日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約３日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約３日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約４日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約４日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約５日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約５日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約６日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約６日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約７日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約７日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約８日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約８日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始

後、約９日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約３日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約５日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約６日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約１０日間続行することができる。

【１１１５】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、本開示の方法（例えば、ＲＥＰと称される拡張、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）のステップＤに示されるプロセスを含む）を使用して、ガス透過性容器内で行うことができる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）の存在下での急速な第２の拡張において拡張される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びフィーダー細胞の存在下での急速な第２の拡張において拡張され、フィーダー細胞は、プライミングによる第１の拡張において存在するフィーダー細胞の濃度の２倍、２．４倍、２．５倍、３倍、３．５倍、または４倍である最終濃度まで追加される。例えば、ＴＩＬは、インターロイキン－２（ＩＬ－２）またはインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）の存在下で非特異的Ｔ細胞受容体刺激を使用して、急速に拡張され得る。非特異的Ｔ細胞受容体刺激は、例えば、抗ＣＤ３抗体、例えば約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３、マウスモノクローナル抗ＣＤ３抗体（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ，Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪもしくはＭｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡから市販）またはＵＨＣＴ－１（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡから市販）を含み得る。ＴＩＬは、がんのエピトープ（複数可）などの抗原性部分を含む、第２の拡張中に１つ以上の抗原を含むことによって、インビトロでＴＩＬのさらなる刺激を誘導するように拡張することができ、これは、ベクター、例えば、ヒト白血球抗原Ａ２（ＨＬＡ－Ａ２）結合ペプチド、例えば、０．３μＭ ＭＡＲＴ－１：２６－３５（２７Ｌ）またはｇｐｌ００：２０９－２１７（２１０Ｍ）から、任意選択で３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２またはＩＬ－１５などのＴ細胞成長因子の存在下で任意で発現され得る。他の好適な抗原には、例えば、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、チロシナーゼがん抗原、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＳＳＸ－２、及びＶＥＧＦＲ２、またはそれらの抗原性部分が含まれ得る。ＴＩＬは、ＨＬＡ－Ａ２を発現する抗原提示細胞にパルスされたがんの同じ抗原（複数可）で再刺激することによっても急速に拡張され得る。代替的に、ＴＩＬは、例えば、例として放射線照射された自己リンパ球または放射線照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２でさらに再刺激され得る。いくつかの実施形態では、再刺激は、第２の拡張の一部として起こる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、放射線照射された自己リンパ球の存在下で、または放射線照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２を用いて起こる。

【１１１６】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、約４０

００ＩＵ／ｍＬ、約４５００ＩＵ／ｍＬ、約５０００ＩＵ／ｍＬ、約５５００ＩＵ／ｍＬ、約６０００ＩＵ／ｍＬ、約６５００ＩＵ／ｍＬ、約７０００ＩＵ／ｍＬ、約７５００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬ、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬ、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ、または８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【１１１７】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、及び約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇの間、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、１５ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬ～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３抗体は、ムロモナブである。

【１１１８】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、容器当たり７．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培地中に、容器当たり５００ｍＬの培養培地及び３０μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培地中に、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び７．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０μｇのＯＫＴ－３、及び７．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【１１１９】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５×10^8～７．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地及び３０μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び５×10^8～７．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地、ならびに６０００ＩＵ／

ｍＬのＩＬ－２、３０μｇのＯＫＴ－３、及び５×１０^{8}～７．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【１１２０】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、細胞培養培地中に１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは４－１ＢＢアゴニストであり、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、ＥＵ－１０１、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリアント、バイオシミラー、及び組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、０．１μｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。

【１１２１】

いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、細胞培養培地は、ＩＬ－２を約３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、及びＯＫＴ－３を約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【１１２２】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１の組み合わせは、第２の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）による、ならびに本明細書に記載のステップＤプロセス中を含む、第２の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の組み合わせは、第２の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）による、及び本明細書に記載のステップＤプロセス中に含まれ得る。

【１１２３】

いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、抗原提示フィーダー細胞、及び任意でＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む補充された細胞培養培地において実施され得る。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、補充された細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、補充された細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、第２の細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ、抗原提示フィーダー細胞とも称される）を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞（すなわち、抗原提示細胞）を含む細胞培養培地中で起こる。

【１１２４】

いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１６０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１４０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、または約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態で

は、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－１５をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。

【１１２５】

いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約４ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、または約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２１をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。

【１１２６】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣ及び／または抗原提示細胞に対する比は、約１：１０、約１：１５、約１：２０、約１：２５、約１：３０、約１：３５、約１：４０、約１：４５、約１：５０、約１：７５、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００、約１：３２５、約１：３５０、約１：３７５、約１：４００、または約１：５００である。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣに対する比は、１：５０～１：３００である。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣに対する比は、１：１００～１：２００である。

【１１２７】

いくつかの実施形態では、ＲＥＰ及び／または急速な第２の拡張は、バルクＴＩＬを１００倍または２００倍過剰の不活性化フィーダー細胞と混合してフラスコ内で行われ、フィーダー細胞濃度は、１５０ｍｌ培地中のプライミングによる第１の拡張、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗ＣＤ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２におけるフィーダー細胞濃度の少なくとも１．１倍（１．１倍）、１．２倍、１．３倍、１．４倍、１．５倍、１．６倍、１．７倍、１．８倍、１．８倍、２倍、２．１倍、２．２倍、２．３倍、２．４倍、２．５倍、２．６倍、２．７倍、２．８倍、２．９倍、３．０倍、３．１倍、３．２倍、３．３倍、３．４倍、３．５倍、３．６倍、３．７倍、３．８倍、３．９倍または４．０倍である。培地交換（一般に、使用済み培地の３分の２の吸引及び等量の新鮮な培地との交換による、３分の２培地交換）は、細胞が代替の成長チャンバに移されるまで行われる。代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、Ｇ－ＲＥＸフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【１１２８】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張（ＲＥＰプロセスと称されるプロセスを含み得る）は、実施例及び図で論じられるように、７～９日間である。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、７日間である。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、８日間である。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、９日間である。

【１１２９】
いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）のステップＤで参照される拡張を含み得る）は、１００ｃｍのガス透過性シリコン底部（Ｇ－ＲＥＸ－１００、Ｗｉｌｓｏｎ Ｗｏｌｆ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｎｅｗ Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ，ＵＳＡから市販）を有する５００ｍＬ容量のガス透過性フラスコ内で行うことができる。５×１０^{6}または１０×１０^{6}ＴＩＬは、５％ヒトＡＢ血清、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）を補充された４００ｍＬの５０／５０培地中でＰＢＭＣとともに培養され得る。Ｇ－ＲＥＸ－１００フラスコを、５％ CO_2中３７℃でインキュベートすることができる。５日目に、２５０ｍＬの上清が除去され、遠心分離ボトルに入れられ、１５００ｒｐｍ（４９１×ｇ）で１０分間遠心分離される。ＴＩＬペレットが、５％ヒトＡＢ血清、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬの新鮮な培地で再懸濁され、元のＧＲＥＸ－１００フラスコに戻し追加され得る。ＴＩＬがＧＲＥＸ－１００フラスコで連続して拡張される場合、１０日目または１１日目に、ＴＩＬは、ＧＲＥＸ－５００などのより大きいフラスコに移され得る。培養１４日目に、細胞が採取され得る。培養１５日目に、細胞が採取され得る。培養１６日目に、細胞が採取され得る。いくつかの実施形態では、培地交換は、細胞が代替の成長チャンバに移されるまで行われる。いくつかの実施形態では、培地の３分の２は、使用済み培地の吸引及び等体積の新鮮な培地との交換によって交換される。いくつかの実施形態では、代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、ＧＲＥＸフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【１１３０】
いくつかの実施形態では、本明細書に開示される拡張プロセスで使用される培地は、無血清培地または合成培地である。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、血清含有培地のロット間の変動に部分的に起因する実験変動を防止及び／または減少させるために使用される。

【１１３１】
いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。

【１１３２】
いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｅｒｕｍ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ、ＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代用物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代用物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代用物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の抗生物質、及び１つ以上の微量元素のうちの１つ以上が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－

バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／または２－メルカプトエタノールをさらに含む。

【１１３３】

いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔは、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＳＴ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。

【１１３４】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地中の総血清代替物濃度（ｖｏｌ％）は、総無血清または合成培地の約１体積％、２体積％、３体積％、４体積％、５体積％、６体積％、７体積％、８体積％、９体積％、１０体積％、１１体積％、１２体積％、１３体積％、１４体積％、１５体積％、１６体積％、１７体積％、１８体積％、１９体積％、または２０体積％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約３％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約５％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約１０％である。

【１１３５】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。

【１１３６】

ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。

【１１３７】

いくつかの実施形態では、合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）

ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。

【１１３８】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約０．１ｍＭ～約１０ｍＭ

、０．５ｍＭ～約９ｍＭ、１ｍＭ～約８ｍＭ、２ｍＭ～約７ｍＭ、３ｍＭ～約６ｍＭ、または４ｍＭ～約５ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約２ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。

【１１３９】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５ｍＭ～約１５０ｍＭ、１０ｍＭ～約１４０ｍＭ、１５ｍＭ～約１３０ｍＭ、２０ｍＭ～約１２０ｍＭ、２５ｍＭ～約１１０ｍＭ、３０ｍＭ～約１００ｍＭ、３５ｍＭ～約９５ｍＭ、４０ｍＭ～約９０ｍＭ、４５ｍＭ～約８５ｍＭ、５０ｍＭ～約８０ｍＭ、５５ｍＭ～約７５ｍＭ、６０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約６５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。

【１１４０】

いくつかの実施形態では、国際特許出願公開第ＷＯ１９９８／０３０６７９号及び米国特許出願公開第２００２／００７６７４７　Ａ１号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載される合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の微量元素、及び１つ以上の抗生物質からなる群から選択される１つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベーターメルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、及び１つ以上の微量元素からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

【１１４１】

いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌの範囲であり、Ｌ－ヒスチジンの濃度は、約５～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－イソロイシンの濃度は、約５～３００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－メチオニンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－フェニルアラニンの濃度は、約５～４００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－プロリンの濃度は、約１～１０００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－ヒドロキシプロリンの濃度は、約１～４５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－セリンの濃度は、約１～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－スレオニンの濃度は、約１０～５００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－トリプトファンの濃度は、約２～１１０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－チロシンの濃度は、約３～１７５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－バリンの濃度

は、約５～５００ｍｇ／Ｌであり、チアミンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、還元型グルタチオンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩の濃度は、約１～２００ｍｇ／Ｌであり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約１～５０ｍｇ／Ｌであり、インスリンの濃度は、約１～１００ｍｇ／Ｌであり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約０．０００００１～０．０００１ｍｇ／Ｌであり、アルブミン（例えば、ＡｌｂｕＭＡＸ（登録商標）Ｉ）の濃度は、約５０００～５０，０００ｍｇ／Ｌである。

【１１４２】

いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地中の濃度範囲」という見出しの下の列に列挙された濃度範囲で存在する。他の実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地の好ましい実施形態」という見出しの下の列に列挙された最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかでは、無血清サプリメントは、表４の「サプリメント中の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。

【１１４３】

いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約２６０～３５０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約２８０～３１０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、合成培地には、最大約３．７ｇ／Ｌ、または約２．２ｇ／Ｌの重炭酸ナトリウムが補充されている。合成培地には、Ｌ－グルタミン（最終濃度約２ｍＭ）、１つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ、最終濃度約１００μＭ）、２－メルカプトエタノール（最終濃度約１００μＭ）がさらに補充されていてもよい。いくつかの実施形態では、Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，４（１）２０１５（ｄｏｉ：１０．１０３８／ｃｔｉ．２０１４．３１）に記載の合成培地が、本発明において有用である。簡潔には、ＲＰＭＩまたはＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）を基礎細胞培地として使用し、０、２％、５％、または１０％のいずれかのＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔを補充した。

【１１４４】

いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ベーターメルカプトエタノール（ＢＭＥまたはβＭＥ、２－メルカプトエタノールとしても知られる、ＣＡＳ６０－２４－２）を欠いている。

【１１４５】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）が行われ、優れた腫瘍反応性のためにＴＩＬが選択されるステップをさらに含む。当該技術分野で知られている任意の選択方法が使用され得る。例えば、米国特許出願公開第２０１６／００１００５８Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている方法が、優れた腫瘍反応性のためのＴＩＬの選択に使用され得る。

【１１４６】

任意選択で、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準のアッセイを使用して、急速な第２の拡張（ＲＥＰ拡張と称される拡張を含む）後に行われ得る。例えば、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンブルー排除アッセイが、バルクＴＩＬの試料上で行われ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ試料は、Ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２自動セルカウンター（Ｎｅｘｃｅｌｏｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｌａｗｒｅｎｃｅ，ＭＡ）を使用して計数され、生存率が決定され得る。いくつかの実施形態では、生存率は、標準のＣｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２　Ｉｍａｇｅ　Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ　Ａｕｔｏｍａｔｉｃ　Ｃｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｅｒプロトコルに従って決定される。

【１１４７】

Ｔリンパ球及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、及びＣ（一定）は、免疫グロブリン及びＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第２の拡張において取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加する。

【１１４８】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地と称されることもある）は、以下でさらに詳細に考察されるように、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、ならびに抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地とも称される）は、以下でさらに詳細に論じられるように、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｕｇ／フラスコのＯＫＴ－３、ならびに7.5×10^{8}の抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地と称されることもある）は、以下でさらに詳細に考察されるように、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、ならびに抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地とも称される）は、以下でさらに詳細に論じられるように、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｕｇ／フラスコのＯＫＴ－３、ならびに5×10^{8}の抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。

【１１４９】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張、例えば、図８によるステップＤ（特に、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）は、閉鎖系バイオリアクターにおいて行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが容器として用いられる。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００またはＧ－ＲＥＸ－５００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－５００である。

【１１５０】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～７日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養でのＴＩＬを、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００－ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来のＴＩＬを、第２の容器内でのより大規模な培養で約４～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。

【１１５１】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて

、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～７日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴＩＬの一部が、第２の小規模培養で約４～７日間培養される。

【１１５２】

いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、ＴＩＬの複数の約２～５亜集団に配分される。

【１１５３】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～７日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴＩＬの一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。

【１１５４】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約５日間培養することによって急速なまたは第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴＩＬの一部が、より大規模な培養で約６日間培養される。

【１１５５】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個のＴＩＬ、少なくとも10^9個のＴＩＬ、または少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。例示的な一実施形態では、各第２の容器は、少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。

【１１５６】

いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２～５亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２、３、４、または５亜集団に配分される。

【１１５７】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張の完了後、複数の亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の完了後、１つ以上のＴＩＬの亜集団を一緒にプールして、治療有効量のＴＩＬを産生する。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、ＴＩＬの各亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。

【１１５８】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、複数のステップに分割される前に、約３～７日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張の分裂は、急速または第２の拡張の開始後約３日目、４日目、５日目、６日目、または７日目に起こる。

【１１５９】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張の分裂は、第１の拡張（すなわち、ＲＥＰ

前拡張）の開始後の約７日目、８日目、９日目、１０日目、１１日目、１２日目、１３日目、１４日目、１５日目、または１６日目、１７日目、または１８日目に起こる。例示的な一実施形態では、急速または第２の拡張の分裂は、第１の拡張の開始後約１６日目に起こる。

【１１６０】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、分裂後約７～１１日間、さらに行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、分裂後約５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日間、さらに行われる。

【１１６１】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地と同じ成分を含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地とは異なる成分を含む。

【１１６２】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む。

【１１６３】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な細胞培養培地で置き換えることによって生成される。

【１１６４】

いくつかの実施形態では、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。

【１１６５】

１．フィーダー細胞及び抗原提示細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の急速な第２の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）のステップＤに記載されるような拡張、ならびにＲＥＰと称されるものを含む）は、ＲＥＰ　ＴＩＬ拡張中及び／または急速な第２の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な献血者由来の標準の全血単位から得られる末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得さ

れる。

【１１６６】

一般に、同種異系ＰＢＭＣは、放射線照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、実施例に記載されるように、ＲＥＰ手順で使用され、これは、放射線照射された同種異系ＰＢＭＣの複製無能力を評価するための例示的なプロトコルを提供する。

【１１６７】

いくつかの実施形態では、７日目または１４日目の総生細胞数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数よりも少ない場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。

【１１６８】

いくつかの実施形態では、７日目及び１４日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された総生細胞数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【１１６９】

いくつかの実施形態では、７日目及び１４日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された総生細胞数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び１０００～６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～５０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～４０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２５００～３５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【１１７０】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、約１：１０、約１：２５、約１：５０、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００、約１：３２５、約１：３５０、約１：３７５、約１：４００、または約１：５００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：５０～１：３００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：１００～１：２００である。

【１１７１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約５×10^8フィーダー細胞：約１００×10^6ＴＩＬの比を必要とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約７．５×10^8フィーダー細胞：約１００×10^6ＴＩＬの比を必要とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約５

×１０^{8}フィーダー細胞：約５０×１０^{6}ＴＩＬの比を必要とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約７．５×１０^{8}フィーダー細胞：約５０×１０^{6}ＴＩＬの比を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約５×１０^{8}フィーダー細胞：約２５×１０^{6}ＴＩＬを必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約７．５×１０^{8}フィーダー細胞：約２５×１０^{6}ＴＩＬを必要とする。さらに他の実施形態では、急速な第２の拡張は、急速な第２の拡張の２倍の数のフィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張が約２．５×１０^{8}フィーダー細胞を必要とする場合、急速な第２の拡張は、約５×１０^{8}フィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張が約２．５×１０^{8}フィーダー細胞を必要とする場合、急速な第２の拡張は、約７．５×１０^{8}フィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張の２倍（２．０×）、２．５倍、３．０倍、３．５倍または４．０倍の数のフィーダー細胞を必要とする。

【１１７２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の急速な第２の拡張手順は、急速な第２の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者由来の標準の全血単位から取得される末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、人工抗原提示（ａＡＰＣ）細胞がＰＢＭＣの代わりに使用される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、プライミングによる第１の拡張に追加されたＰＢＭＣの２倍の濃度で、急速な第２の拡張に追加される。

【１１７３】

一般に、同種異系ＰＢＭＣは、放射線照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、図及び実施例に記載される例示的な手順を含む、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順で使用される。

【１１７４】

いくつかの実施形態では、人工抗原提示細胞は、ＰＢＭＣの代替物として、またはＰＢＭＣと組み合わせて、急速な第２の拡張において使用される。

【１１７５】

２．サイトカイン及び他の添加物

本明細書に記載の急速な第２の拡張方法は、一般に、当該技術分野で知られているように、高用量のサイトカイン、特にＩＬ－２を含む培養培地を使用する。

【１１７６】

いくつかの実施形態では、急速なＴＩＬ拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第２０１７／０１０７４９０Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせを用いて可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２及びＩＬ－１５、ＩＬ－２及びＩＬ－２１、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１及びＩＬ－２、またはＩＬ－１５及びＩＬ－２１が含まれる。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにＴ細胞の生成に特に有利に働く。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、低濃度、例えば、約１０ＩＵ／ｍＬ、約２０ＩＵ／ｍＬ、約３０ＩＵ／ｍＬ、約４０ＩＵ／ｍＬ、約５０ＩＵ／ｍＬ、約１００ＩＵ／ｍＬ、約２００ＩＵ／ｍＬ、約３００ＩＵ／ｍＬ、約４００ＩＵ／ｍＬ、約５００ＩＵ／ｍＬ、約６００ＩＵ／ｍＬ、約７００ＩＵ／ｍＬ、約８００ＩＵ／ｍＬ、約９００ＩＵ／ｍＬ、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、または約４０００ＩＵ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、約１０～４０００ＩＵ／ｍＬ、約１００～３０００ＩＵ／ｍＬ、約５００～２０００ＩＵ／ＭＬ、または約１０００～１５００ＩＵ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、約１０００ＩＵ／ｍ

Ｌで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、約１ｎｇ／ｍＬ、約２ｎｇ／ｍＬ、約３ｎｇ／ｍＬ、約４ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、または約１００ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、約１０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、約１ｎｇ／ｍＬ、約２ｎｇ／ｍＬ、約３ｎｇ／ｍＬ、約４ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約１５０ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約２５０ｎｇ／ｍＬ、または約３００ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、約１０ｎｇ／ｍＬで添加され、ＩＬ－２１は、約３０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のうちの１つ以上は、ステップＢ中、例えば、ステップＢのＤ０及びＤ３、Ｄ０及びＤ４、Ｄ０及びＤ５、Ｄ０及びＤ６、Ｄ０及びＤ７、Ｄ０及びＤ８に２回添加される。

【１１７７】

いくつかの実施形態では、ステップＤ（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇから）はまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＫＴ－３抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、４－１ＢＢアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＤ（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇから）はまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＸ－４０アゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。加えて、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（ＰＰＡＲ）－ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーターＩ－アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第２０１９／０３０７７９６　Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップＤ（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇから）中の培養培地で使用されてもよい。

【１１７８】

いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、培養培地中のタンパク質キナーゼＢ（ＡＫＴ）阻害剤（ＡＫＴｉ）の添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、ＡＫＴ阻害剤を含む培地中で培養され、ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}及び／またはＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性濃縮ＴＩＬ集団を取得する。いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イパタセルチブ、ＧＳＫ６９０６９３、ＧＳＫ２１４１７９５、ＧＳＫ２１１０１８３、ＡＺＤ５３６３、ＧＤＣ－００６８、ＡＴ７８６７、ＣＣＴ１２８９３０、ＭＫ－２２０６、ＢＡＹ１１２５９７６、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、ホノキオール、及びそれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＡＫＴ阻害剤は、イパタセルチブである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を、約０．１μＭ、約０．２μＭ、約０．３μＭ、約０．４μＭ、約０．５μＭ、約０．６μＭ、約０．７μＭ、約０．８μＭ、約０．９μＭ、約１μＭ、約１．１μＭ、約１．２μＭ、約１．３μＭ、約１．４μＭ、約１．５μＭ、約１．６μＭ、約１．７μＭ、約１．８μＭ、約１．９μＭ、約２μＭ、約２．１μＭ、約２．２μＭ、約２．３μＭ、約２．４μＭ、約２．５μＭ、約２．６μＭ、約２．７μＭ、約２．８μＭ、約２．９μＭ、約３μＭ、約３．５μＭ、約４μＭ、約４．５μＭ、約５μＭ、約６μＭ、約７μＭ、約８μＭ、約９μＭ、約１０μＭ、約２０μＭ、約３０μＭ、約４０μＭ、約５０μＭ、約６０μＭ、約７０μＭ、約８０μＭ、約９０μＭ、または約１００μＭのＡＫＴ阻害剤を含む培地中で培養する。

【１１７９】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１２．５ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、または約２０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、約１０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約４５ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約５５ｎｇ／ｍＬ、または約６０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、約３０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、約１０ｎｇ／ｍＬで添加され、ＩＬ－２１は、約３０ｎｇ／ｍＬで添加される。

【１１８０】
いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、Ｄ０、Ｄ１またはＤ２において、ＣＤ４０アゴニスト、例えば、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０アゴニスト抗体の添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０Ｌが添加される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ４０アゴニスト抗体が添加される。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約４５ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約５５ｎｇ／ｍＬ、または約６０ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、約３０ｎｇ／ｍＬで添加される。

【１１８１】
いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、Ｄ０、Ｄ１またはＤ２において、ＩＦＮγの添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ＩＦＮγが添加される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮγは、約５０ｎｇ／ｍＬ、約５５ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約６５ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約７５ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約８５ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約９５ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約１０５ｎｇ／ｍＬ、約１１０ｎｇ／ｍＬ、約１１５ｎｇ／ｍＬ、約１２０ｎｇ／ｍＬ、約１２５ｎｇ／ｍＬ、約１３０ｎｇ／ｍＬ、約１３５ｎｇ／ｍＬ、約１４０ｎｇ／ｍＬ、約１４５ｎｇ／ｍＬ、約１５０ｎｇ／ｍＬ、約１５５ｎｇ／ｍＬ、約１６０ｎｇ／ｍＬ、約１６５ｎｇ／ｍＬ、約１７０ｎｇ／ｍＬ、約１７５ｎｇ／ｍＬ、約１８０ｎｇ／ｍＬ、約１８５ｎｇ／ｍＬ、約１９０ｎｇ／ｍＬ、約１９５ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約２０５ｎｇ／ｍＬ、約２１０ｎｇ／ｍＬ、約２１５ｎｇ／ｍＬ、約２２０ｎｇ／ｍＬ、約２２５ｎｇ／ｍＬ、約２３０ｎｇ／ｍＬ、約２３５ｎｇ／ｍＬ、約２４０ｎｇ／ｍＬ、約２４５ｎｇ／ｍＬ、約２５０ｎｇ／ｍＬ、約２５５ｎｇ／ｍＬ、約２６０ｎｇ／ｍＬ、約２６５ｎｇ／ｍＬ、約２７０ｎｇ／ｍＬ、約２７５ｎｇ／ｍＬ、約２８０ｎｇ／ｍＬ、約２８５ｎｇ／ｍＬ、約２９０ｎｇ／ｍＬ、約２９５ｎｇ／ｍＬ、または約３００ｎｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮγは、約２００ｎｇ／ｍＬで添加される。

【１１８２】
いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、Ｄ０、Ｄ１またはＤ２において、抗ＰＤ－１抗体の添加を含み得る。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、約５μｇ／ｍＬ、約１０μｇ／ｍＬ、約１５μｇ／ｍＬ、約２０μｇ／ｍＬ、約２５μｇ／ｍＬ、約３０μｇ／ｍＬ、約３５μｇ／ｍＬ、約４０μｇ／ｍＬ、約４５μｇ／ｍＬ、約５０μｇ／ｍＬ、約５５μｇ／ｍＬ、または約６０μｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、約１０μｇ／ｍＬで添加される。

【１１８３】
いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、Ｄ０、Ｄ１またはＤ２において、抗ＣＴＬＡ－４抗体の添加を含み得る。いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、約５μｇ／ｍＬ、約１０μｇ／ｍＬ、約１５μｇ／ｍＬ、約２０μｇ／ｍＬ、約２５μｇ／ｍＬ、約３０μｇ／ｍＬ、約３５μｇ／ｍＬ、約４０μｇ／ｍＬ、約４５μｇ／ｍＬ、約５０μｇ／ｍＬ、約５５μｇ／ｍＬ、または約６０μｇ／ｍＬで添加される。いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、約１０μｇ／ｍＬで添加される。

【１１８４】
Ｅ．ステップＥ：ＴＩＬを採取する
急速な第２の拡張ステップ後、細胞が採取され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に提供されるように、１、２、３、４、またはそれ以上の拡張ステップ後に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に提供されるように、２つの拡張ステップ後に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、２つの拡張ステップ、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に提供されるように、１回のプライミングによる第１の拡張及び１回の急速な第２の拡張の後に採取される。
【１１８５】
ＴＩＬは、任意の適切な滅菌様式で、例えば、遠心分離によって採取され得る。ＴＩＬを採取するための方法は、当該技術分野で周知であり、任意のかかる既知の方法が本プロセスとともに用いられ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、自動化系を使用して採取される。
【１１８６】
細胞採取機及び／または細胞処理系は、例えば、Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ　Ｋａｂｉ、Ｔｏｍｔｅｃ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ、及びＩｎｏｔｅｃｈ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃを含む、様々な供給源から市販されている。任意の細胞ベースの採取機が本方法とともに用いられ得る。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理系は、膜ベースの細胞採取機である。いくつかの実施形態では、細胞採取は、ＬＯＶＯ系（Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ　Ｋａｂｉによって製造されたもの）などの細胞処理系によるものである。「ＬＯＶＯ細胞処理系」という用語は、細胞を含む溶液を、滅菌及び／または閉鎖系環境で回転膜または回転フィルターなどの膜またはフィルターをとおしてポンプ輸送し、連続フローを可能にし、細胞を処理して、ペレット化せずに上清または細胞培養培地を除去する、任意のベンダーによって製造された任意の機器または装置も指す。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理系は、滅菌閉鎖系内で、細胞分離、洗浄、流体交換、濃縮、及び／または他の細胞処理ステップを行うことができる。
【１１８７】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張、例えば、図８によるステップＤ（特に、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）は、閉鎖系バイオリアクターにおいて行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが容器として用いられる。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００またはＧ－ＲＥＸ－５００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－５００である。
【１１８８】
いくつかの実施形態では、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）によるステップＥは、本明細書に記載のプロセスに従って行われる。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、閉鎖系の無菌性及び閉鎖性を維持するために、滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるような閉鎖系が用いられる。
【１１８９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の方法に従って採取される。いくつかの実施形態では、１４～１６日目のＴＩＬが本明細書に記載の方法を使用して採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の方法を使用して１４日目に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の方法を使用して１５日目に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の方法を使用して１６日目に採取される。

【１１９０】

いくつかの実施形態では、本発明は、（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせについて、本明細書に記載の採取ステップに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を評価または選別することを提供する。（ｉ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｉｉ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせであるＴＩＬを選別するための方法は、米国出願第２０１９／０２１２３３２号（これは参照により本明細書に組み込まれる）に見出すことができる。いくつかの実施形態では、細胞選別は、Ｚｈａｎｇ，Ｘ ｅｔ．ａｌ．，Ｓｕｒｆａｃｅ Ｆｒｅｅ Ｅｎｅｒｇｙ Ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｈｉｇｈ－Ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ Ｃｅｌｌ Ｓｏｒｔｉｎｇ，Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（２０１４），８６：９３５０－９３５５（これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載される方法を使用して行われる。実施例１５及び図４１は、かかる方法を使用して選別するためのプロトコルの例を提供する。

【１１９１】

Ｆ．ステップＦ：最終製剤及び輸液容器への移行

図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に例示的な順序で提供され、かつ上及び本明細書で詳細に概説されるステップＡ～Ｅが完了した後、細胞は、注入バッグまたは無菌バイアルなどの患者への投与に使用するために容器に移される。いくつかの実施形態では、治療的に十分な数のＴＩＬが上記の拡張方法を使用して得られると、それらは、患者への投与に使用するために容器に移される。

【１１９２】

いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して拡張されたＴＩＬは、薬学的組成物として患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌緩衝液中のＴＩＬ懸濁液である。本明細書に開示されるように拡張されたＴＩＬは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、単回の動脈内または静脈内注入として投与され、これは、好ましくは、およそ３０～６０分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内投与が含まれる。

【１１９３】

いくつかの実施形態では、本発明は、（ａ）プライミングによる第１の拡張の前に、（ｉ）腫瘍断片または試料中のバルクＴＩＬ、または第１のＴＩＬ集団が、ＩＬ－２及び任意選択で腫瘍断片または試料から出るＴＩＬを産生するための抗生物質の第１の組み合わせを含有する細胞培養培地中で培養され、（ｉｉ）腫瘍断片または試料から出る少なくとも複数のＴＩＬが、腫瘍断片または試料から分離して、腫瘍断片または試料、腫瘍断片または試料中に残存するＴＩＬ、及び腫瘍断片または試料から出て、分離後に残存する任意のＴＩＬの混合物を産生し、（ｉｉｉ）任意選択で、腫瘍断片または試料、腫瘍断片または試料中に残存するＴＩＬ、及び腫瘍断片または試料から出て、分離後に残存する任意のＴＩＬの混合物を消化して、かかる混合物の消化物を産生し、（ｂ）プライミングによる第１の拡張を、混合物または混合物の消化物を使用して行うように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載される方法を提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍断片または試料から出るＴＩＬの少なくとも約１％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％以上が、腫瘍断片または試料から分

離されて、混合物を産生する。
【１１９４】
いくつかの実施形態では、本発明は、プライミングによる第１の拡張前の培養ステップが、約１日～約３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１９５】
いくつかの実施形態では、本発明は、プライミングによる第１の拡張の前に、培養ステップが約１、２、３、４、５、６、または７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１９６】
いくつかの実施形態では、本発明は、（ａ）プライミングの第１の拡張に先立つＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}事前選択ステップの前に、（ｉ）腫瘍断片または試料中のバルクＴＩＬ、または第１のＴＩＬ集団が、ＩＬ－２を含有する細胞培養培地中で培養されて、腫瘍断片または試料から出るＴＩＬを産生するように、（ｉｉ）腫瘍断片または試料から出る少なくとも複数のＴＩＬが、腫瘍断片または試料から分離されて、腫瘍断片または試料、腫瘍断片または試料に残るＴＩＬ、及び腫瘍断片または試料から出て、分離後に残る任意のＴＩＬの混合物を産生するように、（ｉｉｉ）腫瘍断片または試料、腫瘍断片または試料に残るＴＩＬ、及び腫瘍断片または試料から出て、分離後に残る任意のＴＩＬの混合物が消化されて、かかる混合物の消化物を産生するように、かつ（ｂ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}予備選択ステップが、混合物の消化物を使用して行われて、ＴＩＬのＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}集団を産生するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍断片または試料から出るＴＩＬの少なくとも約１％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％以上が、腫瘍断片または試料から分離されて、混合物を産生する。
【１１９７】
いくつかの実施形態では、本発明は、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}事前選択ステップ前の培養ステップが、約１日～約３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１９８】
いくつかの実施形態では、本発明は、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}事前選択ステップ前の培養ステップが、約１、２、３、４、５、６または７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１９９】
Ｖ．さらなるＧｅｎ２、Ｇｅｎ３、及び他のＴＩＬ製造プロセスの実施形態
Ａ．ＰＢＭＣフィーダー細胞比
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用される培養培地（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）を参照されたい）は、抗ＣＤ３抗体、例えばＯＫＴ－３を含む。ＩＬ－２と組み合わせた抗ＣＤ３抗体は、ＴＩＬ集団におけるＴ細胞活性化及び細胞分裂を誘導する。この効果は、全長抗体、ならびにＦａｂ及びＦ（ａｂ′）２断片で見ることができ、前者が一般に好まれ、例えば、Ｔｓｏｕｋａｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９８５，１３５，１７１９（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。
【１２００】
いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣフィーダー層の数は、以下のように計算される：
Ｔ細胞の体積（１０μｍ直径）：Ｖ　＝　（４／３）　πｒ^{3}　＝５２３．６　μｍ^{3}

４０μｍ（４細胞）の高さを有するＧ－ＲＥＸ－１００（Ｍ）のカラム：Ｖ　＝　（４／３）　πｒ^{3}　＝　４×１０^{12}　μｍ^{3}
カラムＢを充填するために必要な細胞数：４×１０^{12}　μｍ^{3}　／　５２３．６　μｍ^{3}　＝　７．６×１０^{8}　μｍ^{3}　＊　０．６４　＝　４．８６×１０^{8}
四次元空間で最適に活性化され得る細胞の数：４．８６×１０^{8}　／　２４　＝　２０．２５×１０^{6}
Ｇ－ＲＥＸ－５００に外挿されるフィーダー及びＴＩＬの数：ＴＩＬ：　１００×１０^{6}　及びフィーダー：２．５×１０^{9}
【１２０１】
この計算では、１００ｃｍ^{2}の底部を有するシリンジ中でのＴＩＬの活性化のために二十面体形状を提供するのに必要な単核細胞の数の近似値が使用される。この計算は、Ｊｉｎ，ｅｔ．ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１２，３５，２８３－２９２に記載されているように、ＮＣＩ実験データを密接に反映するＴ細胞の閾値活性化について、約５×１０^{8}の実験結果を導き出す。（Ｃ）では、乗数（０．６４）は、Ｊａｅｇｅｒ　ａｎｄ　Ｎａｇｅｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ，１９９２，２５５，１５２３－３によって計算された等価球のランダム充填密度である。（Ｄ）では、除数２４は、Ｍｕｓｉｎ，Ｒｕｓｓ．Ｍａｔｈ．Ｓｕｒｖ．，２００３，５８，７９４－７９５に記載される、四次元空間内の同様のオブジェクトと接触する可能性のある等価球の数または「ニュートン数」である。
【１２０２】
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞の数は、急速な第２の拡張中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞の数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、この方法は、急速な第２の拡張の細胞培養培地と比較しておよそ５０％少ない抗原提示細胞を含む細胞培養培地中でプライミングによる第１の拡張を行うことを含む。
【１２０３】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）の数は、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数よりも多い。
【１２０４】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２０：１の範囲から選択される。
【１２０５】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択される。
【１２０６】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約９：１の範囲から選択される。
【１２０７】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約８：１の範囲から選択される。
【１２０８】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約７：１の範囲から選択される。
【１２０９】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミ

ングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約６：１の範囲から選択される。

【１２１０】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択される。

【１２１１】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択される。

【１２１２】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択される。

【１２１３】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択される。

【１２１４】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択される。

【１２１５】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択される。

【１２１６】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択される。

【１２１７】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択される。

【１２１８】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択される。

【１２１９】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択される。

【１２２０】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択される。

【１２２１】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択される。

【１２２２】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２：１の範囲から選択される。
【１２２３】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択される。
【１２２４】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択される。
【１２２５】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択される。
【１２２６】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択される。
【１２２７】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択される。
【１２２８】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択される。
【１２２９】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択される。
【１２３０】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択される。
【１２３１】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択される。
【１２３２】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択される。
【１２３３】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択される。
【１２３４】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミン

グによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択される。

【１２３５】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択される。

【１２３６】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１である。

【１２３７】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．１：１、２．２：１、２．３：１、２．４：１、２．５：１、２．６：１、２．７：１、２．８：１、２．９：１、３：１、３．１：１、３．２：１、３．３：１、３．４：１、３．５：１、３．６：１、３．７：１、３．８：１、３．９：１、４：１、４．１：１、４．２：１、４．３：１、４．４：１、４．５：１、４．６：１、４．７：１、４．８：１、４．９：１、または５：１である。

【１２３８】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約1×10^{8}、1.1×10^{8}、1.2×10^{8}、1.3×10^{8}、1.4×10^{8}、1.5×10^{8}、1.6×10^{8}、1.7×10^{8}、1.8×10^{8}、1.9×10^{8}、2×10^{8}、2.1×10^{8}、2.2×10^{8}、2.3×10^{8}、2.4×10^{8}、2.5×10^{8}、2.6×10^{8}、2.7×10^{8}、2.8×10^{8}、2.9×10^{8}、3×10^{8}、3.1×10^{8}、3.2×10^{8}、3.3×10^{8}、3.4×10^{8}、または3.5×10^{8}ＡＰＣであり、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約3.5×10^{8}、3.6×10^{8}、3.7×10^{8}、3.8×10^{8}、3.9×10^{8}、4×10^{8}、4.1×10^{8}、4.2×10^{8}、4.3×10^{8}、4.4×10^{8}、4.5×10^{8}、4.6×10^{8}、4.7×10^{8}、4.8×10^{8}、4.9×10^{8}、5×10^{8}、5.1×10^{8}、5.2×10^{8}、5.3×10^{8}、5.4×10^{8}、5.5×10^{8}、5.6×10^{8}、5.7×10^{8}、5.8×10^{8}、5.9×10^{8}、6×10^{8}、6.1×10^{8}、6.2×10^{8}、6.3×10^{8}、6.4×10^{8}、6.5×10^{8}、6.6×10^{8}、6.7×10^{8}、6.8×10^{8}、6.9×10^{8}、7×10^{8}、7.1×10^{8}、7.2×10^{8}、7.3×10^{8}、7.4×10^{8}、7.5×10^{8}、7.6×10^{8}、7.7×10^{8}、7.8×10^{8}、7.9×10^{8}、8×10^{8}、8.1×10^{8}、8.2×10^{8}、8.3×10^{8}、8.4×10^{8}、8.5×10^{8}、8.6×10^{8}、8.7×10^{8}、8.8×10^{8}、8.9×10^{8}、9×10^{8}、9.1×10^{8}、9.2×10^{8}、9.3×10^{8}、9.4×10^{8}、9.5×10^{8}、9.6×10^{8}、9.7×10^{8}、9.8×10^{8}、9.9×10^{8}、または1×10^{9}ＡＰＣである。

【１２３９】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約1.5×10^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約3×10^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約4×10^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約7.5×10^{8}ＡＰＣの範囲から選択される。

【１２４０】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約2×10^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約2.5×10^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約４．

５×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約５．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択される。
【１２４１】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約２．５×１０^{8}ＡＰＣであり、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約５×１０^{8}ＡＰＣである。
【１２４２】
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に追加されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、プライミングによる第１の拡張の７日目（例えば、方法の７日目）に追加されるＰＢＭＣの数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、方法は、プライミングによる第１の拡張の０日目に抗原提示細胞を第１のＴＩＬ集団に追加することと、７日目に抗原提示細胞を第２のＴＩＬ集団に追加することとを含み、０日目に追加される抗原提示細胞の数は、プライミングによる第１の拡張の７日目（例えば、方法の７日目）に追加される抗原提示細胞の数のおよそ５０％である。
【１２４３】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数よりも多い。
【１２４４】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【１２４５】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【１２４６】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【１２４７】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。
【１２４８】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．０×１０^{6}、１．１×１０^{6}、１．２×１０^{6}、１．３×１０^{6}、１．４×１０^{6}、１．５×１０^{6}、１．６×１０^{6}、１．７×１０^{6}、１．８×１０^{6}、１．９×１０^{6}、２×１０^{6}、２．１×１０^{6}、２．２×１０^{6}、２．３×１０^{6}、２．４×１０^{6}、２．５×１０^{6}、２．６×１０^{6}、２．７×１０^{6}、２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}、３×１０^{6}、３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}、４×１０^{6}、４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}、または４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。
【１２４９】
他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【１２５０】
他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約６．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【１２５１】
他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【１２５２】
他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【１２５３】
他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．６×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．７×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}、３×１０^{6}、３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}、４×１０^{6}、４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}、４．５×１０^{6}、４．６×１０^{6}、４．７×１０^{6}、４．８×１０^{6}、４．９×１０^{6}、５×１０^{6}、５．１×１０^{6}、５．２×１０^{6}、５．３×１０^{6}、５．４×１０^{6}、５．５×１０^{6}、５．６×１０^{6}、５．７×１０^{6}、５．８×１０^{6}、５．９×１０^{6}、６×１０^{6}、６．１×１０^{6}、６．２×１０^{6}、６．３×１０^{6}、６．４×１０^{6}、６．５×１０^{6}、６．６×１０^{6}、６．７×１０^{6}、６．８×１０^{6}、６．９×１０^{6}、７×１０^{6}、７．１×１０^{6}、７．２×１０^{6}、７．３×１０^{6}、７．４×１０^{6}、または７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【１２５４】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．０×１０^{6}、１．１×１０^{6}、１．２×１０^{6}、１．３×１０^{6}、１．４×１０^{6}、１．５×１０^{6}、１．６×１０^{6}、１．７×１０^{6}、１．８×１０^{6}、１．９×１０^{6}、２×１０^{6}、２．１×１０^{6}、２．２×１０^{6}、２．３×１０^{6}、２．４×１０^{6}、２．５×１０^{6}、２．６×１０^{6}、２．７×１０^{6}、２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}、３×１０^{6}、３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}、４×１０^{6}、４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}、または４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．６×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．７×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}、３×１０^{6}、３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}、４×１０^{6}、４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}、４．５×１０^{6}、４．６×１０^{6}、４．７×１０^{6}、４．８×１０^{6}、４．９×１０^{6}、５×１０^{6}、５．１×１０^{6}、５．２×１０^{6}、５．３×１０^{6}、５．４×１０^{6}、５．５×１０^{6}、５．６×１０^{6}、５．７×１０^{6}、５．８×１０^{6}、５．９×１０^{6}、６×１０^{6}、６．１×１０^{6}、６．２×１０^{6}、６．３×１０^{6}、６．４×１０^{6}、６．５×１０^{6}、６．６×１０^{6}、６．７×１０^{6}、６．８×１０^{6}、６．９×１０^{6}、７×１０^{6}、７．１×１０^{6}、７．２×１０^{6}、７．３×１０^{6}、７．４×１０^{6}、または７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【１２５５】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確

にまたは約７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【１２５６】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約６×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【１２５７】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約４×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【１２５８】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約４×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。

【１２５９】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２０：１の範囲から選択される。

【１２６０】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択される。

【１２６１】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約９：１の範囲から選択される。

【１２６２】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約８：１の範囲から選択される。

【１２６３】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約７：１の範囲から選択される。

【１２６４】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約６：１の範囲から選択される。

【１２６５】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択される。
【１２６６】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択される。
【１２６７】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択される。
【１２６８】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択される。
【１２６９】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択される。
【１２７０】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択される。
【１２７１】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択される。
【１２７２】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択される。
【１２７３】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択される。
【１２７４】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択される。

【１２７５】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択される。
【１２７６】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択される。
【１２７７】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２：１の範囲から選択される。
【１２７８】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択される。
【１２７９】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択される。
【１２８０】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択される。
【１２８１】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択される。
【１２８２】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択される。
【１２８３】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択される。
【１２８４】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択される。

【１２８５】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択される。
【１２８６】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択される。
【１２８７】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択される。
【１２８８】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択される。
【１２８９】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数のプライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択される。
【１２９０】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択される。
【１２９１】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１である。
【１２９２】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数のプライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．１：１、２．２：１、２．３：１、２．４：１、２．５：１、２．６：１、２．７：１、２．８：１、２．９：１、３：１、３．１：１、３．２：１、３．３：１、３．４：１、３．５：１、３．６：１、３．７：１、３．８：１、３．９：１、４：１、４．１：１、４．２：１、４．３：１、４．４：１、４．５：１、４．６：１、４．７：１、４．８：１、４．９：１、または５：１である。
【１２９３】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約1×10^{8}、1.1×10^{8}、1.2×10^{8}、1.3×10^{8}、1.4×10^{8}、1.5×10^{8}、1.6×10^{8}、1.7×10^{8}、1.8×10^{8}、1.9×10^{8}、2×10^{8}、2.1×10^{8}、2.2×10^{8}、2.3×10^{8}、2.4×10^{8}、2.5×10^{8}、2.6×10^{8}、2.7

×１０^{8}、２．８×１０^{8}、２．９×１０^{8}、３×１０^{8}、３．１×１０^{8}、３．２×１０^{8}、３．３×１０^{8}、３．４×１０^{8}、または３．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）であり、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約３．５×１０^{8}、３．６×１０^{8}、３．７×１０^{8}、３．８×１０^{8}、３．９×１０^{8}、４×１０^{8}、４．１×１０^{8}、４．２×１０^{8}、４．３×１０^{8}、４．４×１０^{8}、４．５×１０^{8}、４．６×１０^{8}、４．７×１０^{8}、４．８×１０^{8}、４．９×１０^{8}、５×１０^{8}、５．１×１０^{8}、５．２×１０^{8}、５．３×１０^{8}、５．４×１０^{8}、５．５×１０^{8}、５．６×１０^{8}、５．７×１０^{8}、５．８×１０^{8}、５．９×１０^{8}、６×１０^{8}、６．１×１０^{8}、６．２×１０^{8}、６．３×１０^{8}、６．４×１０^{8}、６．５×１０^{8}、６．６×１０^{8}、６．７×１０^{8}、６．８×１０^{8}、６．９×１０^{8}、７×１０^{8}、７．１×１０^{8}、７．２×１０^{8}、７．３×１０^{8}、７．４×１０^{8}、７．５×１０^{8}、７．６×１０^{8}、７．７×１０^{8}、７．８×１０^{8}、７．９×１０^{8}、８×１０^{8}、８．１×１０^{8}、８．２×１０^{8}、８．３×１０^{8}、８．４×１０^{8}、８．５×１０^{8}、８．６×１０^{8}、８．７×１０^{8}、８．８×１０^{8}、８．９×１０^{8}、９×１０^{8}、９．１×１０^{8}、９．２×１０^{8}、９．３×１０^{8}、９．４×１０^{8}、９．５×１０^{8}、９．６×１０^{8}、９．７×１０^{8}、９．８×１０^{8}、９．９×１０^{8}、または１ｘ１０^{9}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）である。

【１２９４】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約１×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～正確にまたは約３．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択され、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約３．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～正確にまたは約１×１０^{9}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択される。

【１２９５】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約１．５×１０^{8}ＡＰＣ～約３×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択され、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、約４×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～約７．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択される。

【１２９６】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約２×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～正確にまたは約２．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択され、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約４．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～正確にまたは約５．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択される。

【１２９７】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約２．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）であり、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）である。

【１２９８】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に追加されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数は、急速な第２の拡張の７日目に追加されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、方法は、プライミングによる第１の拡張の０日目に抗原提示細胞層を第１のＴＩＬ集団に追加す

ることと、７日目に抗原提示細胞を第２のＴＩＬ集団に追加することとを含み、０日目に追加される抗原提示細胞層の数は、７日目に追加される抗原提示細胞層の数のおよそ５０％である。

【１２９９】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数は、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数よりも多い。

【１３００】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約４細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【１３０１】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第３の拡張の７日目は、正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【１３０２】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１．５細胞層～正確にまたは約２．５細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【１３０３】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【１３０４】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６、３．７、３．８、３．９、４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【１３０５】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１細胞層～正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３細胞層～正確にまたは約１０細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【１３０６】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約２細胞層～正確にまたは約３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こ

る。
【１３０７】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。
【１３０８】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１、２、または３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。
【１３０９】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：１０の範囲から選択される。
【１３１０】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の、第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：８の範囲から選択される。
【１３１１】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の、第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：７の範囲から選択される。
【１３１２】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の、第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：６の範囲から選択される。
【１３１３】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰ

Ｃ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の、第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：５の範囲から選択される。

【１３１４】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の、第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：４の範囲から選択される。

【１３１５】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の、第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：３の範囲から選択される。

【１３１６】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の、第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：２の範囲から選択される。

【１３１７】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の、第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．２～正確にまたは約１：８の範囲から選択される。

【１３１８】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の、第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．３～正確にまたは約１：７の範囲から選択される。

【１３１９】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の、第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．４～正確にまたは約１：６の範囲から選択される。

【１３２０】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の、第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．５～正確にまたは約１：５の範囲から選択される。
【１３２１】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の、第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．６～正確にまたは約１：４の範囲から選択される。
【１３２２】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の、第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．７～正確にまたは約１：３．５の範囲から選択される。
【１３２３】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の、第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．８～正確にまたは約１：３の範囲から選択される。
【１３２４】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の、第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．９～正確にまたは約１：２．５の範囲から選択される。
【１３２５】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：２．
【１３２６】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢ

ＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第１のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数の第２のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数に対する比は、約１：１．１、１：１．２、１：１．３、１：１．４、１：１．５、１：１．６、１：１．７、１：１．８、１：１．９、１：２、１：２．１、１：２．２、１：２．３、１：２．４、１：２．５、１：２．６、１：２．７、１：２．８、１：２．９、１：３、１：３．１、１：３．２、１：３．３、１：３．４、１：３．５、１：３．６、１：３．７、１：３．８、１：３．９、１：４、１：４．１、１：４．２、１：４．３、１：４．４、１：４．５、１：４．６、１：４．７、１：４．８、１：４．９、１：５、１：５．１、１：５．２、１：５．３、１：５．４、１：５．５、１：５．６、１：５．７、１：５．８、１：５．９、１：６、１：６．１、１：６．２、１：６．３、１：６．４、１：６．５、１：６．６、１：６．７、１：６．８、１：６．９、１：７、１：７．１、１：７．２、１：７．３、１：７．４、１：７．５、１：７．６、１：７．７、１：７．８、１：７．９、１：８、１：８．１、１：８．２、１：８．３、１：８．４、１：８．５、１：８．６、１：８．７、１：８．８、１：８．９、１：９、１：９．１、１：９．２、１：９．３、１：９．４、１：９．５、１：９．６、１：９．７、１：９．８、１：９．９、または１：１０から選択される。

【１３２７】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張におけるＡＰＣの数は、約１．０×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^2～約４．５×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択され、急速な第２の拡張におけるＡＰＣの数は、約２．５×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^2～約７．５×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される。

【１３２８】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張におけるＡＰＣの数は、約１．５×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^2～約３．５×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択され、急速な第２の拡張におけるＡＰＣの数は、約３．５×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^2～約６．０×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される。

【１３２９】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張におけるＡＰＣの数は、約２．０×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^2～約３．０×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択され、急速な第２の拡張におけるＡＰＣの数は、約４．０×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^2～約５．５×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される。

【１３３０】

Ｂ．任意選択の細胞培地成分

１．抗ＣＤ３抗体

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用される培養培地（例えば、図１及び８（特に、例えば図８Ｂ）を参照されたい）は、抗ＣＤ３抗体を含む。ＩＬ－２と組み合わせた抗ＣＤ３抗体は、ＴＩＬ集団におけるＴ細胞活性化及び細胞分裂を誘導する。この効果は、全長抗体、ならびにＦａｂ及びＦ（ａｂ′）２断片で見ることができ、前者が一般に好まれ、例えば、Ｔｓｏｕｋａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９８５，１３５，１７１９（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【１３３１】

当業者によって理解されるように、マウス、ヒト、霊長類、ラット、及びイヌ抗体を含むが、これらに限定されない、様々な哺乳動物由来の抗ヒトＣＤ３ポリクローナル及びモノクローナル抗体を含む、本発明での使用が見出されるいくつかの好適な抗ヒトＣＤ３抗体が存在する。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体ムロモナブであるＯＫＴ３が使用される（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ，Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪまたはＭｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡから市販されている）。表１を参照されたい。

【１３３２】

当業者によって理解されるように、マウス、ヒト、霊長類、ラット、及びイヌ抗体を含むが、これらに限定されない、様々な哺乳動物由来の抗ヒトＣＤ３ポリクローナル及びモノクローナル抗体を含む、本発明での使用が見出されるいくつかの好適な抗ヒトＣＤ３抗体が存在する。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体ムロモナブであるＯＫＴ３が使用される（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ，Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪまたはＭｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡから市販されている）。

【１３３３】

２．４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）アゴニスト

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張及び／または急速な第２の拡張の細胞培養培地は、ＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）アゴニストである。４－１ＢＢアゴニストは、当該技術分野で知られている任意の４－１ＢＢ結合分子であり得る。４－１ＢＢ結合分子は、ヒトまたは哺乳動物の４－１ＢＢに結合することができるモノクローナル抗体または融合タンパク質であり得る。４－１ＢＢアゴニストまたは４－１ＢＢ結合分子は、任意のアイソタイプ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、及びＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、及びＩｇＡ２）、またはサブクラスの免疫グロブリン分子の免疫グロブリン重鎖を含み得る。４－１ＢＢアゴニストまたは４－１ＢＢ結合分子は、重鎖及び軽鎖の両方を有し得る。本明細書で使用される場合、結合分子という用語は、抗体（全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、及び抗体断片、例えば、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ′）断片、Ｆａｂ発現ライブラリーによって産生された断片、上記のうちのいずれかのエピトープ結合断片、ならびに４－１ＢＢに結合する抗体の操作された形態、例えば、ｓｃＦｖ分子も含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、完全ヒト抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ヒト化抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法及び組成物に使用するための４－１ＢＢアゴニストには、抗４－１ＢＢ抗体、ヒト抗４－１ＢＢ抗体、マウス抗４－１ＢＢ抗体、哺乳動物抗４－１ＢＢ抗体、モノクローナル抗４－１ＢＢ抗体、ポリクローナル抗４－１ＢＢ抗体、キメラ抗４－１ＢＢ抗体、抗４－１ＢＢアドネクチン、抗４－１ＢＢドメイン抗体、一本鎖抗４－１ＢＢ断片、重鎖抗４－１ＢＢ断片、軽鎖抗４－１ＢＢ断片、抗４－１ＢＢ融合タンパク質、及びそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、またはバイオシミラーが含まれる。アゴニスト抗４－１ＢＢ抗体は、強力な免疫応答を誘導することが知られている。Ｌｅｅ，ｅｔ ａｌ．，ＰＬＯＳ Ｏｎｅ ２０１３，８，ｅ６９６７７。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、アゴニスト、抗４－１ＢＢヒト化、または完全ヒトモノクローナル抗体（すなわち、単一の細胞株に由来する抗体）である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＥＵ－１０１（Ｅｕｔｉｌｅｘ Ｃｏ．Ｌｔｄ．）、ウトミルマブ、もしくはウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブもしくはウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。

【１３３４】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストまたは４－１ＢＢ結合分子は、融合タンパク質である場合もある。いくつかの実施形態では、三量体または六量体４－１ＢＢアゴニスト（３つまたは６つのリガンド結合ドメインを有する）などの多量体４－１ＢＢアゴニストは、典型的に２つのリガンド結合ドメインを有するアゴニストモノクローナル抗体と比較して、優れた受容体（４－１ＢＢＬ）クラスター化及び内部細胞シグナル伝達複合体形成を誘導し得る。３つのＴＮＦＲＳＦ結合ドメイン及びＩｇＧ１－Ｆｃを含み、かつ任意選択でこれらの融合タンパク質のうちの２つ以上をさらに結合する三量体（三価）または六量体（もしくは六価）またはそれ以上の融合タンパク質は、例えば、Ｇｉｅｆｆ

ｅｒｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ　２０１３，１２，２７３５－４７に記載されている。

【１３３５】

アゴニスト４－１ＢＢ抗体及び融合タンパク質は、強い免疫応答を誘導することが知られている。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、毒性を低減するのに十分な様式で４－１ＢＢ抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、抗体依存性細胞毒性（ｃｅｌｌｕｌａｒ　ｔｏｘｉｃｉｔｙ）（ＡＤＣＣ）、例えば、ＮＫ細胞細胞傷害性（ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ）を抑制するアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）を無効にするアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）を抑制するアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、Ｆｃ領域機能性を無効にするアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。

【１３３６】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、高い親和性及びアゴニスト活性でヒト４－１ＢＢ（配列番号４０）に結合することを特徴とする。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ヒト４－１ＢＢに結合する結合分子である（配列番号４０）。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、マウス４－１ＢＢに結合する結合分子である（配列番号４１）。４－１ＢＢアゴニストまたは結合分子が結合する４－１ＢＢ抗原のアミノ酸配列を表５に要約する。

【１３３７】

【表６】

表５．４－１ＢＢ抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号４０　ヒト４－１ＢＢ、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー９（ホモサピエンス）	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR　60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC　120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE　180 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG　240 CSCRFPEEEE GGCEL　255
配列番号４１　マウス４－１ＢＢ、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー９（ハツカネズミ）	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN　60 CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS　120 LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG　180 GHSLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKTT GAAQEEDACS　240 CRCPQEEEGG GGGYEL　256

【１３３８】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１００ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約７０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約６０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約５０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約４０ｐＭ以下のK_Dで結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約３０ｐＭ以下のK_Dで結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【１３３９】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約７．５×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもし

くはマウス４－１ＢＢに約７．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$で結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１×１０^{6}１／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$で結合する４－１ＢＢアゴニストを含む。

【１３４０】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．１×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．２×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．３×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．４×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．５×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．６×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．７×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．８×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．９×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約３×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【１３４１】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス及び方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１０ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約７ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約６ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約５ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約４ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約３ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【１３４２】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＰＦ－０５０８２５６６もしくはＭＯＲ－７４８０としても知られるウトミルマブ、またはその断片、誘導体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。ウトミルマブは、Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．から入手可能である。ウトミルマブは、免疫グロブリンＧ２－ガンマ、抗［ホモサピエンスＴＮＦＲＳＦ９（腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーメンバー９、４－１ＢＢ、Ｔ細胞抗原ＩＬＡ、ＣＤ１３７）］、ホモサピエンス（完全ヒト）モノクローナル抗体である。ウトミルマブのアミノ酸配列を表６に示す。ウトミルマブは、Ａｓｎ５９及びＡｓｎ２９２にグリコシル化部位、２２－９６位（V_H－V_L）、１４３－１９９位（C_H1－C_L）、２５６－３１６位（C_H2）、及び３６２－４２０位（C_H3）に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、２２′－８７′位（V_H－V_L）及び１３６′－１９５′位（C_H1－C_L）に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、ＩｇＧ２Ａアイソフォーム２１８－２１８、２１９－２１９、２２２－２２２、及び２２５－２２５位、ＩｇＧ２Ａ／Ｂアイソフォーム２１８－１３０、２１９－２１９、２２２－２２２、及び２２５－２２５位、ならびにＩｇＧ２Ｂアイソフォーム２１９－１３０（２）、２２２－２２２、及び２２５－２２５位に鎖間重鎖－重鎖ジスルフィド架橋、ならびにＩｇＧ２Ａアイソフォーム１３０－２１３′（２）位、ＩｇＧ２Ａ／Ｂアイソフォーム２１８－２１３′位、及び１３０－２１３′位、ならびにＩｇＧ２Ｂアイソフォーム２１８－２１３′（２）位に鎖間重鎖－軽鎖ジスルフ

ィド架橋を含む。ウトミルマブならびにそのバリアント及び断片の調製及び特性は、米国特許第８，８２１，８６７号、同第８，３３７，８５０号、及び同第９，４６８，６７８号、ならびに国際特許出願公開第ＷＯ２０１２／０３２４３３Ａ１号（これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。ウトミルマブの前臨床特徴は、Ｆｉｓｈｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇ．＆Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１２，６１，１７２１－３３に記載されている。様々な血液学的及び固形腫瘍適応症におけるウトミルマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所のｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０２４４４７９３、ＮＣＴ０１３０７２６７、ＮＣＴ０２３１５０６６、及びＮＣＴ０２５５４８１２が含まれる。

【１３４３】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、配列番号４２によって示される重鎖及び配列番号４３によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１３４４】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号４４に示される配列を含み、４－１ＢＢアゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号４５に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖ抗体を含む。

【１３４５】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号４６、配列番号４７、及び配列番号４８に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号４９、配列番号５０、及び配列番号５１に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１３４６】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブに関して薬物規制当局によって承認された４－１ＢＢアゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含む４－１ＢＢ抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出された４－１ＢＢアゴニスト抗体であり、４－１ＢＢアゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。４－１ＢＢアゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。

【１３４７】

【表７】

表６．ウトミルマブに関連する４－１ＢＢアゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）	
配列番号４２ ウトミルマブの重鎖	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTNY SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G	60 120 180 240 300 360 420 441
配列番号４３ ウトミルマブの軽鎖	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS	60 120 180 214
配列番号４４ ウトミルマブの重鎖可変領域	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
配列番号４５ ウトミルマブの軽鎖可変領域	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL	60 108
配列番号４６　ウトミルマブの重鎖ＣＤＲ１	STYWIS	6
配列番号４７ ウトミルマブの重鎖ＣＤＲ２	KIYPGDSYTN YSPSFQG	17
配列番号４８ ウトミルマブの重鎖ＣＤＲ３	RGYGIFDY	8
配列番号４９ ウトミルマブの軽鎖ＣＤＲ１	SGDNIGDQYA H	11
配列番号５０ ウトミルマブの軽鎖ＣＤＲ２	QDKNRPS	7
配列番号５１ ウトミルマブの軽鎖ＣＤＲ３	ATYTGFGSLA V	11

【１３４８】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＢＭＳ－６６３５１３及び２０Ｈ

４．９．ｈ４ａとしても知られるモノクローナル抗体ウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。ウレルマブは、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ，Ｉｎｃ．及びＣｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｉｎｃ．から入手可能である。ウレルマブは、免疫グロブリンＧ４－カッパ、抗［ホモサピエンスＴＮＦＲＳＦ９（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー９、４－１ＢＢ、Ｔ細胞抗原ＩＬＡ、ＣＤ１３７）］、ホモサピエンス（完全ヒト）モノクローナル抗体である。ウレルマブのアミノ酸配列を表７に示す。ウレルマブは、２９８位（及び２９８’’）にＮ－グリコシル化部位、２２－９５位（V_H－V_L）、１４８－２０４位（C_H1－C_L）、２６２－３２２位（C_H2）、及び３６８－４２６位（C_H3）（２２’’－９５’’、１４８’’－２０４’’、２６２’’－３２２’’、及び３６８’’－４２６’’位）に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、２３’－８８’位（V_H－V_L）及び１３６’－１９６’位（C_H1－C_L）（２３’’’－８８’’’及び１３６’’’－１９６’’’位）に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、２２７－２２７’’位及び２３０－２３０’’位に鎖間重鎖－重鎖ジスルフィド架橋ならびに１３５－２１６’及び１３５’’－２１６’’’に鎖間重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウレルマブならびにそのバリアント及び断片の調製及び特性は、米国特許第７，２８８，６３８号及び同第８，９６２，８０４号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ウレルマブの前臨床及び臨床特徴は、Ｓｅｇａｌ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１６に記載されており、ｈｔｔｐ：／ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１５８／１０７８－０４３２．ＣＣＲ－１６－１２７２で入手可能である。様々な血液学的及び固形腫瘍適応症におけるウレルマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所のｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０１７７５６３１、ＮＣＴ０２１１００８２、ＮＣＴ０２２５３９９２、及びＮＣＴ０１４７１２１０が含まれる。

【１３４９】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、配列番号５２によって示される重鎖及び配列番号５３によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１３５０】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号５４に示される配列を含み、４－１ＢＢアゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号５５に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領

域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖ抗体を含む。

【１３５１】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号５６、配列番号５７、及び配列番号５８に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号５９、配列番号６０、及び配列番号６１に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１３５２】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブに関して薬物規制当局によって承認された４－１ＢＢアゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含む４－１ＢＢ抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出された４－１ＢＢアゴニスト抗体であり、４－１ＢＢアゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。４－１ＢＢアゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。

【１３５３】

【表８】

表７．ウレルマブに関連する４－１ＢＢアゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）	
配列番号５２ ウレルマブの重鎖	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN PSLESRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 448
配列番号５３ ウレルマブの軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC	60 120 180 216
配列番号５４ ウレルマブの可変重鎖	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP	60 120
配列番号５５ ウレルマブの可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ	60 110
配列番号５６ ウレルマブの重鎖ＣＤＲ１	GYYWS	5
配列番号５７ ウレルマブの重鎖ＣＤＲ２	EINHGGYVTY NPSLES	16
配列番号５８ ウレルマブの重鎖ＣＤＲ３	DYGPGNYDWY FDL	13
配列番号５９ ウレルマブの軽鎖ＣＤＲ１	RASQSVSSYL A	11
配列番号６０ ウレルマブの軽鎖ＣＤＲ２	DASNRAT	7
配列番号６１ ウレルマブの軽鎖ＣＤＲ３	QQRSDWPPAL T	11

【１３５４】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、１Ｄ８、３Ｅｌｏｒ、４Ｂ４（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　３０９８０９）、Ｈ４－１ＢＢ－Ｍ１２７（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ　５５２５３２）、ＢＢＫ２（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　ＭＳ６２１ＰＡＢＸ）、１４５５０１（Ｌｅｉｎｃｏ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｂ５９１）、ＡＴＣＣ番号ＨＢ－１１２４８として寄託された細胞株によって産生され、米国特許第６，９７４，８６３号に開示される抗体、５Ｆ４（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　３１　１５０３）、Ｃ６５－４８５（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ　５５９４４６）、米国特許出願公開第２００５／００９５２４４号に開示される抗体、米国特許第７，２８８，６３８号に開示される抗体（例えば、２０Ｈ４．９－ＩｇＧｌ（ＢＭＳ－６６３０３１））、米国特許第６，８８７，６７３号に開示される抗体（例えば、４Ｅ９もしくはＢＭＳ－５５４２７１）、米国特許第７，２１４，４９３号に開示される抗体、米国特許第６，３０３，１２１号に開示される抗体、米国特許第６，５６９，９９７号に開示される抗体、米国特許第６，９０５，６８５号に開示される抗体（例えば、４Ｅ９もしくはＢＭＳ－５５４２７１）、米国特許第６，３６２，３２５号に開示される抗体（例えば、１Ｄ８もしくはＢＭＳ－４６９４９２、３Ｈ３もしくはＢＭＳ－４６９４９７、または３Ｅｌ）、米国特許第６，９７４，８６３号に開示される抗体（例えば、５３Ａ２）、米国特許第６，２１０，６６９号に開示される抗体（例えば、１Ｄ８、３Ｂ８、もしくは３Ｅｌ）、米国特許第５，９２８，８９３号に開示される抗体、米国特許第６，３０３，１２１号に開示される抗体、米国特許第６，５６９，９９７号に開示される抗体、国際特許出願公開第ＷＯ２０１２／１７７８８号、同第ＷＯ２０１５／１１９９２３号、及び同第ＷＯ２０１０／０４２４３３号に開示

される抗体、ならびにそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、またはバイオシミラーからなる群から選択され、前述の特許または特許出願公開の各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【１３５５】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、国際特許出願公開第ＷＯ２００８／０２５５１６Ａ１号、同第ＷＯ２００９／００７１２０Ａ１号、同第ＷＯ２０１０／００３７６６Ａ１号、同第ＷＯ２０１０／０１００５１Ａ１号、及び同第ＷＯ２０１０／００７８９６６Ａ１号、米国特許出願公開第２０１１／００２７２１８Ａ１号、同第２０１５／０１２６７０９Ａ１号、同第２０１１／０１１１４９４Ａ１号、同第２０１５／０１１０７３４Ａ１号、及び同第２０１５／０１２６７１０Ａ１号、ならびに米国特許第９，３５９，４２０号、同第９，３４０，５９９号、同第８，９２１，５１９号、及び同第８，４５０，４６０号に記載される４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質であり、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１３５６】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、構造Ｉ－Ａ（Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）もしくは構造Ｉ－Ｂ（Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）に示されるような４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質、またはそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、もしくはバイオシミラーである（図１８を参照されたい）。構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂにおいて、円筒は、個々のポリペプチド結合ドメインを指す。構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂは、例えば、４－１ＢＢＬ（４－１ＢＢリガンド、ＣＤ１３７リガンド（ＣＤ１３７Ｌ）、もしくは腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー９（ＴＮＦＳＦ９））または４－１ＢＢに結合する抗体に由来する３つの直線的に連結されたＴＮＦＲＳＦ結合ドメインを含み、これらが折り重なって三価タンパク質を形成し、その後、これがＩｇＧ１－Ｆｃ（C_H3及びC_H2ドメインを含む）によって第２の三価タンパク質に連結され、その後、これを使用して、三価タンパク質のうちの２つをジスルフィド結合（小さく長細い楕円）によって一緒に連結し、構造を安定化し、６つの受容体及びシグナル伝達タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを一緒にして、シグナル伝達複合体を形成することができるアゴニストを提供する。円筒として示されるＴＮＦＲＳＦ結合ドメインは、例えば、親水性残基及び柔軟性のためのＧｌｙ及びＳｅｒ配列、ならびに溶解性のためのＧｌｕ及びＬｙｓを含み得るリンカーによって結合されたV_H鎖及びV_L鎖を含む、ｓｃＦｖドメインであり得る。ｄｅ Ｍａｒｃｏ，Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ｃｅｌｌ Ｆａｃｔｏｒｉｅｓ，２０１１，１０，４４、Ａｈｍａｄ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．＆Ｄｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２，９８０２５０、Ｍｏｎｎｉｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，２０１３，２，１９３－２０８、または本明細書の他の場所に組み込まれている参照文献に記載されるものなどの任意のｓｃＦｖドメイン設計が使用され得る。この形態の融合タンパク質構造は、米国特許第９，３５９，４２０号、同第９，３４０，５９９号、同第８，９２１，５１９号、及び同第８，４５０，４６０号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１３５７】

図１８に示される構造Ｉ－Ａの他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表８に見出される。Ｆｃドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン（配列番号６２のアミノ酸１７～２３０）、完全なヒンジドメイン（配列番号６２のアミノ酸１～１６）、またはヒンジドメインの一部（例えば、配列番号６２のアミノ酸４～１６）を含む。Ｃ末端Ｆｃ抗体を結合するための好ましいリンカーは、追加のポリペプチドの融合に好適なリンカーを含む、配列番号６３～配列番号７２に示される実施形態から選択され得る。

【１３５８】

【表９】

表８．Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質設計（構造Ｉ－Ａ）を有する、４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質を含む、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）	
配列番号６２ Ｆｃドメイン	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 230
配列番号６３ リンカー	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
配列番号６４ リンカー	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
配列番号６５ リンカー	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
配列番号６６ リンカー	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
配列番号６７ リンカー	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
配列番号６８ リンカー	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
配列番号６９ リンカー	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE	24
配列番号７０ リンカー	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE	23
配列番号７１ リンカー	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E	21
配列番号７２ リンカー	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE	25

【１３５９】

図１８に示される構造Ｉ－Ｂの他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表９に見出される。Ｆｃ抗体断片が構造Ｉ－ＢにあるようなＴＮＲＦＳＦ融合タンパク質のＮ末端に融合される場合、Ｆｃモジュールの配列は、好ましくは、配列番号７３に示されるものであり、リンカー配列は、好ましくは、配列番号７４～配列番号７６に示される実施形態から選択される。

【１３６０】

【表１０】

表９．Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質設計（構造Ｉ－Ｂ）を有する、４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質を含む、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）	
配列番号７３ Ｆｃドメイン	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	60 120 180 240 246
配列番号７４ リンカー	SGSGSGSGSG S	11
配列番号７５ リンカー	SSSSSSGSGS GS	12
配列番号７６ リンカー	SSSSSSGSGS GSGSGS	16

【１３６１】

いくつかの複合体実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、ウトミルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、ウレルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、ウトミルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、表１０に記載の可変重鎖及び可変軽鎖から選択される可変重鎖及び可変軽鎖、前述の可変重鎖及び可変軽鎖の任意の組み合わせ、

ならびにそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、及びバイオシミラーからなる群から選択される１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。

【１３６２】

いくつかの複合体実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、４－１ＢＢＬ配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、配列番号７７による配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、可溶性４－１ＢＢＬ配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、配列番号７８による配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。

【１３６３】

いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号４３及び配列番号４４に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつか実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、各々が、表１０に示されるV_H配列及びV_L配列と少なくとも９５％同一であるV_H配列及びV_L配列を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインはリンカーによって結合されている。

【１３６４】

【表１１】

表１０．融合タンパク質における４－１ＢＢ結合ドメインとしてまたはｓｃＦｖ４－１ＢＢアゴニスト抗体として有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）	
配列番号７７ ４－１ＢＢＬ	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE	60 120 180 240 254
配列番号７８ ４－１ＢＢＬ可溶性ドメイン	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ LEIRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE	60 120 168
配列番号７９ ４Ｂ４－１－１バージョン１の可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS	60 118
配列番号８０ ４Ｂ４－１－１バージョン１の可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号８１ ４Ｂ４－１－１バージョン２の可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA	60 119
配列番号８２ ４Ｂ４－１－１バージョン２の可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR	60 108
配列番号８３ Ｈ３９Ｅ３－２の可変重鎖	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT	60 120
配列番号８４ Ｈ３９Ｅ３－２の可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA	60 110

【１３６５】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、（ｉ）第１の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性４－１ＢＢ結合ドメインを含む４－１ＢＢアゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインである。いくつか実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、（ｉ）第１の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性４－１ＢＢ結合ドメインを含む４－１ＢＢアゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインであり、可溶性４－１ＢＢドメインは各々、茎領域（三量体化に寄与し、細胞膜まである特定の距離を提供するが、４－１ＢＢ結合ドメインの一部分ではない）を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは独立して、３～８アミノ酸長を有する。

【１３６６】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、（ｉ）第１の可溶性腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）スーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインを含む４－１ＢＢアゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインは各々、茎領域を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは独立して、３～８アミノ酸長であり、各ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインは、４－１ＢＢ結合ドメインである。

【１３６７】

いくつか実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、前述のV_Lドメインのうちのいずれかに連結された前述のV_Hドメインのうちのいずれかを含む４－１ＢＢアゴニストｓｃＦｖ抗体である。

【１３６８】

いくつか実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＢＰＳ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）から市販されているＢＰＳ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　４－１ＢＢアゴニスト抗体カタログ番号７９０９７－２である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、Ｃｒｅａｔｉｖｅ　Ｂｉｏｌａｂｓ（Ｓｈｉｒｌｅｙ，ＮＹ，ＵＳＡ）から市販されているＣｒｅａｔｉｖｅ　Ｂｉｏｌａｂｓ　４－１ＢＢアゴニスト抗体カタログ番号ＭＯＭ－１８１７９である。

【１３６９】

３．ＯＸ４０（ＣＤ１３４）アゴニスト

いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、ＯＸ４０（ＣＤ１３４）アゴニストである。ＯＸ４０アゴニストは、当該技術分野で知られている任意のＯＸ４０結合分子であり得る。ＯＸ４０結合分子は、ヒトまたは哺乳動物のＯＸ４０に結合することができるモノクローナル抗体または融合タンパク質であり得る。ＯＸ４０アゴニストまたはＯＸ４０結合分子は、任意のアイソタイプ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、及びＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、及びＩｇＡ２）、またはサブクラスの免疫グロブリン分子の免疫グロブリン重鎖を含み得る。ＯＸ４０アゴニストまたはＯＸ４０結合分子は、重鎖及び軽鎖の両方を有し得る。本明細書で使用される場合、結合分子という用語は、抗体（全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、及び抗体断片、例えば、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ′）断片、Ｆａｂ発現ライブラリーによって産生された断片、上記のうちのいずれかのエピトープ結合断片、ならびにＯＸ４０に結合する抗体の操作された形態、例えば、ｓｃＦｖ分子も含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、完全ヒト抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ヒト化抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法及び組成物に使用するためのＯＸ４０アゴニストには、抗ＯＸ４０抗体、ヒト抗ＯＸ４０抗体、マウス抗ＯＸ４０抗体、哺乳動物抗ＯＸ４０抗体、モノクローナル抗ＯＸ４０抗体、ポリクローナル抗ＯＸ４０抗体、キメラ抗ＯＸ４０抗体、抗ＯＸ４０アドネクチン、抗ＯＸ４０ドメイン抗体、一本鎖抗ＯＸ４０断片、重鎖抗ＯＸ４０断片、軽鎖抗ＯＸ４０断片、抗ＯＸ４０融合タンパク質、及びそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、またはバイオシミラーが含まれる。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、アゴニスト、抗ＯＸ４０ヒト化、または完全ヒトモノクローナル抗体（すなわち、単一の細胞株に由来する抗体）である。

【１３７０】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストまたはＯＸ４０結合分子は、融合タンパク質である場合もある。ＯＸ４０Ｌに融合されたＦｃドメインを含むＯＸ４０融合タンパク質は、例えば、Ｓａｄｕｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００９，１８２，１４８１－８９に記載されている。いくつかの実施形態では、三量体または六量体ＯＸ４０アゴニスト（３つまたは６つのリガンド結合ドメインを有する）などの多量体ＯＸ４０アゴニストは、典型的に２つのリガンド結合ドメインを有するアゴニストモノクローナル抗体と比較して、優れた受容体（ＯＸ４０Ｌ）クラスター化及び内部細胞シグナル伝達複合体形成を誘導し得る。３つのＴＮＦＲＳＦ結合ドメイン及びＩｇＧ１－Ｆｃを含み、かつ任意選択でこれらの融合タンパク質のうちの２つ以上をさらに結合する三量体（三価）または六量体（もしくは六価）またはそれ以上の融合タンパク質は、例えば、Ｇｉｅｆｆｅｒｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ　２０１３，１２，２７３５－４７に記載されている。

【１３７１】

アゴニストＯＸ４０抗体及び融合タンパク質は、強い免疫応答を誘導することが知られている。Ｃｕｒｔｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１３，７３，７１８９－９８。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、毒性を低減するのに十分な様式でＯＸ４０抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体依存性細胞毒性（ｃｅｌｌｕｌａｒ　ｔｏｘｉｃｉｔｙ）（ＡＤＣＣ）、例えば、ＮＫ細胞細胞傷害性（ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ）を抑制するアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）を無効にするアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を無効にするアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｆｃ領域機能性を無効にするアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。

【１３７２】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ヒトＯＸ４０（配列番号８５）に高い親和性及びアゴニスト活性で結合することを特徴とする。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ヒトＯＸ４０に結合する結合分子である（配列番号８５）。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、マウスＯＸ４０に結合する結合分子である（配列番号８６）。ＯＸ４０アゴニストまたは結合分子が結合するＯＸ４０抗原のアミノ酸配列を表１１に要約する。

【１３７３】

【表１２】

表１１．ＯＸ４０抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）	
配列番号８５ ヒトＯＸ４０ （ホモサピエンス）	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI	60 120 180 240 277
配列番号８６ マウスＯＸ４０ （ハツカネズミ）	MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI	60 120 180 240 272

【１３７４】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１００ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約６０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約５０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約４０ｐＭ以下のK_Dで結合する、またはヒトもしくはマウスＯＸ４０に約３０ｐＭ以下のK_Dで結合するＯＸ４０アゴニストを含む。

【１３７５】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７．５×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７．５×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８．５×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒ

トもしくはマウスＯＸ４０に約９．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$で結合する、またはヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１×１０^{6}１／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$で結合するＯＸ４０アゴニストを含む。

【１３７６】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．１×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．２×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．３×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．４×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．５×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．６×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．７×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．８×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．９×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、またはヒトもしくはマウスＯＸ４０に約３×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【１３７７】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１０ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約６ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約５ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約４ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約３ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【１３７８】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＭＥＤＩ０５６２またはＭＥＤＩ－０５６２としても知られるタボリキシズマブである。タボリキシズマブは、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ，Ｉｎｃ．の子会社であるＭｅｄＩｍｍｕｎｅから入手可能である。タボリキシズマブは、免疫グロブリンＧ１－カッパ、抗［ホモサピエンスＴＮＦＲＳＦ４（腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーメンバー４、ＯＸ４０、ＣＤ１３４）］、ヒト化及びキメラモノクローナル抗体である。タボリキシズマブのアミノ酸配列を表１２に示す。タボリキシズマブは、３０１及び３０１′′位にＮ－グリコシル化部位（フコシル化複合二分岐ＣＨＯ型グリカンを有する）、２２－９５位（Ｖ$_{Ｈ}$－Ｖ$_{Ｌ}$）、１４８－２０４位（Ｃ$_{Ｈ}$１－Ｃ$_{Ｌ}$）、２６５－３２５位（Ｃ$_{Ｈ}$２）、及び３７１－４２９位（Ｃ$_{Ｈ}$３）（及び２２′′－９５′′、１４８′′－２０４′′、２６５′′－３２５′′、及び３７１′′－４２９′′位）に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、２３′－８８′位（Ｖ$_{Ｈ}$－Ｖ$_{Ｌ}$）及び１３４′－１９４′位（Ｃ$_{Ｈ}$１－Ｃ$_{Ｌ}$）（及び２３′′′－８８′′′及び１３４′′′－１９４′′′位）に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、２３０－２３０”及び２３３－２３３”位に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、ならびに２２４－２１４′及び２２４′′－２１４′′′に鎖間重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。様々な固形腫瘍適応症におけるタボリキシズマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所のｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０２３１８３９４及びＮＣＴ０２７０５４８２が含まれる。

【１３７９】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号８７によって示される重鎖及び配列番号８８によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアン

ト、もしくはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１３８０】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、タボリキシズマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号８９に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号９０に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖ抗体を含む。

【１３８１】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号９１、配列番号９２、及び配列番号９３に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号９４、配列番号９５、及び配列番号９６に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１３８２】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、タボリキシズマブに関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって承認され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は

、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。

【１３８３】

【表１３】

表１２．タボリキシズマブに関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）	
配列番号８７ タボリキシズマブの重鎖	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	60 120 180 240 300 360 420 451
配列番号８８ タボリキシズマブの軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
配列番号８９ タボリキシズマブの重鎖可変領域	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT	60 118
配列番号９０ タボリキシズマブの軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR	60 108
配列番号９１ タボリキシズマブの重鎖ＣＤＲ１	GSFSSGYWN	9
配列番号９２ タボリキシズマブの重鎖ＣＤＲ２	YIGYISYNGI TYH	13
配列番号９３ タボリキシズマブの重鎖ＣＤＲ３	RYKYDYDGGH AMDY	14
配列番号９４ タボリキシズマブの軽鎖ＣＤＲ１	QDISNYLN	8
配列番号９５ タボリキシズマブの軽鎖ＣＤＲ２	LLIYYTSKLH S	11
配列番号９６タボリキシズマブの軽鎖ＣＤＲ３	QQGSALPW	8

【１３８４】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．から入手可能な完全ヒト抗体である１１Ｄ４である。１１Ｄ４の調製及び特性は、米国特許第７，９６０，５１５号、同第８，２３６，９３０号、及び同第９，０２８，８２４号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。１１Ｄ４のアミノ酸配列を表１３に示す。

【１３８５】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号９７によって示される重鎖及び配列番号９８によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴ

ニストは、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１３８６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１１Ｄ４の重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号９９に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１００に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【１３８７】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１０１、配列番号１０２、及び配列番号１０３に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１０４、配列番号１０５、及び配列番号１０６に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１３８８】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１１Ｄ４に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、１１Ｄ４である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、１１Ｄ４である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬

品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１１Ｄ４である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１１Ｄ４である。

【１３８９】

【表１４】

表１３．１１Ｄ４に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）	
配列番号９７ １１Ｄ４の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPPCPAP PVAGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK	60 120 180 240 300 360 420 444
配列番号９８ １１Ｄ４の軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
配列番号９９ １１Ｄ４の重鎖 可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
配列番号１００ １１Ｄ４の軽鎖可 変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK	60 107
配列番号１０１ １１Ｄ４の重鎖 ＣＤＲ１	SYSMN	5
配列番号１０２ １１Ｄ４の重鎖 ＣＤＲ２	YISSSSSTID YADSVKG	17
配列番号１０３ １１Ｄ４の重鎖 ＣＤＲ３	ESGWYLFDY	9
配列番号１０４ １１Ｄ４の軽鎖 ＣＤＲ１	RASQGISSWL A	11
配列番号１０５ １１Ｄ４の軽鎖 ＣＤＲ２	AASSLQS	7
配列番号１０６ １１Ｄ４の 軽鎖ＣＤＲ３	QQYNSYPPT	9

【１３９０】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．から入手可能な完全ヒト抗体である１８Ｄ８である。１８Ｄ８の調製及び特性は、米国特許第７，９６０，５１５号、同第８，２３６，９３０号、及び同第９，０２８，８２４号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。１８Ｄ８のアミノ酸配列を表１４に示す。

【１３９１】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号１０７によって示される重鎖及び配列番号１０８によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列と少なく

とも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１３９２】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１８Ｄ８の重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１０９に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１１０に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【１３９３】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１１１、配列番号１１２、及び配列番号１１３に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１１４、配列番号１１５、及び配列番号１１６に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１３９４】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１８Ｄ８に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品また

は参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。

【１３９５】

【表１５】

表１４．１８Ｄ８に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）	
配列番号１０７ １８Ｄ８の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
配列番号１０８ １８Ｄ８の軽鎖	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	60 120 180 213
配列番号１０９ １８Ｄ８の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSS	60 120 124
配列番号１１０ １８Ｄ８の軽鎖可変領域	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK	60 106
配列番号１１１ １８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ１	DYAMH	5
配列番号１１２ １８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ２	GISWNSGSIG YADSVKG	17
配列番号１１３ １８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ３	DQSTADYYFY YGMDV	15
配列番号１１４ １８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ１	RASQSVSSYL A	11
配列番号１１５ １８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ２	DASNRAT	7
配列番号１１６ １８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ３	QQRSNWPT	8

【１３９６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ ｐｌｃ．から入手可能なヒト化抗体であるＨｕ１１９－１２２である。Ｈｕ１１９－１２２の調製及び特性は、米国特許第９，００６，３９９号及び同第９，１６３，０８５号、ならびに国際特許公開第ＷＯ２０１２／０２７３２８号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。Ｈｕ１１９－１２２のアミノ酸配列を表１５に示す。

【１３９７】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１１９－１２２の重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１１７に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１１８に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それ

ぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【１３９８】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１１９、配列番号１２０、及び配列番号１２１に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１２２、配列番号１２３、及び配列番号１２４に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１３９９】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１１９－１２２に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１１９－１２２である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１１９－１２２である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１１９－１２２である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１１９－１２２である。

【１４００】

【表１６】

表１５．Ｈｕ１１９－１２２に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）	
配列番号１１７ Ｈｕ１１９－１２ ２の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
配列番号１１８ Ｈｕ１１９－１２ ２の軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号１１９ Ｈｕ１１９－１２ ２の重鎖ＣＤＲ１	SHDMS	5
配列番号１２０ Ｈｕ１１９－１２ ２の重鎖ＣＤＲ２	AINSDGGSTY YPDTMER	17
配列番号１２１ Ｈｕ１１９－１２ ２の重鎖ＣＤＲ３	HYDDYYAWFA Y	11
配列番号１２２ Ｈｕ１１９－１２ ２の軽鎖ＣＤＲ１	RASKSVSTSG YSYMH	15
配列番号１２３ Ｈｕ１１９－１２ ２の軽鎖ＣＤＲ２	LASNLES	7
配列番号１２４ Ｈｕ１１９－１２ ２の軽鎖ＣＤＲ３	QHSRELPLT	9

【１４０１】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ ｐｌｃ．から入手可能なヒト化抗体であるＨｕ１０６－２２２である。Ｈｕ１０６－２２２の調製及び特性は、米国特許第９，００６，３９９号及び同第９，１６３，０８５号、ならびに国際特許公開第ＷＯ２０１２／０２７３２８号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。Ｈｕ１０６－２２２のアミノ酸配列を表１６に示す。

【１４０２】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１０６－２２２の重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１２５に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１２６に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【１４０３】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１２７、配列番号１２８、及び配列番号１２９に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１３０、配

列番号１３１、及び配列番号１３２に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１４０４】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１０６－２２２に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１０６－２２２である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１０６－２２２である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１０６－２２２である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１０６－２２２である。

【１４０５】

【表１７】

表１６．Ｈｕ１０６－２２２に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）	
配列番号１２５ Ｈｕ１０６－２２２の重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	60 120 122
配列番号１２６ Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK	60 107
配列番号１２７ Ｈｕ１０６－２２２の重鎖ＣＤＲ１	DYSMH	5
配列番号１２８ Ｈｕ１０６－２２２の重鎖ＣＤＲ２	WINTETGEPT YADDFKG	17
配列番号１２９ Ｈｕ１０６－２２２の重鎖ＣＤＲ３	PYYDYVSYYA MDY	13
配列番号１３０ Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ１	KASQDVSTAV A	11
配列番号１３１ Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ２	SASYLYT	7
配列番号１３２ Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ３	QQHYSTPRT	9

【１４０６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＭＥＤＩ６４６９（９Ｂ１２とも称される）である。ＭＥＤＩ６４６９は、マウスモノクローナル抗体である。Ｗｅｉｎ

ｂｅｒｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００６，２９，５７５－５８５。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｗｅｉｎｂｅｒｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００６，２９，５７５－５８５（その開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されているように、Ｂｉｏｖｅｓｔ　Ｉｎｃ．（Ｍａｌｖｅｒｎ，ＭＡ，ＵＳＡ）に寄託された９Ｂ１２ハイブリドーマによって産生された抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、ＭＥＤＩ６４６９のＣＤＲ配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＭＥＤＩ６４６９の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【１４０７】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｌ１０６　ＢＤ（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体Ｌ１０６（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）のＣＤＲを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体Ｌ１０６（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）のＣＤＲを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＩｎＶｉｖｏＭＡｂ、ＢｉｏＸｃｅｌｌ　Ｉｎｃ（Ｗｅｓｔ　Ｌｅｂａｎｏｎ，ＮＨ）から市販されているマウスモノクローナル抗体抗ｍＣＤ１３４／ｍＯＸ４０（クローンＯＸ８６）である。

【１４０８】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、国際特許出願公開第ＷＯ９５／１２６７３号、同第ＷＯ９５／２１９２５号、同第ＷＯ２００６／１２１８１０号、同第ＷＯ２０１２／０２７３２８号、同第ＷＯ２０１３／０２８２３１号、同第ＷＯ２０１３／０３８１９１号、及び同第ＷＯ２０１４／１４８８９５号、欧州特許出願第０６７２１４１号、米国特許出願公開第２０１０／１３６０３０号、同第２０１４／３７７２８４号、同第２０１５／１９０５０６号、及び同第２０１５／１３２２８８号（クローン２０Ｅ５及び１２Ｈ３を含む）、ならびに米国特許第７，５０４，１０１号、同第７，５５０，１４０号、同第７，６２２，４４４号、同第７，６９６，１７５号、同第７，９６０，５１５号、同第７，９６１，５１５号、同第８，１３３，９８３号、同第９，００６，３９９号、及び同第９，１６３，０８５号に記載されるＯＸ４０アゴニストから選択され、その各々の開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【１４０９】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、構造Ｉ－Ａ（Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）もしくは構造Ｉ－Ｂ（Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）に示されるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質、またはそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂの特性は、上記及び米国特許第９，３５９，４２０号、同第９，３４０，５９９号、同第８，９２１，５１９号、及び同第８，４５０，４６０号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。図１８に示される構造Ｉ－Ａのポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表９に見出される。Ｆｃドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン（配列番号６２のアミノ酸１７～２３０）、完全なヒンジドメイン（配列番号６２のアミノ酸１～１６）、またはヒンジドメインの一部（例えば、配列番号６２のアミノ酸４～１６）を含む。Ｃ末端Ｆｃ抗体を結合するための好ましいリンカーは、追加のポリペプチドの融合に好適なリンカーを含む、配列番号６３～配列番号７２に示される実施形態から選択され得る。同様に、図１８に示される構造Ｉ－Ｂのポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表１０に見出される。Ｆｃ抗体断片が構造Ｉ－ＢにあるようなＴＮＲＦＳＦ融合タンパク質のＮ末端に融合さ

れる場合、Ｆｃモジュールの配列は、好ましくは、配列番号７３に示されるものであり、リンカー配列は、好ましくは、配列番号７４～配列番号７６に示される実施形態から選択される。

【１４１０】

いくつかの複合体実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、タボリキシズマブの可変重鎖及び可変軽鎖、１１Ｄ４の可変重鎖及び可変軽鎖、１８Ｄ８の可変重鎖及び可変軽鎖、Ｈｕ１１９－１２２の可変重鎖及び可変軽鎖、Ｈｕ１０６－２２２の可変重鎖及び可変軽鎖、表１７に記載の可変重鎖及び可変軽鎖から選択される可変重鎖及び可変軽鎖、前述の可変重鎖及び可変軽鎖の任意の組み合わせ、ならびにそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、及びバイオシミラーからなる群から選択される１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。

【１４１１】

いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、ＯＸ４０Ｌ配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１３３による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、可溶性ＯＸ４０Ｌ配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１３４による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１３５による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。

【１４１２】

いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号１２７及び配列番号１２８に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、表１７に示されるV_H配列及びV_L配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインはリンカーによって結合されている。

【１４１３】

【表１８－１】

表１７．融合タンパク質（例えば、構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂ）におけるＯＸ４０結合ドメインとしてまたはｓｃＦｖ　ＯＸ４０アゴニスト抗体ドメインとして有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）	
配列番号１３３ ＯＸ４０Ｌ	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF CVL	60 120 180 183
配列番号１３４ ＯＸ４０Ｌ可溶性ドメイン	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL IHQNPGEFCV L	60 120 131
配列番号１３５ ＯＸ４０Ｌ可溶性ドメイン（代替）	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ NPGEFCVL	60 120 128
配列番号１３６ ００８の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS	60 120
配列番号１３７ ００８の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK	60 108
配列番号１３８ ０１１の可変重鎖	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA	60 120
配列番号１３９ ０１１の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK	60 108
配列番号１４０ ０２１の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS	60 120
配列番号１４１ ０２１の可変軽鎖	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK	60 108
配列番号１４２ ０２３の可変重鎖	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS	60 120
配列番号１４３ ０２３の可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR	60 108
配列番号１４４ 重鎖可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS	60 119
配列番号１４５ 軽鎖可変領域	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR	60 108
配列番号１４６ 重鎖可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS P	60 120 121
配列番号１４７ 軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR	60 108

【表１８－２】

配列番号１４８ ヒト化抗体の重鎖 可変領域	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV SS	60 120 122
配列番号１４９ ヒト化抗体の重鎖 可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	60 120 122
配列番号１５０ ヒト化抗体の軽鎖 可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号１５１ ヒト化抗体の軽鎖 可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号１５２ ヒト化抗体の重鎖 可変領域	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA	60 120
配列番号１５３ ヒト化抗体の重鎖 可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
配列番号１５４ ヒト化抗体の軽鎖 可変領域	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K	60 111
配列番号１５５ ヒト化抗体の軽鎖 可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号１５６ 重鎖可変領域	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG EVFYFDYWGQ GTTLTVSS	60 120 138
配列番号１５７ 軽鎖可変領域	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG TKLELK	60 120 126

【１４１４】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、（ｉ）第１の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性ＯＸ４０結合ドメインを含むＯＸ４０アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインである。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、（ｉ）第１の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性ＯＸ４０結合ドメインを含むＯＸ４０アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインであり、可溶性ＯＸ４０ドメインは各々、茎領域（三量体化に寄与し、細胞膜まである特定の距離を提供するが、ＯＸ４０結合ドメインの一部分ではない）を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは独立して、３～８アミノ酸長を有する。

【１４１５】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、（ｉ）第１の可溶性腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）スーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインド

メインを含むＯＸ４０アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインは各々、茎領域を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは独立して、３～８アミノ酸長であり、ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインは、ＯＸ４０結合ドメインである。

【１４１６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＭＥＤＩ６３８３である。ＭＥＤＩ６３８３は、ＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質であり、米国特許第６，３１２，７００号に記載されているように調製することができ、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１４１７】

いくつか実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、前述のV_Lドメインのうちのいずれかに連結された前述のV_Hドメインのうちのいずれかを含むＯＸ４０アゴニストｓｃＦｖ抗体である。

【１４１８】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｃｒｅａｔｉｖｅ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｉｎｃ．，Ｓｈｉｒｌｅｙ，ＮＹ，ＵＳＡから市販されているＣｒｅａｔｉｖｅ　Ｂｉｏｌａｂｓ　ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体ＭＯＭ－１８４５５である。

【１４１９】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡから市販されているＯＸ４０アゴニスト抗体クローンＢｅｒ－ＡＣＴ３５である。

【１４２０】

Ｃ．任意選択の細胞生存率分析

任意選択で、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準のアッセイを使用して、プライミングによる第１の拡張（初期バルク拡張と称されることもある）後に行われ得る。したがって、ある特定の実施形態では、方法は、プライミングによる第１の拡張後に細胞生存率アッセイを行うことを含む。例えば、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンブルー排除アッセイが、バルクＴＩＬの試料上で行われ得る。生存率の試験に使用する他のアッセイには、アラマーブルーアッセイ及びＭＴＴアッセイが含まれるが、これらに限定されない。

【１４２１】

１．細胞計数、生存率、フローサイトメトリー

いくつかの実施形態では、細胞数及び／または生存率が測定される。ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、及びＣＤ５６などであるが、これらに限定されないマーカー、ならびに本明細書に開示または記載される任意の他のマーカーの発現は、ＦＡＣＳＣａｎｔｏ（商標）フローサイトメーター（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して、例えば、ＢＤ　Ｂｉｏ－ｓｃｉｅｎｃｅｓ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）から市販されているものであるが、これに限定されない抗体を用いたフローサイトメトリーによって測定され得る。細胞は、使い捨てのｃチップ血球計数器（ＶＷＲ，Ｂａｔａｖｉａ，ＩＬ）を使用して手動で計数することができ、生存率は、トリパンブルー染色を含むが、これに限定されない、当該技術分野で知られている任意の方法を使用して評価することができる。細胞生存率は、米国特許出願公開第２０１８／０２８２６９４号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に基づいてアッセイされ得る。細胞生存率は、米国特許公開第２０１８／０２８０４３６号または国際特許公開第ＷＯ／２０１８／０８１４７３号（いずれもあらゆる目的のためにそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に基づいてアッセイすることもできる。

【１４２２】

いくつかの事例では、バルクＴＩＬ集団は、以下で考察されるプロトコルを使用して直ちに凍結保存され得る。代替的に、以下で論じられるように、バルクＴＩＬ集団がＲＥＰに供されて、凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾ＴＩＬが療法に使用される場合、バ

ルクまたはＲＥＰ　ＴＩＬ集団が好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。

【１４２３】

２．細胞培養

いくつかの実施形態では、上で考察され、図１及び８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に例示されたものを含む、ＴＩＬを拡張するための方法は、約５，０００ｍＬ～約２５，０００ｍＬの細胞培地、約５，０００ｍＬ～約１０，０００ｍＬの細胞培地、または約５，８００ｍＬ～約８，７００ｍＬの細胞培地を使用することを含み得る。いくつかの実施形態では、培地は、無血清培地である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、無血清である。いくつかの実施形態では、第２の拡張における培地は、無血清である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張及び第２の拡張（急速な第２の拡張とも称される）における培地は、両方とも無血清である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの数を拡張することは、わずか１種類の細胞培養培地を使用する。任意の好適な細胞培養培地、例えば、ＡＩＭ－Ｖ細胞培地（Ｌ－グルタミン、５０μＭの硫酸ストレプトマイシン、及び１０μＭの硫酸ゲンタマイシン）細胞培養培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ　ＣＡ）が使用され得る。これに関して、本発明の方法は、ＴＩＬの数を拡張するために必要な培地の量及び培地の種類の数を有利に減少させる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの数を拡張することは、３日または４日に１回以下の頻度で細胞にフィードすることを含み得る。ガス透過性容器内で細胞の数を拡張することは、細胞を拡張するために必要なフィード頻度を減少させることによって、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化する。

【１４２４】

いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培養培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ベータ－メルカプトエタノール（ＢＭＥ）を欠いている。

【１４２５】

いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、プライミングによる第１の拡張として約１～８日間、例えば約７日間、またはプライミングによる第１の拡張として約８日間にわたってＩＬ－２、１Ｘ抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第１のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を培養することと、ＴＩＬを第２のガス透過性容器に移し、ＩＬ－２、２Ｘ抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第２のガス透過性容器内でＴＩＬの数を約７～９日間、例えば約７日間、約８日間、または約９日間にわたって拡張することと、を含む。

【１４２６】

いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、プライミングによる第１の拡張として、ＩＬ－２、１Ｘ抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第１のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を約１～７日間、例えば、約７日間にわたって培養することと、ＴＩＬを第２のガス透過性容器に移し、ＩＬ－２、２Ｘ抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第２のガス透過性容器内でＴＩＬの数を約７～１４日間、または約７～９日間、例えば、約７日間、約８日間、または約９日間、約１０日間、または約１１日間にわたって拡張することと、を含む。

【１４２７】

いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、プライミングによる第１の拡張として、ＩＬ－２、１×抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第１のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を、　約１～７日、例えば、約７日の期間培養することと、ＴＩＬを第２のガス透過性容器に移し、

ＩＬ－２、２×抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第の２ガス透過性容器内でＴＩＬの数を、約７～１１日、例えば、約７日、約８日、約９日、約１０日、または約１１日の期間拡張することと、を含む。

【１４２８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ガス透過性容器内で拡張される。ガス透過性容器は、米国特許出願公開第２００５／０１０６７１７Ａ１号に記載されるものを含む、当該技術分野で知られている方法、組成物、及びデバイスを使用して、ＰＢＭＣを使用してＴＩＬを拡張するために使用されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ガス透過性バッグ内で拡張される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、Ｘｕｒｉ Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ Ｗ２５（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）などのガス透過性バッグ内のＴＩＬを拡張する細胞拡張系を使用して拡張される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、Ｘｕｒｉ Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ Ｗ５（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）としても知られるＷＡＶＥ Ｂｉｏｒｅａｃｔｏｒ Ｓｙｓｔｅｍなどのガス透過性バッグ内でＴＩＬを拡張する細胞拡張系を使用して拡張される。いくつかの実施形態では、細胞拡張系は、約１００ｍＬ、約２００ｍＬ、約３００ｍＬ、約４００ｍＬ、約５００ｍＬ、約６００ｍＬ、約７００ｍＬ、約８００ｍＬ、約９００ｍＬ、約１Ｌ、約２Ｌ、約３Ｌ、約４Ｌ、約５Ｌ、約６Ｌ、約７Ｌ、約８Ｌ、約９Ｌ、及び約１０Ｌからなる群から選択される体積を有するガス透過性細胞バッグを含む。

【１４２９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、Ｇ－ＲＥＸフラスコ（Ｗｉｌｓｏｎ Ｗｏｌｆ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇから市販されている）内で拡張され得る。かかる実施形態は、細胞集団が約５×１０^{5}細胞／ｃｍ^{2}から１０×１０^{6}～３０×１０^{6}細胞／ｃｍ^{2}まで拡張するのを可能にする。いくつかの実施形態では、これは、フィードなしである。いくつかの実施形態では、これは、培地がＧ－ＲＥＸフラスコ内の約１０ｃｍの高さに存在する限り、フィードなしである。いくつかの実施形態では、これは、フィードなしであるが、１つ以上のサイトカインの追加を伴う。いくつかの実施形態では、サイトカインを培地と混合する必要なしに、サイトカインがボーラスとして追加され得る。かかる容器、装置、及び方法は、当該技術分野で知られており、ＴＩＬを拡張するために使用されており、米国特許出願公開第２０１４／０３７７７３９Ａ１号、国際公開第ＷＯ２０１４／２１００３６Ａ１号、米国特許出願公開第２０１３／０１１５６１７Ａ１号、国際公開第ＷＯ２０１３／１８８４２７Ａ１号、米国特許出願公開第２０１１／０１３６２２８Ａ１、米国特許第８，８０９，０５０Ｂ２号、国際公開第ＷＯ２０１１／０７２０８８Ａ２号、米国特許出願公開第２０１６／０２０８２１６Ａ１号、米国特許出願公開第２０１２／０２４４１３３Ａ１号、国際公開第ＷＯ２０１２／１２９２０１Ａ１号、米国特許出願公開第２０１３／０１０２０７５Ａ１号、米国特許第８，９５６，８６０Ｂ２号、国際公開第ＷＯ２０１３／１７３８３５Ａ１号、米国特許出願公開第２０１５／０１７５９６６Ａ１号に記載されるものを含み、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。かかるプロセスはまた、Ｊｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，２０１２，３５：２８３－２９２に記載されている。

【１４３０】

Ｄ．ＴＩＬにおける遺伝子の任意選択のノックダウンまたはノックアウト

いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、タンパク質発現を一過的に変化させるために、各々本明細書で提供されるように、閉鎖滅菌製造プロセス中を含む、拡張ステップ前、拡張ステップ中、または拡張ステップ後にさらに操作される。いくつかの実施形態では、一過的に変化したタンパク質発現は、一過性の遺伝子編集によるものである。いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、ＴＩＬにおけるタンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子（ＴＦ）及び／または他の分子で処理される。いくつかの実施形態では、タンパク質発現を一過的に変化させることができるＴＦ及び／または他の分子は、腫瘍抗原の発現の変化及び／またはＴＩＬ集団における腫瘍抗原特異的Ｔ細

胞の数の変化を提供する。
【１４３１】
ある特定の実施形態では、方法は、ＴＩＬ集団を遺伝子編集することを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、及び／または第３のＴＩＬ集団を遺伝子編集することを含む。
【１４３２】
いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のタンパク質の発現の促進または１つ以上のタンパク質の発現の阻害、ならびに一組のタンパク質の促進及び別の組のタンパク質の阻害の両方の組み合わせの同時発生のために、リボ核酸（ＲＮＡ）挿入、例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）または低分子（もしくは短）干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）のＴＩＬ集団への挿入などのヌクレオチド挿入による遺伝子編集を含む。
【１４３３】
いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、タンパク質発現の一過性の変化を受ける。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８（特に図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に示されるようなステップＡから取得されたＴＩＬ集団を含む、第１の拡張前のバルクＴＩＬ集団において起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８（例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に示されるように、例えば、ステップＢで拡張されたＴＩＬ集団におけるものを含む、第１の拡張中に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、ステップＢから取得され、ステップＣに含まれるＴＩＬ集団である、例えば、第１の拡張と第２の拡張との間の移行中のＴＩＬ集団（例えば、本明細書に記載の第２のＴＩＬ集団）におけるものを含む、第１の拡張後に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＣから取得され、ステップＤでのその拡張前のＴＩＬ集団を含む、第２の拡張前のバルクＴＩＬ集団において起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＤで拡張されたＴＩＬ集団（例えば、第３のＴＩＬ集団）を含む、第２の拡張中に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＤでの拡張から取得されたＴＩＬ集団を含む、第２の拡張後に起こる。
【１４３４】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、エレクトロポレーションステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｔｓｏｎｇ，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．１９９１，６０，２９７－３０６及び米国特許出願公開第２０１４／０２２７２３７Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法（リン酸カルシウムＤＮＡ沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス）は、当該技術分野で知られており、Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９７３，５２，４５６－４６７、Ｗｉｇｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１９７９，７６，１３７３－１３７６、及びＣｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｒｅａ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１９８７，７，２７４５－２７５２、ならびに米国特許第５，５９３，８７５号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リポソームトランスフェクションステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－ｎ，ｎ，ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）及びジオレオイルホスホチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム

製剤を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Ｒｏｓｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１９９１，１０，５２０－５２５及びＦｅｌｇｎｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８７，８４，７４１３－７４１７、ならびに米国特許第５，２７９，８３３号、同第５，９０８，６３５号、同第６，０５６，９３８号、同第６，１１０，４９０号、同第６，５３４，４８４号、及び同第７，６８７，０７０号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、米国特許第５，７６６，９０２号、同第６，０２５，３３７号、同第６，４１０，５１７号、同第６，４７５，９９４号、及び同第７，１８９，７０５号に記載されている方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１４３５】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、幹細胞メモリーＴ細胞（ＴＳＣＭ）の増加をもたらす。ＴＳＣＭは、抗原を経験したセントラルメモリーＴ細胞の初期前駆細胞である。ＴＳＣＭは、一般に、幹細胞を定義する長期生存、自己再生、及び多分化能を示し、一般に、効果的なＴＩＬ製品の生成に望ましいものである。ＴＳＣＭは、養子細胞移植のマウスモデルにおいて他のＴ細胞サブセットと比較して増強された抗腫瘍活性を示している。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、高い割合のＴＳＣＭを含む組成を有するＴＩＬ集団をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＳＣＭパーセンテージの少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＬ集団中のＴＳＣＭの少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、または１０倍の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％のＴＳＣＭを有するＴＩＬ集団をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％のＴＳＣＭを有する治療的ＴＩＬ集団をもたらす。

【１４３６】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、抗原を経験したＴ細胞の幼若化をもたらす。いくつかの実施形態では、幼若化には、例えば、増加した増殖、増加したＴ細胞活性化、及び／または増加した抗原認識が含まれる。

【１４３７】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のＴＣＲレパートリーを保存するために、Ｔ細胞の大部分における発現を変化させる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のＴＣＲレパートリーを変化させない。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のＴＣＲレパートリーを維持する。

【１４３８】

いくつかの実施形態では、タンパク質の一過性の変化は、特定の遺伝子の発現の変化を

もたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＰＤ－１（ＰＤＣＤ１またはＣＣ２７９とも称される）、ＴＧＦＢＲ２、ＣＣＲ４／５、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）、ＣＩＳＨ、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ　１／２　ＩＣＤ、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβ、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＳＣＲ３、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、ＣＣＬ１７、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＶＨＬ、ＣＤ４４、ＰＩＫ３ＣＤ、ＳＯＣＳ１、胸腺細胞選択関連高移動度群（ＨＭＧ）ボックス（ＴＯＸ）、アンキリンリピートドメイン１１（ＡＮＫＲＤ１１）、ＢＣＬ６コリプレッサー（ＢＣＯＲ）、及び／またはｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）を含むが、これらに限定されない遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＴＧＦＢＲ２、ＣＣＲ４／５、ＣＴＬＡ－４、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）、ＣＩＳＨ、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤ、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβ、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＳＣＲ３、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、ＣＣＬ１７、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＶＨＬ、ＣＤ４４、ＰＩＫ３ＣＤ、ＳＯＣＳ１、胸腺細胞選択関連高移動度群（ＨＭＧ）ボックス（ＴＯＸ）、アンキリンリピートドメイン１１（ＡＮＫＲＤ１１）、ＢＣＬ６コリプレッサー（ＢＣＯＲ）、及び／またはｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）からなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ３９を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ６９を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦＢＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ４／５を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－１２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－１５を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＥＴ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦβを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ４を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ５を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＲ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＳＣＲ３を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）を標的とする。いくつかの実施形

態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＬ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＬ８を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ２２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ１７を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＶＨＬを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ４４を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＩＫ３ＣＤを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＳＯＣＳ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、胸腺細胞選択関連高移動度群（ＨＭＧ）ボックス（ＴＯＸ）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、アンキリンリピートドメイン１１（ＡＮＫＲＤ１１）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ＢＣＬ６コリプレッサー（ＢＣＯＲ）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）を標的とする。

【１４３９】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、一過性タンパク質発現によって過剰発現されるケモカイン受容体は、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１、ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、及び／またはＣＣＬ１７を含むが、これらに限定されないリガンドを有する受容体を含む。

【１４４０】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＣＢＬＢ、ＣＩＳＨ、ＴＩＭ－３、ＬＡＧ－３、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、及び／またはＴＧＦβの発現の低下及び／または減少をもたらす（例えば、ＴＧＦβ経路の遮断をもたらすことを含む）。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ－３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ－３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＥＴ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦβＲ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦβの発現の低下及び／または減少をもたらす。

【１４４１】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、腫瘍部位へのＴＩＬの輸送または移動を改善するために、ケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ１、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、及び／またはＣＳＣＲ３からなる群から選択されるケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【１４４２】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、インターロイキンの発現

の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１からなる群から選択されるインターロイキンの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【１４４３】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＶＨＬの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ４４の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＩＫ３ＣＤの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＳＯＣＳ１の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【１４４４】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）の発現の低下及び／または減少をもたらす。

【１４４５】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される２つの分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ならびにＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される１つの分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、及びそれらの組み合わせの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ならびにＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、及びそれらの組み合わせのうちの１つの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＬＡＧ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ３９及びＣＤ６９の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＴＩＭ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＴＥＴ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＬＡＧ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＴＩＭ３の発現の低下及び／または減少をも

たらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＴＥＴ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＴＩＭ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＴＥＴ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨ及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨ及びＴＩＭ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨ及びＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨ及びＴＥＴ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＢＬＢ及びＴＩＭ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＢＬＢ及びＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＢＬＢ及びＴＥＴ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＰＤ－１の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＬＡＧ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＴＥＴ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。

【１４４６】

いくつかの実施形態では、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される接着分子は、ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法によって、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団に挿入される（例えば、接着分子の発現が増加する）。

【１４４７】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の低下及び／または減少、ならびにＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせの発現の増加及び／または増強をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の低下及び／または減少、ならびにＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせの発現の増加及び／または増強をもたらす。

【１４４８】

いくつかの実施形態では、発現が約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、

約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９９％減少する。

【１４４９】

いくつかの実施形態では、発現が約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９０％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９９％増加する。

【１４５０】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＬにおけるタンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子（ＴＦ）及び／または他の分子でのＴＩＬの処理によって誘導される。いくつかの実施形態では、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームが、タンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子（ＴＦ）及び／または他の分子の細胞内送達のために用いられる。かかる方法は、転写因子を含むタンパク質を、Ｔ細胞を含む様々な初代ヒト細胞に送達する能力を示す（これらは、米国特許出願公開第２０１９／００９３０７３　Ａ１号、同第２０１８／０２０１８８９　Ａ１号、及び同第２０１９／００１７０７２　Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）。かかる方法は、ＴＩＬ集団を、転写因子（ＴＦ）及び／または一過性タンパク質発現を誘導することができる他の分子に曝露するために本発明で用いることができ、一過性タンパク質発現を誘導することができる当該ＴＦ及び／または他の分子は、腫瘍抗原の発現の増加及び／またはＴＩＬ集団における腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の数の増加をもたらし、それ故に、ＴＩＬ集団の再プログラミング及び再プログラミングされていないＴＩＬ集団と比較して再プログラミングされたＴＩＬ集団の治療的有効性の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、本明細書に記載されるように、ＴＩＬ開始集団またはＴＩＬ前集団（すなわち、再プログラミング前の）集団と比較して、エフェクターＴ細胞及び／またはセントラルメモリーＴ細胞の亜集団の増加をもたらす。

【１４５１】

いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）には、ＴＣＦ－１、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤ、及び／またはＭＹＢが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＴＣＦ－１である。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤである。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＭＹＢである。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、さらなるＴＩＬ再プログラミングを誘導するために、市販のＫＮＯＣＫＯＵＴ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（Ｇｉｂｃｏ／ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）などの誘導多能性幹細胞培養物（ｉＰ

ＳＣ）とともに投与される。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、さらなるＴＩＬ再プログラミングを誘導するために、ｉＰＳＣカクテルとともに投与される。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ｉＰＳＣカクテルなしで投与される。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、ＴＳＣＭのパーセンテージの増加をもたらす。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、ＴＳＣＭのパーセンテージの約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％ＴＳＣＭの増加をもたらす。

【１４５２】

いくつかの実施形態では、上記のようにタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法と組み合わせられてもよく、１つ以上のタンパク質の産生のための遺伝子の安定した組み込みステップを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾するステップを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、及び／または第３のＴＩＬ集団を遺伝子修飾することを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レトロウイルス形質導入ステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レンチウイルス形質導入ステップを含む。レンチウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｌｅｖｉｎｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．２００６，１０３，１７３７２－７７、Ｚｕｆｆｅｒｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９７，１５，８７１－７５、Ｄｕｌｌ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　１９９８，７２，８４６３－７１、及び米国特許第６，６２７，４４２号に記載されており、それらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、ガンマレトロウイルス形質導入ステップを含む。ガンマレトロウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｃｅｐｋｏ　ａｎｄ　Ｐｅａｒ，Ｃｕｒ．Ｐｒｏｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９６，９．９．１－９．９．１６に記載されており、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入ステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入系は、当該技術分野で知られており、トランスポザーゼが、ＤＮＡ発現ベクターとしてまたは発現可能なＲＮＡもしくはタンパク質として提供される系を含み、これにより、トランスポザーゼ、例えば、ｍＲＮＡ（例えば、キャップ及びポリＡ尾部を含むｍＲＮＡ）として提供されるトランスポザーゼの長期発現がトランスジェニック細胞で起こらないようになる。ＳＢ１０、ＳＢ１１、及びＳＢ１００ｘなどのサケ科型Ｔｅｌ様トランスポザーゼ（ＳＢまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼ）を含む好適なトランスポゾン媒介遺伝子導入系、ならびに増加した酵素活性を有する操作された酵素は、例えば、Ｈａｃｋｅｔｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ　２０１０，１８，６７４－８３及び米国特許第６，４８９，４５８号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１４５３】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ中のタンパク質発現の一過性変化は、短干渉ＲＮＡまたはサイレンシングＲＮＡとして知られることもある、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）は、一般に１９～２５塩基対長の二本鎖ＲＮＡ分子である。ｓｉＲＮＡは、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）において使用され、相補的なヌクレオチド配列を有する特定の遺伝子の発現に干渉する。

【１４５４】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、発現の低下である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬにおけるタンパク質発現の一過性の変化は、高パーセンテージの２’－ＯＨ置換（典型的にはフッ素または－ＯＣＨ$_3$）を有する化学的に合成された非対称ｓｉＲＮＡ二重鎖である自己送達ＲＮＡ干渉（ｓｄＲＮＡ）によって誘導され、これはテトラエチレングリコール（ＴＥＧ）リンカーを使用してその３’末端でコレステロー

ルに複合された、２０ヌクレオチドアンチセンス（ガイド）鎖及び１３～１５塩基センス（パッセンジャー）鎖を含む。短干渉ＲＮＡまたはサイレンシングＲＮＡとして知られることもある、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）は、一般に１９～２５塩基対長の二本鎖ＲＮＡ分子である。ｓｉＲＮＡは、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）において使用され、相補的なヌクレオチド配列を有する特定の遺伝子の発現に干渉する。ｓｄＲＮＡは、共有結合及び疎水的に修飾されたＲＮＡｉ化合物であり、細胞に侵入するために送達媒体を必要としない。ｓｄＲＮＡは、一般に、最小限の二本鎖領域を有する非対称の化学修飾された核酸分子である。ｓｄＲＮＡ分子は、典型的に一本鎖領域及び二本鎖領域を含み、分子の一本鎖領域及び二本鎖領域の両方に様々な化学修飾を含み得る。追加として、ｓｄＲＮＡ分子は、本明細書に記載されているように、従来の高度なステロール型分子などの疎水性複合体に結合することができる。ｓｄＲＮＡ及びかかるｓｄＲＮＡを作製するための関連方法は、例えば、米国特許出願公開第２０１６／０３０４８７３　Ａ１号、同第２０１９／０２１１３３７　Ａ１号、同第２００９／０１３１３６０　Ａ１号、及び同第２０１９／００４８３４１　Ａ１号、ならびに米国特許第１０，６３３，６５４号及び同第１０，９１３，９４８　Ｂ２号（それらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）にも広く記載されている。ｓｄＲＮＡ構造、化学、標的化位置、配列の好みなどを最適化するために、ｓｄＲＮＡ力価予測用のアルゴリズムが開発及び利用されている。これらの分析に基づいて、機能的なｓｄＲＮＡ配列は、一般に、１μＭの濃度で７０％を超える発現の減少を有すると定義されており、確率は４０％を超える。

【１４５５】

二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＲＮＡ）は、一般に、ＲＮＡの相補鎖の対、一般にセンス（パッセンジャー）鎖及びアンチセンス（ガイド）鎖を含む任意の分子を定義するために使用することができ、一本鎖オーバーハング領域を含み得る。ｓｉＲＮＡとは対照的に、ｄｓＲＮＡという用語は、一般に、ダイサーを含む切断酵素系の作用によりより大きいｄｓＲＮＡ分子から放出されるｓｉＲＮＡ分子の配列を含む前駆体分子を指す。

【１４５６】

いくつかの実施形態では、方法は、ＣＣＲを発現するように修飾されたＴＩＬを含むＴＩＬ集団におけるタンパク質発現の一過性変化を含み、例えば、テトラエチレングリコール（ＴＥＧ）リンカーを使用して２０ヌクレオチドアンチセンス（ガイド）鎖及び３’末端でコレステロールにコンジュゲートされた１３～１５塩基センス（パッセンジャー）鎖を含む、高いパーセンテージの２’－ＯＨ置換（典型的にはフッ素または－ＯＣＨ$_3$）を有する化学的に合成された非対称ｓｉＲＮＡ二本鎖である、自己送達ＲＮＡ干渉（ｓｄＲＮＡ）の使用を含む。ｓｉＲＮＡ及びｓｄＲＮＡを使用する方法は、Ｋｈｖｏｒｏｖａ ａｎｄ Ｗａｔｔｓ，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１７，３５，２３８－２４８、Ｂｙｒｎｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｏｃｕｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．２０１３，２９，８５５－８６４、及びＬｉｇｔｅｎｂｅｒｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１８，２６，１４８２－９３（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡの送達は、エレクトロポレーションまたは細胞膜破壊（スクイーズまたはＳＱＺ法など）を使用して達成される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達は、エレクトロポレーション、ＳＱＺ、または他の方法を使用せず、代わりに、ＴＩＬ集団が培地中１μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。ある特定の実施形態では、方法は、ＴＩＬ集団を培地中１μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度のｓｄＲＮＡに１～３日間曝露することを含む、ＴＩＬ集団へのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡの送達を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中１０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中５０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中０．１μＭ／１０，０００ＴＩＬ～５０μＭ／１０

，０００ＴＩＬの濃度でｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中０．１μＭ／１０，０００ＴＩＬ～５０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成され、ｓｄＲＮＡへの曝露は、培地に新鮮なｓｄＲＮＡを添加することによって２、３、４、または５回行われる。他の好適なプロセスは、例えば、米国特許出願公開第ＵＳ２０１１／００３９９１４Ａ１号、同第ＵＳ２０１３／０１３１１４１Ａ１号、及び同第ＵＳ２０１３／０１３１１４２Ａ１号、ならびに米国特許第９，０８０，１７１号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１４５７】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、製造中にＴＩＬ集団に挿入される。いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡは、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤ、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４　ＴＩＭ－３、ＬＡＧ－３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβ、ＴＧＦＢＲ２、ｃＡＭＰプロテインキナーゼＡ（ＰＫＡ）、ＢＡＦＦ　ＢＲ３、ＣＩＳＨ、及び／またはＣＢＬＢに干渉するＲＮＡをコードする。いくつかの実施形態では、発現の減少は、例えば、フローサイトメトリー及び／またはｑＰＣＲによって評価される、遺伝子サイレンシングのパーセンテージに基づいて決定される。いくつかの実施形態では、発現が約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９９％減少する。

【１４５８】

ｓｉＲＮＡの化学修飾に基づく自己送達可能なＲＮＡｉ技術を本発明の方法とともに用いて、本明細書に記載されるように、ｓｄＲＮＡをＴＩＬに首尾よく送達することができる。非対称ｓｉＲＮＡ構造及び疎水性リガンドとの骨格修飾の組み合わせ（例えば、Ｌｉｇｔｅｎｂｅｒｇ，ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１８，２６，１４８２－９３及び米国特許出願公開第２０１６／０３０４８７３　Ａ１号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）は、ｓｄＲＮＡのヌクレアーゼ安定性を利用して、培養培地に単純に添加することによって、追加の製剤及び方法なしに、ｓｄＲＮＡが培養された哺乳動物細胞に浸透することを可能にする。この安定性により、単に培地中のｓｄＲＮＡの活性濃度を維持することによって、標的遺伝子活性の一定レベルのＲＮＡｉを介した減少を支援することができる。理論に拘束されることはないが、ｓｄＲＮＡの骨格安定化は、非分裂細胞で数ヶ月間続く可能性のある遺伝子発現効果の延長された低減を提供する。

【１４５９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの９５％を超えるトランスフェクション効率及び様々な特定のｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡによる標的の発現の減少が起こる。いくつかの実施形態では、いくつかの未修飾リボース残基を含むｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＲＮＡｉ効果の効力及び／または寿命を増加させるために、完全に修飾された配列で置き換えられた。いくつかの実施形態では、発現効果の減少は、１２時間、２４時間、３６時間、４８時間、５日間、６日間、７日間、または８日間以上維持される。いくつかの実施形態では、発現効果の減少は、ＴＩＬのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ処理後１０日以上で低下す

る。いくつかの実施形態では、標的発現の発現の７０％を超える減少が維持される。いくつかの実施形態では、標的発現の発現の７０％を超える減少が維持されるＴＩＬ。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１経路における発現の減少により、ＴＩＬがより強力なインビボ効果を示すことが可能になり、これは、いくつかの実施形態では、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１経路の抑制効果の回避に起因する。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡによるＰＤ－１の発現の減少は、ＴＩＬ増殖の増加をもたらす。

【１４６０】

いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の７０％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の７５％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の８０％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の８５％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の９０％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の９５％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の９９％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．２５μＭ～約４μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約４．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。

【１４６１】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチド剤は、治療剤の安定性及び／または有効性を増加させ、かつ治療される細胞または組織へのオリゴヌクレオチドの効率的な送達をもたらすための１つ以上の修飾を含む。かかる修飾には、２’－Ｏ－メチル修飾、２’－Ｏ－フルロ修飾、ジホスホロチオエート修飾、２’Ｆ修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－メチル修飾、及び／または２’デオキシヌクレオチドが含まれ得る。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、例えば、ステロール、コレステロ

ール、ビタミンD、ナフチル、イソブチル、ベンジル、インドール、トリプトファン、及び／またはフェニルを含む１つ以上の疎水性修飾を含むように修飾される。いくつかの実施形態では、化学修飾ヌクレオチドは、ホスホロチオエート、２’－Ｏ－メチル、２’デオキシ、疎水性修飾及びホスホロチオエートの組み合わせである。いくつかの実施形態では、糖が修飾され得、修飾された糖には、Ｄ－リボース、２’－Ｏ－アルキル（２’－Ｏ－メチル及び２’－０－エチルを含む）、すなわち、２’－アルコキシ、２’－アミノ、２’－Ｓ－アルキル、２’－ハロ（２’－フルオロを含む）、Ｔ－メトキシエトキシ、２’－アリルオキシ（－ＯＣＨ$_2$ＣＨ＝ＣＨ$_2$）、２’－プロパルギル、２’－プロピル、エチニル、エテニル、プロペニル、及びシアノなどが含まれ得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、糖部分は、ヘキソースであり得、Ａｕｇｕｓｔｙｎｓ，ｅｔａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．１９９２，１８，４７１１（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているようにオリゴヌクレオチドに組み込まれ得る。

【１４６２】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖であり、すなわち、分子のいずれかの末端にも一本鎖配列が突出しておらず、すなわち、平滑末端である。いくつかの実施形態では、個々の核酸分子は、異なる長さであり得る。言い換えれば、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖ではない。例えば、２つの別個の核酸分子が使用される場合、アンチセンス配列を含むそれらの分子の一方、例えば、第１の分子は、それにハイブリダイズする（分子の一部を一本鎖のままにする）第２の分子よりも長い可能性がある。いくつかの実施形態では、単一の核酸分子が使用される場合、いずれかの末端の分子の一部は、一本鎖のままであり得る。

【１４６３】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、ミスマッチ及び／またはループもしくはバルジを含むが、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約７０％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約８０％にわたって二本鎖である。他の実施形態では、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約９０％～９５％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約９６％～９８％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくともまたは最大１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５のミスマッチを含む。

【１４６４】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、例えば、米国特許第５，８４９，９０２号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように３’または５’結合を修飾することによって、ヌクレアーゼから実質的に保護され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、「ブロッキング基」を含めることによって耐性にすることができる。本明細書で使用される場合、「ブロッキング基」という用語は、合成のための保護基またはカップリング基のいずれかとして（例えば、ＦＩＴＣ、プロピル（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_3$）、グリコール（－０－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ－）ホスフェート（ＰＯ$_3$$^{2'}$）’、リン酸水素、もしくはホスホロアミダイト）、オリゴヌクレオチドまたはヌクレオモノマーに結合され得る置換基（例えば、ＯＨ基以外）を指す。「ブロッキング基」は、修飾ヌクレオチド及び非ヌクレオチドエキソヌクレアーゼ耐性構造を含む、オリゴヌクレオチドの５’及び３’末端を保護する「末端ブロッキング基」または「エキソヌクレアーゼブロッキング基」も含み得る。

【１４６５】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ内の隣接するポリヌクレオチド

の少なくとも一部は、代替の連結、例えば、ホスホロチオエート連結によって結合されている。

【１４６６】

いくつかの実施形態では、化学修飾は、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡの細胞取り込みの少なくとも１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、または５００パーセントの増強をもたらし得る。いくつかの実施形態では、Ｃ残基またはＵ残基の少なくとも一方が疎水性修飾を含む。いくつかの実施形態では、複数のＣ及びＵが疎水性修飾を含む。いくつかの実施形態では、Ｃ及びＵの少なくとも１０％、１５％、２０％、３０％、４０％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、または少なくとも９５％が疎水性修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、Ｃ及びＵのすべてが疎水性修飾を含む。

【１４６７】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ分子は、プロトン化可能なアミンの組み込みにより増強されたエンドソーム放出を示す。いくつかの実施形態では、プロトン化可能なアミンは、センス鎖（ＲＩＳＣ負荷後に廃棄される分子の一部分）に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明のｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ化合物は、二重鎖領域（１０～１５塩基長の効率的なＲＩＳＣ侵入に必要）及び４～１２ヌクレオチド長の一本鎖領域を１３ヌクレオチド二重鎖とともに含む非対称化合物を含む。いくつかの実施形態では、６ヌクレオチドの一本鎖領域が用いられる。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡの一本鎖領域は、２～１２個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結（ホスホロチオエート修飾と称される）を含む。いくつかの実施形態では、６～８個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結が用いられる。いくつかの実施形態では、本発明のｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ化合物は、安定性を提供し、かつＲＩＳＣ侵入と互換性がある固有の化学修飾パターンを含む。ガイド鎖は、例えば、ＲＩＳＣ侵入に干渉することなく安定性を確証する任意の化学修飾によって修飾することもできる。いくつかの実施形態では、ガイド鎖における化学修飾パターンは、２′Ｆが修飾され、かつ５′末端がリン酸化されたＣ及びＵヌクレオチドの大部分を含む。

【１４６８】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡのヌクレオチドの少なくとも３０％が修飾されている。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡのヌクレオチドの少なくとも３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％が修飾されている。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡのヌクレオチドの１００％が修飾されている。

【１４６９】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ分子は、最小の二本鎖領域を有する。いくつかの実施形態では、二本鎖である分子の領域は、８～１５ヌクレオチド長の範囲である。いくつかの実施形態では、二本鎖である分子の領域は、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、二本鎖領域は、１３ヌクレオチド長である。ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に１００％の相補性が存在する場合もあれば、ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に１つ以上の不一致

が存在する場合もある。いくつかの実施形態では、二本鎖分子の一端で、分子は、平滑末端であるか、または１ヌクレオチドのオーバーハングを有するかのいずれかである。分子の一本鎖領域は、いくつかの実施形態では、４～１２ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２ヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、４ヌクレオチド長未満または１２ヌクレオチド長超であることもできる。ある特定の実施形態では、一本鎖領域は、６または７ヌクレオチド長である。

【１４７０】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ分子は、増加した安定性を有する。いくつかの事例では、化学修飾されたｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ分子は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４時間以上、または２４時間超（任意の中間値を含む）の培地中での半減期を有する。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄ－ＲＮＡは、１２時間以上の培地中での半減期を有する。

【１４７１】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、効力の増加及び／または毒性の低減のために最適化されている。いくつかの実施形態では、ガイド鎖及び／またはパッセンジャー鎖のヌクレオチド長、及び／またはガイド鎖及び／またはパッセンジャー鎖におけるホスホロチオエート修飾の数が、いくつかの態様では、ＲＮＡ分子の効力に影響を与え得る一方で、２′－フルオロ（２′Ｆ）修飾の２′－０－メチル（２′ＯＭｅ）修飾での置き換えは、いくつかの態様では、分子の毒性に影響を与え得る。いくつかの実施形態では、分子の２′Ｆ含有量の減少は、分子の毒性を低減すると予測される。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ分子におけるホスホロチオエート修飾の数は、細胞への分子の取り込み、例えば、細胞への分子の受動的取り込みの効率に影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、２′Ｆ修飾を有しないが、それにもかかわらず、細胞取り込み及び組織浸透における同等の有効性を特徴とする。

【１４７２】

いくつかの実施形態では、ガイド鎖は、およそ１８～１９ヌクレオチド長であり、およそ２～１４個のリン酸修飾を有する。例えば、ガイド鎖は、リン酸修飾された２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４個、または１４個超のヌクレオチドを含み得る。ガイド鎖は、ＲＩＳＣの侵入に干渉することなく増加した安定性を付与する１つ以上の修飾を含み得る。ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドなどのリン酸修飾ヌクレオチドは、３′末端にあるか、５′末端にあるか、またはガイド鎖全体に広がっている可能性がある。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の３′末端１０ヌクレオチドは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを含む。ガイド鎖は、分子全体に位置し得る２′Ｆ及び／または２′ＯＭｅ修飾も含み得る。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の１位のヌクレオチド（ガイド鎖の最も５′側のヌクレオチド）は、２′ＯＭｅ修飾及び／またはリン酸化されている。ガイド鎖内のＣ及びＵヌクレオチドは、２′Ｆ修飾されていてもよい。例えば、１９ｎｔガイド鎖の２～１０位（または異なる長さのガイド鎖における対応する位置）のＣ及びＵヌクレオチドは、２′Ｆ修飾されていてもよい。ガイド鎖内のＣ及びＵヌクレオチドは、２′ＯＭｅ修飾されている場合もある。例えば、１９ｎｔガイド鎖の１１～１８位（または異なる長さのガイド鎖における対応する位置）のＣ及びＵヌクレオチドは、２′ＯＭｅ修飾されていてもよい。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の最も３′側の末端のヌクレオチドは修飾されていない。ある特定の実施形態では、ガイド鎖内のＣ及びＵの大部分は２′Ｆ修飾されており、ガイド鎖の５′末端はリン酸化されている。他の実施形態では、１位及び１１～１８位のＣまたはＵは２′ＯＭｅ修飾されており、ガイド鎖の５′末端はリン酸化されている。他の実施形態では、位置１及び位置１１～１８のＣｓまたはＵｓは２′ＯＭｅ修飾されており、ガイド鎖の５′末端はリン酸化されており、２～１０位のＣまたはＵは２′Ｆ修飾されている。

【１４７３】
自己送達可能なＲＮＡｉ技術は、追加の製剤または技法を必要とすることなくＲＮＡｉ剤（ｓｉＲＮＡ、ｓｄＲＮＡ、または他のＲＮＡｉ剤のいずれか）で細胞を直接トランスフェクトする方法を提供する。トランスフェクションが困難な細胞株をトランスフェクトする能力、高いインビボ活性、及び使用の単純さは、従来のｓｉＲＮＡベースの技法に優る重大な機能的利点を提示する組成物及び方法の特徴であり、したがって、ｓｄＲＮＡ法は、本発明のＴＩＬにおける標的遺伝子の発現を減少させる方法に関連するいくつかの実施形態で用いられる。ｓｄＲＮＡ法により、化学合成された化合物をエクスビボ及びインビボの両方で広範囲の一次細胞及び組織に直接送達することが可能になる。本明細書における本発明のいくつかの実施形態に記載のｓｄＲＮＡは、Ａｄｖｉｒｎａ　ＬＬＣ（Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ，ＭＡ，ＵＳＡ）から市販されている。
【１４７４】
ｓｉＲＮＡ及びｓｄＲＮＡは、疎水的に修飾されたｓｉＲＮＡ－アンチセンスオリゴヌクレオチドハイブリッド構造として形成され得、例えば、Ｂｙｒｎｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｏｃｕｌａｒ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｅｕｔ．，２０１３，２９，８５５－８６４（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている。
【１４７５】
いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、滅菌エレクトロポレーションを使用して本明細書に記載のＴＩＬに送達され得る。ある特定の実施形態では、方法は、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドを送達するためにＴＩＬ集団の滅菌エレクトロポレーションを含む。
【１４７６】
いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、膜貫通送達系と組み合わせて細胞に送達され得る。いくつかの実施形態では、この膜貫通送達系は、脂質、ウイルスベクターなどを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド剤は、自己送達ＲＮＡｉ剤であり、いかなる送達剤も必要としない。特定の実施形態では、方法は、ＴＩＬ集団にｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドを送達するための膜貫通送達系の使用を含む。
【１４７７】
オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド組成物は、本明細書に記載のＴＩＬと接触し（例えば、接触させられ、本明細書では投与または送達されるとも称される）、ＴＩＬによって取り込まれる（ＴＩＬによる受動的取り込みを含む）。ｓｄＲＮＡは、第１の拡張中（例えば、ステップＢ）、第１の拡張後（例えば、ステップＣ中）、第２の拡張前または拡張中（例えば、ステップＤの前またはステップＤ中）、ステップＤ後及びステップＥにおける採取前、ステップＦにおける採取中または採取後、ステップＦにおける最終製剤化及び／または注入バッグへの移行前または移行中、ならびにステップＦにおける任意選択の凍結保存ステップ前に、本明細書に記載のＴＩＬに添加され得る。さらに、ｓｄＲＮＡは、ステップＦにおける任意の凍結保存ステップから解凍した後に添加され得る。いくつかの実施形態では、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の１つ以上のｓｄＲＮＡ標的遺伝子が、１００ｎＭ～２０ｍＭ、２００ｎＭ～１０ｍＭ、５００ｎｍ～１ｍＭ、１μＭ～１００μＭ、及び１μＭ～１００μＭからなる群から選択される濃度でＴＩＬ及び他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。いくつかの実施形態では、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の１つ以上のｓｄＲＮＡ標的遺伝子は、０．１μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、０．５μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、０．７５μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、１μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、１．２５μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、１．５μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、２μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，００

０ＴＩＬ／１００μＬ培地、５μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、または１０μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地からなる群から選択される量でＴＩＬ及び他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。いくつかの実施形態では、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の１つ以上のｓｄＲＮＡ標的遺伝子は、ＲＥＰ前段階またはＲＥＰ段階中に１日２回、１日１回、２日毎、３日毎、４日毎、５日毎、６日毎、または７日毎にＴＩＬ培養物に添加され得る。

【１４７８】

ｓｄＲＮＡを含む本発明のオリゴヌクレオチド組成物は、例えば、細胞培養培地にｓｄＲＮＡを高濃度で溶解し、かつ受動的取り込みが起こるのに十分な時間を許容することによって、拡張プロセス中に本明細書に記載のＴＩＬと接触することができる。ある特定の実施形態では、本発明の方法は、ＴＩＬ集団を、本明細書に記載のオリゴヌクレオチド組成物と接触させることを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、オリゴヌクレオチド、例えば、ｓｄＲＮＡを細胞培養培地に溶解することと、細胞培養培地をＴＩＬ集団と接触させることとを含む。ＴＩＬは、本明細書に記載の第１の集団、第２の集団、及び／または第３の集団であり得る。

【１４７９】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの細胞への送達は、リン酸カルシウム、ＤＭＳＯ、グリセロールもしくはデキストラン、エレクトロポレーションを含む好適な技術分野で認識される方法によって、またはトランスフェクションによって、例えば、当該技術分野で知られている方法、例えば、米国特許第４，８９７，３５５号、同第５，４５９，１２７号、同第５，６３１，２３７号、同第５，９５５，３６５号、同第５，９７６，５６７号、同第１０，０８７，４６４号、及び同第１０，１５５，９４５号、ならびにＢｅｒｇａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１９９３，２１，３５６７（それらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載される方法を使用して、カチオン性、アニオン性、もしくは中性脂質組成物またはリポソームを使用して増強され得る。

【１４８０】

いくつかの実施形態では、１つを超えるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡが、標的遺伝子の発現を減少させるために使用されるいくつかの実施形態では、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＰＤ－１、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２及び／またはＣＩＳＨを標的とするｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡのうちの１つ以上が一緒に使用される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１　ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、１つを超える遺伝子標的の発現を減少させるために、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２及び／またはＣＩＳＨのうちの１つ以上とともに使用される。いくつかの実施形態では、ＬＡＧ３　ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、両方の標的の遺伝子発現を減少させるために、ＣＩＳＨを標的とするｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡと組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、本明細書におけるＣＤ３９、ＣＤ６９、ＰＤ－１、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２及び／またはＣＩＳＨのうちの１つ以上を標的とするｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、Ａｄｖｉｒｎａ　ＬＬＣ（Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ，ＭＡ，ＵＳＡ）または複数の他のベンダーから市販されている。

【１４８１】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では

、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、別のｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、及びそれらの組み合わせから選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ならびにＬＡＧ３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３のうちの１つ、及びそれらの組み合わせから選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＥＴ２を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＥＴ２を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＥＴ２を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡは、ＣＤ３９を標的とし、１つのｓｄＲＮＡは、ＣＤ６９を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＥＴ２を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とする。いくつかの実施形態では

、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＥＴ２を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＥＴ２を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＥＴ２を標的とする。

【１４８２】

本明細書で考察されたように、本発明の実施形態は、それらの治療効果を増強するために遺伝子編集を介して遺伝子修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を提供する。本発明の実施形態は、１つ以上のタンパク質の発現の促進及び１つ以上のタンパク質の発現の阻害の両方、ならびにそれらの組み合わせのために、ＴＩＬ集団へのヌクレオチド挿入（ＲＮＡまたはＤＮＡ）による遺伝子編集を包含する。本発明の実施形態は、ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法も提供し、方法は、ＴＩＬを遺伝子編集することを含む。ＴＩＬ集団を遺伝子修飾するために使用され得るいくつかの遺伝子編集技術が存在し、それらは本発明による使用に好適である。かかる方法は、以下に記載の方法、ならびに本明細書の他の場所に記載のウイルス及びトランスポゾン方法を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを遺伝子修飾してＣＣＲを発現させる方法はまた、かかる遺伝子の安定したノックアウトまたはかかる遺伝子の一過性ノックダウンのいずれかを介して遺伝子の発現を抑制する修飾を含んでもよい。

【１４８３】

いくつかの実施形態では、この方法は、本明細書に記載の第１の集団、第２の集団、及び／または第３の集団におけるＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、１つ以上のタンパク質の産生または阻害（例えば、サイレンシング）のために遺伝子の安定した組み込みステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、エレクトロポレーションステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｔｓｏｎｇ，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．１９９１，６０，２９７－３０６及び米国特許出願公開第２０１４／０２２７２３７Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。米国特許第５，０１９，０３４号、同第５，１２８，２５７号、同第５，１３７，８１７号、同第５，１７３，１５８号、同第５，２３２，８５６号、同第５，２７３，５２５号、同第５，３０４，１２０号、同第５，３１８，５１４号、同第６，０１０，６１３号、及び同第６，０７８，４９０号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどの当該技術分野で知られている他のエレクトロポレーション法が使用され得る。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、滅菌エレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルスエレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適

用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる、及び（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬにおける細孔形成を誘導するステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる、及び（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なり、これにより、誘導された細孔が比較的長期間にわたって持続され、ＴＩＬの生存率が維持される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法（リン酸カルシウムＤＮＡ沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス）は、当該技術分野で知られており、Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９７３，５２，４５６－４６７、Ｗｉｇｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１９７９，７６，１３７３－１３７６、及びＣｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｒｅａ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１９８７，７，２７４５－２７５２、ならびに米国特許第５，５９３，８７５号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、リポソームトランスフェクションステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－ｎ，ｎ，ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）及びジオレオイルホスホチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム製剤を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Ｒｏｓｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １９９１，１０，５２０－５２５及びＦｅｌｇｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８７，８４，７４１３－７４１７、ならびに米国特許第５，２７９，８３３号、同第５，９０８，６３５号、同第６，０５６，９３８号、同第６，１１０，４９０号、同第６，５３４，４８

４号、及び同第７，６８７，０７０号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、米国特許第５，７６６，９０２号、同第６，０２５，３３７号、同第６，４１０，５１７号、同第６，４７５，９９４号、及び同第７，１８９，７０５号に記載の方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＴＩＬは、本明細書に記載のＴＩＬの第１の集団、第２の集団、及び／または第３の集団であり得る。

【１４８４】

ある実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。かかるプログラム可能なヌクレアーゼは、特定のゲノム遺伝子座に切断を導入することによって正確なゲノム編集を可能にし、すなわち、ゲノム内の特定のＤＮＡ配列の認識に依存して、ヌクレアーゼドメインをこの位置に標的し、標的配列での二本鎖切断の生成を媒介する。ＤＮＡの二本鎖切断は、その後、内因性修復機構を切断部位に動員して、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）または相同指向修復（ＨＤＲ）のいずれかによるゲノム編集を媒介する。したがって、切断の修復は、標的遺伝子産物を破壊する（例えば、サイレンス、抑制、または増強する）挿入／欠失変異の導入をもたらす可能性がある。

【１４８５】

部位特異的ゲノム編集を可能にするために開発されたヌクレアーゼの主要なクラスには、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写活性化因子様ヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、及びＣＲＩＳＰＲ関連ヌクレアーゼ（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９）が含まれる。これらのヌクレアーゼ系は、ＤＮＡ認識のモードに基づいて大きく２つのカテゴリーに分類され得、ＺＦＮ及びＴＡＬＥＮは、タンパク質－ＤＮＡ相互作用を介して特定のＤＮＡ結合を達成するが、Ｃａｓ９などのＣＲＩＳＰＲ系は、標的ＤＮＡと直接塩基対を形成する短いＲＮＡガイド分子によって、かつタンパク質－ＤＮＡ相互作用によって特定のＤＮＡ配列を標的とする。例えば、Ｃｏｘ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２０１５，Ｖｏｌ．２１，Ｎｏ．２を参照されたい。

【１４８６】

本発明のＴＩＬ拡張法に従って使用され得る遺伝子編集法の非限定的な例には、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、及びＺＦＮ法が含まれ、これらは以下でより詳細に説明される。ある実施形態によれば、ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、Ｇｅｎ２）に従って、または米国特許出願公開第２０２０／０２９９６４４　Ａ１号及び同第２０２０／０１２１７１９　Ａ１号、ならびに米国特許第１０，９２５，９００号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように実行することができ、方法は、増強された治療効果を提供することができるＴＩＬを生成するために、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはＺＦＮ法のうちの１つ以上によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。ある実施形態によれば、遺伝子編集されたＴＩＬは、インビトロでそれらを修飾されていないＴＩＬと比較することによって、例えば、修飾されていないＴＩＬと比較してインビトロでのエフェクター機能、サイトカインプロファイルなどを評価することによって、治療効果の改善について評価され得る。ある特定の実施形態では、この方法は、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、及び／またはＺＦＮ法を使用してＴＩＬ集団を遺伝子編集することを含む。

【１４８７】

本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションは、ＣＲＩＳＰＲ系、ＴＡＬＥＮ系、及びＺＦＮ系などの遺伝子編集系の送達のために使用される。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーション系は、フローエレクトロポレーション系である。本発明のいくつかの実施形態との使用に好適な、好適なフローエレクトロポレーション系の例は、市販のＭａｘＣｙｔｅ　ＳＴＸ系である。本発明との使用に好適であり得る、ＢＴＸ－Ｈａｒｖａｒｄ　Ａｐｐａｒａｔｕｓから入手可能なＡｇｉｌｅＰｕｌｓｅ系

もしくはＥＣＭ８３０、Ｃｅｌｌａｘｅｓｓ　Ｅｌｅｋｔｒａ（Ｃｅｌｌｅｃｔｒｉｃｏｎ）、Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（Ｌｏｎｚａ／Ａｍａｘａ）、ＧｅｎｅＰｕｌｓｅｒ　ＭＸｃｅｌｌ（ＢＩＯＲＡＤ）、ｉＰｏｒａｔｏｒ－９６（Ｐｒｉｍａｘ）、またはｓｉＰＯＲＴｅｒ９６（Ａｍｂｉｏｎ）などのいくつかの代替の市販エレクトロポレーション機器が存在する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーション系は、ＴＩＬ拡張法の残りとともに、滅菌閉鎖系を形成する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーション系は、本明細書に記載のパルスエレクトロポレーション系であり、ＴＩＬ拡張法の残りとともに、滅菌閉鎖系を形成する。

【１４８８】

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、Ｇｅｎ２）に従って、または米国特許出願公開第２０２０／０２９９６４４　Ａ１号及び同第２０２０／０１２１７１９　Ａ１号、ならびに米国特許第１０，９２５，９００号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように実行することができ、方法は、ＣＲＩＳＰＲ法（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１）によってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣＲＩＳＰＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは減少させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣＲＩＳＰＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。

【１４８９】

ＣＲＩＳＰＲは、ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ　ｒｅｇｕｌａｒｌｙ　ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ　ｓｈｏｒｔ　ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ　ｒｅｐｅａｔｓ（クラスター化された定期的に間隔をあけた短いパリンドロミックリピート）の略語である。遺伝子編集のためにＣＲＩＳＰＲ系を使用する方法は、本明細書ではＣＲＩＳＰＲ法とも称される。ＲＮＡ及びＣａｓタンパク質を組み込み、かつ本発明に従って使用され得るＣＲＩＳＰＲ系には、３つの型：Ｉ型、ＩＩ型、及びＩＩＩ型がある。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ（Ｃａｓ９によって例示される）は、最もよく特徴付けられている系のうちの１つである。

【１４９０】

ＣＲＩＳＰＲ技術は、細菌及び古細菌（単細胞微生物のドメイン）の自然防御機構から適合された。これらの生物は、ＣＲＩＳＰＲ由来のＲＮＡ及びＣａｓ９を含む様々なＣａｓタンパク質を使用して、外来侵入物のＤＮＡを切り刻んで破壊することによって、ウイルス及び他の異物による攻撃を阻止する。ＣＲＩＳＰＲは、ヌクレオチド反復配列及びスペーサーの存在という２つの異なる特徴を有するＤＮＡの特殊な領域である。ヌクレオチドの反復配列は、ＣＲＩＳＰＲ領域全体に分布しており、外来ＤＮＡ（スペーサー）の短いセグメントが反復配列の間に散在している。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系では、スペーサーは、ＣＲＩＳＰＲゲノム遺伝子座内に組み込まれ、転写され、短いＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）に処理される。これらのｃｒＲＮＡは、トランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）にアニーリングし、Ｃａｓタンパク質による病原性ＤＮＡの配列特異的切断及びサイレンシングを指示する。Ｃａｓ９タンパク質による標的認識には、ｃｒＲＮＡ内の「シード」配列、及びｃｒＲＮＡ結合領域の上流にある保存されたジヌクレオチドを含むプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列が必要である。これにより、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系が再標的されて、ｃｒＲＮＡを再設計することにより、実質的にいずれのＤＮＡ配列も切断することができる。天然系におけるｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、遺伝子操作で使用するために、およそ１００ヌクレオチドの単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）に簡略化され得る。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼを発現するプラスミドと必要なｃｒＲＮＡ成分を同時送達することにより、ヒト細胞に直接運搬可能である。Ｃａｓタンパク質の異なるバリアント（例えば、Ｃｐｆ１などのＣａｓ９のオルソログ）を使用して、標的の制限を低減することができる。

【１４９１】

ＣＲＩＳＰＲ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが含まれる。

【１４９２】

ＣＲＩＳＰＲ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１が含まれる。

【１４９３】

ＣＲＩＳＰＲ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得る系、方法、及び組成物の例は、米国特許第８，６９７，３５９号、同第８，９９３，２３３号、同第８，７９５，９６５号、同第８，７７１，９４５号、同第８，８８９，３５６号、同第８，８６５，４０６号、同第８，９９９，６４１号、同第８，９４５，８３９号、同第８，９３２，８１４号、同第８，８７１，４４５号、同第８，９０６，６１６号、及び同第８，８９５，３０８号に記載されており、それらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１を発現するためのプラスミドなどのＣＲＩＳＰＲ法を行うための資源は、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔなどの企業から市販されている。

【１４９４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＴＩＬ集団の遺伝子修飾は、米国特許第９７９０４９０号に記載されているＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１系を使用して行うことができ、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１４９５】

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、Ｇｅｎ２）に従って、または米国特許出願公開第２０２０／０２９９６４４　Ａ１号及び同第２０２０／０１２１７１９　Ａ１号、ならびに米国特許第１０，９２５，９００号に記載されているように実行することができ、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれ、方法は、ＴＡＬＥ法によってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは減少させる。あるいは、ＴＩＬ拡張プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。

【１４９６】

ＴＡＬＥは、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）を含む、転写活性化因子様エフェクタータンパク質を表す。遺伝子編集のためにＴＡＬＥ系を使用する方法は、本明細書ではＴＡＬＥ法とも称され得る。ＴＡＬＥは、植物病原菌Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ属由来の天然に存在するタンパク質であり、各々単一の塩基対を認識する一連の３３～３５アミノ酸反復ドメインで構成されるＤＮＡ結合ドメインを含む。ＴＡＬＥ特異性は、反復可変二残基（ＲＶＤ）として知られる２つの超可変アミノ酸によって決定される。モジュラーＴＡＬＥ反復配列は、隣接するＤＮＡ配列を認識するために一緒に結合される。ＤＮＡ結合ドメイン内の特定のＲＶＤは、標的遺伝子座内の塩基を認識し、予測

可能なＤＮＡ結合ドメインを組み立てるための構造的特徴を提供する。ＴＡＬＥのＤＮＡ結合ドメインは、ＩＩＳ型ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼの触媒ドメインに融合して、標的可能なＴＡＬＥヌクレアーゼを作製する。部位特異的変異を誘導するために、１４～２０塩基対のスペーサー領域によって分離された２つの個々のＴＡＬＥＮアームがＦｏｋＩモノマーを密接に接近させて二量体化し、標的とされる二本鎖切断を産生する。

【１４９７】

様々な組み立て方法を利用したいくつかの大規模な系統的研究により、ＴＡＬＥ反復配列を組み合わせて、実質的にすべてのユーザ定義配列を認識することができることが示されている。カスタム設計されたＴＡＬＥアレイも、Ｃｅｌｌｅｃｔｉｓ Ｂｉｏｒｅｓｅａｒｃｈ（Ｐａｒｉｓ，Ｆｒａｎｃｅ）、Ｔｒａｎｓｐｏｓａｇｅｎ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ，ＫＹ，ＵＳＡ）、及びＬｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ，ＵＳＡ）から市販されている。本発明での使用に好適なＴＡＬＥ法及びＴＡＬＥＮ法は、米国特許公開第２０１１／０２０１１１８　Ａ１号、同第２０１３／０１１７８６９　Ａ１号、同第２０１３／０３１５８８４　Ａ１号、同第２０１５／０２０３８７１　Ａ１号、及び同第２０１６／０１２０９０６　Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１４９８】

ＴＡＬＥ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが含まれる。

【１４９９】

ＴＡＬＥ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１が含まれる。

【１５００】

ＴＡＬＥ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得る系、方法、及び組成物の例は、米国特許第８，５８６，５２６号に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【１５０１】

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態に従って、または米国特許出願公開第２０２０／０２９９６４４　Ａ１号及び同第２０２０／０１２１７１９　Ａ１号、ならびに米国特許第１０，９２５，９００号に記載されているように実行することができ、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれ、方法は、ジンクフィンガーまたはジンクフィンガーヌクレアーゼ法によってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは減少させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。

【１５０２】

個々のジンクフィンガーは、保存されたββα立体配置でおよそ３０個のアミノ酸を含む。αらせんの表面上のいくつかのアミノ酸は、典型的には、異なる選択性レベルでＤＮＡの主溝の３ｂｐと接触する。ジンクフィンガーは、２つのタンパク質ドメインを有する。第１のドメインは、ＤＮＡ結合ドメインであり、真核生物転写因子を含み、ジンクフィンガーを含む。第２のドメインは、ヌクレアーゼドメインであり、ＦｏｋＩ制限酵素を含み、ＤＮＡの触媒的切断を担っている。

【１５０３】

個々のＺＦＮのＤＮＡ結合ドメインは、典型的には、３～６個の個々のジンクフィンガー反復配列を含み、各々９～１８塩基対を認識することができる。ジンクフィンガードメインが目的の標的部位に特異的である場合、合計１８塩基対を認識する３フィンガーＺＦＮの対でさえ、理論的には、哺乳動物ゲノムの単一遺伝子座を標的とすることができる。新たなジンクフィンガーアレイを生成するための１つの方法は、既知の特異性を有するより小さいジンクフィンガー「モジュール」を組み合わせることである。最も一般的なモジュラーアセンブリプロセスは、各々３塩基対のＤＮＡ配列を認識することができる３つの別個のジンクフィンガーを組み合わせて、９塩基対の標的部位を認識することができる３フィンガーアレイを生成することを含む。代替的に、オリゴマー化プールエンジニアリング（ＯＰＥＮ）などの選択ベースのアプローチを使用して、隣接するフィンガー間のコンテキスト依存的相互作用を考慮したランダム化ライブラリーから新たなジンクフィンガーアレイを選択することができる。操作されたジンクフィンガーは、Ｓａｎｇａｍｏ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｒｉｃｈｍｏｎｄ，ＣＡ，ＵＳＡ）及びＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＵＳＡ）から市販されている。

【１５０４】

ジンクフィンガー法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが含まれる。

【１５０５】

ジンクフィンガー法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１が含まれる。

【１５０６】

ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得る系、方法、及び組成物の例は、米国特許第６，５３４，２６１号、同第６，６０７，８８２号、同第６，７４６，８３８号、同第６，７９４，１３６号、同第６，８２４，９７８号、同第６，８６６，９９７号、同第６，９３３，１１３号、同第６，９７９，５３９号、同第７，０１３，２１９号、同第７，０３０，２１５号、同第７，２２０，７１９号、同第７，２４１，５７３号、同第７，２４１，５７４号、同第７，５８５，８４９号、同第７，５９５，３７６号、同第６，９０３，１８５号、及び同第６，４７９，６２６号に記載されており、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。

【１５０７】

ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施

形態に従って使用され得る系、方法、及び組成物の他の例は、Ｂｅａｎｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１５，２３　１３８０－１３９０に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１５０８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、高親和性ＴＣＲ、例えば、ＭＡＧＥ－１、ＨＥＲ２、もしくはＮＹ－ＥＳＯ－１などの腫瘍関連抗原で標的とされるＴＣＲ、または腫瘍関連細胞表面分子（例えば、メソセリン）もしくは系統制限細胞表面分子（例えば、ＣＤ１９）に結合するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含むが、これらに限定されない追加の機能を含むように任意選択で遺伝子操作される。いくつかの実施形態では、遺伝子操作を用いて、ＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４またはＣＤ３９及びＣＤ６９をコードする遺伝子などの特定の標的遺伝子のノックアウトを含む、ＴＩＬを遺伝子編集することができる。ある特定の実施形態では、この方法は、高親和性ＴＣＲ、例えば、ＭＡＧＥ－１、ＨＥＲ２、もしくはＮＹ－ＥＳＯ－１などの腫瘍関連抗原で標的とされるＴＣＲ、または腫瘍関連細胞表面分子（例えば、メソセリン）もしくは系統制限細胞表面分子（例えば、ＣＤ１９）に結合するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含むようにＴＩＬ集団を遺伝子操作することを含む。適切には、ＴＩＬ集団は、本明細書に記載の第１の集団、第２の集団及び／または第３の集団であり得る。

【１５０９】

Ｅ．ＴＩＬ製造のための閉鎖系

本発明は、ＴＩＬ培養プロセス中に閉鎖系の使用を提供する。かかる閉鎖系は、微生物汚染の防止及び／または低減を可能にし、より少数のフラスコの使用を可能にし、コスト削減を可能にする。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、２つの容器を使用する。

【１５１０】

かかる閉鎖系は当該技術分野でよく知られており、例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｆｄａ．ｇｏｖ／ｃｂｅｒ／ｇｕｉｄｅｌｉｎｅｓ．ｈｔｍ及びｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｆｄａ．ｇｏｖ／ＢｉｏｌｏｇｉｃｓＢｌｏｏｄＶａｃｃｉｎｅｓ／ＧｕｉｄａｎｃｅＣｏｍｐｌｉａｎｃｅＲｅｇｕｌａｔｏｒｙＩｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ／Ｇｕｉｄａｎｃｅｓ／Ｂｌｏｏｄ／ｕｃｍ０７６７７９．ｈｔｍで見つけることができる。

【１５１１】

滅菌接続装置（ＳＴＣＤ）は、互換性のある２本の管間の滅菌溶接をもたらす。この手順により、様々な容器と管径との滅菌接続が可能になる。いくつかの実施形態では、閉鎖系には、実施例に記載のルアーロック系及びヒートシール系が含まれる。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、閉鎖系の無菌性及び閉鎖性を維持するために、滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、実施例に記載の閉鎖系が用いられる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、実施例において本明細書に記載される方法に従って、最終製品製剤容器に製剤化される。

【１５１２】

いくつかの実施形態では、閉鎖系は、腫瘍断片が得られてから、ＴＩＬを患者に投与するかまたは凍結保存する準備が整うまで、１つの容器を使用する。いくつかの実施形態では、２つの容器が使用される場合、第１の容器は密閉Ｇ容器であり、ＴＩＬ集団が遠心分離され、第１の密閉Ｇ容器を開かずに注入バッグに移される。いくつかの実施形態では、２つの容器が使用される場合、注入バッグは、ＨｙｐｏＴｈｅｒｍｏｓｏｌを含有する注入バッグである。閉鎖系または閉鎖ＴＩＬ細胞培養系は、腫瘍試料及び／または腫瘍断片が追加されると、系が外部からしっかりと密閉され、細菌、真菌、及び／またはいずれの他の微生物汚染も侵入しない閉鎖環境を形成することを特徴とする。

【１５１３】

いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％～約１００％である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％～約９５％である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％～約９０％である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約１０％～約９０％である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は

、約１５％～約８５％である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％、約１０％、約１５％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、約９７％、約９８％、約９９％、または約１００％である。

【１５１４】

閉鎖系は、微生物汚染の不在下で及び／または微生物汚染が大幅に低減された状態で、ＴＩＬの成長を可能にする。

【１５１５】

さらに、ＴＩＬ細胞培養環境のｐＨ、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧は各々、細胞が培養されるにつれて変化する。したがって、細胞培養に適切な培地を循環させても、ＴＩＬ増殖に最適な環境として閉鎖環境を常に一定に維持する必要がある。この目的のために、閉鎖環境の培養液中のｐＨ、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧の物理的要因がセンサーによって監視されること、そのシグナルが培養環境の入口に設置されたガス交換器を制御するために使用されること、及び閉鎖環境のガス分圧が細胞培養環境を最適化するように培養液の変化に応じてリアルタイムで調整されることが望ましい。いくつかの実施形態では、本発明は、閉鎖環境のｐＨ、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧を測定する監視装置を備えたガス交換器を閉鎖環境の入口に組み込み、かつ監視装置からのシグナルに基づいてガス濃度を自動的に調整することによって細胞培養環境を最適化する閉鎖細胞培養系を提供する。

【１５１６】

いくつかの実施形態では、閉鎖環境内の圧力は、連続的または断続的に制御される。すなわち、閉鎖環境内の圧力を、例えば、圧力維持装置によって変化させることができ、それ故に、空間が正圧状態でＴＩＬの成長に好適であることを確実にするか、または負圧状態で流体の浸出を促進し、ひいては細胞増殖を促進する。さらに、負圧を断続的に加えることにより、閉鎖環境内の体積の一時的な収縮によって、閉鎖環境内の循環液体を均一かつ効率的に置き換えることが可能である。

【１５１７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの増殖に最適な培養成分を置換または追加することができ、ＩＬ－２及び／またはＯＫＴ３などの因子、ならびに組み合わせを追加することができる。

【１５１８】

Ｆ．ＴＩＬの任意選択の凍結保存

バルクＴＩＬ集団（例えば、第２のＴＩＬ集団）または拡張されたＴＩＬ集団（例えば、第３のＴＩＬ集団）のいずれかを、任意選択で凍結保存することができる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、治療的ＴＩＬ集団に起こる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、第２の拡張後に採取されたＴＩＬに起こる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）の例示的なステップＦにおいてＴＩＬに起こる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、注入バッグ内で凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、注入バッグに入れる前に凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、凍結保存され、注入バッグに入っていない。いくつかの実施形態では、凍結保存は、凍結保存培地を使用して行われる。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含有する。これは、一般に、ＴＩＬ集団を凍結溶液、例えば、８５％補体不活性化ＡＢ血清及び１５％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に入れることによって達成される。溶液中の細胞が極低温バイアルに入れられ、－８０℃で２４時間保存され、任意選択で凍結保存のためにガス状窒素冷凍庫に移される。Ｓａｄｅｇｈｉ，ｅｔ ａｌ．，Ａｃｔａ Ｏｎｃｏｌｏｇｉｃａ ２０１３，５２，９７８－９８６を参照されたい。

【１５１９】

適切な場合、細胞が冷凍庫から取り出され、溶液のおよそ５分の４が解凍されるまで３

７℃の水浴中で解凍される。細胞は、一般に、完全培地中に再懸濁され、任意で１回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍されたＴＩＬは、当該技術分野で知られているように計数され、生存率について評価され得る。

【１５２０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、ＣＳ１０凍結保存培地（ＣｒｙｏＳｔｏｒ１０、ＢｉｏＬｉｆｅ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ）を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含有する凍結保存培地を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、１：１（体積：体積）比のＣＳ１０及び細胞培養培地を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、約１：１（体積：体積）比のＣＳ１０及び細胞培養培地を使用して凍結保存され、追加のＩＬ－２をさらに含む。

【１５２１】

上で考察されたように、また図１及び／または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に示されるステップＡ～Ｅで例示されるように、凍結保存は、ＴＩＬ拡張プロセス全体の様々な時点で起こり得る。いくつかの実施形態では、第１の拡張後の拡張されたＴＩＬ集団（例えば、ステップＢに従って提供される、または図１もしくは８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）のステップＤによる１回以上の第２の拡張後の拡張されたＴＩＬ集団を凍結保存することができる。凍結保存は、一般に、ＴＩＬ集団を凍結溶液、例えば、８５％補体不活性化ＡＢ血清及び１５％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に入れることによって達成され得る。溶液中の細胞が極低温バイアルに入れられ、－８０℃で２４時間保存され、任意選択で凍結保存のためにガス状窒素冷凍庫に移される。Ｓａｄｅｇｈｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｃｔａ　Ｏｎｃｏｌｏｇｉｃａ　２０１３，５２，９７８－９８６を参照されたい。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、５％ＤＭＳＯ中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、５％　ＤＭＳＯを加えた細胞培養培地中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、実施例６に提供される方法に従って凍結保存される。

【１５２２】

適切な場合、細胞が冷凍庫から取り出され、溶液のおよそ５分の４が解凍されるまで３７℃の水浴中で解凍される。細胞は、一般に、完全培地中に再懸濁され、任意で１回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍されたＴＩＬは、当該技術分野で知られているように計数され、生存率について評価され得る。

【１５２３】

場合によっては、図１または８からのステップＢ（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）ＴＩＬ集団は、以下に考察されるプロトコルを使用して、直ちに凍結保存され得る。代替的に、バルクＴＩＬ集団を、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）からのステップＣ及びステップＤに供し、その後、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）からのステップＤの後に凍結保存することができる。同様に、遺伝子修飾されたＴＩＬが治療法に使用される場合、図１または８からのステップＢまたはステップＤ（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）を、好適な治療のために遺伝子修飾に供することができる。

【１５２４】

Ｇ．拡張ＴＩＬの表現型特徴

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書及び実施例に記載されているものを含む、拡張後の多数の表現型マーカーの発現について分析される。いくつかの実施形態では、

１つ以上の表現型マーカーの発現が調べられる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）からのステップＢにおける第１の拡張後に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）からのステップＣにおける遷移中に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）からのステップＣによる移行中及び凍結保存後に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）からのステップＤによる第２の拡張後に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）からのステップＤによる２つ以上の拡張後に分析される。

【１５２５】

いくつかの実施形態では、マーカーは、ＣＤ８及びＣＤ２８からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＣＤ８の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、ＣＤ２８の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、ＣＤ８及び／またはＣＤ２８の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に提供される２Ａプロセスと比較して、現行の本発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、ＣＤ８の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば図８Ｂ）に提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に提供される２Ａプロセスと比較して、本発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、ＣＤ２８の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば図８Ａ）に提供される２Ａプロセスと比較して、本発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、高いＣＤ２８発現は、より若く、より持続的なＴＩＬ表現型を示す。いくつかの実施形態では、１つ以上の調節マーカーの発現が測定される。

【１５２６】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８及び／またはＣＤ２８に基づく第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、第３のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団の選択は、本明細書に記載の腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を拡張するための方法のいずれのステップ中にも行われない。

【１５２７】

いくつかの実施形態では、セントラルメモリー細胞のパーセンテージは、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば図８Ａ）に提供される２Ａプロセスと比較して、本発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、セントラルメモリー細胞のメモリーマーカーは、ＣＣＲ７及びＣＤ６２Ｌからなる群から選択される。

【１５２８】
いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬメモリーサブセットは、異なるメモリーサブセットに分類され得る。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、ナイーブ（ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＤ６２Ｌ＋）ＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、セントラルメモリー（ＣＭ、ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ６２Ｌ＋）ＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、エフェクターメモリー（ＥＭ、ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ６２Ｌ－）ＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、ＲＡ＋エフェクターメモリー／エフェクター（ＴＥＭＲＡ／ＴＥＦＦ、ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＤ６２Ｌ＋）ＴＩＬを含む。

【１５２９】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、グランザイムＢ、パーフォリン、及びグラニュライシンからなる群から選択されるもう１つのマーカーを発現する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、グランザイムＢを発現する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、パーフォリンを発現する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、グラニュライシンを発現する。

【１５３０】
いくつかの実施形態では、再刺激されたＴＩＬは、サイトカイン放出アッセイを使用して、サイトカイン放出についても評価され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、インターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）分泌について評価され得る。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、ＥＬＩＳＡアッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に提供されるように、ステップＤの後の急速な第２の拡張ステップの後のＥＬＩＳＡアッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの健康は、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）分泌によって測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、活性なＴＩＬを示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ産生の効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能の別の尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、ＣＤ３、ＣＤ２８、及びＣＤ１３７／４－１ＢＢに対する抗体で刺激されたＴＩＬの培地中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することによって測定され得る。これらの刺激されたＴＩＬからの培地中のＩＦＮ－γレベルは、ＩＦＮ－γ放出を測定することによって決定され得る。いくつかの実施形態では、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）ＴＩＬに提供されるようなＧｅｎ３プロセスのステップＤにおけるＩＦＮ－γ産生の増加は、例えば図８（特に、例えば図８Ａ）に提供される２Ａプロセスのステップと比較して、ステップＤ　ＴＩＬの細胞傷害能の増加を示している。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、３倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、４倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、５倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＥＬＩＳＡキットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、エクスビボでのＴＩＬ中で測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば図８Ｂの方法を含む、本発明の方法によって産生されたＴＩＬを含む、ＴＩＬにおいてエクスビボで測定される。

【１５３１】
いくつかの実施形態では、少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ

及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【１５３２】

いくつかの実施形態では、少なくとも１００ｐｇ／ｍＬ～約１０００ｐｇ／ｍＬ以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも２５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも３００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも３５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも４００ｐｇ／ｍＬ、 少なくとも４５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも５５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも６００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも６５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも７００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも７５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも８００ｐｇ／ｍＬ、 少なくとも８５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも９００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも９５０ｐｇ／ｍＬ、または少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬ以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、

例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１５，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少な

くとも２５，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３５，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４５，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【１５３３】

いくつかの実施形態では、少なくとも１００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも２５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも３００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも３５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも４００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも４５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも５５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも６００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも６５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも７００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも７５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも８００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも８５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも９００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも９５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、または少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及

び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／また

は図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１５，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２５，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３５，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４５，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【１５３４】

Ｔリンパ球及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、及びＣ（一定）は、免疫グロブリン及びＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって得られたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬ及び／または例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬ及び／または図８（特に、例えば図８Ａ）に例示されるようにＧｅｎ２と称される方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第１の拡張で取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態

では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセス（例えば、Ｇｅｎ３プロセス）は、他のプロセス、例えば、試料中の固有のペプチドＣＤＲの数に基づくＧｅｎ２と称されるプロセスと比較して、より高いクローン多様性を示す。

【１５３５】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの活性化及び疲弊は、１つ以上のマーカーを調べることによって決定され得る。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊は、多色フローサイトメトリーを使用して決定され得る。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊のマーカーには、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＣＤ３、ＰＤ－１、２Ｂ４／ＣＤ２４４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＢＴＬＡ、ＫＬＲＧ、ＴＩＭ－３、ＣＤ１９４／ＣＣＲ４、ＣＤ４、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ１８３、ＣＤ６９、ＣＤ９５、ＣＤ１２７、ＣＤ１０３、及び／またはＬＡＧ－３）からなる群から選択される１つ以上のマーカーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊のマーカーには、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＢＴＬＡ、ＣＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、Ｋｉ６７、ＬＡＧ－３、ＰＤ－１、ＴＩＧＩＴ、及び／またはＴＩＭ－３からなる群から選択される１つ以上のマーカーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊のマーカーには、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＢＴＬＡ、ＣＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、Ｋｉ６７、ＬＡＧ－３、ＣＤ１０３＋／ＣＤ６９＋、ＣＤ１０３＋／ＣＤ６９－、ＰＤ－１、ＴＩＧＩＴ、及び／またはＴＩＭ－３からなる群から選択される１つ以上のマーカーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞マーカー（活性化及び疲弊マーカーを含む）は、Ｔ細胞の活性化、阻害、または機能を調べるために決定及び／または分析され得る。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞マーカーには、ＣＤ３９、ＣＤ６９、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ３、ＦｏｘＰ３、Ｔｉｍ－３、ＰＤ－１、ＣＤ１０３、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＢＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、Ｋｉ６７、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ４５、ＣＤ４、及び／またはＣＤ５９からなる群から選択される１つ以上のマーカーが含まれ得るが、これらに限定されない。

【１５３６】

いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ～３００００ｐｇ／１０^{6}以上のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１１０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１６０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２２０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２４０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２６０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２８０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、３００００００ｐｇ／１０^{6}以上のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ

及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１１０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及

び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ～３０００００ｐｇ／１０^{6}以上のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１１０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、３０００００ｐｇ／１０^{6}以上のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例え

ば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１１０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、６０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌

を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【１５３７】

いくつかの実施形態では、１０００ｐｇ／ｍＬ超～３０００００ｐｇ／ｍＬ以上のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００ｐｇ／ｍＬ超、２０００ｐｇ／ｍＬ超、３０００ｐｇ／ｍＬ超、４０００ｐｇ／ｍＬ超、５０００ｐｇ／ｍＬ超、６０００ｐｇ／ｍＬ超、７０００ｐｇ／ｍＬ超、８０００ｐｇ／ｍＬ超、９０００ｐｇ／ｍＬ超、１００００ｐｇ／ｍＬ超、２００００ｐｇ／ｍＬ超、３００００ｐｇ／ｍＬ超、４００００ｐｇ／ｍＬ超、５００００ｐｇ／ｍＬ超、６００００ｐｇ／ｍＬ超、７００００ｐｇ／ｍＬ超、８００００ｐｇ／ｍＬ超、９００００ｐｇ／ｍＬ超、１０００００ｐｇ／ｍＬ以上のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／ｍＬ超の

グランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、４０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、５０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、６０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、７０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、８０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、９０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、４００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、５００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、６００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、７００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、８００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、９００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張

方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１２０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１４０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１６０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１８０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２２０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２４０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２６０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２８０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【１５３８】

いくつかの実施形態では、本発明の拡張方法は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇに提供されるようなＴＩＬを含む、インビトロで増加したグランザイムＢ分泌を示す拡張されたＴＩＬ集団を産生する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも１倍～５０倍以上増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、１倍、少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、少なくとも９倍、少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも３０倍、少なくとも４０倍、少なくとも５０倍以上増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも１倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張された

ＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも２倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも３倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも４倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも５倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも６倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも７倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも８倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも９倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも１０倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも２０倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも３０倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも４０倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも５０倍増加する。

【１５３９】

いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上低いレベルのＴＮＦ－α（すなわち、ＴＮＦ－アルファ）分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも１倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも２倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも３倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも４倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも５倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【１５４０】

いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α（すなわち、ＴＮＦ－アルファ）分泌が可能な

ＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【１５４１】

いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ及びグランザイムＢのレベルを測定して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬの表現型特徴を決定する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ及びＴＮＦ－αのレベルを測定して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本

発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬの表現型特徴を決定する。いくつかの実施形態では、グランザイムＢ及びＴＮＦ－αのレベルを測定して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬの表現型特徴を決定する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ、グランザイムＢ及びＴＮＦ－αのレベルを測定して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬの表現型特徴を決定する。

【１５４２】

いくつかの実施形態では、表現型特徴付けは、凍結保存後に調べられる。

【１５４３】

Ｈ．追加のプロセスの実施形態

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、（ａ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得し、第１のＴＩＬ集団からＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団を分離することと、（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中でＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行うことであって、プライミングによる第１の拡張を約１～７日間または約１～８日間行って第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬよりも多い、プライミングによる第１の拡張を行うことと、（ｃ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が約１～１１日間または約１～１０日間行われて第３のＴＩＬ集団が取得され、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間、または約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移すこととによって、培養のスケールアップを達成し、第２の容器内で、小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団が、より大規模な培養で約４～７日間、または約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、第２の小規模培養で約４～７日間、または約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間、または約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で

約４～７日間、または約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約５～７日間培養される。

【１５４４】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、（ａ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得し、第１のＴＩＬ集団からＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団を分離することと、（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中でＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行うことであって、プライミングによる第１の拡張が約１～８日間行われて第２のＴＩＬ集団が取得され、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、プライミングによる第１の拡張を行うことと、（ｃ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が約１～８日間行われて第３のＴＩＬ集団が取得され、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移すこととによって、培養のスケールアップを達成し、第２の容器内で、小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団が、より大規模な培養で約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、第２の小規模培養で約４～６日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約４～６日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模

培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約４～５日間培養される。

【１５４５】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、（ａ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得し、第１のＴＩＬ集団からＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団を分離することと、（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中でＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行うことであって、プライミングによる第１の拡張が約１～７日間行われて第２のＴＩＬ集団が取得され、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、プライミングによる第１の拡張を行うことと、（ｃ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が約１～１１日間行われて第３のＴＩＬ集団が取得され、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移すこととによって、培養のスケールアップを達成し、第２の容器内で、小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、第２の小規模培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　ｇ５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養

で約５日間培養される。
【１５４６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団を、外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）をさらに含む培養培地と接触させることによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）における培養培地中のＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）における培養培地中のＡＰＣの数よりも多い、方法を提供する。
【１５４７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において培養培地に追加の外因性ＡＰＣが補充されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５４８】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２０：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５４９】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５５０】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約９：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５５１】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約８：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５５２】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約７：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５５３】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約６：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５５４】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５５５】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～

正確にまたは約４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５５６】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５５７】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５５８】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５５９】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５６０】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５６１】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５６２】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５６３】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５６４】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５６５】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～

正確にまたは約２．１：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５６６】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５６７】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５６８】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５６９】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５７０】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５７１】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５７２】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５７３】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５７４】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５７５】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確

にまたは約２．５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５７６】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５７７】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５７８】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５７９】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５８０】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１になるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５８１】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．１：１、２．２：１、２．３：１、２．４：１、２．５：１、２．６：１、２．７：１、２．８：１、２．９：１、３：１、３．１：１、３．２：１、３．３：１、３．４：１、３．５：１、３．６：１、３．７：１、３．８：１、３．９：１、４：１、４．１：１、４．２：１、４．３：１、４．４：１、４．５：１、４．６：１、４．７：１、４．８：１、４．９：１、または５：１になるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５８２】

他の実施形態では、本発明は、一次の第１の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約1×10^{8}、1.1×10^{8}、1.2×10^{8}、1.3×10^{8}、1.4×10^{8}、1.5×10^{8}、1.6×10^{8}、1.7×10^{8}、1.8×10^{8}、1.9×10^{8}、2×10^{8}、2.1×10^{8}、2.2×10^{8}、2.3×10^{8}、2.4×10^{8}、2.5×10^{8}、2.6×10^{8}、2.7×10^{8}、2.8×10^{8}、2.9×10^{8}、3×10^{8}、3.1×10^{8}、3.2×10^{8}、3.3×10^{8}、3.4×10^{8}、または3.5×10^{8}ＡＰＣになるように、かつ急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約3.5×10^{8}、3.6×10^{8}、3.7×10^{8}、3.8×10^{8}、3.9×10^{8}、4×10^{8}、4.1×10^{8}、4.2×10^{8}、4.3×10^{8}、4.4×10^{8}、4.5×10^{8}、4.6×10^{8}、4.7×10^{8}、4.8×10^{8}、4.9×10^{8}、5×10^{8}、5.1×10^{8}、5.2×10^{8}、5.3×10^{8}、5.4×10^{8}、5.5×10^{8}、5.6×10^{8}、5.7×10^{8}、5.8×10^{8}、5.9×10^{8}、6×10^{8}、6.1×10^{8}、6.2×10^{8}、6.3×10^{8}、6

．４×１０^{8}、６．５×１０^{8}、６．６×１０^{8}、６．７×１０^{8}、６．８×１０^{8}、６．９×１０^{8}、７×１０^{8}、７．１×１０^{8}、７．２×１０^{8}、７．３×１０^{8}、７．４×１０^{8}、７．５×１０^{8}、７．６×１０^{8}、７．７×１０^{8}、７．８×１０^{8}、７．９×１０^{8}、８×１０^{8}、８．１×１０^{8}、８．２×１０^{8}、８．３×１０^{8}、８．４×１０^{8}、８．５×１０^{8}、８．６×１０^{8}、８．７×１０^{8}、８．８×１０^{8}、８．９×１０^{8}、９×１０^{8}、９．１×１０^{8}、９．２×１０^{8}、９．３×１０^{8}、９．４×１０^{8}、９．５×１０^{8}、９．６×１０^{8}、９．７×１０^{8}、９．８×１０^{8}、９．９×１０^{8}、または１×１０^{9}ＡＰＣになるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５８３】

他の実施形態では、本発明は、一次の第１の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約１×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約３．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約３．５×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約１×１０^{9}ＡＰＣの範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５８４】

他の実施形態では、本発明は、一次の第１の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約１．５×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約３×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約４×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約７．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５８５】

他の実施形態では、本発明は、一次の第１の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約２×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約２．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約４．５×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約５．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５８６】

他の実施形態では、本発明は、正確にまたは約２．５×１０^{8}ＡＰＣが一次の第１の拡張に追加され、かつ正確にまたは約５×１０^{8}ＡＰＣが急速な第２の増殖に追加されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５８７】

他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５８８】

他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍断片が複数の別個の容器に分配され、それらの別個の容器の各々内で、第１のＴＩＬ集団がステップ（ａ）において取得され、第２のＴＩＬ集団がステップ（ｂ）において取得され、第３のＴＩＬ集団がステップ（ｃ）において取得され、ステップ（ｃ）における複数の容器からの治療的ＴＩＬ集団が組み合わせられて、ステップ（ｄ）からの採取されたＴＩＬ集団を産生するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５８９】

他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍が複数の別個の容器に均一に分配されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５９０】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が少なくとも２個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５９１】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～２０個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５９２】
他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～１５個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５９３】
他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～１０個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５９４】
他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～５個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５９５】
他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５９６】
他の実施形態では、本発明は、プライミングによる第１の拡張がステップ（ｂ）において第１のＴＩＬ集団で行われる各容器の場合、ステップ（ｃ）における急速な第２の拡張が、同じ容器内でかかる第１のＴＩＬ集団から産生された第２のＴＩＬ集団で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５９７】
他の実施形態では、本発明は、別個の容器の各々が第１のガス透過性表面積を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５９８】
他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍断片が単一の容器に分配されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５９９】
他の実施形態では、本発明は、単一の容器が第１のガス透過性表面積を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６００】
他の実施形態では、本発明は、ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、プライミングによる第１の拡張が、ステップ（ｂ）において、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団上で行われる各容器について、ステップ（ｃ）における急速な第２の拡張が、同じ容器内でかかるＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団から産生される第２のＴＩＬ集団上で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６０１】
いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１細胞層～正確にまたは約３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化される、方法を提供する。
【１６０２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１．５細胞層～正確にまたは約２．５細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６０３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約２細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６０４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６０５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３細胞層～正確にまたは約１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６０６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６０７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６０８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６０９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む第１の容器内で行われ、ステップ（ｃ）において、急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む第２の容器内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６１０】

他の実施形態では、本発明は、第２の容器が第１の容器よりも大きいように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６１１】

他の実施形態では、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１細胞層～正確にまたは約３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化される、方法を提供する。

【１６１２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１．５細胞層～正確にまたは約２．５細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６１３】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約２細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６１４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６１５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３細胞層～正確にまたは約１０細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６１６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６１７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６１８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６１９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む第１の容器内で行われ、ステップ（ｃ）において、急速な第２の拡張が、第１の容器内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６２０】
他の実施形態では、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１細胞層～正確にまたは約３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化される、方法を提供する。
【１６２１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１．５細胞層～正確にまたは約２．５細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６２２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約２

細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６２３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６２４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３細胞層～正確にまたは約１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６２５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６２６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６２７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６２８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：１０の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６２９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：９の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６３０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣ

の数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：８の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６３１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：７の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６３２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：６の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６３３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：５の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６３４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：４の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６３５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：３の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６３６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．

１～正確にまたは約１：２の範囲から選択される、方法を提供する。
【１６３７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．２～正確にまたは約１：８の範囲から選択される、方法を提供する。
【１６３８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．３～正確にまたは約１：７の範囲から選択される、方法を提供する。
【１６３９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．４～正確にまたは約１：６の範囲から選択される、方法を提供する。
【１６４０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．５～正確にまたは約１：５の範囲から選択される、方法を提供する。
【１６４１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．６～正確にまたは約１：４の範囲から選択される、方法を提供する。
【１６４２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．７～正確にまたは約１：３．５の範囲から選択される、方法を提供する。
【１６４３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．８～正確にまたは約１：３の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６４４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．９～正確にまたは約１：２．５の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６４５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：２の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６４６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１、１：１．２、１：１．３、１：１．４、１：１．５、１：１．６、１：１．７、１：１．８、１：１．９、１：２、１：２．１、１：２．２、１：２．３、１：２．４、１：２．５、１：２．６、１：２．７、１：２．８、１：２．９、１：３、１：３．１、１：３．２、１：３．３、１：３．４、１：３．５、１：３．６、１：３．７、１：３．８、１：３．９、１：４、１：４．１、１：４．２、１：４．３、１：４．４、１：４．５、１：４．６、１：４．７、１：４．８、１：４．９、１：５、１：５．１、１：５．２、１：５．３、１：５．４、１：５．５、１：５．６、１：５．７、１：５．８、１：５．９、１：６、１：６．１、１：６．２、１：６．３、１：６．４、１：６．５、１：６．６、１：６．７、１：６．８、１：６．９、１：７、１：７．１、１：７．２、１：７．３、１：７．４、１：７．５、１：７．６、１：７．７、１：７．８、１：７．９、１：８、１：８．１、１：８．２、１：８．３、１：８．４、１：８．５、１：８．６、１：８．７、１：８．８、１：８．９、１：９、１：９．１、１：９．２、１：９．３、１：９．４、１：９．５、１：９．６、１：９．７、１：９．８、１：９．９、または１：１０から選択される、方法を提供する。

【１６４７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（

ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：１０の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６４８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：９の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６４９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：８の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６５０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＴＩＬ集団を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：７の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６５１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：６の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６５２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：５の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６５３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）

において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：４の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６５４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：３の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６５５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：２の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６５６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．２～正確にまたは約１：８の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６５７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．３～正確にまたは約１：７の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６５８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．４～正確にまたは約１：６の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６５９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細

胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．５～正確にまたは約１：５の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６６０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．６～正確にまたは約１：４の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６６１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．７～正確にまたは約１：３．５の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６６２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．８～正確にまたは約１：３の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６６３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．９～正確にまたは約１：２．５の範囲から選択される、方法を提供する。

【１６６４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：２の範囲から選択される、方

法を提供する。
【１６６５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１、１：１．２、１：１．３、１：１．４、１：１．５、１：１．６、１：１．７、１：１．８、１：１．９、１：２、１：２．１、１：２．２、１：２．３、１：２．４、１：２．５、１：２．６、１：２．７、１：２．８、１：２．９、１：３、１：３．１、１：３．２、１：３．３、１：３．４、１：３．５、１：３．６、１：３．７、１：３．８、１：３．９、１：４、１：４．１、１：４．２、１：４．３、１：４．４、１：４．５、１：４．６、１：４．７、１：４．８、１：４．９、１：５、１：５．１、１：５．２、１：５．３、１：５．４、１：５．５、１：５．６、１：５．７、１：５．８、１：５．９、１：６、１：６．１、１：６．２、１：６．３、１：６．４、１：６．５、１：６．６、１：６．７、１：６．８、１：６．９、１：７、１：７．１、１：７．２、１：７．３、１：７．４、１：７．５、１：７．６、１：７．７、１：７．８、１：７．９、１：８、１：８．１、１：８．２、１：８．３、１：８．４、１：８．５、１：８．６、１：８．７、１：８．８、１：８．９、１：９、１：９．１、１：９．２、１：９．３、１：９．４、１：９．５、１：９．６、１：９．７、１：９．８、１：９．９、または１：１０から選択される、方法を提供する。
【１６６６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数に対する比が、正確にまたは約５０：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６６７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数に対する比が、正確にまたは約２５：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６６８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数に対する比が、正確にまたは約２０：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６６９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数に対する比が、正確にまたは約１０：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６７０】
他の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団の数が、第１のＴＩＬ集団よりも少なくとも正確にまたは約５０倍多いように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６７１】
他の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団の数が、第１のＴＩＬ集団よりも少なくとも正確にまたは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、または５０倍多いように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６７２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第２の期間の開始の正確にまたは約２日または正確にまたは約３日後に、細胞培養培地に追加のＩＬ－２が補充されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６７３】
他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｄ）において採取されたＴＩＬ集団を凍結保存するステップをさらに含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６７４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）の後に、（ｅ）ステップ（ｄ）から採取したＴＩＬ集団を、任意選択でＨｙｐｏＴｈｅｒｍｏｓｏｌを含有する注入バッグに移す追加のステップを行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６７５】
他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｅ）において採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６７６】
他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスが、１：１の採取されたＴＩＬ集団の凍結保存培地に対する比を使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６７７】
他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６７８】
他の実施形態では、本発明は、ＰＢＭＣが放射線照射され、かつ同種異系であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６７９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において細胞培養に追加されるＡＰＣの総数が2.5×10^{8}であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６８０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において細胞培養に追加されるＡＰＣの総数が5×10^{8}であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６８１】
他の実施形態では、本発明は、ＡＰＣがＰＢＭＣであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６８２】
他の実施形態では、本発明は、ＰＢＭＣが放射線照射され、かつ同種異系であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６８３】
他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が人工抗原提示細胞であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６８４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）での採取が膜ベースの細胞処理系を使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６８５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）での採取がＬＯＶＯ細胞処理系を使用し

て行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６８６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６８７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約１０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６８８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約１５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６８９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約２０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６９０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約２５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６９１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約３０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６９２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約３５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６９３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約４０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６９４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約４５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６９５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約５０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６９６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、または６０個の断片（複数可）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１６９７】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２７ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６９８】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２０ｍｍ^3～正確にまたは約５０ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１６９９】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２１ｍｍ^3～正確にまたは約３０ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７００】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２２ｍｍ^3～正確にまたは約２９．５ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７０１】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２３ｍｍ^3～正確にまたは約２９ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７０２】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２４ｍｍ^3～正確にまたは約２８．５ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７０３】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２５ｍｍ^3～正確にまたは約２８ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７０４】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２６．５ｍｍ^3～正確にまたは約２７．５ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７０５】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、または５０ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７０６】
他の実施形態では、本発明は、複数の断片が正確にまたは約３０～正確にまたは約６０個の断片を含み、正確にまたは約１３００ｍｍ^3～正確にまたは約１５００ｍｍ^{3}の総体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７０７】
他の実施形態では、本発明は、複数の断片が正確にまたは約５０個の断片を含み、正確にまたは約１３５０ｍｍ^{3}の総体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７０８】
他の実施形態では、本発明は、複数の断片が正確にまたは約５０個の断片を含み、正確にまたは約１グラム～正確にまたは約１．５グラムの総質量を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７０９】
他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地がＧ容器またはＸｕｒｉセルバッグである容器内に提供されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７１０】
他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地中のＩＬ－２濃度が約１０，０００ＩＵ／ｍＬ～約５０００ＩＵ／ｍＬであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７１１】
他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地中のＩＬ－２濃度が約６，０００ＩＵ／ｍＬであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７１２】
他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地がジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７１３】
他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地が７％～１０％ＤＭＳＯを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７１４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）における第１の期間が正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日の期間内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７１５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第２の期間が正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７１６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）における第１の期間及びステップ（ｃ）における第２の期間が各々、正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日の期間内に個別に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７１７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）における第１の期間及びステップ（ｃ）における第２の期間が各々、正確にまたは約５日、６日、または７日の期間内に個別に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７１８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）における第１の期間及びステップ（ｃ）における第２の期間が各々、正確にまたは約７日の期間内に個別に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７１９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７２０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７２１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１６日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７２２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１７日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７２３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日～正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７２４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日～正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７２５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１６日～正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７２６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日～正確にまたは約１６日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７２７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日～正確にまたは約１６日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７２８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７２９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７３０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１６日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７３１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７３２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７３３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法

を提供する。
【１７３４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７３５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１６日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７３６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１８日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７３７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）で採取された治療的ＴＩＬ集団が、ＴＩＬの治療上有効な投与量に十分なＴＩＬを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７３８】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量に十分なＴＩＬの数が、正確にまたは約２．３×１０^{10}～正確にまたは約１３．７×１０^{10}であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７３９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７４０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍～５倍以上のインターフェロンガンマ産生を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７４１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍～５倍以上のインターフェロンガンマ産生を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７４２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍～５倍以上のインターフェロンガンマ産生を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７４３】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）の第３のＴＩＬ集団から取得されたエフェクターＴ細胞及び／またはセントラルメモリーＴ細胞が、ステップ（ｂ）の第２の細胞集団から取得されたエフェクターＴ細胞及び／またはセントラルメモリーＴ細胞と比較して増加したＣＤ８及びＣＤ２８発現を示すように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７４４】
他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器が密閉容器であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７４５】
他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧ容器であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７４６】
他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧＲＥＸ－１０であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７４７】
他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧＲＥＸ－１００であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７４８】
他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧＲＥＸ－５００であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７４９】
他の実施形態では、本発明は、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法によって作製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供する。
【１７５０】
他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）またはＯＫＴ３を添加せずに第１のＴＩＬ拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。
【１７５１】
他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）を添加せずに第１のＴＩＬ拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。
【１７５２】
他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、ＯＫＴ３を添加せずに第１のＴＩＬ拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。
【１７５３】
他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）を添加せず、かつＯＫＴ３を添加せずに第１のＴＩＬ拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。
【１７５４】
他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、１６日より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。
【１７５５】
他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、１７日より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。
【１７５６】
他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩ

Ｌ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、１８日より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。

【１７５７】

他の実施形態では、本発明は、増加したインターフェロンガンマ産生を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【１７５８】

他の実施形態では、本発明は、増加したポリクローン性を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載された治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【１７５９】

他の実施形態では、本発明は、増加した有効性を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【１７６０】

他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に示されているように）、本明細書に記載の拡張プロセスに起因する少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【１７６１】

他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に示されているように）、本明細書に記載の拡張プロセスに起因する少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【１７６２】

他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ

産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に示されているように）、本明細書に記載の拡張プロセスに起因する少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【１７６３】

他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）を添加せずに第１のＴＩＬ拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に示されているように）、本明細書に記載の拡張プロセスに起因する少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【１７６４】

他の実施形態では、本発明は、ＯＫＴ３を添加せずに第１のＴＩＬ拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に示されているように）、本明細書に記載の拡張プロセスに起因する少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【１７６５】

他の実施形態では、本発明は、ＡＰＣを添加せずに第１のＴＩＬ拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に示されているように）、本明細書に記載の拡張プロセスに起因する少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【１７６６】

他の実施形態では、本発明は、ＯＫＴ３を添加せずに第１のＴＩＬ拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に示されているように）、本明細書に記載の拡張プロセスに起因する少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【１７６７】

他の実施形態では、本発明は、ＡＰＣを添加せずに第１のＴＩＬ拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例え

ば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に示されているように）、本明細書に記載の拡張プロセスに起因する少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【１７６８】

他の実施形態では、本発明は、ＯＫＴ３を添加せずに第１のＴＩＬ拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に示されているように）、本明細書に記載の拡張プロセスに起因する少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【１７６９】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が、小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物であるように修正された、上記の該当する前の段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【１７７０】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片がコア生検であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７７１】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が細針吸引物であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７７２】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が小生検（例えば、パンチ生検を含む）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７７３】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片がコア針生検であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７７４】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から第１のＴＩＬ集団を得ることを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、約８日間にわたってプライミングによる第１の拡張を行うことを含み、かつ（ｉｖ）方法が、約１１日間にわたって急速な第２の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【１７７５】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から第１のＴＩＬ集団を得ることを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、約８日間にわたってプライミングによる第１の拡張を行うことを含み、かつ（ｉｖ）方法が、第２のＴＩＬ集団の培養物を約５日間培養し、培養物を最大５つの継代培養物に分割し、かつ継代培養物を約６日間培養することによって、急速な第２の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、最大５

つの継代培養物が各々、第２のＴＩＬ集団の培養が急速な第２の拡張で開始される容器と同じサイズのまたはそれよりも大きい容器内で培養される。前述の実施形態のうちのいくつかでは、第２のＴＩＬ集団の培養物は、最大５つの継代培養物間で均等に分けられる。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【１７７６】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７７７】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７７８】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７７９】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７８０】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７８１】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７８２】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７８３】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７８４】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１７８５】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれか

に記載の方法を提供する。
【１７８６】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７８７】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７８８】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７８９】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７９０】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７９１】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７９２】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７９３】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７９４】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７９５】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１７９６】
他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア生検から第１のＴＩＬ集団を得ることを含み、（ｉｉ）方法が、第１のＴＩＬ集団からＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団を分離するステップを行う前に、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間

培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{ＬＯ}／ＣＤ６９^{ＬＯ}ＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む培養培地中で約８日間培養することによってプライミングによる第１の拡張ステップを行い、第２のＴＩＬ集団を得ることを含み、かつ（ｉｖ）方法が、第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む培養培地中で約１１日間培養することによって急速な第２の拡張ステップを行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【１７９７】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア生検から第１のＴＩＬ集団を取得することを含み、（ｉｉ）方法が、第１のＴＩＬ集団からＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{ＬＯ}／ＣＤ６９^{ＬＯ}ＴＩＬ集団を分離するステップを行う前に、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{ＬＯ}／ＣＤ６９^{ＬＯ}ＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む培養培地中で約８日間培養することによってプライミングによる第１の拡張ステップを行い、第２のＴＩＬ集団を取得することを含み、かつ（ｉｖ）方法が、第２のＴＩＬ集団の培養物を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む培養培地中で約５日間培養し、培養物を最大５つの継代培養物に分割し、かつ継代培養物の各々を、ＩＬ－２を含む培養培地中で約６日間培養することによって、急速な第２の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、最大５つの継代培養物が各々、第２のＴＩＬ集団の培養が急速な第２の拡張で開始される容器と同じサイズのまたはそれよりも大きい容器内で培養される。前述の実施形態のうちのいくつかでは、第２のＴＩＬ集団の培養物は、最大５つの継代培養物間で均等に分けられる。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【１７９８】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア生検から第１のＴＩＬ集団を取得することを含み、（ｉｉ）方法が、第１のＴＩＬ集団からＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{ＬＯ}／ＣＤ６９^{ＬＯ}ＴＩＬ集団を分離するステップを行う前に、Ｇ－ＲＥＸ－１００Ｍフラスコ内の０．５ＬのＣＭ１培養培地中６０００ＩＵ　ＩＬ－２／ｍＬを含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、６０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬ　ＯＫＴ－３、及び約１０^{8}個のフィーダー細胞を含む０．５ＬのＣＭ１培養培地を、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{ＬＯ}／ＣＤ６９^{ＬＯ}ＴＩＬ集団に添加し、約８日間培養することによって、プライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することを含み、かつ（ｉｖ）方法が、（ａ）第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬ　ＯＫＴ－３、及び５×１０^{9}個のフィーダー細胞を有する５ＬのＣＭ^{2}培養培地を含むＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳフラスコに移し、約５日間培養し、（ｂ）１０^{9}個のＴＩＬを、３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２を有する５ＬのＡＩＭ－Ｖ培地を含む最大５つのＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳフラスコの各々に移すことによって培養物を最大５つの継代培養物に分割し、継代培養物を約６日間培養することによって、急速な第２の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【１７９９】

いくつかの実施形態では、本発明は、（ａ）対象から腫瘍試料を取得するステップの後で、（ｉ）腫瘍試料中のバルクＴＩＬ、または第１のＴＩＬ集団が、ＩＬ－２を含有する細胞培養培地中で培養されて、腫瘍断片または試料から出るＴＩＬを産生する、（ｉｉ）腫瘍断片または試料から出る少なくとも複数のＴＩＬが、／腫瘍断片または試料から分離

して、腫瘍断片または試料、腫瘍断片または試料中に残存するＴＩＬ、及び腫瘍断片または試料から出て、分離後に残存する任意のＴＩＬの混合物を産生する、（ｉｉｉ）腫瘍断片または試料、腫瘍断片または試料中に残存するＴＩＬ、及び腫瘍断片または試料から出て、分離後に残存する任意のＴＩＬの混合物を消化して、かかる混合物の消化物を産生する、及び（ｉｖ）ＴＩＬのＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団が、かかる混合物の消化物から分離されるように、（ｂ）プライミングの第１の拡張が、ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／またはＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}ＴＩＬ集団を培養することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍断片または試料から出るＴＩＬの少なくとも約１％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％以上が、腫瘍断片または試料から分離されて、混合物を産生する。

【１８００】

いくつかの実施形態では、本発明は、プライミングによる第１の拡張前の培養ステップが、約１日～約３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８０１】

いくつかの実施形態では、本発明は、プライミングによる第１の拡張前の培養ステップが、約１、２、３、４、５、６または７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８０２】

いくつかの実施形態では、本発明は、ＰＤ－１事前選択ステップ前の培養ステップが、約１日～約３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８０３】

いくつかの実施形態では、本発明は、ＰＤ－１事前選択ステップ前の培養ステップが、約１、２、３、４、５、６または７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８０４】

いくつかの実施形態では、本発明は、ＣＤ３９及びＣＤ６９事前選択前の培養ステップが、約１日～約３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８０５】

いくつかの実施形態では、本発明は、ＣＤ３９及びＣＤ６９事前選択ステップ前の培養ステップが、約１、２、３、４、５、６または７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８０６】

他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞を拡張する方法であって、（ａ）第１のＴ細胞集団を培養することによってドナーから取得された第１のＴ細胞集団のプライミングによる第１の拡張を行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、（ｂ）ステップ（ａ）においてプライミングされた第１のＴ細胞集団の活性化が減衰し始めた後、第１のＴ細胞集団を培養することによって第１のＴ細胞集団の急速な第２の拡張を行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、（ｃ）第２のＴ細胞集団を採取することと、を含む、Ｔ細胞を拡張する方法を提供する。他の実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養での第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来の第１のＴ細胞集

団を、第２の容器内でのより大規模な培養で約４～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。他の実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、第２の小規模培養で約４～７日間培養される。他の実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。他の実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約５日間培養される。

【１８０７】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養での第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第２の容器内でのより大規模な培養で約５～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８０８】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、第２の小規模培養で約５～７日間培養される。

【１８０９】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１

７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約５～７日間培養される。

【１８１０】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約５～６日間培養される。

【１８１１】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約５日間培養される。

【１８１２】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約６日間培養される。

【１８１３】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約７日間培養される。

【１８１４】

他の実施形態では、本発明は、プライミングによる第１の拡張ステップが最大７日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８１５】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張ステップが最大８日の期間中に行われ

るように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８１６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８１７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大１０日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８１８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大１１日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８１９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が７日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８２０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が７日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大１０日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８２１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が７日または８日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８２２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が７日または８日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大１０日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８２３】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が８日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８２４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が８日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大８日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８２５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団がＯＫＴ－３及びＩＬ－２を含む第１の培養培地中で培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８２６】
他の実施形態では、本発明は、第１の培養培地が４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３及びＩＬ－２を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方

法を提供する。
【１８２７】
他の実施形態では、本発明は、第１の培養培地がＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８２８】
他の実施形態では、本発明は、第１の培養培地が４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８２９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団がＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の培養培地中で培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８３０】
他の実施形態では、本発明は、第２の培養培地が４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８３１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地中で培養され（ここで、第１の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団が、第１のＡＰＣ集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８３２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地中で培養され（ここで、第１の培養培地が、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団が、第１のＡＰＣ集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８３３】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地中で培養され（ここで、第１の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地が、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団が、第１のＡＰＣ集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８３４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地中で培養され（ここで、第１の培養培地が、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地が、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団が、第１のＡＰＣ集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８３５】
他の実施形態では、本発明は、第２のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数の、第１のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数に対する比が約２：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８３６】
他の実施形態では、本発明は、第１のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数が約２．５×１０^{8}であり、第２のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数が約５×１０^{8}であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８３７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が、２層のＡＰＣの平均厚さで第１のガス透過性表面上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８３８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が、４～８層のＡＰＣから選択される平均厚さで第１のガス透過性表面上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８３９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において第１のガス透過性表面上に層状化されたＡＰＣの平均層数の、ステップ（ａ）において第１のガス透過性表面上に層状化されたＡＰＣの平均層数に対する比が、２：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８４０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が約１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８４１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８４２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約３．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８４３】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種されるように

修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８４４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８４５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約６．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８４６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８４７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８４８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８４９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約６．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８５０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８５１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８５２】

他の実施形態では、本発明は、ＡＰＣが末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８５３】
他の実施形態では、本発明は、ＰＢＭＣが放射線照射され、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８５４】
他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞が腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８５５】
他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞が骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８５６】
他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞が末梢血リンパ球（ＰＢＬ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８５７】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団がドナーの全血からの分離によって取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８５８】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団がドナーのアフェレーシス産物からの分離によって取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８５９】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、Ｔ細胞表現型の正または負の選択によってドナーの全血またはアフェレーシス産物から分離されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８６０】
他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞表現型がＣＤ３＋及びＣＤ４５＋であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８６１】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団のプライミングによる第１の拡張を行う前に、Ｔ細胞がＮＫ細胞から分離されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。他の実施形態では、Ｔ細胞は、第１のＴ細胞集団からのＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞の除去によって、第１のＴ細胞集団中のＮＫ細胞から分離される。他の実施形態では、ＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞は、ＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞画分を除去し、かつ陰性画分を回収するゲーティング戦略を使用して、第１のＴ細胞集団を細胞選別に供することによって、第１のＴ細胞集団から除去される。他の実施形態では、前述の方法は、高いＮＫ細胞パーセンテージを特徴とする第１のＴ細胞集団におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、高いＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞パーセンテージを特徴とする第１のＴ細胞集団におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のＮＫ細胞の存在を特徴とする腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞を特徴とする腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のＮＫ細胞の存在を特徴とする腫瘍に罹患している患者から取得された腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞の存在を特徴とする腫瘍に罹患している患者から取得された腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、卵巣癌に罹患している患者から取得された腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。
【１８６２】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団由来の正確にまたは約1×10^{7}Ｔ細

胞が容器内に播種されて、かかる容器内で一次の第１の拡張を開始するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８６３】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が複数の容器に分配され、各容器内で、第１のＴ細胞集団由来の正確にまたは約1×10^{7}Ｔ細胞が播種されて、かかる容器内で一次の第１の拡張を開始するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８６４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において採取された第２のＴ細胞集団が治療的ＴＩＬ集団であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８６５】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８６６】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８６７】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８６８】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８６９】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８７０】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８７１】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８７２】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８７３】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８７４】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８７５】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８７６】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８７７】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８７８】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８７９】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８８０】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８８１】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８８２】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８８３】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８８４】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提

供する。
【１８８５】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８８６】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８８７】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８８８】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８８９】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８９０】
いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、（ｉ）ＩＦＮ－γ及び抗ＰＤ－１を含む第１の細胞培養倍地中で腫瘍試料を約２～３日間培養することによって対象における腫瘍の１つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容して、ＡＫＴｉの有無にかかわらず、少なくともＩＬ－２及び任意選択で、ＩＬ－２１を含む培地中で腫瘍反応性ＴＩＬの刺激を増強することと、（ｉｉ）ＡＫＴｉの有無にかかわらず、少なくともＩＬ－２、及び任意選択で、ＩＬ－２１を含む第２の細胞培養倍地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が約２～３日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団が取得され、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、（ｉｉｉ）第２のＴＩＬ集団を、ＡＫＴｉの有無にかかわらず、少なくともＩＬ－２、及び任意選択で、ＩＬ－１５及び／またはＩＬ－２１を含む第３の細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が約１１日間の第２の期間行われて、第３のＴＩＬ集団が取得され、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｉｖ）ステップ（ｉｉｉ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、方法を提供する。
【１８９１】
他の実施形態では、本発明は、第２の期間の５日目の後に、培養物が２つ以上の継代培養物に分割され、各継代培養物に追加量の第３の培養培地が補充され、約６日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８９２】
他の実施形態では、本発明は、第２の期間の５日目の後に、培養物が２つ以上の継代培養物に分割され、各継代培養物にＩＬ－２を含む第４の培養培地が補充され、約６日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８９３】

他の実施形態では、本発明は、第２の期間の５日目の後に、培養物が最大５つの継代培養物に分割されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８９４】

他の実施形態では、本発明は、方法におけるすべてのステップが約２２日で完了するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８９５】

他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞を拡張する方法であって、（ｉ）最大約４８～７２時間を含む、ＩＦＮｇ（インターフェロンガンマ）、ＰＤ－１（抗ＰＤ－１抗体）、ＣＤ４０Ｌ、ＣＤ４０（抗ＣＤ４０抗体）、及び／またはＣＴＬＡ－４アゴニストからなる群のうちのいずれかで第１のＴＩＬ集団を刺激することと、（ｉｉ）第１のＴＩＬ集団のプライミングによる第１の拡張を行って、腫瘍反応性ＴＩＬの割合を増加させ、第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、（ｉｉｉ）ステップ（ｂ）でプライミングされた第１のＴＩＬ集団の活性化後、第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１のＴＩＬ集団の第２の拡張を行って、成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、（ｉｖ）第２のＴ細胞集団を採取することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍試料は、複数のコア生検から得られる。いくつかの実施形態では、複数のコア生検は、２、３、４、５、６、７、８、９及び１０個のコア生検からなる群から選択される。

【１８９６】

他の実施形態では、本発明は、Ｂ細胞を拡張する方法であって、（ｉ）最大約４８～７２時間を含む、ＩＦＮｇ（インターフェロンガンマ）、ＰＤ－１（抗ＰＤ－１抗体）、ＣＤ４０Ｌ、ＣＤ４０（抗ＣＤ４０抗体）、及び／またはＣＴＬＡ－４アゴニストからなる群のうちのいずれかで第１のＴＩＬ集団を刺激することと、（ｉｉ）細胞を培養することによって第１のＢ細胞集団の第１の拡張を行って、第２のＢ細胞集団を産生することと、（ｉｉｉ）第２のＢ細胞集団の細胞培養培地を補充することによって第２の拡張を行って、第３のＢ細胞集団を産生することであって、第３のＢ細胞集団が、治療的Ｂ細胞集団である、第３のＢ細胞集団を産生することと、（ｉｖ）第３のＢ細胞集団を採取することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍試料は、複数のコア生検から得られる。いくつかの実施形態では、複数のコア生検は、２、３、４、５、６、７、８、９及び１０個のコア生検からなる群から選択される。

【１８９７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１、第２及び／または第３のＴＩＬ集団が、（ａ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｂ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または（ｃ）（ａ）及び（ｂ）ＴＩＬの組み合わせについて選別されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。（ａ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び／または（ｂ）ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}、または本発明の方法による（ｉ）及び（ｉｉ）の組み合わせであるＴＩＬを選別するのに好適な細胞選別システムは、米国出願第２０１９／０２１２３３２号に見出すことができ、これは参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、細胞選別は、Ｚｈａｎｇ，Ｘ ｅｔ．ａｌ．，Ｓｕｒｆａｃｅ Ｆｒｅｅ Ｅｎｅｒｇｙ Ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｈｉｇｈ－Ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ Ｃｅｌｌ Ｓｏｒｔｉｎｇ，Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（２０１４），８６：９３５０－９３５５（これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載される方法を使用して行われる。いくつかの実施形態では、細胞選別技術は、１秒当たりの５ｅ７細胞の容量を有する。いくつかの実施形態では、１秒当たりの５ｅ７細胞の容量は、２２日目（例えば、ＴＩＬの拡張後）での選別に有用である。いくつかの実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物が、１－ＲＥＰまたは２－ＲＥＰプロトコルのいずれかを使用して拡張されることを提供する（実施例１５及び図４１を参照されたい）。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、成長、生存率、表現型、機能、自己腫瘍死滅、及びＴＣＲｖβレパートリーについて評価される。いく

つかの実施形態では、上記の細胞選別方法を使用して試験するために、治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物の一部をサンプリングしてもよい。

【１８９８】

いくつかの実施形態では、本発明は、Ｔ細胞またはＴＩＬが腫瘍消化物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載される方法。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、ＲＰＭＩ１６４０、２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼであるが、これらに限定されない酵素培地中で腫瘍をインキュベートすること、続いて、機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって生成される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはタイプのコラゲナーゼを含む）、Ａｃｃｕｔａｓｅ（商標）、Ａｃｃｕｍａｘ（商標）、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、キモトリプシン、キモパパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパイン、プロテアーゼタイプＸＩＶ（プロナーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）、トリプシン阻害剤、任意の他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びこれらの任意の組み合わせ等の１つ以上の解離（消化）酵素を含むが、これらに限定されない腫瘍解離酵素混合物の中に配置される。他の実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはタイプのコラゲナーゼを含む）、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）及びデオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）を含む腫瘍解離酵素混合物中に配置される。

【１８９９】

ＶＩ．薬学的組成物、投与量、及び投薬レジメン

いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して拡張及び／または遺伝子修飾された（ＣＣＲを発現するように遺伝子修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを含む）ＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬは、薬学的組成物として患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌緩衝液中のＴＩＬ懸濁液である。本開示のＰＢＭＣを使用して拡張されたＴＩＬは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、単回の動脈内または静脈内注入として投与され、これは、好ましくは、およそ３０～６０分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内投与が含まれる。

【１９００】

したがって、本開示のいくつかの実施形態は、本明細書に開示される方法を使用して製造される治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、治療的ＴＩＬ集団は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、治療的ＴＩＬ集団は、約１×10^{9}～約１×10^{11}のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、治療的ＴＩＬ集団は、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、増強された多官能性を示す。いくつかの実施形態では、治療的ＴＩＬ集団は、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、より幹様の表現型を示す。いくつかの実施形態では、治療的ＴＩＬ集団は、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、活性化及び／または分化の少ないＴＩＬの頻度の増加を示す。いくつかの実施形態では、治療的ＴＩＬ集団は、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、同種異系設定で改善された腫瘍細胞殺傷を示す。いくつかの実施形態では、治療的ＴＩＬ集団は、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ６２Ｌ、及びＩＬ－７Ｒからなる群から選択されるメモリー関連マーカーの増加した発現を示す。いくつかの実施形態では、治療的ＴＩＬ集団は、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、ＣＤ３８、ＣＤ３９、及びＣＤ６９からなる群から選択される活性化マーカーの発現の低下を示す。いくつかの実施形態では、治療的ＴＩＬ集団は、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造されたＴＩＬ集団と比較して、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＴＩＧＩＴ、及びＴＯＸからなる群から選択される阻害／枯渇関連マーカーの発現の低下を示す。いくつかの実施形態では、治療的ＴＩＬ集団は、参照ＴＩＬ製造プロセスを使用して製造

されたＴＩＬ集団と比較して、ＧＺＭＢ、ＣＸＣＲ３、ＩＦＮｇ、ＴＮＦａ、及びＩＬ－２からなる群から選択される機能的マーカーの発現の増加を示す。いくつかの実施形態では、参照ＴＩＬ製造プロセスは、例えば、図１及び／または８に概説されるプロセスを含む、Ｇｅｎ２プロセスまたはプロセス２Ａなどの、本明細書に開示されるＴＩＬ製造プロセスである。

【１９０１】

任意の好適な用量のＴＩＬが投与され得る。いくつかの実施形態では、特にがんがＮＳＣＬＣまたは黒色腫である場合、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}のＴＩＬが投与され、平均約７．８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、約１．２×１０^{10}～約４．３×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約３×１０^{10}～約１２×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約４×１０^{10}～約１０×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約５×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約６×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約７×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}である。いくつかの実施形態では、特にがんが黒色腫である場合、治療上有効な投与量は、約７．８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、特にがんがＮＳＣＬＣである場合、治療上有効な投与量は、約７．８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約１．２×１０^{10}～約４．３×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約３×１０^{10}～約１２×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約４×１０^{10}～約１０×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約５×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約６×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約７×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬである。

【１９０２】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供されるＴＩＬの数は、約１×１０^{6}、２×１０^{6}、３×１０^{6}、４×１０^{6}、５×１０^{6}、６×１０^{6}、７×１０^{6}、８×１０^{6}、９×１０^{6}、１×１０^{7}、２×１０^{7}、３×１０^{7}、４×１０^{7}、５×１０^{7}、６×１０^{7}、７×１０^{7}、８×１０^{7}、９×１０^{7}、１×１０^{8}、２×１０^{8}、３×１０^{8}、４×１０^{8}、５×１０^{8}、６×１０^{8}、７×１０^{8}、８×１０^{8}、９×１０^{8}、１×１０^{9}、２×１０^{9}、３×１０^{9}、４×１０^{9}、５×１０^{9}、６×１０^{9}、７×１０^{9}、８×１０^{9}、９×１０^{9}、１×１０^{10}、２×１０^{10}、３×１０^{10}、４×１０^{10}、５×１０^{10}、６×１０^{10}、７×１０^{10}、８×１０^{10}、９×１０^{10}、１×１０^{11}、２×１０^{11}、３×１０^{11}、４×１０^{11}、５×１０^{11}、６×１０^{11}、７×１０^{11}、８×１０^{11}、９×１０^{11}、１×１０^{12}、２×１０^{12}、３×１０^{12}、４×１０^{12}、５×１０^{12}、６×１０^{12}、７×１０^{12}、８×１０^{12}、９×１０^{12}、１×１０^{13}、２×１０^{13}、３×１０^{13}、４×１０^{13}、５×１０^{13}、６×１０^{13}、７×１０^{13}、８×１０^{13}、及び９×１０^{13}である。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供されるＴＩＬの数は、１×１０^{6}～５×１０^{6}、５×１０^{6}～１×１０^{7}、１×１０^{7}～５×１０^{7}、５×１０^{7}～１×１０^{8}、１×１０^{8}～５×１０^{8}、５×１０^{8}～１×１０^{9}、１×１０^{9}～５×１０^{9}、５×１０^{9}～１×１０^{10}、１×１０^{10}～５×１０^{10}、５×１０^{10}～１×１０^{11}、５×１０^{11}～１×１０^{12}、１×１０^{12}～５×１０^{12}、及び５×１０^{12}～１×１０^{13}の範囲内である。

【１９０３】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、例えば、薬学的組成物の１００％、９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．

４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖ未満である。

【１９０４】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９．７５％、１９．５０％、１９．２５％、１９％、１８．７５％、１８．５０％、１８．２５％、１８％、１７．７５％、１７．５０％、１７．２５％、１７％、１６．７５％、１６．５０％、１６．２５％、１６％、１５．７５％、１５．５０％、１５．２５％、１５％、１４．７５％、１４．５０％、１４．２５％、１４％、１３．７５％、１３．５０％、１３．２５％、１３％、１２．７５％、１２．５０％、１２．２５％、１２％、１１．７５％、１１．５０％、１１．２５％、１１％、１０．７５％、１０．５０％、１０．２５％、１０％、９．７５％、９．５０％、９．２５％、９％、８．７５％、８．５０％、８．２５％、８％、７．７５％、７．５０％、７．２５％、７％、６．７５％、６．５０％、６．２５％、６％、５．７５％、５．５０％、５．２５％、５％、４．７５％、４．５０％、４．２５％、４％、３．７５％、３．５０％、３．２５％、３％、２．７５％、２．５０％、２．２５％、２％、１．７５％、１．５０％、１２５％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖ超である。

【１９０５】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の約０．０００１％～約５０％、約０．００１％～約４０％、約０．０１％～約３０％、約０．０２％～約２９％、約０．０３％～約２８％、約０．０４％～約２７％、約０．０５％～約２６％、約０．０６％～約２５％、約０．０７％～約２４％、約０．０８％～約２３％、約０．０９％～約２２％、約０．１％～約２１％、約０．２％～約２０％、約０．３％～約１９％、約０．４％～約１８％、約０．５％～約１７％、約０．６％～約１６％、約０．７％～約１５％、約０．８％～約１４％、約０．９％～約１２％、または約１％～約１０％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの範囲内である。

【１９０６】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の約０．００１％～約１０％、約０．０１％～約５％、約０．０２％～約４．５％、約０．０３％～約４％、約０．０４％～約３．５％、約０．０５％～約３％、約０．０６％～約２．５％、約０．０７％～約２％、約０．０８％～約１．５％、約０．０９％～約１％、約０．１％～約０．９％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの範囲内である。

【１９０７】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの量は、１０ｇ、９．５ｇ、９．０ｇ、８．５ｇ、８．０ｇ、７．５ｇ、７．０ｇ、６．５ｇ、６．０ｇ、５．５ｇ、５．０ｇ、４．５ｇ、４．０ｇ、３．５ｇ、３．０ｇ、２．５ｇ、２．０ｇ、１．５ｇ、１．０ｇ、０．９５ｇ、０．９ｇ、０．８５ｇ、０．８ｇ、０．７５ｇ、０．７ｇ、０．６５ｇ、０．６ｇ、０．５５ｇ、０．５ｇ、０．４５ｇ、０．４ｇ、０．３５ｇ、０．３ｇ、０．２５ｇ、０．２ｇ、０．１５ｇ、０．１ｇ、０．０９ｇ、０．０８ｇ、０．０７ｇ、０．０６ｇ、０．０５ｇ、０．０４ｇ、０．０３ｇ、０．０２ｇ、０．０１ｇ、０．００９ｇ、０．００８ｇ、０．００７ｇ、０．００６ｇ、０．００５ｇ、０

．００４ｇ、０．００３ｇ、０．００２ｇ、０．００１ｇ、０．０００９ｇ、０．０００８ｇ、０．０００７ｇ、０．０００６ｇ、０．０００５ｇ、０．０００４ｇ、０．０００３ｇ、０．０００２ｇ、または０．０００１ｇ以下である。

【１９０８】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの量は、０．０００１ｇ、０．０００２ｇ、０．０００３ｇ、０．０００４ｇ、０．０００５ｇ、０．０００６ｇ、０．０００７ｇ、０．０００８ｇ、０．０００９ｇ、０．００１ｇ、０．００１５ｇ、０．００２ｇ、０．００２５ｇ、０．００３ｇ、０．００３５ｇ、０．００４ｇ、０．００４５ｇ、０．００５ｇ、０．００５５ｇ、０．００６ｇ、０．００６５ｇ、０．００７ｇ、０．００７５ｇ、０．００８ｇ、０．００８５ｇ、０．００９ｇ、０．００９５ｇ、０．０１ｇ、０．０１５ｇ、０．０２ｇ、０．０２５ｇ、０．０３ｇ、０．０３５ｇ、０．０４ｇ、０．０４５ｇ、０．０５ｇ、０．０５５ｇ、０．０６ｇ、０．０６５ｇ、０．０７ｇ、０．０７５ｇ、０．０８ｇ、０．０８５ｇ、０．０９ｇ、０．０９５ｇ、０．１ｇ、０．１５ｇ、０．２ｇ、０．２５ｇ、０．３ｇ、０．３５ｇ、０．４ｇ、０．４５ｇ、０．５ｇ、０．５５ｇ、０．６ｇ、０．６５ｇ、０．７ｇ、０．７５ｇ、０．８ｇ、０．８５ｇ、０．９ｇ、０．９５ｇ、１ｇ、１．５ｇ、２ｇ、２．５、３ｇ、３．５、４ｇ、４．５ｇ、５ｇ、５．５ｇ、６ｇ、６．５ｇ、７ｇ、７．５ｇ、８ｇ、８．５ｇ、９ｇ、９．５ｇ、または１０ｇ超である。

【１９０９】

本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬは、広い投与量範囲にわたって有効である。正確な投与量は、投与経路、化合物が投与される形態、治療される対象の性別及び年齢、治療される対象の体重、ならびに主治医の選好及び経験に依存するであろう。適切な場合、ＴＩＬの臨床的に確立された投与量が使用される場合もある。ＴＩＬの投与量などの本明細書の方法を使用して投与される薬学的組成物の量は、治療されるヒトまたは哺乳動物、障害または状態の重症度、投与速度、医薬品有効成分の性質、及び処方医師の裁量に依存するであろう。

【１９１０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、単回用量で投与され得る。かかる投与は、注射、例えば、静脈内注射に従うものであり得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、複数回用量で投与され得る。投薬は、１年に１回、２回、３回、４回、５回、６回、または６回超であり得る。投薬は、月１回、２週間に１回、週１回、または隔日に１回であり得る。ＴＩＬの投与は、必要な限り継続することができる。

【１９１１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}、8×10^{7}、9×10^{7}、1×10^{8}、2×10^{8}、3×10^{8}、4×10^{8}、5×10^{8}、6×10^{8}、7×10^{8}、8×10^{8}、9×10^{8}、1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}、及び9×10^{13}である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、1×10^{6}～5×10^{6}、5×10^{6}～1×10^{7}、1×10^{7}～5×10^{7}、5×10^{7}～1×10^{8}、1×10^{8}～5×10^{8}、5×10^{8}～1×10^{9}、1×10^{9}～5×10^{9}、5×10^{9}～1×10^{10}、1×10^{10}～5×10^{10}、5×10^{10}～1×10^{11}、5×10^{11}～1×10^{12}、1×10^{12}～5×10^{12}、及び5×1

0^{12}～1×10^{13}の範囲内である。

【１９１２】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約４．３ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約３．２ｍｇ／ｋｇ、約０．３５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．３ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約１．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１ｍｇ／ｋｇ、約０．５５ｍｇ／ｋｇ～約０．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．６５ｍｇ／ｋｇ～約０．８ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約０．７５ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．８５ｍｇ／ｋｇ～約２ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約１．８５ｍｇ／ｋｇ、約１．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約１．３ｍｇ／ｋｇ～約１．６ｍｇ／ｋｇ、約１．３５ｍｇ／ｋｇ～約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約２．３ｍｇ／ｋｇ～約３．４ｍｇ／ｋｇ、約２．４ｍｇ／ｋｇ～約３．３ｍｇ／ｋｇ、約２．６ｍｇ／ｋｇ～約３．１５ｍｇ／ｋｇ、約２．７ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、約２．８ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、または約２．８５ｍｇ／ｋｇ～約２．９５ｍｇ／ｋｇの範囲内である。

【１９１３】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約１ｍｇ～約５００ｍｇ、約１０ｍｇ～約３００ｍｇ、約２０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約２５ｍｇ～約２００ｍｇ、約１ｍｇ～約５０ｍｇ、約５ｍｇ～約４５ｍｇ、約１０ｍｇ～約４０ｍｇ、約１５ｍｇ～約３５ｍｇ、約２０ｍｇ～約３０ｍｇ、約２３ｍｇ～約２８ｍｇ、約５０ｍｇ～約１５０ｍｇ、約６０ｍｇ～約１４０ｍｇ、約７０ｍｇ～約１３０ｍｇ、約８０ｍｇ～約１２０ｍｇ、約９０ｍｇ～約１１０ｍｇ、または約９５ｍｇ～約１０５ｍｇ、約９８ｍｇ～約１０２ｍｇ、約１５０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約１６０ｍｇ～約２４０ｍｇ、約１７０ｍｇ～約２３０ｍｇ、約１８０ｍｇ～約２２０ｍｇ、約１９０ｍｇ～約２１０ｍｇ、約１９５ｍｇ～約２０５ｍｇ、または約１９８～約２０７ｍｇの範囲内である。

【１９１４】

ＴＩＬの有効量は、鼻腔内経路及び経皮経路を含む、同様の有用性を有する薬剤の認められた投与様式のうちのいずれかによって、動脈内注射によって、静脈内、腹腔内、非経口、筋肉内、皮下、局所、移植によって、または吸入によって、単回用量または複数回用量のいずれかで投与され得る。

【１９１５】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を含む注入バッグを提供する。

【１９１６】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団及び薬学的に許容される担体を含む腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）組成物を提供する。

【１９１７】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を含む注入バッグを提供する。

【１９１８】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団の凍結保存された調製物を提供する。

【１９１９】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団及び凍結保存された培地を含む腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）組成物を提供する。

【１９２０】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地がＤＭＳＯを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。

【１９２１】
他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地が７～１０％のＤＭＳＯを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。
【１９２２】
他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物の凍結保存された調製物を提供する。
【１９２３】
いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して拡張されたＴＩＬは、薬学的組成物として患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌緩衝液中のＴＩＬ懸濁液である。本開示のＰＢＭＣを使用して拡張されたＴＩＬは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、単回の動脈内または静脈内注入として投与され、これは、好ましくは、およそ３０～６０分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内投与が含まれる。
【１９２４】
任意の好適な用量のＴＩＬが投与され得る。いくつかの実施形態では、特にがんがＮＳＣＬＣである場合、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}のＴＩＬが投与され、平均は約７．８×10^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、約１．２×10^{10}～約４．３×10^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約３×10^{10}～約１２×10^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約４×10^{10}～約１０×10^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約５×10^{10}～約８×10^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約６×10^{10}～約８×10^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約７×10^{10}～約８×10^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}である。いくつかの実施形態では、特にがんがＮＳＣＬＣである場合、治療上有効な投与量は、約７．８×10^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約１．２×10^{10}～約４．３×10^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約３×10^{10}～約１２×10^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約４×10^{10}～約１０×10^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約５×10^{10}～約８×10^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約６×10^{10}～約８×10^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約７×10^{10}～約８×10^{10}ＴＩＬである。
【１９２５】
いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供されるＴＩＬの数は、約１×10^{6}、２×10^{6}、３×10^{6}、４×10^{6}、５×10^{6}、６×10^{6}、７×10^{6}、８×10^{6}、９×10^{6}、１×10^{7}、２×10^{7}、３×10^{7}、４×10^{7}、５×10^{7}、６×10^{7}、７×10^{7}、８×10^{7}、９×10^{7}、１×10^{8}、２×10^{8}、３×10^{8}、４×10^{8}、５×10^{8}、６×10^{8}、７×10^{8}、８×10^{8}、９×10^{8}、１×10^{9}、２×10^{9}、３×10^{9}、４×10^{9}、５×10^{9}、６×10^{9}、７×10^{9}、８×10^{9}、９×10^{9}、１×10^{10}、２×10^{10}、３×10^{10}、４×10^{10}、５×10^{10}、６×10^{10}、７×10^{10}、８×10^{10}、９×10^{10}、１×10^{11}、２×10^{11}、３×10^{11}、４×10^{11}、５×10^{11}、６×10^{11}、７×10^{11}、８×10^{11}、９×10^{11}、１×10^{12}、２×10^{12}、３×10^{12}、４×10^{12}、５×10^{12}、６×10^{12}、７×10^{12}、８×10^{12}、９×10^{12}、１×10^{13}、２×10^{13}、３×10^{13}、４×10^{13}、５×10^{13}、６×10^{13}、７×10^{13}、８×10^{13}、及び９×10^{13}である。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供されるＴＩＬの数は、１×10^{6}～５×10^{6}、５×10^{6}～１×10^{7}、１×10^{7}～５×10^{7}、５×10^{7}～１×10^{8}、１×10^{8}～５×10^{8}、５×10^{8}～１×10^{9}、１×10^{9}～５×10^{9}、５×10^{9}～１×10^{10}、１×10^{10}～５×10^{10}、５×10^{10}～１×10^{11}、５×10^{11}～１×１０

10^{12}、1×10^{12}～5×10^{12}、及び5×10^{12}～1×10^{13}の範囲内である。

【１９２６】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、例えば、薬学的組成物の１００％、９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖ未満である。

【１９２７】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９．７５％、１９．５０％、１９．２５％、１９％、１８．７５％、１８．５０％、１８．２５％、１８％、１７．７５％、１７．５０％、１７．２５％、１７％、１６．７５％、１６．５０％、１６．２５％、１６％、１５．７５％、１５．５０％、１５．２５％、１５％、１４．７５％、１４．５０％、１４．２５％、１４％、１３．７５％、１３．５０％、１３．２５％、１３％、１２．７５％、１２．５０％、１２．２５％、１２％、１１．７５％、１１．５０％、１１．２５％、１１％、１０．７５％、１０．５０％、１０．２５％、１０％、９．７５％、９．５０％、９．２５％、９％、８．７５％、８．５０％、８．２５％、８％、７．７５％、７．５０％、７．２５％、７％、６．７５％、６．５０％、６．２５％、６％、５．７５％、５．５０％、５．２５％、５％、４．７５％、４．５０％、４．２５％、４％、３．７５％、３．５０％、３．２５％、３％、２．７５％、２．５０％、２．２５％、２％、１．７５％、１．５０％、１２５％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖ超である。

【１９２８】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の約０．０００１％～約５０％、約０．００１％～約４０％、約０．０１％～約３０％、約０．０２％～約２９％、約０．０３％～約２８％、約０．０４％～約２７％、約０．０５％～約２６％、約０．０６％～約２５％、約０．０７％～約２４％、約０．０８％～約２３％、約０．０９％～約２２％、約０．１％～約２１％、約０．２％～約２０％、約０．３％～約１９％、約０．４％～約１８％、約０．５％～約１７％、約０．６％～約１６％、約０．７％～約１５％、約０．８％～約１４％、約０．９％～約１２％、または約１％～約１０％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの範囲内である。

【１９２９】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の約０．００１％～約１０％、約０．０１％～約５％、約０．０２％～約４．５％、約０．０３％～約４％、約０．０４％～約３．５％、約０．０５％～約３％、約０．０６％～約２．５％、約０．０７％～約２％、約０．０８％～約１．５％、約０．０９％～約１％、約０．１％～約０．９％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの範囲内である。

【１９３０】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの量は、１０ｇ、９．５ｇ、９．０ｇ、８．５ｇ、８．０ｇ、７．５ｇ、７．０ｇ、６．５ｇ、６．０ｇ

、５．５ｇ、５．０ｇ、４．５ｇ、４．０ｇ、３．５ｇ、３．０ｇ、２．５ｇ、２．０ｇ、１．５ｇ、１．０ｇ、０．９５ｇ、０．９ｇ、０．８５ｇ、０．８ｇ、０．７５ｇ、０．７ｇ、０．６５ｇ、０．６ｇ、０．５５ｇ、０．５ｇ、０．４５ｇ、０．４ｇ、０．３５ｇ、０．３ｇ、０．２５ｇ、０．２ｇ、０．１５ｇ、０．１ｇ、０．０９ｇ、０．０８ｇ、０．０７ｇ、０．０６ｇ、０．０５ｇ、０．０４ｇ、０．０３ｇ、０．０２ｇ、０．０１ｇ、０．００９ｇ、０．００８ｇ、０．００７ｇ、０．００６ｇ、０．００５ｇ、０．００４ｇ、０．００３ｇ、０．００２ｇ、０．００１ｇ、０．０００９ｇ、０．０００８ｇ、０．０００７ｇ、０．０００６ｇ、０．０００５ｇ、０．０００４ｇ、０．０００３ｇ、０．０００２ｇ、または０．０００１ｇ以下である。

【１９３１】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの量は、０．０００１ｇ、０．０００２ｇ、０．０００３ｇ、０．０００４ｇ、０．０００５ｇ、０．０００６ｇ、０．０００７ｇ、０．０００８ｇ、０．０００９ｇ、０．００１ｇ、０．００１５ｇ、０．００２ｇ、０．００２５ｇ、０．００３ｇ、０．００３５ｇ、０．００４ｇ、０．００４５ｇ、０．００５ｇ、０．００５５ｇ、０．００６ｇ、０．００６５ｇ、０．００７ｇ、０．００７５ｇ、０．００８ｇ、０．００８５ｇ、０．００９ｇ、０．００９５ｇ、０．０１ｇ、０．０１５ｇ、０．０２ｇ、０．０２５ｇ、０．０３ｇ、０．０３５ｇ、０．０４ｇ、０．０４５ｇ、０．０５ｇ、０．０５５ｇ、０．０６ｇ、０．０６５ｇ、０．０７ｇ、０．０７５ｇ、０．０８ｇ、０．０８５ｇ、０．０９ｇ、０．０９５ｇ、０．１ｇ、０．１５ｇ、０．２ｇ、０．２５ｇ、０．３ｇ、０．３５ｇ、０．４ｇ、０．４５ｇ、０．５ｇ、０．５５ｇ、０．６ｇ、０．６５ｇ、０．７ｇ、０．７５ｇ、０．８ｇ、０．８５ｇ、０．９ｇ、０．９５ｇ、１ｇ、１．５ｇ、２ｇ、２．５、３ｇ、３．５、４ｇ、４．５ｇ、５ｇ、５．５ｇ、６ｇ、６．５ｇ、７ｇ、７．５ｇ、８ｇ、８．５ｇ、９ｇ、９．５ｇ、または１０ｇ超である。

【１９３２】

本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬは、広い投与量範囲にわたって有効である。正確な投与量は、投与経路、化合物が投与される形態、治療される対象の性別及び年齢、治療される対象の体重、ならびに主治医の選好及び経験に依存するであろう。適切な場合、ＴＩＬの臨床的に確立された投与量が使用される場合もある。ＴＩＬの投与量などの本明細書の方法を使用して投与される薬学的組成物の量は、治療されるヒトまたは哺乳動物、障害または状態の重症度、投与速度、医薬品有効成分の性質、及び処方医師の裁量に依存するであろう。

【１９３３】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、単回用量で投与され得る。かかる投与は、注射、例えば、静脈内注射に従うものであり得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、複数回用量で投与され得る。投薬は、１年に１回、２回、３回、４回、５回、６回、または６回超であり得る。投薬は、月１回、２週間に１回、週１回、または隔日に１回であり得る。ＴＩＬの投与は、必要な限り継続することができる。

【１９３４】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}、8×10^{7}、9×10^{7}、1×10^{8}、2×10^{8}、3×10^{8}、4×10^{8}、5×10^{8}、6×10^{8}、7×10^{8}、8×10^{8}、9×10^{8}、1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10

10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}、及び9×10^{13}である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、1×10^{6}～5×10^{6}、5×10^{6}～1×10^{7}、1×10^{7}～5×10^{7}、5×10^{7}～1×10^{8}、1×10^{8}～5×10^{8}、5×10^{8}～1×10^{9}、1×10^{9}～5×10^{9}、5×10^{9}～1×10^{10}、1×10^{10}～5×10^{10}、5×10^{10}～1×10^{11}、5×10^{11}～1×10^{12}、1×10^{12}～5×10^{12}、及び5×10^{12}～1×10^{13}の範囲内である。

【１９３５】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約４．３ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約３．２ｍｇ／ｋｇ、約０．３５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．３ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約１．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１ｍｇ／ｋｇ、約０．５５ｍｇ／ｋｇ～約０．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．６５ｍｇ／ｋｇ～約０．８ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約０．７５ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．８５ｍｇ／ｋｇ～約２ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約１．８５ｍｇ／ｋｇ、約１．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約１．３ｍｇ／ｋｇ～約１．６ｍｇ／ｋｇ、約１．３５ｍｇ／ｋｇ～約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約２．３ｍｇ／ｋｇ～約３．４ｍｇ／ｋｇ、約２．４ｍｇ／ｋｇ～約３．３ｍｇ／ｋｇ、約２．６ｍｇ／ｋｇ～約３．１５ｍｇ／ｋｇ、約２．７ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、約２．８ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、または約２．８５ｍｇ／ｋｇ～約２．９５ｍｇ／ｋｇの範囲内である。

【１９３６】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約１ｍｇ～約５００ｍｇ、約１０ｍｇ～約３００ｍｇ、約２０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約２５ｍｇ～約２００ｍｇ、約１ｍｇ～約５０ｍｇ、約５ｍｇ～約４５ｍｇ、約１０ｍｇ～約４０ｍｇ、約１５ｍｇ～約３５ｍｇ、約２０ｍｇ～約３０ｍｇ、約２３ｍｇ～約２８ｍｇ、約５０ｍｇ～約１５０ｍｇ、約６０ｍｇ～約１４０ｍｇ、約７０ｍｇ～約１３０ｍｇ、約８０ｍｇ～約１２０ｍｇ、約９０ｍｇ～約１１０ｍｇ、または約９５ｍｇ～約１０５ｍｇ、約９８ｍｇ～約１０２ｍｇ、約１５０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約１６０ｍｇ～約２４０ｍｇ、約１７０ｍｇ～約２３０ｍｇ、約１８０ｍｇ～約２２０ｍｇ、約１９０ｍｇ～約２１０ｍｇ、約１９５ｍｇ～約２０５ｍｇ、または約１９８～約２０７ｍｇの範囲内である。

【１９３７】

ＴＩＬの有効量は、鼻腔内経路及び経皮経路を含む、同様の有用性を有する薬剤の認められた投与様式のうちのいずれかによって、動脈内注射によって、静脈内、腹腔内、非経口、筋肉内、皮下、局所、移植によって、または吸入によって、単回用量または複数回用量のいずれかで投与され得る。

【１９３８】

ＶＩＩ．患者を治療する方法

治療方法は、最初のＴＩＬ収集及びＴＩＬの培養から始まる。かかる方法は両方とも、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｊｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，２０１２，３５（３）：２８３－２９２によって当該技術分野で説明されている。治療方法の実施形態は、実施例を含む以下の節全体に記載されている。

【１９３９】

本明細書に記載の方法に従って、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また例えば、図１及び／または図８に示されるように）産生される拡張ＴＩＬは、がんを有する患者の治療における特定の用途を見出す（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｇｏｆｆ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．

Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２０１６，３４（２０）：２３８９－２３９、及び補足内容に記載される）。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、以前に記載されたように、転移性黒色腫の切除された沈着物から増殖された（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００３，２６：３３２－３４２を参照されたい）。新鮮な腫瘍は、滅菌条件下で解剖され得る。代表的な試料は、正式な病理学的分析のために収集され得る。２ｍｍ^3～３ｍｍ^{3}の単一断片が使用され得る。いくつかの実施形態では、患者当たり５、１０、１５、２０、２５、または３０個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり２０、２５、または３０個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり２０、２２、２４、２６、または２８個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり２４個の試料が取得される。試料は、２４ウェルプレートの個々のウェル内に配置され、高用量ＩＬ－２（６，０００ＩＵ／ｍＬ）を含む成長培地中で維持され、腫瘍の破壊及び／またはＴＩＬの増殖について監視され得る。処理後に生細胞が残っている腫瘍は、本明細書に記載されるように、単一細胞懸濁液中に酵素的に消化され、凍結保存され得る。

【１９４０】

いくつかの実施形態では、成功裏に成長したＴＩＬは、表現型分析（ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、及びＣＤ５６）のためにサンプリングされ、利用可能な場合、自己腫瘍に対して試験され得る。一晩の共培養によりインターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）レベルが２００ｐｇ／ｍＬを超え、バックグラウンドの２倍になった場合、ＴＩＬは反応性があるとみなされ得る。（Ｇｏｆｆ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２０１０，３３：８４０－８４７、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態では、自己反応性または十分な成長パターンの証拠を有する培養物は、急速拡張（ＲＥＰ）と称されることもある第２の拡張を含む、第２の拡張（例えば、図１及び／または図８のステップＤに従って提供される第２の拡張）のために選択され得る。いくつかの実施形態では、高い自己反応性（例えば、第２の拡張中の高い増殖）を有する拡張ＴＩＬが、追加の第２の拡張のために選択される。いくつかの実施形態では、高い自己反応性（例えば、図１及び／または図８のステップＤで提供されるような第２の拡張中の高い増殖）を有するＴＩＬが、図１及び／または図８のステップＤに従って、追加の第２の拡張のために選択される。

【１９４１】

注入バッグＴＩＬの凍結保存試料の細胞表現型は、表面マーカーＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＣＲ７、及びＣＤ４５ＲＡ（ＢＤ ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ）のフローサイトメトリー（例えば、ＦｌｏｗＪｏ）、ならびに本明細書に記載の方法のうちのいずれかによって分析され得る。血清サイトカインは、標準的な酵素結合免疫吸着アッセイ技術を使用することにより測定された。血清ＩＦＮ－ｇの上昇は、１００ｐｇ／ｍＬ超及び４　３ベースラインレベルを超えると定義された。

【１９４２】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図１及び／または図８に例示される方法によって産生されるＴＩＬは、ＴＩＬの臨床効果の驚くべき改善を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図１及び／または図８に例示される方法によって産生されるＴＩＬは、例えば、図１及び／または図８に例示されるもの以外の方法を含む、本明細書に記載されるもの以外の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、増加した臨床効果を示す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるもの以外の方法は、プロセス１Ｃ及び／または第１世代（Ｇｅｎ１）と称される方法を含む。いくつかの実施形態では、増加した有効性は、ＤＣＲ、ＯＲＲ、及び／または他の臨床応答によって測定される。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図１または図８に例示される方法によって産生されるＴＩＬは、例えば、図１及び／または図８に例示されるもの以外の方法を含む、本明細書に記載されるもの以外の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、同様の応答時間及び安全性プロファイルを示す。

【１９４３】

いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）は、治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。いくつかの実施形態では、ＴＩＬで治療された対象の血液中のＩＦＮ－γは、活性なＴＩＬを示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ産生の効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能の別の尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、例えば、図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のエクスビボでの血液、血清、またはＴＩＬ中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することによって測定することができる。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γの増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬで治療された患者における治療有効性を示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、ＩＦＮ－γが１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、３倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、４倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＥＬＩＳＡキットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば、図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のエクスビボでのＴＩＬにおいて測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象の血液において測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば、図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のＴＩＬ血清において測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）は、がんの治療における治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。

【１９４４】

いくつかの実施形態では、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治例えば、図１または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬ。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）は、治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。いくつかの実施形態では、ＴＩＬで治療された対象の血液中のＩＦＮ－γは、活性なＴＩＬを示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ産生の効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能の別の尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、例えば、図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のエクスビボでの血液、血清、またはＴＩＬ中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することによって測定することができる。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γの増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬで治療された患者における治療有効性を示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本

明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、ＩＦＮ－γが１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上増加する。

【１９４５】

いくつかの実施形態では、例えば図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されるＴＩＬは、例えばプロセス１Ｃ法と称される方法を含む、図１及び／または図８に例示されていないものを含む他の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、増加したポリクローン性を示す。いくつかの実施形態では、有意に改善されたポリクローン性及び／または増加したポリクローン性は、治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、Ｔ細胞レパートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性の増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬの投与に関する治療有効性を示すことができる。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、１倍、２倍、１０倍、１００倍、５００倍、または１０００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０００倍増加する。

【１９４６】

有効性の尺度には、当該技術分野で知られており、本明細書にも記載されている、疾患制御率（ＤＣＲ）ならびに全応答率（ＯＲＲ）が含まれ得る。

【１９４７】

Ａ．がんを治療する方法

本明細書に記載の組成物及び方法は、疾患を治療するための方法で使用され得る。いくつかの実施形態では、それらは、成人患者または小児患者における、がんなどの過剰増殖性障害の治療に使用するためのものである。それらは、本明細書及び以下の段落に記載される他の障害の治療にも使用され得る。

【１９４８】

いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、がんである。いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、固形腫瘍がんである。いくつかの実施形態では、固形腫瘍癌は、肛門癌、膀胱癌、乳癌（トリプルネガティブ乳癌を含む）、骨癌、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）によって引き起こされるたん、中枢神経系関連癌（上衣腫、髄芽腫、神経芽腫、松果体芽腫、及び未分化神経外胚葉性腫瘍を含む）、子宮頸癌（扁平上皮癌、腺扁平上皮癌、及び子宮頸部腺癌）、結腸癌、大腸癌、子宮内膜癌、食道癌、食道胃接合癌、胃癌、消火器癌、消化管間質腫瘍、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（

ＨＮＳＣＣ）を含む）、下咽頭癌、喉頭癌、鼻咽頭癌、中咽頭癌、及び咽頭癌）、腎臓癌、肝臓癌、肺癌（非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）及び小細胞肺癌）、黒色腫（ブドウ膜黒色腫、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫を含む）、中皮腫（悪性胸膜中皮腫を含む）、卵巣癌、膵臓癌（膵管腺癌を含む）、陰茎癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉腫（ユーイング肉腫、骨肉腫、横紋筋肉腫、ならびに他の骨及び軟部組織肉腫を含む）、甲状腺癌（未分化甲状腺癌を含む）、子宮癌、ならびに膣癌からなる群から選択される。

【１９４９】

いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、慢性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、及び多発性骨髄腫からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、本発明は、がん患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＭＩＬまたはＰＢＬを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。

【１９５０】

いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、または免疫療法を含む少なくとも１つの前療法による治療に対して再発するか、または不応性である、固形腫瘍がん及び血液学的悪性腫瘍を含む、前述のがんのうちの１つである。いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、及び／または免疫療法を含む少なくとも２つの以前の療法による治療に対して再発するか、または不応性である、前述のがんのうちの１つである。いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、及び／または免疫療法を含む少なくとも３つの以前の療法による治療に対して再発するか、または不応性である前述のがんのうちの１つである。

【１９５１】

いくつかの実施形態では、がんは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）癌である。したがって、ＭＳＩ－Ｈ及びｄＭＭＲ癌ならびに試験は、Ｋａｗａｋａｍｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｔｒｅａｔ．Ｏｐｔｉｏｎｓ　Ｏｎｃｏｌ．２０１５，１６，３０（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【１９５２】

いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを使用してがんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、ヒトである。いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを使用してがんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、非ヒトである。いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを使用してがんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、伴侶動物である。

【１９５３】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ＢＲＡＦ阻害剤及び／またはＭＥＫ阻害剤による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ベムラフェニブ、ダブラフェニブ、エンコラフェニブ、ソラフェニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるＢＲＡＦ阻害剤による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、トラメチニブ、コビメチニブ、ビニメチニブ、セルメチニブ、ピマセルチニブ、レファメチニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるＭＥＫ阻害剤による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、本

発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ベムラフェニブ、ダブラフェニブ、エンコラフェニブ、ソラフェニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるＢＲＡＦ阻害剤、ならびにトラメチニブ、コビメチニブ、ビニメチニブ、セルメチニブ、ピマセルチニブ、レファメチニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるＭＥＫ阻害剤による治療に対して不応性である。

【１９５４】

いくつかの実施形態では、本発明は、がん患者を治療する方法を含み、がんは、小児癌である。

【１９５５】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ブドウ膜黒色腫である。

【１９５６】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、ブドウ膜黒色腫は、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫である。

【１９５７】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児癌は、神経芽腫である。

【１９５８】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児がんは、肉腫である。

【１９５９】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、肉腫は、骨肉腫である。

【１９６０】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、肉腫は、軟部組織肉腫である。

【１９６１】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、軟部組織肉腫は、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、または未分化神経外胚葉性腫瘍（ＰＮＥＴ）である。

【１９６２】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児癌は、中枢神経系（ＣＮＳ）関連癌である。いくつかの実施形態では、小児癌は、化学療法による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、小児癌は、放射線療法による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、小児癌は、ジヌツキシマブによる治療に対して不応性である。

【１９６３】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、ＣＮＳ関連がんは、髄芽腫、松果芽腫、神経膠腫、上衣腫、または神経膠芽細胞腫である。

【１９６４】

本明細書に記載の組成物及び方法は、がんを治療するための方法において使用することができ、がんは、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体による治療に対して不応性または耐性である。いくつかの実施形態では、患者は、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対する一次不応性患者である。いくつかの実施形態では、患者は、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対する事前の応答を示さない。いくつかの実施形態では、患者は、患者のがんの進行に続く、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対する事前の応答を示す。いくつかの実施形態では、がんは、少なくとも１つの化学療法剤と組み合わせた抗ＣＴＬＡ－４抗体及び／または抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対して不応性である。いくつかの実施形態では、以前の化学療法剤は、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド

、及び／またはシスプラチンである。いくつかの実施形態では、化学療法剤（複数可）は、白金ダブレット化学療法剤である。いくつかの実施形態では、白金ダブレット療法は、シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤と、ビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはナブ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療法剤と、を含む。いくつかの実施形態では、白金ダブレット化学療法剤は、ペメトレキセドと組み合わされている。

【１９６５】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ＰＤ－Ｌ１陰性であり、及び／または本明細書の他の場所に記載されるように、腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）が１％未満でＰＤ－Ｌ１を発現するがんを有する患者に由来する。

【１９６６】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体及び白金ダブレット療法を含む併用療法に対して不応性であり、白金ダブレット療法は、

ｉ）シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤と、

ｉｉ）ビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはｎａｂ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療法剤と、を含む。

【１９６７】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体、ペメトレキセド、及び白金ダブレット療法を含む併用療法に対して不応性であり、白金ダブレット療法は、

ｉ）シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤と、

ｉｉ）ビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはｎａｂ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療法剤と、を含む。

【１９６８】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１抗体で処理されている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で処理されている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療未経験である。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、以前に化学療法剤で治療されている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、以前に化学療法剤で治療されているが、もはや化学療法剤で治療されていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１未経験である。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療未経験のＮＳＣＬＣを有するか、または化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１未経験である。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療未経験または化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１未経験であり、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。いくつかの実施形態では、対象は、ベースラインで巨大腫瘤病変を有し、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、検出可能なＰＤ－Ｌ１の発現を有しない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療未経験または化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１未経験であり、検出可能なＰＤ－Ｌ１の発現を有しない。いくつかの実施形態では、患者は、ベースラインで巨大腫瘤病変を有し、検出可能なＰＤ－Ｌ１の発現を有しない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療未経験のＮＳＣＬＣまたは化学療法後（例えば、化学療法剤後）であるが、ＰＤ－Ｌ１の発現が低く、及び／またはベースラインで巨大腫瘤病変を有する抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１未経験である。いくつかの実施形態では、最大腫瘍直径が横方向または冠状面のいずれかで測定された７ｃｍより大きい場合、巨大腫瘤病変が示される。いくつかの

実施形態では、巨大腫瘤病変は、２０ｍｍ以上の短軸直径を有する腫れたリンパ節がある場合に示される。いくつかの実施形態では、化学療法剤は、ＮＳＣＬＣの標準治療の治療薬を含む。

【１９６９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１発現は、腫瘍割合スコアによって決定される。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象は、＜１％の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）を有する。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象は、≧１％　ＴＰＳを有する。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣを有する対象は、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、該抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣを有する対象は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、該抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。

【１９７０】

いくつかの実施形態では、例えば、図１または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されるＴＩＬは、例えば、プロセス１Ｃ法と称される方法などの、図１または図８に例示されていないものを含む他の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、増加したポリクローン性を示す。いくつかの実施形態では、有意に改善されたポリクローン性及び／または増加したポリクローン性は、がん治療に対する治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、Ｔ細胞レパートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性の増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬの投与に関する治療有効性を示すことができる。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、１倍、２倍、１０倍、１００倍、５００倍、または１０００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０００倍増加する。

【１９７１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１発現は、本明細書に記載の１つのさらなる試験方法を使用して、腫瘍割合スコアによって決定される。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象または患者は、＜１％の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ腫瘍は、≧１％　ＴＰＳを有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、

抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象または患者は、＜１％の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）を有する。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象または患者は、≧１％　ＴＰＳを有する。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。

【１９７２】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、１％未満（ＴＰＳ＜１％）のＰＤ－Ｌ１タンパク質についての任意の強度での部分的または完全な膜染色を示す、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１療法の前に採取された患者からの腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）または生存腫瘍細胞のパーセンテージを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、＜５０％、＜４５％、＜４０％、＜３５％、＜３０％、＜２５％、＜２０％、＜１５％、＜１０％、＜９％、＜８％、＜７％、＜６％、＜５％、＜４％、＜３％、＜２％、＜１％、＜０．９％、＜０．８％、＜０．７％、＜０．６％、＜０．５％、＜０．４％、＜０．３％、＜０．２％、＜０．１％、＜０．０９％、＜０．０８％、＜０．０７％、＜０．０６％、＜０．０５％、＜０．０４％、＜０．０３％、＜０．０２％、及び＜０．０１％からなる群から選択されるＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、約５０％、約４５％、約４０％、約３５％、約３０％、約２５％、約２０％、約１５％、約１０％、約９％、約８％、約７％、約６％、約５％、約４％、約３％、約２％、約１％、約０．９％、約０．８％、約０．７％、約０．６％、約０．５％、約０．４％、約０．３％、約０．２％、約０．１％、約０．０９％、約０．０８％、約０．０７％、約０．０６％、約０．０５％、約０．０４％、約０．０３％、約０．０２％，及び約０．０１％からなる群から選択されるＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～１％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．９％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．８％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．７％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．６％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．５％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．４％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．３％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．２％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．１％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。ＴＰＳは、当該技術分野で知られている方法、例えば、Ｈｉｒｓｃｈ，ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｔｈｏｒａｃ．Ｏｎｃｏｌ．２０１７，１２，２０８－２２２に記載される方法、あるいはペムブロリズマブまたは他の抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１療法による治療前のＴＰＳの決定に使用される方法によって測定され得る。米国食品医薬品局（Ｕ．Ｓ．Ｆｏｏｄ　ａｎｄ　Ｄｒｕｇ　Ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）によって承認されたＴＰＳの測定のための方法を使用することもできる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、エクソソームＰＤ－Ｌ１である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、循環腫瘍細胞上に見出される。

【１９７３】

いくつかの実施形態では、部分的な膜染色は、１％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、またはそれ以上を含む。いくつかの実施形態では、完了した膜染色は、およそ１００％の膜染色を含む。

【１９７４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１の試験は、患者の血清中のＰＤ－Ｌ１のレベルを測定することを伴い得る。これらの実施形態では、患者の血清中のＰＤ－Ｌ１の測定は、腫瘍の不均一性の不確実性及び連続生検の患者の不快感を除去する。

【１９７５】

いくつかの実施形態では、ベースラインまたは標準レベルと比較して、可溶性ＰＤ－Ｌ１の上昇は、ＮＳＣＬＣにおける予後の悪化と相関する。例えば、Ｏｋｕｍａ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｌｕｎｇ Ｃａｎｃｅｒ，２０１８，１９，４１０－４１７、Ｖｅｃｃｈｉａｒｅｌｌｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｏｎｃｏｔａｒｇｅｔ，２０１８，９，１７５５４－１７５６３を参照されたい。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、エクソソームＰＤ－Ｌ１である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、循環腫瘍細胞上に発現される。

【１９７６】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することによって、ＮＳＣＬＣを治療する方法を提供し、対象または患者は、

＜１％のＰＤ－Ｌ１の所定の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）、

１％～４９％のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコア、または

１つ以上のドライバー変異の所定の非存在のうちの少なくとも１つを有し、

ドライバー変異は、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＥＧＦＲエクソン２０、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、ＲＥＴ融合、ＥＲＢＢ２変異、ＥＲＢＢ２増幅、ＢＲＣＡ変異、ＭＡＰ２Ｋ１変異、ＰＩＫ３ＣＡ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＰＴＥＮ変異、ＵＭＤ変異、ＮＲＡＳ変異、ＫＲＡＳ変異、ＮＦ１変異、ＭＥＴ変異、ＭＥＴスプライス及び／または変化したＭＥＴシグナル伝達、ＴＰ５３変異、ＣＲＥＢＢＰ変異、ＫＭＴ２Ｃ変異、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１変異、ＡＴＭ変異、ＳＥＴＤ２変異、ＦＬＴ３変異、ＰＴＰＮ１１変異、ＦＧＦＲ１変異、ＥＰ３００変異、ＭＹＣ変異、ＥＺＨ２変異、ＪＡＫ２変異、ＦＢＸＷ７変異、ＣＣＮＤ３変異、及びＧＮＡ１１変異からなる群から選択され、この方法は、

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

（ｂ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加することと、

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

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

（ｅ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、

（ｆ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

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

（ｈ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｇ）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【１９７７】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することによって、ＮＳＣＬＣを治療する方法を提供し、この方法は、

（ａ）ＰＤ－Ｌ１のＰＤ－Ｌ１発現及び腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）について患者の腫瘍を試験することと、

（ｂ）１つ以上のドライバー変異の所定の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＥＧＦＲエクソン２０、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、ＲＥＴ融合、ＥＲＢＢ２変異、ＥＲＢＢ２増幅、ＢＲＣＡ変異、ＭＡＰ２Ｋ１変異、ＰＩＫ３ＣＡ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＰＴＥＮ変異、ＵＭＤ変異、ＮＲＡＳ変異、ＫＲＡＳ変異、ＮＦ１変異、ＭＥＴ変異、ＭＥＴスプライス及び／または変化したＭＥＴシグナル伝達、ＴＰ５３変異、ＣＲＥＢＢＰ変異、ＫＭＴ２Ｃ変異、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１変異、ＡＴＭ変異、ＳＥＴＤ２変異、ＦＬＴ３変異、ＰＴＰＮ１１変異、ＦＧＦＲ１変異、ＥＰ３００変異、ＭＹＣ変異、ＥＺＨ２変異、ＪＡＫ２変異、ＦＢＸＷ７変異、ＣＣＮＤ３変異、及びＧＮＡ１１変異からなる群から選択される、試験することと、

（ｃ）患者が、約１％～約４９％のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、

（ｄ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｅ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加することと、

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

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

（ｈ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、

（ｉ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

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

（ｋ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｇ）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【１９７８】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することによって、ＮＳＣＬＣを治療する方法を提供し、この方法は、

（ａ）ＰＤ－Ｌ１のＰＤ－Ｌ１発現及び腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）について患者の腫瘍を試験することと、

（ｂ）１つ以上のドライバー変異の所定の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＥＧＦＲエクソン２０、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、ＲＥＴ融合、ＥＲＢＢ２変異、ＥＲＢＢ２増幅、ＢＲＣＡ変異、ＭＡＰ２Ｋ１変

異、ＰＩＫ３ＣＡ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＰＴＥＮ変異、ＵＭＤ変異、ＮＲＡＳ変異、ＫＲＡＳ変異、ＮＦ１変異、ＭＥＴ変異、ＭＥＴスプライス及び／または変化したＭＥＴシグナル伝達、ＴＰ５３変異、ＣＲＥＢＢＰ変異、ＫＭＴ２Ｃ変異、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１変異、ＡＴＭ変異、ＳＥＴＤ２変異、ＦＬＴ３変異、ＰＴＰＮ１１変異、ＦＧＦＲ１変異、ＥＰ３００変異、ＭＹＣ変異、ＥＺＨ２変異、ＪＡＫ２変異、ＦＢＸＷ７変異、ＣＣＮＤ３変異、及びＧＮＡ１１変異からなる群から選択される、試験することと、

（ｃ）患者が、約１％未満のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、

（ｄ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｅ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加することと、

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

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

（ｈ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、

（ｉ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

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

（ｋ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｇ）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【１９７９】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することによって、ＮＳＣＬＣを治療する方法を提供し、この方法は、

（ａ）ＰＤ－Ｌ１のＰＤ－Ｌ１発現及び腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）について患者の腫瘍を試験することと、

（ｂ）１つ以上のドライバー変異の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、またはＲＥＴ融合からなる群から選択される、試験することと、

（ｃ）患者が、約１％～約４９％のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、

（ｄ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｅ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加することと、

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

なく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｉ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、
（ｋ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｇ）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。
【１９８０】
いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することによって、ＮＳＣＬＣを治療する方法を提供し、この方法は、
（ａ）ＰＤ－Ｌ１のＰＤ－Ｌ１発現及び腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）について患者の腫瘍を試験することと、
（ｂ）１つ以上のドライバー変異の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、またはＲＥＴ融合からなる群から選択される、試験することと、
（ｃ）患者が、約１％未満のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、
（ｄ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｅ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加することと、
（ｆ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｉ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、
（ｋ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｇ）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。
【１９８１】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１９８２】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、本明細書に記載のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１９８３】

他の実施形態では、本発明は、それぞれ、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団及び本明細書に記載のＴＩＬ組成物を投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１９８４】

他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間のシクロホスファミドの投与に続いて、２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間のフルダラビンを投与するステップを含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１９８５】

他の実施形態では、本発明は、対象にＴＩＬ細胞を投与した翌日に開始する、高用量のＩＬ－２レジメンで対象を治療するステップをさらに含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１９８６】

他の実施形態では、本発明は、高用量ＩＬ－２レジメンが、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される６００，０００または７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１９８７】

他の実施形態では、本発明は、がんが固形腫瘍であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１９８８】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭癌ウイルスによって引き起こされたがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、または腎細胞癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１９８９】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌、ＮＳＣＬＣ、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、及び胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１９９０】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１９９１】

他の実施形態では、本発明は、がんがＨＮＳＣＣであるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１９９２】

他の実施形態では、本発明は、がんが子宮頸癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１９９３】

他の実施形態では、本発明は、がんがＮＳＣＬＣであるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１９９４】

他の実施形態では、本発明は、がんが神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１９９５】

他の実施形態では、本発明は、がんが胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１９９６】

他の実施形態では、本発明は、がんが高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１９９７】

他の実施形態では、本発明は、がんが小児の高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１９９８】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法で使用するための、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【１９９９】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法で使用するための、本明細書に記載のＴＩＬ組成物を提供する。

【２０００】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団または本明細書に記載のＴＩＬ組成物を対象に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団または本明細書に記載のＴＩＬ組成物を提供する。

【２００１】

他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間のシクロホスファミドの投与に続いて、２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間のフルダラビンを投与するステップを含むように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【２００２】

他の実施形態では、本発明は、ＴＩＬ細胞を患者に投与した翌日から開始する、高用量ＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含むように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【２００３】

他の実施形態では、本発明は、高用量ＩＬ－２レジメンが、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される６００，０００または７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含むように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【２００４】

他の実施形態では、本発明は、がんが固形腫瘍であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【２００５】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭癌ウイルスによって引き起こされたがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、または腎細胞癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【２００６】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌、ＮＳＣＬＣ、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、及び胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載の

治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２００７】
他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２００８】
他の実施形態では、本発明は、がんがＨＮＳＣＣであるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２００９】
他の実施形態では、本発明は、がんが子宮頸癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２０１０】
他の実施形態では、本発明は、がんがＮＳＣＬＣであるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２０１１】
他の実施形態では、本発明は、がんが、神経膠芽細胞腫であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２０１２】
他の実施形態では、本発明は、がんが胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２０１３】
他の実施形態では、本発明は、がんが高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２０１４】
他の実施形態では、本発明は、がんが小児の高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２０１５】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法における本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団の使用を提供する。
【２０１６】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法における前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物の使用を提供する。
【２０１７】
他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンを対象に投与することと、次いで治療上有効な投与量の、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団または本明細書に記載のＴＩＬ組成物を対象に投与することと、を含む、患者におけるがんを治療する方法における、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団または本明細書に記載のＴＩＬ組成物の使用を提供する。
【２０１８】
Ｂ．ＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１阻害剤との併用
いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるＴＩＬ療法は、治療的ＴＩＬ集合単独による治療を含んでもよく、またはＴＩＬならびに１つ以上のＰＤ－１及び／またはＰＤ－Ｌ１阻害剤を含む併用治療を含んでもよい。
【２０１９】
プログラム死１（ＰＤ－１）は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）Ｔ細胞、活性化単球、及び樹状細胞によって発現される２８８アミノ酸の膜貫通免疫チェックポイント受容体タンパク質である。ＣＤ２７９としても知られるＰＤ－１は、ＣＤ２８ファミリーに属し、ヒトでは第２染色体上のＰｄｃｄ１遺伝子によってコードされる。ＰＤ－１は、１つの免疫グロブリン（Ｉｇ）スーパーファミリードメイン、膜貫通領域、ならびに

免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ（ＩＴＩＭ）及び免疫受容体チロシンベースのスイッチモチーフ（ＩＴＳＭ）を含む細胞内ドメインからなる。ＰＤ－１とそのリガンド（ＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２）は、Ｋｅｉｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００８，２６，６７７－７０４に記載されるように、免疫耐性において重要な役割を果たすことが知られている。ＰＤ－１は、Ｔ細胞の免疫応答を負に調節する阻害シグナルを提供する。ＰＤ－Ｌ１（Ｂ７－Ｈ１またはＣＤ２７４としても知られる）及びＰＤ－Ｌ２（Ｂ７－ＤＣまたはＣＤ２７３としても知られる）は、腫瘍細胞及び間質細胞上に発現され、ＰＤ－１を発現する活性化Ｔ細胞が遭遇する可能性があり、Ｔ細胞の免疫抑制につながる。ＰＤ－Ｌ１は、ヒト第９染色体上のＣｄ２７４遺伝子によってコードされる２９０アミノ酸の膜貫通タンパク質である。例えば、Ｔｏｐａｌｉａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎ．Ｅｎｇ．Ｊ．Ｍｅｄ．２０１２，３６６，２４４３－５４に記載される最近の臨床研究で実証されているように、ＰＤ－１阻害剤、ＰＤ－Ｌ１阻害剤、及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤の使用による、ＰＤ－１とそのリガンドＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２との間の相互作用をブロックすることで、免疫抵抗を克服することができる。ＰＤ－Ｌ１は、多くの腫瘍細胞株上で発現されるが、ＰＤ－Ｌ２は、主に樹状細胞及びいくつかの腫瘍株上で発現される発現される。Ｔ細胞（活性化後にＰＤ－１を誘導的に発現する）に加えて、ＰＤ－１は、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、活性化単球、樹状細胞上でも発現される。

【２０２０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ及びＰＤ－１阻害剤は、ＮＳＣＬＣの治療のための併用療法または共療法として投与される。

【２０２１】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、前療法を受けていない。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、フロントライン療法または初期療法として投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、本明細書に記載のＴＩＬと併用して、フロントライン療法または初期療法として投与される。

【２０２２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、当該技術分野で知られている任意のＰＤ－１阻害剤またはＰＤ－１遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるＰＤ－１阻害剤または遮断剤のうちの１つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、ＰＤ－１阻害剤に関して互換的に使用される。誤解を避けるために、抗体であるＰＤ－１阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリアント、複合体、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、ＰＤ－１阻害剤への本明細書での言及はまた、小分子化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【２０２３】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、抗体（すなわち、抗ＰＤ－１抗体）、Ｆａｂ断片を含むその断片、またはその一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ＰＤ－１との結合について競合し、及び／またはＰＤ－１上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、ＰＤ－１との結合について競合し、及び／またはＰＤ－１上のエピトープに結合する。

【２０２４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ヒトＰＤ－１に約１００ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約９０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約８０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約７０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約６０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約５０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約４０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約３０ｐＭ以下のＫ

Ｄで結合する、ヒトＰＤ－１に約２０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約１０ｐＭ以下のＫＤで結合する、またはヒトＰＤ－１に約１ｐＭ以下のＫＤで結合するものである。

【２０２５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ヒトＰＤ－１に約７．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約７．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約８×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約８．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約９×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約９．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、またはヒトＰＤ－１に約１×１０^{6}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合するものである。

【２０２６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ヒトＰＤ－１に約２×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．１×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．２×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．３×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．４×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．５×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．６×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、またはヒトＰＤ－１に約２．７×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．８×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．９×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、またはヒトＰＤ－１に約３×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合するものである。

【２０２７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、約１０ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約９ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約８ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約７ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約６ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約５ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約４ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約３ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約２ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、または約１ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害するものである。

【２０２８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブ（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ　Ｃｏ．からＯＰＤＩＶＯとして市販されている）、またはそれらのバイオシミラー、抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。ニボルマブは、ＰＤ－１受容体を遮断する完全ヒトＩｇＧ４抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、免疫グロブリンＧ４カッパ、抗（ヒトＣＤ２７４）抗体である。ニボルマブには、Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ａｂｓｔｒａｃｔｓ　Ｓｅｒｖｉｃｅ（ＣＡＳ）登録番号９４６４１４－９４－４が割り当てられており、５Ｃ４、ＢＭＳ－９３６５５８、ＭＤＸ－１１０６、及びＯＮＯ－４５３８としても知られている。ニボルマブの調製及び特性は、米国特許第８，００８，４４９号及び国際特許公開第ＷＯ２００６／１２１１６８号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。様々な形態のがんにおけ

るニボルマブの臨床的安全性及び有効性は、Ｗａｎｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｓ．２０１４，２，８４６－５６、Ｐａｇｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．，２０１４，６５，１８５－２０２、及びＷｅｂｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２０１３，３１，４３１１－４３１８に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ニボルマブのアミノ酸配列を表１８に示す。ニボルマブは、２２－９６、１４０－１９６、２５４－３１４、３６０－４１８、２２’’－９６’’、１４０’’－１９６’’、２５４’’－３１４’’、及び３６０’’－４１８’’における重鎖内ジスルフィド連結；２３’－８８’、１３４’－１９４’、２３’’’－８８’’’、及び１３４’’’－１９４’’’における軽鎖内ジスルフィド連結；１２７－２１４’、１２７’’－２１４’’’における重鎖－軽鎖間ジスルフィド連結；２１９－２１９’’及び２２２－２２２’’における重鎖－重鎖間ジスルフィド連結；ならびに２９０、２９０’’におけるＮ－グリコシル化部位（Ｈ　ＣＨ２　８４．４）を有する。

【２０２９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、配列番号１５８によって与えられる重鎖及び配列番号１５９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２０３０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１６０に示される配列を含み、ＰＤ－１阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１６１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【２０３１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号１６２、配列番号１６３、及び配列番号１６４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１６５、配列番号１６６、及び配列番号１６７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－１上

の同じエピトープに結合する。

【２０３２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－１抗体であり、抗ＰＤ－１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。抗ＰＤ－１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。

【２０３３】

【表１９】

表１８．ニボルマブに関連するＰＤ－１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）	
配列番号１５８ ニボルマブ重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 440
配列番号１５９ ニボルマブ軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
配列番号１６０ ニボルマブ可変重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSS	60 113
配列番号１６１ ニボルマブ可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIK	60 107
配列番号１６２ ニボルマブ重鎖 ＣＤＲ１	NSGMH	5
配列番号１６３ ニボルマブ重鎖 ＣＤＲ２	VIWYDGSKRY YADSVKG	17
配列番号１６４ ニボルマブ重鎖 ＣＤＲ３	NDDY	4
配列番号１６５ ニボルマブ軽鎖 ＣＤＲ１	RASQSVSSYL A	11
配列番号１６６ ニボルマブ軽鎖 ＣＤＲ２	DASNRAT	7
配列番号１６７ ニボルマブ軽鎖 ＣＤＲ３	QQSSNWPRT	9

【２０３４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約３．５ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約４．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約５．５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約６．５ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約７．５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約８．５ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約９．５ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０３５】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約２００ｍｇ～約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約２００ｍｇ、約２２０ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２６０ｍｇ、約２８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３２０ｍｇ、約３４０ｍｇ、約３６０ｍｇ、約３８０ｍｇ、約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４４０ｍｇ、約４６０ｍｇ、約４８０ｍｇ、または約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０３６】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、または６週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０３７】
いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与され、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与され、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために、約１ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ３ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量、次いで２４０ｍｇを２週間毎、または４８０ｍｇを４週間毎に投与される。

【２０３８】
いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０３９】
いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、２週間毎に約３ｍｇ／ｋｇで、６週間毎に１ｍｇ／ｋｇのイピリムマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、３週間毎に約３６０ｍｇで、６週間毎に１ｍｇ／ｋｇのイピリムマブ及び２サイクルのプラ

チナダブレット化学療法とともに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇまたは４週間毎に４８０ｍｇ投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０４０】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、小細胞肺癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０４１】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、悪性胸膜中皮腫を治療するために、３週間毎に約３６０ｍｇ／ｋｇ、６週間毎に１ｍｇ／ｋｇのイピリムマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０４２】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約３ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ約１ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量、次いで２４０ｍｇを２週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約３ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ約１ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量、次いで２４０ｍｇを２週間毎、４８０ｍｇを４週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０４３】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的ホジキンリンパ腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的ホジキンリンパ腫を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは

、古典的ホジキンリンパ腫を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０４４】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０４５】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、局所進行性または転移性尿路上皮癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、局所進行性または転移性尿路上皮癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０４６】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性大腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性大腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、４０ｋｇ以上の成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性大腸癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、４０ｋｇ以上の成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性大腸癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０４７】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、＜４０ｋｇの小児患者における高頻度マイク

ロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性大腸癌を治療するために、２週間毎に約３ｍｇ／ｋｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、４０ｋｇ以上の成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性大腸癌を治療するために、約３ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ１ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量、次いで２４０ｍｇを２週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、４０ｋｇ以上の成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性大腸癌を治療するために、約３ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ１ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量、次いで４８０ｍｇを４週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０４８】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、約１ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ３ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量、次いで２４０ｍｇを２週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、約１ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ３ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量、次いで４８０ｍｇを４週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０４９】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、食道扁平上皮癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、食道扁平上皮癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、食道扁平上皮癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０５０】

他の実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブ（Ｍｅｒｃｋ＆Ｃｏ．，Ｉｎｃ（Ｋｅｎｉｌｗｏｒｔｈ，ＮＪ，ＵＳＡ）からＫＥＹＴＲＵＤＡとして市販されている）、またはそれらの抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントを含む。ペムブロリズマブには、ＣＡＳ登録番号１３７４８５３－９１－４が割り当てられており、ラムブロリズマブ、ＭＫ－３４７５、及びＳＣＨ－９００４７５としても知られている。ペムブロリズマブは、免疫グロブリンＧ４、抗（ヒトタンパク質ＰＤＣＤ１（プログラム細胞死１））

（ヒト－ハツカネズミモノクローナル重鎖）、ヒト－ハツカネズミモノクローナル軽鎖、二量体構造を有するジスルフィドを有する。ペムブロリズマブの構造は、免疫グロブリンＧ４、抗（ヒトプログラム細胞死１）；ヒト化マウスモノクローナルκ軽鎖二量体（２２６－２２６′′：２２９－２２９′′）－ビスジスルフィドを有するヒト化マウスモノクローナル［２２８－Ｌ－プロリン（Ｈ１０－Ｓ＞Ｐ）］γ４重鎖（１３４－２１８′）－ジスルフィドとしても記載され得る。ペムブロリズマブの特性、使用、及び調製は、国際特許公開第ＷＯ２００８／１５６７１２Ａ１号、米国特許第８，３５４，５０９号、ならびに米国特許出願公開第２０１０／０２６６６１７Ａ１号、同第２０１３／０１０８６５１Ａ１号、及び同第２０１３／０１０９８４３Ａ２号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。様々な形態のがんにおけるペムブロリズマブの臨床的安全性及び有効性は、Ｆｕｅｒｓｔ，Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　Ｔｉｍｅｓ，２０１４，３６，３５－３６、Ｒｏｂｅｒｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ，２０１４，３８４，１１０９－１７、及びＴｈｏｍａｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｅｘｐ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．，２０１４，１４，１０６１－１０６４に記載されている。ペムブロリズマブのアミノ酸配列を表１９に示す。ペムブロリズマブは、ジスルフィド架橋：２２－９６、２２′′－９６′′、２３′－９２′、２３′′′－９２′′′、１３４－２１８′、１３４′′－２１８′′′、１３８′－１９８′、１３８′′′－１９８′′′、１４７－２０３、１４７′′－２０３′′、２２６－２２６′′、２２９－２２９′′、２６１－３２１、２６１′′－３２１′′、３６７－４２５、及び３６７′′－４２５′′、ならびにグリコシル化部位（Ｎ）：Ａｓｎ－２９７及びＡｓｎ－２９７′′を含む。ペムブロリズマブは、Ｆｃ領域に安定化Ｓ２２８Ｐ変異を有するＩｇＧ４／カッパアイソタイプであり、この変異をＩｇＧ４ヒンジ領域に挿入すると、ＩｇＧ４抗体で典型的に観察される半分子の形成が防止される。ペムブロリズマブは、各重鎖のＦｃドメイン内のＡｓｎ２９７で不均一にグリコシル化されており、無傷の抗体の分子量はおよそ１４９ｋＤａになる。ペムブロリズマブの優性グリコフォームは、フコシル化アガラクト二分性グリカンフォーム（Ｇ０Ｆ）である。

【２０５１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、配列番号１６８によって与えられる重鎖及び配列番号１６９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２０５２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１７０に示される配列を含み、ＰＤ－１阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１７１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実

施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【２０５３】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号１７２、配列番号１７３、及び配列番号１７４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１７５、配列番号１７６、及び配列番号１７７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－１上の同じエピトープに結合する。

【２０５４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－１抗体であり、抗ＰＤ－１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。抗ＰＤ－１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。

【２０５５】

【表２０】

表１９．ペムブロリズマブに関連するＰＤ－１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）	
配列番号１６８ ペムブロリズマブ重鎖	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 447
配列番号１６９ ペムブロリズマブ軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC	60 120 180 218
配列番号１７０ ペムブロリズマブ可変重鎖	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS	60 120
配列番号１７１ ペムブロリズマブ可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号１７２ ペムブロリズマブ重鎖ＣＤＲ１	NYYMY	5
配列番号１７３ ペムブロリズマブ重鎖ＣＤＲ２	GINPSNGGTN FNEKFK	16
配列番号１７４ ペムブロリズマブ重鎖ＣＤＲ３	RDYRFDMGFD Y	11
配列番号１７５ ペムブロリズマブ軽鎖ＣＤＲ１	RASKGVSTSG YSYLH	15
配列番号１７６ ペムブロリズマブ軽鎖ＣＤＲ２	LASYLES	7
配列番号１７７ ペムブロリズマブ軽鎖ＣＤＲ３	QHSRDLPLT	9

【２０５６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約３．５ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約４．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約５．５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約６．５ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約７．５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約８．５ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約９．５ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患

者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。
【２０５７】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約２００ｍｇ～約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約２００ｍｇ、約２２０ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２６０ｍｇ、約２８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３２０ｍｇ、約３４０ｍｇ、約３６０ｍｇ、約３８０ｍｇ、約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４４０ｍｇ、約４６０ｍｇ、約４８０ｍｇ、または約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。
【２０５８】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、または６週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。
【２０５９】
いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、黒色腫を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、黒色腫を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。
【２０６０】
いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＮＳＣＬＣを治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＮＳＣＬＣを治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＮＳＣＬＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。
【２０６１】
いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、小細胞肺癌（ＳＣＬＣ）を治療するた

めに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＳＣＬＣを治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＳＣＬＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０６２】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＨＮＳＣＣを治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＨＮＳＣＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０６３】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、古典的ホジキンリンパ腫（ｃＨＬ）または原発性縦隔大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＰＭＢＣＬ）を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、古典的ホジキンリンパ腫（ｃＨＬ）または原発性縦隔大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＰＭＢＣＬ）を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。ペムブロリズマブは、古典的ホジキンリンパ腫（ｃＨＬ）または原発性縦隔大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＰＭＢＣＬ）を治療するために、小児の場合、３週間毎に約２ｍｇ／ｋｇ（最大２００ｍｇ）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０６４】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、尿路上皮癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、尿路上皮癌を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０６５】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（

ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＭＳＩ－ＨまたはｄＭＭＲ癌を治療するために、成人の場合、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＭＳＩ－ＨまたはｄＭＭＲ癌を治療するために、小児の場合、３週間毎に約２ｍｇ／ｋｇ（最大２００ｍｇ）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０６６】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損大腸癌（ｄＭＭＲ　ＣＲＣを治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＭＳＩ－ＨまたはｄＭＭＲ　ＣＲＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０６７】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、胃癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、胃癌を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０６８】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、食道癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、食道癌を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０６９】
いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮頸癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮頸癌を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０７０】
いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、肝細胞癌（ＨＣＣ）を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＨＣＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０７１】
いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、メルケル細胞癌（ＭＣＣ）を治療するために、成人の場合、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＭＣＣを治療するために、成人の場合、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＭＣＣを治療するために、小児の場合、３週間毎に約２ｍｇ／ｋｇ（最大２００ｍｇ）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０７２】
いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、腎細胞癌（ＲＣＣ）を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＲＣＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで、経口で１日２回のアキシチニブ５ｍｇとともに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態

では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０７３】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮内膜癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮内膜癌を治療するために、ＭＳＩ－ＨまたはｄＭＭＲではない腫瘍に対して、６週間毎に約４００ｍｇで、経口で１日１回のレンバチニブ２０ｍｇとともに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０７４】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高遺伝子変異量（ＴＭＢ－Ｈ）癌を治療するために、成人の場合、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＴＭＢ－Ｈ癌を治療するために、成人の場合、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＴＭＢ－Ｈ癌を治療するために、小児の場合、３週間毎に約２ｍｇ／ｋｇ（最大２００ｍｇ）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０７５】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、皮膚扁平上皮癌（ｃＳＣＣ）を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ｃＳＣＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０７６】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、トリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ）を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＴＮＢＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０７７】

いくつかの実施形態では、患者または対象が成人である場合、すなわち、成人適応症の治療、及び６週間毎の４００ｍｇの追加の投薬レジメンが用いられ得る。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２０７８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、抗ｍ－ＰＤ－１クローンＪ４３（カタログ番号ＢＥ００３３－２）及びＲＭＰ１－１４（カタログ番号ＢＥ０１４６）（ＢｉｏＸ　Ｃｅｌｌ，Ｉｎｃ．，Ｗｅｓｔ　Ｌｅｂａｎｏｎ，ＮＨ　ＵＳＡ）などの市販の抗ＰＤ－１モノクローナル抗体である。いくつかの市販の抗ＰＤ－１抗体が、当業者に知られている。

【２０７９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，３５４，５０９号または米国特許出願公開第２０１０／０２６６６１７　Ａ１号、同第２０１３／０１０８６５１Ａ１号、同第２０１３／０１０９８４３　Ａ２号に開示されている抗体であり、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，２８７，８５６号、同第８，５８０，２４７号、及び同第８，１６８，７５７号、ならびに米国特許出願公開第２００９／００２８８５７　Ａ１号、同第２０１０／０２８５０１３　Ａ１号、同第２０１３／００２２６００Ａ１号、及び同第２０１１／０００８３６９　Ａ１号に記載されている抗ＰＤ－１抗体であり、それらの教示は参照により本明細書に組み込まれる。他の実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，７３５，５５３　Ｂ１号に開示されている抗ＰＤ－１抗体であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ＣＴ－０１１としても知られるピジリズマブであり、これは米国特許第８，６８６，１１９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【２０８０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，９０７，０５３号、同第９，０９６，６４２号、及び同第９，０４４，４４２号、ならびに米国特許出願公開第２０１５／００８７５８１号に記載されるものなどの小分子またはペプチドもしくはペプチド誘導体；米国特許出願公開第２０１５／００７３０２４号に記載されるものなどの１，２，４－オキサジアゾール化合物及び誘導体；米国特許出願公開第２０１５／００７３０４２号に記載されるものなどの環状ペプチド模倣化合物及び誘導体；米国特許出願公開第２０１５／０１２５４９１号に記載されるものなどの環状化合物及び誘導体；国際特許出願公開第ＷＯ２０１５／０３３３０１号に記載されるものなどの１，３，４－オキサジアゾール及び１，３，４－チアジアゾール化合物ならびに誘導体；国際特許出願公開第ＷＯ２０１５／０３６９２７号及び同第ＷＯ２０１５／０４４９０号に記載されるものなどのペプチド系化合物及び誘導体、または米国特許出願公開第２０１４／０２９４８９８号に記載されるものなどの大環状ペプチド系化合物及び誘導体であり得、各々の開示は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ，Ｉｎｃ．から市販されているセミプリマブである。

【２０８１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ及びＰＤ－Ｌ１阻害剤またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ＮＳＣＬＣの治療のための併用療法または共療法として投与される。

【２０８２】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、前療法を受けていない。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、フロントライン療法または初期療法

として投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、本明細書に記載のＴＩＬと併用して、フロントライン療法または初期療法として投与される。

【２０８３】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、当該技術分野で知られている任意のＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２阻害剤、アンタゴニスト、または遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２阻害剤、アンタゴニスト、または遮断剤のうちの１つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、ＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２阻害剤に関して交換可能に使用される。誤解を避けるために、抗体であるＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリアント、複合体、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【２０８４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物、プロセス、及び方法は、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、小分子である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、抗体（すなわち、抗ＰＤ－１抗体）、Ｆａｂ断片を含むその断片、またはその一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２との結合について競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、ＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２との結合について競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２上のエピトープに結合する。

【２０８５】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＰＤ－Ｌ１阻害剤は、化合物が、ＰＤ－Ｌ２受容体を含む他の受容体と結合または相互作用するよりも実質的に低い濃度でＰＤ－Ｌ１と結合または相互作用するという点で、ＰＤ－Ｌ１に対して選択的である。特定の実施形態では、化合物は、ＰＤ－Ｌ２受容体に対するより少なくとも約２倍高い濃度、約３倍高い濃度、約５倍高い濃度、約１０倍高い濃度、約２０倍高い濃度、約３０倍高い濃度、約５０倍高い濃度、約１００倍高い濃度、約２００倍高い濃度、約３００倍高い濃度、または約５００倍高い濃度である結合定数でＰＤ－Ｌ１受容体に結合する。

【２０８６】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＰＤ－Ｌ２阻害剤は、化合物が、ＰＤ－Ｌ１受容体を含む他の受容体と結合または相互作用するよりも実質的に低い濃度でＰＤ－Ｌ２と結合または相互作用するという点で、ＰＤ－Ｌ２に対して選択的である。ある特定の実施形態では、化合物は、ＰＤ－Ｌ１受容体に対するより少なくとも約２倍高い濃度、約３倍高い濃度、約５倍高い濃度、約１０倍高い濃度、約２０倍高い濃度、約３０倍高い濃度、約５０倍高い濃度、約１００倍高い濃度、約２００倍高い濃度、約３００倍高い濃度、または約５００倍高い濃度である結合定数でＰＤ－Ｌ２受容体に結合する。

【２０８７】

いかなる理論にも縛られることなく、腫瘍細胞はＰＤ－Ｌ１を発現し、Ｔ細胞はＰＤ－１を発現すると考えられている。しかしながら、腫瘍細胞によるＰＤ－Ｌ１の発現は、ＰＤ－１またはＰＤ－Ｌ１の阻害剤または遮断剤の有効性には必要とされない。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、ＰＤ－Ｌ１を発現する。他の実施形態では、腫瘍細胞は、ＰＤ－Ｌ１を発現しない。いくつかの実施形態では、方法は、ＴＩＬと組み合わせて、本明細書に記載されるものなどのＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１抗体の組み合わせを含むことができる。ＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１抗体とＴＩＬとの組み合わせの投与は、同時または連続的で

あり得る。

【２０８８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約１００ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約９０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約８０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約７０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約６０ｐＭ以下のＫＤで結合する、約５０ｐＭ以下のＫＤ、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約４０ｐＭ以下のＫＤで結合する、またはヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約３０ｐＭ以下のＫＤで結合するものである。

【２０８９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約７．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約８×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約８．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約９×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約９．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、またはヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約１×１０^{6}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合するものである。

【２０９０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ヒトＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２に約２×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．１×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．２×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．３×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．４×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．５×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．６×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２に約２．７×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、またはヒトＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２に約３×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合するものである。

【２０９１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、約１０ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約９ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約８ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約７ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約６ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約５ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約４ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約３ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約２ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、またはヒトＰＤ－１を遮断し、または約１ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断するものである。

【２０９２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＭＥＤＩ４７３６としても知られるデュルバルマブ（これは、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ　ｐｌｃ．の子会社であるＭｅｄｉｍｍｕｎｅ，ＬＬＣ（Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）から市販されている）

、またはその抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許第８，７７９，１０８号または米国特許出願公開第２０１３／００３４５５９号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。デュルバルマブの臨床的有効性は、Ｐａｇｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．，２０１４，６５，１８５－２０２、Ｂｒａｈｍｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２０１４，３２，５ｓ（補足、要約８０２１）、及びＭｃＤｅｒｍｏｔｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ　Ｒｅｖ．，２０１４，４０，１０５６－６４に記載されている。デュルバルマブの調製及び特性は、米国特許第８，７７９，１０８号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。デュルバルマブのアミノ酸配列を表２０に示す。デュルバルマブモノクローナル抗体は、２２－９６、２２′′－９６′′、２３′－８９′、２３′′′－８９′′′、１３５′－１９５′、１３５′′′－１９５′′′、１４８－２０４、１４８′′－２０４′′、２１５′－２２４、２１５′′′－２２４′′′、２３０－２３０′′、２３３－２３３′′、２６５－３２５、２６５′′－３２５′′、３７１－４２９、及び３７１′′－４２９′におけるジスルフィド連結、ならびにＡｓｎ－３０１及びＡｓｎ－３０１′′におけるＮ－グリコシル化部位を含む。

【２０９３】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、配列番号１７８によって与えられる重鎖及び配列番号１７９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２０９４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、デュルバルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１８０に示される配列を含み、ＰＤ－Ｌ１阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１８１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【２０９５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１８２、配列番号

１８３、及び配列番号１８４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１８５、配列番号１８６、及び配列番号１８７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１上の同じエピトープに結合する。

【２０９６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ペムブロリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－Ｌ１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－Ｌ１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－Ｌ１抗体であり、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。

【２０９７】

【表２１】

表２０．デュルバルマブに関連するＰＤ－Ｌ１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）	
配列番号１７８ デュルバルマブ 重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEFEG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPASIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	60 120 180 240 300 360 420 451
配列番号１７９ デュルバルマブ 軽鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC	60 120 180 240 265
配列番号１８０ デュルバルマブ 可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS S	60 120 121
配列番号１８１ デュルバルマブ 可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIK	60 108
配列番号１８２ デュルバルマブ 重鎖ＣＤＲ１	RYWMS	5
配列番号１８３ デュルバルマブ 重鎖ＣＤＲ２	NIKQDGSEKY YVDSVKG	17
配列番号１８４ デュルバルマブ 重鎖ＣＤＲ３	EGGWFGELAF DY	12
配列番号１８５ デュルバルマブ 軽鎖ＣＤＲ１	RASQRVSSSY LA	12
配列番号１８６ デュルバルマブ 軽鎖ＣＤＲ２	DASSRAT	7
配列番号１８７ デュルバルマブ 軽鎖ＣＤＲ３	QQYGSLPWT	9

【２０９８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＭＳＢ００１０７１８Ｃ（ＭｅｒｃｋＫＧａＡ／ＥＭＤ　Ｓｅｒｏｎｏから市販されている）としても知られるアベルマブ、またはその抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。アベルマブの調製及び特性は、米国特許出願公開第２０１４／０３４１９１７Ａ１号に記載されており、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。アベルマブのアミノ酸配列を表２１に示す。アベルマブは、２２－９６、１４７－２０３、２６４－３２４、３７０－４２８、２２’’－９６’’、１４７’’－２０３’’、２６４’’－３２４’’、及び３７０’’－４２８’’における重鎖内ジスルフィド連結（Ｃ２３－Ｃ１０４）；２２’－９０’、１３８’－１９７’、２２’’’－９０’’’、及び１３８’’’－１９７’’’における軽鎖内ジスルフィド連結（Ｃ２３－Ｃ１０４）；２２３－２１５’及び２２３’’－２１５’’’における重鎖－軽鎖内ジスルフィド連結（ｈ　５－ＣＬ　１２６）；２２９－２２９’’及び２３２－２３２’’における重鎖－重鎖内ジスルフィド連結（ｈ　１１、ｈ　１４）；３００、３００’’におけるＮ－グリコシル化部位（Ｈ　ＣＨ２　Ｎ８４．

４）；フコシル化複合体二分性ＣＨＯ型グリカン；ならびに４５０及び４５０′におけるＨ　ＣＨＳ　Ｋ２　Ｃ末端リジンクリッピングを有する。

【２０９９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、配列番号１８８によって与えられる重鎖及び配列番号１８９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２１００】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アベルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤重鎖可変領域（ＶＨ）は、配列番号１９０に示される配列を含み、ＰＤ－Ｌ１阻害剤軽鎖可変領域（ＶＬ）は、配列番号１９１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【２１０１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１９２、配列番号１９３、及び配列番号１９４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１９５、配列番号１９６、及び配列番号１９７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１上の同じエピトープに結合する。

【２１０２】

いくつかの複合体実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アベルマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－Ｌ１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの複合体実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－Ｌ１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、

グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－Ｌ１抗体であり、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。

【２１０３】

【表２２】

表２１．アベルマブに関連するＰＤ－Ｌ１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）	
配列番号１８８ アベルマブ 重鎖	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
配列番号１８９ アベルマブ 軽鎖	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL GQPKANPTVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS	60 120 180 216
配列番号１９０ アベルマブ 可変重鎖	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS	60 120
配列番号１９１ アベルマブ 可変軽鎖	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL	60 110
配列番号１９２ アベルマブ 重鎖ＣＤＲ１	SYIMM	5
配列番号１９３ アベルマブ 重鎖ＣＤＲ２	SIYPSGGITF YADTVKG	17
配列番号１９４ アベルマブ 重鎖ＣＤＲ３	IKLGTVTTVD Y	11
配列番号１９５ アベルマブ 軽鎖ＣＤＲ１	TGTSSDVGGY NYVS	14
配列番号１９６ アベルマブ 軽鎖ＣＤＲ２	DVSNRPS	7
配列番号１９７ アベルマブ 軽鎖ＣＤＲ３	SSYTSSSTRV	10

【２１０４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＭＰＤＬ３２８０ＡまたはＲＧ７４４

６としても知られるアテゾリズマブ（Ｒｏｃｈｅ　Ｈｏｌｄｉｎｇ　ＡＧ（Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）の子会社であるＧｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．からＴＥＣＥＮＴＲＩＱとして市販されている）、またはその抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許第８，２１７，１４９号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許出願公開第２０１０／０２０３０５６Ａ１号、同第２０１３／００４５２００Ａ１号、同第２０１３／００４５２０１Ａ１号、同第２０１３／００４５２０２Ａ１号、または同第２０１４／００６５１３５Ａ１号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。アテゾリズマブの調製及び特性は、米国特許第８，２１７，１４９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。アテゾリズマブのアミノ酸配列を表２２に示す。アテゾリズマブは、２２－９６、１４５－２０１、２６２－３２２、３６８－４２６、２２′′－９６′′、１４５′′－２０１′′、２６２′′－３２２′′、及び３６８′′－４２６′′における重鎖内ジスルフィド連結（Ｃ２３－Ｃ１０４）；２３′－８８′、１３４′－１９４′、２３′′′－８８′′′、及び１３４′′′－１９４′′′における軽鎖内ジスルフィド連結（Ｃ２３－Ｃ１０４）；２２１－２１４′及び２２１′′－２１４′′′における重鎖－軽鎖内ジスルフィド連結（ｈ　５－ＣＬ　１２６）；２２７－２２７′′及び２３０－２３０′′における重鎖－重鎖内ジスルフィド連結（ｈ　１１、ｈ　１４）；ならびに２９８及び２９８′におけるＮ－グリコシル化部位（Ｈ　ＣＨ２　Ｎ８４．４＞Ａ）を有する。

【２１０５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、配列番号１９８によって与えられる重鎖及び配列番号１９９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２１０６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アテゾリズマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号２００に示される配列を含み、ＰＤ－Ｌ１阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号２０１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番

号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶ$_H$領域及びＶ$_L$領域を含む。

【２１０７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号２０２、配列番号２０３、及び配列番号２０４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２０５、配列番号２０６、及び配列番号２０７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１上の同じエピトープに結合する。

【２１０８】

いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、アテゾリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－Ｌ１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－Ｌ１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－Ｌ１抗体であり、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。

【２１０９】

【表２３】

表２２．アテゾリズマブに関連するＰＤ－Ｌ１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号１９８ アテゾリズマブ 重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYAST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
配列番号１９９ アテゾリズマブ 軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号２００ アテゾリズマブ 可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSA 118
配列番号２０１ アテゾリズマブ 可変軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKR 108
配列番号２０２ アテゾリズマブ 重鎖ＣＤＲ１	GFTFSDSWIH 10
配列番号２０３ アテゾリズマブ 重鎖ＣＤＲ２	AWISPYGGST YYADSVKG 18
配列番号２０４ アテゾリズマブ 重鎖ＣＤＲ３	RHWPGGFDY 9
配列番号２０５ アテゾリズマブ 軽鎖ＣＤＲ１	RASQDVSTAV A 11
配列番号２０６ アテゾリズマブ 軽鎖ＣＤＲ２	SASFLYS 7
配列番号２０７ アテゾリズマブ 軽鎖ＣＤＲ３	QQYLYHPAT 9

【２１１０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許出願公開第２０１４／０３４１９１７Ａ１号に記載されている抗体を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。他の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１への結合についてこれらの抗体のうちのいずれかと競合する抗体も含まれる。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、ＢＭＳ－９３５５５９としても知られるＭＤＸ－１１０５であり、これは米国特許第７，９４３，７４３号に開示されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第７，９４３，７４３号に開示されている抗ＰＤ－Ｌ１抗体から選択される。

【２１１１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＩＮＶＩＶＯＭＡＢ抗ｍ－ＰＤ－Ｌ１クローン１０Ｆ．９Ｇ２（カタログ番号ＢＥ０１０１、Ｂｉｏ Ｘ Ｃｅｌｌ，Ｉｎｃ．，Ｗｅｓｔ Ｌｅｂａｎｏｎ，ＮＨ，ＵＳＡ）などの市販のモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、ＡＦＦＹＭＥＴＲＩＸ ＥＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥ（ＭＩＨ１）などの市販のモノクローナル抗体である。いくつかの市販の抗ＰＤ

－Ｌ１抗体が、当業者に知られている。
【２１１２】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ＢＩＯＬＥＧＥＮＤ２４Ｆ．１０Ｃ１２マウスＩｇＧ２ａ、κアイソタイプ（カタログ番号３２９６０２　Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、ＳＩＧＭＡ抗ＰＤ－Ｌ２抗体（カタログ番号ＳＡＢ３５００３９５，Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）、または当業者に知られている他の市販のＰＤ－Ｌ２抗体などの市販のモノクローナル抗体である。
【２１１３】
Ｃ．ＣＴＬＡ－４阻害剤及び／またはＣＤ４０アゴニストとの組み合わせ
いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるＴＩＬ療法は、治療的ＴＩＬ集合単独による治療を含んでもよく、またはＴＩＬ及び１つ以上のＣＴＬＡ－４阻害剤を含む併用治療を含んでもよい。
【２１１４】
細胞傷害性Ｔリンパ球抗原４（ＣＴＬＡ－４）は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、ヘルパーＴ細胞の表面で発現する。ＣＴＬＡ－４は、ＣＤ２８依存性Ｔ細胞活性化の負の制御因子であり、適応免疫応答のチェックポイントとして機能する。Ｔ細胞共刺激タンパク質ＣＤ２８と同様に、ＣＴＬＡ－４結合抗原は、細胞上でＣＤ８０及びＣＤ８６を提示する。ＣＴＬＡ－４は抑制シグナルをＴ細胞に伝達し、ＣＤ２８は刺激シグナルを伝達する。ヒトＣＴＬＡ－４に対するヒト抗体は、ウイルス感染及び細菌感染を治療または予防すること、ならびにがんを治療するためのものなど、多くの疾患状態における免疫刺激調節因子として記載されている（ＷＯ０１／１４４２４及びＷＯ００／３７５０４）。イピリムマブ（ＭＤＸ－０１０）及びトレメリムマブ（ＣＰ－６７５，２０６）を含むが、これらに限定されない、様々な種類の固形腫瘍の治療のためのいくつかの完全ヒト抗ヒトＣＴＬＡ－４モノクローナル抗体（ｍＡｂ）が、臨床試験で研究されている。
【２１１５】
いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、当技術分野で知られている任意のＣＴＬＡ－４阻害剤またはＣＴＬＡ－４遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるＣＴＬＡ－４阻害剤または遮断剤のうちの１つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、ＣＴＬＡ－４阻害剤に関して互換的に使用される。誤解を避けるために、抗体であるＣＴＬＡ－４阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリアント、複合体、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、ＣＴＬＡ－４阻害剤への本明細書での言及はまた、小分子化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。
【２１１６】
本発明の方法で使用するための好適なＣＴＬＡ－４阻害剤には、抗ＣＴＬＡ－４抗体、ヒト抗ＣＴＬＡ－４抗体、マウス抗ＣＴＬＡ－４抗体、哺乳動物抗ＣＴＬＡ－４抗体、ヒト化抗ＣＴＬＡ－４抗体、モノクローナル抗ＣＴＬＡ－４抗体、ポリクローナル抗ＣＴＬＡ－４抗体、キメラ抗ＣＴＬＡ－４抗体、ＭＤＸ－０１０（イピリムマブ）、トレメリムマブ、抗ＣＤ２８抗体、抗ＣＴＬＡ－４アドネクチン、抗ＣＴＬＡ－４ドメイン抗体、一本鎖抗ＣＴＬＡ－４断片、重鎖抗ＣＴＬＡ－４断片、軽鎖抗ＣＴＬＡ－４断片、共刺激経路を刺激するＣＴＬＡ－４の阻害剤、ＰＣＴ公開第ＷＯ２００１／０１４４２４号に開示される抗体、ＰＣＴ公開第ＷＯ２００４／０３５６０７号に開示される抗体、米国公開第２００５／０２０１９９４号に開示される抗体、ならびに付与された欧州特許第ＥＰ　１２１２４２２　Ｂ１号に開示された抗体が含まれるが、これらに限定されず、各々の開示が参照により本明細書に組み込まれる。さらなるＣＴＬＡ－４抗体は、米国特許第５，８１１，０９７号、同第５，８５５，８８７号、同第６，０５１，２２７号、及び同第６，９８４，７２０号、ＰＣＴ公開第ＷＯ０１／１４４２４号及び同第ＷＯ００／３７５０４

号、ならびに米国公開第２００２／００３９５８１号及び同第２００２／０８６０１４号に記載されており、各々の開示が参照により本明細書に組み込まれる。本発明の方法で使用することができる他の抗ＣＴＬＡ－４抗体には、例えば、ＷＯ９８／４２７５２、米国特許第６，６８２，７３６号及び同第６，２０７，１５６号、Ｈｕｒｗｉｔｚ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９５（１７）：１００６７－１００７１（１９９８）、Ｃａｍａｃｈｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２２（１４５）：Ａｂｓｔｒａｃｔ Ｎｏ．２５０５（２００４）（抗体ＣＰ－６７５２０６）、Ｍｏｋｙｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，５８：５３０１－５３０４（１９９８）、ならびに米国特許第５，９７７，３１８号、同第６，６８２，７３６号、同第７，１０９，００３号、及び同第７，１３２，２８１号に開示されるものが含まれ、これらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【２１１７】

さらなるＣＴＬＡ－４阻害剤には、ＣＤ２８抗原がその同族リガンドと結合する能力を妨害すること、ＣＴＬＡ－４がその同族リガンドと結合する能力を阻害すること、共刺激経路を介してＴ細胞応答を増強すること、Ｂ７がＣＤ２８及び／またはＣＴＬＡ－４と結合する能力を破壊すること、Ｂ７が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、ＣＤ８０がＣＤ２８及び／またはＣＴＬＡ－４と結合する能力を破壊すること、ＣＤ８０が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、ＣＤ８６がＣＤ２８及び／またはＣＴＬＡ－４と結合する能力を破壊すること、ＣＤ８６が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、及び共刺激経路を一般に活性化されることから破壊することが可能である任意の阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。これには、共刺激経路の他のメンバーのなかでもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４の小分子阻害剤、共刺激経路の他のメンバーのなかでもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４に対する抗体、共刺激経路の他のメンバーのなかでもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４に指向するアンチセンス分子、共刺激経路の他のメンバーのなかでもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４に指向するアドネクチン、他のＣＴＬＡ－４阻害剤のなかでも共刺激経路の他のメンバーのなかでもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４のＲＮＡｉ阻害剤（一本鎖及び二本鎖の両方）が必ず含まれる。

【２１１８】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、約10^{-6}Ｍ以下、10^{-7}Ｍ以下、10^{-8}Ｍ以下、10^{-9}Ｍ以下、10^{-10}Ｍ以下、10^{-11}Ｍ以下、10^{-12}Ｍ以下、例えば、10^{-13}Ｍ～10^{-16}Ｍ、またはエンドポイントとして前述の値のうちのいずれか２つを有する任意の範囲内のＫｄでＣＴＬＡ－４に結合する。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、同じアッセイを使用して比較した場合、イピリムマブのＫｄの１０倍以下のＫｄでＣＴＬＡ－４と結合する。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、同じアッセイを使用して比較した場合、イピリムマブとほぼ同じかまたはそれ以下（例えば、最大１０倍低いか、または最大１００倍低い）のＫｄでＣＴＬＡ－４と結合する。いくつかの実施形態では、ＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４結合のＣＴＬＡ－４阻害剤による阻害のＩＣ５０値は、同じアッセイを使用して比較した場合、それぞれＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４結合のイピリムマブ媒介阻害より１０倍以下で大きい。いくつかの実施形態では、ＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４結合のＣＴＬＡ－４阻害剤による阻害のＩＣ５０値は、同じアッセイを使用して比較した場合、それぞれＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４結合のイピリムマブ媒介性阻害とほぼ同じかまたはそれ以下（例えば、最大１０倍低い、または最大１００倍低い）である。

【２１１９】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、好適な対照と比較して、少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、または１００％、例えば、５０％～７５％、７５％～９０％、または９０％～１００％の間でＣＴＬＡ－４の発現を阻害する、及び／または生物学的活性を減少させるのに十分な量で使用

される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４経路阻害剤は、好適な対照と比較して、少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、または１００％、例えば、５０％～７５％、７５％～９０％、または９０％～１００％の間でＣＴＬＡ－４のＣＤ８０、ＣＤ８６、またはその両方との結合を減少させることにより、ＣＴＬＡ－４の生物学的活性を減少させるのに十分な量で使用される。対象となる薬剤の効果を評価または定量化する状況下における好適な対照は、典型的には、対象となる薬剤、例えば、ＣＴＬＡ－４経路阻害剤に曝露されていないか、または治療されていない（または僅かな量に曝露されているか、または治療されている）同等の生物学的系（例えば、細胞または対象）である。いくつかの実施形態では、生物学的系は、それ自体の対照として機能し得る（例えば、生物学的系は、薬剤への曝露または治療の前に評価され得、曝露または治療が開始または終了した後の状態と比較され得る。いくつかの実施形態では、歴史的対照が使用され得る。

【２１２０】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブ（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ　Ｃｏ．からＹｅｒｖｏｙとして市販されている）、またはそのバイオシミラー、抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。当該技術分野で知られているように、イピリムマブは、機能的ヒトレパートリーを生成するための重鎖及び軽鎖をコードするヒト遺伝子を有するトランスジェニックマウスに由来する完全ヒトＩｇＧ　１κ抗体である、抗ＣＴＬＡ－４抗体を指す。イピリムマブは、そのＣＡＳ登録番号４７７２０２－００－９及びＰＣＴ公開第ＷＯ０１／１４４２４号で参照することもでき、その全体がすべての目的で参照により本明細書に組み込まれる。それは抗体１０ＤＩとして開示されている。具体的には、イピリムマブは、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域（配列番号２１１を含む軽鎖可変領域を有し、配列番号２１０を含む重鎖可変領域を有する）を含む。イピリムマブの薬学的組成物は、イピリムマブ及び１つ以上の希釈剤、ビヒクル、または賦形剤を含有するすべての薬学的に許容される組成物を含む。イピリムマブを含有する薬学的組成物の例は、国際特許出願公開第ＷＯ２００７／６７９５９号に記載されている。イピリムマブは、静脈内（ＩＶ）投与され得る。

【２１２１】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、配列番号２０８によって与えられる重鎖及び配列番号２０９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２１２２】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブの重鎖及び軽鎖のＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号２１０に示される配列を含み、ＣＴＬＡ－４阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号２１１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域

を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【２１２３】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２１２、配列番号２１３、及び配列番号２１４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２１５、配列番号２１６、及び配列番号２１７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＣＴＬＡ－４上の同じエピトープに結合する。

【２１２４】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブに関して薬物規制当局によって承認されたＣＴＬＡ－４バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、抗ＣＴＬＡ－４抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。イピリムマブのアミノ酸配列を表２３に示す。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＣＴＬＡ－４抗体であり、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。抗ＣＴＬＡ－４抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。

【２１２５】

【表２４】

表２３．イピリムマブのアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号２０８ イピリムマブ重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTH 225
配列番号２０９ イピリムマブ軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP 120 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL 180 TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC 215
配列番号２１０ イピリムマブ可変重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSS 118
配列番号２１１ イピリムマブ可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIK 108
配列番号２１２ イピリムマブ重鎖ＣＤＲ１	GFTFSSYT 8
配列番号２１３ イピリムマブ重鎖ＣＤＲ２	TFISYDGNNK 10
配列番号２１４ イピリムマブ重鎖ＣＤＲ３	ARTGWLGPFD Y 11
配列番号２１５ イピリムマブ軽鎖ＣＤＲ１	QSVGSSY 7
配列番号２１６	GAF 3

【２１２６】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約３．５ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約４．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約５．５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約６．５ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約７．５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約８．５ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約９．５ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２１２７】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約２００ｍｇ～約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約２００ｍｇ、約２２０ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２６０ｍｇ、約２８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３２０ｍｇ、約３４０ｍｇ、約３６０ｍｇ、約３８０ｍｇ、約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４４０ｍｇ、約４６０ｍｇ、約４８０ｍｇ、または約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１

、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２１２８】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、または６週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２１２９】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために、３週間毎に約ｍｇ／ｋｇで最大４用量投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２１３０】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、黒色腫のアジュバント治療のために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、約１０ｍｇ／ｋｇで３週間毎に４用量、続いて１０ｍｇ／ｋｇで１２週間毎に最大３年間投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２１３１】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、進行性腎細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約１ｍｇ／ｋｇで投与され、直後に同じ日にニボルマブ３ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量投与される。いくつかの実施形態では、４用量の組み合わせを完了した後、ニボルマブは、進行性腎細胞癌及び／または腎細胞癌の標準的な投薬レジメンに従って単剤として投与され得る。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２１３２】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性大腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性大腸癌を治療するために、約１ｍｇ／ｋｇで静脈内に３０分間にわたって投与され、直後に同じ日にイピリムマブ３ｍｇ／ｋｇを静脈内に３０分間にわたって３週間毎に４用量投与される。いくつかの実施形態では、４用量の組み合わせを完了した後、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性大腸癌の標準的な投薬レジメンに従って推奨されるように単剤としてニボルマブを投与する。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２１３３】
いくつかの実施形態では、イピリムマブは、肝細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、肝細胞癌を治療するために、約３ｍｇ／ｋｇで静脈内に３０分間にわたって投与され、直後に同じ日にニボルマブ１ｍｇ／ｋｇを静脈内に３０分間にわたって３週間毎に４用量投与される。いくつかの実施形態では、４用量の組み合わせを完了した後、肝細胞癌のための標準的な投薬レジメンに従って単剤としてニボルマブを投与する。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。
【２１３４】
いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、６週間毎に約１ｍｇ／ｋｇで、２週間毎に３ｍｇ／ｋｇのニボルマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、６週間毎に約１ｍｇ／ｋｇで、３週間毎に３６０ｍｇのニボルマブ及び２サイクルのプラチナダブレット化学療法とともに投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。
【２１３５】
いくつかの実施形態では、イピリムマブは、悪性胸膜中皮腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、悪性胸膜中皮腫を治療するために、６週間毎に約１ｍｇ／ｋｇで、３週間毎に３６０ｍｇのニボルマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。
【２１３６】
トレメリムマブ（ＣＰ－６７５，２０６としても知られる）は、完全ヒトＩｇＧ２モノクローナル抗体であり、ＣＡＳ番号７４５０１３－５９－６を有する。トレメリムマブは、米国特許第６，６８２，７３６号（参照により本明細書に組み込まれる）において抗体１１．２．１として開示されている。トレメリムマブの重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号２１８及び２１９に示す。トレメリムマブは、黒色腫及び乳癌を含む種々の腫瘍の治療のための臨床試験において研究されており、トレメリムマブは、０．０１及び１５ｍｇ／ｋｇの用量範囲で４週間または１２週間毎に単回用量または複数回用量として静脈内投与される。本発明によって提供されるレジメンでは、トレメリムマブは、局所的に、特に皮内または皮下に投与される。皮内または皮下投与されるトレメリムマブの有効量は、典型的には、人当たり５～２００ｍｇ／用量の範囲である。いくつかの実施形態では、トレメリムマブの有効量は、用量当たり人当たり１０～１５０ｍｇ／用量の範囲である。いくつかの特定の実施形態では、トレメリムマブの有効量は、人当たり約１０、２５、３７．５、４０、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５、または２００ｍｇ／用量である。
【２１３７】
いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、配列番号２１８によって与えられる重鎖及び配列番号２１９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－

４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２１３８】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブの重鎖及び軽鎖のＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号２２０に示される配列を含み、ＣＴＬＡ－４阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号２２１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【２１３９】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２２２、配列番号２２３、及び配列番号２２４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２２５、配列番号２２６、及び配列番号２２７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＣＴＬＡ－４上の同じエピトープに結合する。

【２１４０】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＣＴＬＡ－４バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、抗ＣＴＬＡ－４抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。トレメリムマブのアミノ酸配列を表２４に示す。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＣＴＬＡ－４抗体であり、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。抗ＣＴＬＡ－４抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異

なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。

【２１４１】

【表２５】

表２４．トレメリムマブのアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号２１８ トレメリムマブ重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP RGATLYYYYY GMDVWGQGTT 120 VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA 180 VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVERKCCVE CPPCPAPPVA 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF 300 NSTFRVVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
配列番号２１９ トレメリムマブ軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIN SYLDWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYSTPFTFGP GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号２２０ トレメリムマブ可変重鎖	GVVQPGRSLR LSCAASGFTF SSYGMHWVRQ APGKGLEWVA VIWYDGSNKY YADSVKGRFT 60 ISRDNSKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCARD PRGATLYYYY YGMDVWGQGT TVTVSSASTK 120 GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVH 167
配列番号２２１ トレメリムマブ可変軽鎖	PSSLSASVGD RVTITCRASQ SINSYLDWYQ QKPGKAPKLL IYAASSLQSG VPSRFSGSGS 60 GTDFTLTISS LQPEDFATYY CQQYYSTPFT FGPGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS 120 GTASVVCLLN NFYPREAKV 139
配列番号２２２ トレメリムマブ重鎖ＣＤＲ１	GFTFSSYGMH 10
配列番号２２３ トレメリムマブ重鎖ＣＤＲ２	VIWYDGSNKY YADSV 15
配列番号２２４ トレメリムマブ重鎖ＣＤＲ３	DPRGATLYYY YYGMDV 16
配列番号２２５ トレメリムマブ軽鎖ＣＤＲ１	RASQSINSYL D 11
配列番号２２６ トレメリムマブ軽鎖ＣＤＲ２	AASSLQS 7
配列番号２２７ トレメリムマブ軽鎖ＣＤＲ３	QQYYSTPFT 9

【２１４２】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約３．５ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約４．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約５．５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約６．５ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約７．５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約８．５ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約９．５ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、

２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２１４３】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約２００ｍｇ～約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約２００ｍｇ、約２２０ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２６０ｍｇ、約２８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３２０ｍｇ、約３４０ｍｇ、約３６０ｍｇ、約３８０ｍｇ、約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４４０ｍｇ、約４６０ｍｇ、約４８０ｍｇ、または約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２１４４】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、または６週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２１４５】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、Ａｇｅｎｕｓからのザリフレリマブ、またはそのバイオシミラー、抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。ザリフレリマブは、完全ヒトモノクローナル抗体である。ザリフレリマブには、Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ａｂｓｔｒａｃｔｓ　Ｓｅｒｖｉｃｅ（ＣＡＳ）登録番号２１４８３２１－６９－９が割り当てられており、ＡＧＥＮ１８８４としても知られている。ザリフレリマブの調製及び特性は、米国特許第１０，１４４，７７９号及び米国特許出願公開第２０２０／００２４３５０　Ａ１号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【２１４６】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、配列番号２２８によって与えられる重鎖及び配列番号２２９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２１４７】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ザリフレリマブの重鎖及び軽鎖のＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤重鎖

可変領域（V_H）は、配列番号２３０に示される配列を含み、ＣＴＬＡ－４阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号２３１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【２１４８】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２３１、配列番号２３３、及び配列番号２３４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２３５、配列番号２３６、及び配列番号２３７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＣＴＬＡ－４上の同じエピトープに結合する。

【２１４９】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ザリフレリマブに関して薬物規制当局によって承認されたＣＴＬＡ－４バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、抗ＣＴＬＡ－４抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。ザリフレリマブのアミノ酸配列を表２５に示す。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＣＴＬＡ－４抗体であり、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。抗ＣＴＬＡ－４抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。

【２１５０】

【表２６】

表２５．ザリフレリマブのアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号２２８ ザリフレリマブ 重鎖	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
配列番号２２９ ザリフレリマブ 軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKP GQAPRLLIYG ASTRATGIPD 60 RFSGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号２３０ ザリフレリマブ 可変重鎖	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSS 118
配列番号２３１ ザリフレリマブ 可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKP GQAPRLLIYG ASTRATGIPD 60 RFSGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQ GTKVEIK 107
配列番号２３２ ザリフレリマブ 重鎖ＣＤＲ１	GFTFSSYS 8
配列番号２３３ ザリフレリマブ 重鎖ＣＤＲ２	ISSSSSYI 8
配列番号２３４ ザリフレリマブ 重鎖ＣＤＲ３	ARVGLMGPFD I 11
配列番号２３５ ザリフレリマブ 軽鎖ＣＤＲ１	QSVSRY 6
配列番号２３６ ザリフレリマブ 軽鎖ＣＤＲ２	GAS 3
配列番号２３７ ザリフレリマブ 軽鎖ＣＤＲ３	QQYGSSPWT 9

【２１５１】

さらなる抗ＣＴＬＡ－４抗体の例には、ＡＧＥＮ１１８１、ＢＭＳ－９８６２１８、ＢＣＤ－１４５、ＯＮＣ－３９２、ＣＳ１００２、ＲＥＧＮ４６５９、及びＡＤＧ１１６が含まれるが、これらに限定されず、これらは当業者に即知である。

【２１５２】

いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、以下の特許公開のうちのいずれかに開示される抗ＣＴＬＡ－４抗体である：ＵＳ２０１９／００４８０９６Ａ１、ＵＳ２０２０／０２２３９０７、ＵＳ２０１９／０２０１３３４、ＵＳ２０１９／０２０１３３４、ＵＳ２００５／０２０１９９４、ＥＰ１２１２４２２Ｂ１、ＷＯ２０１８／２０４７６０、ＷＯ２０１８／２０４７６０、ＷＯ２００１／０１４４２４、ＷＯ２００４／０３５６０７、ＷＯ２００３／０８６４５９、ＷＯ２０１２／１２０１２５、ＷＯ２０００／０３７５０４、ＷＯ２００９／１００１４０、ＷＯ２００６／０９６４９、ＷＯ２００５／０９２３８０、ＷＯ２００７／１２３７３７、ＷＯ２００６／０２９２１９、ＷＯ２０１０／０９７９５９７、ＷＯ２００６／１２１６８、及びＷＯ１９９７／０２０５７４（これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる）。さらなるＣＴＬＡ－４抗体は、米国特

許第５，８１１，０９７号、同第５，８５５，８８７号、同第６，０５１，２２７号、及び同第６，９８４，７２０号、ＰＣＴ公開第ＷＯ０１／１４４２４号及び同第ＷＯ００／３７５０４号、ならびに米国公開第２００２／００３９５８１号及び同第２００２／０８６０１４号、及び／または米国特許第５，９７７，３１８号、同第６，６８２，７３６号、同第７，１０９，００３号、及び同第７，１３２，２８１号に記載されており、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、例えば、ＷＯ９８／４２７５２、米国特許第６，６８２，７３６号及び同第６，２０７，１５６号、Ｈｕｒｗｉｔｚ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９９８，９５，１００６７－１００７１（１９９８）、Ｃａｍａｃｈｏ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．，２００４，２２，１４５（Ａｂｓｔｒａｃｔ Ｎｏ．２５０５（２００４）（抗体ＣＰ－６７５２０６）、またはＭｏｋｙｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，１９９８，５８，５３０１－５３０４（１９９８）に開示されており、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。

【２１５３】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ＷＯ１９９６／０４０９１５（参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるＣＴＬＡ－４リガンドである。

【２１５４】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ＣＴＬＡ－４発現の核酸阻害剤である。例えば、抗ＣＴＬＡ－４ＲＮＡｉ分子は、ＰＣＴ公開第ＷＯ１９９９／０３２６１９号及び同第ＷＯ２００１／０２９０５８号、米国公開第２００３／００５１２６３号、同第２００３／００５５０２０号、同第２００３／００５６２３５号、同第２００４／２６５８３９号、同第２００５／０１００９１３号、同第２００６／００２４７９８号、同第２００８／００５０３４２号、同第２００８／００８１３７３号、同第２００８／０２４８５７６号、同第２００８／０５５４４３号、及び／または米国特許第６，５０６，５５９号、同第７，２８２，５６４号、同第７，５３８，０９５号、及び同第７，５６０，４３８号（参照により本明細書に組み込まれる）において記載された分子の形態を取り得る。いくつかの事例では、抗ＣＴＬＡ－４ＲＮＡｉ分子は、欧州特許第ＥＰ１３０９７２６号（参照により本明細書に組み込まれる）において記載された二本鎖ＲＮＡｉ分子の形態を取る。いくつかの事例では、抗ＣＴＬＡ－４ＲＮＡｉ分子は、米国特許第７，０５６，７０４号及び同第７，０７８，１９６号（参照により本明細書に組み込まれる）において記載された二本鎖ＲＮＡｉ分子の形態を取る。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、国際特許出願公開第ＷＯ２００４／０８１０２１（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されたアプタマーである。

【２１５５】

他の実施形態では、本発明の抗ＣＴＬＡ－４ＲＮＡｉ分子は、米国特許第５，８９８，０３１号、同第６，１０７，０９４号、同第７，４３２，２４９号、及び同第７，４３２，２５０号、ならびに欧州出願第０９２８２９０号（参照により本明細書に組み込まれる）において記載されたＲＮＡ分子である。

【２１５６】

いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるＴＩＬ療法は、治療的ＴＩＬ集団単独による治療を含んでもよく、またはＴＩＬ及び１つ以上のＣＤ４０アゴニストを含む併用治療を含んでもよい。

【２１５７】

ＣＤ４０Ｌは、ＣＤ４０リガンドまたはＣＤ１５４とも呼ばれ、主に活性化Ｔ細胞上で発現するタンパク質であり、分子のＴＮＦスーパーファミリーのメンバーである。それは、標的細胞型に応じて多くの効果をもたらす、抗原提示細胞（ＡＰＣ）上のＣＤ４０に結合する。ＣＤ４０Ｌは、共刺激分子として機能し、Ｔ濾胞ヘルパー細胞（T_{FH}細胞）と呼ばれるＴ細胞のサブセットで特に重要である。T_{FH}細胞では、ＣＤ４０Ｌは、Ｂ細胞表面上のＣＤ４０と係合することによって、Ｂ細胞の成熟及び機能を促進し、したがって、細胞間通信を促進する。ＣＤ４０Ｌの非存在はまた、胚中心の形成を停止させ、したが

って、適応免疫系における重要なプロセスである抗体親和性成熟を禁止する。

【２１５８】

いくつかの実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、抗ＣＤ４０抗体であってもよい。誤解を避けるために、抗体であるＣＤ４０アゴニストへの本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリアント、複合体、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、ＣＤ４０阻害剤への本明細書での言及はまた、小分子化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【２１５９】

本発明の方法で使用するための好適なＣＤ４０アゴニストには、抗ＣＤ４０抗体、ヒト抗ＣＤ４０抗体、マウス抗ＣＤ４０抗体、哺乳動物抗ＣＤ４０抗体、ヒト化抗ＣＤ４０抗体、モノクローナル抗ＣＤ４０抗体、ポリクローナル抗ＣＤ４０抗体、キメラ抗ＣＤ４０抗体、米国特許出願公開第２０１０／０２９７１５４号、国際公開第２００４／００９６１５号、米国特許第１０，８４４，１３１号、日本特許第５７５２８６５号、同第６８０７８９０号、同第６８４２４８８号、同第６８０７８９０号、及び韓国特許第１０１４０３９１０号（それらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる）に開示される組成物が含まれるが、これらに限定されない。

【２１６０】

いくつかの実施形態では、ＣＤ４０阻害剤は、約10^{-6}Ｍ以下、10^{-7}Ｍ以下、10^{-8}Ｍ以下、10^{-9}Ｍ以下、10^{-10}Ｍ以下、10^{-11}Ｍ以下、10^{-12}Ｍ以下、例えば、10^{-13}Ｍ～10^{-16}Ｍ、またはエンドポイントとして前述の値のうちのいずれか２つを有する任意の範囲内のＫｄでＣＤ４０に結合する。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、同じアッセイを使用して比較した場合、イピリムマブのＫｄの１０倍以下のＫｄでＣＤ４０と結合する。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、同じアッセイを使用して比較した場合、ＣＤ４０Ｌとほぼ同じかまたはそれ以下（例えば、最大１０倍低いか、または最大１００倍低い）のＫｄでＣＤ４０と結合する。

【２１６１】

いくつかの実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、好適な対照と比較して、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、または１００％、例えば、５０％～７５％、７５％～９０％、または９０％～１００％の間でＣＤ４０を活性化する、及び／またはＣＤ４０の生物学的活性を増加させるのに十分な量で使用される。いくつかの実施形態では、生物学的系は、それ自体の対照として機能し得る（例えば、生物学的系は、薬剤への曝露または治療の前に評価され得、曝露または治療が開始または終了した後の状態と比較され得る。いくつかの実施形態では、歴史的対照が使用され得る。

【２１６２】

【表２７】

表２６．ＣＤ４０Ｌのアミノ酸配列

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号２３８ ＣＤ４０Ｌ	MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQ RCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQW AEKGYYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAAN THSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL

【２１６３】

Ｄ．ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、及びＣＴＬＡ－４阻害剤との組み合わせ

いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるＴＩＬ療法は、治療的ＴＩＬ集団単独による治療を含んでもよく、またはＴＩＬならびに１つ以上のＰＤ－１及び／ま

たはＰＤ－Ｌ１及び／またはＣＴＬＡ－４阻害剤を含む併用治療を含んでもよい。
【２１６４】
いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるＴＩＬ療法は、１つ以上のＰＤ－１阻害剤と組み合わせた治療的ＴＩＬ集団による治療を含む。いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるＴＩＬ療法は、１つ以上のＰＤ－Ｌ１阻害剤と組み合わせた治療的ＴＩＬ集団による治療を含む。いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるＴＩＬ療法は、１つ以上のＣＴＬＡ－４阻害剤と組み合わせた治療的ＴＩＬ集団による療法を含む。いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるＴＩＬ療法は、１つ以上のＰＤ－１阻害剤及び１つ以上のＰＤ－Ｌ１阻害剤と組み合わせた治療的ＴＩＬ集団による治療を含む。いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるＴＩＬ療法は、１つ以上のＰＤ－Ｌ１阻害剤及び１つ以上のＣＴＬＡ－４阻害剤と組み合わせた治療的ＴＩＬ集団による治療を含む。いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるＴＩＬ療法は、１つ以上のＣＴＬＡ－４阻害剤及び１つ以上のＰＤ－１阻害剤と組み合わせた治療的ＴＩＬ集団による治療を含む。いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるＴＩＬ療法は、１つ以上のＰＤ－１阻害剤、１つ以上のＰＤ－Ｌ１阻害剤、及び１つ以上のＣＴＬＡ－４阻害剤と組み合わせた治療的ＴＩＬ集団による治療を含む。本明細書に記載されるものなど、当該技術分野で知られている任意の好適なＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、またはＣＴＬＡ－４阻害剤を使用してもよい。
【２１６５】
Ｅ．患者のリンパ球枯渇プレコンディショニング
いくつかの実施形態では、本発明は、ＴＩＬ集団でがんを治療する方法を含み、患者は、本開示によるＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的化学療法で前治療された患者のがんの治療に使用するためのＴＩＬ集団を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、注入による投与用である。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド６０ｍｇ／ｋｇ／日で２日間（ＴＩＬ注入の２７日前及び２６日前）、ならびにフルダラビン２５ｍｇ／ｍ^2／日で５日間（ＴＩＬ注入の２７日前～２３日前）である。いくつかの実施形態では、本開示による骨髄非破壊的化学療法及びＴＩＬ注入（０日目）後、患者は、生理学的許容範囲まで８時間毎に７２０，０００ＩＵ／ｋｇで静脈内的にＩＬ－２（ＰＲＯＬＥＵＫＩＮとして市販されている、アルデスロイキン）の静脈内注入を受ける。ある特定の実施形態では、ＴＩＬ集団は、ＩＬ－２と組み合わせてがんを治療する際に使用するためのものであり、ＩＬ－２は、ＴＩＬ集団の後に投与される。
【２１６６】
実験結果は、腫瘍特異的Ｔリンパ球の養子移入前のリンパ球枯渇が、制御性Ｔ細胞及び免疫系の競合要素（「サイトカインシンク」）を排除することによって治療有効性を増強する上で重要な役割を果たすことを示している。したがって、本発明のいくつかの実施形態は、本発明のＴＩＬを導入する前に、患者に対してリンパ球枯渇ステップ（「免疫抑制コンディショニング」と称されることもある）を利用する。
【２１６７】
一般に、リンパ球枯渇は、フルダラビンまたはシクロホスファミド（マホスファミドと称される活性形態）及びそれらの組み合わせの投与を使用して達成される。かかる方法は、Ｇａｓｓｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１１，６０，７５－８５、Ｍｕｒａｎｓｋｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｌｉｎ．Ｐｒａｃｔ．Ｏｎｃｏｌ．，２００６，３，６６８－６８１、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００８，２６，５２３３－５２３９、及びＤｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００５，２３，２３４６－２３５７に記載されており、これらはすべて、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。
【２１６８】
いくつかの実施形態では、フルダラビンは、０．５μｇ／ｍＬ～１０μｇ／ｍＬのフル

ダラビン濃度で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、１μｇ／ｍＬのフルダラビン濃度で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日以上投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、１０ｍｇ／ｋｇ／日、１５ｍｇ／ｋｇ／日、２０ｍｇ／ｋｇ／日、２５ｍｇ／ｋｇ／日、３０ｍｇ／ｋｇ／日、３５ｍｇ／ｋｇ／日、４０ｍｇ／ｋｇ／日、または４５ｍｇ／ｋｇ／日の投与量で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で２～７日間投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で４～５日間投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、２５ｍｇ／ｋｇ／日で４～５日間投与される。

【２１６９】

いくつかの実施形態では、シクロホスファミドの活性形態であるマホスファミドは、シクロホスファミドの投与により、０．５μｇ／ｍＬ～１０μｇ／ｍＬの濃度で取得される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドの活性形態であるマホスファミドは、シクロホスファミドの投与により、１μｇ／ｍＬの濃度で取得される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日以上投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、１００ｍｇ／ｍ^2／日、１５０ｍｇ／ｍ^2／日、１７５ｍｇ／ｍ^2／日、２００ｍｇ／ｍ^2／日、２２５ｍｇ／ｍ^2／日、２５０ｍｇ／ｍ^2／日、２７５ｍｇ／ｍ^2／日、または３００ｍｇ／ｍ^2／日の投与量で投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、静脈内（すなわち、ｉ．ｖ．）投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で２～７日間投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、２５０ｍｇ／ｍ^2／日で４～５日間ｉ．ｖ．投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、２５０ｍｇ／ｍ^2／日で４日間ｉ．ｖ．投与される。

【２１７０】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、患者にフルダラビンとシクロホスファミドを一緒に投与することによって行われる。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、２５ｍｇ／ｍ^2／日でｉ．ｖ．投与され、シクロホスファミドは、２５０ｍｇ／ｍ^2／日で４日間にわたってｉ．ｖ投与される。

【２１７１】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われる。

【２１７２】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【２１７３】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約５０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを約２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【２１７４】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約５０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを約２０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【２１７５】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約４０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを約２０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与する

ことによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【２１７６】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約４０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを約１５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計３日間で行われる。

【２１７７】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、及びフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与することによって行われる。

【２１７８】

いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。いくつかの実施形態では、メスナは、１５ｍｇ／ｋｇで投与される。メスナが注入されるいくつかの実施形態では、連続的に注入される場合、メスナは、約２時間にわたってシクロホスファミドを注入することができ（－５日目及び／または－４日目）、次いで、各シクロホスファミド用量と同時に開始する２４時間にわたって残りの２２時間で３ｍｇ／ｋｇ／時間の速度で注入することができる。

【２１７９】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、第３のＴＩＬ集団を患者に投与した翌日から開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。

【２１８０】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、第３のＴＩＬ集団を患者に投与したのと同じ日に開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。

【２１８１】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、５日間のプレコンディショニング治療を含む。いくつかの実施形態では、該日は、－５日から－１日、または０日から４日として示される。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－４日目（すなわち、０日目及び１日目）にシクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－４日目（すなわち、０日目及び１日目）に静脈内シクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－４日目（すなわち、０日目及び１日目）に６０ｍｇ／ｋｇの静脈内シクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。いくつかの実施形態では、レジメンは、フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、静脈内フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、２５ｍｇ／ｍ^{2}の静脈内フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－１日目（すなわち、０～４日目）に２５ｍｇ／ｍ^{2}の静脈内フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－１日目（すなわち、０～４日目）に２５ｍｇ／ｍ^{2}の静脈内フルダラビンをさらに含む。

【２１８２】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、及びフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与するステップを含む。

【２１８３】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与するステップを含む。

【２１８４】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミド

を６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む。

【２１８５】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、及びフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む。

【２１８６】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、及びフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で１日間投与するステップを含む。

【２１８７】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む。

【２１８８】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、及びフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む。

【２１８９】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表２７に従って投与される。

【２１９０】

【表２８】

表２７．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 25mg/m^2/日	X	X	X	X	X					
TIL 注入						X				

【２１９１】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表２８に従って投与される。

【２１９２】

【表２９】

表２８．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X							
メスナ(必要に応じて)	X	X							
フルダラビン 25mg/m²/日	X	X	X	X					
TIL 注入					X				

【２１９３】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表２９に従って投与される。
【２１９４】
【表３０】

表２９．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X						
メスナ(必要に応じて)	X	X						
フルダラビン 25mg/m²/日	X	X	X					
TIL 注入				X				

【２１９５】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３０に従って投与される。
【２１９６】
【表３１】

表３０．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 25mg/m²/日			X	X	X					
TIL 注入						X				

【２１９７】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３１に従って投与される。
【２１９８】

【表３２】

表３１．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 30mg/m²/日	X	X	X	X	X					
TIL 注入						X				

【２１９９】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３２に従って投与される。
【２２００】
【表３３】

表３２．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X							
メスナ(必要に応じて)	X	X							
フルダラビン 30mg/m²/日	X	X	X	X					
TIL 注入					X				

【２２０１】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３３に従って投与される。
【２２０２】
【表３４】

表３３．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X						
メスナ(必要に応じて)	X	X						
フルダラビン 30mg/m²/日	X	X	X					
TIL 注入				X				

【２２０３】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３４に従って投与される。
【２２０４】

【表３５】

表３４．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 30mg/m²/日			X	X	X					
TIL 注入						X				

【２２０５】
いくつかの実施形態では、骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンの前述の実施形態で使用されるＴＩＬ注入は、本明細書に記載の任意のＴＩＬ組成物であり得、また本明細書に記載されるようなＩＬ－２レジメンの追加及び併用療法（ＰＤ－１及び／またはＰＤ－Ｌ１阻害剤など）の投与であり得る。
【２２０６】
Ｆ．ＩＬ－２レジメン
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、高用量ＩＬ－２レジメンを含み、高用量ＩＬ－２レジメンは、治療的ＴＩＬ集団の治療上有効な部分を投与した翌日から静脈内投与されるアルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリアントを含み、アルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリアントは、許容範囲まで８時間毎に最大１４用量にわたって、０．０３７ｍｇ／ｋｇまたは０．０４４ｍｇ／ｋｇ ＩＵ／ｋｇ（患者の体重）の用量で１５分のボーラス静脈内注入を使用して投与される。９日間の休止後、このスケジュールは、さらに１４用量、合計最大２８用量にわたって繰り返され得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、１、２、３、４、５、または６用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、最大６用量の最大投与量で投与される。
【２２０７】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、デクレッシェンドＩＬ－２レジメンを含む。デクレッシェンドＩＬ－２レジメンは、Ｏ’Ｄａｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．１９９９，１７，２７５２－６１、及びＥｔｏｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ ２０００，８８，１７０３－９（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。いくつかの実施形態では、デクレッシェンドＩＬ－２レジメンは、６時間にわたって静脈内投与される１８×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}アルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアント、続いて１２時間にわたって静脈内投与される１８×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}、続いて２４時間にわたって静脈内投与される１８×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}、続いて７２時間かけて静脈内投与される４．５×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}を含む。この治療サイクルは、２８日毎に最大４サイクル繰り返され得る。いくつかの実施形態では、デクレッシェンドＩＬ－２レジメンは、１日目の１８，０００，０００ＩＵ／ｍ^{2}、２日目の９，０００，０００ＩＵ／ｍ^{2}、３日目及び４日目の４，５００，０００ＩＵ／ｍ^{2}を含む。
【２２０８】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、低用量ＩＬ－２レジメンを含む。Ｄｏｍｉｎｇｕｅｚ－Ｖｉｌｌａｒ ａｎｄ Ｈａｆｌｅｒ，Ｎａｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２０００，１９，６６５－６７３、Ｈａｒｔｅｍａｎｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．２０１３，１，２９５－３０５、及びＲｏｓｅｎｚｗａｉｇ，ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｈｅｕｍ．Ｄｉｓ．２０１９，７８，２０９－２１７（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている低用量ＩＬ－２レジメンを含む、当該技術分野で知られている任意の低用量ＩＬ－２レジメン

を使用することができる。いくつかの実施形態では、低用量ＩＬ－２レジメンは、m^2当たり１８×１０^{6}ＩＵのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを２４時間当たり５日間の連続的注入として、その後ＩＬ－２療法なしで２～６日間、その後任意選択でアルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリアントを静脈内にさらに５日間、２４時間当たりm^2当たり１８×１０^{6}ＩＵの連続的注入として、その後任意選択でＩＬ－２療法なしで３週間投与することを含み、その後追加のサイクルが投与され得る。

【２２０９】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、最大６用量の最大投与量で投与される。いくつかの実施形態では、高用量ＩＬ－２レジメンは、小児の使用に適合される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に６００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に５００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に４００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に５００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に３００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に２００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に１００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。

【２２１０】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４、または２１日毎にペグ化ＩＬ－２を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４、または２１日毎に、ベンペガルデスロイキン、またはその断片、バリアント、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

【２２１１】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４、または２１日毎に、ＴＨＯＲ－７０７、またはその断片、バリアント、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

【２２１２】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、ＴＩＬの投与後に、ネムバロイキンアルファ、またはその断片、バリアント、もしくはバイオシミラーの投与を含む。ある特定の実施形態では、患者にネムバロイキンを１日、２日、４日、６日、７日、１４日または２１日毎に、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で投与される。

【２２１３】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、抗体骨格に移植されたＩＬ－２断片の投与を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、ＩＬ－２低親和性受容体と結合する抗体－サイトカイン移植タンパク質の投与を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（V_H）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（V_L）と、V_HまたはV_LのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含み、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（V_H）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（V_L）と、V_HまたはV_LのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含み、ＩＬ－２分子は、ムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優

先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４または２１日毎に、配列番号２９及び配列番号３８からなる群から選択される重鎖と、配列番号３７及び配列番号３９からなる群から選択される軽鎖と、を含む抗体、またはその断片、バリアント、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

【２２１４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質は、アルデスロイキン（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ（登録商標））または同等の分子などであるがこれらに限定されない野生型ＩＬ－２分子よりも長い血清半減期を有する。

【２２１５】

いくつかの実施形態では、骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンの前述の実施形態で使用されるＴＩＬ注入は、本明細書に記載の任意のＴＩＬ組成物であり得、また、ＴＩＬ注入の代わりにＭＩＬ及びＰＢＬの注入、ならびに本明細書に記載のＩＬ－２レジメンの追加及び併用療法（ＰＤ－１及び／またはＰＤ－Ｌ１阻害剤及び／またはＣＴＬＡ－４阻害剤など）の投与を含み得る。

【実施例】

【２２１６】

本明細書に包含される実施形態は、これから以下の実施例を参照して説明される。これらの実施例は、例示のみを目的として提供されており、本明細書に包含される本開示は、決してこれらの実施例に限定されると解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書で提供される教示の結果として明らかになるありとあらゆる変形を包含すると解釈されるべきである。

【２２１７】

実施例１：ＲＥＰ前プロセス及びＲＥＰプロセス用の培地の調製

この実施例は、様々な固形腫瘍に由来する腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の培養を含むプロトコルで使用するための組織培養培地の調製のための手順を説明する。この培地を、本出願及び他の実施例に記載のＴＩＬのうちのいずれかの調製に使用することができる。

【２２１８】

ＣＭ１の調製。以下の試薬を冷蔵から取り出し、それらを３７℃の水浴中で温めた（ＲＰＭＩ１６４０、ヒトＡＢ血清、２００ｍＭ　Ｌ－グルタミン）。ろ過される容量に適した０．２μｍフィルターユニットの上部に各成分を添加することによって、以下の表３５に従ってＣＭ１培地を調製した。４℃で保存する。

【２２１９】

【表３６】

表３５．ＣＭ１の調製

成分	最終濃度	最終体積 500mL	最終体積 IL
RPMI1640	NA	450mL	900mL
ヒト AB 血清、熱不活性化 10%	50mL	100mL	
200mM L-グルタミン	2mM	5mL	10mL
55mM BME	55μM	0.5mL	1mL
50mg/mL 硫酸ゲンタマイシン	50μg/mL	0.5mL	1mL

【２２２０】

使用日に、３７℃の水浴中で必要量のＣＭ１を事前に温め、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を追加した。

【２２２１】
表３６に従って必要に応じて追加の補充を行った。
【２２２２】
【表３７】

表３６．必要に応じたＣＭ１の追加の補充。

サプリメント	ストック濃度	希釈	最終濃度
GlutaMAX(商標)	200mM	1:100	2mM
ペニシリン/ストレプトマイシン	10,000U/mL ペニシリン 10,000μg/mL ストレプトマイシン	1:100	100U/mL ペニシリン 100μg/mL ストレプトマイシン
アンホテリシンB	250μg/mL	1:100	2.5μg/mL

【２２２３】
ＣＭ２の調製
調製したＣＭ１を冷蔵庫から取り出すか、または新鮮なＣＭ１を調製した。ＡＩＭ－Ｖ（登録商標）を冷蔵庫から取り出し、調製したＣＭ１を滅菌培地ボトル内で同等体積のＡＩＭ－Ｖ（登録商標）と混合することによって、必要な量のＣＭ２を調製した。使用日に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をＣＭ２培地に追加した。使用日に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む十分な量のＣＭ２を作製した。ＣＭ２培地ボトルにその名前、調製者のイニシャル、濾過／調製日、２週間の有効期限をラベル付けし、組織培養に必要になるまで４℃で保存した。
【２２２４】
ＣＭ３の調製
使用が必要になった日にＣＭ３を調製した。ＣＭ３は、ＡＩＭ－Ｖ（登録商標）培地と同じであり、使用日に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した。ＩＬ－２ストック溶液をＡＩＭ－Ｖのボトルまたはバッグに直接追加することによって、実験のニーズに十分な量のＣＭ３を調製した。穏やかに振盪することによって十分に混合した。ボトルに、ＡＩＭ－Ｖに追加した直後に「３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２」とラベル付けする。過剰なＣＭ３が存在する場合は、培地名、調製者のイニシャル、培地を調製した日、及びその有効期限（調製後７日）でラベル付けしたボトル内で４℃で保管した。４℃で７日間保管した後、ＩＬ－２を補充した培地を廃棄した。
【２２２５】
ＣＭ４の調製
ＣＭ４は、ＣＭ３と同じであり、２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）（最終濃度）を追加で補充した。１ＬのＣＭ３毎に、１０ｍＬの２００ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）を添加する。ＩＬ－２ストック溶液及びＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）ストック溶液をＡＩＭ－Ｖのボトルまたはバッグに直接追加することによって、実験のニーズに十分な量のＣＭ４を調製する。穏やかに振盪することによって十分に混合した。ボトルに、ＡＩＭ－Ｖに追加した直後に「３０００ＩＬ／ｍＬ　ＩＬ－２及びＧｌｕｔａＭＡＸ」とラベル付けした。過剰なＣＭ４が存在する場合、培地名、「ＧｌｕｔａＭＡＸ」、及びその有効期限（調製後７日）でラベル付けしたボトル内で４℃で保管した。４℃で７日間保管した後、ＩＬ－２を補充した培地を廃棄した。
【２２２６】
実施例２：ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１サイトカインカクテルの使用
この実施例は、本明細書の実施例のうちのいずれかのＴＩＬプロセスと組み合わせた、追加のＴ細胞成長因子として機能するＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１サイトカイ

ンの使用を説明する。
【２２２７】
本明細書に記載のプロセスを使用して、ＴＩＬは、培養の開始時に、実験の一方のアームにおいてＩＬ－２の存在下で腫瘍から、及びもう一方のアームではＩＬ－２の代わりにＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の組み合わせから成長させることができる。ＲＥＰ前の完了時に、培養物を、拡張、表現型、機能（ＣＤ１０７ａ＋及びＩＦＮ－γ）、及びにＴＣＲ　Ｖβレパートリーについて評価した。ＩＬ－１５及びＩＬ－２１は、本明細書の他の場所及びＳａｎｔｅｇｏｅｔｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄ．，２０１３，１１，３７に記載されている。
【２２２８】
結果は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１処理条件でのＣＤ４$^+$及びＣＤ８$^+$細胞の両方で、ＩＬ－２のみの条件と比較して増強したＴＩＬ拡張（＞２０％）が観察できることを示し得る。ＩＬ－２単独培養物と比較して、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１で処理した培養物から取得されたＴＩＬには、歪んだＴＣＲ　Ｖβレパートリーを伴う主にＣＤ８$^+$集団への歪みがあった。ＩＦＮ－γ及びＣＤ１０７ａは、ＩＬ－２単独で処理したＴＩＬと比較して、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１で処理したＴＩＬで上昇した。
【２２２９】
実施例３：ガンマ線照射末梢単核細胞の個々のロットを適格性確認する
この実施例は、本明細書に記載の例示的な方法において同種異系フィーダー細胞として使用するためのガンマ線照射末梢単核細胞（ＰＢＭＣ、単核細胞またはＭＮＣとしても知られる）の個々のロットを適格性確認するための簡略化された手順を説明する。
【２２３０】
放射線照射された各ＭＮＣフィーダーロットは、個々のドナーから調製した。各ロットまたはドナーは、精製された抗ＣＤ３（クローンＯＫＴ３）抗体及びインターロイキン－２（ＩＬ－２）の存在下でＲＥＰ内のＴＩＬを拡張する能力について個々にスクリーニングした。さらに、フィーダー細胞の各ロットを、ＴＩＬを添加せずに試験し、受けたガンマ線の線量がそれらを複製不全にするのに十分であることを確認した。
【２２３１】
ＴＩＬのＲＥＰには、ガンマ線を照射し、成長を停止させたＭＮＣフィーダー細胞が必要である。フィーダーＭＮＣの膜受容体は、抗ＣＤ３（クローンＯＫＴ３）抗体に結合し、ＲＥＰフラスコ内のＴＩＬに架橋し、ＴＩＬを刺激して拡張させる。フィーダーロットは、個々のドナーから採取した全血の白血球アフェレーシスから調製した。白血球アフェレーシス産物を、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ上で遠心分離し、洗浄し、照射し、ＧＭＰ条件下で凍結保存した。
【２２３２】
ＴＩＬ療法を受けた患者には、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）を引き起こす可能性があるため、生存可能なフィーダー細胞を注入しないことが重要である。したがって、フィーダー細胞は、細胞にガンマ線を照射することによって成長を停止させ、再培養時に二本鎖ＤＮＡ切断が起こり、ＭＮＣ細胞の細胞生存性が喪失する。
【２２３３】
フィーダーロットを、２つの基準：１）共培養でＴＩＬを１００倍超拡張する能力、及び２）複製不全で評価した。
【２２３４】
フィーダーロットを、直立したＴ２５組織培養フラスコ内で培養された２つの主要なＲＥＰ前　ＴＩＬ株を利用して、ｍｉｎｉ－ＲＥＰ形式で試験した。各ＴＩＬ株は、ＲＥＰでの活性化に応答して増殖する能力が独特であるため、フィーダーロットを、２つの異なるＴＩＬ株に対して試験した。対照として、上記の基準を満たすことが歴史的に示されている多くの放射線照射されたＭＮＣフィーダー細胞を、試験ロットと並行して実行した。
【２２３５】

１回の実験で試験されたすべてのロットが同等の試験を受けることを保証するために、すべての条件及びすべてのフィーダーロットを試験するために、同じＲＥＰ前ＴＩＬ株の十分なストックが利用可能であった。

【２２３６】

試験したフィーダー細胞の各ロットに、合計６つのＴ２５フラスコがあった：ＲＥＰ前ＴＩＬ株番号１（２フラスコ）、ＲＥＰ前ＴＩＬ株番号２（２フラスコ）、及びフィーダー対照（２フラスコ）。ＴＩＬ株番号１及び番号２を含むフラスコは、フィーダーロットがＴＩＬを拡張する能力を評価した。フィーダー対照フラスコは、フィーダーロットの複製不全を評価した。

【２２３７】

Ａ．実験プロトコル

－２／３日目、ＴＩＬ株の解凍ＣＭ２培地を調製し、ＣＭ２を３７℃の水浴中で温める。３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した４０ｍＬのＣＭ２を調製する。使用まで保温する。ＩＬ－２を含まない２０ｍＬの予熱したＣＭ２を、使用したＴＩＬ株の名前がラベル付けされた２本の５０ｍＬコニカルチューブの各々に入れる。ＬＮ２ストレージから２つの指定されたＲＥＰ前ＴＩＬ株を取り出し、バイアルを組織培養室に移した。少量の氷が残るまで、３７℃の水浴内の密封されたジッパーストレージバッグ内にバイアルを入れて解凍した。

【２２３８】

無菌トランスファーピペットを使用して、各バイアルの内容物を、調製した、ラベル付けされた５０ｍＬのコニカルチューブ中の２０ｍＬのＣＭ２に直ちに移した。細胞を洗浄し、４００×ＣＦで５分間遠心分離するために、ＩＬ－２なしのＣＭ２を使用して４０ｍＬにＱＳ。上清を吸引し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補充された５ｍＬの温かいＣＭ２に再懸濁した。

【２２３９】

自動セルカウンターを使用して細胞を計数するために、少量のアリコート（２０μＬ）を重複して取り出した。計数を記録した。カウントしながら、ＴＩＬ細胞を含む５０ｍＬのコニカルチューブを、加湿した３７℃、５％　CO_2インキュベーターに入れ、ガス交換を可能にするためにキャップを緩めた。細胞濃度を決定し、ＴＩＬを、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充したＣＭ２中で1×10^6細胞／ｍＬに希釈した。

【２２４０】

ｍｉｎｉ－ＲＥＰの０日目まで、加湿した３７℃のインキュベーターで必要な数のウェルにおいて、２４ウェル組織培養プレートの１ウェル当たり２ｍＬで培養した。混乱及び潜在的な相互汚染を避けるために、別々の２４ウェル組織培養プレートで異なるＴＩＬ株を培養した。

【２２４１】

０日目、Ｍｉｎｉ－ＲＥＰを開始する試験されるフィーダーロットの数に十分なＣＭ２培地を調製した。（例えば、一度に４つのフィーダーロットを試験するために、８００ｍＬのＣＭ２培地を調製した）。上記で調製したＣＭ２の一部を分注し、それを細胞の培養のために３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補充した。（例えば、一度に４つのフィーダーロットを試験するために、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む５００ｍＬのＣＭ２培地を調製する）。

【２２４２】

相互汚染を防ぐために各ＴＩＬ株を別々に操作し、ＴＩＬ培養物を入れた２４ウェルプレートをインキュベーターから取り出し、ＢＳＣに移した。

【２２４３】

無菌トランスファーピペットまたは１００～１０００μＬピペッター及びチップを使用して、約１ｍＬの培地を、使用されるＴＩＬの各ウェルから取り出し、２４ウェル組織培養プレートの未使用のウェルに入れる。

【２２４４】

新鮮な無菌トランスファーピペットまたは１００～１０００μＬピペッター及びチップを使用して、残りの培地をウェル内のＴＩＬと混合して細胞を再懸濁し、次いで細胞懸濁液を、ＴＩＬロット名のラベルが付いた５０ｍＬコニカルチューブに移し、容量を記録した。

【２２４５】

予備の培地でウェルを洗浄し、その容量を同じ５０ｍＬコニカルチューブに移した。細胞を４００×ＣＦで回転させて、細胞ペレットを収集する。培地上清を吸引除去し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含有する２～５ｍＬのＣＭ２培地に細胞ペレットを再懸濁し（採取したウェルの数及びペレットのサイズに基づいて使用される容量）、容量は、１．３×10^6細胞／ｍＬを超える濃度を保証するのに十分である必要がある。

【２２４６】

血清学的ピペットを使用して、細胞懸濁液を十分に混合し、容量を記録した。自動セルカウンターを使用して細胞を計数するために、２００μＬを取り出した。カウントしながら、ＴＩＬ細胞を含む５０ｍＬのコニカルチューブを、加湿した５％　CO_2、３７℃インキュベーターに入れ、ガス交換を可能にするためにキャップを緩めた。計数を記録した。

【２２４７】

ＴＩＬ細胞を含有する５０ｍＬのコニカルチューブをインキュベーターから取り出し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補充された温かいＣＭ２中、１．３×10^6細胞／ｍＬの濃度でそれらの細胞を再懸濁した。キャップを緩めた状態で、５０ｍＬのコニカルチューブをインキュベーターに戻した。

【２２４８】

第２のＴＩＬ株について、上記のステップを繰り返した。

【２２４９】

ＴＩＬを実験用のＴ２５フラスコに入れる直前に、ＴＩＬを、以下の通り１：１０に希釈して１．３×10^5細胞／ｍＬの最終濃度にした。

【２２５０】

ＭＡＣＳ　ＧＭＰ　ＣＤ３ピュア（ＯＫＴ３）作用溶液を調製するＯＫＴ３のストック溶液（１ｍｇ／ｍＬ）を４℃の冷蔵庫から取り出し、ＢＳＣに入れた。ｍｉｎｉ－ＲＥＰの培地では、最終濃度３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３を使用した。

【２２５１】

実験の各Ｔ２５フラスコ内の２０ｍＬに対して６００ｎｇのＯＫＴ３が必要であり、これは、２０ｍＬ毎に６０μＬの１０μｇ／ｍＬ溶液、または各フィーダーロットについて試験した６つのフラスコすべてで３６０μＬに相当する。

【２２５２】

試験した各フィーダーロットについて、４００μＬの１：１００希釈の１ｍｇ／ｍＬ　ＯＫＴ３を、１０μｇ／ｍＬの作業濃度で作製した（例えば、４つのフィーダーロットを一度に試験する場合、１６００μＬの１：１００希釈の１ｍｇ／ｍＬ　ＯＫＴ３：１６μＬの１ｍｇ／ｍＬ　ＯＫＴ３＋３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１．５８４ｍＬのＣＭ２培地を作製する）。

【２２５３】

Ｔ２５フラスコを調製するフィーダー細胞を調製する前に、各フラスコにラベルを付け、フラスコにＣＭ２培地を充填した。フラスコを３７℃の加湿した５％　CO_2インキュベーターに入れ、残りの成分を添加するのを待つ間、培地を保温した。一旦フィーダー細胞が調製されると、各フラスコ内のＣＭ２に成分が添加される。

【２２５４】

さらなる情報を表３７に提供する。

【２２５５】

【表３８】

表３７．溶液情報。

構成要素	共培養フラスコ内の容量	対照(フィーダーのみ)フラスコ内の容量
CM2 + 3000 IU/mL IL-2	18mL	19mL
MNC: CM2+3000IU IL-2 中 1.3×10^7/mL (最終濃度 1.3×10^7/フラスコ)	1mL	1mL
OKT3: CM2=3000IU IL-2 中 10μL/mL	60μL	60μL
TIL: 3000IU の IL-2 を含む CM2 中の 1.3×10^5/mL (最終濃度 1.3×10^5/フラスコ)	1mL	0

【２２５６】

フィーダー細胞を調製する。このプロトコルについて試験されたロット当たり７８×１０^{6}フィーダー細胞の最小値が必要であった。ＳＤＢＢによって凍結された各１ｍＬバイアルは、凍結時に１００×１０^{6}個の生細胞を有していた。液体N_2ストレージからの解凍時の５０％の回収率を仮定すると、ロット当たり少なくとも２つの１ｍＬバイアルのフィーダー細胞を解凍して、各ＲＥＰに推定１００×１０^{6}個の生細胞を与えることが推奨された。あるいは、１．８ｍＬバイアルで供給された場合、１つのバイアルだけで十分なフィーダー細胞が提供された。

【２２５７】

フィーダー細胞を解凍する前に、試験される各フィーダーロットにＩＬ－２を含まないおよそ５０ｍＬのＣＭ２を予熱した。指定されたフィーダーロットバイアルをＬＮ２ストレージから取り出し、ジッパーストレージバッグに入れ、氷上に置いた。３７℃の水浴に浸すことによって、閉じたジッパーストレージバッグ内のバイアルを解凍した。バイアルをジッパーバッグから取り出し、７０％　ＥｔＯＨでスプレーまたはワイプし、ＢＳＣに移した。

【２２５８】

トランスファーピペットを使用して、フィーダーバイアルの内容物を、５０ｍＬのコニカルチューブ中の３０ｍＬの温かいＣＭ２に直ちに移した。バイアルを少量のＣＭ２で洗浄して、バイアル内の残留細胞を除去し、４００×ＣＦで５分間遠心分離した。上清を吸引し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を加えた４ｍＬの温かいＣＭ２に再懸濁した。自動セルカウンターを使用して細胞を計数するために、２００μＬを取り出した。計数を記録した。

【２２５９】

３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を加えた温かいＣＭ２中、１．３×１０^{7}細胞／ｍＬで細胞を再懸濁した。ＴＩＬ細胞を１．３×１０^{6}細胞／ｍＬから１．３×１０^{5}細胞／ｍＬに希釈した。

【２２６０】

共培養物を準備する。ＴＩＬ細胞を１．３×１０^{6}細胞／ｍＬから１．３×１０^{5}細胞／ｍＬに希釈した。４．５ｍＬのＣＭ２培地を１５ｍＬのコニカルチューブに追加した。インキュベーターからＴＩＬ細胞を取り出し、１０ｍＬの血清ピペットを使用して十分に再懸濁した。１．３×１０^{6}細胞／ｍＬのＴＩＬ懸濁液から０．５ｍＬの細胞を取り出し、１５ｍＬのコニカルチューブ中の４．５ｍＬの培地に添加した。ＴＩＬストックバイア

ルをインキュベーターに戻した。よく混ぜた。第２のＴＩＬ株に対して繰り返した。

【２２６１】

単一フィーダーロット用に予熱した培地を入れたフラスコを、インキュベーターからＢＳＣに移した。１ｍＬのピペットチップで数回上下にピペッティングすることによってフィーダー細胞を混合し、そのフィーダーロットの各フラスコに１ｍＬ（１．３×10^7細胞）を移した。６０μＬのＯＫＴ３作業ストック（１０μｇ／ｍＬ）を各フラスコに追加した。２つの対照フラスコをインキュベーターに戻した。

【２２６２】

各ＴＩＬロットの１ｍＬ（１．３×10^5）を、対応するラベルの付いたＴ２５フラスコに移した。フラスコをインキュベーターに戻し、直立させてインキュベートした。５日目まで乱さなかった。試験したすべてのフィーダーロットについて、この手順を繰り返した。

【２２６３】

５日目、培地変更３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含むＣＭ２を調製した。各フラスコに１０ｍＬが必要である。１０ｍＬピペットを使用して、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１０ｍＬの温かいＣＭ２を各フラスコに移した。フラスコをインキュベーターに戻し、７日目まで直立させてインキュベートした。試験したすべてのフィーダーロットについて繰り返した。

【２２６４】

７日目、採取インキュベーターからフラスコを取り出し、ＢＳＣに移し、フラスコの底部の細胞層を乱さないように注意する。フラスコの底部で成長する細胞を乱すことなく、各試験フラスコから１０ｍＬの培地を取り出し、対照フラスコの各々から１５ｍＬの培地を取り出した。

【２２６５】

１０ｍＬの血清ピペットを使用して、残りの培地に細胞を再懸濁し、よく混合して細胞の塊をすべて破壊した。ピペッティングすることによって細胞懸濁液を完全に混合した後、細胞計数のために２００μＬを取り出した。自動セルカウンター装置とともに適切な標準操作手順を使用して、ＴＩＬを計数した。７日目に計数を記録した。試験したすべてのフィーダーロットについて、この手順を繰り返した。

【２２６６】

フィーダー対照フラスコは、複製不全について評価し、ＴＩＬを含むフラスコは、０日目からの倍率拡張について評価した。

【２２６７】

７日目、フィーダー対照フラスコの１４日目までの継続フィーダー対照フラスコの７日目の計数を完了した後、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５ｍＬの新鮮なＣＭ２培地を対照フラスコの各々に追加した。対照フラスコをインキュベーターに戻し、１４日目まで直立位置でインキュベートした。

【２２６８】

１４日目、フィーダー対照フラスコの長期非増殖インキュベーターからフラスコを取り出し、ＢＳＣに移し、フラスコの底部の細胞層を乱さないように注意した。フラスコの底部で成長する細胞を乱すことなく、各対照フラスコからおよそ１７ｍＬの培地を取り出した。５ｍＬの血清ピペットを使用して、残りの培地に細胞を再懸濁し、よく混合して細胞の塊をすべて破壊した。各フラスコについて、容量を記録した。

【２２６９】

ピペッティングすることによって細胞懸濁液を完全に混合した後、細胞計数のために２００μＬを取り出した。ＴＩＬは、自動セルカウンター装置と併せて適切な標準操作手順を使用して計数し、計数を記録した。試験したすべてのフィーダーロットについて、この手順を繰り返した。

【２２７０】

Ｂ．結果及び承認基準プロトコル

結果ガンマ線照射の線量は、フィーダー細胞を複製不全にするのに十分であった。すべてのロットは、評価基準を満たすことが予想され、また０日目と比較して、ＲＥＰ培養の７日目に残っているフィーダー細胞の総有効数の低減を示した。すべてのフィーダーロットは、ＲＥＰ培養の７日目までのＴＩＬ成長の１００倍拡張の評価基準を満たすことが予想された。フィーダー対照フラスコの１４日目の計数は、７日目に見られた非増殖傾向を継続すると予想された。

【２２７１】

承認基準フィーダー細胞の各ロットについて試験された各複製ＴＩＬ株について、以下の承認基準が満たされた。承認基準は、以下の表３８に示すように、２倍であった。

【２２７２】

【表３９】

表３８．承認基準の実施形態。

試験	承認基準
MNC の照射及び複製不全	7 日目及び 14 日目に成長は観察されなかった
TIL 拡張	各 TIL の少なくとも 100 倍の拡張(最低 1.3×10^7 個の生細胞)

【２２７３】

３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養した場合に、ＭＮＣフィーダー細胞の複製を不全にするのに十分な放射線量を評価した。複製不全は、ＲＥＰの７日目及び１４日目の自動細胞計数によって決定された総生細胞数（ＴＶＣ）によって評価した。

【２２７４】

承認基準は、「成長なし」であり、これは、ＲＥＰの０日目に培養された最初の生細胞数から７日目及び１４日目に総生細胞数が増加していないことを意味する。

【２２７５】

フィーダー細胞がＴＩＬ拡張をサポートする能力を評価した。ＴＩＬ成長は、ＲＥＰの０日目の培養開始からＲＥＰの７日目までの生細胞の倍率拡張の観点から測定された。自動細胞計数によって評価されるように、７日目に、ＴＩＬ培養物は最低１００倍の拡張を達成した（すなわち、ＲＥＰの０日目に培養された生ＴＩＬ細胞の総数の１００倍超）。

【２２７６】

承認基準を満たさないＭＮＣフィーダーロットの偶発性試験ＭＮＣフィーダーロットが上で概説された承認基準のうちのいずれかを満たさなかった場合は、以下のステップを実行してロットを再試験し、単純な実験者エラーを原因として除外する。

【２２７７】

ロットの衛星試験バイアルが２つ以上残っている場合は、ロットを再試験した。ロットの衛星試験バイアルが１つ残っているか、まったく残っていない場合、上記の承認基準に従ってロットは失敗であった。

【２２７８】

適格となるには、問題のロット及び対照ロットが、上記の承認基準を達成する必要があった。これらの基準を満たすと、ロットは使用のために放出される。

【２２７９】

実施例４：ＩＬ－２ストック溶液の調製

この実施例は、精製されて凍結乾燥された組換えヒトインターロイキン－２を、ｒｈＩＬ－２の使用を含むものを含む、本出願及び実施例に記載されるものすべてを含む、さらなる組織培養プロトコルでの使用に好適なストック試料に溶解するプロセスを説明する。

【２２８０】
手順。０．２％酢酸溶液（ＨＡｃ）を調製した。２９ｍＬの滅菌水を、５０ｍＬのコニカルチューブに移した。１ｍＬの１Ｎ酢酸を、５０ｍＬのコニカルチューブに追加した。チューブを２～３回反転させながら十分に混合した。Ｓｔｅｒｉｆｌｉｐフィルターを使用した濾過によってＨＡｃ溶液を滅菌した。
【２２８１】
ＰＢＳ中の１％　ＨＳＡを調製する。４ｍＬの２５％　ＨＳＡストック溶液を、１５０ｍＬの滅菌フィルターユニット内の９６ｍＬのＰＢＳに追加した。溶液を濾過した。４℃で保管した。調製したｒｈＩＬ－２の各バイアルについて、フォームに記入する。
【２２８２】
ｒｈＩＬ－２ストック溶液を調製した（最終濃度６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）。ｒｈＩＬ－２の各ロットは異なり、必要な情報は、以下のような製造業者の分析証明書（ＣＯＡ）に見出された：１）バイアル当たりのｒｈＩＬ－２の質量（ｍｇ）、２）ｒｈＩＬ－２の比活性（ＩＵ／ｍｇ）、及び３）推奨０．２％　ＨＡｃ再構成体積（ｍＬ）。
【２２８３】
以下の等式を使用して、ｒｈＩＬ－２ロットに必要な１％ＨＳＡの体積を計算した。
【２２８４】
【数１】

$$\left(\frac{\text{バイアル質量}(mg)\ x\ \text{生物活性}\ (\frac{IU}{mg})}{6x10^{6}\ \frac{IU}{mL}}\right) - \text{HAc体積}(mL) = 1\%\text{HSA体積}\ (mL)$$

【２２８５】
例えば、ｒｈＩＬ－２ロット１０２００１２１（Ｃｅｌｌｇｅｎｉｘ）のＣＯＡによると、１ｍｇバイアルの比活性は、２５×１０^{6}ＩＵ／ｍｇである。ｒｈＩＬ－２を２ｍＬの０．２％ＨＡｃ中で再構成することが推奨される。
【２２８６】
【数２】

$$\left(\frac{1mg\ x\ 25x10^{6}\ \frac{IU}{mg}}{6x10^{6}\ \frac{IU}{mL}}\right) - 2mL = 2.167mL\ HSA$$

【２２８７】
ＩＬ－２バイアルのゴム栓をアルコールワイプで拭いた。３ｍＬシリンジに取り付けた１６Ｇ針を使用して、推奨体積の０．２％　ＨＡｃをバイアルに注入した。針を抜くときに栓が外れないように注意した。バイアルを３回反転させ、すべての粉末が溶解するまで回転させた。栓を慎重に取り外し、アルコールワイプ上に置いた。計算された容量の１％ＨＳＡをバイアルに添加した。
【２２８８】
ｒｈＩＬ－２溶液の保管。短期保管（７２時間未満）の場合、４℃でバイアルを保管した。長期保管（７２時間超）の場合、バイアルをより小さい体積に等分し、使用の準備が整うまで－２０℃でクライオバイアル内で保管した。凍結／解凍サイクルを回避した。調製日から６ヶ月後に有効期限が切れた。Ｒｈ－ＩＬ－２ラベルに、ベンダー及びカタログ番号、ロット番号、有効期限、オペレーターのイニシャル、濃度、ならびにアリコート体

積を含めた。

【２２８９】

実施例５：凍結保存プロセス

この実施例では、ＣｒｙｏＭｅｄ制御速度冷凍庫、モデル７４５４（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、本明細書に記載の手順で調製したＴＩＬの凍結保存プロセス方法について説明する。

【２２９０】

使用した機器は以下の通りであった：アルミニウムカセットホルダーラック（ＣＳ７５０フリーザーバッグに対応）、７５０ｍＬバッグ用凍結保存カセット、低圧（２２ｐｓｉ）液体窒素タンク、冷蔵庫、熱電対センサー（バッグ用リボンタイプ）、及びＣｒｙｏＳｔｏｒｅ ＣＳ７５０冷凍バッグ（ＯｒｉＧｅｎ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。

【２２９１】

凍結プロセスは、核形成から－２０℃まで０．５℃の速度、及び－８０℃の終了温度まで毎分１℃の冷却速度を提供する。プログラムパラメータは、以下の通りである：ステップ１－４℃で待つ、ステップ２：－４℃まで１．０℃／分（試料温度）、ステップ３：－４５℃まで２０．０℃／分（チャンバ温度）、ステップ４：－１０．０℃まで１０．０℃／分（チャンバ温度）、ステップ５：－２０℃まで０．５℃／分（チャンバ温度）、及びステップ６：－８０℃まで１．０℃／分（試料温度）。

【２２９２】

実施例６：合成培地を用いた腫瘍拡張プロセス

上記で開示されるプロセスは、ＣＭ１培地及びＣＭ２培地を、合成培地（例えば、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、例えば、ＤＭ１及びＤＭ２を含む）で置き換えることによって行われ得る。

【２２９３】

実施例７：凍結保存ＴＩＬ細胞療法の例示的ＧＥＮ２産生

この実施例は、Ｉｏｖａｎｃｅ Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．のｃＧＭＰ製造を説明する。現在の適正組織基準及び現在の適正製造基準に従った、Ｇ－ＲＥＸフラスコ内のＴＩＬ細胞療法プロセス。この実施例は、現在の適正組織基準及び現在の適正製造基準に従った、Ｇ－ＲＥＸフラスコ内のＴＩＬ細胞療法プロセスの例示的なｃＧＭＰ製造を説明する。

【２２９４】

【表４０】

表３９．プロセス拡張の例示的な計画

推定日(播種後)	活性	標的基準	予想される容器	推定総体積(mL)
0	腫瘍解剖	≦50 個の望ましい腫瘍断片/G-REX-100MCS	G-REX-100MCS 1 フラスコ	≦1000
11	REP 播種	5~200×10^6 個の生細胞/G-REX-500MCS	G-REX-500MCS 1 フラスコ	≦5000
16	REP 分割	1×10^9 個の生細胞/G-REX-500MCS	G-REX-500MCS≦5 フラスコ	≦25000
22	採取	全利用可能な細胞	3~4 つの CS-750 バッグ	≦530

【２２９５】

【表４１】

表４０．フラスコ容積

フラスコタイプ	作業 容積/フラスコ
G-REX-100MCS	1000
G-REX-500MCS	5000

【２２９６】
０日目のＣＭ１培地の調製ＢＳＣ内で、試薬をＲＰＭＩ１６４０培地ボトルに追加した。ボトル当たり追加された以下の試薬を追加した：不活化ヒトＡＢ血清（１００．０ｍＬ）、ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）（１０．０ｍＬ）、硫酸ゲンタマイシン、５０ｍｇ／ｍＬ（１．０ｍＬ）、２－メルカプトエタノール（１．０ｍＬ）を加熱する
【２２９７】
ＢＳＣから不要な材料を取り出した。ＢＳＣから培地試薬を抜き取り、配合された洗浄培地の調製のために硫酸ゲンタマイシン及びＨＢＳＳをＢＳＣの中に残した。
【２２９８】
ＩＬ－２アリコートを解凍した。すべての氷が融解するまで、１つの１．１ｍＬのＩＬ－２アリコート（６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）（ＢＲ７１４２４）を解凍した。ＩＬ－２：ロット番号及び有効期限を記録した。
【２２９９】
ＩＬ－２ストック溶液を培地に移した。ＢＳＣ内で、１．０ｍＬのＩＬ－２ストック溶液を、調製されたＣＭ１の０日目培地ボトルに移した。ＣＭ１の０日目培地１ボトル及びＩＬ－２（６×１０６ＩＵ／ｍＬ）１．０ｍＬを追加した。
【２３００】
Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳをＢＳＣの中に通過させた。無菌的にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ（Ｗ３０１３１３０）をＢＳＣの中に通過させた。
【２３０１】
すべての完全なＣＭ１の０日目培地をＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコにポンプで注入した。組織断片円錐形またはＧＲｅｘ１００ＭＣＳ。
【２３０２】
０日目の腫瘍洗浄培地の調製ＢＳＣ内で、５．０ｍＬのゲンタマイシン（Ｗ３００９８３２またはＷ３０１２７３５）を１本の５００ｍＬのＨＢＳＳ培地（Ｗ３０１３１２８）ボトルに追加した。ボトル当たりの追加：ＨＢＳＳ（５００．０ｍＬ）、硫酸ゲンタマイシン、５０ｍｇ／ｍＬ（５．０ｍＬ）。１Ｌの０．２２ミクロンフィルターユニット（Ｗ１２１８８１０）をとおして調製されたゲンタマイシンを含有するＨＢＳＳを濾過した。
【２３０３】
０日目の腫瘍処理腫瘍検体を取得し、即時に処理のために２～８℃における部屋に移した。腫瘍洗浄培地を等分した。腫瘍洗浄１は、８インチ鉗子（Ｗ３００９７７１）を使用して行う。腫瘍を検体ボトルから取り出し、調製した「洗浄１」皿に移す。この後、腫瘍洗浄２及び腫瘍洗浄３が続く。腫瘍を測定し、評価した。腫瘍領域全体の３０％未満が壊死及び／または脂肪性組織であることが観察されたかどうかを評価した。該当する場合、クリーンアップ解剖を行う。腫瘍が大きく、外部の組織の３０％未満が壊死／脂肪性であることが観察された場合、メス及び／または鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍の内側構造を温存しながら壊死／脂肪性組織を除去することによって、「クリーンアップ解剖」を行った。腫瘍を切除した。メス及び／または鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍検体を均等で適切なサイズの断片（最大６つの中間断片）に切断した。中間腫瘍断片を移した。腫

瘍断片を、およそ３×３×３ｍｍのサイズの小片に切除した。乾燥を防止するために中間断片を保存した。中間断片の解剖を繰り返した。収集された切片の数を決定した。望ましい組織が残っている場合、「好ましい中間断片」６ウェルプレートから追加の好ましい腫瘍片を選択し、最大５０片のために液滴を充填した。

【２３０４】

コニカルチューブを準備した。腫瘍片を５０ｍＬのコニカルチューブに移した。Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳのためのＢＳＣを準備した。インキュベーターからＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳを取り出した。無菌的にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコをＢＳＣの中に通過させた。腫瘍断片をＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコに追加した。切片を均等に分配した。

【２３０５】

以下のパラメータにおいてＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳをインキュベートした：Ｇ－ＲＥＸフラスコをインキュベートした：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５　％CO_2。計算：培養の時間、下限＝培養の時間＋２５２時間、上限＝培養の時間＋２７６時間。

【２３０６】

プロセスが完了した後、いずれの残りの温められた培地も廃棄し、ＩＬ－２のアリコートを解凍した。

【２３０７】

１１日目－培地の調製インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、ＣＯ２パーセンテージ：５．０±１．５％　ＣＯ２

【２３０８】

３本の１０００ｍＬのＲＰＭＩ　１６４０培地（Ｗ３０１３１１２）ボトル及び３本の１０００ｍＬのＡＩＭ－Ｖ（Ｗ３００９５０１）ボトルを、インキュベーター内で３０分間以上温めた。インキュベーターからＲＰＭＩ１６４０培地を取り出した。ＲＰＭＩ１６４０培地を調製した。培地を濾過した。３つのＩＬ－２の１．１ｍＬのアリコート（６×１０６ＩＵ／ｍＬ）（ＢＲ７１４２４）を解凍した。インキュベーターからＡＩＭ－Ｖ培地を取り出した。ＩＬ－２をＡＩＭ－Ｖに追加した。１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグ及びリピータポンプ移送セットを、ＢＳＣの中に無菌的に移した。

【２３０９】

１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒ培地バッグを準備した。Ｂａｘａポンプを準備した。１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒ培地バッグを準備した。培地を１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒにポンプで注入した。Ｌａｂｔａｉｎｅｒバッグからポンプマティックを取り出した。

【２３１０】

培地を混合した。バッグを穏やかにマッサージして混合した。試料計画に従って培地を試料採取した。２０．０ｍＬの培地を取り出し、５０ｍＬのコニカルチューブに入れた。細胞計数希釈管を準備した。ＢＳＣに、「細胞計数希釈液用」及びロット番号でラベル付けされた４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地を、４本の１５ｍＬコニカルチューブに追加した。試薬をＢＳＣから２～８℃に移した。１Ｌ移送パックを準備した。（プロセス注記５．１１に従って）ＢＳＣ溶接の外側で、「完全なＣＭ２の１１日目培地」バッグに取り付けられた移送セットへの１Ｌ移送パックを準備した。フィーダー細胞移送パックを準備した。完全なＣＭ２の１１日目培地をインキュベートした。

【２３１１】

１１日目－ＴＩＬ採取前処理表。インキュベーターパラメータ：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５％　CO_2．インキュベーターからＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳを取り出した。３００ｍＬ移送パックを準備した。移送パックをＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳに溶接した。

【２３１２】

ＴＩＬ採取及びＴＩＬ採取の開始のためにフラスコを準備する。ＴＩＬが採取された。ＧａｔｈｅＲｅｘを使用して、血液フィルターを介して細胞懸濁液を３００ｍＬの移送パ

ックに移した。付着した細胞について膜を点検した。

【２３１３】

フラスコ膜をすすいだ。Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ上のクランプを閉じた。すべてのクランプが閉じられていることを確実にした。ＴＩＬ及び「上清」移送パックを熱融着した。ＴＩＬ懸濁液の体積を計算した。試料採取のために上清移送パックを準備した。

【２３１４】

Ｂａｃ－Ｔ試料を引き出した。ＢＳＣ内で、１Ｌ「上清」移送パックからおよそ２０．０ｍＬの上清を引き上げ、無菌５０ｍＬコニカルチューブに分注する。

【２３１５】

試料計画に従ってＢａｃＴを接種した。適切なサイズのシリンジを使用して調製されたＢａｃＴとラベル付けされた５０ｍＬコニカルから１．０ｍＬの試料を取り出し、嫌気性ボトルに接種した。

【２３１６】

ＴＩＬをインキュベートした。必要とされるまで、ＴＩＬ移送パックをインキュベーターに入れた。細胞計数及び計算を行った。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。生存率÷２。生細胞濃度÷２。計数の上限及び下限を決定した。下限：生細胞濃度の平均×０．９。上限：生細胞濃度の平均×１．１。許容限界内の両方の計数を確認した。行われた４つすべての計数から平均生細胞濃度を決定した。

【２３１７】

ＴＩＬ懸濁液の調整された体積：細胞計数試料を取り出した後のＴＩＬ懸濁液の調整された体積を計算する。総ＴＩＬ細胞体積（Ａ）。取り出された細胞計数試料の体積（４．０ｍＬ）（Ｂ）調整された総ＴＩＬ細胞体積Ｃ＝Ａ－Ｂ。

【２３１８】

総生ＴＩＬ細胞を計算した。平均生細胞濃度＊：総体積、総生細胞：Ｃ＝Ａｘ Ｂ．

【２３１９】

フローサイトメトリーのための計算：総生ＴＩＬ細胞数が、４．０×１０^{7}個以上であった場合、フローサイトメトリー試料のために１．０×１０^{7}個の細胞を取得するための体積を計算した。

【２３２０】

フローサイトメトリーに必要とされる総生細胞：１．０×１０^{7}個の細胞。フローサイトメトリーに必要とされる細胞の体積：生細胞濃度を１．０×１０^{7}個の細胞Ａで割ったもの。

【２３２１】

２．０×１０^{8}個の生細胞に等しいＴＩＬ懸濁液の体積を計算した。必要に応じて、取り出すＴＩＬ細胞の過剰体積を計算し、過剰なＴＩＬを取り出し、必要に応じてＴＩＬをインキュベーターに入れた。必要に応じて、取り出された全過剰ＴＩＬを計算した。

【２３２２】

凍結のための標的細胞濃度が１．０×１０^{8}細胞／ｍＬである過剰なＴＩＬ細胞に追加するＣＳ－１０培地の量を計算した。必要に応じて、過剰なＴＩＬを遠心分離した。コニカルチューブを観察し、ＣＳ－１０を追加した。

【２３２３】

バイアルを充填した。１．０ｍＬの細胞懸濁液を、適切なサイズの凍結バイアルに等分した。残留体積を適切なサイズのクライオバイアルに等分した。体積が≦０．５ｍＬである場合、体積が０．５ｍＬになるまでＣＳ１０をバイアルに追加する。

【２３２４】

凍結保存のための１×１０^{7}個の細胞を取得するために必要とされる細胞の体積を計算した。凍結保存のために試料を取り出した。ＴＩＬをインキュベーターに入れた。

【２３２５】

試料の凍結保存コニカルチューブを観察し、ＣＳ－１０をゆっくりと追加し、追加された０．５ｍＬのＣＳ１０の体積を記録した。

【２３２６】
１１日目－フィーダー細胞フィーダー細胞を取得した。ＬＮ２冷凍庫から少なくとも２つの異なるロット番号を伴うフィーダー細胞の３つのバッグを取得した。解凍する準備が整うまで、細胞をドライアイス上で保管した。水浴またはｃｒｙｏｔｈｅｒｍを準備した。３７．０±２．０℃の水浴またはｃｙｔｏｔｈｅｒｍにおいて約３～５分間、または氷が消滅するまで、フィーダー細胞を解凍した。インキュベーターから培地を取り出した。解凍されたフィーダー細胞をプールした。フィーダー細胞を移送パックに追加した。シリンジから移送パックにフィーダー細胞を分注した。プールされたフィーダー細胞を混合し、移送パックをラベル付けした。
【２３２７】
移送パック内のフィーダー細胞懸濁液の総体積を計算した。細胞計数試料を取り出した。各試料に別個の３ｍＬシリンジを使用して、不要注入ポートを使用してフィーダー細胞懸濁液移送パックから４×１．０ｍＬの細胞計数試料を引き出した。各試料をラベル付けされたクライオバイアルに等分した。細胞計数を行い、増倍率を決定し、プロトコルを選択し、増倍率を入力した。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定し、限界内で確認した。
【２３２８】
フィーダー細胞懸濁液の調整された体積。細胞計数試料を取り出した後のフィーダー細胞懸濁液の調整された体積を計算した。総生フィーダー細胞を計算した。必要に応じて追加のフィーダー細胞を取得した。必要に応じて追加のフィーダー細胞を解凍した。第４のフィーダー細胞バッグをジップトップバッグに入れ、３７．０±２．０℃の水浴またはｃｙｔｏｔｈｅｒｍ内で約３～５分間解凍し、追加のフィーダー細胞をプールした。体積を測定した。シリンジ内のフィーダー細胞の体積を測定し、以下に記録した（Ｂ）。フィーダー細胞の新しい総体積を計算した。フィーダー細胞を移送パックに追加した。
【２３２９】
必要に応じて希釈液を調製し、４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地を４本の１５ｍＬコニカルチューブに追加した。細胞計数を準備した。各試料に対して別個の３ｍＬシリンジを使用して、不要注入ポートを使用して、フィーダー細胞懸濁液移送パックから４×１．０ｍＬの細胞計数試料を取り出した。細胞計数及び計算を行った。行われた４つすべての計数から平均生細胞濃度を決定した。フィーダー細胞懸濁液の体積を調整し、細胞計数試料を取り出した後のフィーダー細胞懸濁液の調整された体積を計算した。４．０ｍＬを差し引いた総フィーダー細胞体積が取り出された。５×10^9個の生フィーダー細胞を取得するために必要とされたフィーダー細胞懸濁液の体積を計算した。過剰なフィーダー細胞体積を計算した。取り出す過剰なフィーダー細胞の体積を計算した。過剰なフィーダー細胞を取り出した。
【２３３０】
１．０ｍＬシリンジ及び１６Ｇ針を使用して、０．１５ｍＬのＯＫＴ３を引き上げ、ＯＫＴ３を追加した。フィーダー細胞懸濁液移送パックを熱融着した。
【２３３１】
１１日目　Ｇ－ＲＥＸ充填及びシード設定Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ。「完全なＣＭ２の１１日目培地」をインキュベーターから取り出し、培地をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳにポンプで注入した。４．５Ｌの培地をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳにポンプで注入し、フラスコ上にマークされたラインまで充填した。必要に応じてフラスコを熱融着し、インキュベートした。フィーダー細胞の懸濁液移送パックを、Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳに溶接した。フィーダー細胞をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳに追加した。熱融着した。ＴＩＬ懸濁液移送パックをフラスコに溶接した。ＴＩＬをＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳに追加した。熱融着した。Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを３７．０±２．０℃でインキュベートした。ＣＯ２パーセンテージ：５．０±１．５％　ＣＯ２
【２３３２】
インキュベーション時間帯を計算した。１６日目にインキュベーターからＧ－ＲＥＸ５

００ＭＣＳを取り出すための適切な時間を決定するための計算を行った。下限：インキュベーションの時間１０８時間。上限：インキュベーションの時間１３２時間。

【２３３３】

１１日目　過剰ＴＩＬ凍結保存。該当：過剰ＴＩＬバイアルを凍結させた。凍結前にＣＲＦが設定されていることを検証した。凍結保存を行った。バイアルを速度制御された冷凍庫から適切な保管場所に移した。凍結の完了時に、バイアルをＣＲＦから適切な保管容器に移した。バイアルを適切な保管場所に移した。ＬＮ２における保管場所を記録した。

【２３３４】

１６日目　培地の調製ＡＩＭ－Ｖ培地を事前に温めた。培地バッグ１、２、及び３について培地が温められた時間を計算した。すべてのバッグが１２～２４時間の持続時間にわたって温められていることを確実にした。上清用の１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを設定した。ルアーコネクタを使用して、流体ポンプ移送セットのより大きな直径の端部を１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグのメス型ポートのうちの１つに取り付けた。上清用の１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを設定し、ラベル付けした。上清用の１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを設定した。ＢＳＣから取り出す前に、すべてのクランプが閉じられていることを確実にした。注記：上清バッグは、培地調製と同時に行われ得るＴＩＬ採取中に使用された。

【２３３５】

ＩＬ－２を解凍した。すべての氷が融解するまで、ＣＴＳ　ＡＩＭ　Ｖ培地の１バッグ当たりＩＬ－２（６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）（ＢＲ７１４２４）の５×１．１ｍＬアリコートを解凍した。１００．０ｍＬのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を等分した。ＩＬ－２をＧｌｕｔａＭａｘ（商標）に追加した。配合用のＣＴＳ　ＡＩＭ　Ｖ培地バッグを準備した。配合用のＣＴＳ　ＡＩＭ　Ｖ培地バッグを準備した。ステージＢａｘａポンプ。培地を配合することを準備した。ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）＋ＩＬ－２をバッグにポンプで注入した。パラメータを監視した：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５％　CO_2．完全なＣＭ４の１６日目培地を温めた。希釈液を調製した。

【２３３６】

１６日目　ＲＥＰ分割。インキュベーターパラメータを監視した：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５　％CO_2。インキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを取り出した。１Ｌの移送パックを準備し、ＴＩＬ懸濁液としてラベル付けし、１Ｌの重量を量った。

【２３３７】

Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳの減容。約４．５Ｌの培養上清をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳから１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒに移した。

【２３３８】

ＴＩＬ採取用のフラスコを準備した。上清を取り出した後に、赤色ラインへのすべてのクランプを閉じた。

【２３３９】

ＴＩＬ採取の開始。フラスコを激しく叩き、培地を旋回させて細胞を解放し、すべての細胞が引き離されていることを確実にする。

【２３４０】

ＴＩＬ採取。ＴＩＬ懸濁液移送パックにつながるすべてのクランプを解放した。ＧａｔｈｅＲｅｘを使用して、細胞懸濁液をＴＩＬ懸濁液移送パックの中に移した。注記：すべての細胞及び培地が収集されるまで、傾斜した縁を必ず維持すること。付着した細胞について膜を点検した。フラスコ膜をすすいだ。Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ上のクランプを閉じた。ＴＩＬを含む移送パックを熱融着した。上清を含む１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを熱融着した。細胞懸濁液を伴う移送パックの重量を記録し、細胞懸濁液を計算した。試料を取り出すための移送パックを準備した。細胞上清から試験試料を取り出した。

【２３４１】

無菌性及びＢａｃＴ試験サンプリング。調製したＢａｃＴラベル付けされた１５ｍＬの

コニカルから１．０ｍＬの試料を取り出した。細胞計数試料を取り出した。ＢＳＣ内で、各試料に別個の３ｍＬシリンジを使用して、「ＴＩＬ懸濁液」移送パックから４×１．０ｍＬの細胞計数試料を取り出した。

【２３４２】

マイコプラズマ試料を取り出した。３ｍＬシリンジを使用して、ＴＩＬ懸濁液移送パックから１．０ｍＬを取り出し、調製された「マイコプラズマ希釈液」とラベル付けされた１５ｍＬコニカルチューブに入れた。

【２３４３】

播種用の移送パックを準備した。ＴＩＬをインキュベーターに入れた。細胞懸濁液をＢＳＣから取り出し、必要とされるまでインキュベーターに入れた。細胞計数及び計算を行った。最初に、０．５ｍＬの細胞懸濁液を調製された４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地に追加することによって、細胞計数試料を希釈し、１：１０希釈液を生じた。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。注記：希釈は、細胞の期待濃度に基づいて調整され得る。行われた４つすべての計数から平均生細胞濃度を決定した。ＴＩＬ懸濁液の調整された体積。細胞計数試料を取り出した後のＴＩＬ懸濁液の調整された体積を計算した。５．０ｍＬを差し引いた総ＴＩＬ細胞体積が試験のために取り出された。

【２３４４】

総生ＴＩＬ細胞を計算した。播種するフラスコの総数を計算した。注記：播種するＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコの最大数は５であった。播種するフラスコの計算された数が５つを超えた場合、５つのみが利用可能な細胞懸濁液の体積全体を使用して播種された。

【２３４５】

二次培養用のフラスコの数を計算した。準備されたバッグに加えて必要とされる培地バッグの数を計算した。計算されたように必要とされる２つのＧ－ＲＥＸ－５００Ｍフラスコ毎に「ＣＭ４の１６日目培地」の１つの１０Ｌバッグを準備した。追加の培地が調製され、温められている間に、続けて第１のＧＲＥＸ－５００Ｍフラスコ（複数可）を播種した。計算された数の決定された追加の培地バッグを調製し、温めた。Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを充填した。培地をポンプで注入するように準備し、４．５Ｌの培地をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳにポンプで注入した。熱融着した。充填を繰り返した。フラスコをインキュベートした。新しいＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコに追加するＴＩＬ懸濁液の標的体積を計算した。フラスコの計算された数が５つを超える場合、５つのみが細胞懸濁液の体積全体を使用して播種されるであろう。播種用のフラスコを準備した。インキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを取り出した。ポンプで注入するためのＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを準備した。大型フィルターラインを除くすべてのクランプを閉じた。インキュベーターからＴＩＬを取り出した。播種用の細胞懸濁液を調製した。（プロセス注記５．１１に従って）「ＴＩＬ懸濁液」移送パックをポンプ入口ラインに滅菌溶接した。ＴＩＬ懸濁液バッグを秤の上に置いた。

【２３４６】

フラスコにＴＩＬ懸濁液を播種した。計算されたＴＩＬ懸濁液の体積をフラスコにポンプで注入した。熱融着した。残りのフラスコを充填した。

【２３４７】

インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５％　CO_2．フラスコをインキュベートした。

【２３４８】

２２日目にインキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを取り出す時間範囲を決定した。

【２３４９】

２２日目　洗浄緩衝液の調製１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグを準備した。ＢＳＣ内で、ルアー接続を介して４インチ血漿移送セットを１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグに

取り付けた。１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグを準備した。ＢＳＣから外に移す前に、すべてのクランプを閉じた。注記：採取される２つのＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコ毎に、１つの１０Ｌ　Ｌａｂｔａｉｎｅｒバッグを準備した。Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅを３００ｍＬバッグにポンプで注入し、ポンプを反転させてバッグの位置を操作することによって、３０００ｍＬのＯｒｉｇｅｎバッグから空気を除去した。ヒトアルブミン２５％を３０００ｍＬのバッグに追加した。１２０．０ｍＬの最終体積のヒトアルブミン２５％を取得する。

【２３５０】

ＩＬ－２希釈液を調製した。１０ｍＬシリンジを使用して、ＬＯＶＯ洗浄緩衝液バッグ上の無針注入ポートを使用して、５．０ｍＬのＬＯＶＯ洗浄緩衝液を取り出した。ＬＯＶＯ洗浄緩衝液を５０ｍＬのコニカルチューブに分注した。

【２３５１】

等分されたＣＲＦブランクバッグＬＯＶＯ洗浄緩衝液。１００ｍＬのシリンジを使用して、無針注入ポートから７０．０ｍＬのＬＯＶＯ洗浄緩衝液を引き上げた。

【２３５２】

すべての氷が融解するまで、１つの１．１ｍＬのＩＬ－２（６×１０６ＩＵ／ｍＬ））を解凍した。５０μＬのＩＬ－２ストック（６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）を「ＩＬ－２希釈液」とラベル付けされた５０ｍＬのコニカルチューブに追加した。

【２３５３】

凍結保存調製。５つのクライオカセットを２～８℃に置き、最終製品の凍結保存のためにそれらを前調整した。

【２３５４】

細胞計数希釈液を調製した。ＢＳＣ内で、ロット番号及び「細胞計数希釈液用」でラベル付けされた４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地を、４本の別個の１５ｍＬコニカルチューブに追加した。細胞計数を準備した。４つのクライオバイアルをバイアル番号（１～４）でラベル付けした。使用されるＢＳＣの下でバイアルを保存した。

【２３５５】

２２日目　ＴＩＬ採取インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ温度ＬＥＤディスプレイ：３７±２．０℃、ＣＯ２パーセンテージ：５％±１．５％．インキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコを取り外した。ＴＩＬ収集バッグを準備し、ラベル付けした。余分な接続を密封した。減容：約４．５Ｌの上清をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳから上清バッグに移した。

【２３５６】

ＴＩＬ採取用のフラスコを準備した。ＴＩＬの収集を開始した。フラスコを激しく叩き、培地旋回させて細胞を解放した。すべての細胞が引き離されていることを確実にした。ＴＩＬの収集を開始した。ＴＩＬ懸濁液収集バッグにつながるすべてのクランプを解放した。ＴＩＬ採取。ＧａｔｈｅＲｅｘを使用して、ＴＩＬ懸濁液を３０００ｍＬの収集バッグに移した。付着した細胞について膜を点検した。フラスコ膜をすすいだ。Ｇ－Ｒｅｘ５００ＭＣＳ上のクランプを閉じ、すべてのクランプが閉じていることを確実にした。細胞懸濁液をＬＯＶＯソースバッグの中に移した。すべてのクランプを閉じた。熱融着した。４×１．０ｍＬの細胞計数試料を取り出した。

【２３５７】

細胞計数を行った。ＮＣ－２００及びプロセス注記５．１４を利用して、細胞計数及び計算を行った。最初に、０．５ｍＬの細胞懸濁液を調製された４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地に追加することによって、細胞計数試料を希釈した。これは、１：１０希釈液を生じた。行われた細胞計数の平均生存率、生細胞濃度、及び総有核細胞濃度を決定した。計数の上限及び下限を決定した。行われた細胞計数の平均生存率、生細胞濃度、及び総有核細胞濃度を決定した。ＬＯＶＯソースバッグの重量を量った。総生ＴＩＬ細胞を計算した。総有核細胞を計算した。

【２３５８】

マイコプラズマ希釈液を調製した。ルアー試料ポートを介して１つの上清バッグから１０．０ｍＬを取り出し、１５ｍＬコニカルに入れた。

【２３５９】

「ＴＩＬ　Ｇ－ＲＥＸ採取」プロトコルを行い、最終製品の標的体積を決定した。使い捨てキットを装填した。濾液バッグを取り出した。濾液容量を入力した。濾液容器をベンチトップの上に置いた。ＰｌａｓｍａＬｙｔｅを取り付けた。ＰｌａｓｍａＬｙｔｅが取り付けられていることを検証し、ＰｌａｓｍａＬｙｔｅが動いていることを観察した。ソース容器をチューブに取り付け、ソース容器が取り付けられていることを検証した。ＰｌａｓｍａＬｙｔｅが動いていることを確認した。

【２３６０】

最終製剤及び充填標的体積／バッグの計算。ブランクバッグを配合するためのＣＳ－１０及びＬＯＶＯ洗浄緩衝液の体積を計算した。ＣＲＦブランクを調製した。

【２３６１】

最終製品に追加するＩＬ－２の体積を計算した。所望される最終ＩＬ－２濃度（ＩＵ／ｍＬ）－３００ＩＵ／ｍＬ。ＩＬ－２作業ストック：６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ接続装置を組み立てた。４Ｓ－４Ｍ６０をＣＣ２細胞接続に滅菌溶接した。ＣＳ７５０クライオバッグを準備したハーネスに滅菌溶接した。ＣＳ－１０バッグを４Ｓ－４Ｍ６０のスパイクに溶接した。ＩＬ－２とともにＴＩＬ調製した。適切なサイズのシリンジを使用して、「ＩＬ－２　６×１０^{4}」アリコートから決定されたＩＬ－２の量を取り出した。配合されたＴＩＬバッグをラベル付けした。配合されたＴＩＬバッグを装置に追加した。ＣＳ１０を追加した。シリンジを交換した。約１０ｍＬの空気を１００ｍＬのシリンジに引き込み、装置上の６０ｍＬシリンジを交換した。ＣＳ１０を追加した。ＣＳ－７５０バッグを準備した。細胞を分注した。

【２３６２】

最終製品バッグから空気を除去し、保持液を得た。最後の最終製品バッグが充填されると、すべてのクランプを閉じた。１０ｍＬの空気を新しい１００ｍＬシリンジに引き込み、装置のシリンジを交換する。保持液を５０ｍＬコニカルチューブに分注し、管を「保持液」及びロット番号としてラベル付けした。各バッグについて空気除去ステップを繰り返した。

【２３６３】

目視検査を含み、凍結保存のための最終製品を調製した。凍結保存までクライオバッグを低温パック上で、または２～８℃で保持した。

【２３６４】

細胞計数試料を取り出した。適切なサイズのピペットを使用して、２．０ｍＬの保持液を取り出し、細胞計数に使用されるように１５ｍＬコニカルチューブに入れる。細胞計数及び計算を行った。注記：１つだけの試料を適切な希釈に希釈し、希釈が十分であることを検証した。追加の試料を適切な希釈倍率に希釈し、計数を進めた。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。注記：希釈は、細胞の期待濃度に基づいて調整され得る。生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。ＩＦＮ－γを計算した。最終製品バッグを熱融着した。

【２３６５】

以下の例示的試料計画に従って試料をラベル付けし、収集した。

【２３６６】

【表４２】

表４１．試料計画。

試料	容器の数	各々に追加する試料体積	容器タイプ
*マイコプラズマ	1	1.0mL	15mL コニカル
内毒素	2	1.0mL	2mL クライオバイアル
グラム染色	1	1.0mL	2mL クライオバイアル
IFN-γ	1	1.0mL	2mL クライオバイアル
フローサイトメトリー	1	1.0mL	2mL クライオバイアル
**Bac-T 無菌性	2	1.0mL	Bac-T ボトル
QC 保持	4	1.0mL	2mL クライオバイアル
サテライトバイアル	10	0.5mL	2mL クライオバイアル

【２３６７】
無菌性及びＢａｃＴ試験。試験試料採取。ＢＳＣ内で、適切なサイズのシリンジを使用して収集された保持細胞懸濁液から１．０ｍＬの試料を取り出し、嫌気性ボトルに接種する。好気性ボトルについて上記を繰り返す。
【２３６８】
最終製品の凍結保存。制御速度冷凍庫（ＣＲＦ）を準備した。ＣＲＦが設定されていることを検証した。ＣＲＦプローブを設定した。最終製品及び試料をＣＲＦに入れた。４℃±１．５℃に達し、ＣＲＦ実行を進めるために必要な時間を決定した。ＣＲＦが完了し、保管された。実行の完了後にＣＲＦを停止させた。カセット及びバイアルをＣＲＦから取り出した。保存のためにカセット及びバイアルを蒸気相ＬＮ２に移した。保管場所を記録した。
【２３６９】
最終医薬品の後処理及び分析には、以下の試験が含まれた：（２２日目）フローサイトメトリーによる２２日目ＲＥＰのＣＤ３＋細胞の決定、（２２日目）グラム染色法（ＧＭＰ）、（２２日目）ゲルクロットＬＡＬアッセイ（ＧＭＰ）による細菌内毒素試験、（１６日目）ＢａｃＴ滅菌アッセイ（ＧＭＰ）、（１６日目）ＴＤ－ＰＣＲによるマイコプラズマＤＮＡ検出（ＧＭＰ）、許容される外観属性、（２２日目）ＢａｃＴ滅菌アッセイ（ＧＭＰ）（２２日目）、（２２日目）ＩＦＮ－ガンマアッセイ。本明細書に記載の他の効力アッセイもまた、ＴＩＬ製品を分析するために用いられる。
【２３７０】
実施例８：ＧＥＮ３拡張プラットフォームの例示的な実施形態
０日目
腫瘍洗浄培地を調製した。培地を開始前に温めた。５ｍＬのゲンタマイシン（５０ｍｇ／ｍＬ）を５００ｍＬボトルのＨＢＳＳに添加した。５ｍＬの腫瘍洗浄培地を、ＯＫＴ３希釈に使用する１５ｍＬのコニカルチューブに添加した。フィーダー細胞バッグを調製した。フィーダー細胞をフィーダー細胞バッグに無菌で移し、使用するまで３７℃で保管するか、または凍結させた。３７℃の場合、フィーダー細胞をカウントした。凍結した場合は、解凍した後、フィーダー細胞をカウントした。
【２３７１】

フィーダー細胞濃度の範囲は、５×１０^{4}～５×１０^{6}細胞／ｍＬである。４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖを含む４つのコニカルチューブを準備した。各細胞計数について０．５ｍＬの細胞画分を追加した。総生フィーダー細胞数が１×１０^{9}細胞以上であった場合、進んでフィーダー細胞濃度を調整した。フィーダー細胞の体積を計算し、第１のフィーダー細胞バッグから取り出して、１×１０^{9}細胞を第２のフィーダー細胞バッグに添加した。

【２３７２】

ｐ１０００マイクロピペットを使用して、９００μＬの腫瘍洗浄培地をＯＫＴ３アリコート（１００μＬ）に移した。シリンジ及び滅菌技法を使用して、０．６ｍＬのＯＫＴ３を吸引し、第２のフィーダー細胞バッグに添加した。培地体積を全体積２Ｌに調整した。第２のフィーダー細胞バッグをインキュベーターに移した。

【２３７３】

ＯＫＴ３製剤の詳細：ＯＫＴ３は、１００μＬアリコート中のバイアル（１ｍｇ／ｍＬ）からの元のストック濃度でアリコートされ、凍結されてもよい。１ｍＬバイアル当たり約１０×アリコート。－８０℃で保管した。０日目：１５μｇ／フラスコ、すなわち５００ｍＬ中３０ｎｇ／ｍＬ～６０μＬ最大約１アリコート。

【２３７４】

５ｍＬの腫瘍洗浄培地を、過剰腫瘍片とラベル付けした６ウェルプレートのすべてのウェルに添加した。解剖中に腫瘍を水和状態に保持する際に、腫瘍洗浄培地をさらなる使用のために利用可能にした。５０ｍＬの腫瘍洗浄培地を、各１００ｍｍペトリ皿に追加した。

【２３７５】

解剖皿のふたの下の定規を参照として使用して、腫瘍を２７ｍｍ^{3}断片（３×３×３ｍｍ）に解剖した。６０個の断片に達するまで中間断片を解剖した。生成した最終断片の数に応じて、最終断片の総数を計数し、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコを調製した（一般に、１フラスコ当たり６０個の断片）。

【２３７６】

断片チューブ１～断片チューブ４とラベル付けしたコニカルチューブ内に好ましい組織断片を保持した。起源とする断片チューブの数に応じて、フィーダー細胞懸濁液を播種するＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコの数を計算した。

【２３７７】

フィーダー細胞バッグをインキュベーターから取り出し、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳを播種する。Ｄ０（０日目）とラベル付けする。

【２３７８】

Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ中の培養物への腫瘍断片の追加滅菌条件下で、腫瘍断片培養物（Ｄ０）１とラベル付けしたＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ及び断片チューブとラベル付けした５０ｍＬのコニカルチューブのキャップを緩めた。開いた断片チューブ１を回転させ、同時にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳのキャップをわずかに持ち上げた。断片を含む培地を、回転している間にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳに追加した。Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳに移送された断片の数を記録した。

【２３７９】

断片がＧＲＥＸフラスコの底に配置された時点で、７ｍＬの培地を吸引し、７つの１ｍＬアリコートを作製した（拡張された特徴付け用に５ｍＬ、滅菌試料用に２ｍＬ）。拡張された特徴付け用の５つのアリコート（最終断片培養上清）を、必要になるまで－２０℃で保管した。

【２３８０】

１本の嫌気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトル及び１本の好気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトルに各々１ｍＬの最終断片培養上清を接種した。サンプリングしたフラスコ毎に繰り返す。

【２３８１】

７日目～８日目

【２３８２】
フィーダー細胞バッグを調製した。凍結時に３７℃の水浴中で３～５分間フィーダーバッグを解凍した。凍結している場合、フィーダー細胞を計数した。フィーダー細胞濃度の範囲は、５×１０^{4}～５×１０^{6}細胞／ｍＬである。４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖを含む４つのコニカルチューブを準備した。各細胞計数について０．５ｍＬの細胞画分を新しいクライオバイアル管に追加した。試料を十分に混合し、細胞計数を続けた。
【２３８３】
総生フィーダー細胞数が２×１０^{9}細胞以上であった場合、次のステップに進んでフィーダー細胞濃度を調整した。フィーダー細胞の体積を計算し、第１のフィーダー細胞バッグから取り出して、２×１０^{9}細胞を第２のフィーダー細胞バッグに追加した。
【２３８４】
ｐ１０００マイクロピペットを使用して、９００μＬのＨＢＳＳを１００μＬのＯＫＴ３アリコートに移す。上下に３回ピペッティングして混合する。２つのアリコートを調製した。
【２３８５】
ＯＫＴ３製剤の詳細：ＯＫＴ３は、１００μＬアリコート中のバイアル（１ｍｇ／ｍＬ）からの元のストック濃度でアリコートされ、凍結されてもよい。１ｍＬバイアル当たり約１０×アリコート。－８０℃で保管した。７日目／８日目：３０μｇ／フラスコ、すなわち５００ｍＬ中６０ｎｇ／ｍＬ～１２０μｌ最大約２アリコート。
【２３８６】
シリンジ及び滅菌技法を使用して、０．６ｍＬのＯＫＴ３を吸引し、フィーダー細胞バッグに添加して、すべて添加されたことを確認した。培地量を合計２Ｌに調整した。第２のＯＫＴ３アリコートで繰り返し、フィーダー細胞バッグに追加した。第２のフィーダー細胞バッグをインキュベーターに移した。
【２３８７】
フィーダー細胞懸濁液を含むＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコの準備。０日目に生成されたＧ－ＲＥＸフラスコの数に従って処理するためにＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコの数を記録した。Ｇ－ＲＥＸフラスコをインキュベーターから取り出し、第２のフィーダー細胞バッグをインキュベーターから取り出した。
【２３８８】
フィーダー細胞懸濁液を添加する前の上清の除去：１本の１０ｍＬシリンジをＧ－ＲＥＸ１００フラスコに接続し、５ｍＬの培地を引き上げた。５つの１ｍＬアリコート（拡張された特徴付け用に５ｍＬ）を作製し、治験依頼者からの要求があるまで、拡張された特徴付け用に５つのアリコート（最終断片培養上清）を－２０℃で保管した。各Ｇ－ＲＥＸ１００フラスコにラベル付けし、繰り返した。
【２３８９】
フラスコの数に応じた、特徴付け用の５～２０×１ｍＬ試料：
●５ｍＬ＝１フラスコ
●１０ｍＬ＝２フラスコ
●１５ｍＬ＝３フラスコ
●２０ｍＬ＝４フラスコ
【２３９０】
フィーダー細胞をＧ－ＲＥＸ１００　ＭＣＳに播種し続け、Ｇ－ＲＥＸ１００　ＭＣＳフラスコ毎に繰り返した。無菌移送法を使用して、各Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコに重量で５００ｍＬの第２のフィーダー細胞バッグを重力移送し（１ｇ＝１ｍＬと想定）、量を記録した。７日目培養とラベル付けし、Ｇ－ＲＥＸ１００フラスコ毎に繰り返した。Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコをインキュベーターに移した。
【２３９１】
１０～１１日目
第１のＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコを取り出し、滅菌条件を使用して、１０ｍＬ

シリンジを使用して７ｍＬの前処理培養上清を取り出した。７つの１ｍＬアリコートを作製した（拡張された特徴付け用に５ｍＬ、滅菌試料用に２ｍＬ）。

【２３９２】

フラスコを注意深く混合し、新たな１０ｍＬシリンジを使用して１０ｍＬの上清を取り出し、Ｄ１０／１１マイコプラズマ上清とラベル付けした１５ｍＬのチューブに移す。

【２３９３】

フラスコを注意深く混合し、新しい注射器を使用して、処理されるフラスコの数に応じて以下の量を除去した。

●１フラスコ＝４０ｍＬ
●２フラスコ＝２０ｍＬ／フラスコ
●３フラスコ＝１３．３ｍＬ／フラスコ
●４フラスコ＝１０ｍＬ／フラスコ

【２３９４】

合計４０ｍＬをすべてのフラスコから取り出し、「１０／１１日目ＱＣ試料」とラベル付けした５０ｍＬのコニカルチューブにプールし、必要になるまでインキュベーター内で保管すべきである。細胞計数を行い、細胞を割り当てた。

【２３９５】

必要になるまで－２０℃以下で拡張された特徴付けのために５つのアリコート（前処理培養上清）を保管した。１本の嫌気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトル及び１本の好気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトルに各々１ｍＬの前処理培養上清を接種した。

【２３９６】

細胞懸濁液をＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳに移し、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ毎に繰り返した。滅菌条件を使用して、各Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳの内容物をＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳに移し、一度に約１００ｍＬの液体移送を監視した。Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳの容量が５００ｍＬに低減したとき、移送を停止した。

【２３９７】

移送ステップ中、１０ｍＬシリンジを使用し、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳからシリンジに１０ｍＬの細胞懸濁液を引き上げた。培養中のフラスコの数に従って指示に従った。１つのフラスコのみの場合：２つのシリンジを使用して合計２０ｍＬを取り出した。フラスコが２つの場合：１フラスコ当たり１０ｍＬを取り出した。フラスコが３つの場合：１フラスコ当たり７ｍＬを取り出した。フラスコが４つの場合：１フラスコ当たり５ｍＬを取り出した。細胞懸濁液を１本の一般的な５０ｍＬのコニカルチューブに移した。細胞計数ステップ及びＱＣ試料までインキュベーター内で保管する。ＱＣに必要な細胞の総数は、約２０ｅ６細胞であった：４×０．５ｍＬの細胞数（細胞数を最初に希釈しなかった）。

【２３９８】

アッセイに必要な細胞の量は、以下の通りである。

１．本明細書に記載されるものなどの効力アッセイ、またはＩＦＮ－γもしくはグランザイムＢアッセイのための最小10×10^{6}細胞
２．マイコプラズマのための1×10^{6}細胞
３．ＣＤ３＋／ＣＤ４５＋のためのフローサイトメトリーのための5×10^{6}細胞

【２３９９】

Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコをインキュベーターに移した。

【２４００】

ＱＣ試料を調製した。この実施形態のアッセイには少なくとも15×10^{8}細胞が必要であった。アッセイは、細胞数及び生存率、マイコプラズマ（1×10^{6}細胞／平均生存濃度）、フロー（5×10^{6}細胞／平均生存濃度）及びＩＦＮ－ｇアッセイ（5×10^{6}細胞～1×10^{6}細胞を含み、８～10×10^{6}細胞が、ＩＦＮ－γアッセイに必要である。

【２４０１】

10×10^{6}細胞／ｍＬで凍結保存のための細胞画分の体積を計算し、調製するバイア

ルの数を計算した。
【２４０２】
１６～１７日目
洗浄緩衝液の調製（１％ ＨＳＡ Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅ Ａ）。ＨＳＡ及びＰｌａｓｍａｌｙｔｅを５Ｌバッグに移して、ＬＯＶＯ洗浄緩衝液を作製した。滅菌条件を使用して、総体積１２５ｍＬの２５％ＨＳＡを５Ｌバッグに移した。１０ｍＬまたは４０ｍＬの洗浄緩衝液を取り出し、「ＩＬ－２ ６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ」チューブに移した（ＩＬ－２を事前に調製した場合は１０ｍＬ、ＩＬ－２を新たに調製した場合は４０ｍＬ）。
【２４０３】
Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅ＋１％ ＨＳＡに添加する再構成ＩＬ－２の量を計算した：再構成ＩＬ－２の量＝（ＩＬ－２の最終濃度×最終量）／ＩＬ－２の比活性（標準アッセイに基づく）。ＩＬ－２の最終濃度は、６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬであった。最終体積は、４０ｍＬであった。
【２４０４】
再構成ＩＬ－２に必要なＩＬ－２の計算された初期体積を取り出し、「ＩＬ－２ ６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ」チューブに移した。事前に調製したアリコートから１００μＬのＩＬ－２ ６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬを、１０ｍＬのＬＯＶＯ洗浄緩衝液を含有する「ＩＬ－２ ６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ」とラベル付けしたチューブに追加した。
【２４０５】
約４５００ｍＬの上清をＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコから取り出した。残りの上清を回転させ、細胞を細胞収集プールバッグに移した。すべてのＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコで繰り返した。
【２４０６】
６０ｍＬの上清を除去し、マイコプラズマ検出を含む品質管理アッセイのために上清チューブに添加した。＋２～８℃で保管した。
【２４０７】
細胞収集細胞を計数した。４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖを含む４つの１５ｍＬコニカルチューブを準備する。これらは、事前に準備してもよい。範囲は、５×１０^{4}～５×１０^{6}細胞／ｍＬである。（１：１０希釈が推奨された）。１：１０希釈の場合、事前に調製した４５００μＬのＡＩＭ Ｖに、５００μＬのＣＦを追加する。希釈倍率を記録した。
ＴＣ（総細胞）ＬＯＶＯ前（生＋死）を計算した＝
平均総細胞
濃度（ＴＣ濃度ＬＯＶＯ前）
（生＋死）
Ｘ
ソースバッグの体積
ＴＶＣ（総生細胞）ＬＯＶＯ前（生）を計算した＝
平均総生細胞
濃度（ＴＶＣ ＬＯＶＯ前）
（生）
Ｘ
ＬＯＶＯソースバッグの体積
【２４０８】
総細胞（ＴＣ）数が５×１０^{9}超であった場合、５×１０^{8}細胞を取り出して、ＭＤＡ保持試料として凍結保存する。５×１０^{8}÷平均ＴＣ濃度（ステップ１４．４４）＝取り出す体積
【２４０９】
総細胞（ＴＣ）数が≦５×１０^{9}以下であった場合、４×１０^{6}細胞を取り出して、ＭＤＡ保持試料として凍結保存する。４×１０^{6}÷平均ＴＣ濃度＝取り出す体積。
【２４１０】

総細胞数が決定された場合、取り出す細胞の数は、１５０×１０^{9}生細胞の保持を可能にすべきである。ＴＶＣ　ＬＯＶＯ前５×１０^{8}もしくは４×１０^{6}を確認するか、または該当なしである。取り出す細胞の体積量を計算した。

【２４１１】

バッグに残っている残りの総細胞を計算した。ＴＣ（総細胞）ＬＯＶＯ前を計算した。［平均総細胞濃度×残りの体積＝残りのＴＣ　ＬＯＶＯ前］を計算した。

【２４１２】

残存する細胞の総数に従って、表４２の対応するプロセスを選択する。

【２４１３】

【表４３】

表４２．セルの総数。

総細胞:	保持液(mL)
$0<$総細胞$\leqq 31\times10^9$	115
$31\times10^9<$総細胞$\leqq 71\times10^9$	165
$71\times10^9<$総細胞$\leqq 110\times10^9$	215
$110\times10^9<$総細胞$\leqq 115\times10^9$	265

【２４１４】

使用したプロセスに対応して添加するＩＬ－２の量を選択する。次のように計算された体積：保持量×２×３００ＩＵ／ｍＬ＝必要とされるＩＬ－２のＩＵ。必要なＩＬ－２のＩＵ／６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ＝ＬＯＶＯ後バッグに追加するＩＬ－２の体積。添加したすべての体積を記録した。さらなる分析のために試料をクライオバイアル内に得た。

【２４１５】

細胞製品を十分に混合した。該当する場合、凍結保存を含むさらなる処理のためにすべてのバッグを密封した。

【２４１６】

得られたクライオバイアル試料に対して、内毒素、ＩＦＮ－γ、無菌性、及び必要に応じて他のアッセイを行った。

【２４１７】

実施例９：ＧＥＮ２及びＧＥＮ３の例示的なプロセス

この実施例は、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３のプロセスを示す。Ｇｅｎ２プロセス及びＧｅｎ３プロセスのＴＩＬは、一般に腫瘍の外科的切除によって個々の患者から得られ、その後、エクスビボで拡張された自己ＴＩＬで構成されている。Ｇｅｎ３プロセスのプライミングによる第１の拡張ステップは、インターロイキン－２（ＩＬ－２）及びモノクローナル抗体ＯＫＴ３の存在下での細胞培養であり、放射線照射された末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）の足場上のＴ細胞共受容体ＣＤ３を標的とする。

【２４１８】

Ｇｅｎ２　ＴＩＬ製品の製造は、２つの相からなる：１）急速拡張前（ＲＥＰ前）及び２）急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）。ＲＥＰ前中に、切除腫瘍を、各寸法２～３ｍｍの５０個以下の断片に切断し、血清含有培養培地（１０％ＨｕＳＡＢを補充したＲＰＭＩ１６４０培地）及び６，０００ＩＵ／ｍＬのインターロイキン－２（ＩＬ－２）で１１日間培養した。１１日目にＴＩＬを採取し、大規模二次ＲＥＰ拡張に導入した。ＲＥＰは、５日間の３０００ＩＵ／ｍＬのｒｈＩＬ－２を補充した５Ｌ体積のＣＭ２中の１５０μｇのモ

ノクローナル抗ＣＤ３抗体（ＯＫＴ３）を装填した５×１０^{9}個の放射線照射された同種異系ＰＢＭＣフィーダー細胞の共培養におけるＲＥＰ前由来の２００×１０^{6}個以下の生細胞の活性化からなる。１６日目に、培養物の体積を９０％減少させ、細胞画分を１フラスコ当たり１×１０^{9}個以上の生リンパ球で複数のＧ－ＲＥＸ－５００フラスコに分割し、ＣＭ４で５ＬにＱＳする。ＴＩＬをさらに６日間インキュベートする。ＲＥＰを２２日目に採取し、洗浄し、製剤化し、凍結保存した後に、注入のために臨床現場に－１５０℃で発送する。

【２４１９】

Ｇｅｎ３　ＴＩＬ製品の製造は、３つの相からなる：１）プライミングによる第１の拡張プロトコル、２）急速な第２の拡張プロトコル（急速拡張相またはＲＥＰとも称される）、及び３）継代培養分割。プライミングによる第１の拡張ＴＩＬ増殖を行うために、切除した腫瘍を各寸法２～３ｍｍ以下の１２０個以下の断片に切断した。プライミングによる第１の拡張の０日目に、ＯＫＴ－３を装填したおよそ２．５×１０^{8}個の放射線照射された同種異系ＰＢＭＣフィーダー細胞のフィーダー層を、３つの１００ＭＣＳ容器の各々内のおよそ１００ｃｍ^{2}の表面積上に確立した。腫瘍断片を、各々が５００ｍＬの血清含有ＣＭ１培養培地及び６，０００ＩＵ／ｍＬのインターロイキン－２（ＩＬ－２）及び１５ｕｇのＯＫＴ－３を含む３つの１００ＭＣＳ容器に分布し、その中で７日間培養した。７日目に、ＯＫＴ－３を負荷したおよそ５×１０^{8}個の同種異系の放射線照射されたＰＢＭＣフィーダー細胞の追加のフィーダー細胞層を、３つの１００ＭＣＳ容器の各々において腫瘍断片化培養相に組み込み、５００ｍＬのＣＭ２培養培地及び６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０μｇのＯＫＴ－３で培養することによってＲＥＰを開始した。ＲＥＰの開始を、１００ＭＣＳ容器へのＯＫＴ３を装填したフィーダー細胞の閉鎖系流体移送を使用して、同じ容器内のプライミングによる第１の拡張培養物全体を活性化することによって増強した。Ｇｅｎ３の場合、ＴＩＬのスケールアップまたは分割に、細胞培養物全体を閉鎖系流体移送によってより大きい容器にスケーリングし、移し（１００Ｍフラスコから５００Ｍフラスコに）、追加の４ＬのＣＭ４培地を添加するプロセスステップを含めた。１６日目にＲＥＰ細胞を採取し、洗浄し、製剤化し、凍結保存した後に、注入のために臨床現場に－１５０℃で発送する。

【２４２０】

全体として、Ｇｅｎ３プロセスは、より短く、よりスケーラブルであり、かつ簡単に修正可能な拡張プラットフォームであり、堅牢な製造及びプロセス比較可能性に適するように適応する。

【２４２１】

【表４４】

表５１．例示的なＧｅｎ２及び例示的なＧｅｎ３製造プロセスの比較

ステップ	プロセス(Gen2)	プロセス(Gen3)
REP 前-0 日目	最大 50 個の断片、1 つの G-REX-100MCS 11 日 1L の CM1 培地 + IL-2 (6000 IU/mL)	全腫瘍最大 120 個の断片を最大 3 つのフラスコに均等に分割した。1 つのフラスコ:1~60 個の断片 2 つのフラスコ 61~89 個の断片 3 つのフラスコ:90~120 個の断片 500mL の CM1 培地中で 7 日間 + IL-2 (6000 IU/mL) 2.5×10^8 フィーダー細胞/フラスコ 15ug OKT-3/フラスコ
REP 開始	REP に指向する、11 日目、 $<200\times10^6$ TIL (1)5L CM2 培地中の G-REX-500MCS IL-2 (3000 IU/mL) 5×10^9 フィーダー細胞 150ug OKT-3	REP に指向する、7 日目、すべての細胞、同じ G-REX-100MCS 500CM2 培地を添加する IL-2 (6000 IU/mL) 5×10^8 フィーダー細胞/フラスコ 30ug の OKT-3/フラスコ
TIL の増殖またはスケールアップ	減容し、細胞画分を最大 5 つの G-REX-500MCS に分割する 4.5L CM4 培地+IL-2(3000IU/mL) $\geqq1\times10^9$ TVC/フラスコ 16 日目に分割する	各 G-REX-100MCS(1L)が 1 つの G-REX-500MCS に移行する 4L の CM4 培地+IL-2(3000IU/mL)を添加する 9~11 日目にスケールアップする
採取	22 日目に採取する、 LOVO-自動細胞洗浄機	16 日目に採取する LOVO 自動細胞洗浄機
最終製剤	凍結保存した製品 LN_2 中の 300IU/mL の IL2-CS10、 複数のアリコート	凍結保存した製品 LN_2 中 300IU/mL の IL-2-CS10、 複数のアリコート
プロセス時間	22 日	16 日

【２４２２】

０日目に、両方のプロセスについて、腫瘍を３回洗浄し、断片をランダム化し、２つのプールに分けた（プロセス毎に１つのプール）。Ｇｅｎ２プロセスの場合、断片を、６，０００ＩＵ／ｍＬのｒｈＩＬ－２を含有する１ＬのＣＭ１培地を含む１つのＧＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコに移した。Ｇｅｎ３プロセスでは、断片を、６，０００ＩＵ／ｍＬのｒｈＩＬ－２、１５ｕｇのＯＫＴ－３及び２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞を含有する５００ｍＬのＣＭ１を含む１つのＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコに移した。Ｒｅｐ開始日のＴＩＬの播種は、各プロセスに従って異なる日に起こった。Ｇ－ＲＥＸ　Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコを９０％減容させたＧｅｎ２プロセスの場合、収集した細胞懸濁

液を新たなＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳに移して、ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）＋５×１０^{9}フィーダー細胞及びＯＫＴ－３（３０ｎｇ／ｍＬ）を含有するＣＭ２培地中で１１日目にＲＥＰを開始した。細胞が拡張し、プロトコルに従って１６日目にＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）を有するＣＭ４培地を含む複数のＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコに分割した。その後、培養物を採取し、プロトコルに従って２２日目に凍結保存した。Ｇｅｎ３プロセスの場合、ＲＥＰの開始は７日目に起こり、同じＧ－ＲＥＸ －１００ＭＣＳをＲＥＰの開始に使用した。簡潔には、ＩＬ－２（６０００ＩＵ／ｍＬ）及び５×１０^{8}個のフィーダー細胞を３０ｕｇのＯＫＴ－３とともに含有する５００ｍＬのＣＭ２培地を各フラスコに添加した。９～１１日目に、培養をスケールアップした。Ｇ－ＲＥＸ１００Ｍの全体積（１Ｌ）をＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳに移し、ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）を含有する４ＬのＣＭ４を添加した。フラスコを５日間インキュベートした。培養物を採取し、１６日目に凍結保存した。

【２４２３】

比較には、２つの肺腫瘍（Ｌ４０５４及びＬ４０５５）と１つの黒色腫腫瘍（Ｍ１０８５Ｔ）の３つの異なる腫瘍を含めた。

【２４２４】

Ｌ４０５４及びＬ４０５５の場合、ＣＭ１培地（培養培地１）、ＣＭ２培地（培養培地２）、及びＣＭ４培地（培養培地４）を事前に調製し、４℃で保持した。ＣＭ１培地及びＣＭ２培地を、培地を濾過した場合の細胞増殖と培地を濾過しなかった場合の細胞増殖を比較するために、濾過せずに調製した。

【２４２５】

Ｌ４０５５腫瘍の場合、ＲＥＰの開始及びスケールアップ時に、培地を事前に３７℃で最大２４時間温めた。

【２４２６】

結果達成された生細胞の総数について、Ｇｅｎ３の結果はＧｅｎ２の３０％以内であった。Ｇｅｎ３最終製品は、再刺激後により高いＩＮＦ－γ産生を示した。Ｇｅｎ３最終製品は、存在する固有の全ＣＤＲ３配列によって測定される、増加したクローンの多様性を示した。Ｇｅｎ３最終製品は、より長い平均テロメア長を示した。

【２４２７】

Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスでのＲＥＰ前及びＲＥＰ拡張は、上記の手順に従った。各腫瘍について、２つのプールに同数の断片を含めた。腫瘍のサイズが小さいため、１フラスコ当たりの最大断片数は達成されなかった。総ＲＥＰ前細胞（ＴＶＣ）を採取し、Ｇｅｎ２プロセスの場合は１１日目に、Ｇｅｎ３プロセスの場合は７日目に計数した。２つのＲＥＰ前群を比較するために、細胞計数を培養物中に提供された断片の数で割り、１断片当たりの平均生細胞を計算した。以下の表５２に示されるように、Ｇｅｎ２プロセスは、Ｇｅｎ３プロセスと比較して、１断片当たりより多くの細胞を一貫して成長させた。ＲＥＰ前ＴＶＣを７で割り、その後、１１を掛けて計算した、１１日目にＧｅｎ３プロセスで予想されるＴＶＣ数の外挿計算。

【２４２８】

【表４５】

表５２．ＲＥＰ前の細胞計数

腫瘍 ID	L4054		L4055*		M1085T	
プロセス	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
REP 前 TVC	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
断片数	21	21	24	24	16	16
REP 前における断片当たりの平均 TVC	6.65E+06	2.06E+06	1.12E+06	5.75E+05	7.66E+05	2.18E+05
11 日目の REP 前における Gen3 外挿値	N/A	6.79E+07	N/A	2.17E+07	N/A	5.49E+06

＊Ｌ４０５５、濾過されていない培地。

【２４２９】

Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスの場合、ＴＶＣをプロセス条件毎に計数し、生細胞パーセントをプロセス日毎に生成した。採取時に、２２日目（Ｇｅｎ２）及び１６日目（Ｇｅｎ３）の細胞を収集し、ＴＶＣ数を確立した。その後、ＴＶＣを０日目に提供された断片の数で割り、１断片当たりの平均生細胞を計算した。倍率拡張を、採取したＴＶＣをＲＥＰ開始ＴＶＣで割ることによって計算した。表５３に示されるように、Ｇｅｎ２とＧｅｎ３を比較すると、倍率拡張はＬ４０５４の場合では同様であり、Ｌ４０５５の場合、倍率拡張はＧｅｎ２プロセスの方が高かった。具体的には、この場合、培地をＲＥＰ開始日の前に２４温めた。Ｍ１０８５Ｔの場合のＧｅｎ３でもより高い倍率拡張が観察された。ＲＥＰ　ＴＶＣを１６で割り、その後、２２を掛けて計算した、２２日目にＧｅｎ３プロセスで予想されるＴＶＣ数の外挿計算。

【２４３０】

【表４６】

表５３．ＴＩＬ最終製品の総生細胞数及び倍率拡張。

腫瘍 ID	L4054		L4055		M1085T	
プロセス	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
断片数	21	21	24	24	16	16
TVC/断片(採取時)	3.18E+09	8.77E+08	2.30E+09	3.65E+08	7.09E+08	4.80E+08
REP 開始	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
スケールアップ	3.36E+09	9.35E+08	3.49E+09	8.44E+08	1.99E+09	3.25E+08
採取	6.67E+10	1.84E+10	5.52E+10	8.76E+09	1.13E+10	7.68E+09
倍率拡張 採取/REP 開始	468.4	425.9	2056.8	634.6	925.0	2197.2
22 日目の REP 採取における Gen3 外挿値	N/A	2.53E+10	N/A	1.20E+10	N/A	1.06E+10

＊Ｌ４０５５、濾過されていない培地。

【２４３１】

表５４： ＴＩＬ最終製品の生存率％：採取時に、最終ＴＩＬ ＲＥＰ製品を生存率％の放出基準と比較した。Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスのすべての条件は、７０％の生存率基準を超えており、プロセス及び腫瘍間で同等であった。

【２４３２】

採取時に、最終ＴＩＬ ＲＥＰ製品を生存率％の放出基準と比較した。Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスのすべての条件は、７０％の生存率基準を超えており、プロセス及び腫瘍間で同等であった。

【２４３３】

【表４７】

表５４．ＲＥＰの生存率（ＴＩＬ最終製品）

腫瘍 ID	L4054		L4055		M1085T	
プロセス	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
REP 開始	98.23%	97.97%	97.43%	92.03%	81.85%	68.27%
スケールアップ	94.00%	93.57%	90.50%	95.93%	78.55%	71.15%
採取	87.95%	89.85%	87.50%	86.70%	86.10%	87.45%

【２４３４】

１フラスコ当たりの断片の数が最大必要数未満であったため、採取日の推定細胞計数を腫瘍毎に計算した。推定は、臨床腫瘍が０日目に２つまたは３つのフラスコに播種するの

に十分な大きさであるという予想に基づいた。
【２４３５】
【表４８】

表５５．Ｇｅｎ３プロセスでのフルスケール２及び３フラスコへの外挿推定細胞数計算

腫瘍 ID	L4054		L4055		M1085T	
Gen3 プロセス	2 フラスコ	3 フラスコ	2 フラスコ	3 フラスコ	2 フラスコ	3 フラスコ
推定採取	3.68E+10	5.52E+10	1.75E+10	2.63E+10	1.54E+10	2.30E+10

【２４３６】
免疫表現型決定－ＴＩＬ最終製品の表現型マーカー比較。３つの腫瘍Ｌ４０５４、Ｌ４０５５、及びＭ１０８５Ｔは、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスの両方でＴＩＬ拡張を受けた。採取時に、ＲＥＰ　ＴＩＬ最終製品をフローサイトメトリー分析にかけ、純度、分化、及びメモリーマーカーを試験した。すべての条件で、ＴＣＲ　ａ／ｂ＋細胞パーセンテージは９０％超であった。
【２４３７】
Ｇｅｎ３プロセスから採取したＴＩＬは、Ｇｅｎ２プロセスから採取したＴＩＬと比較して、より高いＣＤ８及びＣＤ２８発現を示した。Ｇｅｎ２プロセスは、より高いＣＤ４＋パーセンテージを示した。
【２４３８】
Ｇｅｎ３プロセスから採取したＴＩＬは、Ｇｅｎ２プロセス由来のＴＩＬと比較して、セントラルメモリー区画でより高い発現を示した。
【２４３９】
活性化及び疲弊マーカーを２つの腫瘍Ｌ４０５４及びＬ４０５５由来のＴＩＬで分析して、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３　ＴＩＬ拡張プロセス由来の最終ＴＩＬ製品を比較した。活性化及び疲弊マーカーは、Ｇｅｎ２プロセスとの間で同等であった。
【２４４０】
再刺激時のインターフェロンガンマ分泌採取日、Ｇｅｎ２の場合は２２日目、Ｇｅｎ３の場合は１６日目に、ＴＩＬは、Ｌ４０５４及びＬ４０５５の場合、コーティングした抗ＣＤ３プレートで一晩再刺激を受けた。Ｍ１０８５Ｔでの再刺激は、抗ＣＤ３、ＣＤ２８、及びＣＤ１３７ビーズを使用して行った。すべての条件で再刺激の２４時間後に上清を収集し、上清を凍結させた。ＥＬＩＳＡによるＩＦＮγ分析を、同じＥＬＩＳＡプレートを使用して両方のプロセス由来の上清で同時に評価した。分析した３つの腫瘍で、Ｇｅｎ３プロセス由来のＩＦＮγのより高い産生が観察された。
【２４４１】
培養培地中のＩＬ－２レベルの測定Ｇｅｎ２プロセスとの間のＩＬ－２消費量を比較するために、腫瘍Ｌ４０５４及びＬ４０５５で、ＲＥＰの開始時、スケールアップ時、及び採取日に細胞上清を収集した。細胞培養上清中のＩＬ－２の量を、Ｒ＆Ｄ製の定量化ＥＬＩＳＡキットによって測定した。一般的な傾向は、Ｇｅｎ２プロセスと比較して、Ｇｅｎ３プロセスではＩＬ－２濃度が高いままであることを示す。これは、プロセス全体を通して培地のキャリーオーバーと相まってＧｅｎ３のＲＥＰ開始時のＩＬ－２濃度がより高い（６０００ＩＵ／ｍＬ）ことに起因する可能性がある。
【２４４２】
代謝基質及び代謝物分析Ｄ－グルコース及びＬ－グルタミンなどの代謝基質のレベルを、全培地消費量の代わりに測定した。乳酸及びアンモニアなどのそれらの相互代謝物を測定した。グルコースは、ＡＴＰの形態でエネルギーを産生するためにミトコンドリアによ

って利用される培地中の単糖である。グルコースが酸化されると、乳酸が産生される（乳酸塩は乳酸のエステルである）。乳酸塩は、細胞の指数関数的成長期中に強く産生される。高レベルの乳酸塩は、細胞培養プロセスに悪影響を及ぼす。

【２４４３】

Ｌ４０５４及びＬ４０５５の使用済み培地を、Ｇｅｎ２プロセス及びＧｅｎ３プロセスの両方で、ＲＥＰ開始時、スケールアップ時、及び採取日に収集した。使用済み培地の収集は、Ｇｅｎ２の場合は１１日目、１６日目、及び２２日目、Ｇｅｎ３の場合は７日目、１１日目、及び１６日目であった。上清を、グルコース、乳酸、グルタミン、ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）、及びアンモニアの濃度についてＣＥＤＥＸバイオアナライザーで分析した。

【２４４４】

Ｌ－グルタミンは、細胞培養培地製剤に必要な不安定な必須アミノ酸である。グルタミンにはアミンが含まれており、このアミド構造基は、窒素を細胞に輸送して送達することができる。Ｌ－グルタミンが酸化すると、細胞によって有毒なアンモニア副産物が産生される。Ｌ－グルタミンの分解に対抗するために、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスの培地に、水溶液中でより安定しており、かつ自発的に分解しないＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を補充した。２つの腫瘍株では、Ｇｅｎ３アームは、プロセス中のＬ－グルタミン及びＧｌｕｔａＭａｘ（商標）の減少、ならびにＲＥＰ全体でアンモニアの増加を示した。Ｇｅｎ２アームでは、Ｌ－グルタミン及びＧｌｕｔａＭａｘ（商標）の濃度が一定であり、アンモニア産生のわずかな増加が観察された。Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３のプロセスは、アンモニアについて採取日に同等であり、Ｌ－グルタミン分解にわずかな違いが見られた。

【２４４５】

テロメアは、Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨによって繰り返される。Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨ技術を使用して、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスでのＬ４０５４及びＬ４０５５のテロメア反復の平均長を測定した。相対テロメア長（ＲＴＬ）の決定を、ＤＡＫＯ製のフローサイトメトリー分析用Ｔｅｌｏｍｅｒｅ　ＰＮＡキット／ＦＩＴＣを使用して計算した。Ｇｅｎ３は、Ｇｅｎ２と同等のテロメア長を示した。

【２４４６】

ＣＤ３分析各プロセスで生成された細胞製品のクローン多様性を決定するために、Ｌ４０５４及びＬ４０５５の採取したＴＩＬ最終製品をサンプリングし、Ｔ細胞受容体のＣＤＲ３部分の配列決定によるクローン多様性分析についてアッセイした。

【２４４７】

表５６は、採取したＴＩＬ細胞製品のＬ４０５４における共有される固有のＣＤＲ３配列パーセンテージに関するＧｅｎ２とＧｅｎ３との比較を示す。１９９個の配列がＧｅｎ３最終製品とＧｅｎ２最終製品との間で共有され、Ｇｅｎ３最終製品と共有されるＧｅｎ２由来の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の９７．０７％に相当する。

【２４４８】

【表４９】

表５６．Ｌ４０５４のＧｅｎ２プロセスとＧｅｎ３プロセスとの間で共有されるｕＣＤＲ３配列の比較。

uCDR3 番号 (重複%)	すべての uCDR3		uCDR3 の上位 80%	
	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
Gen2-L4054	8915	4355(48.85%)	205	199(97.07%)
Gen3-L4054	-	18130	-	223

【２４４９】

表５７は、採取したＴＩＬ細胞製品のＬ４０５５における共有される固有のＣＤＲ３配列パーセンテージに関するＧｅｎ２とＧｅｎ３との比較を示す。１８３３個の配列がＧｅｎ３最終製品とＧｅｎ２最終製品との間で共有され、Ｇｅｎ３最終製品と共有されるＧｅｎ２由来の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の９９．４５％に相当する。

【２４５０】

【表５０】

表５７．Ｌ４０５５のＧｅｎ２プロセスとＧｅｎ３プロセスとの間で共有されるｕＣＤＲ３配列の比較。

uCDR3 番号 (重複%)	すべての uCDR3		uCDR3 の上位 80%	
	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
Gen2-L4055	12996	6599(50.77%)	1843	1833(99.45%)
Gen3-L4055	-	27246	-	2616

【２４５１】

ＣＭ１及びＣＭ２培地は、濾過せずに事前に調製し、腫瘍Ｌ４０５５の場合、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスで使用するまで４℃で保持した。

【２４５２】

Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスのＲＥＰ開始日に、腫瘍Ｌ４０５５の場合、培地を３７℃で事前に２４時間温めた。

【２４５３】

これらのプロセスで収集した上清中にＬＤＨは測定されなかった。

【２４５４】

Ｍ１０８５Ｔ　ＴＩＬ細胞計数を、Ｋ２　ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ細胞カウンターを使用して実行した。

【２４５５】

腫瘍Ｍ１０８５Ｔでは、代謝分析用の上清、活性化及び疲弊マーカー分析用のＴＩＬ製品、テロメア長、及びＣＤ３－ＴＣＲｖｂ分析などの試料は入手できなかった。

【２４５６】

結論この実施例では、３つの独立したドナー腫瘍組織を、機能的品質属性に加えて、拡張された表現型特徴付け、ならびにＧｅｎ２プロセス及びＧｅｎ３プロセス間の培地消費に関して比較する。

【２４５７】

Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３のＲＥＰ前及びＲＥＰ拡張比較を、生成された全生細胞及び全有核細胞集団の生存率に関して評価した。採取日のＴＶＣ細胞用量は、Ｇｅｎ２（２２日）とＧｅｎ３（１６日）との間で同等ではなかった。Ｇｅｎ３細胞用量は、採取時に収集した全生細胞の約４０％であり、Ｇｅｎ２よりも低かった。

【２４５８】

ＲＥＰ前採取は、７日目ではなく１１日目に起こり、ＲＥＰ採取は、１６日目ではなく２２日目に起こると仮定して、Ｇｅｎ３プロセスの外挿細胞数を計算した。どちらの場合も、Ｇｅｎ３は、Ｇｅｎ２プロセスと比較してＴＶＣの数値が近いことを示し、初期活性化により、ＴＩＬの成長が増強したことを示す。

【２４５９】

Ｇｅｎ３プロセスでの追加フラスコ（２つまたは３つ）の外挿値の場合、処理される腫瘍サイズがより大きいと仮定し、記載されるようにプロセス毎に必要な最大断片数に到達する。２２日目のＧｅｎ２プロセスと比較して、Ｇｅｎ３プロセスの１６日目の採取時にＴＶＣで同様の用量に到達可能であり得ることが観察された。この観察は重要であり、培

養物の早期活性化がＴＩＬ処理時間を短縮したことを示す。
【２４６０】
Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３のＲＥＰ前及びＲＥＰ拡張比較を、生成された全生細胞及び全有核細胞集団の生存率に関して評価した。採取日のＴＶＣ細胞用量は、Ｇｅｎ２（２２日）とＧｅｎ３（１６日）との間で同等ではなかった。Ｇｅｎ３細胞用量は、採取時に収集した全生細胞の約４０％であり、Ｇｅｎ２よりも低かった。
【２４６１】
表現型特徴付けに関して、Ｇｅｎ２プロセスと比較してＧｅｎ３プロセスでの３つの腫瘍でより高いＣＤ８＋及びＣＤ２８＋発現が観察された。
【２４６２】
Ｇｅｎ３プロセスは、Ｇｅｎ２プロセスと比較してわずかに高いセントラルメモリー区画を示した。
【２４６３】
Ｇｅｎ２プロセス及びＧｅｎ３プロセスは、Ｇｅｎ３プロセスの持続期間がより短いにもかかわらず、同等の活性化及び疲弊マーカーを示した。
【２４６４】
ＩＦＮガンマ（ＩＦＮγ）産生は、分析した３つの腫瘍において、Ｇｅｎ２と比較してＧｅｎ３最終製品において３倍高かった。このデータは、Ｇｅｎ３プロセスがより短いＧｅｎ２プロセスと比較して高機能でより強力なＴＩＬ製品を生成したことを示し、Ｇｅｎ３でのＣＤ８及びＣＤ２８発現がより高いことに起因する可能性がある。表現型特徴付けは、Ｇｅｎ２プロセスと比較して３つの腫瘍でＣＤ８＋、ＣＤ２８＋発現へのＧｅｎ３の肯定的な傾向を示唆した。
【２４６５】
Ｇｅｎ２とＧｅｎ３との間のＴＩＬ最終製品のテロメア長は同等であった。
【２４６６】
グルコース及び乳酸塩レベルは、Ｇｅｎ２最終製品とＧｅｎ３最終製品との間で同等であり、プロセス日毎に減容除去が実行されなかったこと、及びＧｅｎ２と比較してプロセスにおける培地全体の体積が少ないことに起因して、Ｇｅｎ３プロセスの培地の栄養素レベルが影響されなかったことを示唆する。
【２４６７】
全体として、Ｇｅｎ３プロセスは、Ｇｅｎ２プロセスと比較してほぼ２倍の処理時間の短縮を示し、これにより、Ｇｅｎ３プロセスによって拡張されたＴＩＬ製品の売上原価（ＣＯＧ）の有意な削減がもたらされるであろう。
【２４６８】
ＩＬ－２消費は、Ｇｅｎ２プロセスでのＩＬ－２消費の一般的な傾向を示しており、Ｇｅｎ３プロセスでは、古い培地が除去されなかったため、ＩＬ－２が高かった。
【２４６９】
Ｇｅｎ３プロセスは、ＣＤＲ３　ＴＣＲａｂ配列分析によって測定されたより高いクローン多様性を示した。
【２４７０】
Ｇｅｎ３プロセスを使用して、ＲＥＰ前の０日目のフィーダー及びＯＫＴ－３の追加により、ＴＩＬの初期活性化が可能になり、ＴＩＬ成長が可能になった。
【２４７１】
表５８は、現在のＧｅｎ２プロセスと比較したＧｅｎ３プロセスの様々な実施形態及び成果を説明する。
【２４７２】

【表５１】

表５８．例示的なＧｅｎ３プロセス特徴。

ステップ	プロセス Gen2 の実施形態	プロセス Gen3 の実施形態
REP 前-0 日目	50 個以下の断片 1X G-REX-100MCS 1L 培地 IL-2 (6000 IU/mL) 11 日	240 個以下の断片 60 個以下の断片/フラスコ 4 つ以下のフラスコ 2L 以下の培地(500mL/フラスコ) IL-2 (6000 IU/mL) 2.5×10^8 個のフィーダー細胞/フラスコ 15ug の OKT3/フラスコ
REP 開始	REP に指向した新鮮な TIL 11 日目 $200e^6$ 個以下の生細胞 5×10^9 フィーダー細胞 G-REX-500MCS 5L CM2 培地+IL-2(3000IU/mL) 150μg の OKT3	REP に指向した新鮮な TIL 7 日目 培養物全体を活性化する 5×10^8 フィーダー細胞 30μg の OKT3/フラスコ G-REX-100MCS 500mL 培地+IL-2(6000IU/mL)
TIL 継代培養またはスケールアップ	5 つ以下の G-REX-500MCS 1×10 個以下の生細胞/フラスコ 5L/フラスコ 16 日目	4 つ以下の G-REX-500MCS 培養物全体をスケールアップする 4L/フラスコ 10~11 日目
採取	22 日目に採取 LOVO-自動細胞洗浄機 2 回の洗浄サイクル	16 日目に採取する LOVO-自動細胞洗浄機 5 回の洗浄サイクル
最終製剤	凍結保存した製品 LN_2 中の 300IU/mL の IL2-CS10、 複数のアリコート	凍結保存した製品 LN_2 中 300IU/mL の IL-2-CS10、 複数のアリコート
プロセス時間	22 日	16 日

【２４７３】

実施例１０：例示的なＧＥＮ３プロセス（ＧＥＮ３．１とも称される）

この実施例は、「ＴＩＬ拡張のためのＧｅｎ２プロセスとＧｅｎ３プロセスとの間の比較可能性」に関するさらなる研究について説明する。Ｇｅｎ３プロセスを、表現型及び機能プロファイルを維持しながら、最終総生細胞（ＴＶＣ）出力を増やすことを目的として、プロセスの初期に活性化ステップを含むように修正した。以下に記載されるように、Ｇｅｎ３実施形態をさらなる実施形態として修正し、本明細書におけるこの実施例ではＧｅｎ３．１と称する。

【２４７４】

いくつかの実施形態では、Ｇｅｎ３．１　ＴＩＬ製造プロセスは、以下の４つのオペレーター介入を有する。

１．腫瘍断片の単離及び活性化：プロセスの０日目に腫瘍を解剖し、最終断片を各々約３×３ｍｍ（合計で最大２４０個の断片）を生成し、１～４つのＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコ内で培養した。各フラスコは、最大６０個の断片、６，０００ＩＵのｒｈＩＬ－２、１５μｇのＯＫＴ３、及び２．５×10^8個の放射線照射した同種異系単核細胞を補充した５００ｍＬのＣＭ１またはＤＭ１培地を含んだ。培養物を３７℃で６～８日間インキュベートした。

２．ＴＩＬ培養再活性化：７～８日目に、いずれの場合も６，０００ＩＵのｒｈＩＬ－２、３０μｇのＯＫＴ３、及び５×10^8個の放射線照射した同種異系単核細胞を補充したＣＭ２またはＤＭ１培地をゆっくり添加することによって、培養物を補充した。フラスコの底にある既存の細胞を乱さないように注意した。培養物を３７℃で３～４日間インキュベートした。

３．培養のスケールアップ：１０～１１日目に生じる。培養のスケールアップ中に、Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳの全内容物を、いずれの場合も３，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した４ＬのＣＭ４またはＤＭ２を含むＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコに移した。採取するまでフラスコを３７℃で５～６日間インキュベートした。

４．採取／洗浄／製剤化：１６～１７日目に、フラスコを減容させ、プールする。細胞を濃縮し、１％ＨＳＡを含有するＰｌａｓｍａＬｙｔｅ Ａ ｐＨ７．４で洗浄した。洗浄した細胞懸濁液を、ＣｒｙｏＳｔｏｒ１０と１：１の比で配合し、３００ＩＵ／ｍＬの最終濃度までｒｈＩＬ－２を補充した。

【２４７５】

ＤＰを制御された速度の凍結で凍結保存し、気相液体窒素中で保管した。＊完全標準ＴＩＬ培地１、２、または４（ＣＭ１、ＣＭ２、ＣＭ４）は、上記のように、合成培地（ＤＭ１またはＤＭ２）と称されるＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞無血清拡張培地の代用となり得た。

【２４７６】

プロセスの説明０日目に、腫瘍を３回洗浄し、その後、３×３×３の最終断片に断片化した。全腫瘍を断片化した時点で、最終断片を均等にランダム化し、３つのプールに分割した。１つのランダム化断片プールを各群に導入し、３つの実験マトリックス毎に同じ数の断片を添加した。

【２４７７】

全ＴＩＬ拡張プロセスにわたって、腫瘍Ｌ４０６３拡張を標準培地で行い、腫瘍Ｌ４０６４拡張を合成培地（ＣＴＳ ＯｐＴｍｉｚｅｒ）で行った。培地の成分を本明細書に記載する。

【２４７８】

ＣＭ１完全培地１：２ｍＭ ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）、１０％ヒトＡＢ血清、ゲンタマイシン（５０ｕｇ／ｍＬ）、２－メルカプトエタノール（５５ｕＭ）を補充したＲＰＭＩ＋グルタミン。６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終培地製剤。

【２４７９】

ＣＭ２完全培地２：５０％ ＣＭ１培地＋５０％ ＡＩＭ－Ｖ培地。６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終培地製剤。

【２４８０】

ＣＭ４完全培地４：ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）（２ｍＭ）を補充したＡＩＭ－Ｖ。３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終培地製剤。

【２４８１】

ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（２６ｍＬ／Ｌ）を補充したＣＴＳ ＯｐＴｍｉｚｅｒ ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ。

【２４８２】

ＤＭ１：ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（２６ｍＬ／Ｌ）、及びＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ

ＳＲ（３％）をＧｌｕｔａＭａｘ（商標）（２ｍＭ）とともに補充したＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ。６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終製剤。

【２４８３】

ＤＭ２：ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（２６ｍＬ／Ｌ）、及びＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ ＳＲ（３％）をＧｌｕｔａＭａｘ（商標）（２ｍＭ）とともに補充したＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ。３，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終製剤。

【２４８４】

使用したすべてのタイプの培地、すなわち、完全培地（ＣＭ）及び合成培地（ＤＭ）を事前に調製し、使用前日まで４℃で保持し、プロセス日前に事前に最長２４時間にわたってインキュベーター内で３７℃で温めた。

【２４８５】

ＴＩＬ培養再活性化は、両方の腫瘍で７日目に起こった。スケールアップは、Ｌ４０６３では１０日目、Ｌ４０６４では１１日目に起こった。両方の培養物を採取し、１６日目に凍結保存した。

【２４８６】

達成した結果Ｇｅｎ３．０プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスの細胞計数及び生存率％を決定した。すべての条件下での拡張は、この実施例に説明される詳細に従った。

【２４８７】

腫瘍毎に、断片を同数の３つのプールに分割した。腫瘍のサイズが小さいため、１フラスコ当たりの断片の最大数は達成されなかった。３つの異なるプロセスについて、総生細胞及び細胞生存率を条件毎に評価した。細胞数を、７日目の再活性化のＴＶＣ、１０日目（Ｌ４０６４）または１１日目（Ｌ４０６３）のスケールアップのＴＶＣ、及び１６／１７日目の採取時のＴＶＣとして決定した。

【２４８８】

７日目及び１０／１１日目の細胞計数をＦＩＯで測定した。倍率拡張を、１６／１７日目の採取時のＴＶＣを７日目の再活性化日のＴＶＣで割ることによって計算した。３つの群を比較するために、採取日のＴＶＣを、０日目の培養物中に添加した断片の数で割って、１断片当たりの生細胞の平均を計算した。

【２４８９】

Ｌ４０６３及びＬ４０６４について、細胞計数及び生存率アッセイを行った。Ｇｅｎ３．１－試験プロセスは、両方の腫瘍でＧｅｎ３．０プロセスよりも多くの１断片当たりの細胞数をもたらした。

【２４９０】

総生細胞数及び倍率拡張、プロセス中の生存率％再活性化時に、スケールアップして採取し、すべての条件で生存率％を行った。１６／１７日目の採取日に、最終ＴＶＣを生存率％の放出基準と比較した。評価したすべての条件は、７０％の生存率基準を超え、プロセス及び腫瘍全体で同等であった。

【２４９１】

免疫表現型決定－ＴＩＬ最終製品の表現型特徴付け。最終製品をフローサイトメトリー分析にかけ、純度、分化、及びメモリーマーカーを試験した。集団パーセントは、すべての条件で、ＴＣＲα／β細胞、ＣＤ４＋細胞、及びＣＤ８＋細胞で一貫していた。

【２４９２】

ＲＥＰ ＴＩＬの拡張表現型分析を行った。ＴＩＬ製品は、両方の腫瘍でＧｅｎ３．０と比較してＧｅｎ３．１条件でより高いＣＤ４＋細胞パーセンテージを示し、両方の条件でＧｅｎ３．１条件と比較してＧｅｎ３．０でより高いＣＤ８＋集団由来のＣＤ２８＋細胞パーセンテージを示した。

【２４９３】

Ｇｅｎ３．０プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスから採取したＴＩＬは、ＣＤ４＋細胞及びＣＤ８＋細胞でのＣＤ２７及びＣＤ５６発現、ならびにＣＤ４＋ゲート細胞集団での同等のＣＤ２８発現と同等の表現型マーカーを示した。ＴＩＬ最終製品のメモリーマーカーの比較：

【２４９４】

１６日目に採取したＴＩＬの凍結試料を分析のために染色した。ＴＩＬメモリーステータスは、Ｇｅｎ３．０プロセスとＧｅｎ３．１プロセスとの間で同等であった。ＴＩＬ最終製品の活性化及び疲弊マーカーの比較：

【２４９５】

活性化及び疲弊マーカーは、ＣＤ４＋細胞及びＣＤ８＋細胞上でゲートされたＧｅｎ３．０プロセスとＧｅｎ３．１プロセスとの間で同等であった。

【２４９６】

再刺激時のインターフェロンガンマ分泌採取したＴＩＬは、Ｌ４０６３及びＬ４０６４用のコーティングされた抗ＣＤ３プレートで一晩再刺激を受けた。Ｇｅｎ３．０プロセスと比較して、分析した２つの腫瘍で、より高いＧｅｎ３．１プロセスからのＩＦＮγ産生が観察された。

【２４９７】

培養培地中のＩＬ－２レベルの測定すべての条件及びプロセス間のＩＬ－２消費レベルを比較するために、細胞上清を、７日目の再活性化の開始時、１０日目（Ｌ４０６４）／１１日目（Ｌ４０６３）のスケールアップ時、及び１６／１７日目の採取及び凍結時に収集した。その後、上清を解凍し、分析した。細胞培養上清中のＩＬ－２の量を、製造業者のプロトコルによって測定した。

【２４９８】

全体的なＧｅｎ３プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスは、同じ培地条件で評価した全プロセス中のＩＬ－２消費に関して同等であった。Ｌ４０６３及びＬ４０６４用に収集した使用済み培地のＩＬ－２濃度（ｐｇ／ｍＬ）分析。

【２４９９】

代謝物分析使用済み培地の上清を、Ｌ４０６３及びＬ４０６４について、すべての条件で、７日目の再活性化の開始時、１０日目（Ｌ４０６４）または１１日目（Ｌ４０６３）のスケールアップ時、及び１６／１７日目の採取時に、Ｌ４０６３及びＬ４０６４から収集した。上清をＣＥＤＥＸバイオアナライザーでグルコース、乳酸塩、グルタミン、ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）、及びアンモニアの濃度について分析した。

【２５００】

合成培地は、完全培地（２ｇ／Ｌ）と比較してより高いグルコース濃度４．５ｇ／Ｌを有する。全体として、グルコースの濃度及び消費量は、各培地タイプ内でＧｅｎ３．０プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスにおいて同等であった。

【２５０１】

乳酸塩の増加が観察され、乳酸塩の増加は、Ｇｅｎ３．０条件とＧｅｎ３．１条件との間、及び再活性化拡張に使用した２つの培地（完全培地と合成培地）間で同等であった。

【２５０２】

いくつかの場合において、標準基礎培地は、２ｍＭのＬ－グルタミンを含有し、培養条件下でＬ－グルタミンのＬ－グルタミン酸塩及びアンモニアへの自然分解を補うために、２ｍＭのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）で補充された。

【２５０３】

いくつかの場合において、使用した合成（無血清）培地は、基礎培地にＬ－グルタミンを含有せず、最終濃度が２ｍＭになるまでＧｌｕｔａＭａｘ（商標）のみで補充された。ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）は、Ｌ－アラニンとＬ－グルタミンのジペプチドであり、水溶液中でＬ－グルタミンよりも安定しており、グルタミン酸塩及びアンモニアに自発的に分解しない。代わりに、ジペプチドは、個々のアミノ酸に徐々に解離し、それにより、より低いが十分な濃度のＬ－グルタミンを維持して、強力な細胞成長を維持する。

【２５０４】
いくつかの場合において、グルタミン濃度及びＧｌｕｔａＭａｘ（商標）濃度は、スケールアップ日にわずかに減少したが、採取日には再活性化日と比較して同様またはより近いレベルへの増加を示した。Ｌ４０６４の場合、グルタミン濃度及びＧｌｕｔａＭａｘ（商標）濃度は、全プロセス中、異なる条件間で同様の速度でわずかな分解を示した。
【２５０５】
アンモニア濃度は、２ｍＭのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を含有する合成培地中で成長させた試料よりも、２ｍＭのグルタミン＋２ｍＭのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を含有する標準培地中で成長させた試料で高かった。さらに、予想通り、培養の過程にわたってアンモニアの段階的増加または蓄積があった。３つの異なる試験条件間でアンモニア濃度に差はなかった。
【２５０６】
Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨによるテロメア反復：Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨ技術を使用して、Ｇｅｎ３プロセス及びＧｅｎ３．１プロセス下でのＬ４０６３及びＬ４０６４のテロメア反復の平均長を測定した。相対テロメア長（ＲＴＬ）の決定を、ＤＡＫＯ製のフローサイトメトリー分析用Ｔｅｌｏｍｅｒｅ　ＰＮＡキット／ＦＩＴＣを使用して計算した。テロメアアッセイを行った。試料のテロメア長を、対照細胞株（１３０１白血病）と比較した。対照細胞株は、長くて安定したテロメアを有する四倍体細胞株であり、相対テロメア長の計算を可能にする。両方の腫瘍で評価したＧｅｎ３プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスは、同等のテロメア長を示した。
【２５０７】
ＴＣＲ　Ｖβレパートリー分析
各プロセスで生成された細胞製品のクローン多様性を決定するために、ＴＩＬ最終製品をＴ細胞受容体のＣＤＲ３部分の配列決定によるクローン多様性分析のためにアッセイした。
【２５０８】
３つのパラメータを３つの条件間で比較した。
●固有のＣＤＲ３（ｕＣＤＲ３）の多様性指数
●ｕＣＤＲ３共有％
●ｕＣＤＲ３の上位８０％の場合：
○共有されるｕＣＤＲ３コピーの％を比較する
○固有のクロノタイプの頻度を比較する
【２５０９】
対照及びＧｅｎ３．１試験、ＴＩＬで採取した細胞製品で共有される固有のＣＤＲ３配列パーセンテージ：９７５個の配列がＧｅｎ３試験最終製品とＧｅｎ３．１試験最終製品との間で共有され、Ｇｅｎ３．１と共有されるＧｅｎ３由来の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の８８％に相当する。
【２５１０】
対照及びＧｅｎ３．１試験、ＴＩＬで採取した細胞製品で共有される固有のＣＤＲ３配列パーセンテージ：２１６３個の配列がＧｅｎ３試験最終製品とＧｅｎ３．１試験最終製品との間で共有され、Ｇｅｎ３．１と共有されるＧｅｎ３由来の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の８７％に相当する。
【２５１１】
異なるプロセスについて、１６日目の採取時に収集した1×10^{6}個の細胞から特定された固有のＣＤ３配列の数。Ｇｅｎ３．１試験条件は、試料内の固有のペプチドＣＤＲの数に基づいて、Ｇｅｎ３．０と比較してわずかに高いクローン多様性を示した。
【２５１２】
シャノンエントロピー多様性指数は、比較のための信頼性の高い一般的なメトリックであり、両方の腫瘍に対するＧｅｎ３．１条件は、Ｇｅｎ３プロセスよりもわずかに高い多様性を示し、Ｇｅｎ３．１試験条件のＴＣＲ　ＶβレパートリーがＧｅｎ３．０プロセス

よりもポリクローナルであることを示唆する。

【２５１３】

追加として、Ｇｅｎ３．１試験条件のＴＣＲ　Ｖβレパートリーは、腫瘍Ｌ４０６３及びＬ４０６４の両方でＧｅｎ３．０プロセスの対応するレパートリーと８７％を超える重複を示した。

【２５１４】

再活性化日のＧｅｎ３．１試験Ｌ４０６４の使用済み培地のＩＬ－２濃度の値は、期待値を下回った（Ｇｅｎ３．１対照及びＧｅｎ３．０条件と同様であった）。

【２５１５】

低い値はピペッティングエラーに起因した可能性があったが、最小限の試料しか採取できなかったため、アッセイを繰り返すことができなかった。

【２５１６】

結論０日目のフィーダー及びＯＫＴ－３を含むＧｅｎ３．１試験条件は、Ｇｅｎ３．０及びＧｅｎ３．１対照と比較して、１６日目の採取時の細胞用量のＴＶＣがより高いことを示した。Ｇｅｎ３．１試験条件のＴＶＣ最終製品は、Ｇｅｎ３．０よりも約２．５倍高かった。

【２５１７】

試験した腫瘍試料の両方について、０日目にＯＫＴ－３及びフィーダーを添加したＧｅｎ３．１試験条件は、採取時にフラスコの最大容量に達した。これらの条件下で、０日目に最大４つのフラスコを開始した場合、最終細胞用量は、８０～１００×10^9ＴＩＬである可能性があった。

【２５１８】

最終ＴＩＬ製品の純度、疲弊、活性化、及びメモリーマーカーを含む表現型特徴付けなどのすべての品質属性が、Ｇｅｎ３．１試験とＧｅｎ３．０プロセスとの間で維持された。

【２５１９】

最終ＴＩＬ製品のＩＦＮ－γ産生は、分析した２つの腫瘍において、Ｇｅｎ３．０と比較して、０日目にフィーダー及びＯＫＴ－３を添加したＧｅｎ３．１で３倍高く、Ｇｅｎ３．１プロセスが強力なＴＩＬ製品を生成したことを示唆する。

【２５２０】

試験条件にわたって、グルコースまたは乳酸塩レベルに差異は観察されなかった。培地条件にわたって、Ｇｅｎ３．０プロセスとＧｅｎ３．１プロセスとの間でグルタミン及びアンモニアに差異は観察されなかった。培地上の低レベルのグルタミンは、細胞増殖を制限しておらず、培地へのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）のみの添加が、細胞を増殖させるのに必要な栄養素を与えるのに十分であることを示唆する。

【２５２１】

１１日目及び１０日目のスケールアップは、それぞれ、プロセスの採取日に到達した細胞数に関して大きな差異を示さず、代謝物の消費量は、全プロセスにわたって両方の場合で同等であった。この観察結果は、Ｇｅｎ３．０最適化プロセスが処理日に柔軟性を有し、それにより、製造スケジュールの柔軟性を促進することができることを示唆している。

【２５２２】

０日目にフィーダー及びＯＫＴ－３を添加したＧｅｎ３．１プロセスは、Ｇｅｎ３．０と比較して、ＣＤＲ３　ＴＣＲａｂ配列分析によって測定されたより高いクローン多様性を示した。

【２５２３】

図３２は、Ｇｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３最適化プロセス）の実施形態を説明する。標準培地及びＣＴＳ　Ｏｐｔｉｍｉｚｅｒ無血清培地を、Ｇｅｎ３最適化プロセスＴＩＬ拡張に使用することができる。ＣＴＳ　Ｏｐｔｉｍｉｚｅｒの場合、培地のＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を最終濃度４ｍＭに増加させるために無血清培地が推奨される。

【２５２４】

実施例１１：ＣＤ３９／ＣＤ６９選択に関連した浸潤リンパ球（ＴＩＬ）拡張及びＴＩＬにおける遺伝子ノックアウトのためのプロセス
腫瘍の調製
新たに切除された腫瘍試料は、消化、選別及びＧｅｎ２製品生成に使用される。写真を撮り、パッケージから腫瘍を取り出し、バイアルを腫瘍の有無にかかわらず秤量し、腫瘍の質量を計算する。
【２５２５】
腫瘍消化のために腫瘍全体をおよそ４～６ｍｍ３の断片に断片化する。拡張に使用されている細胞集団に応じて、腫瘍を、Ｇｅｎ２プロトコルを使用して、消化及び拡張する。
【２５２６】
腫瘍消化のための酵素調製（研究グレードのＤＮＡｓｅ、コラゲナーゼ及びヒアルロニダーゼを使用）
以下の消化酵素の各々について示されている滅菌ＨＢＳＳの量で凍結乾燥酵素を再構成する。これらの酵素は、１０倍として調製される。上下に数回ピペッティングし、旋回させて、完全な再構成を確実にする。
【２５２７】
１ｇのコラゲナーゼＩＶ（Ｓｉｇｍａ，ＭＯ，Ｃ５１３８）を１０ｍｌのＨＢＳＳで再構成する（１００ｍｇ／ｍＬのストックを作製するため）。上下にピペッティングすることによって混合して溶解する。再構成後に溶解していない場合、３７℃のＨ２０浴中で５分間置く。１ｍｌのバイアルに分注する。これは、コラゲナーゼの１００ｍｇ／ｍＬの１０倍作業ストックである。
【２５２８】
ＤＮＡｓｅ（Ｓｉｇｍａ，ＭＯ，Ｄ５０２５）ストック溶液（１０，０００ＩＵ／ｍＬ）を調製する。各ロットのＤＮＡｓｅの単位は、添付のデータシートに提供される。ＨＢＳＳの適切な量を計算して、１００ｍｇの凍結乾燥ＤＮＡｓｅストックを再構成する。例えば、ＤＮＡｓｅストックが２０００Ｕ／ｍｇである場合、ストック内のＤＮＡｓｅの合計は、２００，０００ＩＵ（２０００ＩＵ／ｍｇ×１００ｍｇ）である。１０，０００ＩＵの作業ストックに希釈し、１００ｍｇのＤＮＡｓｅに２０ｍｌのＨＢＳＳを添加する（２００，０００ＩＵ／２０ｍｌ＝１０，０００Ｕ／ｍＬ）。１ｍｌのバイアルに分注する。これは、ＤＮＡｓｅの１０，０００ＩＵ／ｍＬの１０倍作業ストックである。
【２５２９】
ヒアルロニダーゼ１０ｍｇ／ｍＬ（Ｓｉｇｍａ，ＭＯ，Ｈ２１２６）ストック溶液を調製する。５００ｍｇのバイアルを５０ｍｌのＨＢＳＳで再構成して、１０ｍｇ／ｍＬのストック溶液を作製する。１ｍｌのバイアルに分注する。これは、ヒアルロニダーゼの１０ｍｇ／ｍＬの１０倍作業ストックであった。
【２５３０】
ストック消化酵素を１倍に希釈する。１倍作業溶液を作製するために、コラゲナーゼ、ＤＮＡｓｅ、及びヒアルロニダーゼを各々５００ｍｌずつ３．５ｍｌのＨＢＳＳに添加する。消化物カクテルをＣチューブに直接添加する。
【２５３１】
腫瘍消化のための酵素調製（ＧＭＰコラゲナーゼ及び中性プロテアーゼを使用）
以下の消化酵素の各々について示されている滅菌ＨＢＳＳの量で凍結乾燥酵素を再構成する。ボトルの側面及びボトル開口部の保護ホイルからのいかなる残留粉末も必ず捕捉する。上下に数回ピペッティングし、旋回させて、完全な再構成を確実にする。
【２５３２】
コラゲナーゼＡＦ－１（Ｎｏｒｄｍａｒｋ，Ｓｗｅｄｅｎ，Ｎ０００３５５４）を１０ｍｌの滅菌ＨＢＳＳで再構成する。凍結乾燥ストック酵素は、２８９２ＰＺ　Ｕ／バイアルの濃度にある。再構成後に、コラゲナーゼストックは、２８９．２ＰＺ　Ｕ／ｍＬであった。
【２５３３】

中性プロテアーゼ（Ｎｏｒｄｍａｒｋ，Ｓｗｅｄｅｎ，Ｎ０００３５５３）を１ｍｌの滅菌ＨＢＳＳで再構成する。凍結乾燥ストック酵素は、１７５ＤＭＣ Ｕ／バイアルの濃度にある。したがって、再構成後、中性プロテアーゼストックは、１７５ＤＭＣ／ｍＬであった。

【２５３４】

ＤＮＡｓｅ Ｉ（Ｒｏｃｈｅ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ，０３７２４７５１）を１ｍｌの滅菌ＨＢＳＳで再構成する。凍結乾燥したストック酵素は、４ＫＵ／バイアルの濃度にある。したがって、再構成後、ＤＮＡｓｅストックは、４ＫＵ／バイアルである。

【２５３５】

作業ＧＭＰ消化物カクテルを調製する。１０．２μｌの中性プロテアーゼ（０．３６ＤＭＣ Ｕ／ｍＬ）、２１．３μｌのコラゲナーゼＡＦ－１（１．２ＰＺ／ｍＬ）及び２５０μｌのＤＮＡｓｅ Ｉ（２００Ｕ／ｍＬ）を４．７ｍｌの滅菌ＨＢＳＳに添加する。消化物カクテルをＣチューブに直接入れる。

【２５３６】

腫瘍の処理及び消化

ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ ＯｃｔｏＤｉｓｓｏｃｉａｔｏｒを使用する場合、腫瘍断片をＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ Ｃ－Ｔｕｂｅ（Ｃチューブ）または上記の５ｍｌの消化物カクテル中（ＨＢＳＳ中）の５０ｍｌのコニカルチューブに移す。２～３個の断片（４～６ｍｍ）を各Ｃチューブに移す。

【２５３７】

各Ｃチューブ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ，Ｇｅｒｍａｎｙ，１３０－０９６－３３４）をＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ ＯｃｔｏＤｉｓｓｏｃｉａｔｏｒ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ，Ｇｅｒｍａｎｙ，１３０－０９５－９３７）に移す。製造業者の指示に従って使用する。各腫瘍組織学には、腫瘍解離のための推奨プログラムがあることに留意する。それぞれの腫瘍組織学のために適切なプログラムを選択する。解離は、およそ１時間であった。

【２５３８】

ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ ＯｃｔｏＤｉｓｓｏｃｉａｔｏｒが利用できない場合、標準ローテーターを使用する。２～３個の腫瘍断片を５０ｍｌのコニカルチューブ（漏れを防ぐためにパラフィルムで密封）に入れ、ローテーターに固定した。ローテーターを３７℃、５％ ＣＯ２加湿インキュベーターに置き、１～２時間一定回転させる。代替的に、腫瘍断片は、一定回転させながら、室温で一晩消化され得る。

【２５３９】

消化後、ＯｃｔｏｄｉｓｓｏｃｉａｔｏｒまたはローテーターからＣチューブを取り外す。０．２２μｍのストレーナーを滅菌Ｆａｌｃｏｎコニカルチューブに取り付ける。ピペットを使用して、Ｃチューブ／または５０ｍｌのコニカル（５ｍｌ）からのすべての内容物を０．２２μｍのストレーナーを通して５０ｍｌのコニカルに通す。Ｃチューブ／５０ｍｌのコニカルを１０ｍｌのＨＢＳＳで洗浄し、ストレーナーに適用する。滅菌シリンジプランジャーの平らな先端を使用して、フィルターを通していかなる残りの消化されていない腫瘍も解離する。最大５０ｍｌのＣＭ１またはＨＢＳＳを添加し、チューブにキャップをする。

【２５４０】

１５００ｒｐｍ、室温で５分間の遠心分離（９の加速及び減速）によって、試料をペレット化する。慎重に液体を取り除き、細胞計数及び生存率の評価のために、ペレットを５ｍｌのＣＭ１に再懸濁した。

【２５４１】

以下のために全腫瘍消化物を取り分ける：１．細胞培養（選択されていないＴＩＬ対照）２．ＦＭＯフローサイトメトリー対照３．全腫瘍消化物表現型アッセイを予め選別する４．腫瘍反応性／細胞殺傷アッセイのために凍結させる。取り分けられた細胞の数は、総消化物収量及び腫瘍組織学に依存する。

【２５４２】
デブリ除去キットを使用した消化物のクリーンアップ
デブリは、デブリ除去溶液（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ｇｅｒｍａｎｙ、カタログ番号１３０－１０９－３９８）を製造業者の指示に従って使用して、腫瘍消化物から除去することができる。
【２５４３】
腫瘍細胞懸濁液を３００Ｘｇ、４℃で１０分間遠心分離し、上清を完全に吸引する。
【２５４４】
以下の表に従って適切な量の冷却緩衝液を用いて細胞懸濁液を慎重に再懸濁し、細胞懸濁液を１５ｍｌのコニカルチューブに移す。ボルテックスしない。
【２５４５】
【表５２】

	再懸濁(PBS)	デブリ除去溶液	重層(PBS)
0.5~1g の組織	6200-µl	1800-µl	4-ml
>0.5g の組織	3100-µl	900-µl	4-ml

【２５４６】
適切な量の冷却デブリ除去溶液を添加し、５ｍｌピペットを使用して１０～２０回ゆっくりと上下にピペッティングすることによってよく混合する。４ｍｌの冷却緩衝液で非常に穏やかに重層させた。ＰＢＳ／Ｄ－ＰＢＳ相が細胞懸濁液を重層させて、相が混合されないことを確認するために、チューブを傾け、非常にゆっくりとピペッティングする。腫瘍細胞懸濁液を３０００Ｘｇ、４℃で１０分間遠心分離し、完全に加速し、完全に破壊する。３つの相が形成されなければならない。上の２つの相を完全に吸引し、それらを破棄する。
【２５４７】
下の相には、デブリ除去溶液及び細胞が含まれている。必ず、少なくとも添加したデブリ除去溶液と同じ量を底に残す。（すなわち、１ｍｌの溶液を添加した場合は、チューブの底に少なくとも１ｍｌを残す）。
【２５４８】
冷却緩衝液を用いて１５ｍｌにし、チューブを少なくとも３回反転させる。ボルテックスしない。１０００Ｘｇ、４℃で１０分間遠心分離し、完全に加速し、完全に破壊する。細胞計数のために、ＨＢＳＳまたは培地に細胞を再懸濁する。
【２５４９】
細胞選別のために消化された腫瘍を染色する（エクスビボ及び拡張後選別の両方）
腫瘍消化物は、以下のプロトコルに従って、抗ＣＤ６９、抗ＣＤ３９、及び抗ＣＤ３抗体を含むカクテルで染色される。計数後、細胞を１０ｍｌのＨＢＳＳに再懸濁する。
【２５５０】
ペレットをＦＡＣＳ緩衝液（１×ＨＢＳＳ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、２％ウシ胎仔血清）に再懸濁する。ペレットに添加されるＦＡＣＳ緩衝液の量は、ペレットのサイズに基づいている。染色量は、ペレットの約３倍のサイズでなければならない。したがって、３００μｌの細胞がある場合、緩衝液の量は、少なくとも９００μｌでなければならない。
【２５５１】
抗体添加の場合、各１００μｌの量は、１回の試験（抗体の滴定量）に相当する。すなわち、１ｍｌの量がある場合、１０倍量の滴定抗体が必要である。１００μｌの量当たり滴定量の抗ＣＤ３－ＰＥ－Ｃｙ７、抗ＣＤ６９　ＰＥ及び抗ＣＤ３９　ＦＩＴＣの各抗体を添加する。細胞を氷上で３０分間インキュベートする。インキュベーション中に光から保護する。インキュベーション中、数回撹拌する。細胞を２０ｍｌのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁する。溶液を７０ミクロンの細胞ストレーナーに通して、新しい５０ｍｌコニカルに

通す。４００Ｘｇ、室温で５分間遠心分離する（９の加速及び減速）。吸引する。細胞を最大１０ｅ６／ｍＬ合計（ｌｉｖｅ＋ｄｅａｄ）でＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁する。最小量は、３００μｌである。滅菌ポリプロピレンＦＡＣＳチューブまたは１５ｍｌコニカルチューブに移す。ＦＡＣＳ選別用の３ｍｌ／チューブ。選別された集団用に１５ｍｌ収集チューブを準備する。２ｍｌのＦＡＣＳ緩衝液をチューブに入れる。

【２５５２】

細胞計数及び生存率

細胞及び生存率の計数を取得するための手順は、Ｎｅｘｃｅｌｏｍ　Ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２または同等の細胞カウンターを使用した。

【２５５３】

ＦＡＣＳ選別（ＦＸ５００スタートアップ手順）

注記：他のフローサイトメーターのプロトコルは異なり、機械使用についての製造業者の指示に従い、必要に応じて適応される。

【２５５４】

スタートアップ後、プロンプトが表示されたら、ＰＢＳ／ＥＤＴＡ緩衝液の４つのバッグをすべて取り付ける。ＰＥＥＫ試料ラインを取り付ける。プロセスの詳細な説明については、「ＬＥ－ＦＸ５００オペレーターガイド」を参照されたい。

【２５５５】

機器を設定する。レーザー選択のプロンプトが表示されたら、３つのレーザーをすべて選択する（４８８ｎｍ、５６１ｎｍ、及び６３８ｎｍ）。フィルター設定を求めるプロンプトが表示されたら、「標準」ラジオボタンを選択する。自動キャリブレーションを実行する。キャリブレーションビーズをロードするようにプロンプトが表示されたら、１５滴の自動セットアップビーズを５ｍｌの滅菌ＦＡＣＳチューブに添加する。次いで、プロンプトに従う。

【２５５６】

自動キャリブレーションの設定を選択するようにプロンプトが表示されたら、「標準」ラジオボタンを選択した。キャリブレーションが完了するのを待っている間に、以下を準備する。

●１０ｍｌの滅菌脱イオン水を用いて５本の滅菌１５ｍｌコニカルチューブを準備する。

●４ｍｌの滅菌脱イオン水を用いて５本の滅菌５ｍｌ　ＦＡＣＳチューブを準備する。

●１２ｍｌの７０％ ＥｔＯＨを含む５本の滅菌１５ｍｌコニカルチューブを準備する。

●１２ｍｌの１０％次亜塩素酸ナトリウムを含む５本の滅菌１５ｍｌコニカルチューブを準備する。

【２５５７】

用いられる標準的な方法に従って、及び用いられるフルオロフォアに基づいて、細胞を選別する。

【２５５８】

試料収集

試料チャンバ及び収集チャンバが５℃であり、撹拌試料アイコンが選択されていることを確認する。スクリーンの上部の［サイトメーター（Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ）］タブ及び［収集（Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）５℃］アイコンならびに［試料（Ｓａｍｐｌｅ）５℃］アイコンをクリックする。［撹拌（Ａｇｉｔａｔｅ）］アイコンをクリックする。試料が補正されていることを確認する。スクリーンの上部の［補正（Ｃｏｍｐｅｎｓａｔｉｏｎ）］タブをクリックする。

【２５５９】

ＰＢＭＣ対照を含むチューブ（５ｍｌ　ＦＡＣＳチューブまたは１５ｍｌコニカルのいずれか）を試料収集プラットフォームに配置する。試料収集圧力を６に設定した。試料収集を開始する。［ゲート及び統計（Ｇａｔｅｓ　ａｎｄ　Ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ）］テーブルをクリックし、上記に見られる両方のドロップダウンメニューで１００，０００を選

択する。
【２５６０】
細胞集団が正しくゲーティングされていることを検証する。ＢＳＣまたはＦＳＣの設定を調整する必要があり得る。しかしながら、いずれの他のチャネルについても電圧を調整しない。
【２５６１】
ゲートの調整が完了したら、記録せずに［停止（Ｓｔｏｐ）］をクリックし、チューブを取り外す。次のチューブアイコンをクリックし、チューブを右クリックして、［名前の変更（Ｒｅｎａｍｅ）］を選択する。チューブを「ＰＥ　ｆｍｏ」とラベル付けする。チューブを装填し、再生を押す。注記：このチューブには通常、あまり多くの細胞は存在しなかった。必要に応じてゲートを調整する。
【２５６２】
ゲートが満たされた場合、できるだけ多くの事象（または最大２０，０００のＣＤ３事象）を記録する。この収集を高速化するために、試料圧力を１０に設定することができる。
【２５６３】
収集を停止し、チューブを取り外す。以前に作製された滅菌ｄＨ２０の１５ｍｌコニカルチューブを試料プラットフォーム上に装填する。試料圧力として１０を選択する。試料を１分間収集する。ＣＤ３ゲートに事象がなくなるまで繰り返す。ｄＨ２０試料チューブを取り外して、廃棄した。メニスカスの底及び中間点に永続的なマーカーを付けて、収集されるチューブにラインを引く。
【２５６４】
収集される試料を装填プラットフォーム上に添加する。設定を検証する。試料圧力として４を選択する。細胞がスクリーンに表示されるのを待つ。約１５秒。画分が表示されたら、一時停止する。３つの画分のうち最も低い２つを最初に収集する。
【２５６５】
試料チャンバのドアを開き、１５ｍｌの収集チャンバブロックをチャンバに装填する。収集緩衝液を含む収集チューブをチャンバブロックに装填する。キャップ付きチューブを数回反転させて、チューブの上部を収集緩衝液でコーティングする。ＢＳＣの表面上でチューブを軽くたたいて、チューブ及びキャップの上部から余分な緩衝液を取り除く。ＣＤ３９－／ＣＤ６９－（例えば、ＣＤ３９^{LO}／ＣＤ６９^{LO}及び／またはＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性）画分を選択する。キャップを外し、チューブを試料チャンバブロックに入れる。チューブの位置に一致するように正しい右／左の向きを選択する。［ロード収集（Ｌｏａｄ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）］アイコンをクリックする。
【２５６６】
１秒当たりの全事象が５，０００未満になるように、試料圧力を調整する。選別開始アイコンをクリックする。少なくとも８５％の選別効率を維持するように試料圧力を調整する。５０，０００件のＣＤ３事象を記録する。試料のおよそ３分の２が空になったら、選別を停止する。最も多くの事象を含む収集された試料を取り除く。キャップを閉め、氷上または４℃で置く。最も高いパーセンテージの細胞の収集中に、より多くの細胞を収集することができるように、収集チャンバに少量の試料を残す。収集チューブをラベル付けし、キャップを取り外した。それを収集チャンバに入れる。
【２５６７】
選別収集の適切な左／右方向を選択する。収集チューブを装填する。再生、記録を押して、選別を開始する。試料のおよそ３分の１が空になったら、選別を停止する。収集した画分を取り除く。キャップを閉め、氷上または４℃で置き、ホルダーの左側にＣＤ３収集チューブを入れる。
【２５６８】
左側をＣＤ３用にし、右側の選別を空白にした。すべての試料が試料チューブからなくなるまで、選別を継続する。チューブが「枯渇」しても問題ない。試料チャンバから試料

チューブを取り外し、廃棄する。収集チャンバから選別された画分を取り出す。チューブに蓋をし、チューブの上部近くの液滴を溶液に取り込むために、数回穏やかに反転させる。ＢＳＣの表面上でチューブを軽くたたいて、チューブとキャップの上部から余分な溶液を取り除く。チューブを氷上に置く。

【２５６９】

ＣＤ３９^{LO}ＣＤ６９^{LO}画分の純度パーセントを確認する。滅菌ｄＨ２Ｏの１４ｍｌコニカルチューブを試料チャンバに入れる。［プローブ洗浄（Ｐｒｏｂｅ　Ｗａｓｈ）］アイコンをクリックする。繰り返す。ｄＨ２Ｏチューブを取り外し、陽性画分チューブを追加する。試料圧力値を１０に変更する。次のチューブアイコンをクリックする。チューブに試料名及び「ｈｉ　ｓｅｌｅｃｔ」の名前を付ける。再生をクリックし、７５のＣＤ３陽性事象を記録する。すぐにチューブを停止し、試料チャンバからチューブを取り外す。

【２５７０】

残りの試料についてもこれらの手順を繰り返す。

データをエクスポートする。

「ｆｍｏ」チューブをダブルクリックして選択し、レポートを保存する。収集したチューブの各々に対して繰り返す。

【２５７１】

ＲＥＰ１開始

細胞の数が最も少ない条件を使用して、ＲＥＰ１開始の細胞の数を決定することができる。（選別中に決定された）ＣＤ３細胞の％を使用して、選別された試料と同じ数のＣＤ３細胞で、選択されていないＴＩＬ集団において、ＲＥＰ１を開始するために必要とされる消化物全体の細胞の総数を計算する。ＲＥＰ１開始のための全消化細胞の総数＝ＲＥＰ１に接種された選別された細胞の数／ＣＤ３細胞の％。

【２５７２】

およそ１０００～１００，０００個の細胞ＣＤ３＋細胞を、Ｇ－ＲＥＸ１０または同等のフラスコに、それぞれ、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む、７ｍｌまたは４０ｍｌのＣＭ２（５０％　ＲＰＭＩ　１６４０＋１０％ヒト血清、ｇｌｕｔａｍａｘ、ゲンタマイシン、及び５０％　ＡｉｍＶ）とともに１１日間入れる。ＣＤ３９^{LO}ＣＤ６９^{LO}で選別された集団及び選択されていないＴＩＬに対して、少なくとも１つのＧ－ＲＥＸフラスコが開始される。抗ＣＤ３（クローン：ＯＫＴ３）（３０ｎｇ／ｍＬ）及びフィーダー（１：１００比（ＴＩＬ：フィーダー））を、培養開始時に各フラスコに添加する。

【２５７３】

プレート／フラスコ内の細胞を１１日間インキュベートし、培地の交換は行わない（ＲＥＰ１）。単一のＲＥＰ条件は、細胞をさらに３～７日間培養し続け、次いで特性評価に進む。

【２５７４】

ＲＥＰ１の完了時に、Ｇ－ＲＥＸ　１０の場合は、およそ３０ｍｌの培地を取り出す。上下にピペッティングすることによって、細胞を残りの培地に再懸濁する。細胞を５０ｍｌのコニカルに入れ、１５００ｒｐｍで５分間遠心分離する（９の加速及び減速）。

【２５７５】

計数及び生存率の評価については、培地を吸引し、細胞を１０～２０ｍｌのＣＭ２に再懸濁する。

【２５７６】

ＲＥＰ２開始

ｍｉｎｉ－ＲＥＰ２の開始のために、１ｅ５細胞を、４０ｍｌのＣＭ２培地及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含むＧ－ＲＥＸ　１０または同等物に入れた。抗ＣＤ３（クローン：ＯＫＴ３）（３０ｎｇ／ｍＬ）及びフィーダー（１：１００比、ＴＩＬ：フィーダー）を、培養開始時に添加した。

【２５７７】

「フルスケール実行」の場合、２ｅ６－３０ｅ６個の細胞を、Ｇ－ＲＥＸ　１００Ｍまたは同等物中の１ＬのＣＭ２培地及び３０００ＩＵ／ｍのＩＬ－２中で拡張する。抗ＣＤ３（クローン：ＯＫＴ３）（３０ｎｇ／ｍＬ）及びフィーダー（１：１００比、ＴＩＬ：フィーダー）を、培養開始時に添加した。

【２５７８】

培地交換（小規模の場合）または培地交換＋分割（「フルスケール実行の場合）」は、ＲＥＰ２の５日目（プロセスの１６日目）に行われる。フラスコを、およそ１０ｍｌ（Ｇ－ＲＥＸ　１０）または１００ｍｌ（Ｇ－ＲＥＸ　１００Ｍ）に減容し、ＣＭ２またはＡｉｍＶ＋３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２のいずれかで、４０ｍｌ（Ｇ－ＲＥＸ　１０）または１Ｌ（Ｇ－ＲＥＸ　１００Ｍ）に補充した。「フルスケール実行」の場合、フラスコを１：２に分割する。

【２５７９】

ＲＥＰ２の１１日目（またはプロセスの２２日目）に、フラスコを減容し、１５００ｒｐｍ、室温で５分間遠心分離する（９の加速及び減速）。

【２５８０】

最終産物を、細胞計数、生存率、表現型、サイトカイン産生、ＴＣＲＶβレパートリー分析、及び腫瘍特異的反応性について評価する。

【２５８１】

図３４は、実施例１５に概説されるプロセスの概略図を提供する。

【２５８２】

実施例１５の参考文献：

１．Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ，Ｓ．Ａ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｄｕｒａｂｌｅ　ｃｏｍｐｌｅｔｅ　ｒｅｓｐｏｎｓｅｓ　ｉｎ　ｈｅａｖｉｌｙ　ｐｒｅｔｒｅａｔｅｄ　ｐａｔｉｅｎｔｓ　ｗｉｔｈ　ｍｅｔａｓｔａｔｉｃ　ｍｅｌａｎｏｍａ　ｕｓｉｎｇ　Ｔ－ｃｅｌｌ　ｔｒａｎｓｆｅｒ　ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ．Ｃｌｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ，２０１１．１７（１３）：ｐ．４５５０－７。
２．Ｋｖｉｓｔｂｏｒｇ，Ｐ．，ｅｔ　ａｌ．，ＴＩＬ　ｔｈｅｒａｐｙ　ｂｒｏａｄｅｎｓ　ｔｈｅ　ｔｕｍｏｒ－ｒｅａｃｔｉｖｅ　ＣＤ８（＋）Ｔ　ｃｅｌｌ　ｃｏｍｐａｒｔｍｅｎｔ　ｉｎ　ｍｅｌａｎｏｍａ　ｐａｔｉｅｎｔｓ．Ｏｎｃｏｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２０１２．１（４）：ｐ．４０９－４１８。
３．Ｓｉｍｏｎｉ，Ｙ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｙｓｔａｎｄｅｒ　ＣＤ８（＋）Ｔ　ｃｅｌｌｓ　ａｒｅ　ａｂｕｎｄａｎｔ　ａｎｄ　ｐｈｅｎｏｔｙｐｉｃａｌｌｙ　ｄｉｓｔｉｎｃｔ　ｉｎ　ｈｕｍａｎ　ｔｕｍｏｕｒ　ｉｎｆｉｌｔｒａｔｅｓ．Ｎａｔｕｒｅ，２０１８．５５７（７７０６）：ｐ．５７５－５７９。
４．Ｓｃｈｕｍａｃｈｅｒ，Ｔ．Ｎ．ａｎｄ　Ｒ．Ｄ．Ｓｃｈｒｅｉｂｅｒ，Ｎｅｏａｎｔｉｇｅｎｓ　ｉｎ　ｃａｎｃｅｒ　ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ．Ｓｃｉｅｎｃｅ，２０１５．３４８（６２３０）：ｐ．６９－７４。
５．Ｔｕｒｃｏｔｔｅ，Ｓ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｈｅｎｏｔｙｐｅ　ａｎｄ　ｆｕｎｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｔ　ｃｅｌｌｓ　ｉｎｆｉｌｔｒａｔｉｎｇ　ｖｉｓｃｅｒａｌ　ｍｅｔａｓｔａｓｅｓ　ｆｒｏｍ　ｇａｓｔｒｏｉｎｔｅｓｔｉｎａｌ　ｃａｎｃｅｒｓ　ａｎｄ　ｍｅｌａｎｏｍａ：ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　ｆｏｒ　ａｄｏｐｔｉｖｅ　ｃｅｌｌ　ｔｒａｎｓｆｅｒ　ｔｈｅｒａｐｙ．Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ，２０１３．１９１（５）：ｐ．２２１７－２５。
６．Ｉｎｏｚｕｍｅ，Ｔ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ＣＤ８＋ＰＤ－１＋　ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅｓ　ｉｎ　ｆｒｅｓｈ　ｈｕｍａｎ　ｍｅｌａｎｏｍａｓ　ｅｎｒｉｃｈｅｓ　ｆｏｒ　ｔｕｍｏｒ－ｒｅａｃｔｉｖｅ　Ｔ　ｃｅｌｌｓ．Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ，２０１０．３３（９）：ｐ．９５６－６４。
７．Ｇｒｏｓ，Ａ．，ｅｔ　ａｌ．，ＰＤ－１　ｉｄｅｎｔｉｆｉｅｓ　ｔｈｅ　ｐａｔｉｅｎｔ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ＣＤ８（＋）ｔｕｍｏｒ－ｒｅａｃｔｉｖｅ　ｒｅｐｅｒｔｏｉｒｅ　ｉｎｆｉｌｔｒａｔｉｎｇ　ｈｕｍａｎ　ｔｕｍｏｒｓ．Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉ

ｎｖｅｓｔ，２０１４．１２４（５）：ｐ．２２４６－５９。
８．Ｔｈｏｍｍｅｎ，Ｄ．Ｓ．，ｅｔ ａｌ．，Ａ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌｌｙ ａｎｄ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌｌｙ ｄｉｓｔｉｎｃｔ ＰＤ－１（＋）ＣＤ８（＋）Ｔ ｃｅｌｌ ｐｏｏｌ ｗｉｔｈ ｐｒｅｄｉｃｔｉｖｅ ｐｏｔｅｎｔｉａｌ ｉｎ ｎｏｎ－ｓｍａｌｌ－ｃｅｌｌ ｌｕｎｇ ｃａｎｃｅｒ ｔｒｅａｔｅｄ ｗｉｔｈ ＰＤ－１ ｂｌｏｃｋａｄｅ．Ｎａｔ Ｍｅｄ，２０１８。

【２５８３】

実施例１２：急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）中のＡＫＴ阻害は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）のメモリー特性及びサイトカイン産生を拡張し、メモリー前駆体幹細胞様（ＣＤ３９－ＣＤ６９－）細胞の集団を増加させる

異なる適応症からの患者の腫瘍を受け取り、断片化し、ＴＩＬ製造のための拡張プロトコルに供した。異なる用量（０．３μＭ及び１μＭ）のｐａｎ－ＡＫＴ阻害剤（ＡＫＴｉ）イパタセルチブを、エクスビボ拡張中に培養物に添加した。ＴＩＬの拡張可能性、ならびに表現型及び機能的特性を最終ＴＩＬ製品上で評価した。

【２５８４】

１μＭ用量でのＡＫＴｉ処理は、対照と比較してＴＩＬの同等の拡張及び生存率をもたらしたが、低分化ＣＤ３９－ＣＤ６９－細胞の集団を２倍にした。この効果は、再刺激後でさえも存在し、これらの細胞は、ＣＤ３８ならびに転写因子Ｔ－ｂｅｔ及びＴｏｘの発現の低下を示し、分化が少なく、疲弊した表現型を示唆している。重要なことに、ＡＫＴｉ処理は、ＩＦＮγ＋ＴＮＦα＋ＣＤ８＋Ｔ細胞の頻度の増加をもたらし、これは、細胞傷害性の増加につながった。

【２５８５】

エクスビボＴＩＬ拡張中のＡＫＴｉ処理は、分化のより少ない、よりメモリー様の機能的ＴＩＬの割合を増加させた。したがって、ＴＩＬ拡張中のＡＫＴシグナル伝達を時間的に阻害することは、ＴＩＬの質を向上させ、臨床設定におけるＴＩＬの持続性及び治療有効性を向上させるためのアプローチを表すことができる。

【２５８６】

実施例１３：黒色腫患者のＢ細胞及びＴ細胞治療効果を増強するための原発性リンパ球培養物の生体外刺激

この実施例は、本明細書に記載の例示的な方法において黒色腫の治療のための養子細胞療法において使用するためのＲＥＰ前拡張中にＢ細胞及びＴ細胞を含む採取したＴＩＬ集団を刺激するための簡略化した手順を説明する。

【２５８７】

最近の研究は、Ｂ細胞浸潤が免疫チェックポイント阻害剤への改善された臨床応答と関連していることを実証している。Ｐｅｔｉｔｐｒｅｚ Ｆ，ｅｔ ａｌ．（２０２０）．Ｎａｔｕｒｅ．５７７：５５６－５６。

【２５８８】

黒色腫がＴＩＬ療法に応答しなかった１２人（非応答者）及び応答した８人（応答者）を含む２０人のアッセイでは、ＦＦＰＥ黒色腫試料のＲＮＡ－ｓｅｑ分析は、クラススイッチされたメモリーＢ細胞のより高い含有量が、診療所での療法に応答したクラスと密接に対応したことを実証する。

【２５８９】

結果として、ＲＥＰ前刺激研究は、ＴＩＬ集団におけるＢ細胞応答を増強することを試みるように設計された。簡潔には、凍結腫瘍消化物を、０日目に開始し、４８時間継続するＣＤ４０Ｌの存在下または非存在下のいずれかで、標準的なプロトコル（実施例を参照されたい）によって培養した。次いで、細胞を特定の腫瘍認識についてアッセイし、応答した集団は、ＲＥＰ相で第２の拡張を受ける。

【２５９０】

まず、ＣＤ４０アゴニストによる刺激の効果をＢ細胞で評価した。４８時間のＣＤ４０Ｌ処理は、フローサイトメトリーによってアッセイされるように、ＣＤ８０＋ ＣＤ８６

＋　Ｂ細胞集団を有意に増加させ、これは、活性化された（すなわち、クラススイッチングされた）メモリーＢ細胞のマーカーであり、対照ＴＩＬ集団と比較して、およそ２０倍の平均増加を伴う。

【２５９１】

次に、ＲＥＰ前ＴＩＬ集団の全体的な細胞計数を行って、ＣＤ４０Ｌ刺激が全体的な拡張に及ぼす影響を評価した。ＣＤ４０Ｌによって刺激されたＴＩＬ集団は、対照条件下よりも３倍拡張する可能性が高く、拡張は、同様に、刺激された集団について平均して顕著により堅牢である。

【２５９２】

ＴＩＬ集団内のＴ細胞に対する刺激の影響も評価した。特に、ＣＤ４０Ｌ刺激は、ＣＤ８＋Ｔ細胞集団を減少させることなく、ＣＤ４＋Ｔ細胞の数の有意な増加をもたらす。さらに、ＣＤ４０Ｌ刺激は、ＴＩＬ集団内のエフェクターメモリーＴ細胞（T_{EM}細胞）の量の有意な増加をもたらすが、中央メモリーＴ細胞またはＣＤ４５＋T_{EM}細胞のいずれにおいても同様の増加は観察されない。最後に、ＣＤ３９－ＣＤ６９－Ｔ細胞の割合をこれら２つの条件の間で評価した。ＣＤ４０Ｌ刺激は、対照と比較して、この亜集団の顕著な増加をもたらす。

【２５９３】

次のステップは、ＲＥＰ後相におけるＴＩＬ集団に対するＣＤ４０Ｌ刺激の影響を評価することであった。ＲＥＰ後Ｔ細胞を、疲弊のマーカーについてアッセイした。拡張の１４日後、ＣＤ４０Ｌ刺激集団と対照ＴＩＬ集団との間に有意差は認められなかった。さらに、同じ時点でＣＤ３９－ＣＤ６９－亜集団の相対サイズを評価したときに有意差は見られなかった。

【２５９４】

結論

少なくともＣＤ４０Ｌによる拡張前刺激は、有病率ＣＤ８に影響を与えることなく、ＣＤ４＋Ｔ細胞集団の増加をもたらした。さらに、この刺激は、ＲＥＰ前アッセイした場合、ＣＤ３９－ＣＤ６９－集団の増加をもたらした。最後に、ＣＤ４０Ｌによる刺激は、刺激のない標準的な拡張プロトコルと比較して、凍結保存した試料からより高い生存率及びより大きな拡張をもたらした。全体として、この実施例は、少なくともＣＤ４０Ｌによる拡張前刺激が、得られたＴＩＬ集団が患者に投与されるときに利益をもたらし得ることを示唆する。

【２５９５】

実施例１４：ＩＬ－２及びＧＤＣ－００６８の滴定、ＲＥＰ前条件下でのＲＥＰ前細胞におけるＩＬ－２＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）の組み合わせの試験

この実施例は、凍結したＲＥＰ前細胞を使用したＲＥＰ前条件中の、より低用量のＩＬ－２の単独での、またはＡＫＴ阻害剤ＧＤＣ－００６８及びＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）の異なる濃度との組み合わせでの効果の決定を説明する。幹様属性及びエフェクター分化の防止に関連する、生存率、収率、ならびにＲＥＰ前の後のＴＩＬの他の表現型特性及び機能的特性を含む、様々なパラメータを分析する。この研究の目的は、ＲＥＰ前中に使用するＩＬ－２の用量を調べ、ＡＫＴｉ（及びどの濃度で）またはＩＬ－２１の組み合わせが、拡張プロセスのこの相でＴＩＬの表現型をさらに改善できるかどうかを決定することであった。

【２５９６】

凍結したＲＥＰ前ＴＩＬを解凍し、２４ウェルＧＲＥＸプレート中の異なるサイトカイン条件を使用して、ＲＥＰ前条件下で培養した。サイトカインを２回与えた（ＲＥＰ前の０日目及び５日目）。

【２５９７】

これらの実験の結論（図７６～７９に示される）は、ＲＥＰ前中のＩＬ－２の濃度が、６０００～３０００ＩＵ／ｍｌの範囲で有用である可能性が高いことを含む。ＲＥＰ前の間のＡＫＴｉ処理の濃度は、ＲＥＰ中よりも低くする必要があり得る。ＧＤＣ－００６８

の場合、１ｕＭの濃度が選択される。１０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－２及びＩＬ－２１の組み合わせは、ＴＩＬに有益な表現型の変化を与える。

【２５９８】

実施例１５：低用量のＩＬ－２及びＩＬ－２１と組み合わせたＲＥＰ中の異なるＡＫＴ阻害剤の効果の試験

この実施例は、ＴＩＬの表現型に対する、低用量のＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）及びＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）と組み合わせた、異なるＡＫＴ阻害剤の効果の評価を説明する。幹様属性及びエフェクター分化の防止に関連する、生存率、収率、ならびにＲＥＰ後のＴＩＬの他の表現型特性及び機能的特性を含む、様々なパラメータを分析する。これらの実験の包括的な目標は、ＴＩＬの機能的特徴及び表現型特徴を改善しながら、それらの幹様属性を増強するために、ＴＩＬの拡張プロセス中の成長条件を決定することである。

【２５９９】

凍結したＲＥＰ前ＴＩＬを解凍し、２４ウェルのＧＲＥＸプレート中の異なるサイトカイン条件下でＲＥＰ化した。サイトカインを２回投与した（ＲＥＰの０日目及び５日目）。ＲＥＰプロトコルは、この時点で、以前の実験の結果に基づいて修正された。特に、当該修正は、以下を含む：

１）フィーダー：ＴＩＬ比を、４００万個のフィーダー及び１ウェル当たり２０，０００ＴＩＬ、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３によって２００：１に増加させた。

２）０日目に、サイトカイン及び化合物を含む３ｍＬのＣＭ２でＲＥＰを開始する。

３）５日目に、５ｍＬのＣＭ４培地を各ウェルに添加した。

４）すべてのサイトカイン及び化合物を、０日目及び５日目に２回添加する。

５）４つの異なる適応症からのＲＥＰ前ＴＩＬを解凍し、Ｇ－ＲＥＸ　２４ウェルプレート内でＲＥＰ化した。

６）ＲＥＰ　ＴＩＬを一晩静置し、続いて細胞表面及び細胞内マーカーを作製した。

【２６００】

この研究で試験した条件は、以下を含む：ＩＬ－２　３０００ＩＵ／ｍＬ、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋５ｕＭ　ＧＤＣ－００６８、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋３ｕＭ　ＧＳＫ２１１０１８３、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋３ｕＭ　ＡＺＤ５３６３、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋３ｕＭ　ＭＫ－２２０６、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋０．２ボルセルチブ、及びＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋１ｕＭ　ＡＴ７８６７。

【２６０１】

この研究の結論（図８０～８８に示される）は、より低いレベルのＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）及びＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）を有するＲＥＰ条件下で添加されたＡＫＴｉが、ＣＤ１２７＋ＴＩＬの頻度の増加、より低い活性化ＰＤ１－ＴＩＭ３－ＴＩＬの頻度の増加、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３及びＴＩＧＩＴ発現細胞の頻度の減少、ＴＩＬにおけるＣＤ２５及びＣＤ３８発現の頻度の減少、ならびにより活性化及び分化されたＣＤ６９＋ＣＤ３９＋ＴＩＬの頻度の減少をさらに増強することを含む。

【２６０２】

実施例１６：ＩＬ－２１及びＡＫＴｉの有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２の効果を評価することによる、ＲＥＰ前の条件の選択

この実施例は、異なる濃度のＩＬ－２１及びＡＫＴｉの有無にかかわらず、より低用量のＩＬ－２を使用することによる、ＴＩＬのＲＥＰ前拡張の条件の評価を説明する。この研究では、ＭＫ－２２０６を使用した。幹様属性及びエフェクター分化の防止に関連する、生存率、収率、ならびにＲＥＰ前の後のＴＩＬの他の表現型特性及び機能的特性を含む、様々なパラメータを分析する。これらの実験の包括的な目標は、ＴＩＬの機能的特徴及

び表現型特徴を改善しながら、それらの幹様属性を増強するために、ＴＩＬの拡張プロセス中の成長条件を調べることである。

【２６０３】

凍結したＲＥＰ前ＴＩＬを解凍し、２４ウェルＧＲＥＸプレート中の異なるサイトカイン条件下で再度ＲＥＰ前化した。サイトカインを２回投与した（ＲＥＰ前の０日目及び５日目）。凍結したＲＥＰ前細胞を解凍し、２４ウェルＧ－Ｒｅｘプレート中に２００万個の細胞でプレートして、別のＲＥＰ前ラウンドを行った。４つの異なる適応症からのＲＥＰ前ＴＩＬを使用した。１１日間のＲＥＰ前プロセスの後、ＴＩＬを、抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズで染色するか、または一晩刺激した。以下の条件を試験した：ＩＬ－２　６０００ＩＵ／ｍＬ、ＩＬ－２　３０００ＩＵ／ｍＬ、ＩＬ－２　３０００ＩＵ／ｍＬ＋０．５ｕＭ　ＭＫ－２２０６、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋１ｕＭ　ＭＫ－２２０６、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１（３ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）＋１ｕＭ　ＭＫ－２２０６、及びＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１（３ｎｇ／ｍｌ）＋１ｕＭ　ＭＫ－２２０６。

【２６０４】

これらの実験（図８９～９７に示される）の結論は、３０００ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２とＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）との組み合わせが、活性化の低下及び機能の改善に関連するＴＩＬに有益な表現型変化を付与したことを含む。これらの条件は、Ｉ－ＴＩＬプロセスのいくつかの実施形態では、ＲＥＰ前相について選択される。

【２６０５】

実施例１７：ＲＥＰ中のＩＬ－２＋ＩＬ－２１と組み合わせた様々なＡＫＴ阻害剤の濃度の試験

この実施例は、ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）と組み合わせた滴定用量の異なるＡＫＴ阻害剤の、エフェクター分化を予防すること、より多くの幹様属性を促進すること、及びＲＥＰ中のＴＩＬの機能性を改善することに対する効果に関するさらなる評価を説明する。これらの実験の包括的な目標は、ＴＩＬの機能的特徴及び表現型特徴を改善しながら、それらの幹様属性を増強するために、ＴＩＬの拡張プロセス中の成長条件を調べることである。

【２６０６】

凍結したＲＥＰ前ＴＩＬを解凍し、２４ウェルのＧＲＥＸプレート中の異なる条件下でＲＥＰ化した。サイトカインを２回投与した（ＲＥＰ前の０日目及び５日目）。以下の条件は、２４ウェルＧ－Ｒｅｘプレートで使用されるＲＥＰプロトコルに含まれていた：

１）フィーダー：ＴＩＬ比を、４００万個のフィーダー及び１ウェル当たり２０，０００ＴＩＬ、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３によって２５０：１にした。

２）０日目に、サイトカイン及び化合物を含む３ｍＬのＣＭ２でＲＥＰを開始する。

３）５日目に、５ｍＬのＣＭ４培地を各ウェルに添加した。

４）すべてのサイトカイン及び化合物を、０日目及び５日目に２回添加する。

３つの異なる適応症からのＲＥＰ前ＴＩＬを解凍し、Ｇ－ＲＥＸ　２４ウェルプレート内でＲＥＰ化した。以下の条件を試験した：ＩＬ－２　３０００ＩＵ／ｍＬ、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋５ｕＭ　ＧＤＣ－００６８、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋５ｕＭ　ＧＤＣ－００６８＋２０ｎＭ　ＤＡＣ、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋５ｕＭ　ＧＤＣ－００６８＋３００ｕＭ　Ｌ－２ＨＧ、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋０．２ボルセルチブ、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋３ｕＭ　ＧＳＫ２１１０１８３、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋１ｕＭ　ＡＺＤ５３６３、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋２ｕＭ　ＡＺＤ５３６３、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋１ｕＭ　ＭＫ－２２０６、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋２ｕＭ　ＭＫ－２２

０６、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋３ｕＭ　ＧＤＣ－００６８＋ＴＧＦｂ（５ｎｇ／ｍｌ）、及びＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋ＴＧＦｂ（５ｎｇ／ｍｌ）。

【２６０７】

これらの実験の結論（図９８～１０６に示される）は、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）と組み合わせた１０００ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２と組み合わせた異なるＡＫＴ阻害剤が、阻害性受容体の発現、活性化の低下、より多くの幹様特性、及び機能の改善に関連するＩＬ－２１と組み合わせたＩＬ－２レベルの低下によって既に付与された変化を除いて、ＴＩＬにさらなる有益な表現型変化を付与したという所見を含む。

【２６０８】

実施例１８：ＲＥＰ中のＩＬ－２＋ＩＬ－２１と組み合わせたＡＺＤ５３６３の試験

この実施例は、エフェクター分化を予防すること、より多くの幹様属性を促進すること、及びＲＥＰ中のＴＩＬの機能性を改善することに対するＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）と組み合わせたＡＺＤ５３６３の濃度及び投与量の試験を説明する。これらの実験の包括的な目標は、ＴＩＬの機能的特徴及び表現型特徴を改善しながら、それらの幹様属性を増強するために、ＴＩＬの拡張プロセス中の成長条件を調べることである。

【２６０９】

凍結したＲＥＰ前ＴＩＬを解凍し、２４ウェルのＧＲＥＸプレート中の異なる条件下でＲＥＰ化した。サイトカインを２回与えた（ＲＥＰ前の０日目及び５日目）。３つの異なる適応症からのＲＥＰ前ＴＩＬを解凍し、Ｇ－ＲＥＸ　２４ウェルプレート内でＲＥＰ化した。以下の条件は、２４ウェルＧ－Ｒｅｘプレートで使用されるＲＥＰプロトコルに含まれていた：

１）フィーダー：ＴＩＬ比を、４００万個のフィーダー及び１ウェル当たり２０，０００ＴＩＬ、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３によって２５０：１にした。

２）０日目に、サイトカイン及び化合物を含む３ｍＬのＣＭ２でＲＥＰを開始する。

３）５日目に、５ｍＬのＣＭ４培地を各ウェルに添加した。

４）すべてのサイトカイン及び化合物を、０日目及び５日目に２回添加する。

以下の条件を試験した：ＩＬ－２　３０００ＩＵ／ｍＬ、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋１ｕＭ　ＡＺＤ５３６３（２回添加）、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋１ｕＭ　ＡＺＤ５３６３（１回添加）、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋２ｕＭ　ＡＺＤ５３６３（２回添加）、及びＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋２ｕＭ　ＡＺＤ５３６３（１回添加）。

【２６１０】

これらの実験（図１０７～１１７に示される）の結論には、１回または２回、１０００ＩＵ／ｍｌ＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）でＩＬ－２と組み合わせて投与された１または２ｕＭのＡＺＤ５３６３が、阻害性受容体の発現の低下、活性化の低下、より多くの幹様特性、及び機能性の改善に関連するＩＬ－２１と組み合わせたＩＬ－２レベルの低下によって既に付与された変化を除いて、ＴＩＬにさらなる有益な表現型変化を付与したという所見が含まれる。

【２６１１】

実施例１９：高用量のＩＬ－２またはＩＬ－１５とのＩＬ－２１及びＡＫＴｉの使用の比較

この実施例は、ＩＬ－２またはＩＬ－１５の用量の増加と併せて、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）＋ＡＺＤ５３６３の効果の評価、ならびにエフェクター分化を予防すること、より多くの幹様属性を促進すること、及びＲＥＰ中のＴＩＬの機能性を改善することに対する全体的な影響の評価を説明する。これらの実験の包括的な目標は、ＴＩＬの機能的特

徴及び表現型特徴を改善しながら、それらの幹様属性を増強するために、ＴＩＬの拡張プロセス中の成長条件を調べることである。

【２６１２】

凍結したＲＥＰ前ＴＩＬを解凍し、２４ウェルのＧＲＥＸプレート中の異なる条件下でＲＥＰ化した。サイトカインを２回投与した（ＲＥＰ前の０日目及び５日目）。３つの異なる適応症からのＲＥＰ前ＴＩＬを解凍し、Ｇ－ＲＥＸ　２４ウェルプレート内でＲＥＰ化した。以下の条件は、２４ウェルＧ－Ｒｅｘプレートで使用されるＲＥＰプロトコルに含まれていた：

１）フィーダー：ＴＩＬ比を、４００万個のフィーダー及び１ウェル当たり２０，０００ＴＩＬ、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３によって２５０：１にした。

２）０日目に、サイトカイン及び化合物を含む３ｍＬのＣＭ２でＲＥＰを開始する。

３）５日目に、５ｍＬのＣＭ４培地を各ウェルに添加した。

４）すべてのサイトカイン及び化合物を、０日目及び５日目に２回添加する。

以下の条件を試験した：ＩＬ－２　３０００ＩＵ／ｍＬ、ＩＬ－２　２０００ＩＵ／ｍＬ、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ、ＩＬ－２　３０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ、ＩＬ－２　２０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ、ＩＬ－２　３０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋２ｕＭ　ＡＺＤ５３６３（１回添加）、ＩＬ－２　２０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋２ｕＭ　ＡＺＤ５３６３（１回添加）、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋２ｕＭ　ＡＺＤ５３６３（１回添加）、及びＩＬ－１５　１０ｎｇ／ｍｌ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋１ｕＭ　ＡＺＤ５３６３（２回添加）。

【２６１３】

これらの実験（図１１８～１２７に示される）の結論には、一度与えられたＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）、及び２ｕＭ　ＡＺＤ５３６３の組み合わせが、阻害性受容体発現の頻度を低下させながら、ＲＥＰプロセス中のエフェクター分化を防止すること、ＴＩＬの幹様表現型を増加させること、及び機能的応答を改善することにおける所望の変化のうちの多くを誘導するという所見が含まれる。これらの効果は、ＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）、及びＡＺＤ５３６３に匹敵したが、この後者の組み合わせによるサイトカイン産生、特にＩＬ－２に対する効果は、非常に顕著であった。ＩＬ－１５の組み合わせはまた、ＴＩＬの活性化状態をさらに低下させた。

【２６１４】

実施例２０：ＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍＬ）及びＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍＬ）とともに使用するためのＡＺＤ５３６３の濃度及び用量の評価

この実施例は、ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）と比較した、ＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）と組み合わせたＡＺＤ５３６３に使用する用量及び濃度の評価、ならびにエフェクター分化を防止すること、幹様表現型を増加させること、及びＲＥＰ中のＴＩＬの機能性を改善することに対する全体的な影響の評価を説明する。これらの実験の包括的な目標は、ＴＩＬの機能的特徴及び表現型特徴を改善しながら、それらの幹様属性を増強するために、ＴＩＬの拡張プロセス中の成長条件を調べることである。

【２６１５】

３つの異なる適応症からのＲＥＰ前ＴＩＬを解凍し、Ｇ－ＲＥＸ　２４ウェルプレート内でＲＥＰ化した。サイトカインを２回投与した（ＲＥＰ前の０日目及び５日目）。以下の条件は、２４ウェルＧ－Ｒｅｘプレートで使用されるＲＥＰプロトコルに含まれていた：

１）フィーダー：ＴＩＬ比を、４００万個のフィーダー及び１ウェル当たり２０，０００ＴＩＬ、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３によって２５０：１にした。

２）０日目に、サイトカイン及び化合物を含む３ｍＬのＣＭ２でＲＥＰを開始する。

３）５日目に、５ｍＬのＣＭ４培地を各ウェルに添加した。
４）すべてのサイトカイン及び化合物を、０日目及び５日目に２回添加する。
以下の条件を試験した：ＩＬ－２　３０００ＩＵ／ｍＬ、ＩＬ－２　１０００ＩＵ／ｍＬ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋２ｕＭ　ＡＺＤ５３６３（１回添加）、ＩＬ－１５　１０ｎｇ／ｍｌ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋２ｕＭ　ＡＺＤ５３６３（１回添加）、ＩＬ－１５　１０ｎｇ／ｍｌ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋１ｕＭ　ＡＺＤ５３６３（２回添加）、及びＩＬ－１５　１０ｎｇ／ｍｌ＋ＩＬ－２１　１０ｎｇ／ｍｌ＋２ｕＭ、続いて１ｕＭ　ＡＺＤ５３６３。

【２６１６】

これらの実験（図１２８～１３７に示される）の結論には、ＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）、及びＡＺＤ５３６３の組み合わせが、阻害性受容体発現の頻度を低下させながら、ＲＥＰプロセス中のエフェクター分化を防止すること、ＴＩＬの幹様表現型を増加させること、及び機能的応答を改善することにおける所望の変化のうちの多くを誘導するという所見が含まれる。特に、ＩＦＮｇ、ＴＮＦａ及びＩＬ－２を増加させることに対する効果は、ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）及びＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）よりも顕著である。ＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）と組み合わせたＡＺＤ５３６３の用量及び濃度は、Ｉ－ＴＩＬプロセスの様々な実施形態において２回与えられる１μＭである。

【２６１７】

実施例２１：Ｉ－ＴＩＬプロセスの条件の評価

この実施例は、ＲＥＰ相中のＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）＋２ｕＭ　ＡＺＤ５３６３の使用と、ＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）＋２ｕＭ　ＡＺＤ５３６３の使用とを比較した、Ｉ－ＴＩＬプロセスの条件の検討を説明する。これらの実験の包括的な目標は、ＴＩＬの機能的特徴及び表現型特徴を改善しながら、それらの幹様属性を増強するために、ＴＩＬの拡張プロセス中の成長条件を調べることである。

【２６１８】

腫瘍（Ｎ＝１８）を受け取り、ＲＥＰ前及びＲＥＰ拡張の両方について処理して、好ましい条件のセットを試験及び選択し、最終Ｉ－ＴＩＬ（活性化ＴＩＬ）条件として指名した。

【２６１９】

新鮮な腫瘍を使用して６ウェルＧ－Ｒｅｘプレートで試験したＲＥＰ前条件は、以下を含む：ＩＬ－２（６０００ＩＵ／ｍｌ）及びＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）。サイトカインを、ＲＥＰ前の０日目及び５日目に２回添加した。

【２６２０】

次いで、ＲＥＰを同時に開始するために、すべてのＲＥＰ前試料が生成されるまでＲＥＰ前細胞を凍結させた。凍結したＲＥＰ前ＴＩＬを解凍し、それらに対応する条件で一晩静置し、続いて、２４ウェルのＧ－Ｒｅｘプレート中でＲＥＰを行った。試験した条件は、以下を含む：ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）、ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍＬ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍＬ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）＋２ｕＭ　ＡＺＤ５３６３、ＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）、及びＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）＋２ｕＭ　ＡＺＤ５３６３。サイトカインを０日目及び５日目に２回添加し、ＡＺＤ５３６３をＲＥＰの０日目に１回のみ添加した。

【２６２１】

これらの実験（図１３８～１４７に示される）の結論には、ＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）、及びＡＺＤ５３６３の組み合わせが、阻害性受容体発現の頻度を低下させながら、ＲＥＰプロセス中のエフェクター分化を防止すること、ＴＩＬの幹様表現型を増加させること、及び機能的応答を改善することにおける所望の変化のうちの多くを誘導するという所見が含まれる。特に、ＩＦＮｇ、ＴＮＦａ及びＩＬ－

２の増加に対する効果は、ＩＬ－２（１０００ＩＵ／ｍｌ）＋ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）＋ＡＺＤ５３６３条件の場合よりも顕著である。これは、ＣＸＣＲ３の発現及びＣＤ６９＋ＣＤ３９＋細胞の減少についても同様である。このプロセスの収率及び生存率はまた、ＩＬ－１５条件によって顕著に増強される。

【２６２２】

実施例２２：ＩＮＶＩＧＯ－Ｔプロセスと他のプロセスとの比較

この実施例は、Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ（本明細書ではＩ－ＴＩＬとも称される）プロセスの態様を、Ｇｅｎ２プロセス及びＡＺＤ５３６３を含まないＩｎｖｉｇｏ－Ｔプロトコルを含む、ＴＩＬを拡張するために使用される他のプロセスと比較して説明する。これらの実験の包括的な目標は、Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔプロセスで拡張されたＴＩＬの表現型特徴と、それらが他のものとどのように異なるかを調べることである。

【２６２３】

ＲＥＰ後ＴＩＬをＦＡＣＳによって、Ｂｒｅｆｅｌｄｉｎ　Ａの存在下、１ｕｇ／ｍｌで６時間のＯＫＴ３刺激後のサイトカイン発現について評価した。測定された３つのサイトカインすべての発現を示すＣＤ８＋ＴＩＬの頻度は、Ｇｅｎ２対照またはＡＺＤ５３６３を含まないＩｎｖｉｇｏ－Ｔと比較して顕著に上昇した。ＣＤ４＋ＴＩＬについて同様の結果が観察された（データは図示せず）。

【２６２４】

次いで、１０：１のエフェクター対標的細胞でのＫＩＬＲ（登録商標）ＴＨＰ－１細胞との２４時間の共培養後、同種異系環境で細胞傷害性を試験した。Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔプロセスは、Ｇｅｎ２対照よりも顕著に高い細胞傷害性を示したが、ＡＺＤ５３６３の有無にかかわらず有意差はなかった。次に、ＴＩＬを、ＴｒａｎｓＡｃｔで３日毎に刺激し、続いてＫＩＬＲ（登録商標）ＴＨＰ－１細胞で２４時間共培養した後、細胞傷害性及びＩＦＮｇ発現を評価した（フローサイトメトリー染色によって測定した）。Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔプロセスは、再び、Ｇｅｎ２対照よりも顕著に高い細胞傷害性を示した。これは、ＡＺＤ５３６３を含まないＧｅｎ２またはＩｎｖｉｇｏ－Ｔのいずれかと比較した、Ｉ－ＴＩＬプロセスのＩＦＮｇレベルの上昇と相関した。これらの結果は、試験した他の２つの条件と比較して、ＣＤ８＋ＴＩＬまたはＣＤ４＋ＴＩＬのいずれかでＩｎｖｉｇｏ－Ｔプロセスで観察された全体的な表現型変化と相関する。

【２６２５】

これらの実験の結論（図１４８～１５０に示される）は、Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔの拡張プロセスが、同種異系設定におけるＴＩＬの多機能性及びＴＩＬ細胞傷害性を増加させることを含む。これらの変化は、ＣＤ８＋及びＣＤ４＋ＴＩＬ上の機能的マーカーのより大きな発現において表現型的に明らかである。

【２６２６】

Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔ拡張プロセスは、増強された多官能性、阻害性受容体発現の減少、より幹様の表現型（図１５４Ｂ）、ならびに活性化及び分化のより少ないＴＩＬの頻度の増加を含む、ＴＩＬ持続性及び応答の両方に相関する複数のメトリックを通じて顕著な改善を提供する。

【２６２７】

ｓｃＲＮＡｓｅｑデータは、Ｉｎｖｉｇｏ－Ｔで処理された試料が、応答と相関するＣＤ３９－ＣＤ６９－（ＤＮ）遺伝子クラスターで濃縮され（図１５５）、分化のより少ない表現型をさらに裏付けることを示す（図１５７及び１５９）。追加として、ｓｃＲＮＡｓｅｑデータは、ＣＤ８（図１５４）及びＣＤ４　ＴＩＬ（図１６０）の両方についての疲弊関連遺伝子シグネチャの発現の減少を裏付ける。

【２６２８】

方法：

単一細胞ＲＮＡ配列決定

凍結保存した対照またはＩｎｖｉｇｏＴで処理したＴＩＬ（１群当たりｎ＝５）を解凍し、ＰＢＳ＋０．０４％　ＢＳＡで２回洗浄した。細胞生存率を、ＡＯＰＩを使用して、

Ｎｅｘｃｅｌｏｍ Ｃｅｌｌａｃａ自動セルカウンターを使用して評価した。製造業者のガイドラインに従って、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ死細胞除去キットを使用して、７５％未満の生細胞を含有する試料上で死細胞除去を行った。１０×Ｃｈｒｏｍｉｕｍ Ｘコントローラーを使用して、単一セルゲルビーズエマルションを調製した。配列決定ライブラリーを、製造業者ガイドラインに従って、１０×５’免疫プロファイリングｖ２試薬を使用して調製し、９０塩基対の挿入読み取り長さを有するＩｌｌｕｍｉｎａ ＮｅｘｔＳｅｑ２０００機器上で配列決定した。デフォルトパラメータを有するＣｅｌｌ Ｒａｎｇｅｒ ｖ７（１０×ゲノミクス）を使用して、一次及び二次データ分析を行った。ＲパッケージＳｅｕｒａｔ１を、三次分析及びデータ可視化に使用した。３つ未満の細胞で検出された遺伝子を破棄した。クロノタイプクラスター化バイアスを回避するために、ＴＣＲＡ及びＴＣＲＢ遺伝子を除去した。以下の経験的に決定されたフィルターを適用して、死細胞、二重鎖、または低品質の細胞を除去した。ミトコンドリア読み取り率が８％未満であり、検出された遺伝子の数が５００～６０００個である。得られた合計８８，３９６個の個々の細胞を下流分析に使用した。細胞型識別のために、試料は、デフォルトパラメータを有するＳｅｕｒａｔパッケージからのＦｉｎｄＴｒａｎｓｆｅｒＡｎｃｈｏｒｓ及びＭａｐＱｕｅｒｙ関数を使用して、社内で開発された、手動で注釈付けされた、マルチモーダルＧＥＮ２ ＴＩＬ参照アトラスにマッピングされた。参照マッピング注釈に基づいて、細胞をＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞またはＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞にサブセットし、同じ方法で別々に分析した。変数特徴は、正規化後に特定された。次いで、試料を処理（ＣＴＲＬ対ＩｎｖｉｇｏＴ）に基づいてグループ化し、異なるドナーにわたって統合した。次いで、データをスケーリングし、ｎｐｃｓ＝５０で寸法を縮小した。クラスターは、０．５の分解能パラメータで定義した。ＦｉｎｄＭａｒｋｅｒｓ関数を使用して、デフォルトパラメータを用いて、微分発現分析を行った。擬時間分析を、根細胞マーカー遺伝子としてＩＬ７Ｒを有するＲパッケージＭｏｎｏｃｌｅ３[2]を使用して行った。遺伝子セット分析のために、ＲパッケージＥｓｃａｐｅ[3]、ＵＣｅｌｌ[4]、及びｐｈｅａｔｍａｐ[5]を使用して、Ｋｒｉｓｈｎａ ｅｔ ａｌ．[6]からのＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性及び二重陽性遺伝子シグネチャの遺伝子セットスコア、Ｊａｎｓｅｎ ｅｔ ａｌ．[7]からの幹様メモリーシグネチャ、Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．[8]からのＴ$_{EX}$シグネチャ、Ｃａｕｓｈｉ ｅｔ ａｌ．[9]からのＣＤ８幹様メモリー、Ｏｌｉｖｅｒｉｒａ[10]からの腫瘍特異的Ｔ$_{TE}$シグネチャ、及びＦｅｌｄｍａｎ[11]からの疲弊（番号３）シグネチャを定量化及び可視化した。

【２６２９】

バルクＴＣＲ配列決定

ＮＥＢ Ｍｏｎａｒｃｈ Ｔｏｔａｌ ＲＮＡ Ｍｉｎｉｐｒｅｐキットを使用して、およそ１００万個の細胞から全ＲＮＡを抽出した。製造業者のガイドラインに従って、最大５００ｎｇの精製された全ＲＮＡを、Ｔａｋａｒａ ＳＭＡＲＴｅｒ Ｈｕｍａｎ ＴＣＲ ａ／ｂプロファイリングキットｖ２を使用して、ＴＣＲベータ鎖ライブラリーを調製するためのテンプレートとして使用した。各ライブラリーの等モル量を一緒にプールし、対合した末端１５０ｂｐリードを有するＮｅｘｔＳｅｑ２０００上で配列決定した。生産的な再配置（クローンタイプ）を識別及び定量化するためのＦＡＳＴＱファイルの一次分析は、デフォルトパラメータを有するＲＴＣＲ[12]を使用して行った。ＣＤＲ３領域における完璧な平均ベース品質スコア未満のクロノタイプを除外した。三次分析及びデータ可視化は、Ｒパッケージｉｍｍｕｎａｒｃｈ[13]を使用して行った。Ｒは、独自のクローンタイプ（リッチネス）の数を表し、P_iは、クローンタイプｉの相対存在量（割合）を表し、シャノン多様性指数は、以下のように計算し、

【数３】

$$\frac{-\sum_{i=1}^{R} P_i \ln(P_i)}{\ln(R)}$$

Ｓｉｍｐｓｏｎクローン性指数は、以下のように計算した：

【数４】

$$\sqrt{\sum_{i=1}^{R} P_i^2}$$

【２６３０】

参考文献：

１．Ｈａｏ Ｙ，Ｈａｏ Ｓ，Ａｎｄｅｒｓｅｎ－Ｎｉｓｓｅｎ Ｅ，Ｍａｕｃｋ Ｗ Ｍ ３ｒｄ，Ｚｈｅｎｇ Ｓ，Ｂｕｔｌｅｒ Ａ，Ｌｅｅ ＭＪ，Ｗｉｌｋ ＡＪ，Ｄａｒｂｙ Ｃ，Ｚａｇｅｒ Ｍ，Ｈｏｆｆｍａｎ Ｐ，Ｓｔｏｅｃｋｉｕｓ Ｍ，Ｐａｐａｌｅｘｉ Ｅ，Ｍｉｍｉｔｏｕ ＥＰ，Ｊａｉｎ Ｊ，Ｓｒｉｖａｓｔａｖａ Ａ，Ｓｔｕａｒｔ Ｔ，Ｆｌｅｍｉｎｇ ＬＭ，Ｙｅｕｎｇ Ｂ，Ｒｏｇｅｒｓ ＡＪ，ＭｃＥｌｒａｔｈ ＪＭ，Ｂｌｉｓｈ ＣＡ，Ｇｏｔｔａｒｄｏ Ｒ，Ｓｍｉｂｅｒｔ Ｐ，Ｓａｔｉｊａ Ｒ．Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｍｕｌｔｉｍｏｄａｌ ｓｉｎｇｌｅ－ｃｅｌｌ ｄａｔａ．Ｃｅｌｌ．２０２１ Ｊｕｎ ２４；１８４（１３）：３５７３－３５８７．ｅ２９．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｃｅｌｌ．２０２１．０４．０４８．Ｅｐｕｂ ２０２１ Ｍａｙ ３１．ＰＭＩＤ：３４０６２１１９；ＰＭＣＩＤ：ＰＭＣ８２３８４９９。

２．Ｃａｏ Ｊ，Ｓｐｉｅｌｍａｎｎ Ｍ，Ｑｉｕ Ｘ，Ｈｕａｎｇ Ｘ，Ｉｂｒａｈｉｍ ＤＭ，Ｈｉｌｌ ＡＪ，Ｚｈａｎｇ Ｆ，Ｍｕｎｄｌｏｓ Ｓ，Ｃｈｒｉｓｔｉａｎｓｅｎ Ｌ，Ｓｔｅｅｍｅｒｓ ＦＪ，Ｔｒａｐｎｅｌｌ Ｃ，ＳｈｅｎｄｕｒｅＪ．Ｔｈｅ ｓｉｎｇｌｅ－ｃｅｌｌ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ ｌａｎｄｓｃａｐｅ ｏｆ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｏｒｇａｎｏｇｅｎｅｓｉｓ．Ｎａｔｕｒｅ．２０１９ Ｆｅｂ；５６６（７７４５）：４９６－５０２．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓ４１５８６－０１９－０９６９－ｘ．Ｅｐｕｂ ２０１９ Ｆｅｂ ２０．ＰＭＩＤ：３０７８７４３７；ＰＭＣＩＤ：ＰＭＣ６４３４９５２。

３．Ｂｏｒｃｈｅｒｄｉｎｇ Ｎ，Ａｎｄｒｅｗｓ Ｊ（２０２２）．ｅｓｃａｐｅ：Ｅａｓｙ ｓｉｎｇｌｅ ｃｅｌｌ ａｎａｌｙｓｉｓ ｐｌａｔｆｏｒｍ ｆｏｒ ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ．Ｒ ｐａｃｋａｇｅ ｖｅｒｓｉｏｎ １．８．０。

４．Ａｎｄｒｅａｔｔａ Ｍ，Ｃａｒｍｏｎａ ＳＪ．ＵＣｅｌｌ：Ｒｏｂｕｓｔ ａｎｄ ｓｃａｌａｂｌｅ ｓｉｎｇｌｅ－ｃｅｌｌ ｇｅｎｅ ｓｉｇｎａｔｕｒｅ ｓｃｏｒｉｎｇ．Ｃｏｍｐｕｔ Ｓｔｒｕｃｔ ＢｉｏｔｅｃｈｎｏｌＪ．２０２１ Ｊｕｎ ３０；１９：３７９６－３７９８．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｃｓｂｊ．２０２１．０６．０４３．ＰＭＩＤ：３４２８５７７９；ＰＭＣＩＤ：ＰＭＣ８２７１１１１。

５．Ｒａｉｖｏ Ｋｏｌｄｅ（２０１９）．ｐｈｅａｔｍａｐ：Ｐｒｅｔｔｙ Ｈｅａｔｍａｐｓ．Ｒ ｐａｃｋａｇｅ ｖｅｒｓｉｏｎ １．０．１２。

６．Ｋｒｉｓｈｎａ Ｓ，Ｌｏｗｅｒｙ ＦＪ，Ｃｏｐｅｌａｎｄ ＡＲ，Ｂａｈａｄｉｒｏｇｌｕ Ｅ，Ｍｕｋｈｅｒｊｅｅ Ｒ，Ｊｉａ Ｌ，Ａｎｉｂａｌ ＪＴ，Ｓａｃｈｓ Ａ，Ａｄｅｂｏｌａ ＳＯ，Ｇｕｒｕｓａｍｙ Ｄ，Ｙｕ Ｚ，Ｈｉｌｌ Ｖ，Ｇａｒｔｎｅｒ ＪＪ，Ｌｉ ＹＦ，Ｐａｒｋｈｕｒｓｔ Ｍ，Ｐａｒｉａ Ｂ，Ｋｖｉｓｔｂｏｒｇ Ｐ，Ｋｅｌｌｙ ＭＣ，Ｇｏｆｆ ＳＬ，Ａｌｔａｎ－Ｂｏｎｎｅｔ Ｇ，Ｒｏｂｂｉｎｓ ＰＦ，Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ ＳＡ．Ｓｔｅｍ－ｌｉｋｅ ＣＤ８ Ｔ ｃｅｌｌｓ ｍｅｄｉａｔｅ ｒｅｓｐｏｎｓｅ ｏｆ ａｄｏｐｔｉｖｅ ｃｅｌｌ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ａｇａｉｎｓｔ ｈｕｍａｎ ｃａｎｃｅｒ．Ｓｃｉｅｎｃｅ．２０２０ Ｄｅｃ １１；３７０（６５２２）：１３２８－１３３４．ｄｏｉ：１０．１１２６／ｓｃｉｅｎｃｅ．ａｂｂ９８４７．ＰＭＩＤ：３３３０３６１５；ＰＭＣＩＤ：ＰＭＣ８８８３５７９。

７．Ｊａｎｓｅｎ ＣＳ，Ｐｒｏｋｈｎｅｖｓｋａ Ｎ，Ｍａｓｔｅｒ ＶＡ，Ｓａｎｄａ ＭＧ，Ｃａｒｌｉｓｌｅ ＪＷ，Ｂｉｌｅｎ ＭＡ，Ｃａｒｄｅｎａｓ Ｍ，Ｗｉｌｋｉｎｓｏｎ Ｓ，Ｌａｋｅ Ｒ，Ｓｏｗａｌｓｋｙ ＡＧ，Ｖａｌａｎｐａｒａｍｂ

il RM, Hudson WH, McGuire D, Melnick K, Khan AI, Kim K, Chang YM, Kim A, Filson CP, Alemozaffar M, Osunkoya AO, Mullane P, Ellis C, Akondy R, Im SJ, Kamphorst AO, Reyes A, Liu Y, Kissick H. An intra-tumoral niche maintains and differentiates stem-like CD8 T cells. Nature. 2019 Dec;576(7787):465-470. doi:10.1038/s41586-019-1836-5. Epub 2019 Dec 11. PMID:31827286;PMCID:PMC7108171。

8. Zheng L, Qin S, Si W, Wang A, Xing B, Gao R, Ren X, Wang L, Wu X, Zhang J, Wu N, Zhang N, Zheng H, Ouyang H, Chen K, Bu Z, Hu X, Ji J, Zhang Z. Pan-cancer single-cell landscape of tumor-infiltrating T cells. Science. 2021 Dec 17;374(6574):abe6474. doi:10.1126/science.abe6474. Epub 2021 Dec 17. PMID:34914499.

9. Caushi JX, Zhang J, Ji Z, Vaghasia A, Zhang B, Hsiue EH, Mog BJ, Hou W, Justesen S, Blosser R, Tam A, Anagnostou V, Cottrell TR, Guo H, Chan HY, Singh D, Thapa S, Dykema AG, Burman P, Choudhury B, Aparicio L, Cheung LS, Lanis M, Belcaid Z, El Asmar M, Illei PB, Wang R, Meyers J, Schuebel K, Gupta A, Skaist A, Wheelan S, Naidoo J, Marrone KA, Brock M, Ha J, Bush EL, Park BJ, Bott M, Jones DR, Reuss JE, Velculescu VE, Chaft JE, Kinzler KW, Zhou S, Vogelstein B, Taube JM, Hellmann MD, Brahmer JR, Merghoub T, Forde PM, Yegnasubramanian S, Ji H, Pardoll DM, Smith KN. Transcriptional programs of neoantigen-specific TIL in anti-PD-1-treated lung cancers. Nature. 2021 Aug;596(7870):126-132. doi:10.1038/s41586-021-03752-4. Epub 2021 Jul 21. Erratum in:Nature. 2021 Oct;598(7881):E1. PMID:34290408;PMCID:PMC8338555。

10. Oliveira G, Stromhaug K, Klaeger S, Kula T, Frederick DT, Le PM, Forman J, Huang T, Li S, Zhang W, Xu Q, Cieri N, Clauser KR, Shukla SA, Neuberg D, Justesen S, MacBeath G, Carr SA, Fritsch EF, Hacohen N, Sade-Feldman M, Livak KJ, Boland GM, Ott PA, Keskin DB, Wu CJ. Phenotype, specificity and avidity of antitumour CD8^{+} T cells in melanoma. Nature. 2021 Aug;596(7870):119-125. doi:10.1038/s41586-021-03704-y. Epub 2021 Jul 21. PMID:34290406;PMCID:PMC9187974。

11. Sade-Feldman M, Yizhak K, Bjorgaard SL, Ray JP, de Boer CG, Jenkins RW, Lieb DJ, Chen JH, Frederick DT, Barzily-Rokni M, Freem

an SS, Reuben A, Hoover PJ, Villani AC, Ivanova E, Portell A, Lizotte PH, Aref AR, Eliane JP, Hammond MR, Vitzthum H, Blackmon SM, Li B, Gopalakrishnan V, Reddy SM, Cooper ZA, Paweletz CP, Barbie DA, Stemmer-Rachamimov A, Flaherty KT, Wargo JA, Boland GM, Sullivan RJ, Getz G, Hacohen N. Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma. Cell. 2019 Jan 10;176(1-2):404. doi:10.1016/j.cell.2018.12.034. Erratum for: Cell. 2018 Nov 1;175(4):998-1013.e20. PMID:30633907;PMCID:PMC6647017。

12. Gerritsen B, Pandit A, Andeweg AC, de Boer RJ. RTCR:a pipeline for complete and accurate recovery of T cell repertoires from high throughput sequencing data. Bioinformatics. 2016 Oct 15;32(20):3098-3106. doi:10.1093/bioinformatics/btw339. Epub 2016 Jun 20. PMID:27324198;PMCID:PMC5048062。

13. Vadim I. Nazarov, Vasily O. Tsvetkov, Eugene Rumynskiy, Aleksandr A. Popov, Ivan Balashov and Maria Volobueva (2022). immunarch:Bioinformatics Analysis of T-Cell and B-Cell Immune Repertoires. R package version 0.6.9。

【2631】

上記の実施例は、当業者に対して、本発明の組成物、系及び方法の実施形態の作製方法及び使用方法の完全な開示及び説明を提供するために提示されており、本発明者らが自身の発明とみなすものの範囲を限定することを意図しない。当業者に明らかな、本発明を実施するための上記のモードの修正は、添付の特許請求の範囲内にあることを意図している。本明細書で言及するすべての特許及び刊行物は、本発明が属する分野の当業者のレベルを示す。

【2632】

すべての見出し及びセクションの指定は、明確化及び参照の目的のみのために使用されており、いかなる方法でも限定するものとしてみなされない。例えば、当業者は、本明細書に記載の本発明の趣旨及び範囲に従って異なる見出し及びセクションから様々な態様を適宜組み合わせることの有用性を理解する。

【2633】

本明細書で引用されたすべての参考文献は、各個々の刊行物または特許もしくは特許出願がすべての目的のためにその全体が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されているのと同じ程度にすべての目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【2634】

当業者に明らかであるように、本出願の趣旨及び範囲から逸脱することなく、本出願の多くの修正及び変形が加えられてもよい。本明細書に記載の特定の実施形態及び実施例はほんの一例として提供されており、本出願は、特許請求の範囲が権利を与えられる等価物の全範囲に加えて、添付の特許請求の範囲の用語によってのみ限定されるべきである。

【図面】

【図１】

プロセス２Ａ：ステップＡ～Ｅから約２２日

１．ステップＡ

患者の腫瘍試料を取得する

２．ステップＢ

断片化及び第１の拡張

３日～１４日

３．ステップＣ

第１の拡張から第２の拡張へと移行

ストレージ及び閉鎖系なし

４．ステップＤ

第２の拡張

ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞

閉鎖系

５．ステップＥ

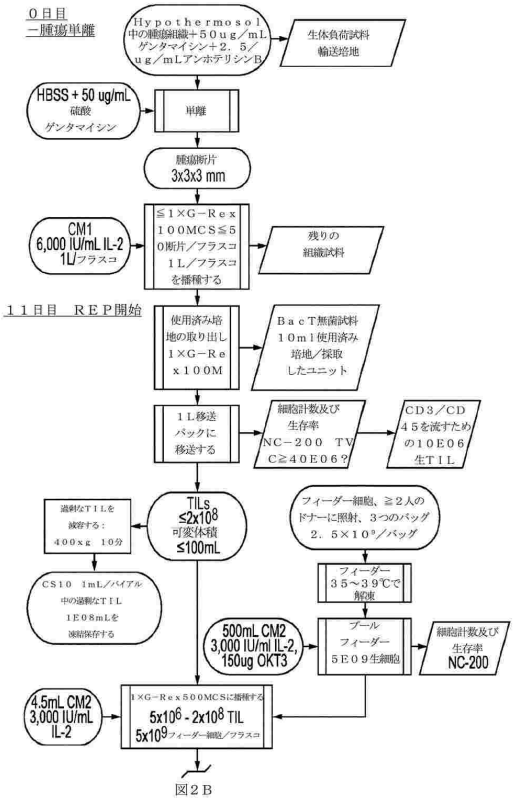
ステップＤからのＴＩＬを採取する

６．ステップＦ

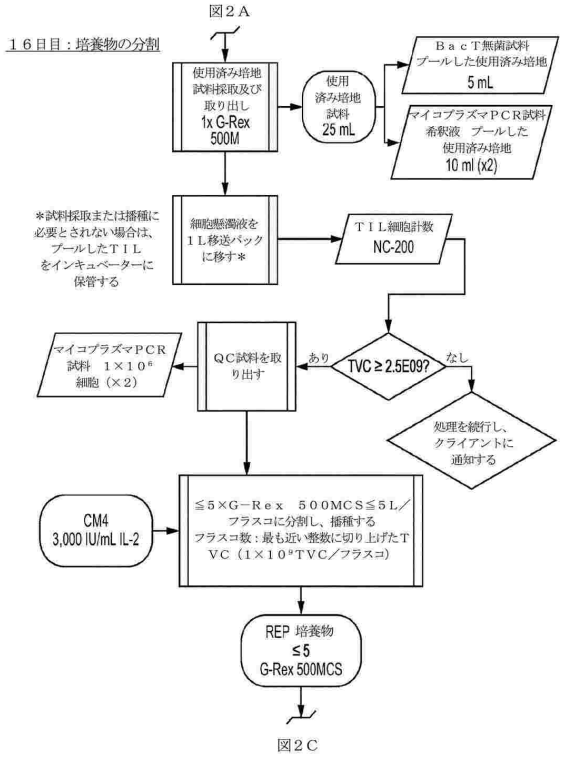
最終製剤及び／または注入バッグへの移行

（任意選択で凍結保存）

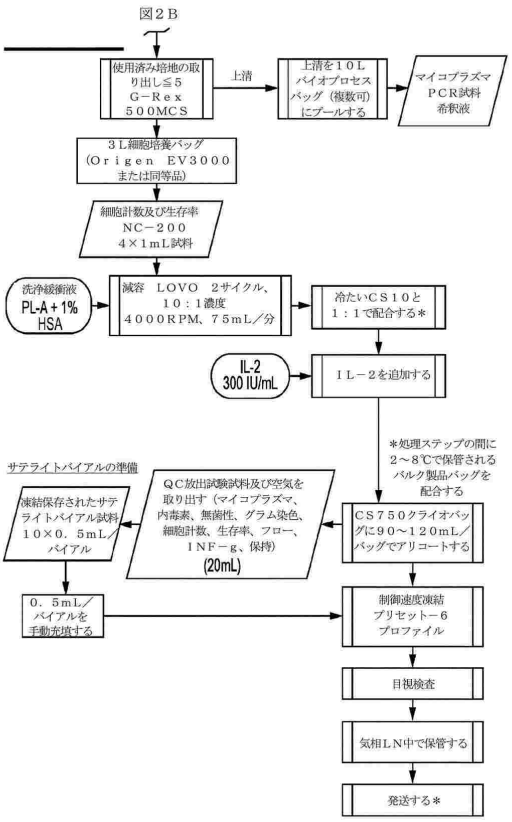
【図２Ａ】



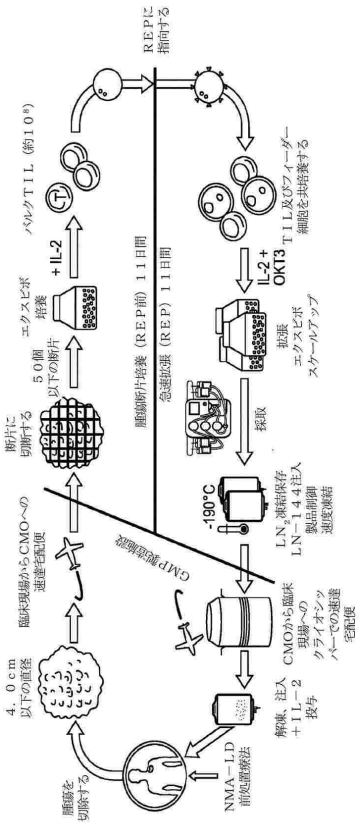
【図２Ｂ】



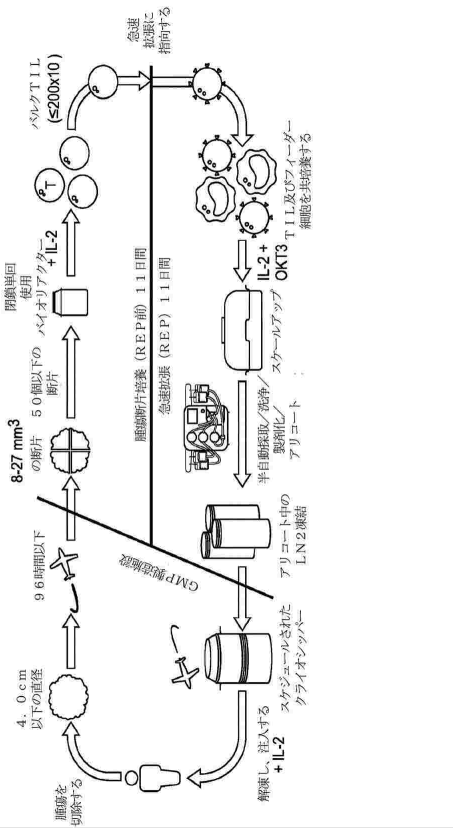
【図２Ｃ】



【図３】



【図４】



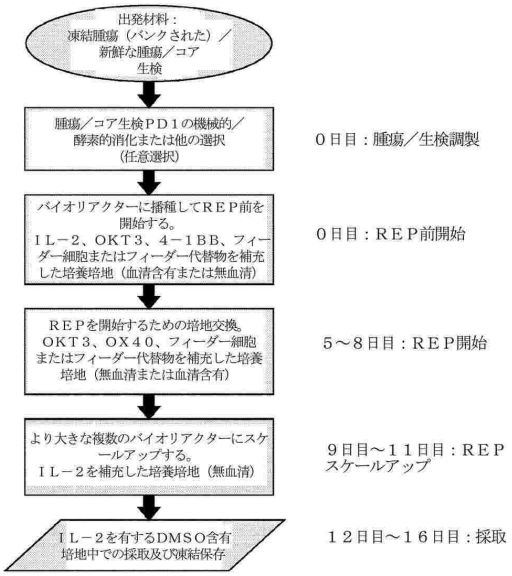
【図５】

プロセス1C：ステップA～Eについて43～55日	プロセス2A：ステップA～Eから約22日
1. ステップ**A** 患者の腫瘍試料を取得する	**1.** ステップ**A** 患者の腫瘍試料を取得する
2. ステップ**B** 断片化及び第1の拡張 11日～21日	**2.** ステップ**B** 断片化及び第1の拡張 3日～14日
3. ステップ**C** 第1の拡張から第2の拡張へと移行 選択までの任意選択のストレージ	**3.** ステップ**C** 第1の拡張から第2の拡張へと移行 ストレージ及び閉鎖系なし
4. ステップ**D** 第2の拡張 IL−2、OKT−3、抗原提示フィーダー細胞 任意選択で1回以上繰り返す	**4.** ステップ**D** 第2の拡張 IL−2、OKT−3、抗原提示フィーダー細胞 閉鎖系
5. ステップ**E** ステップDからのTILを採取する	**5.** ステップ**E** ステップDからのTILを採取する 閉鎖系
6. ステップ**F** 最終製剤及び／または注入バッグへの移行	**6.** ステップ**F** 最終製剤及び／または注入バッグへの移行 （任意選択で凍結保存）

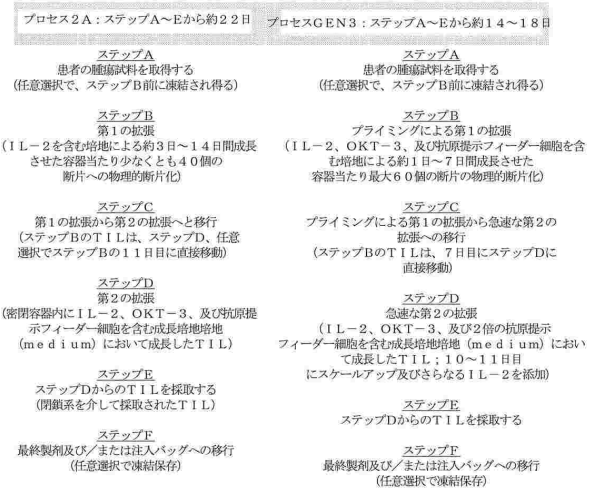
【図６】

プロセスステップ	プロセス1C実施形態	プロセス2A実施形態	利点
Pre-REP	•10個のGREX−10フラスコ当たり4個の断片 •11～21日間	•1つのGREX−100Mフラスコ当たり40個の断片 •11日間	•フラスコ当たりの腫瘍断片の増加 •培養時間の短縮 •ステップ数の削減 •閉鎖系に適している
REP前からREPへの移行	•REP前TILを、選択のために表現型決定されるまで凍結し、次いで解凍してREPに進む（−30日目） REPは、＞40×10⁶TILを必要とする	•REP前TILは、11日目に直接REPに移動する REPは、25～200×10⁸TILを必要とする	•REP前からREPプロセスの短縮 •ステップ数の削減 •表現型決定選択の排除 •閉鎖系に適している
REP	•REP 0日目に6つのGREX−100Mフラスコ •REP 0日目に5×10⁸TIL及び5×10⁸PBMCフィーダー／フラスコ •REP 7日目に18～36個のフラスコに分割する •14日間	•11日目に1つのGREX−500Mフラスコ •11日目に25～200×10⁸TIL及び5×10⁹PBMC •16日目に6つ以下のGREX−500Mフラスコに分割する •11日間	•ステップ数の削減 •REP期間の短縮 •フラスコ間のTILの閉鎖系移送 •閉鎖系培地交換
採取	•遠心分離によって採取したTIL	•LOVO自動細胞洗浄系を介して採取したTIL	•ステップ数の削減 •自動細胞洗浄 •閉鎖系 •洗浄中の製品損失の低減
最終製剤化	•Hypothermosol中の新鮮な製品 •単回注入バッグ •限定された発送安定性	•LN_2中で保管されたPlasmaLyte−A+1% HSA及びCS10中の凍結保存製品 •複数のアリコート •より長い発送安定性	•発送の柔軟性 •柔軟な患者スケジューリング •よりタイムリーな放出試験
全体の推定プロセス時間	• 43～55日	• 22日	• 患者へのより速い転向

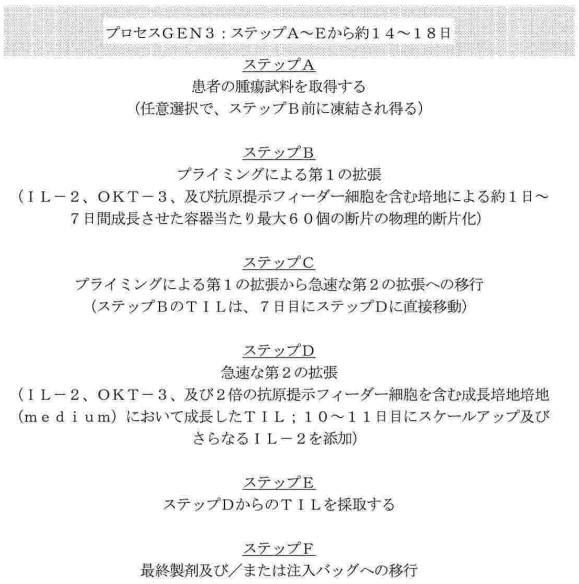
【図７】



【図８Ａ】



【図８Ｂ】



【図８Ｃ】



【図８Ｄ】

修正したＧｅｎ２様プロセス：ステップＡ～Ｅから約２２日

ステップＡ
患者の腫瘍試料を取得する
（任意に、ステップＢ前に凍結され得；　任意に、腫瘍試料は、コア／小生検であり得る）

ステップＢ１
初期培養
容器当たり最大６０個の腫瘍断片または最大１０個のコア／小生検の物理的断片化、ＩＬ－２を含む成長培地中で３日間成長したＴＩＬ

ステップＢ２
プライミングによる第１の拡張
ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地中で８日間成長したＴＩＬ）

ステップＣ
プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行
（ステップＢのＴＩＬは、１１日目にステップＤに直接移動）

ステップＤ
急速な第２の拡張
（体積を低下させ、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び５０倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地において成長したＴＩＬ；１６日目にスケールアップ及びさらなるＩＬ－２を添加）

ステップＥ
ステップＤからのＴＩＬを採取する

ステップＦ
最終製剤及び／または注入バッグへの移行
（任意選択で凍結保存）

【図８Ｅ】

プロセスＣＤ３９／ＣＤ６９　ＧＥＮ２Ａ：ステップＡ～Ｅから約２２日	プロセスＣＤ３９／ＣＤ６９　ＧＥＮ３：ステップＡ～Ｅから約１４～２２日
ステップＡ１ 患者の腫瘍試料を取得する （任意選択で、ステップＢ前に凍結され得る） ステップＡ２ 腫瘍試料の消化／物理的分解 ステップＡ３ （ａ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性、（ｂ）ＣＤ３９／ＣＤ６９^{LO}、または（ａ）細胞と（ｂ）細胞との組み合わせの事前選択	ステップＡ１ 患者の腫瘍試料を取得する （任意選択で、ステップＢ前に凍結され得る） ステップＡ２ 腫瘍試料の消化／物理的分解 ステップＡ３ （ａ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性、（ｂ）ＣＤ３９／ＣＤ６９^{LO}、または（ａ）細胞と（ｂ）細胞との組み合わせの事前選択
ステップＢ 第１の拡張 （ＩＬ－２を含む培地による約３日～１４日間成長させた容器当たり１０００～１００，０００個の細胞）	ステップＢ プライミングによる第１の拡張 （ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む培地による約１日～１１日間成長させた容器当たり１０００～１００，０００個の細胞）
ステップＣ 第１の拡張から第２の拡張へと移行 （ステップＢのＴＩＬは、ステップＤ、任意選択でステップＢの１１日目に直接移動）	ステップＣ プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行 （ステップＢのＴＩＬは、７日目～１１日目にステップＤに直接移動）
ステップＤ 第２の拡張 （密閉容器内にＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地（ｍｅｄｉｕｍ）において成長したＴＩＬ）	ステップＤ 急速な第２の拡張 （ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び２倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地（ｍｅｄｉｕｍ）において成長したＴＩＬ；１０～１１日目にスケールアップ及びさらなるＩＬ－２を添加）
ステップＥ ステップＤからのＴＩＬを採取する （閉鎖系を介して採取されたＴＩＬ）	ステップＥ ステップＤからのＴＩＬを採取する
ステップＦ 最終製剤及び／または注入バッグへの移行 （任意選択で凍結保存）	ステップＦ 最終製剤及び／または注入バッグへの移行 （任意選択で凍結保存）

【図８Ｆ】

プロセスＣＤ３９／ＣＤ６９　ＧＥＮ３：ステップＡ～Ｅから約１４～２２日

ステップＡ１
患者の腫瘍試料を取得する
（任意選択で、ステップＢ前に凍結され得る）

ステップＡ２
（ａ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性、（ｂ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重ノックアウト、または（ａ）細胞と（ｂ）細胞との組み合わせの事前選択

ステップＢ
プライミングによる第１の拡張
（ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む培地による約１日～１１日間成長させた容器当たり最大６０個の断片の物理的断片化）

ステップＣ
プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行
（ステップＢのＴＩＬは、７日目～１１日目にステップＤに直接移動）

ステップＤ
急速な第２の拡張
（ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び２倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地（ｍｅｄｉｕｍ）において成長したＴＩＬ；１０～１１日目にスケールアップ及びさらなるＩＬ－２を添加）

ステップＥ
ステップＤからのＴＩＬを採取する

ステップＦ
最終製剤及び／または注入バッグへの移行
（任意選択で凍結保存）

【図８Ｇ】

ＣＤ３９／ＣＤ６９事前選択によるＣＤ３９／ＣＤ６９　ＫＯ　ＴＩＬ拡張プロセス　ステップＡ～Ｅから約２２～２６日

ステップＡ１
患者の腫瘍試料を取得する
腫瘍消化ならびに消化及びＯＫＴ－３による再刺激

ステップＡ２
任意選択で、ＰＤ－１事前選択；（ａ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重陰性、（ｂ）ＣＤ３９／ＣＤ６９二重ノックアウト、または（ａ）細胞と（ｂ）細胞との組み合わせの事前選択

ステップＢ
第１の拡張
ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞で培養されたＴＩＬ（約１１日）

ステップＣ
採取され、ＯＫＴ－３で再刺激されたＴＩＬ（約２日）

ステップＤ
任意選択で、ＣＤ３９／ＣＤ６９陽性ＴＩＬを遺伝子修飾して、内因性ＣＤ３９／ＣＤ６９発現をサイレンシングまたは減少させる
（約１～２日）

ステップＥ
第２の拡張
（ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地において成長したＴＩＬ）（約１１日）

ステップＦ
ステップＥからのＴＩＬを採取する

ステップＧ
最終製剤及び／または注入バッグへの移行
（任意選択で凍結保存）

【図８Ｈ】

プロセスＴＳ－ＴＩＬ：ステップＡ～Ｅから約２２日

ステップＡ
患者の腫瘍試料を取得する
（任意に、ステップＢ前に凍結され得；　任意に、腫瘍試料は、コア／小生検であり得る）

ステップＢ１
初期培養／刺激
（最大６０個の腫瘍断片または最大１０個のコア／小生検の物理的断片化、ＩＬ－２［任意選択で低用量］、ＩＦＮ－γ及びＰＤ－１を含む成長培地中で最大２日間成長させたＴＩＬ）
ステップＢ２
第１の拡張
（細胞を密閉容器に移し、ＩＬ－２［任意選択で低用量］、ＩＬ－２１、及びＡＫＴｉを含む培地を用いて約１日～５日間成長させ；ＩＬ－２、ＩＬ－２１、及びＡＫＴｉを含む新しい培地で約５日～９日間培養した）
ステップＣ
第１の拡張から第２の拡張へと移行
（ステップＢのＴＩＬは、ステップＤ、任意選択でステップＢの１１日目に直接移動）
ステップＤ
第２の拡張
（ＩＬ－２［任意選択で低用量］、ＩＬ－２１、及びＡＫＴｉを含む培地を用いて約１日～５日間成長させ；ＩＬ－２、ＩＬ－２１、及びＡＫＴｉを含む新しい培地で約５日～９日間、密閉容器中で培養したＴＩＬ）
ステップＥ
ステップＤからのＴＩＬを採取する
（閉鎖系を介して採取されたＴＩＬ）

ステップＦ
最終製剤及び／または注入バッグへの移行
（任意選択で凍結保存）

【図８Ｉ】

プロセスＩ－ＴＩＬ：ステップＡ～Ｅから約２２日

ステップＡ
患者の腫瘍試料を取得する
（任意に、ステップＢ前に凍結され得；　任意に、腫瘍試料は、コア／小生検であり得る）

ステップＢ
第１の拡張
（ＩＬ－２、ＩＬ－２１、及びＡＫＴｉを含む培地を用いて約１日～５日間成長させた容器当たり少なくとも４０個の断片への物理的断片化；次いで、ＩＬ－２［任意選択で低用量］、ＩＬ－２１、及びＡＫＴｉを含む新しい培地で約５日～９日間培養した）
ステップＣ
第１の拡張から第２の拡張へと移行
（ステップＢのＴＩＬは、ステップＤ、任意選択でステップＢの１１日目に直接移動）
ステップＤ
第２の拡張
（ＩＬ－２［任意選択で低用量］、ＩＬ－２１、及びＡＫＴｉを含む培地を用いて約１日～５日間成長させ；ＩＬ－２、ＩＬ－２１、及びＡＫＴｉを含む新しい培地で約５日～９日間、密閉容器中で培養したＴＩＬ）
ステップＥ
ステップＤからのＴＩＬを採取する
（閉鎖系を介して採取されたＴＩＬ）

ステップＦ
最終製剤及び／または注入バッグへの移行
（任意選択で凍結保存）

【図８Ｊ】

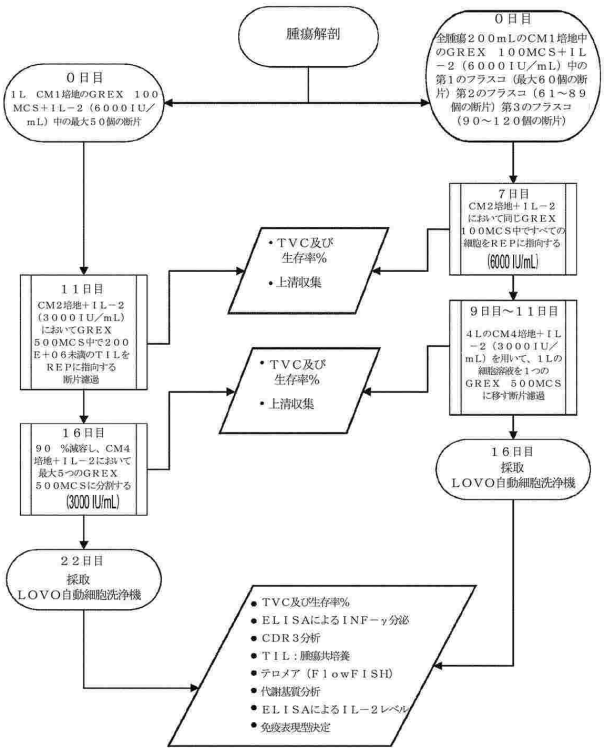
修正プロセスＴＳ－ＴＩＬ：ステップＡ～Ｅから約２２日

ステップＡ
患者の腫瘍試料を取得する
（任意に、ステップＢ前に凍結され得；　任意に、腫瘍試料は、コア／小生検であり得る）

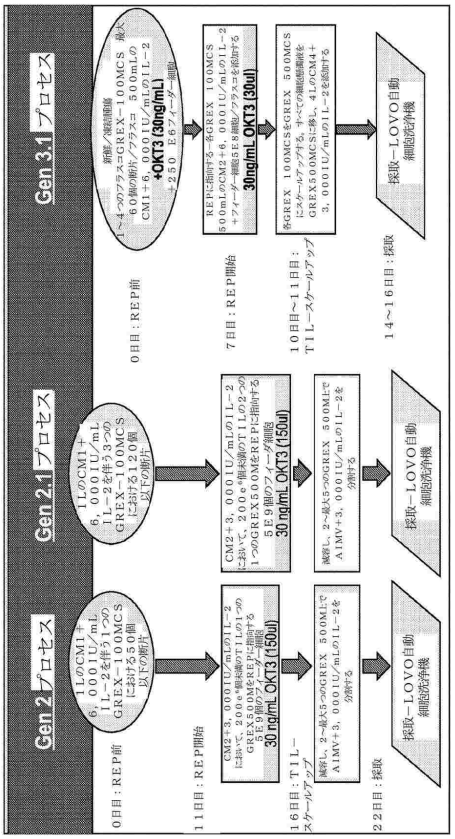
ステップＢ１
初期培養／刺激
（最大６０個の腫瘍断片または最大１０個のコア／小生検の物理的断片化、ＩＬ－２［任意選択で低用量］、ＩＦＮ－γ及びＰＤ－１及び／またはＣＴＬＡ－４及び／またはＣＤ４０Ｌ及び／またはＣＤ４０を含む成長培地中で最大２日間成長させたＴＩＬ）
ステップＢ２
第１の拡張
（細胞を密閉容器に移し、ＩＬ－２［任意選択で低用量］、ＩＬ－２１、及びＡＫＴｉを含む培地を用いて約１日～５日間成長させ；ＩＬ－２、ＩＬ－２１、及びＡＫＴｉを含む新しい培地で約５日～９日間培養した）
ステップＣ
第１の拡張から第２の拡張へと移行
（ステップＢのＴＩＬは、ステップＤ、任意選択でステップＢの１１日目に直接移動）
ステップＤ
第２の拡張
（ＩＬ－２［任意選択で低用量］、ＩＬ－２１、及びＡＫＴｉを含む培地を用いて約１日～５日間成長させ；ＩＬ－２、ＩＬ－２１、及びＡＫＴｉを含む新しい培地で約５日～９日間、密閉容器中で培養したＴＩＬ）
ステップＥ
ステップＤからのＴＩＬを採取する
（閉鎖系を介して採取されたＴＩＬ）

ステップＦ
最終製剤及び／または注入バッグへの移行
（任意選択で凍結保存）

【図９】



【図１０】



【図１１】

ステップ	Gen 2	Gen 2.1	最適化されたGen 3．0
REP前－0日目	≦50個の断片／1つのG-Rex 100MCS-11日	≦180個の断片／3つのG-Rex、事前配合されたCM1加温培地 100MCS-11日	新鮮または凍結腫瘍 1～4つのG-Rex当たり≦30個の断片～最大60個の断片を有する全腫瘍 100MCS（最大4つのG-Rex）、事前に配合された加温培地－7日、REP前、フィーダー 2．5 E8細胞 ＋OKT-3 (30ng/mL)
REP開始	REPに指向する-11日目- <200 E6 TIL 1つのG-Rex 500MCS	REPに指向する-11日目- <200 E6 TIL 1つのG-REX500MCS中の事前配合されたCM2加温培地	REPに指向する-7日目-すべての腫瘍TIL-同じG-Rex 100MCS（100MCS、最大4つのGREX）、標準培地または合成培地（無血清）。追加のフィーダー5 E8細胞 ＋OKT-3 (30ng/mL)
TILの増殖またはスケールアップ	1～5つのG-REX 500MCS 16日目に分割する	2～5つのG-REX 500MCS 事前配合されたCM4加温培地 16日目に分割する	G-REX 100MCSから、TIL懸濁液をG-REX 500MCS、最大4つのGREX 500 MCSに移す- 10日目または11日目にスケールアップする
採取	22日目に採取する、LOVO自動細胞洗浄機	22日目に採取する、LOVO自動細胞洗浄機 (5回の洗浄サイクル)	14日目または16日目に採取する LOVO自動細胞洗浄機（5回の洗浄サイクル）
最終製剤	凍結保存した製品 LN_B中の 3001U/mlのIL2-CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品 LN_B中の 3001U/mlのIL2-CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品 LN_B中の 3001U/mlのIL2-CS10、複数のアリコート
プロセス時間	22日	22日	16日

【図１２】

プロセス日	条件	Gen 3.1
0日目－REP開始前	培地CM1	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	OKT-3 (30ng/mL)	+
	フィーダー(250 E+06)	+

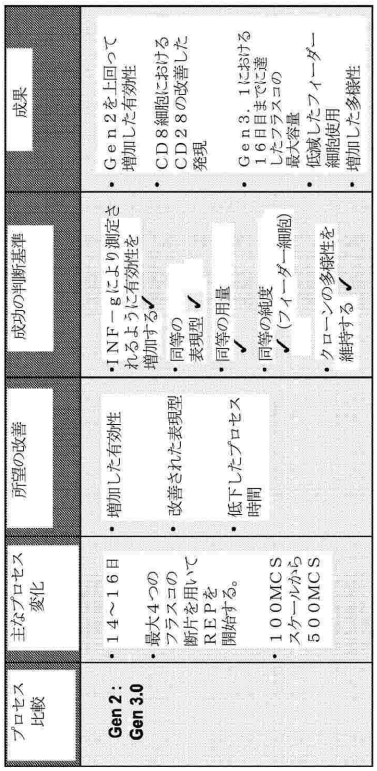
プロセス日	条件	Gen 3.1
7日目－REP開始	培地CM2	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	7日目に追加されたOKT－3（30ng/mL）	+
	7日目に追加されたフィーダー	500 E06
	日数での後フィーダー	750 E+06

プロセス日	条件	Gen 3.1
9～11日目 スケールアップ	G-REX 100MCSから、TIL懸濁液を1つのG-REX 500MCS（最大3つのGREX 500MCS）に移す	あり
16日目－採取	LOVO自動細胞洗浄機	あり

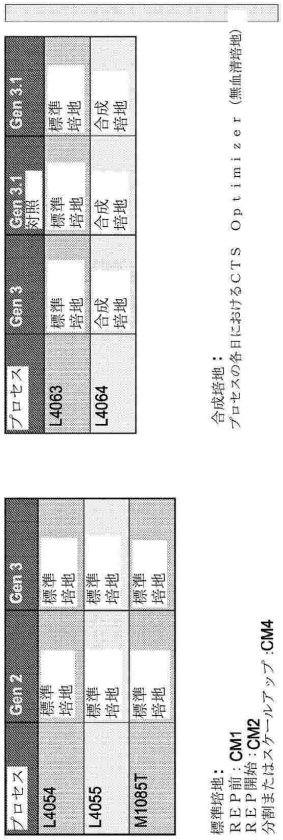
【図１３】

プロセス比較	主なプロセス変化	利点
Gen 2：Gen 2.1	• 1つのフラスコの代わりに2つのフラスコを用いたプロセスを開始する • 2つのG－Rex500MCSプラスコ間のREP開始のフィーダー層に分割する • 使用前に培地を事前に製剤化し、加温する	• 増加したTILレパートリーを用いた最終細胞計数（用量）の増加の可能性。 • プロセス中のプロセス冗長性
Gen 2.1：Gen 3.1	• 新鮮または凍結腫瘍 • 14～16日のプロセス（22日から） • プロセス中の全フィーダー層を低減する • 0日目に存在するフィーダー層及びOKT3 • 断片で開始したREP 100MCSスケールから500MCS • 複数のpre－REPのフラスコを計量する • 標準培地及び合成培地（無血清）	• 増加した有効性 • 改善された表現型 • 低下したプロセス時間 • 低減した試薬試験 • 低下したプロセス変動 • 合成された試薬 • 増加したレパートリー純度を低減する（フィーダー） • 同等またはより高い用量。

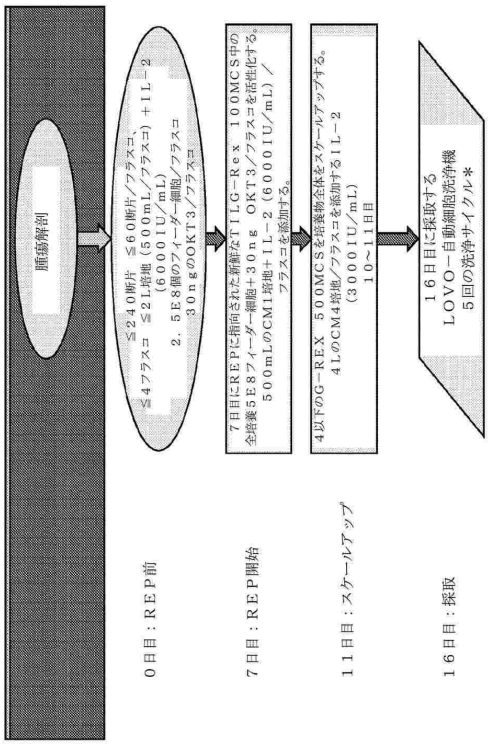
【図１４】



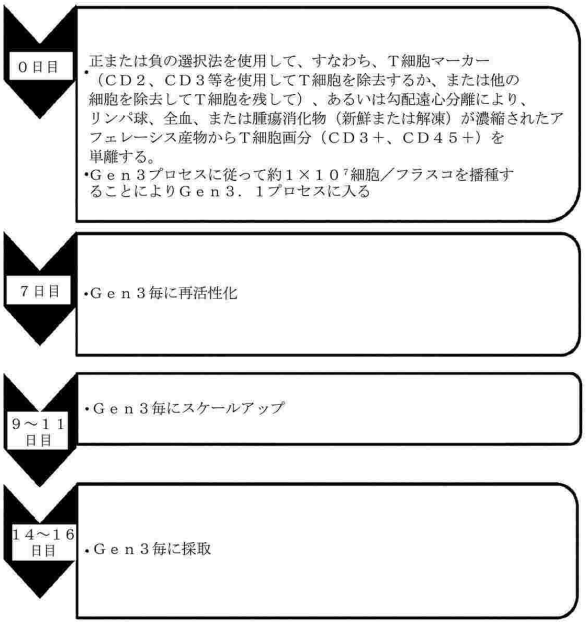
【図１５】



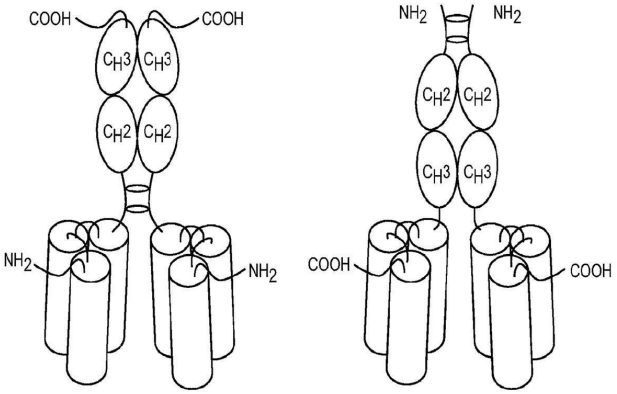
【図１６】



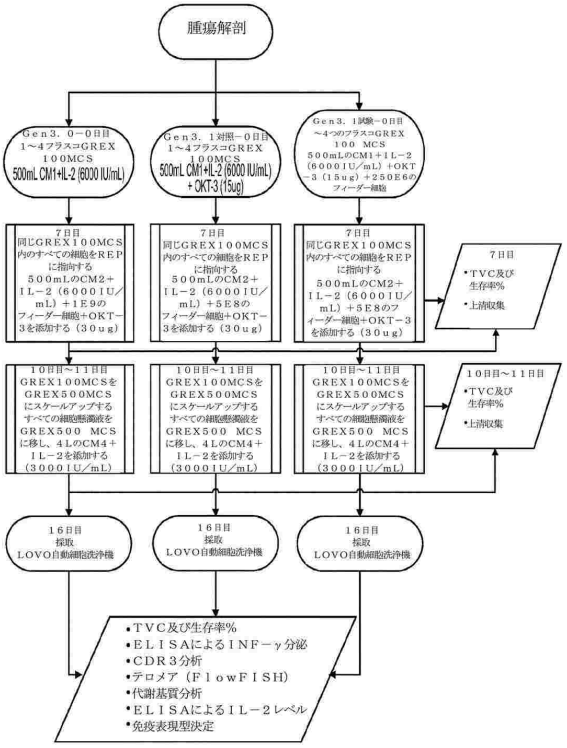
【図１７】



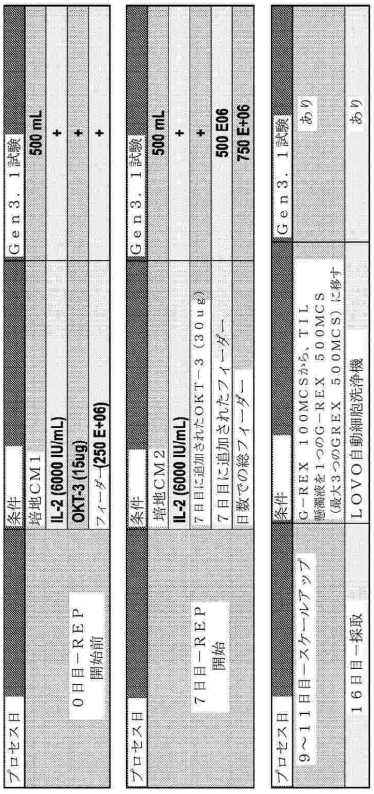
【図１８】



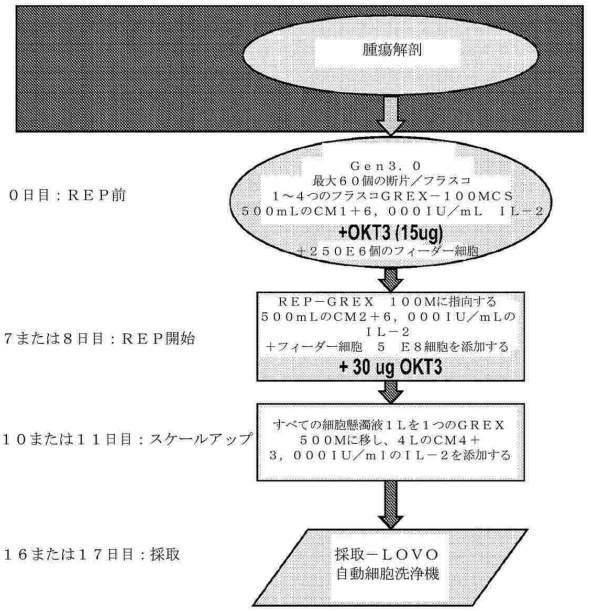
【図１９】



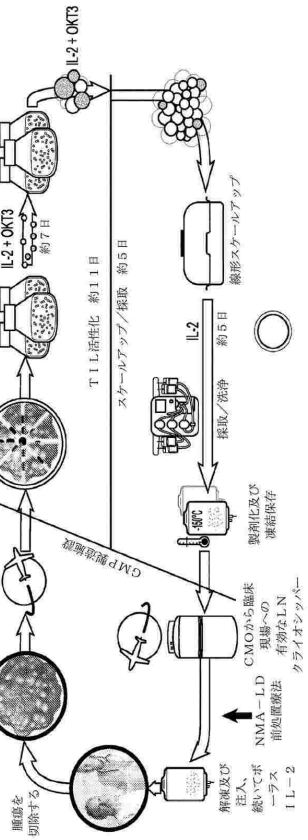
【図２０】



【図２１】



【図２２】



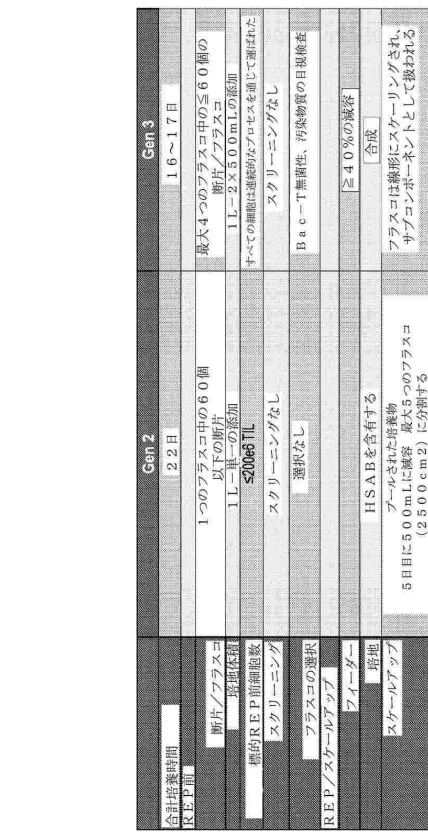
【図２３Ａ】

	Gen 2	Gen 3
合計培養時間	22日	16～17日
REP前		
断片／プラスコ	1つのプラスコ中の60個以下の断片	最大4つのプラスコ中の≦60個の断片／プラスコ
培地体積	1L－2×500mLの添加	1L－2×600mLの添加
標的REP前細胞数	≤200e6 TIL	すべての細胞は連続的なプロセスを通じて選ばれた
スクリーニング	スクリーニングなし	スクリーニングなし
プラスコの選択	選択なし	Bac－T無菌性、汚染物質の目視検査
REP／スケールアップ		
フィーダー	HSABを含有する	≧40%の減容
培地	プールされた播種物 5日目に500mLに減容 最大5つのプラスコ（2500cm2）に分割する	合成
スケールアップ		プラスコは線形にスケーリングされ、サプコンポーネントとして扱われる 最大スケールで180ug以下
OKT3	150ug	高用量
IL-2	1-5	1-4
プラスコの数	高用量	
採取－減容	閉鎖10：1	閉鎖10：1
濃縮／洗浄	LOVO 100:1	LOVO 100:1
製剤化	1:1 CS10 (5% DMSO)	1:1 CS10 (5% DMSO)
発送	気相LN	気相LN
注入	解凍したIV重力	解凍したIV重力

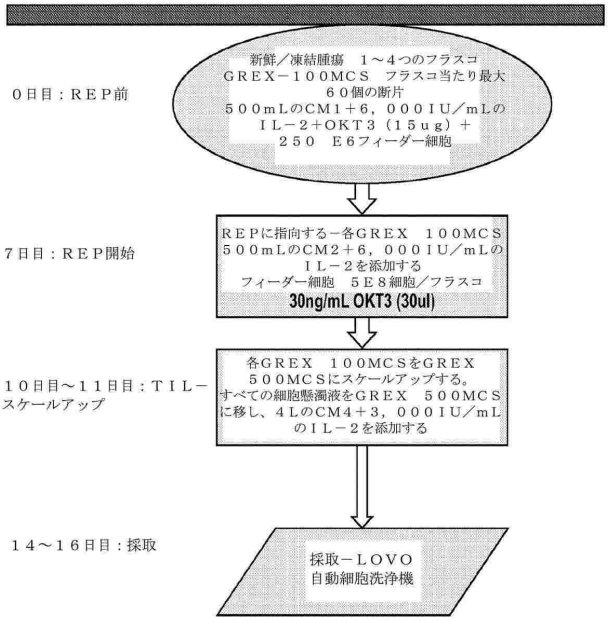
【図２３Ｂ】

	Gen 2	Gen 3
合計培養時間	22日	16～17日
REP前		
断片／プラスコ	1つのプラスコ中の60個以下の断片	最大4つのプラスコ中の≦60個の断片／プラスコ
培地体積	1L－2×500mLの添加	1L－2×600mLの添加
標的REP前細胞数	≤200e6 TIL	すべての細胞は連続的なプロセスを通じて選ばれた
スクリーニング	スクリーニングなし	スクリーニングなし
プラスコの選択	選択なし	Bac－T無菌性、汚染物質の目視検査
REP／スケールアップ		
フィーダー	HSABを含有する	≧40%の減容
培地	プールされた播種物 5日目に500mLに減容 最大5つのプラスコ（2500cm2）に分割する	合成
スケールアップ		プラスコは線形にスケーリングされ、サプコンポーネントとして扱われる 最大スケールで180ug以下
OKT3	150ug	高用量
IL-2	1-5	1-4
プラスコの数	高用量	
採取－減容	閉鎖10：1	閉鎖10：1
濃縮／洗浄	LOVO 100:1	LOVO 100:1
製剤化	1:1 CS10 (5% DMSO)	1:1 CS10 (5% DMSO)
発送	気相LN	気相LN
注入	解凍したIV重力	解凍したIV重力

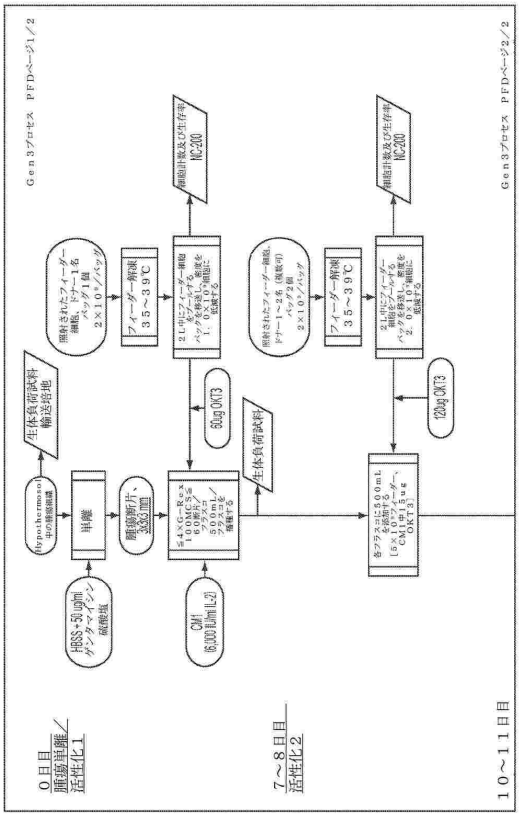
【図２４】



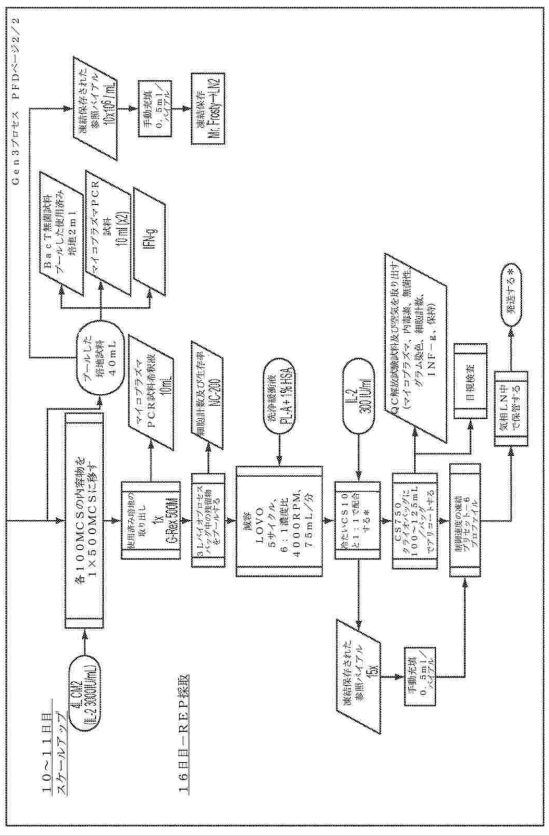
【図２５】



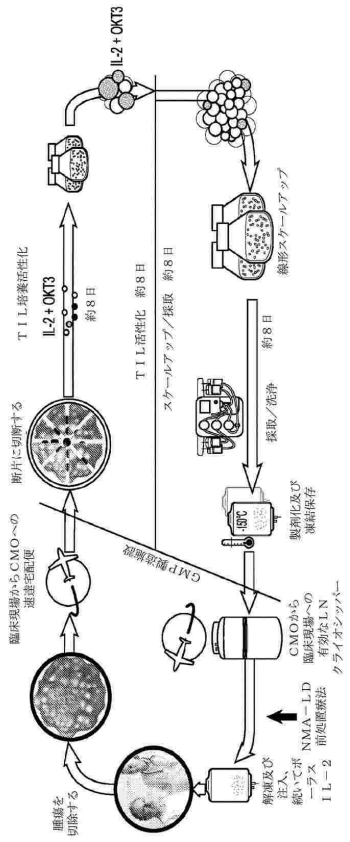
【図２６Ａ】



【図２６Ｂ】



【図２７】



【図２８】

ステップ	Gen 2	Gen 2.1	最適化されたGen3.0
REP前－0日目	≦50個の断片／1つのG－Rex 100MCS－11日	≦180個の断片／3つのG－Rex、事前配合されたCM1 100MCS－11日	新鮮または凍結腫瘍 1つのG－Rex当たり≦30個の断片～最大60個の断片を有する全腫瘍（最大4つのG－Rex）、事前に配合された加温培地－7日、REP前、フィーダー－250e6細胞 +OKT-3 (30ng/mL)
REP開始	REPに指向する－11日目－ <200e6 TIL 1つのG－Rex 500MCS	REPに指向する－11日目－ <200e6 TIL 1つのG－REX500MCS中の事前配合されたCM2加温培地	REPに指向する－7日目－すべての細胞TIL－同じG－Rex 100MCS（100MCS、最大4つのGREX）、標準培地または合成培地（無血清）。追加のフィーダー－5006e細胞 +OKT-3 (30ng/mL)
TILの増殖またはスケールアップ	1～5つのG－REX 500MCS 16日目に分割する	2～5つのG－REX 500MCS 事前配合されたCM4加温培地 16日目に分割する	G－REX 100MCSから、TIL懸濁液をG－REX 500 MCSに移す－10日目または11日目にスケールアップする
採取	22日目に採取する、LOVO自動細胞洗浄機	22日目に採取する、LOVO自動細胞洗浄機（5回の洗浄サイクル）	14日目または16日目に採取するLOVO自動細胞洗浄機（5回の洗浄サイクル）
最終製剤	凍結保存した製品 LN_2中の3001U／m1のIL2－CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品 LN_2中の3001U／m1のIL2－CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品 LN_2中の3001U／m1のIL2－CS10、複数のアリコート
プロセス時間	22日	22日	16日

【図２９】

プロセス比較	プロセス変更	差異
Gen 2 ; Gen 2.1	• 1つのフラスコの代わりに2つのフラスコを用いたプロセスを開始する • 2つのG－Rex500MCSフラスコ間のREP開始のフィーダー層に分割する • 使用前に培地を事前に製剤化し、加温する	• 増加したTILレパートリーを用いた最終細胞計数（用量）の倍加の可能性。 • プロセス中のプロセス冗長性
Gen 2.1 ; Gen 3.1	• 新鮮または凍結腫瘍 • 14～16日のプロセス（22日から） • プロセス中の全フィーダー層を低減する • 0日目に存在するフィーダー層及びOKT3 • 断片で開始したREP • 100MCSスケールから500MCS • 複数のpre－REPのプラスコを計量する • 標準培地及び合成培地（無血清）	• 増加した有効性 • 改善された表現型 • 低下したプロセス時間 • 低減した試薬試験 • 低下したプロセス変動 • 合成された試薬 • 増加したレパートリー • 純度を低減する（フィーダー） • 同等またはより高い用量。

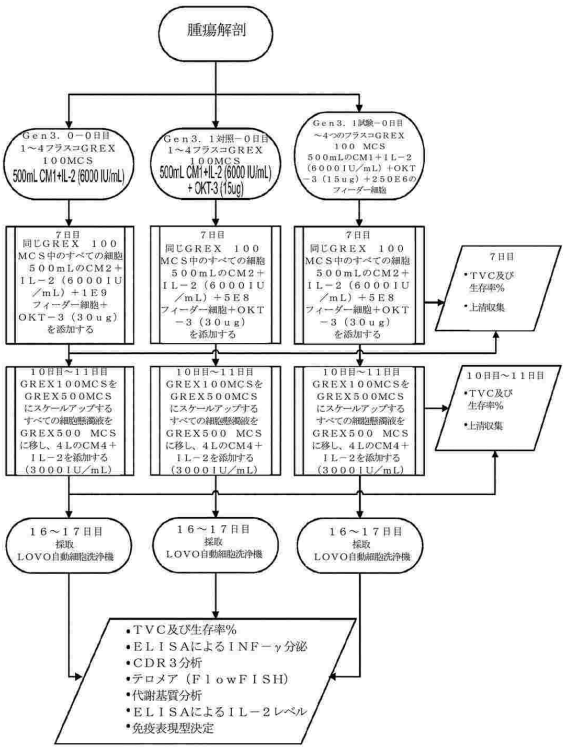
【図３０】

表２．Ｇｅｎ３最適化条件の説明。

プロセス日	条件	Gen 3.0	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
０日目：腫瘍断片の単離及び活性化	培地 (*)	500 mL	500 mL	500 mL
	IL-2	6000 IU/mL	6000 IU/mL	6000 IU/mL
	OKT-3	-	15 ug	15 ug
	フィーダー	-	-	2.5E+06
プロセス日	条件	Gen 3.0	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
７～８日目：ＴＩＬ培養再活性化	培地 (*)	500 mL	500 mL	500 mL
	IL-2	6000 IU/mL	6000 IU/mL	6000 IU/mL
	OKT-3	30 ug	30 ug	30 ug
	フィーダー	1 E+09	500 E+06	500E+06
	７日目までに添加されたフィーダーの合計	1 E+09	500 E+06	750E+06
プロセス日	条件	Gen 3.0	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
１０～１１日目：培養のスケールアップ	ＧＲＥＸ１００から、ＩＬ－２を含む４Ｌ培地を含有する１つのＧＲＥＸ５００に、全ＴＩＬ懸濁液を移す (3000 IU/mL)			
プロセス日	条件	Gen 3.0	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
１６～１７日目：採取／洗浄／製剤化	ＬＯＶＯ自動細胞洗浄機及びＣＴＳ１０による凍結保存。			

(*) 培地は、標準培地またはＣＴＳ無血清培地であり得る。

【図３１】



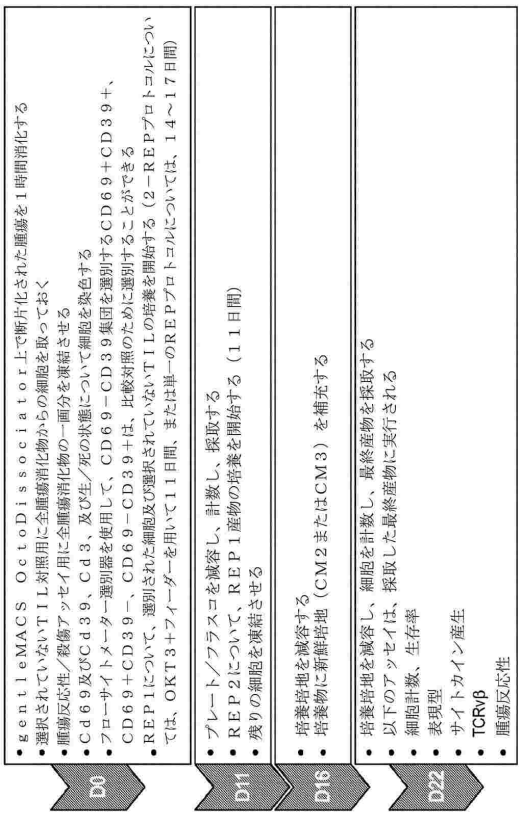
【図３２】

ステップ	Ｇｅｎ３プロセス－最適化
０日目　腫瘍 単離及び活性化	２４０個以下の断片 ６０個以下の断片／フラスコ ４つ以下のフラスコ ２Ｌ以下の培地（５００ｍＬ／フラスコ） **IL-2 (6000IU/mL)** ２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞／フラスコ １５ｕｇのＯＫＴ３／フラスコ
７～８日目 再活性化	ＲＥＰに指向した新鮮なＴＩＬ 培養物全体を活性化する ５×１０^{8}個のフィーダー細胞 ３０ｕｇ　ＯＫＴ３／フラスコ Ｇ－Ｒｅｘ１００ＭＣＳ ５００ｍｌの培地＋ＩＬ－２（６０００ＩＵ／ｍＬ）を添加する
１０～１１日目 スケールアップまたは ＴＩＬ維代培養	４つ以下のＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ １ＬをＧＲＥＸ　１００ＭＣＳからＧＲＥＸ　５０ＭＣＳに移して培養物全体をスケールアップし、４Ｌの培地＋ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）／フラスコを添加する
１６～１７日目： 採取	採取 ＬＯＶＯ自動細胞洗浄機 Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅ　１％　ＨＳＡで凍結保存：**CS10**

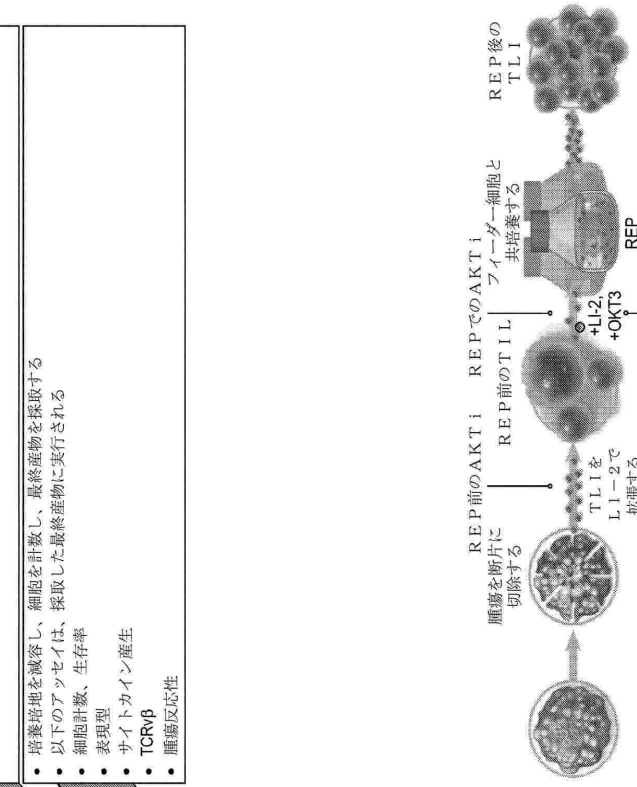
【図３３】

試験	承認基準	Ｇｅｎ３．１試験対 Ｇｅｎ３．０プロセス
細胞計数 (TVC)	Ｇｅｎ３．１＞３０％からプロセス Ｇｅｎ３．０	**Met**
生存率%	≧７０％の生存率	**Met**
免疫表現型決定 **(%CD3+/ %CD45+)**	Ｇｅｎ３．１とＧｅｎ３．０ プロセスとの間の≦５％の差	**Met**
ＩＦＮγ分泌	Ｇｅｎ３．１＞３０％からプロセス Ｇｅｎ３．０	**Met**

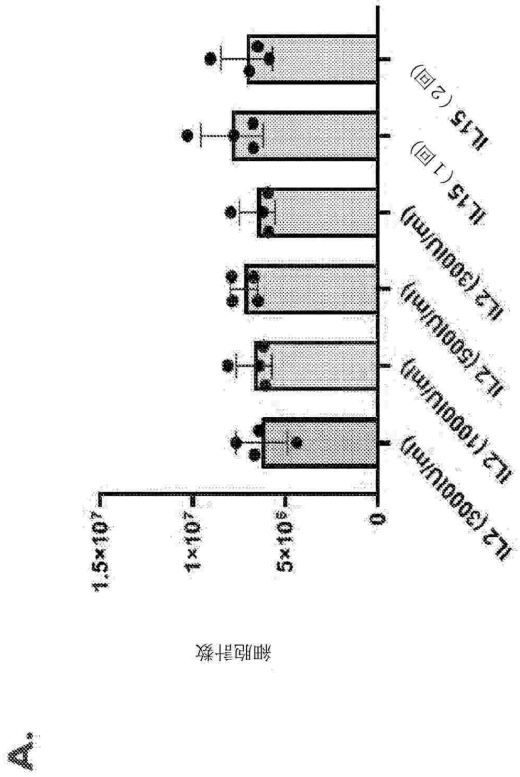
【図３４】



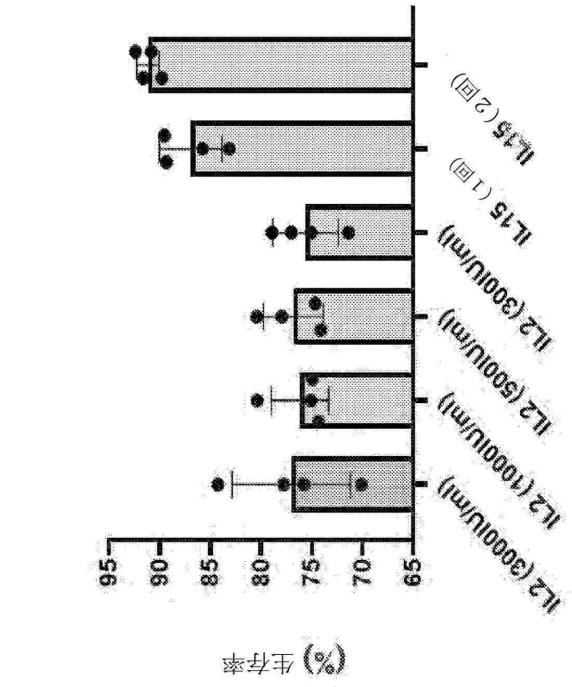
【図３５】



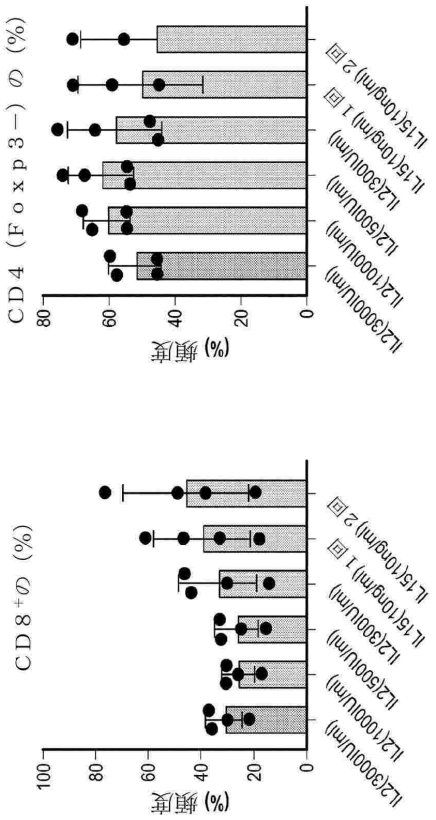
【図３６Ａ】



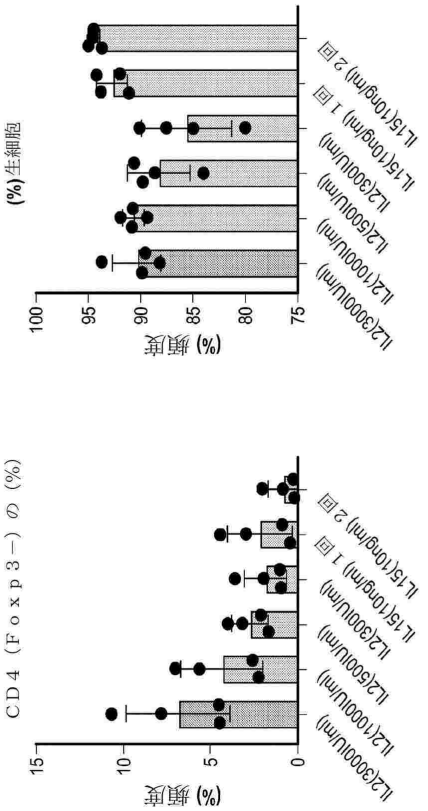
【図３６Ｂ】



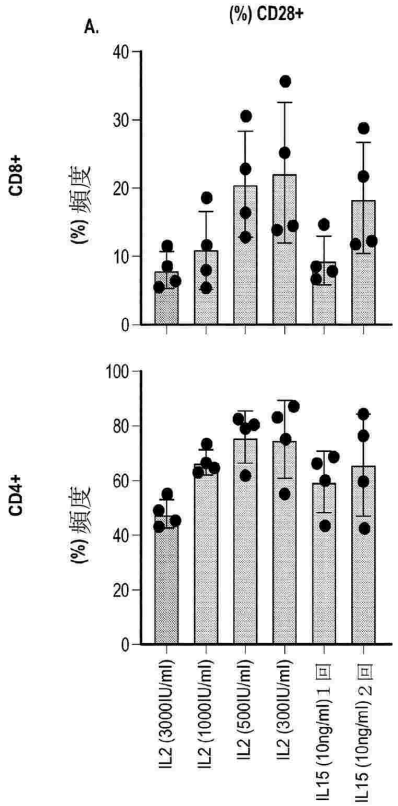
【図３７－１】



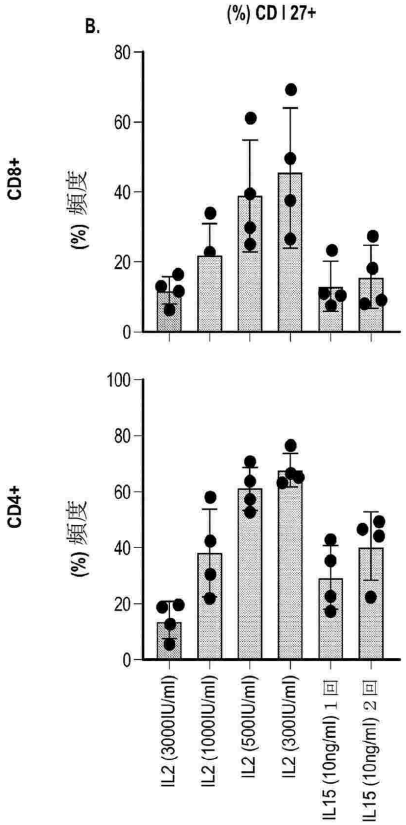
【図３７－２】



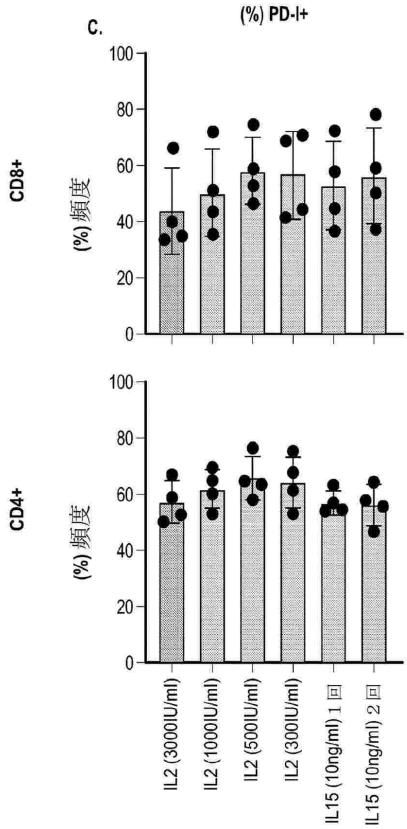
【図３８Ａ】



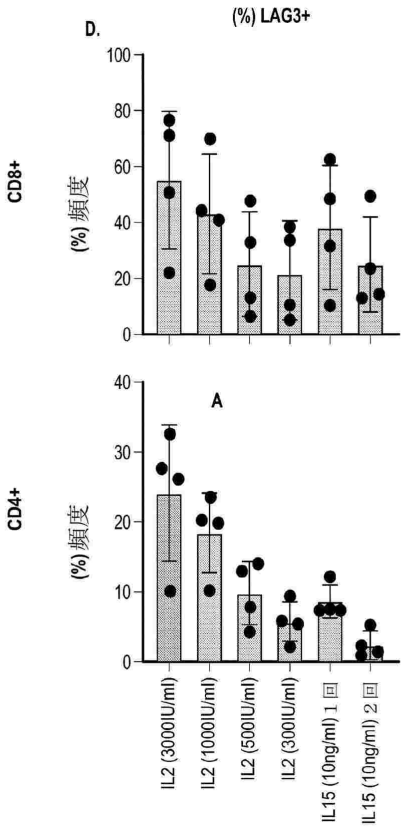
【図３８Ｂ】



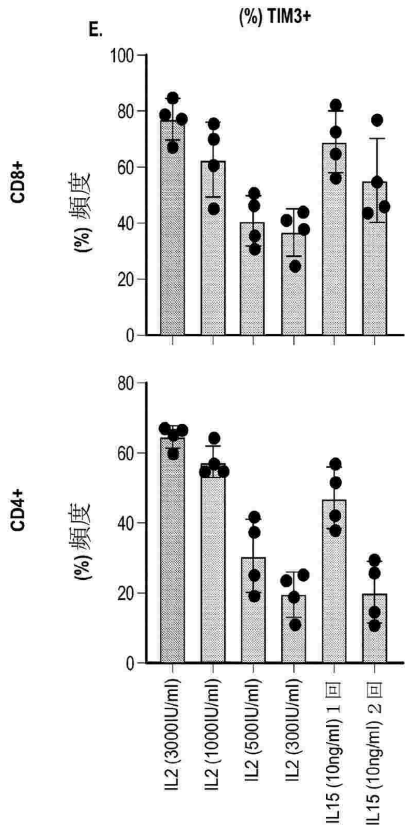
【図３８Ｃ】



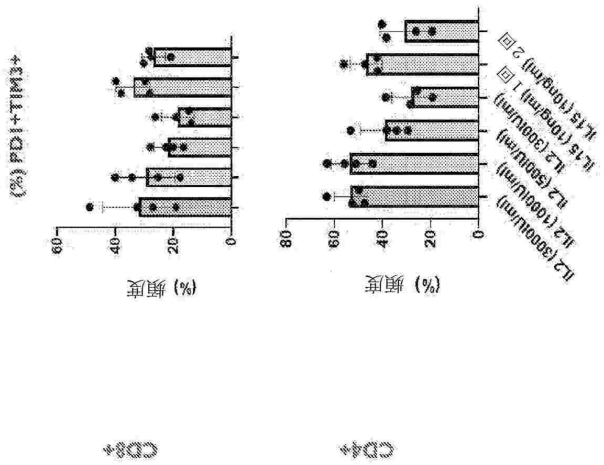
【図３８Ｄ】



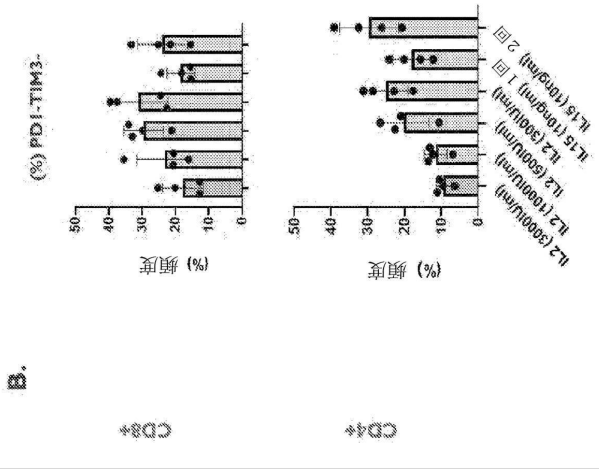
【図３８Ｅ】



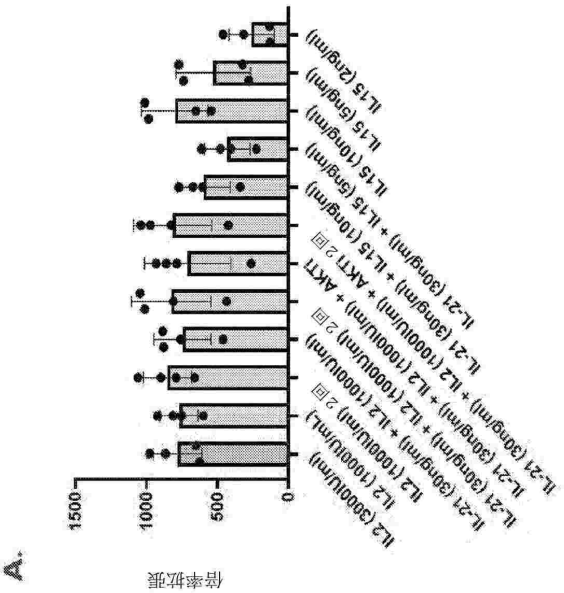
【図３９Ａ】



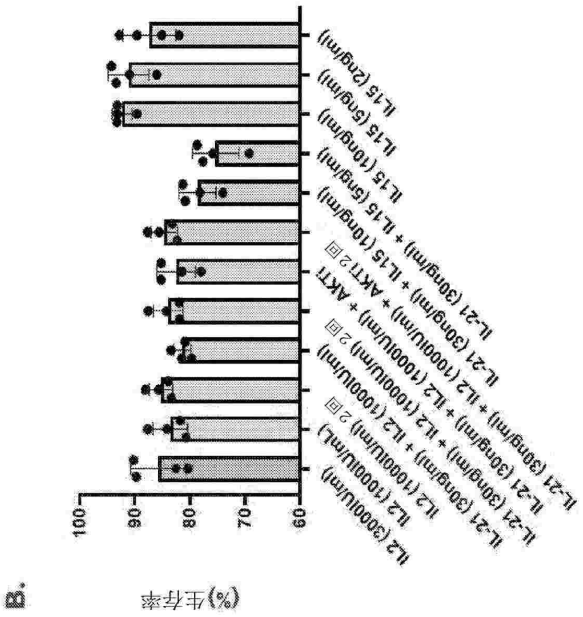
【図３９Ｂ】



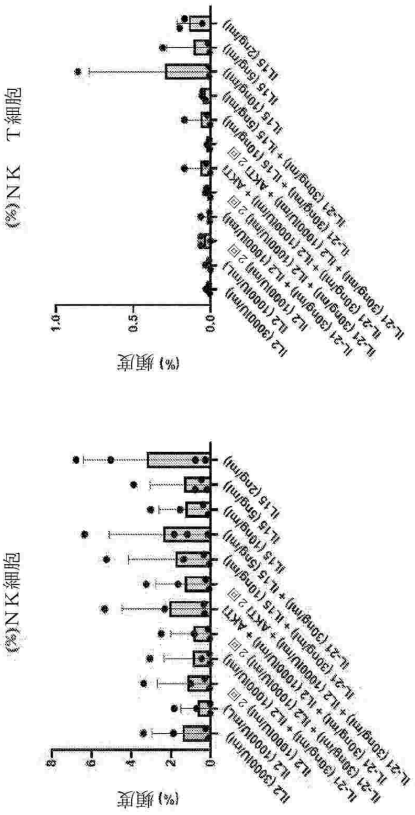
【図４０Ａ】



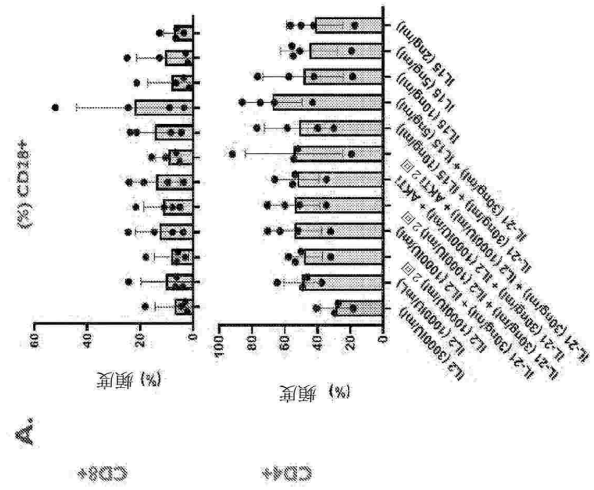
【図４０Ｂ】



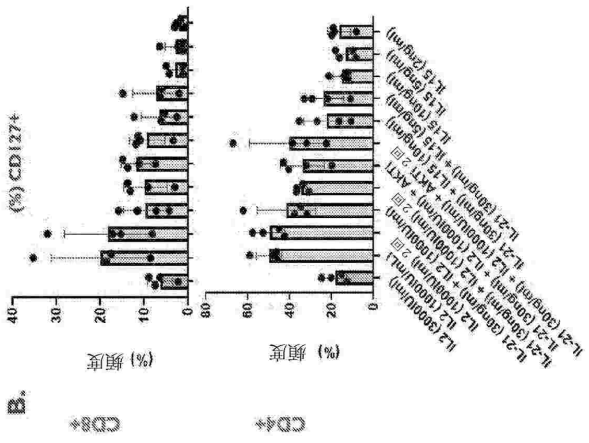
【図４１】



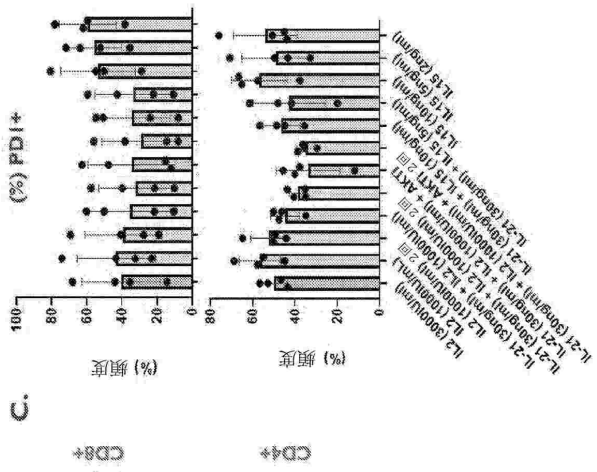
【図４２Ａ】



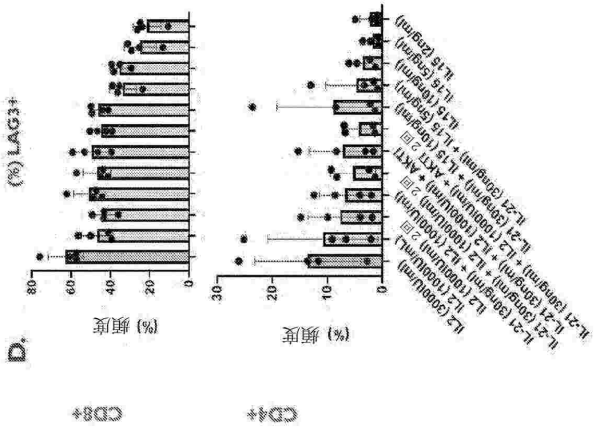
【図４２Ｂ】



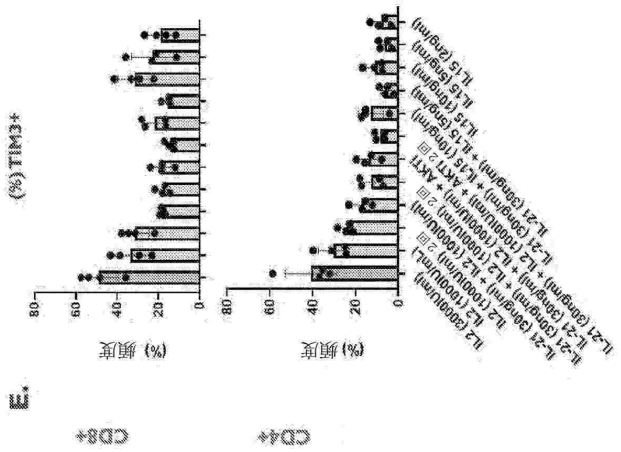
【図４２Ｃ】



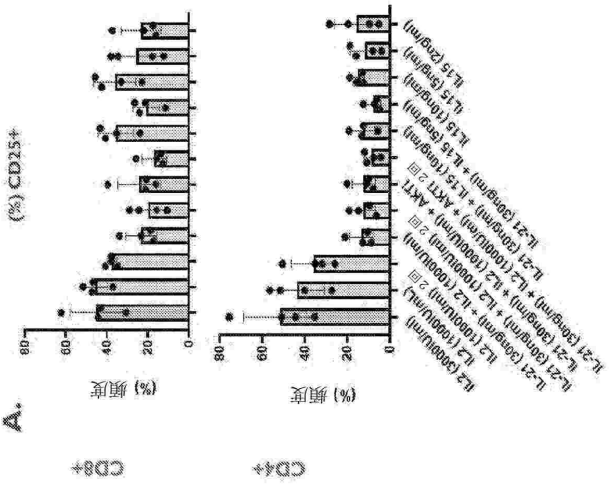
【図４２Ｄ】



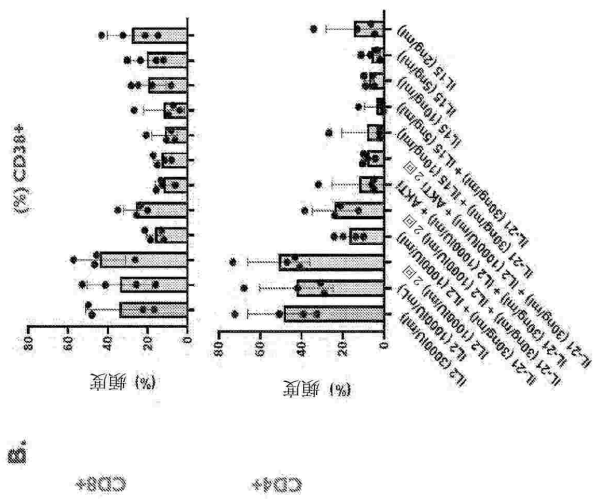
【図４２Ｅ】



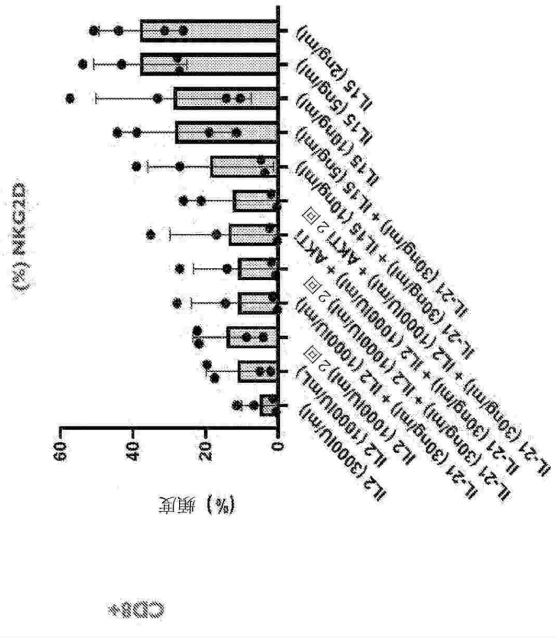
【図４３Ａ】



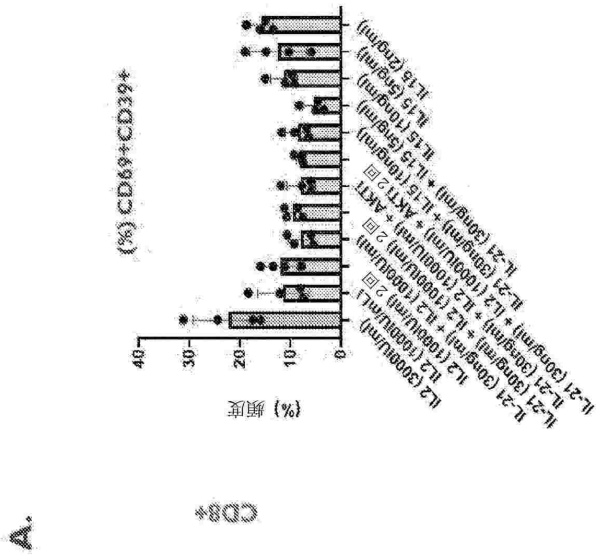
【図４３Ｂ】



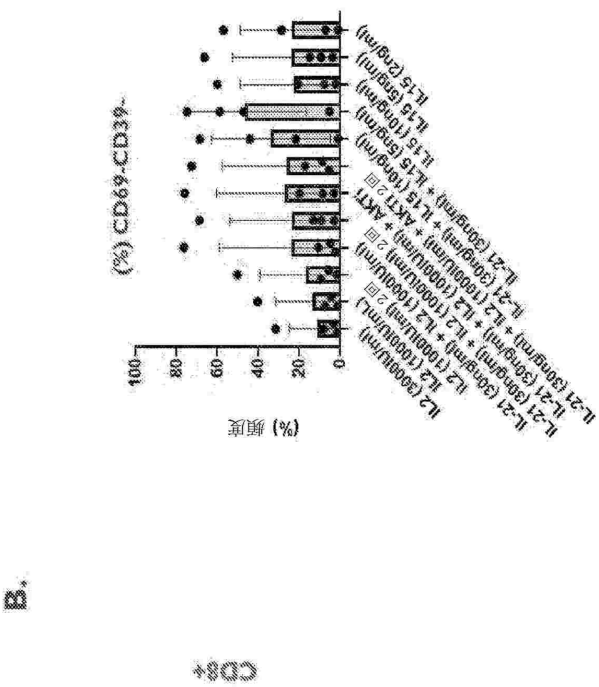
【図４３Ｃ】



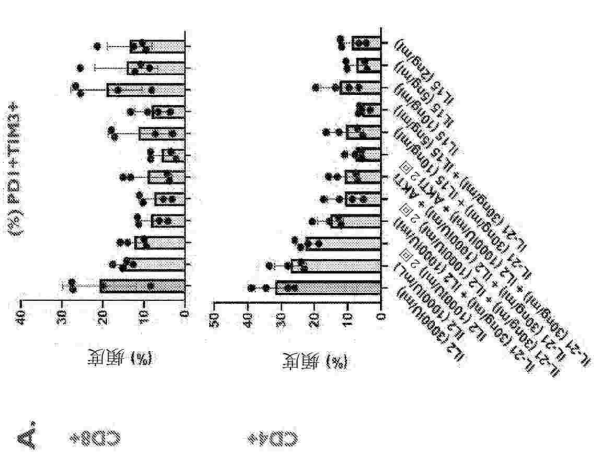
【図４４Ａ】



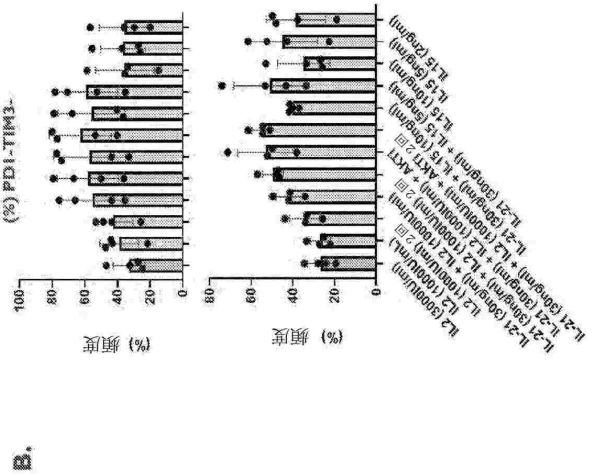
【図４４Ｂ】



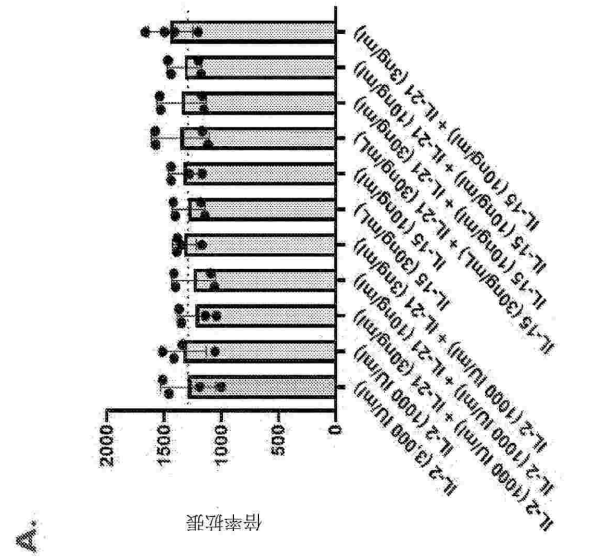
【図４５Ａ】



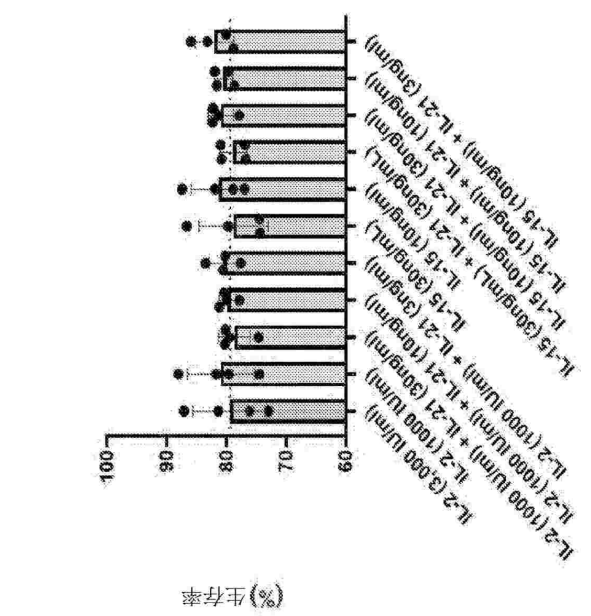
【図４５Ｂ】



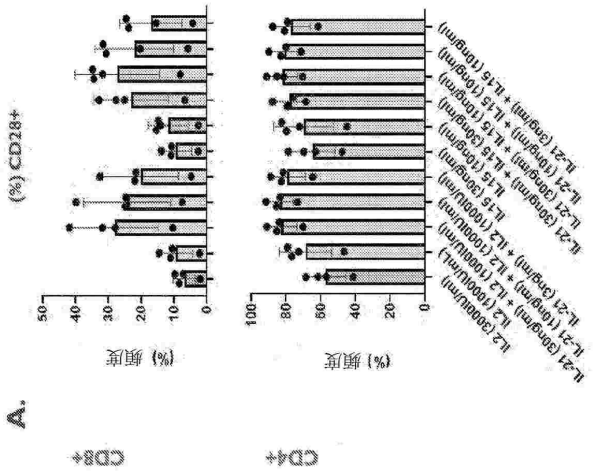
【図４６Ａ】



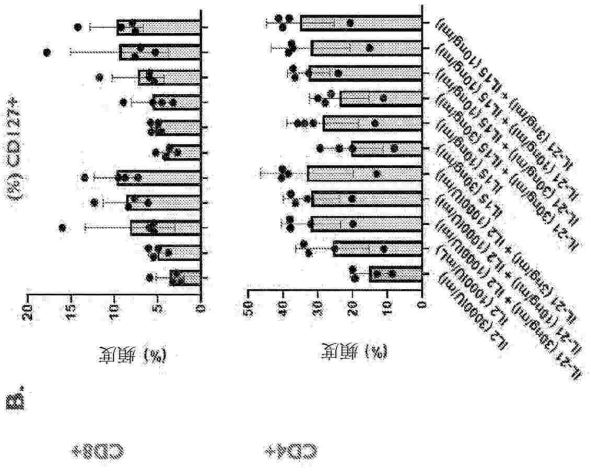
【図４６Ｂ】



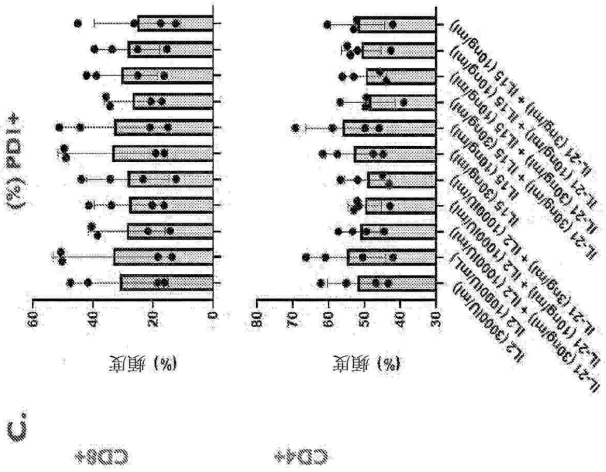
【図４７Ａ】



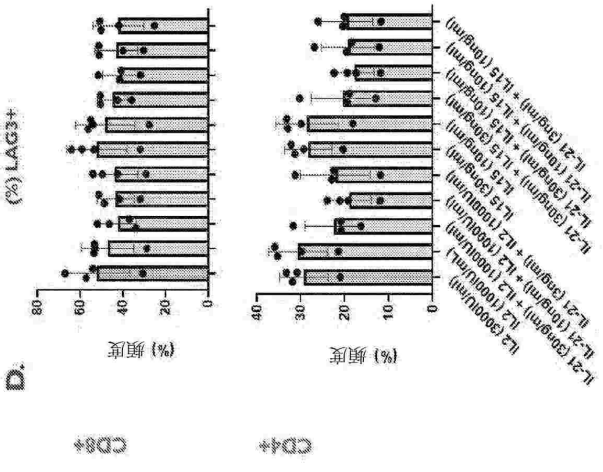
【図４７Ｂ】



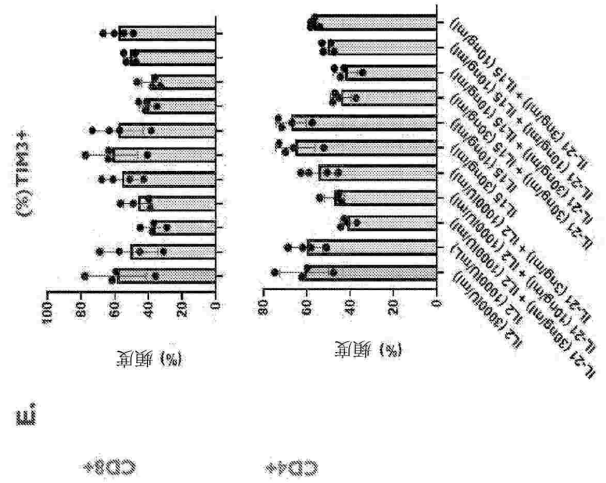
【図４７Ｃ】



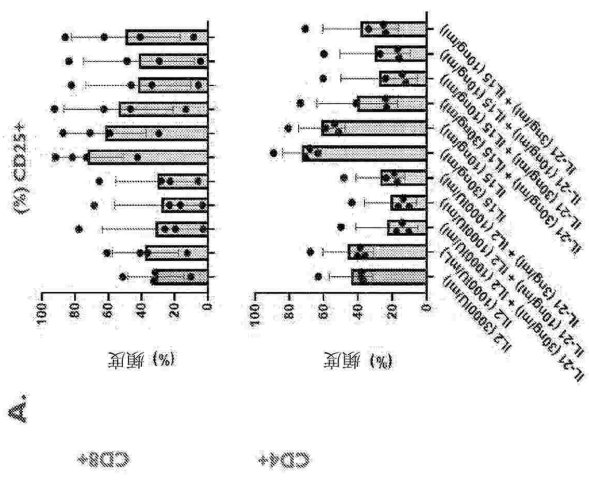
【図４７Ｄ】



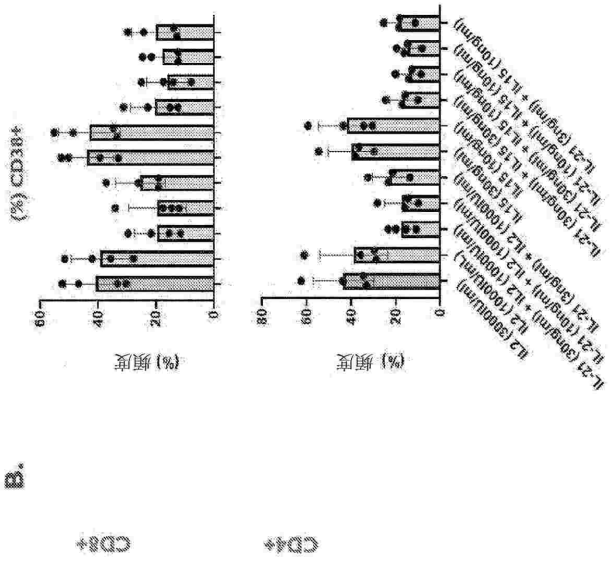
【図４７Ｅ】



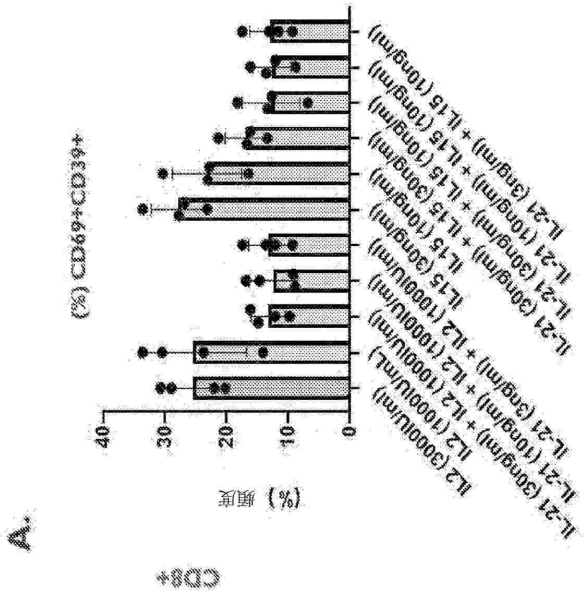
【図４８Ａ】



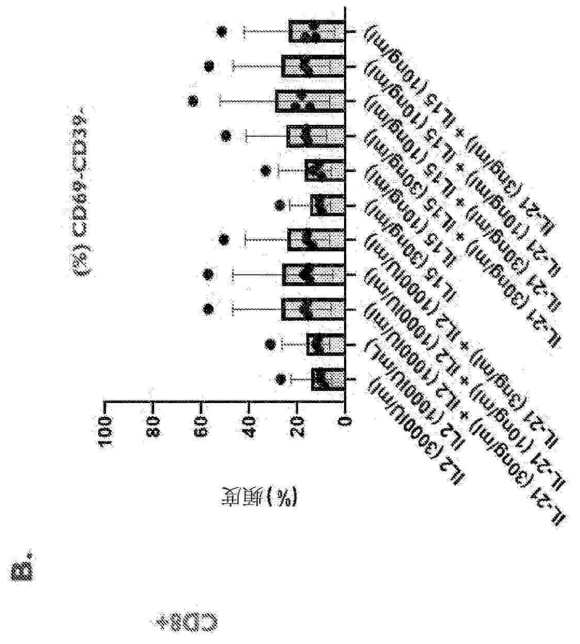
【図４８Ｂ】



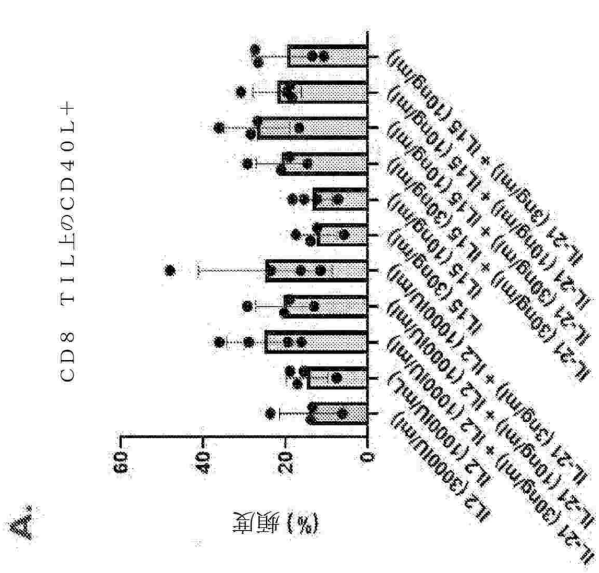
【図４９Ａ】



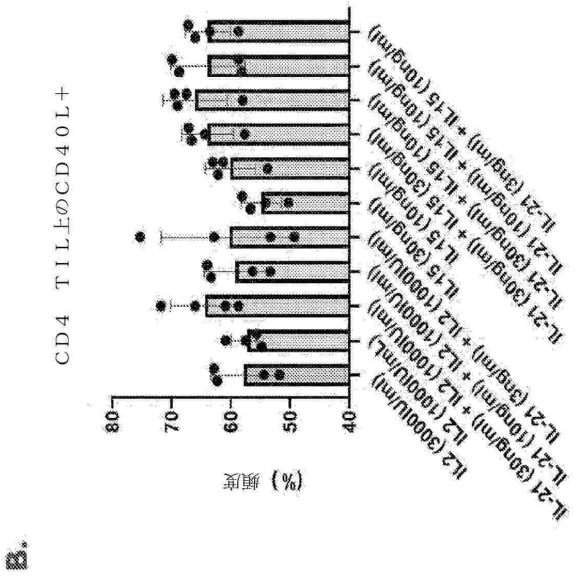
【図４９Ｂ】



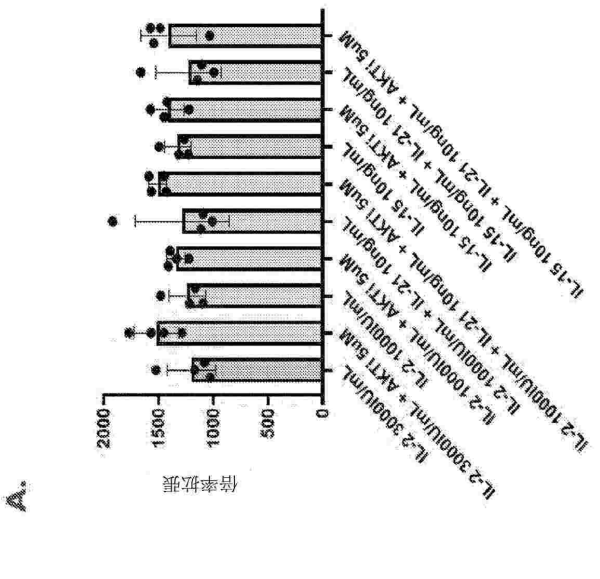
【図５０Ａ】



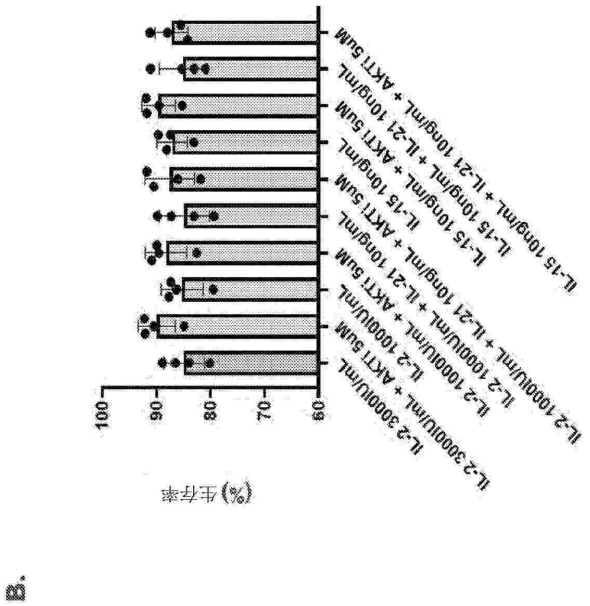
【図５０Ｂ】



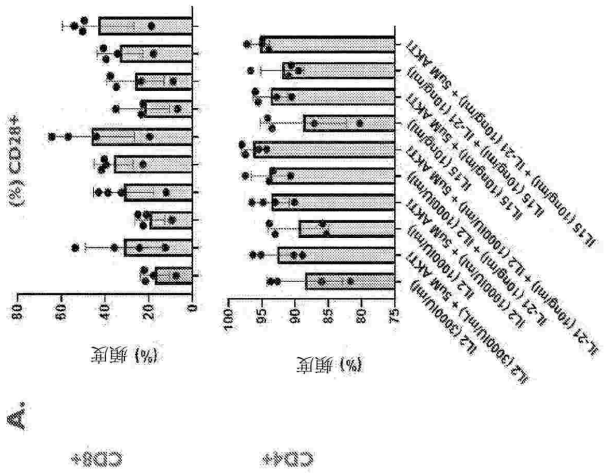
【図５１Ａ】



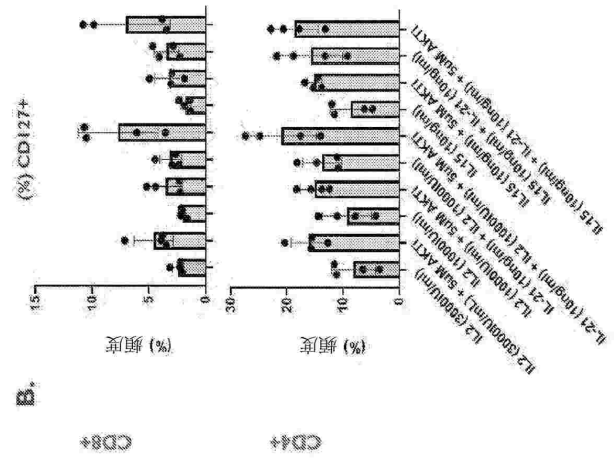
【図５１Ｂ】



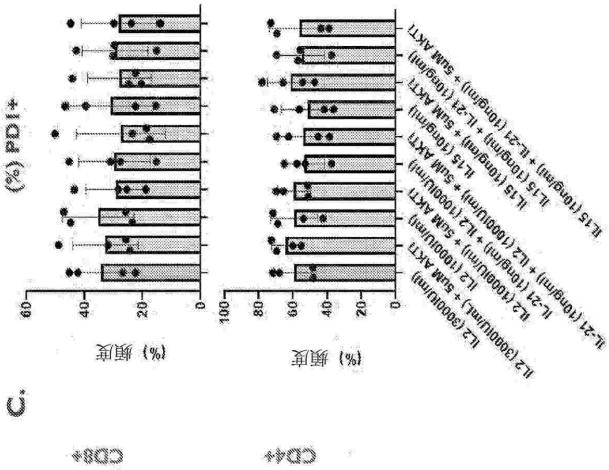
【図５２Ａ】



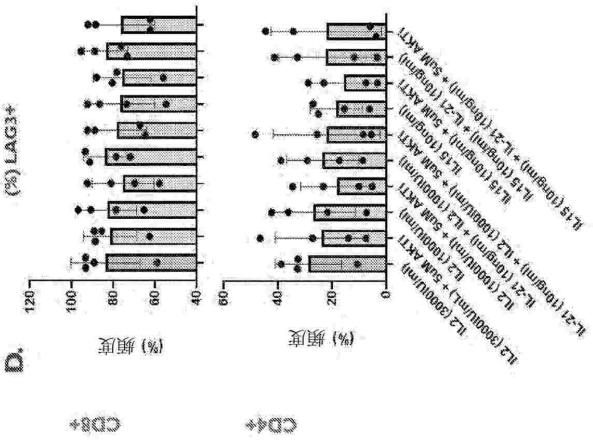
【図５２Ｂ】



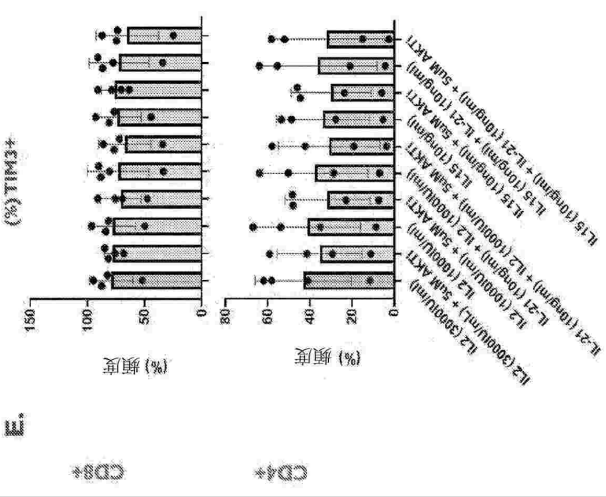
【図５２Ｃ】



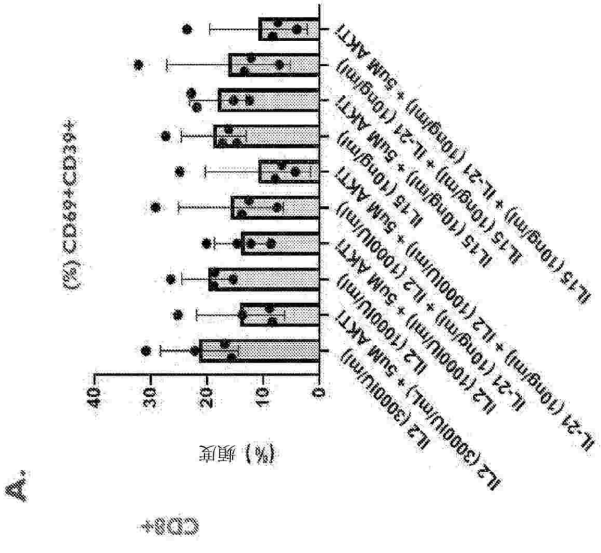
【図５２Ｄ】



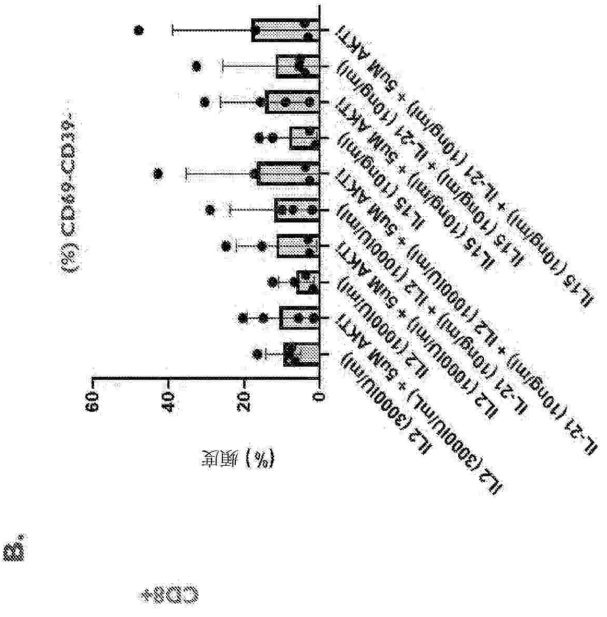
【図５２Ｅ】



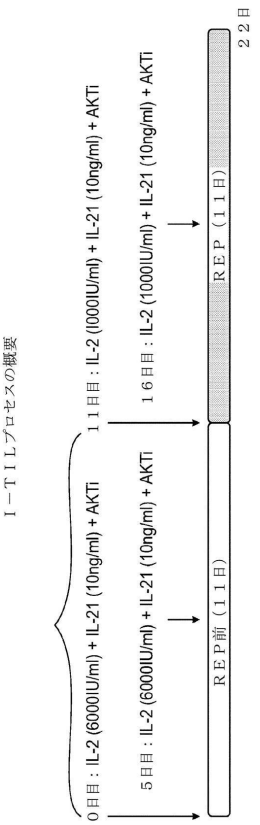
【図５３Ａ】



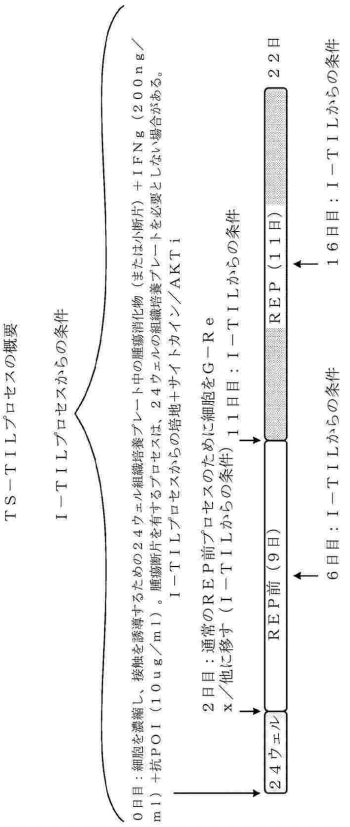
【図５３Ｂ】



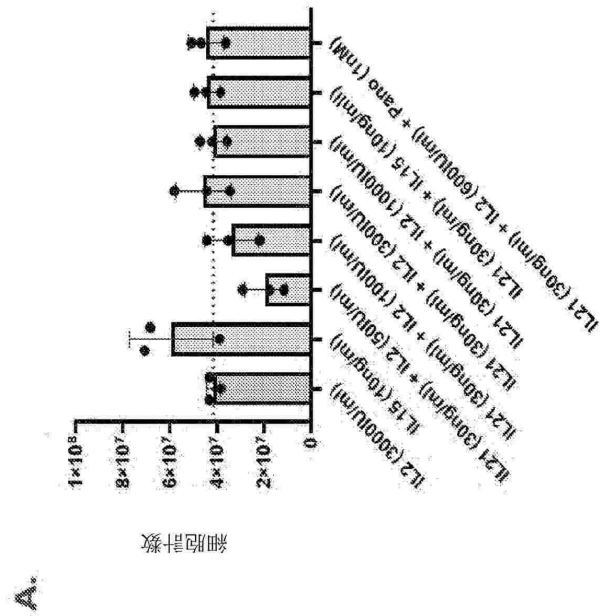
【図５４】



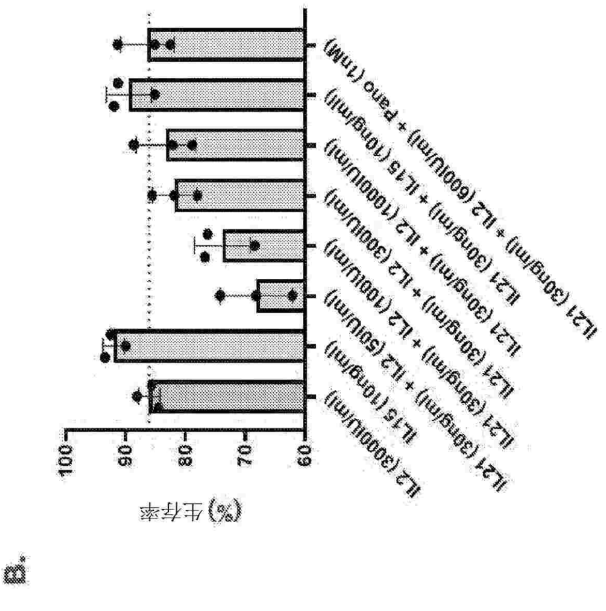
【図５５】



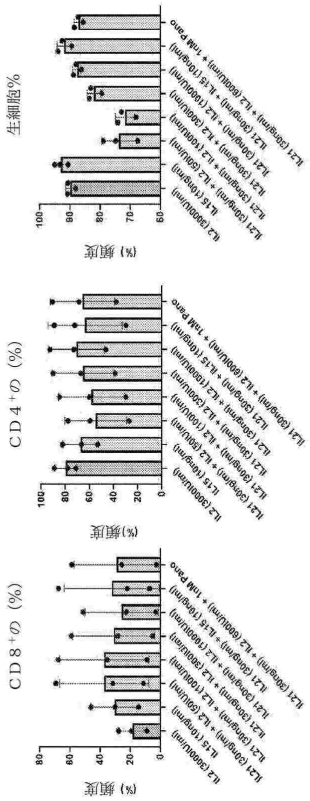
【図５６Ａ】



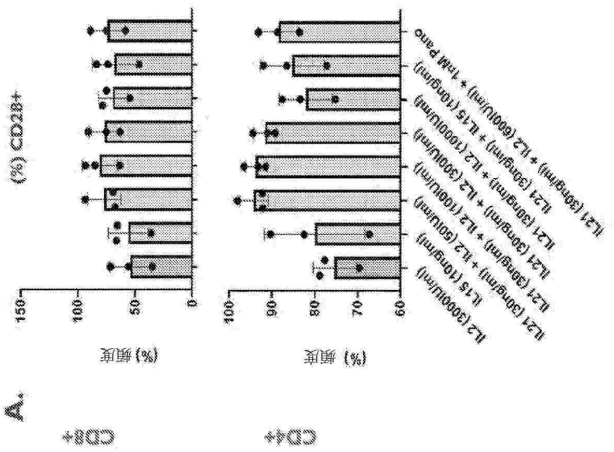
【図５６Ｂ】



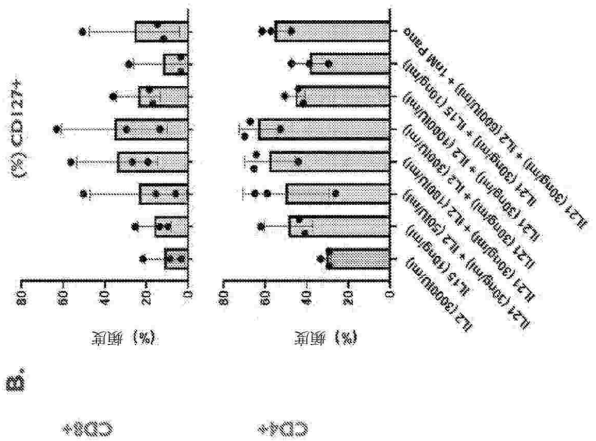
【図５７】



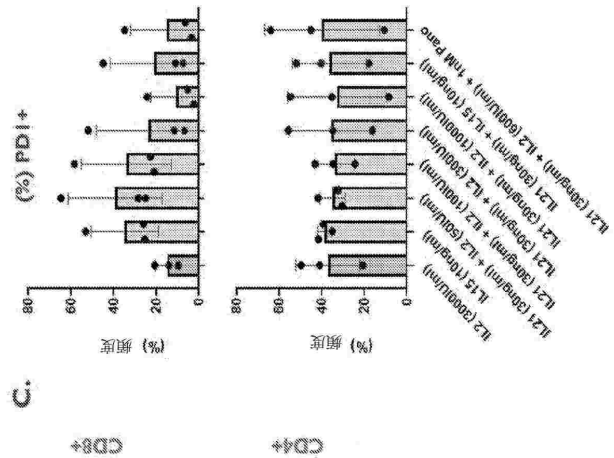
【図５８Ａ】



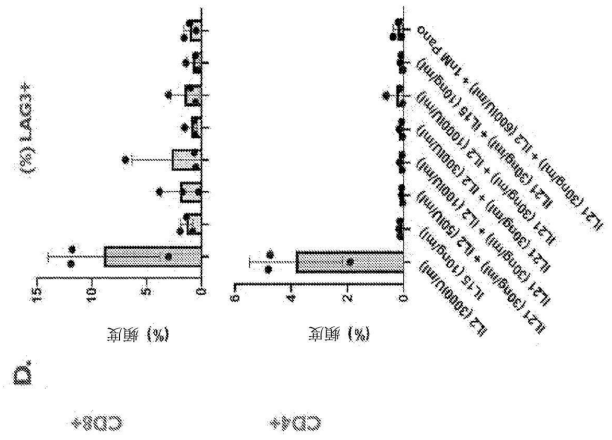
【図５８Ｂ】



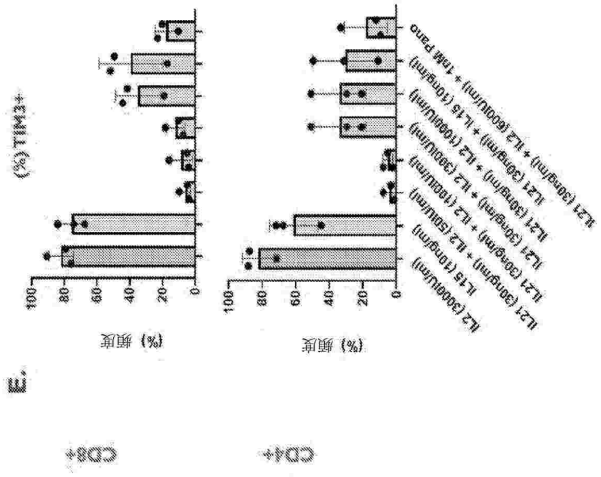
【図５８Ｃ】



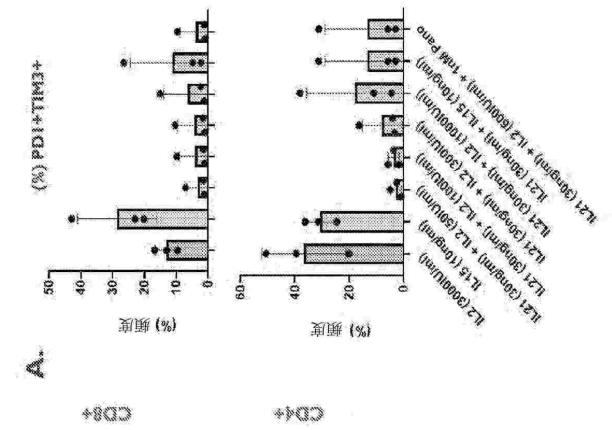
【図５８Ｄ】



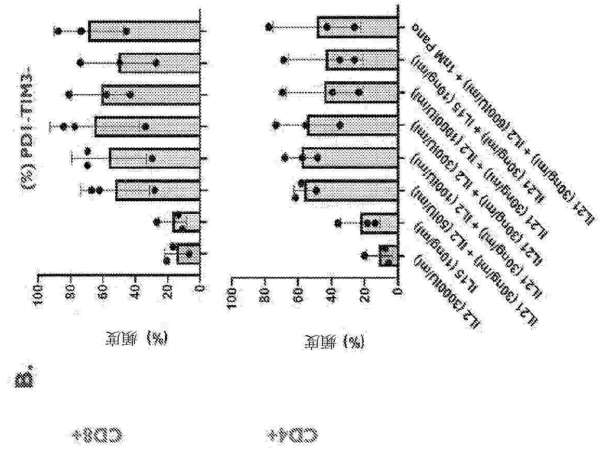
【図５８Ｅ】



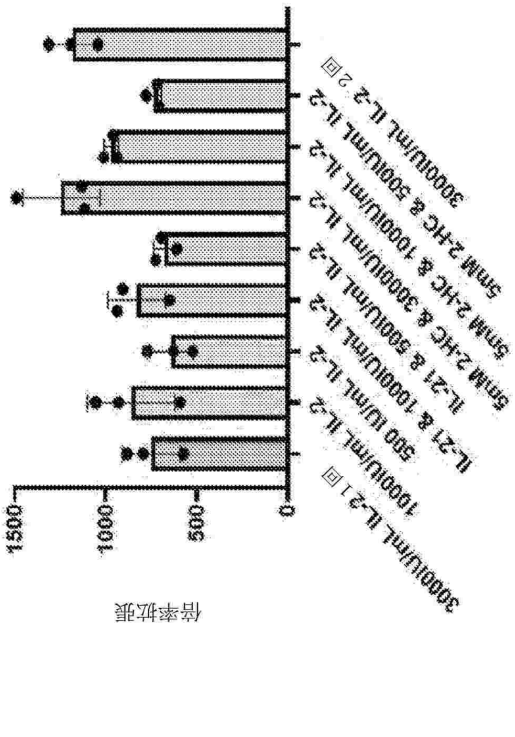
【図５９Ａ】



【図５９Ｂ】

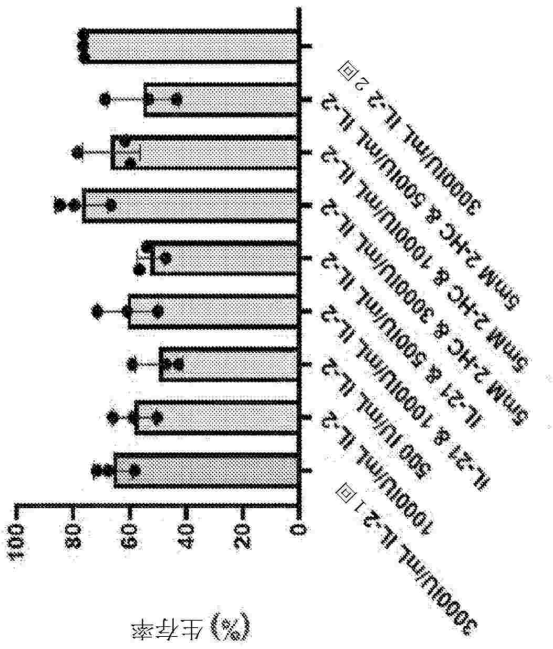


【図６０Ａ】



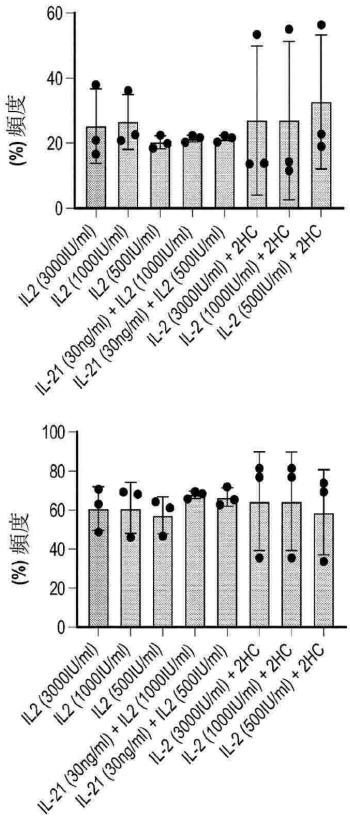
A.

【図６０Ｂ】

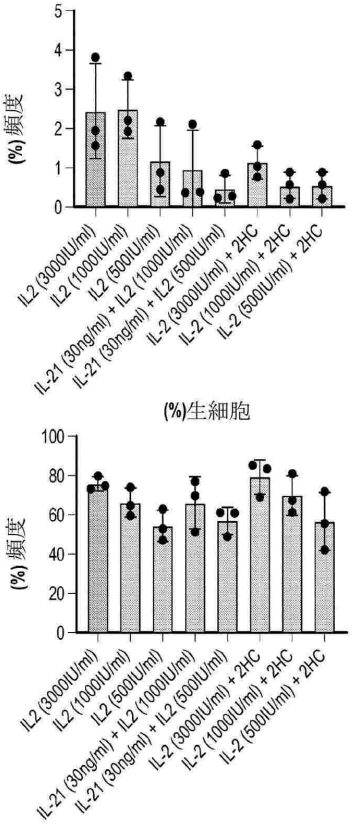


B.

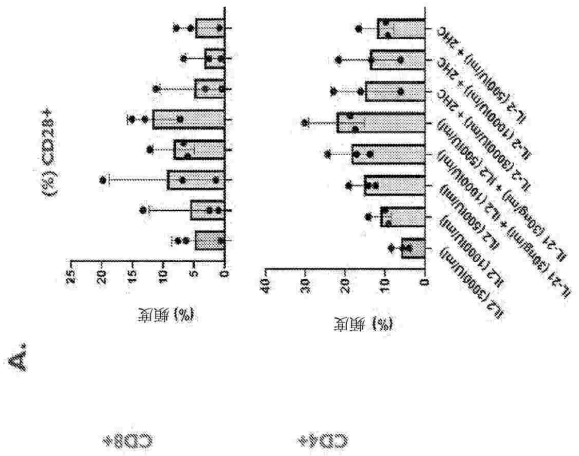
【図６１－１】



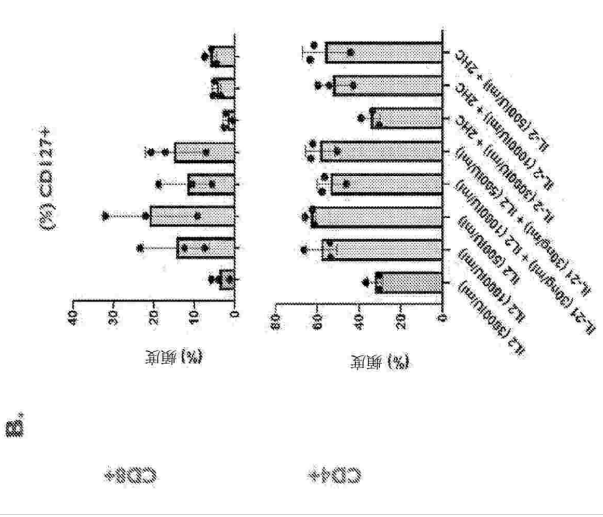
【図６１－２】



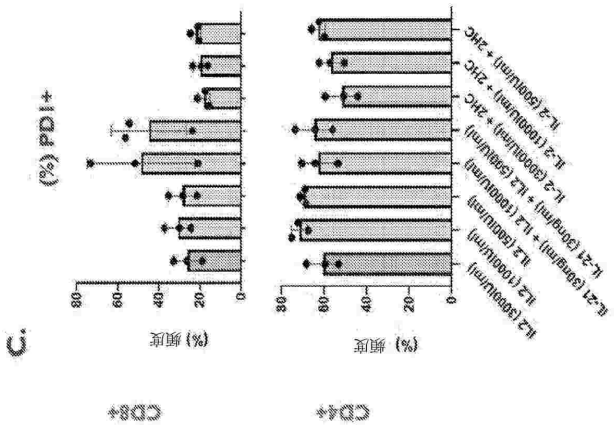
【図６２Ａ】



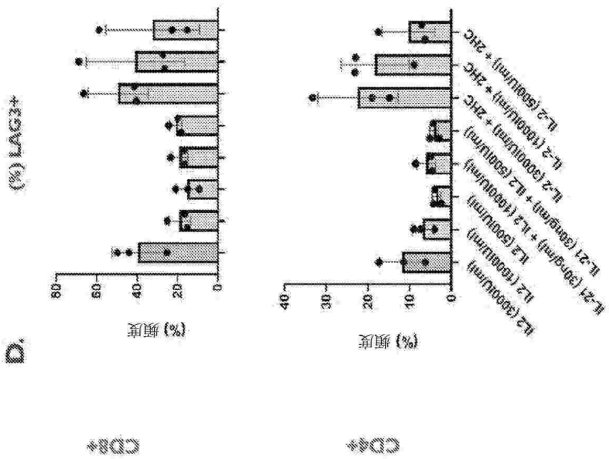
【図６２Ｂ】



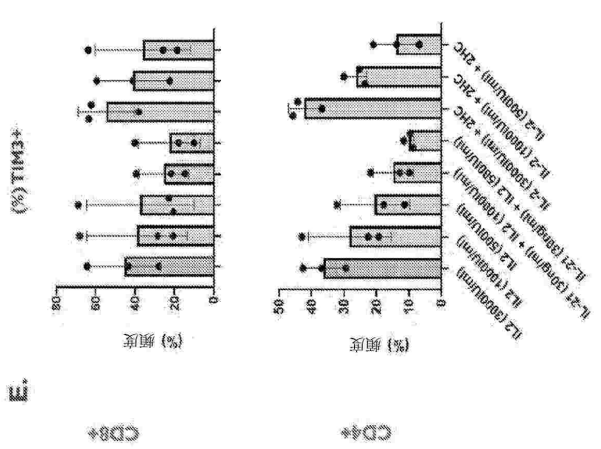
【図６２Ｃ】



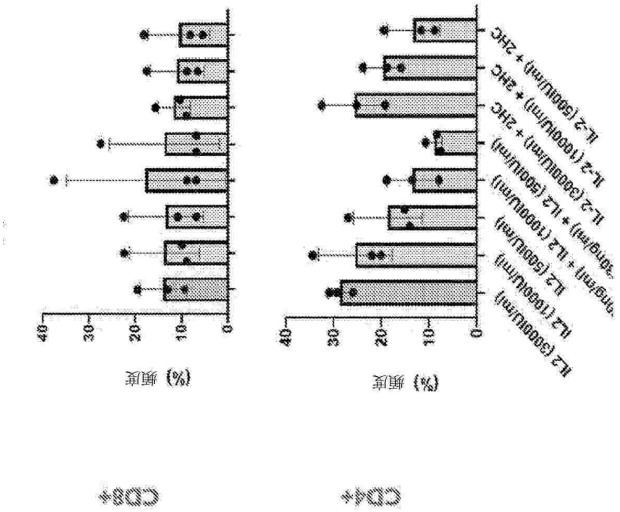
【図６２Ｄ】



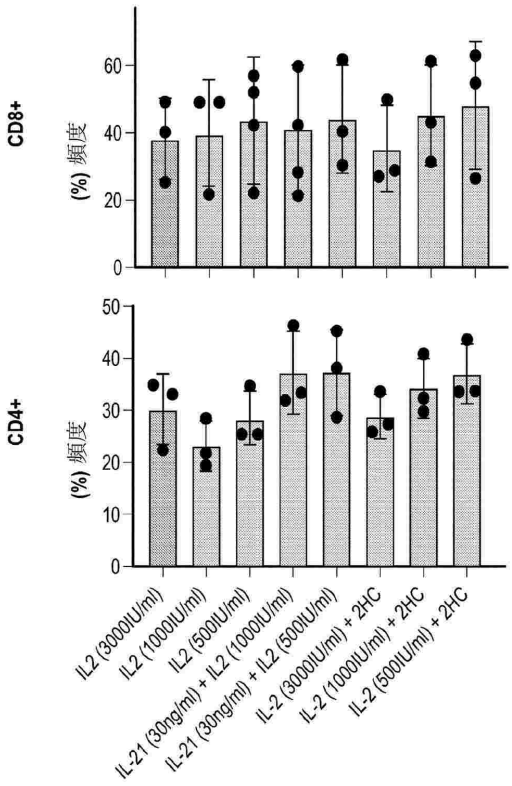
【図６２Ｅ】



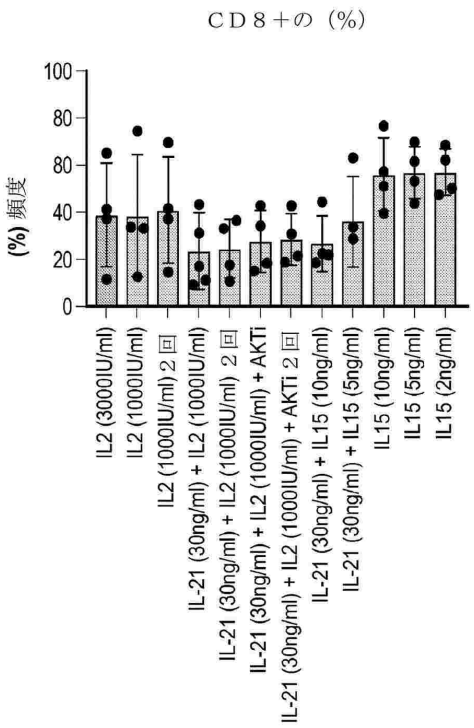
【図６３Ａ】



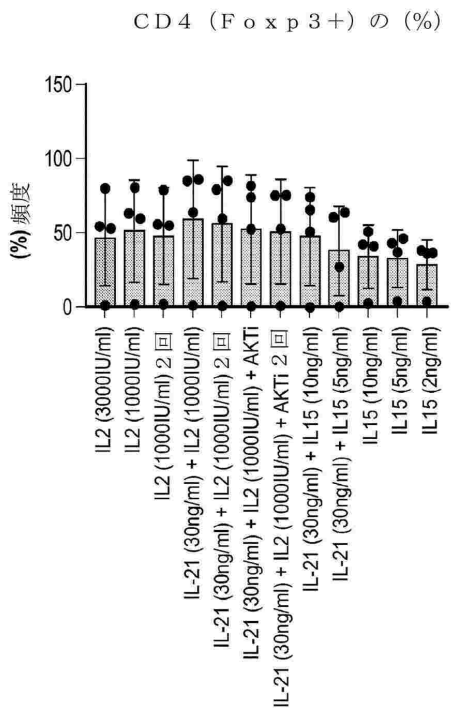
【図６３Ｂ】



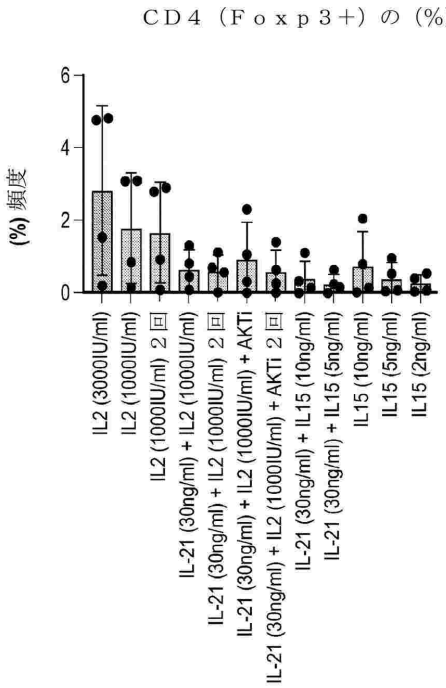
【図６４－１】



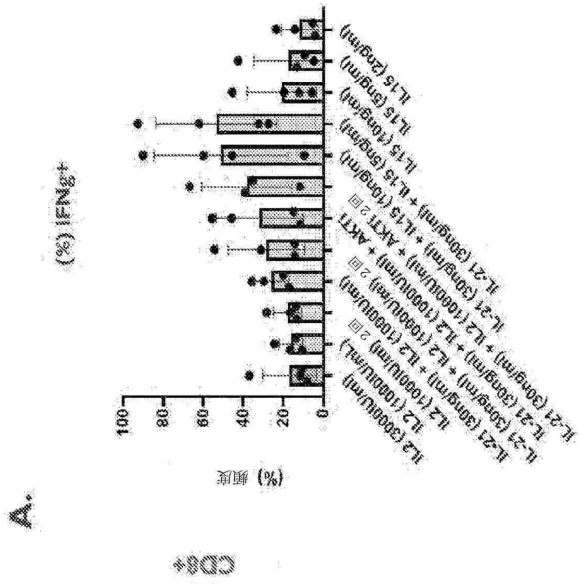
【図６４－２】



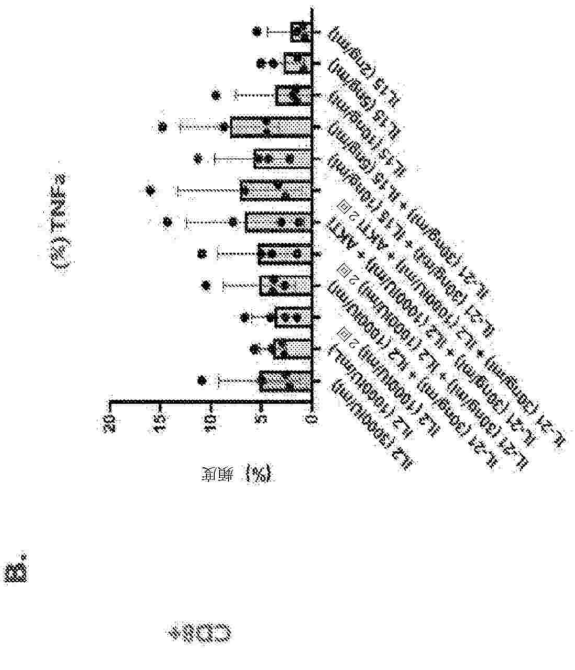
【図６４－３】



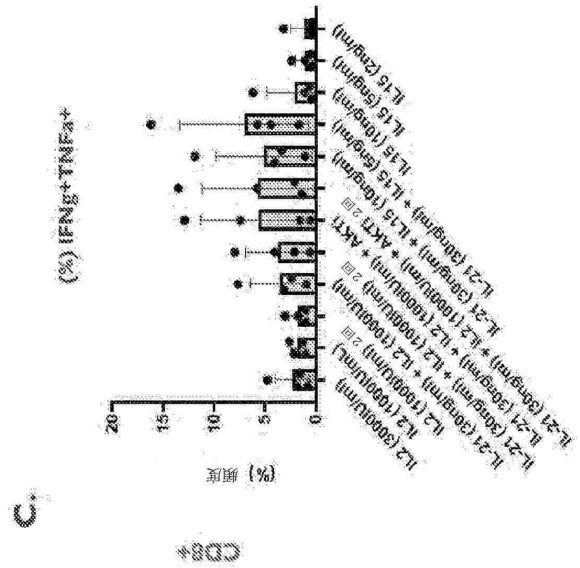
【図６５Ａ】



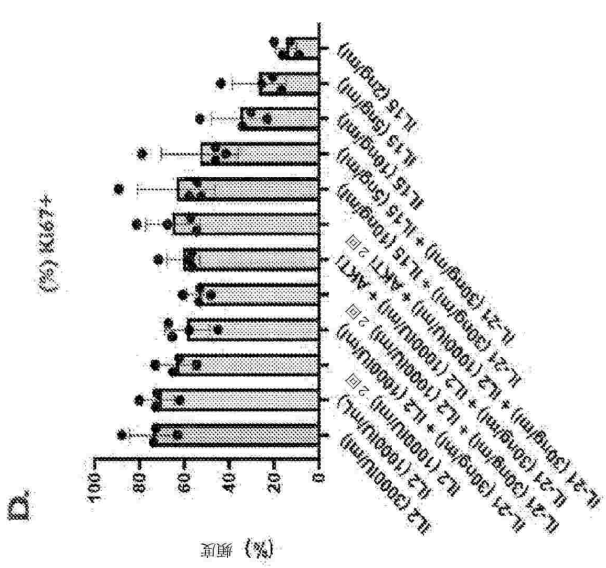
【図６５Ｂ】



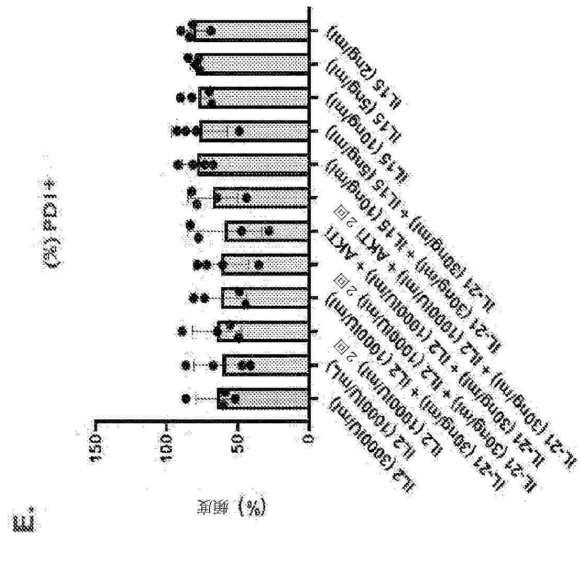
【図６５Ｃ】



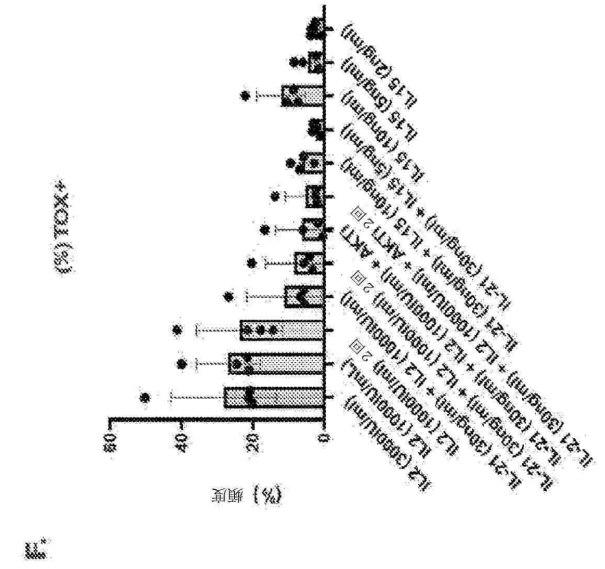
【図６５Ｄ】



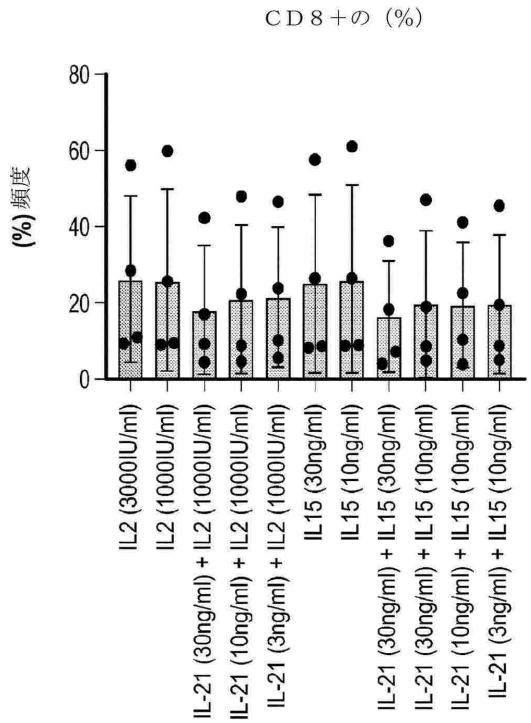
【図６５Ｅ】



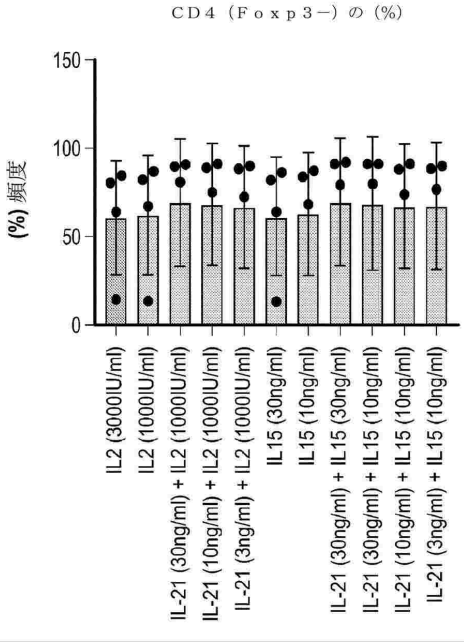
【図６５Ｆ】



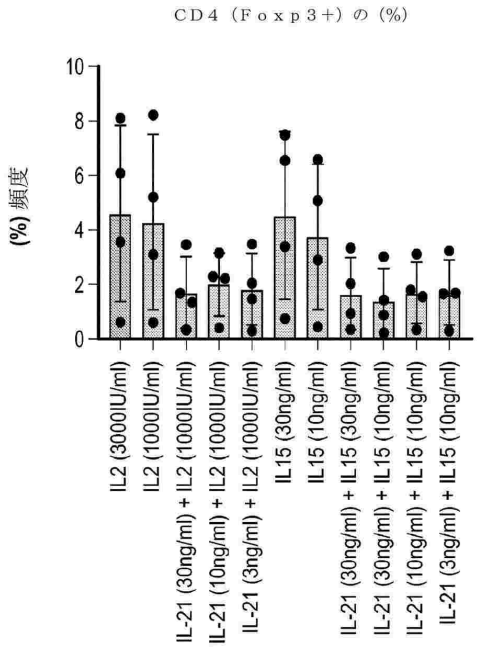
【図６６－１】



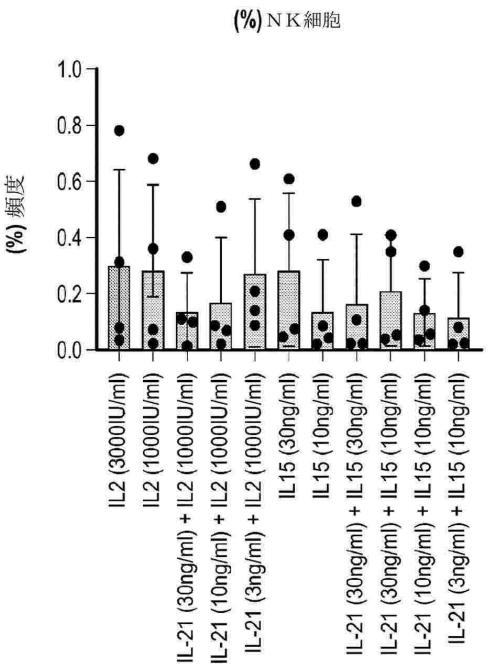
【図６６－２】



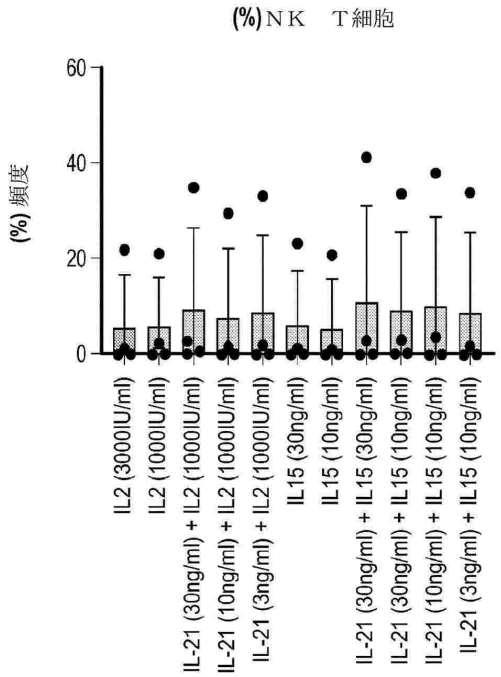
【図６６－３】



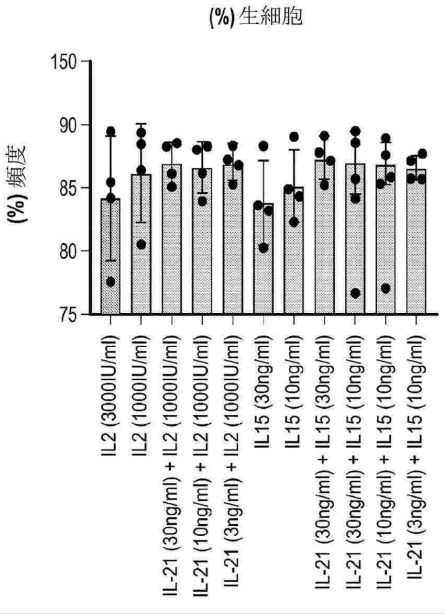
【図６６－４】



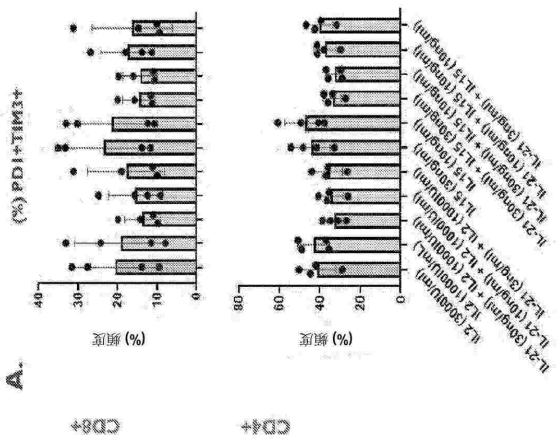
【図６６－５】



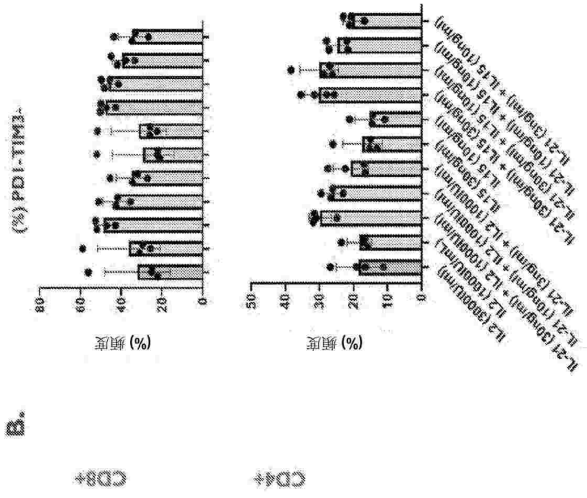
【図６６－６】



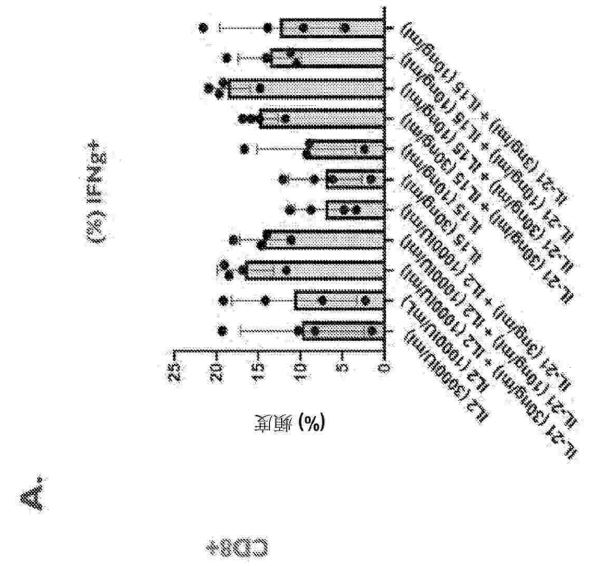
【図６７Ａ】



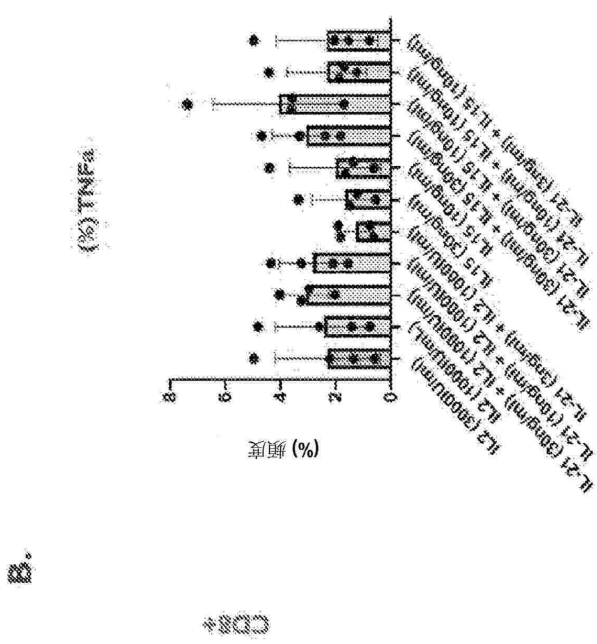
【図６７Ｂ】



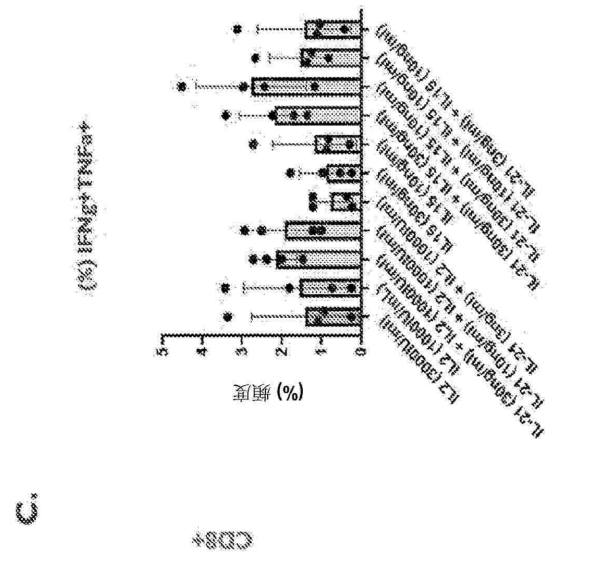
【図６８Ａ】



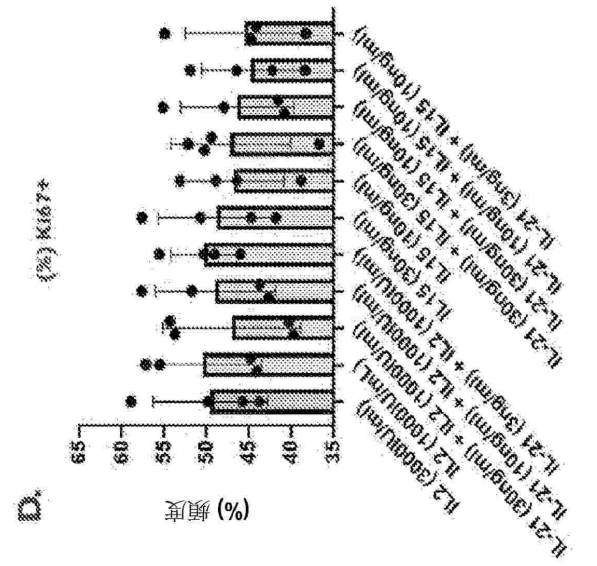
【図６８Ｂ】



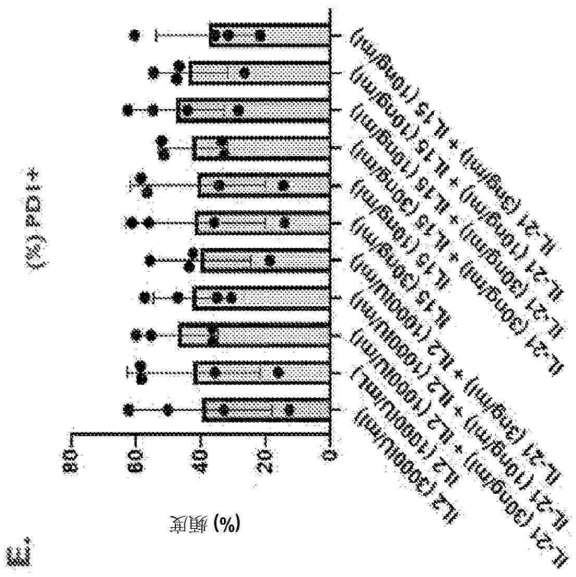
【図６８Ｃ】



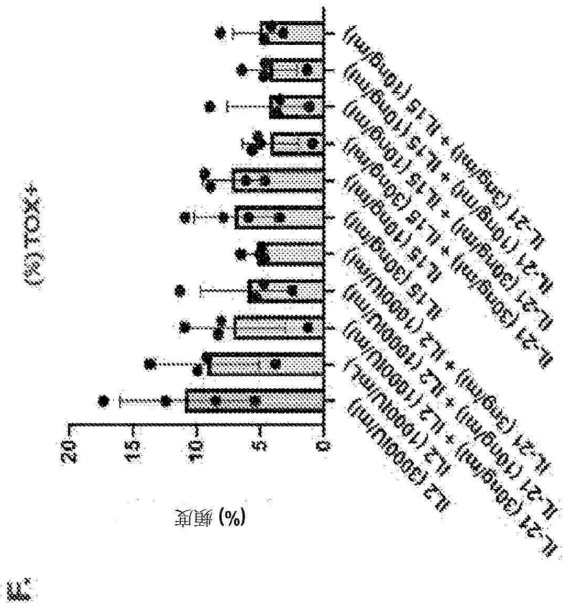
【図６８Ｄ】



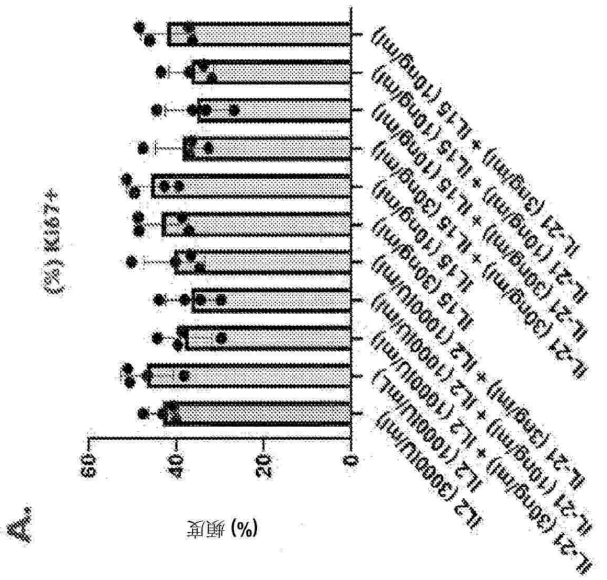
【図６８Ｅ】



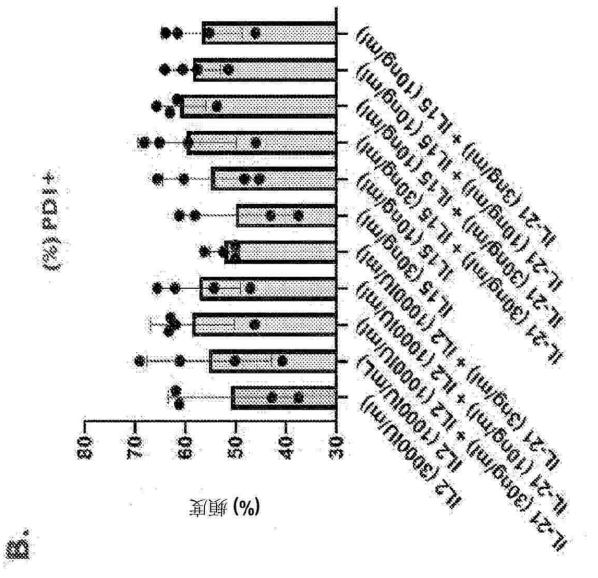
【図６８Ｆ】



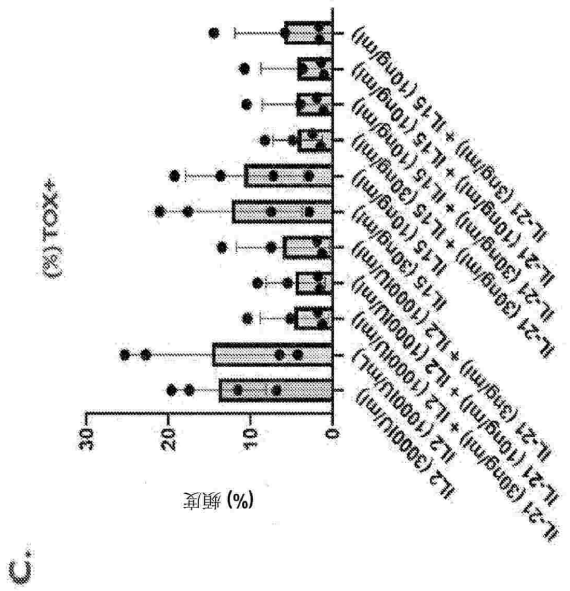
【図６９Ａ】



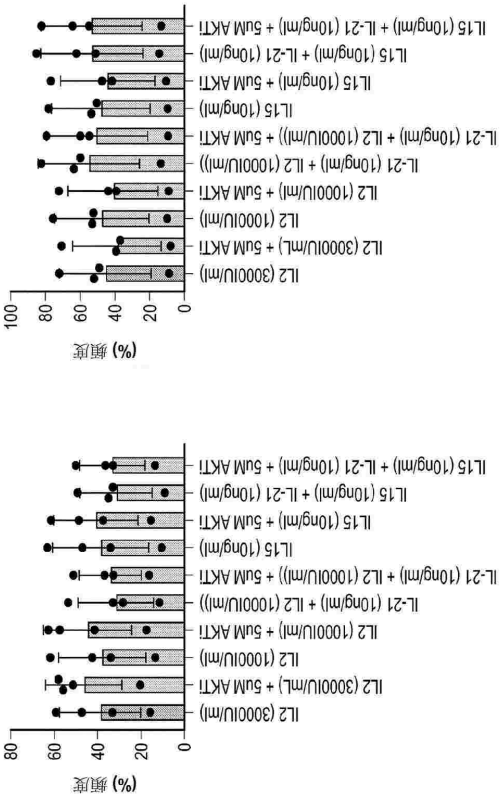
【図６９Ｂ】



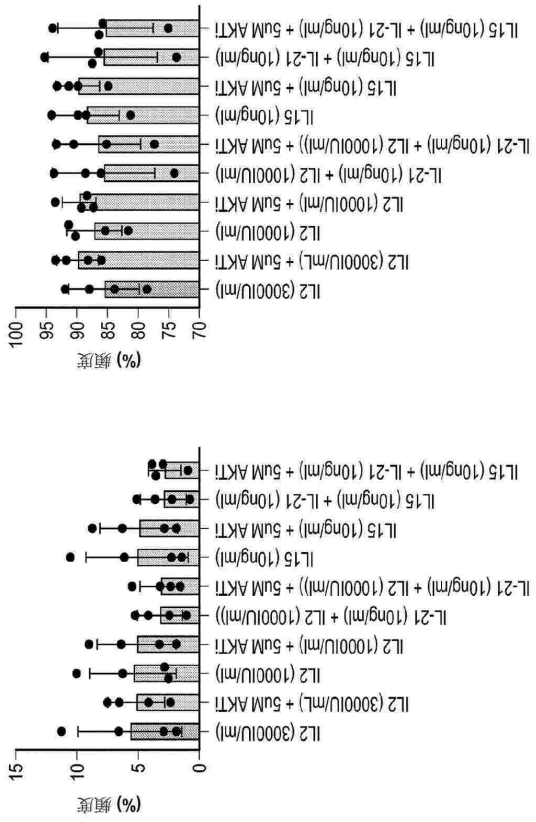
【図６９Ｃ】



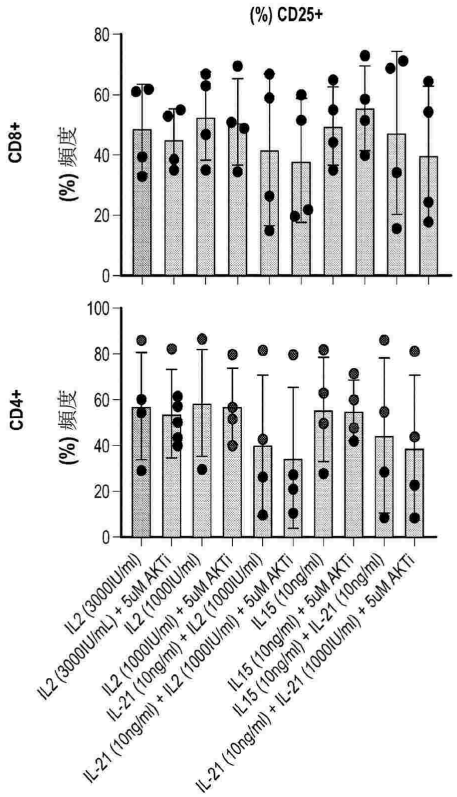
【図７０－１】



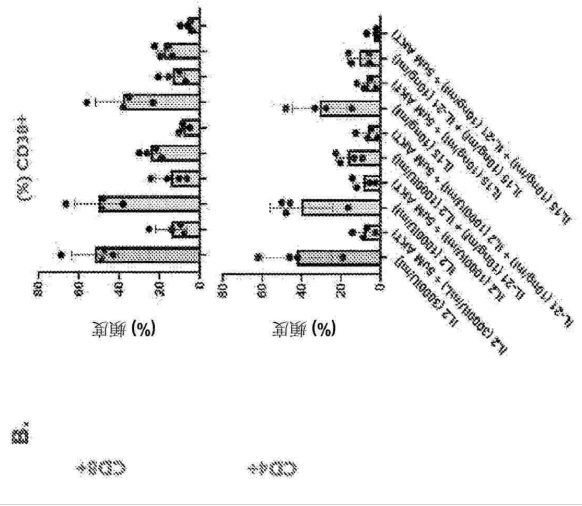
【図７０－２】



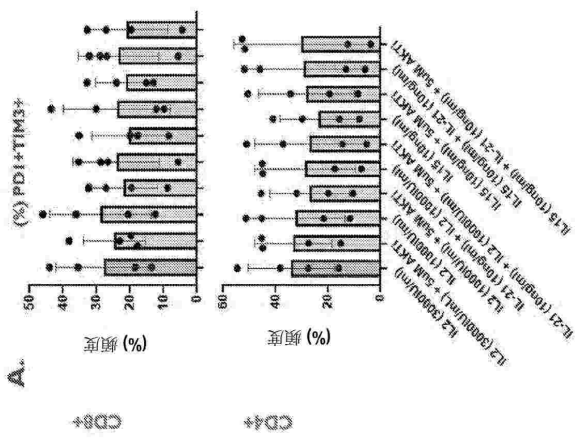
【図７１Ａ】



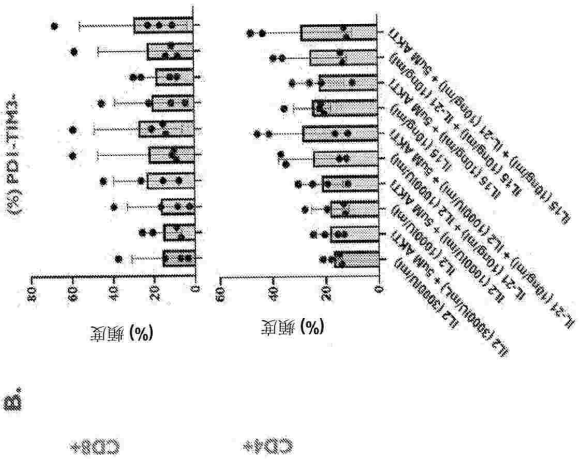
【図７１Ｂ】



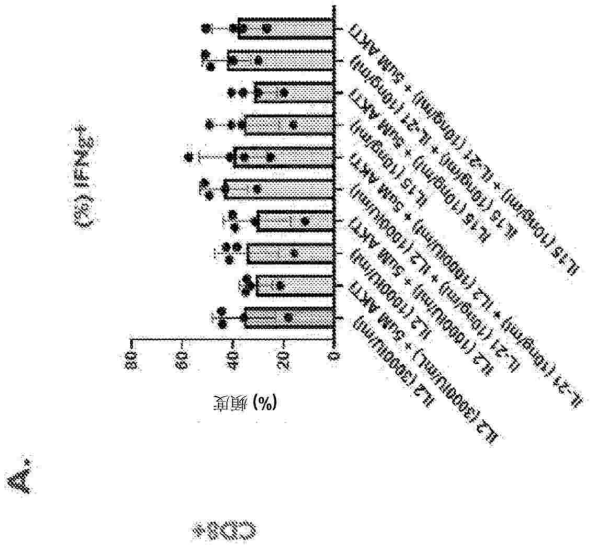
【図７２Ａ】



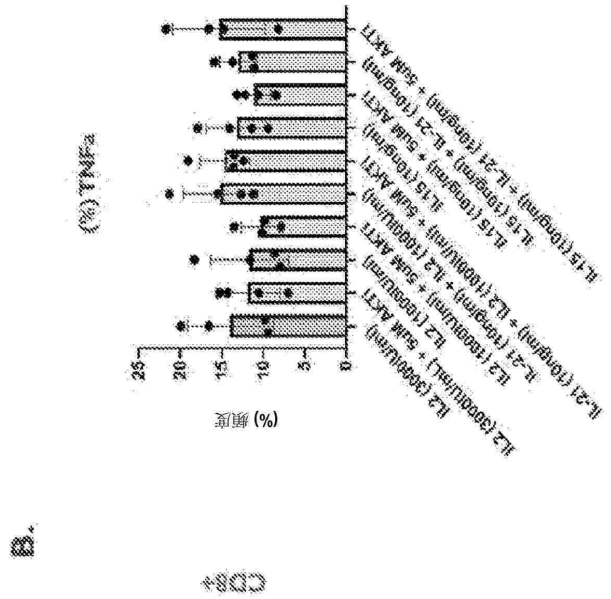
【図７２Ｂ】



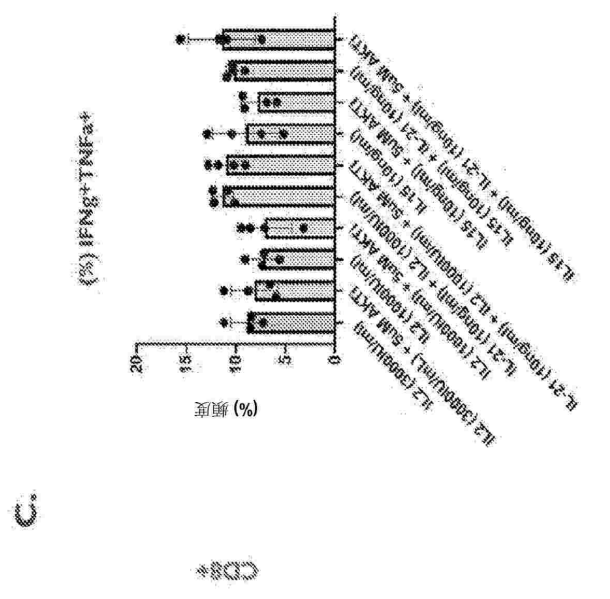
【図７３Ａ】



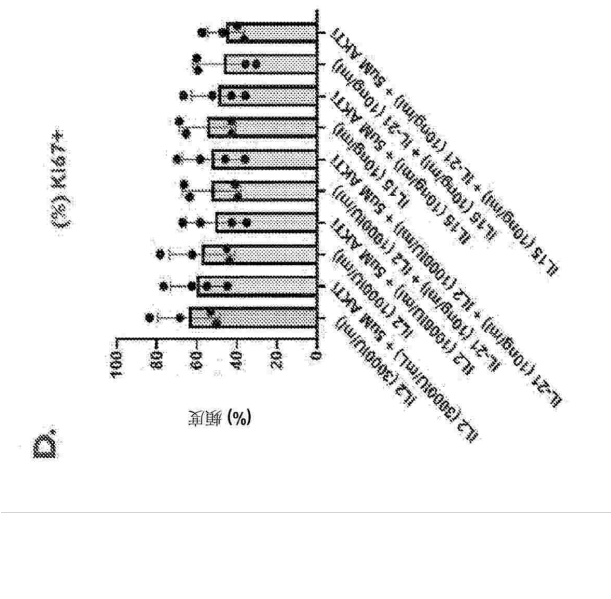
【図７３Ｂ】



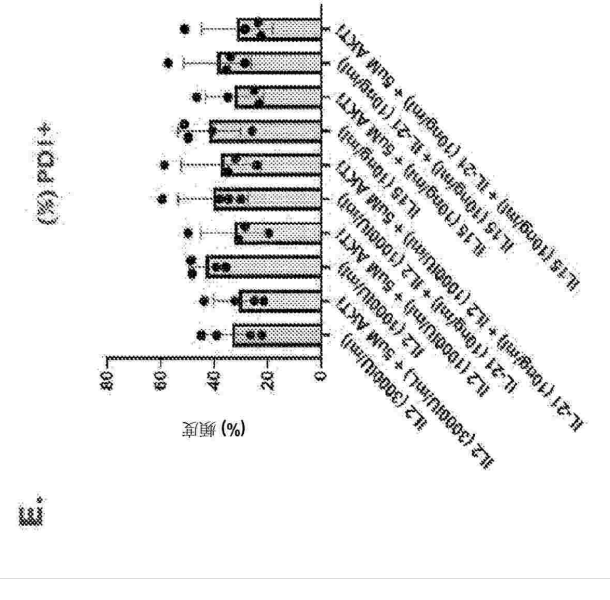
【図７３Ｃ】



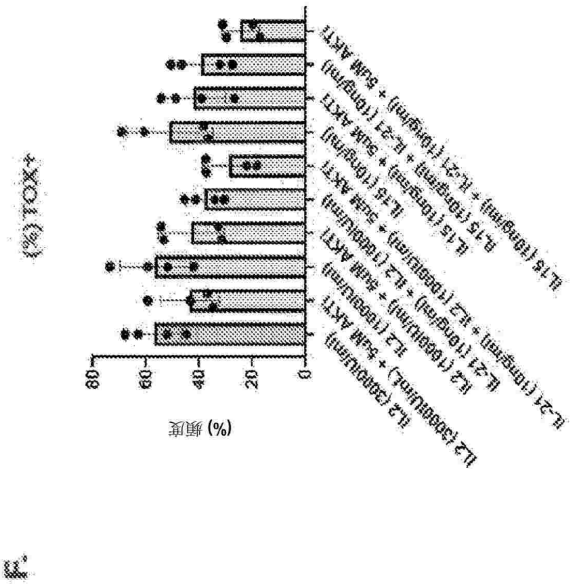
【図７３Ｄ】



【図７３Ｅ】

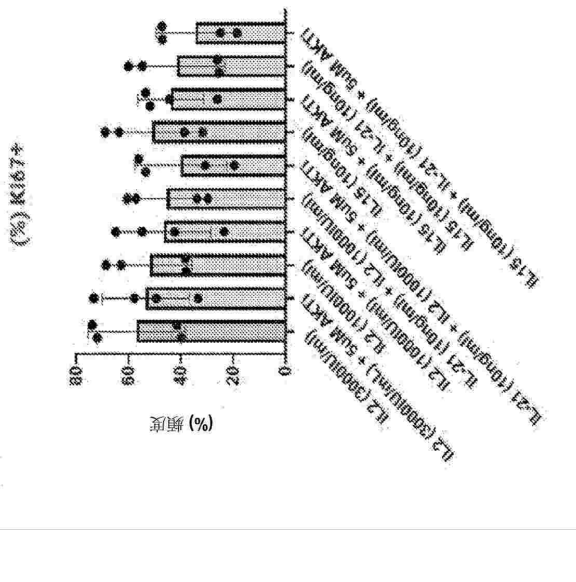


【図７３Ｆ】



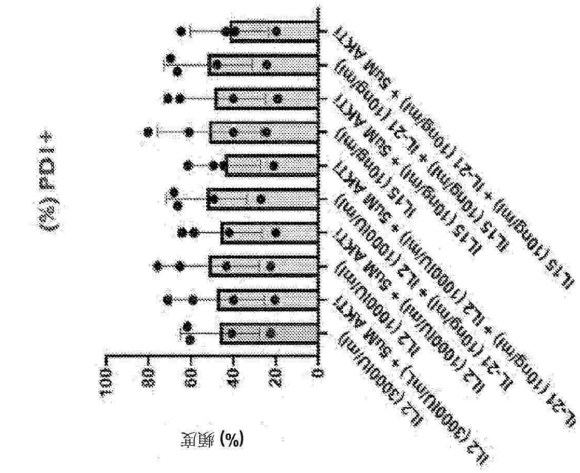
E.

【図７４Ａ】



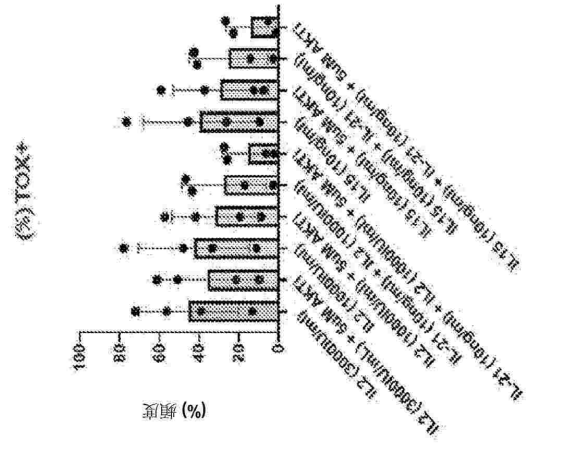
A.

【図７４Ｂ】



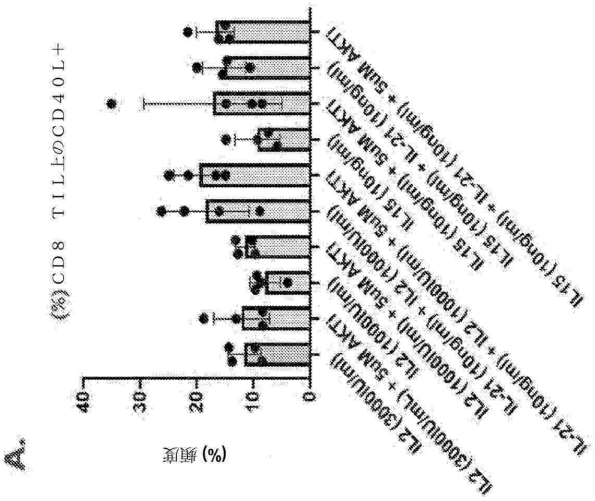
B.

【図７４Ｃ】

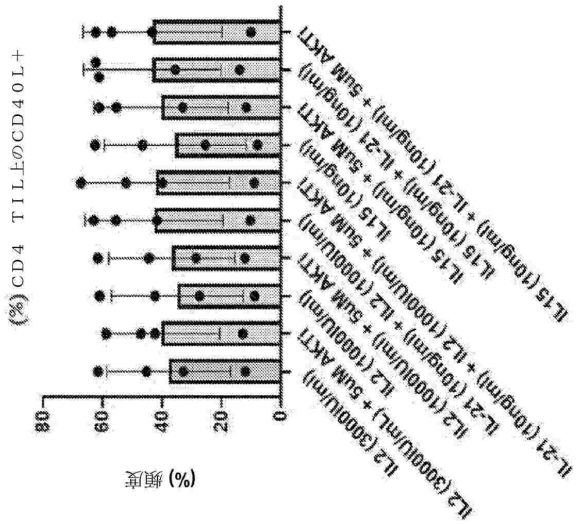


C.

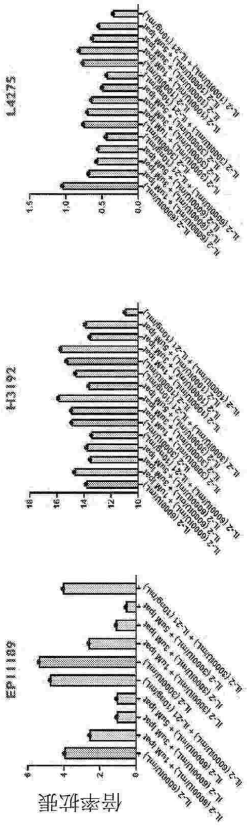
【図７５Ａ】



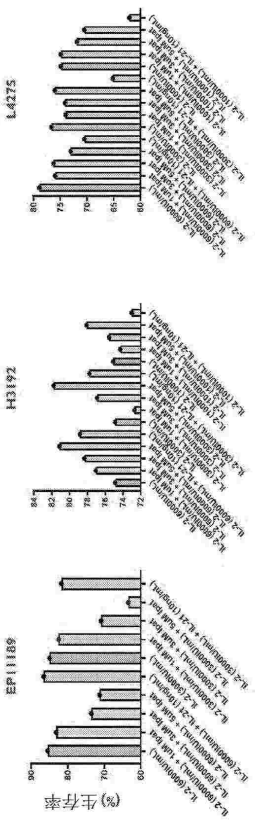
【図７５Ｂ】



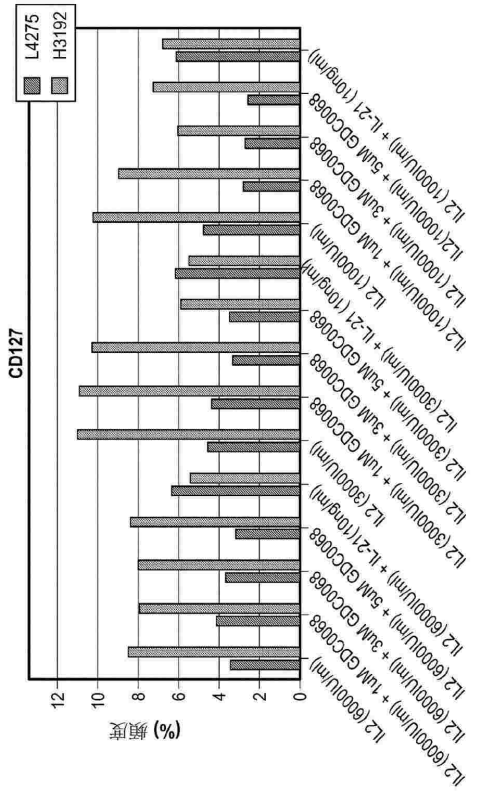
【図７６Ａ】



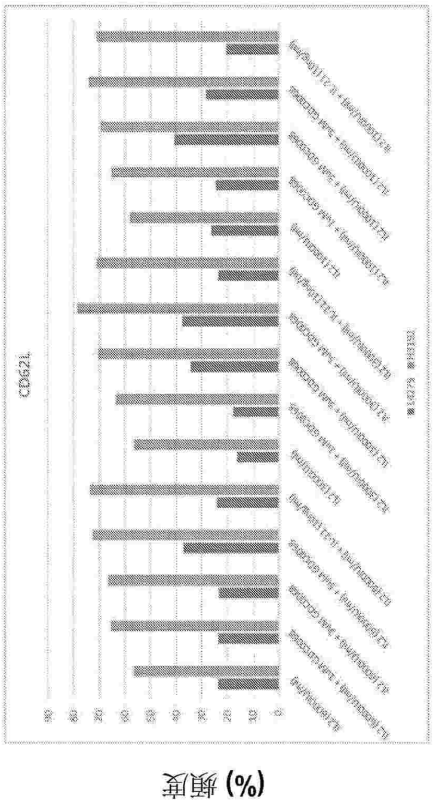
【図７６Ｂ】



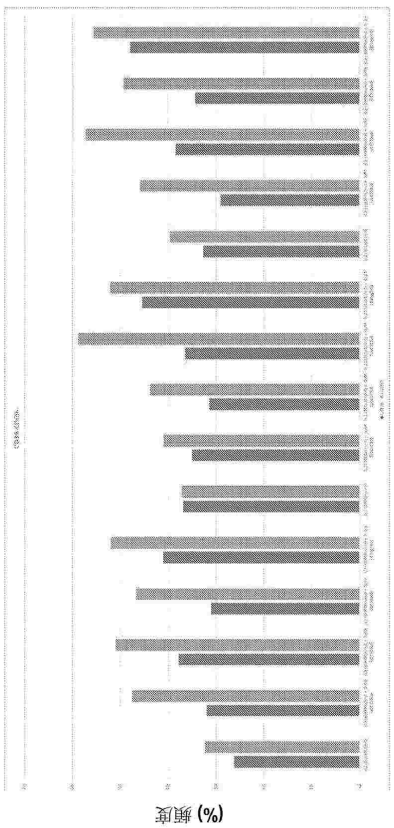
【図７７Ａ】



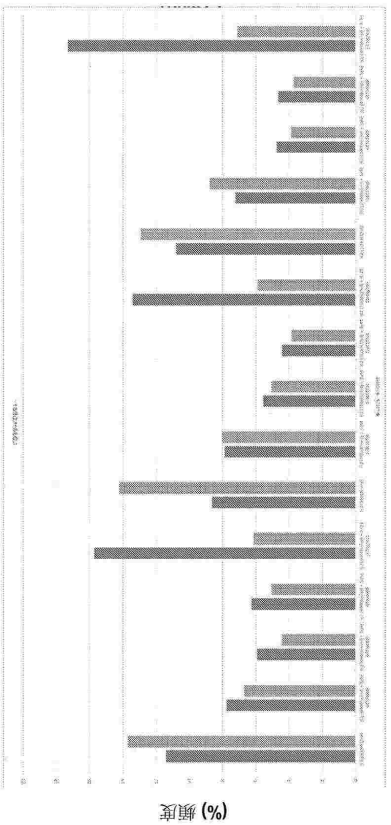
【図７７Ｂ】



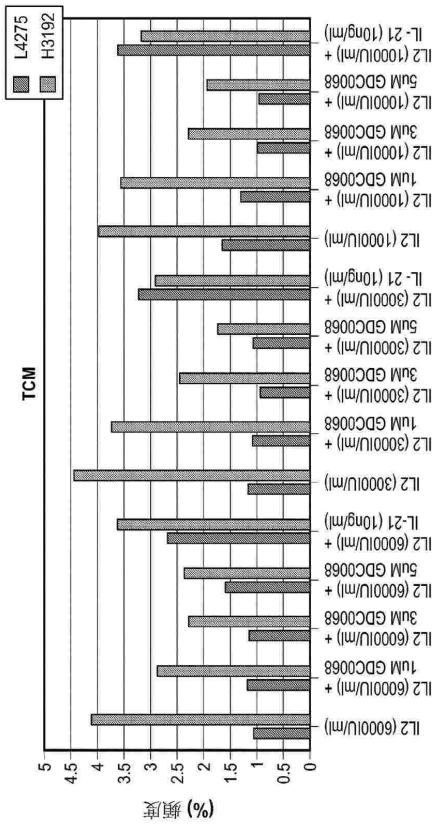
【図７８Ａ】



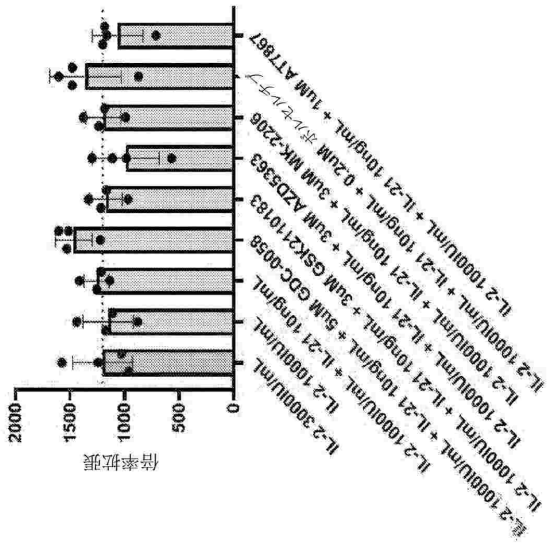
【図７８Ｂ】



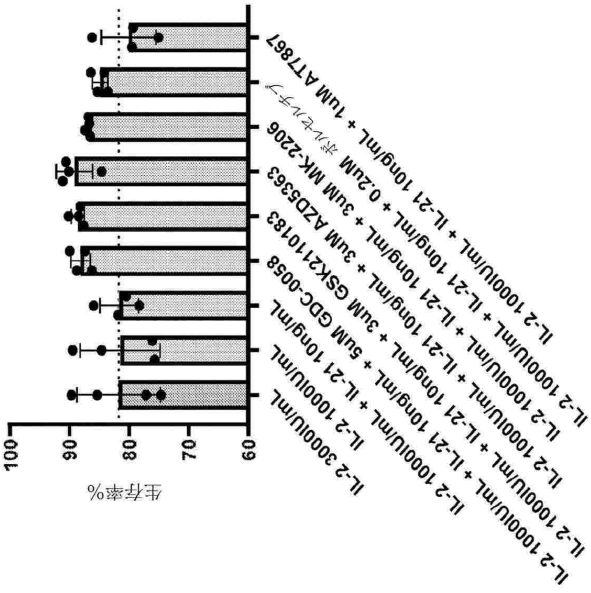
【図７９】



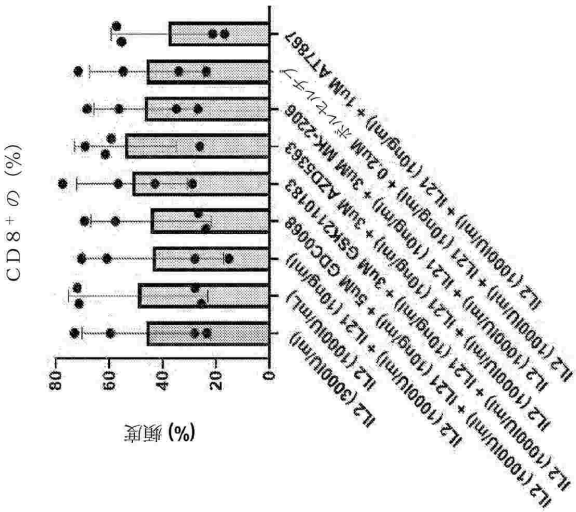
【図８０Ａ】



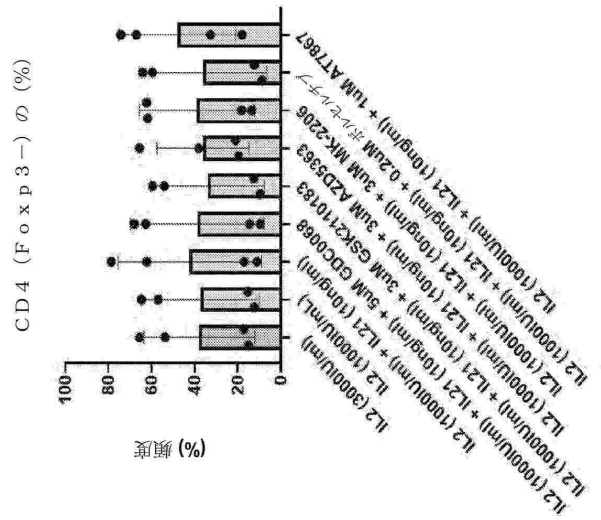
【図８０Ｂ】



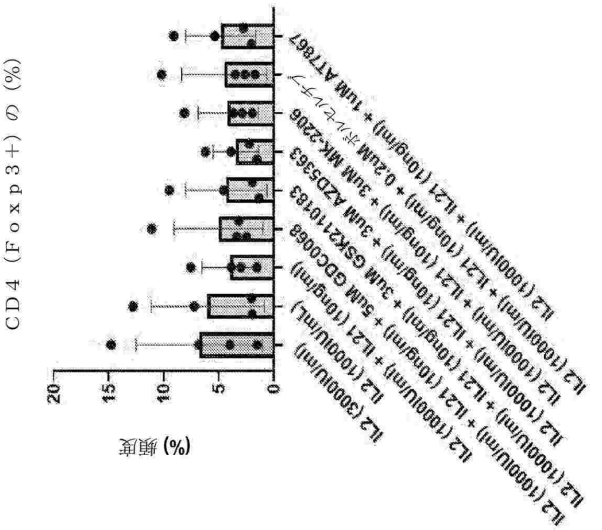
【図８１Ａ】



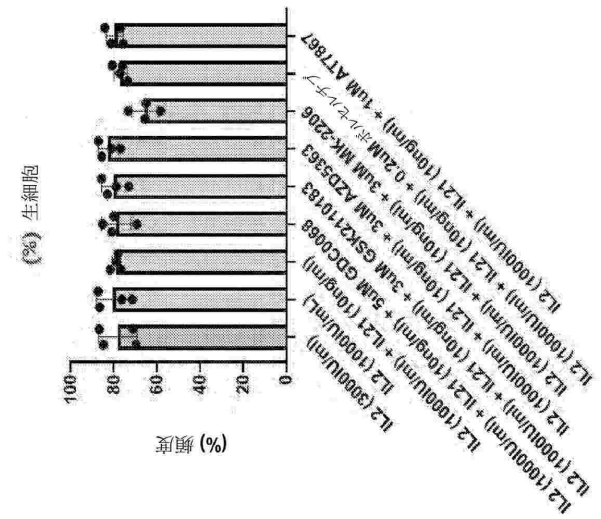
【図８１Ｂ】



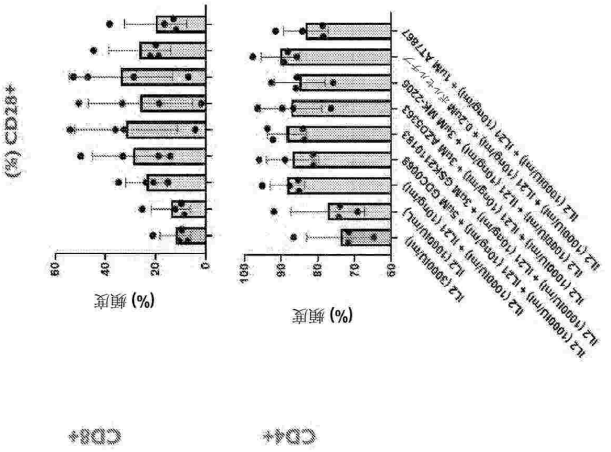
【図８１Ｃ】



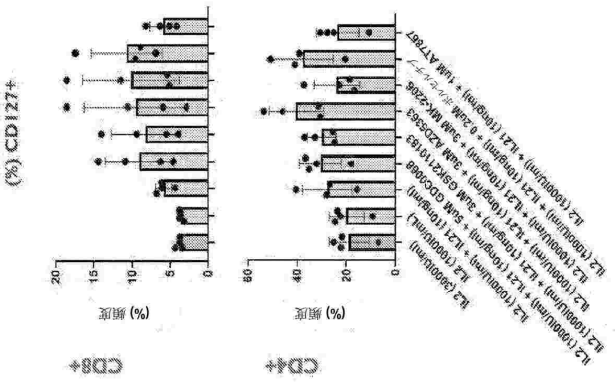
【図８１Ｄ】



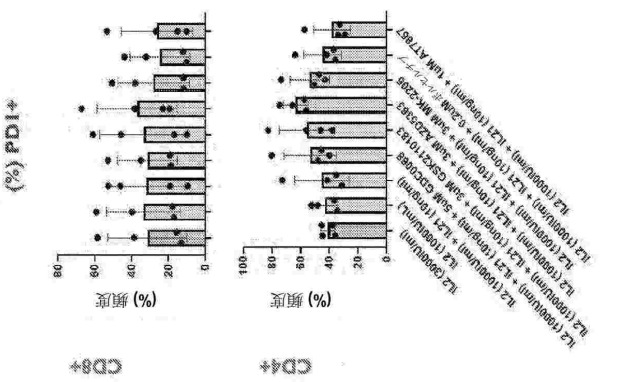
【図８２Ａ】



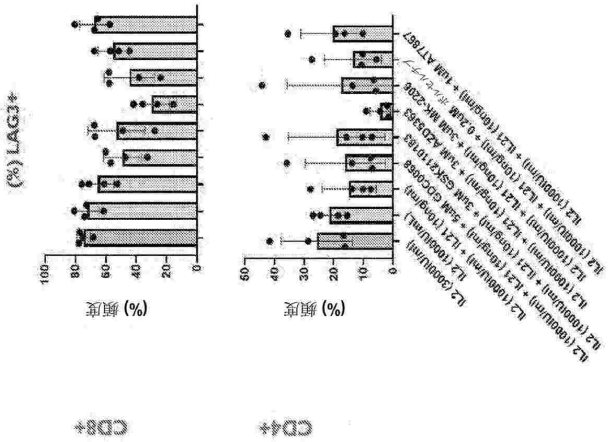
【図８２Ｂ】



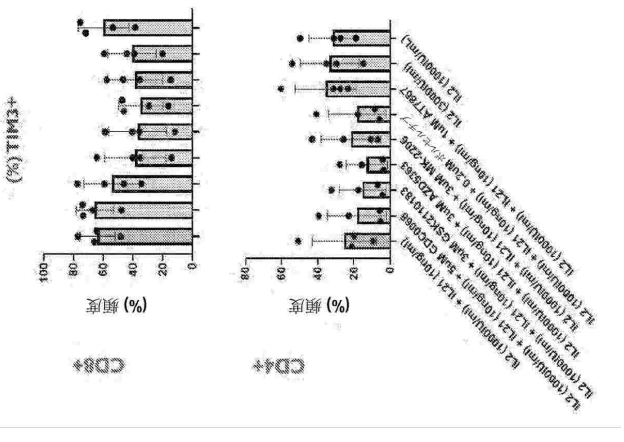
【図８２Ｃ】



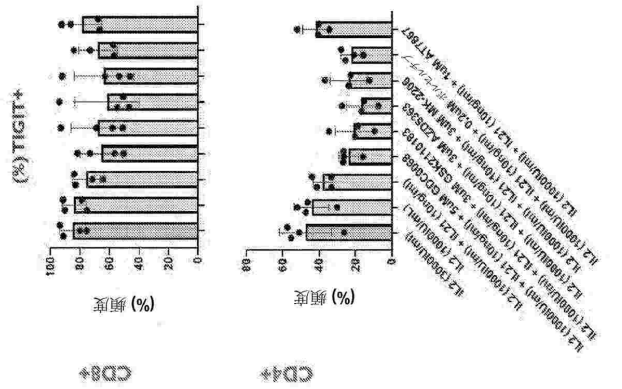
【図８２Ｄ】



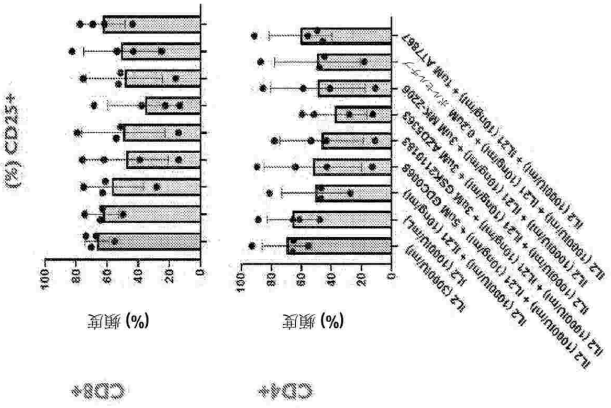
【図８２Ｅ】



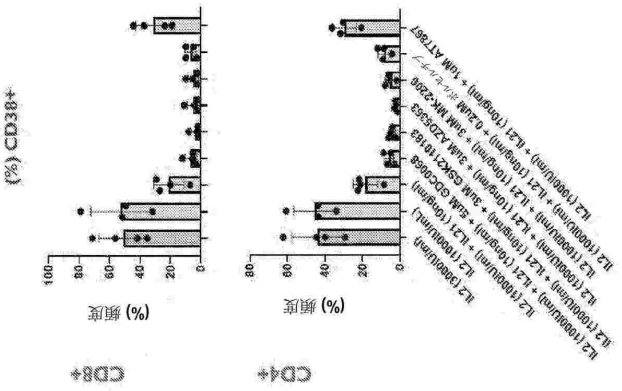
【図８２Ｆ】



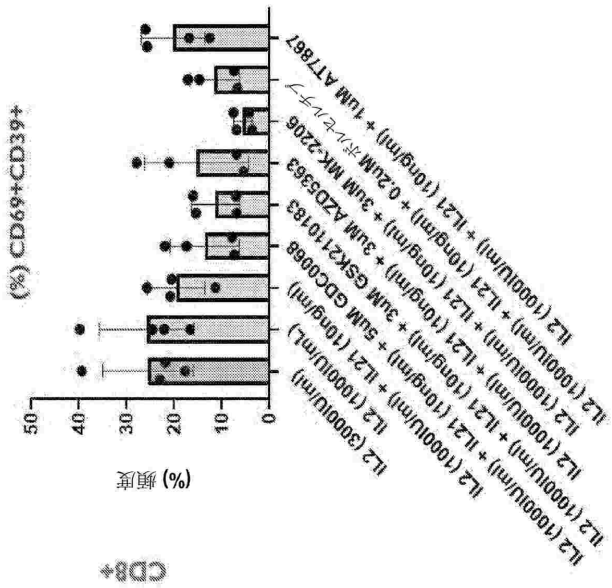
【図８３Ａ】



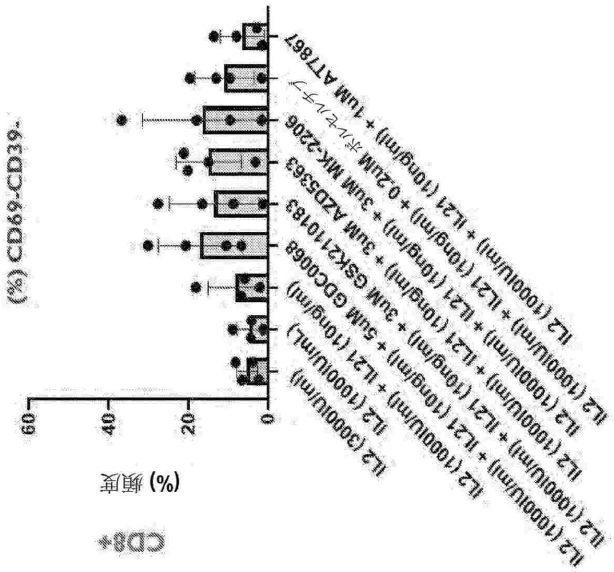
【図８３Ｂ】



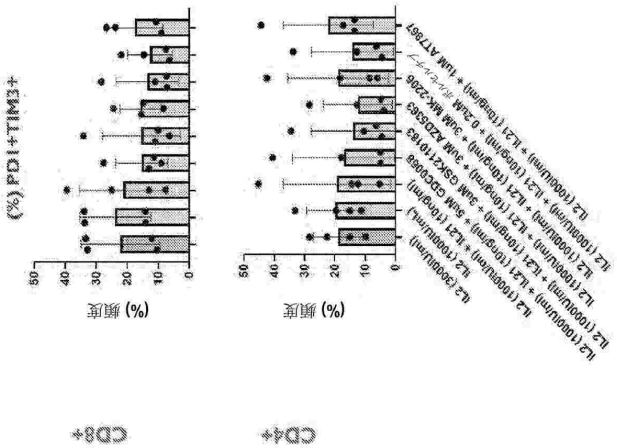
【図８４Ａ】



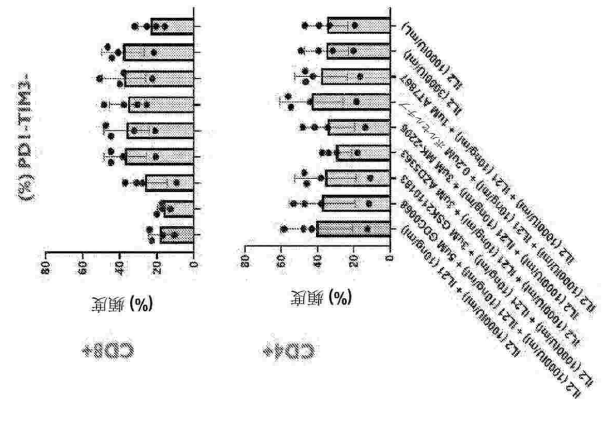
【図８４Ｂ】



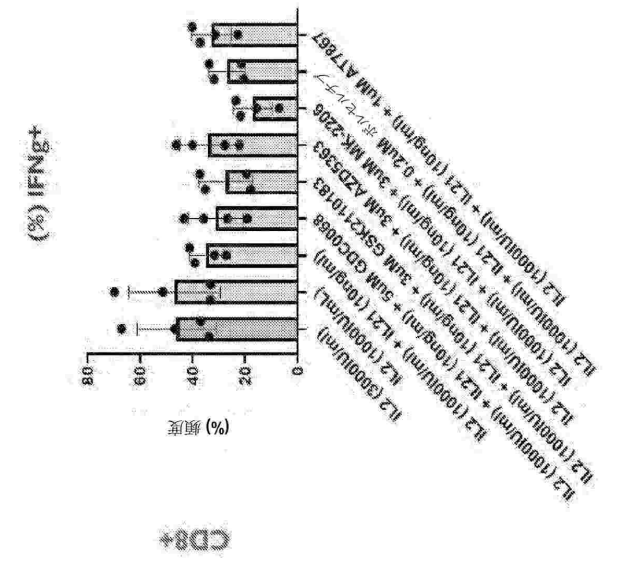
【図８５Ａ】



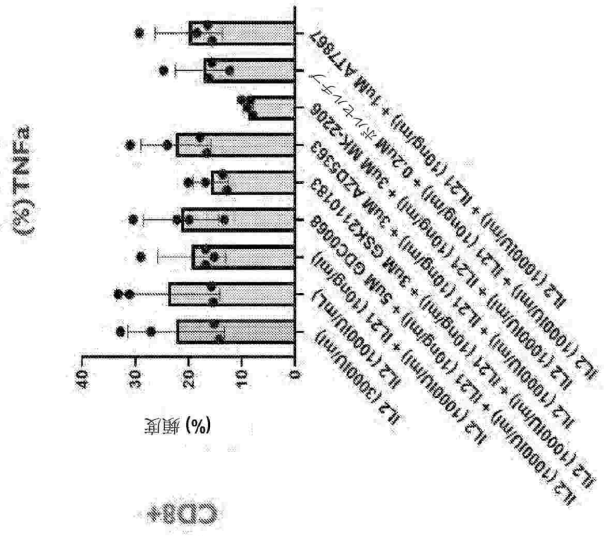
【図８５Ｂ】



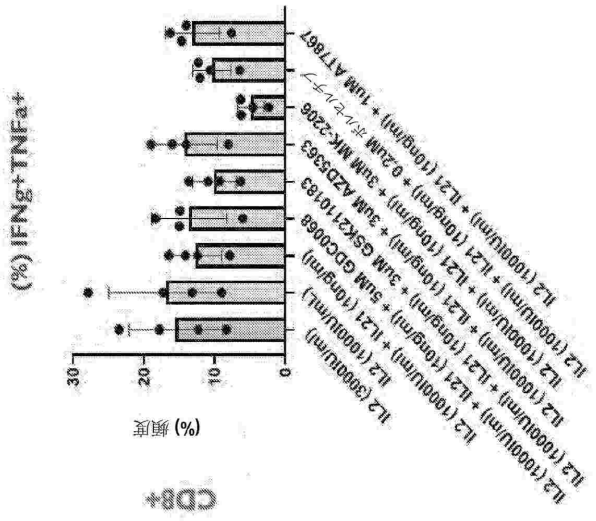
【図８６Ａ】



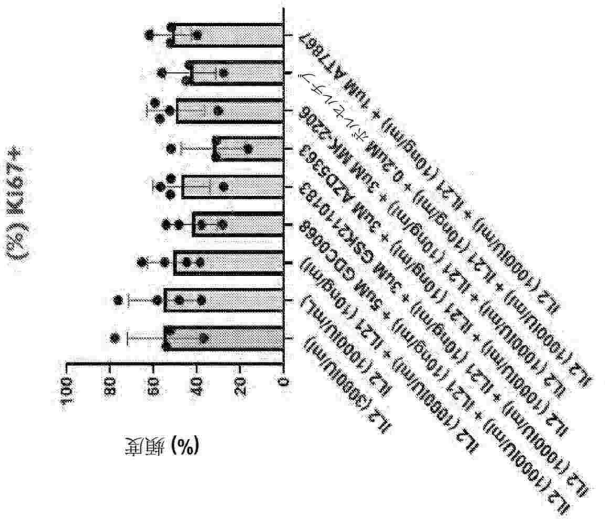
【図８６Ｂ】



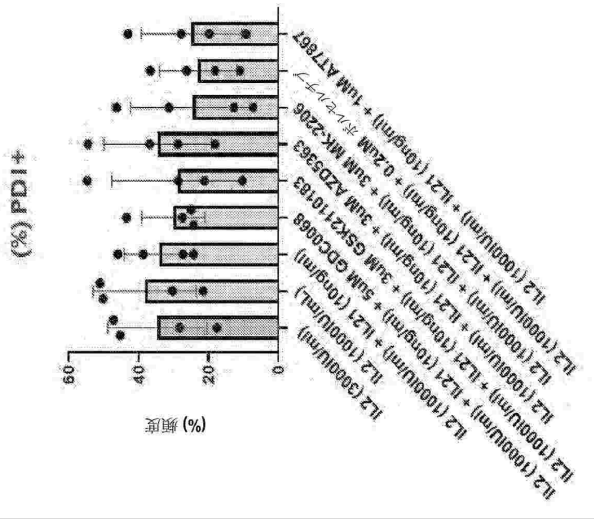
【図８６Ｃ】



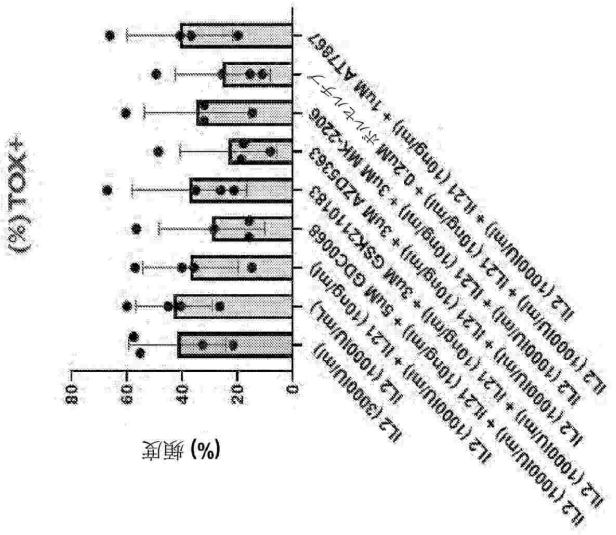
【図８６Ｄ】



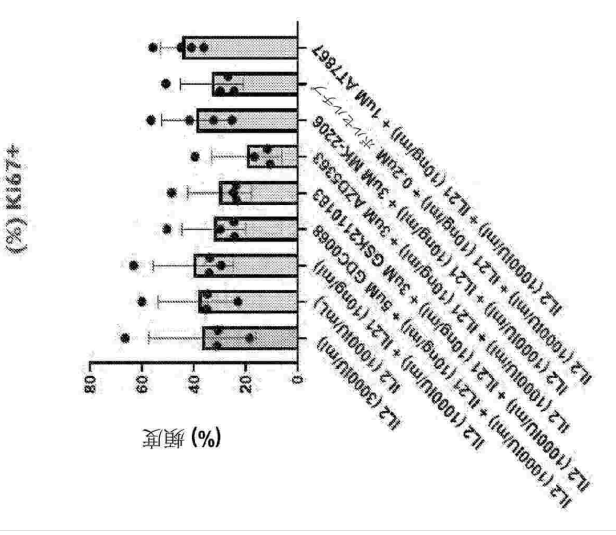
【図８６Ｅ】



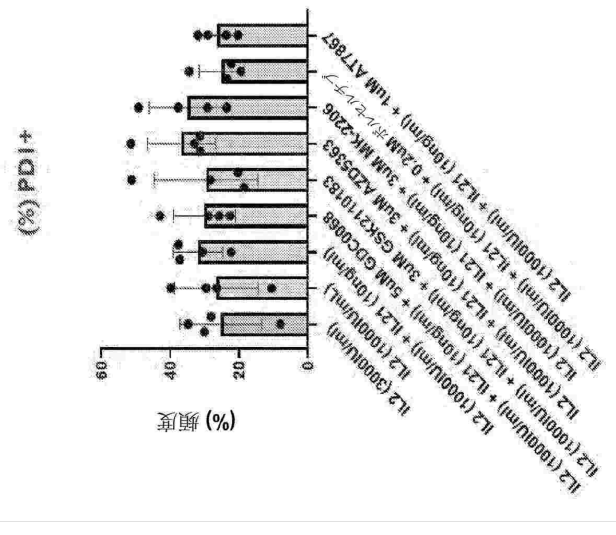
【図８６Ｆ】



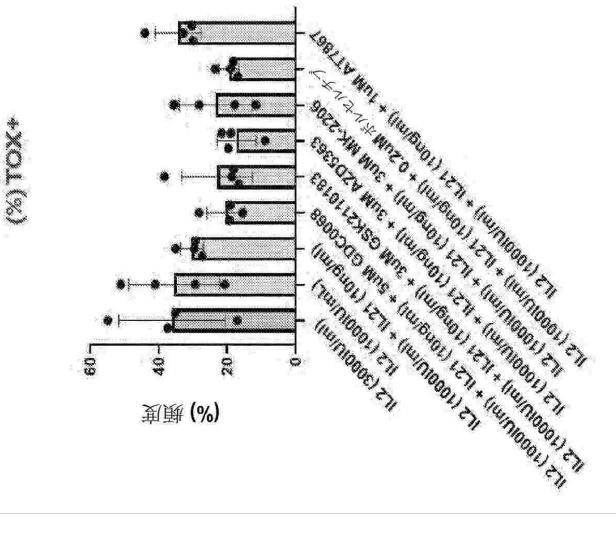
【図８７Ａ】



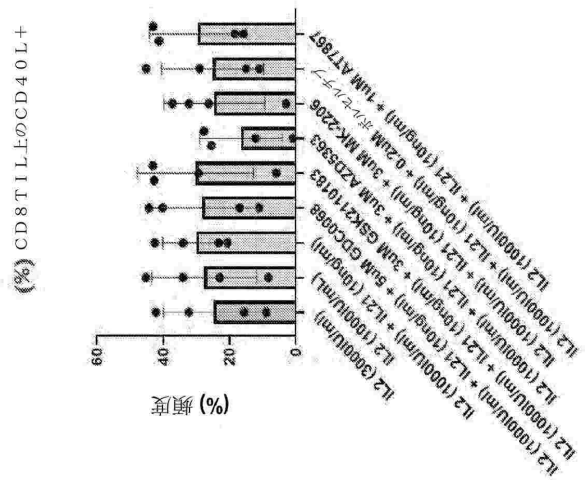
【図８７Ｂ】



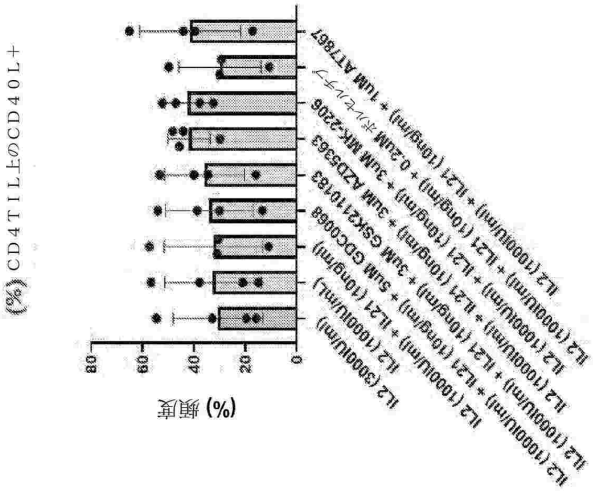
【図８７Ｃ】



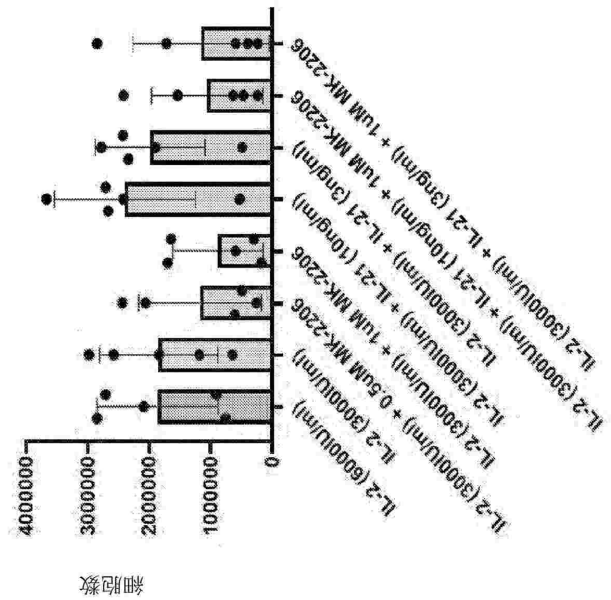
【図８８Ａ】



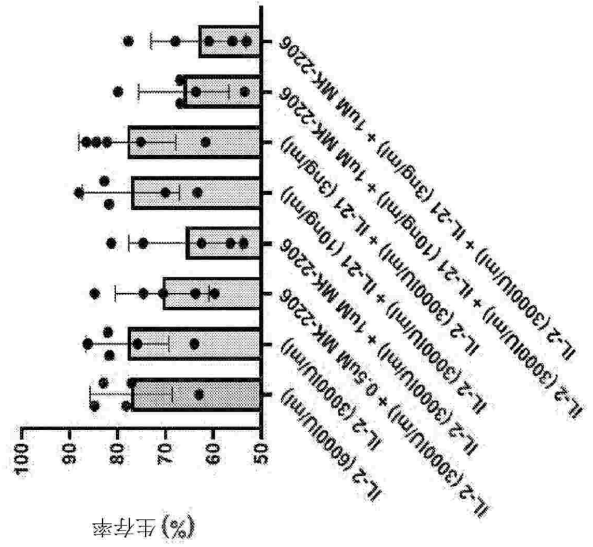
【図８８Ｂ】



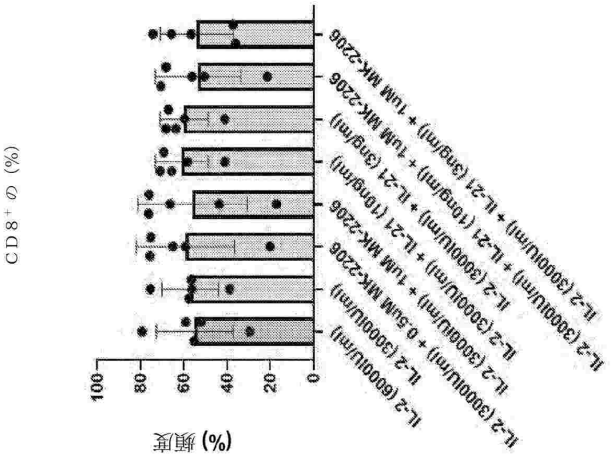
【図８９Ａ】



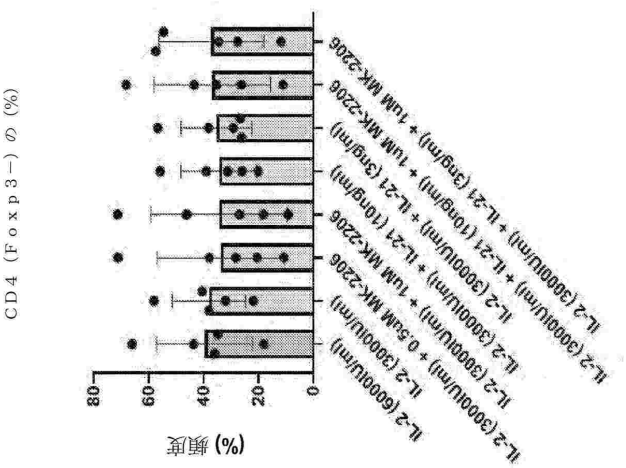
【図８９Ｂ】



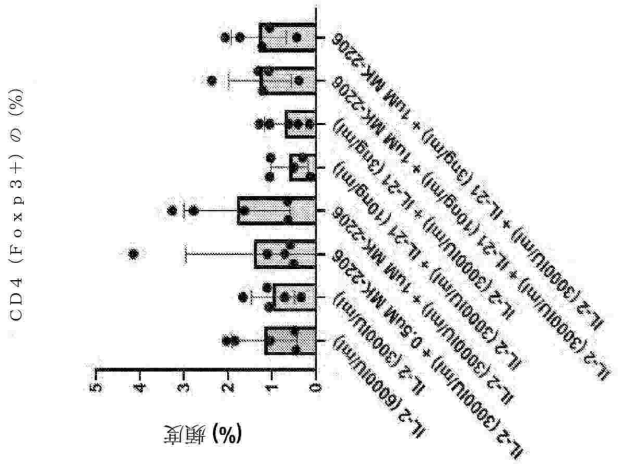
【図９０Ａ】



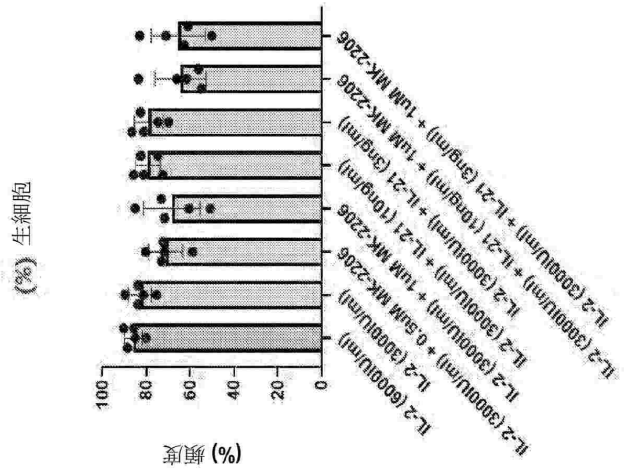
【図９０Ｂ】



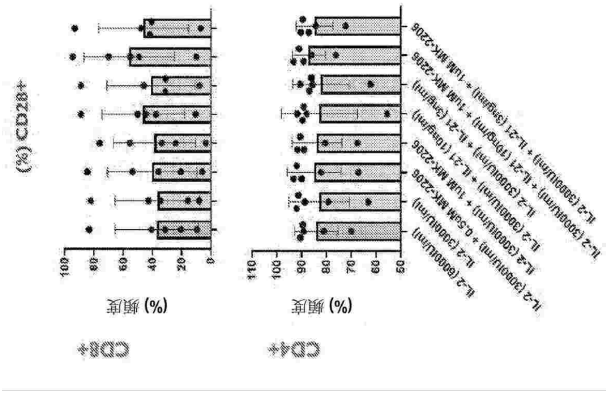
【図９０Ｃ】



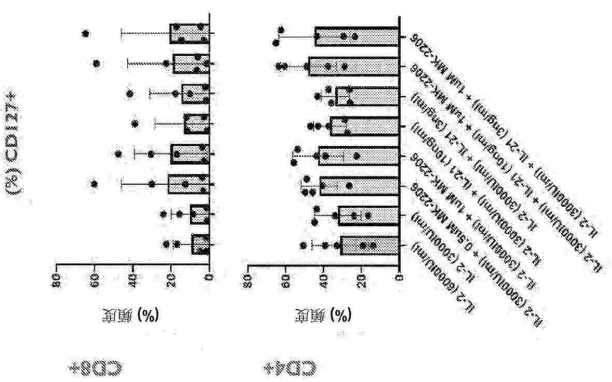
【図９０Ｄ】



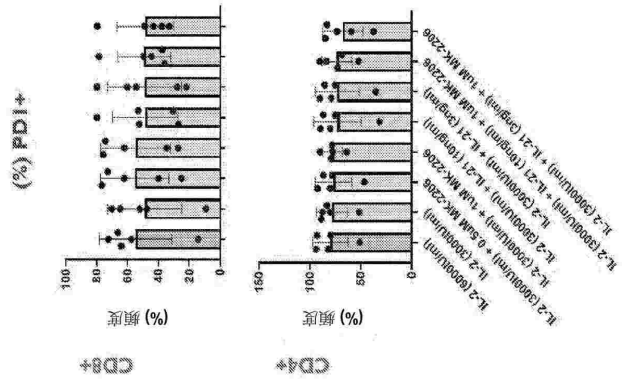
【図９１Ａ】



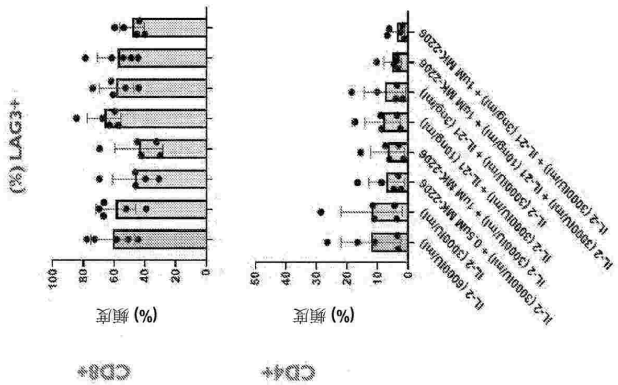
【図９１Ｂ】



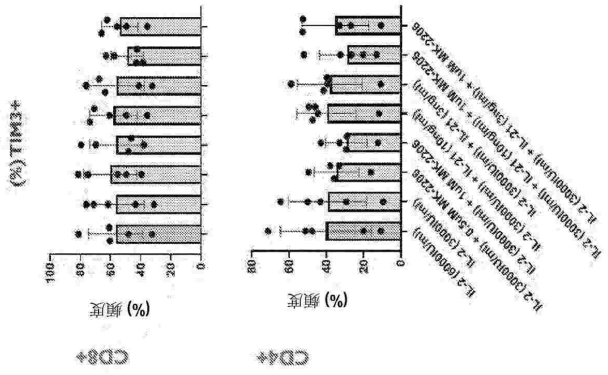
【図９１Ｃ】



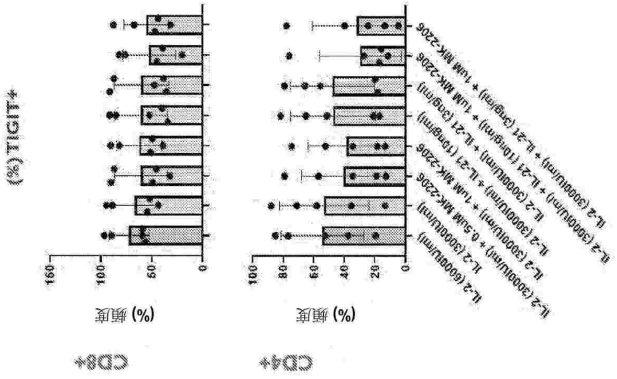
【図９１Ｄ】



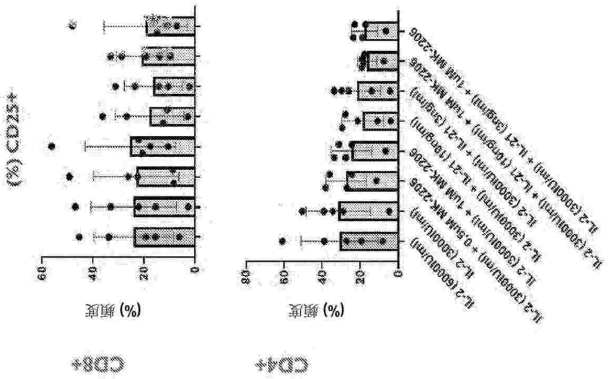
【図９１Ｅ】



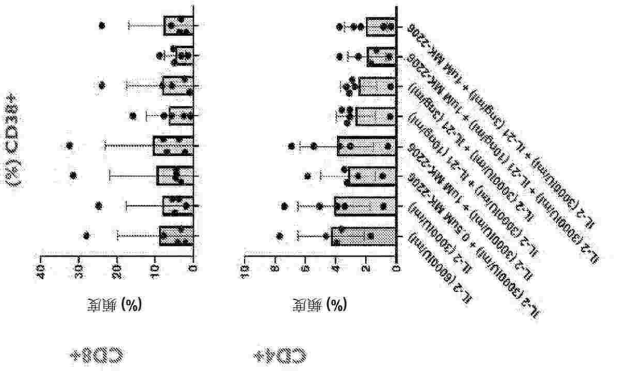
【図９１Ｆ】



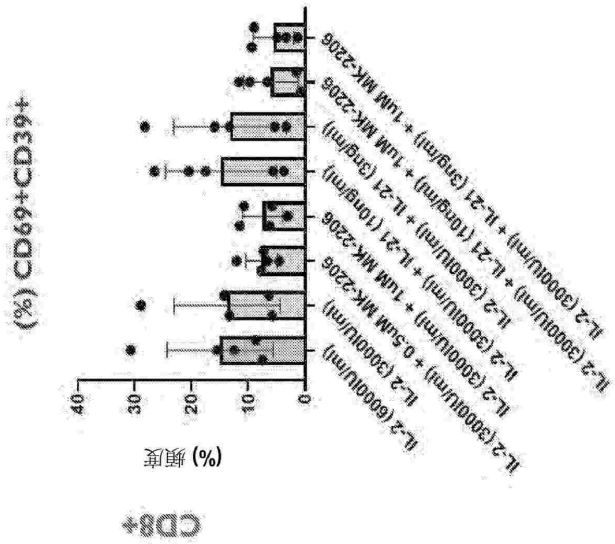
【図９２Ａ】



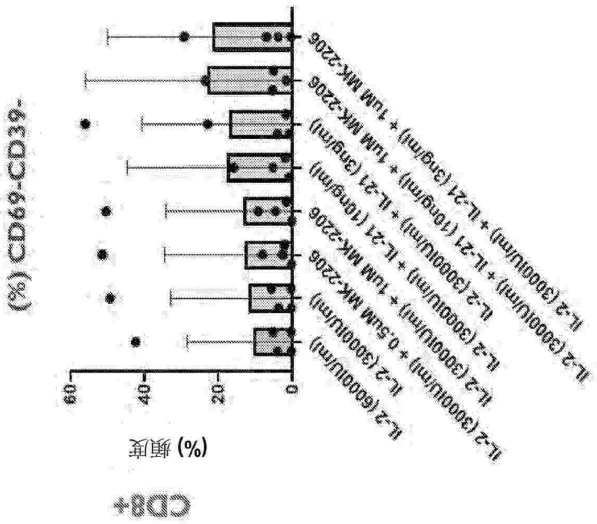
【図９２Ｂ】



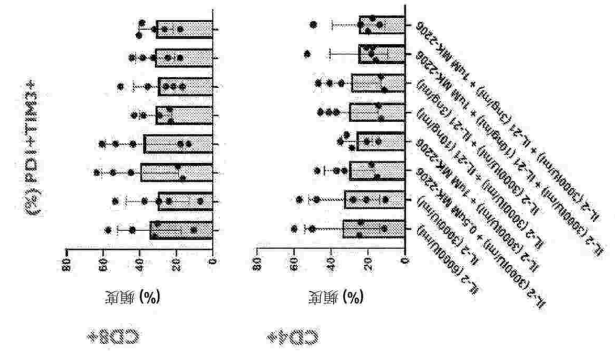
【図９３Ａ】



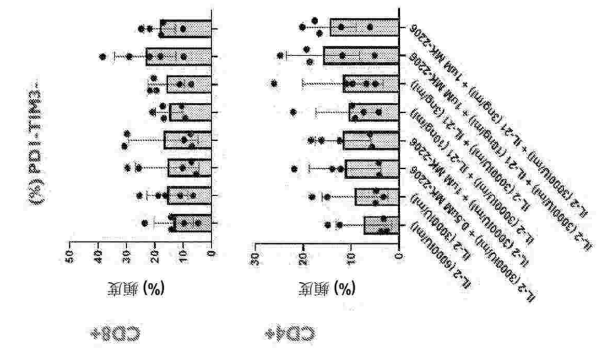
【図９３Ｂ】



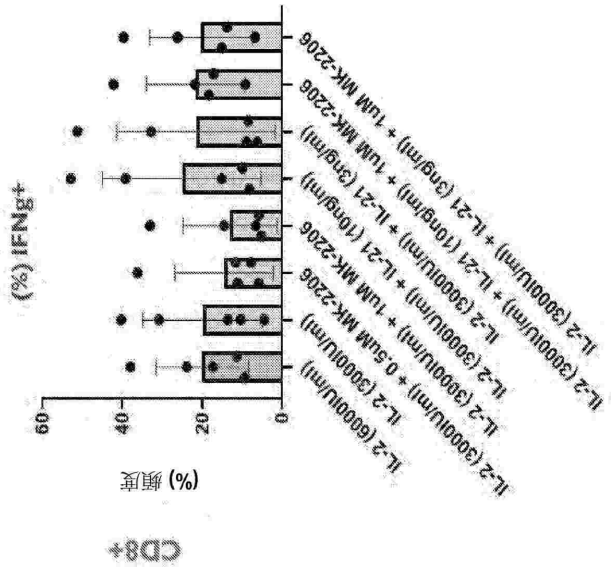
【図９４Ａ】



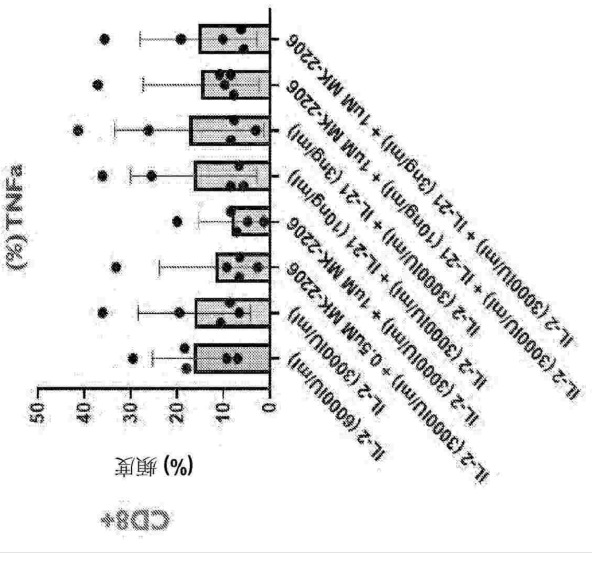
【図９４Ｂ】



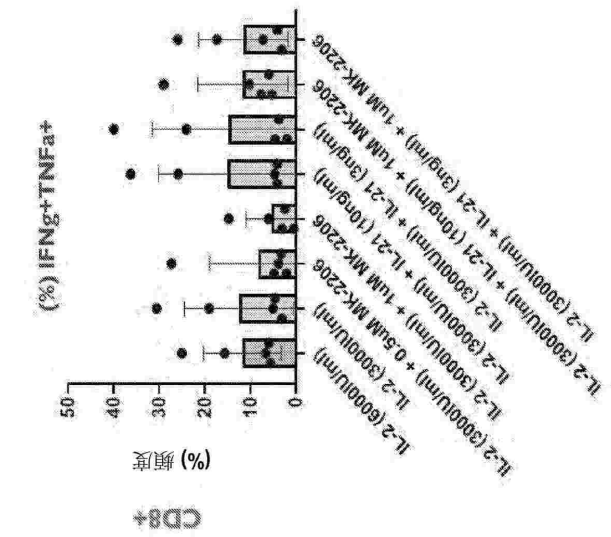
【図９５Ａ】



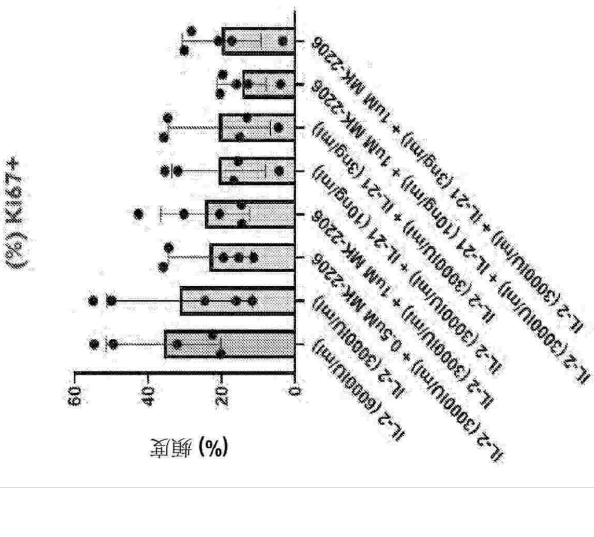
【図９５Ｂ】



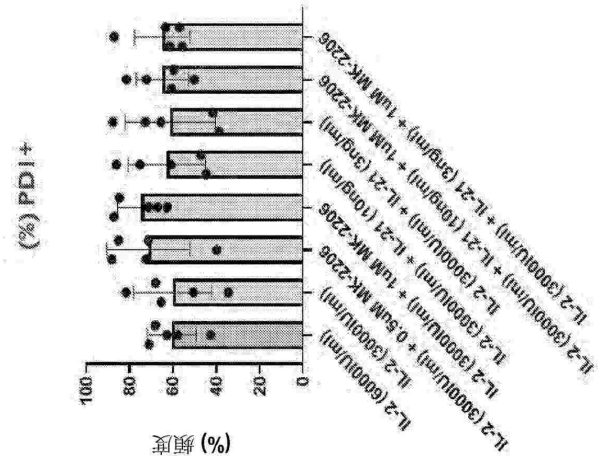
【図９５Ｃ】



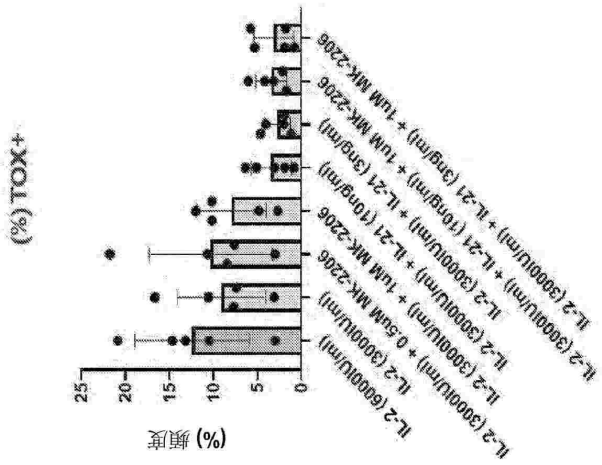
【図９５Ｄ】



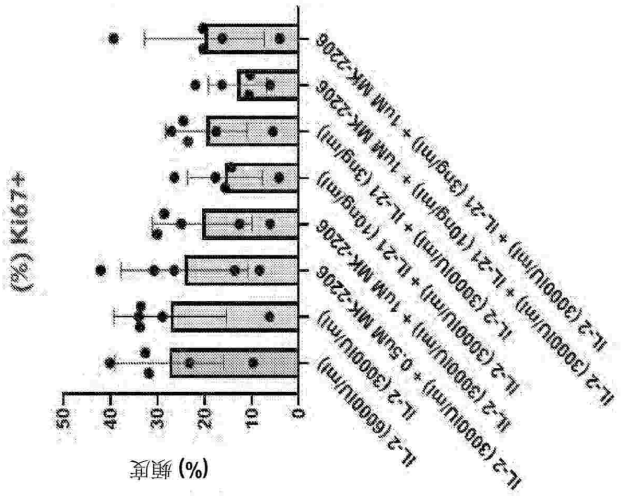
【図９５Ｅ】



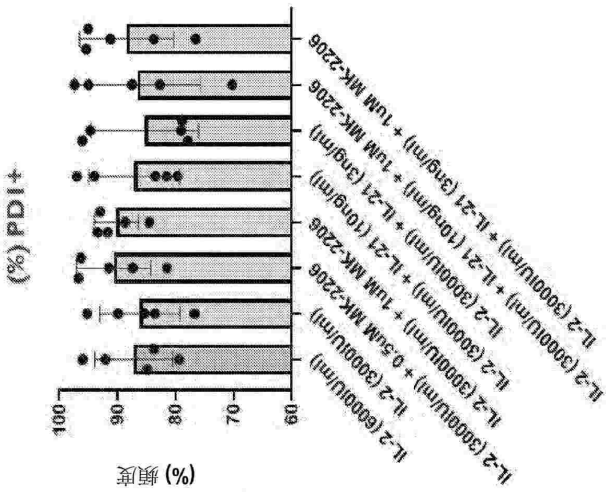
【図９５Ｆ】



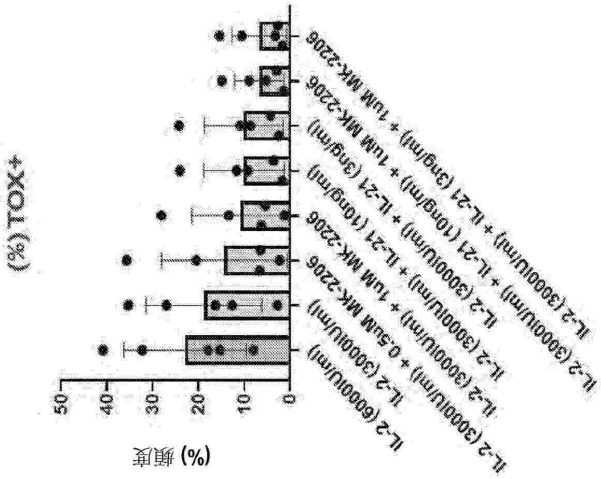
【図９６Ａ】



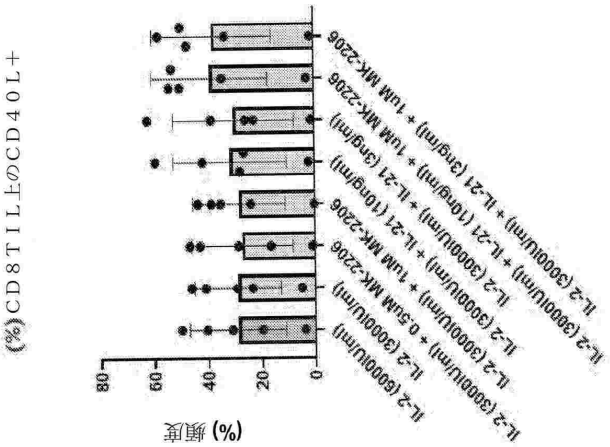
【図９６Ｂ】



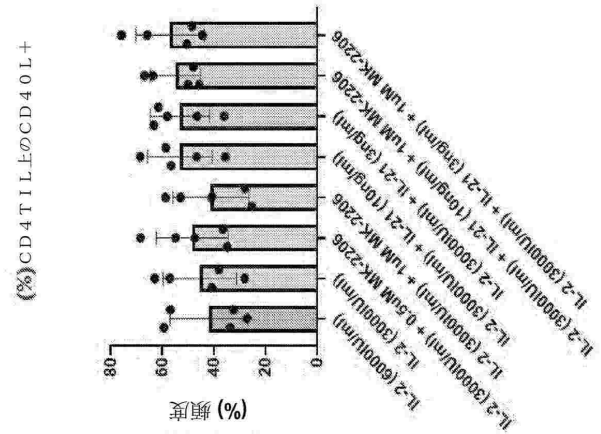
【図９６Ｃ】



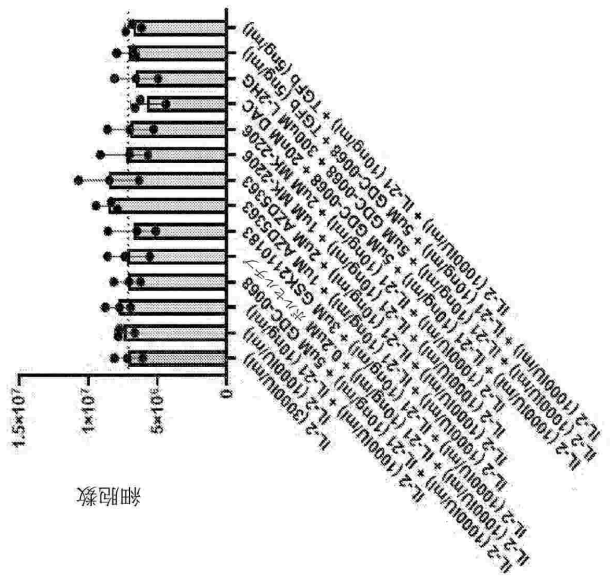
【図９７Ａ】



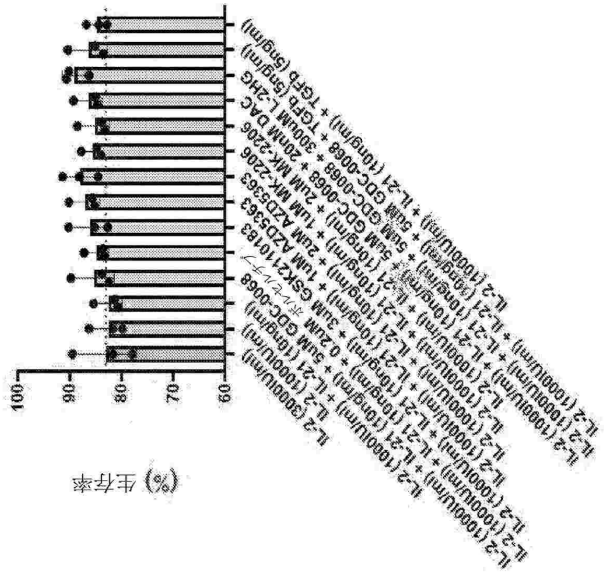
【図９７Ｂ】



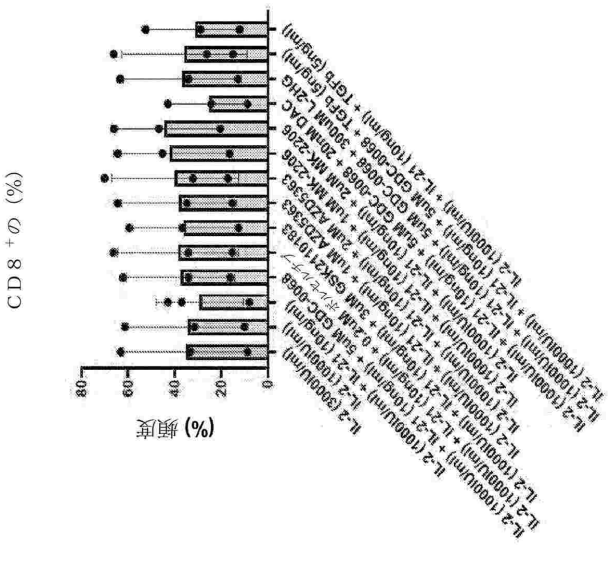
【図９８Ａ】



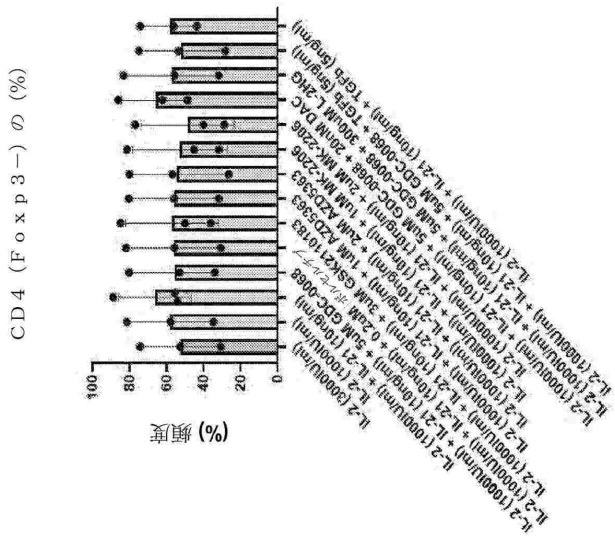
【図９８Ｂ】



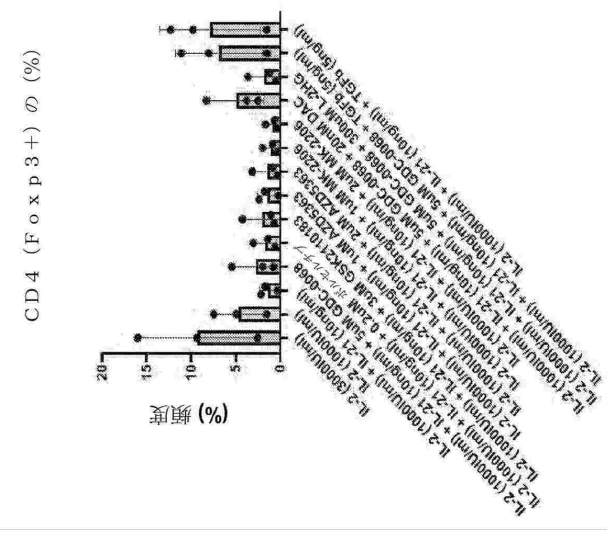
【図９９Ａ】



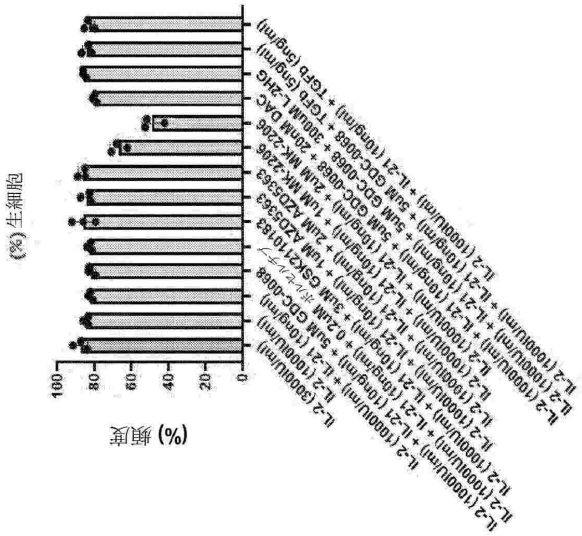
【図９９Ｂ】



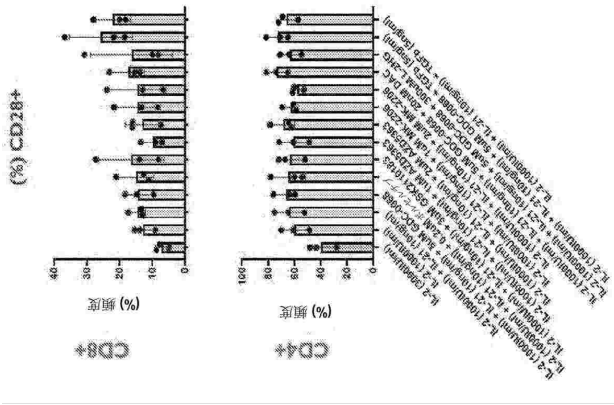
【図９９Ｃ】



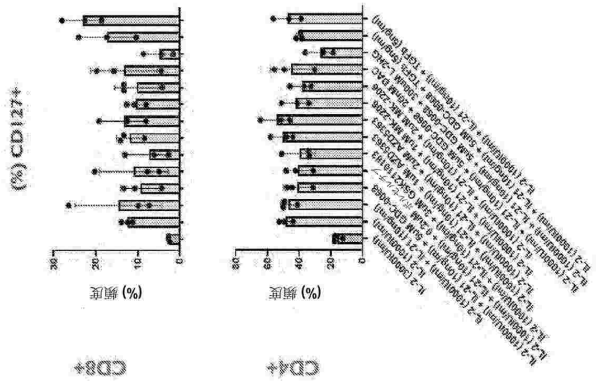
【図９９Ｄ】



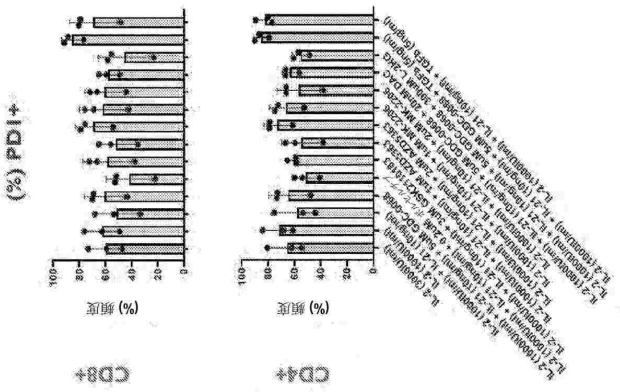
【図１００Ａ】



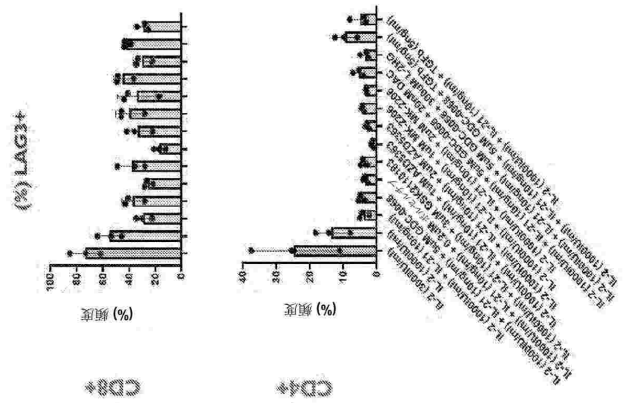
【図１００Ｂ】



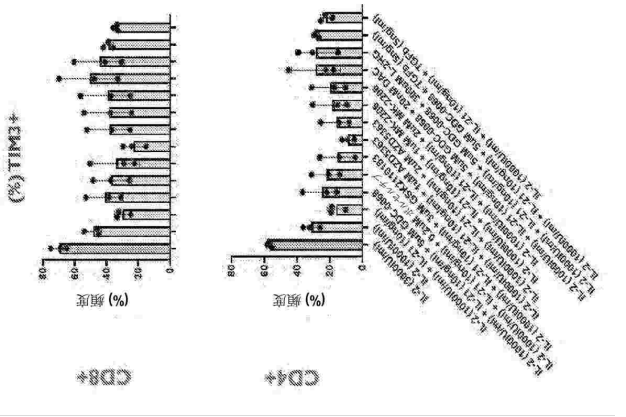
【図１００Ｃ】



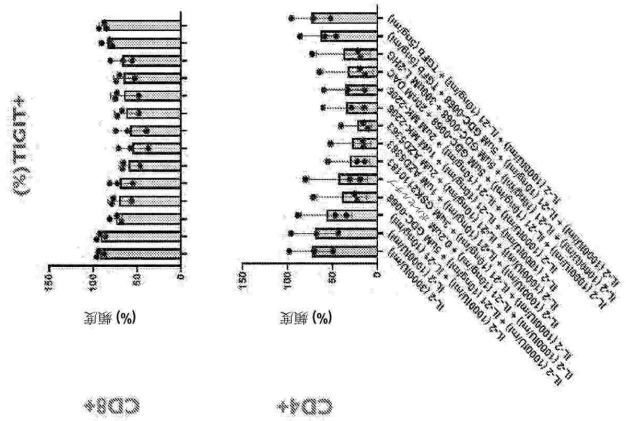
【図１００Ｄ】



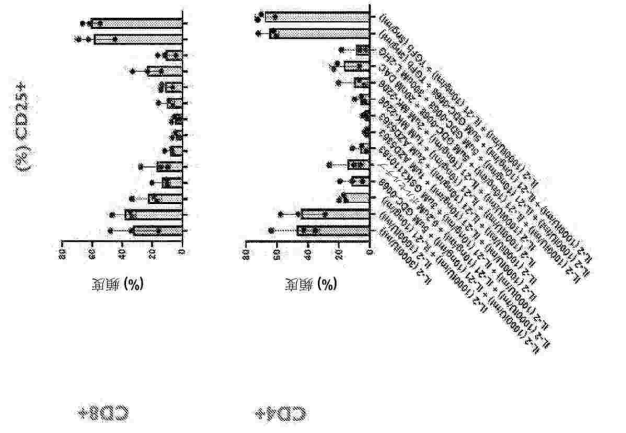
【図１００Ｅ】



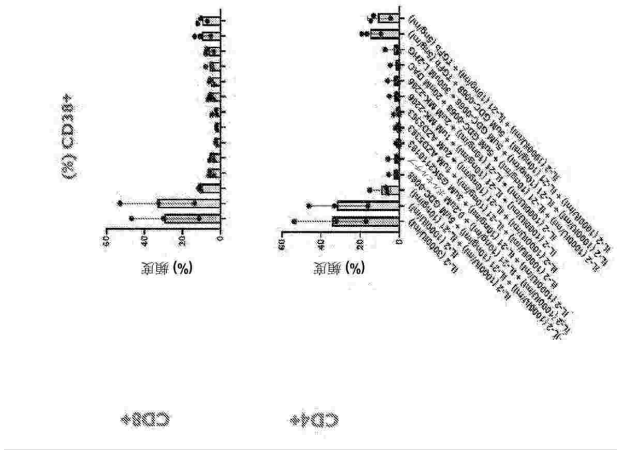
【図１００Ｆ】



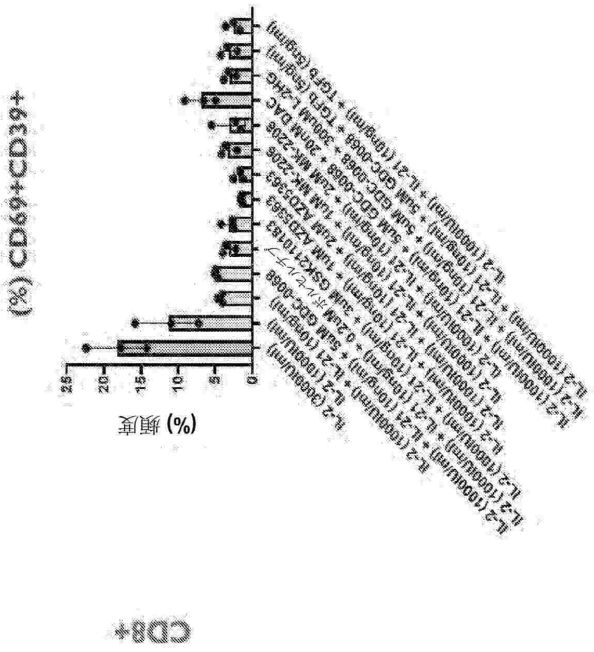
【図１０１Ａ】



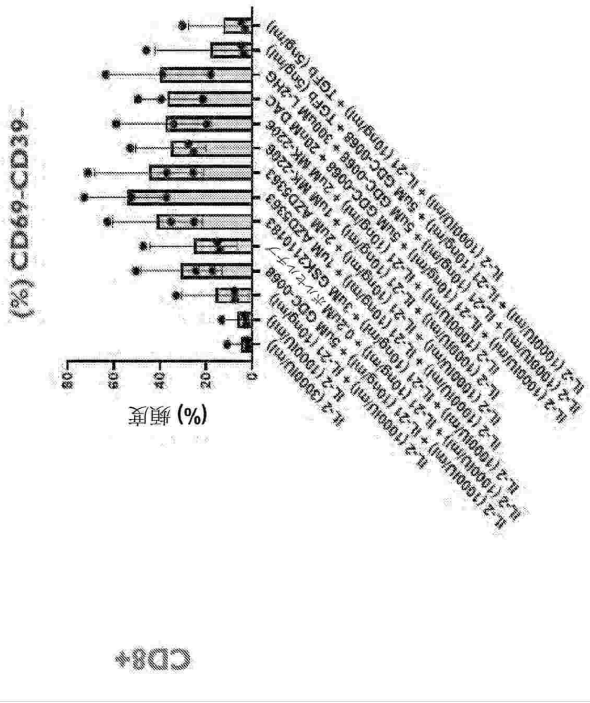
【図１０１Ｂ】



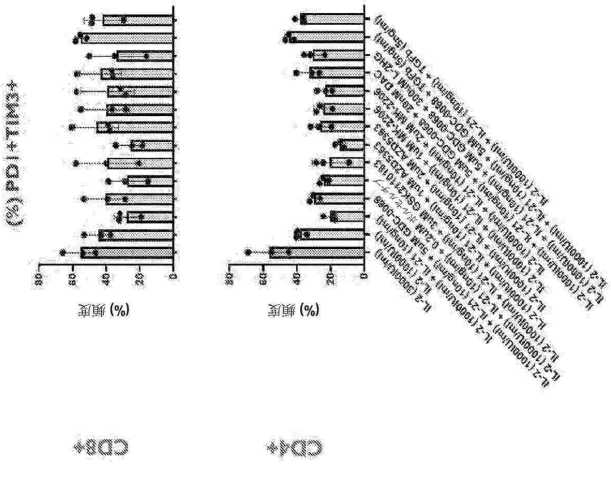
【図１０２Ａ】



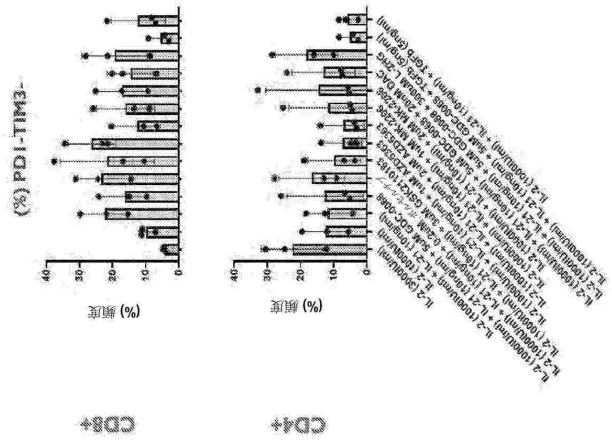
【図１０２Ｂ】



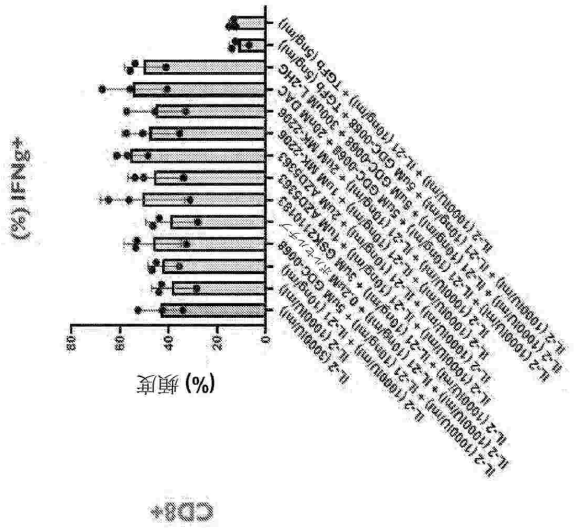
【図１０３Ａ】



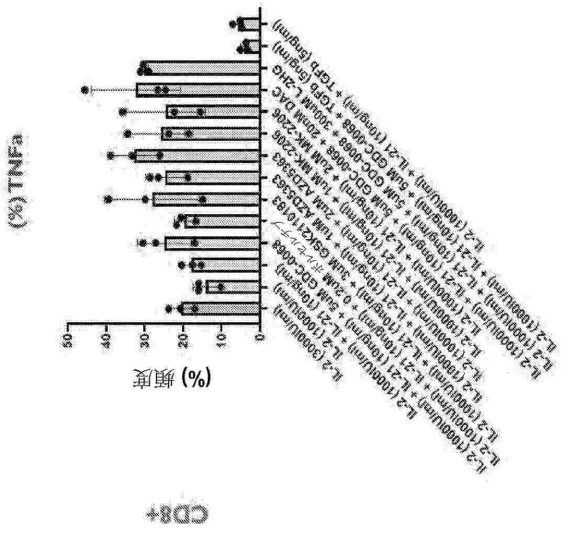
【図１０３Ｂ】



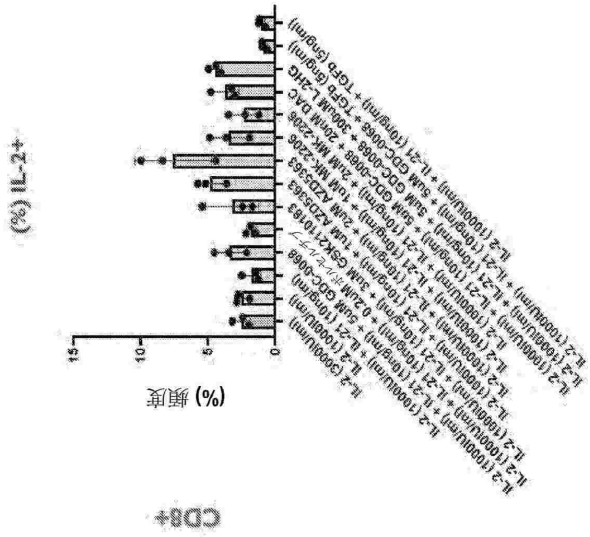
【図１０４Ａ】



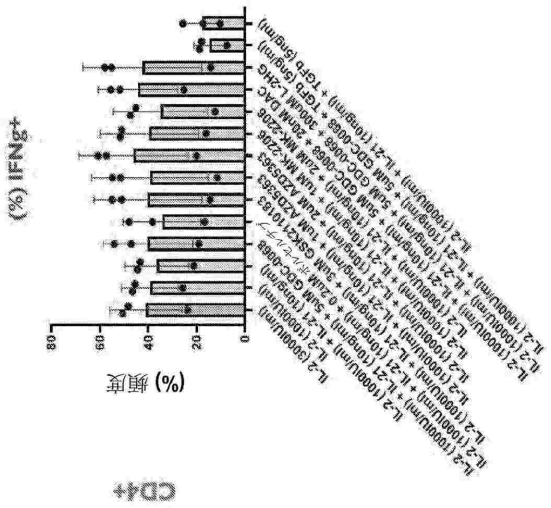
【図１０４Ｂ】



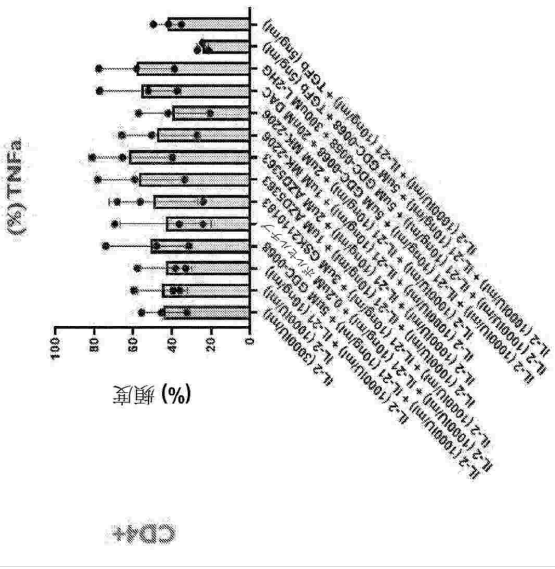
【図１０４Ｃ】



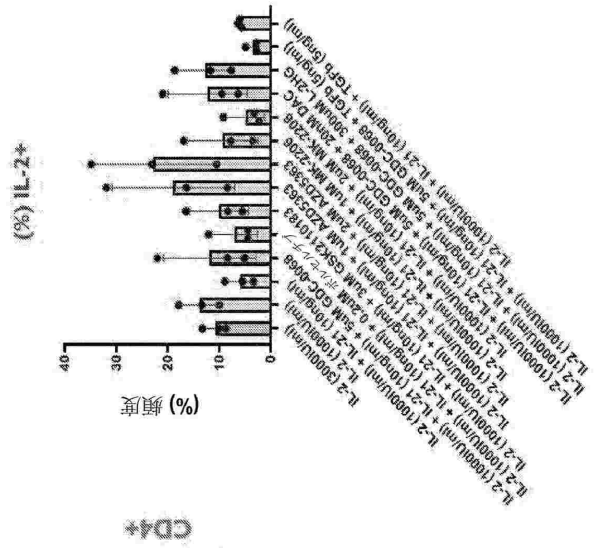
【図１０５Ａ】



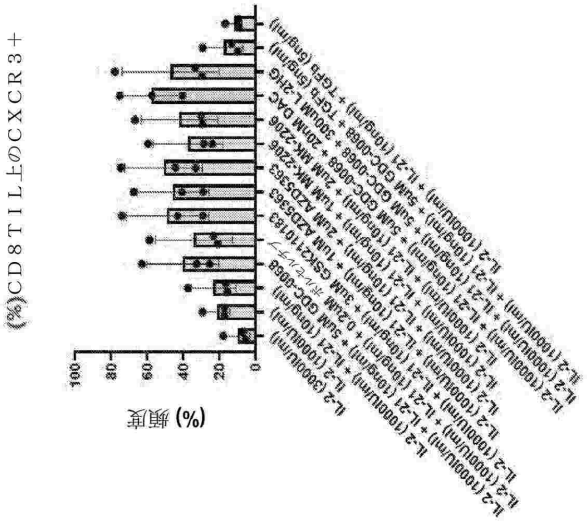
【図１０５Ｂ】



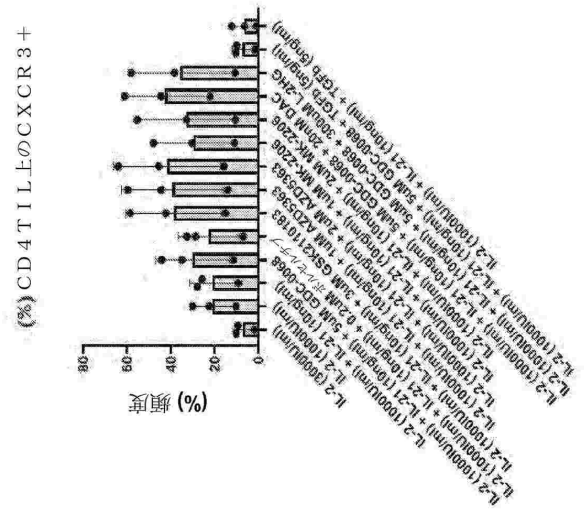
【図１０５Ｃ】



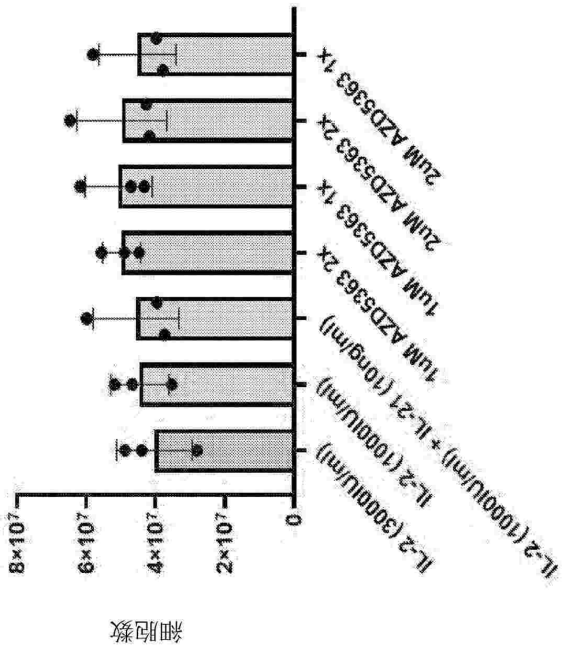
【図１０６Ａ】



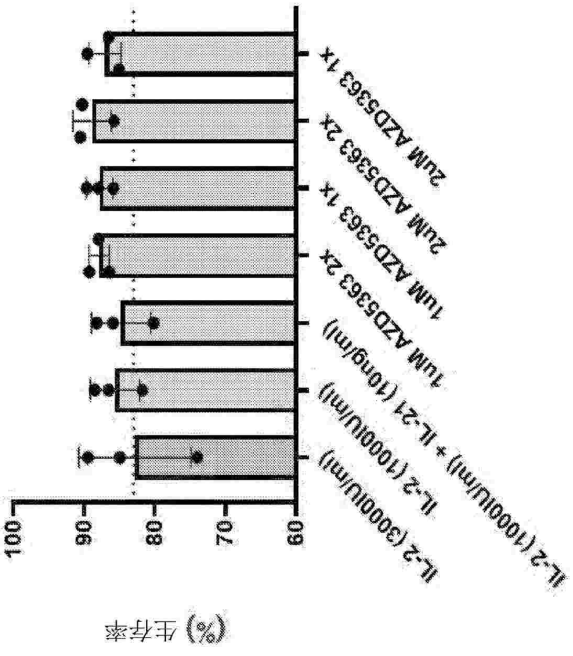
【図１０６Ｂ】



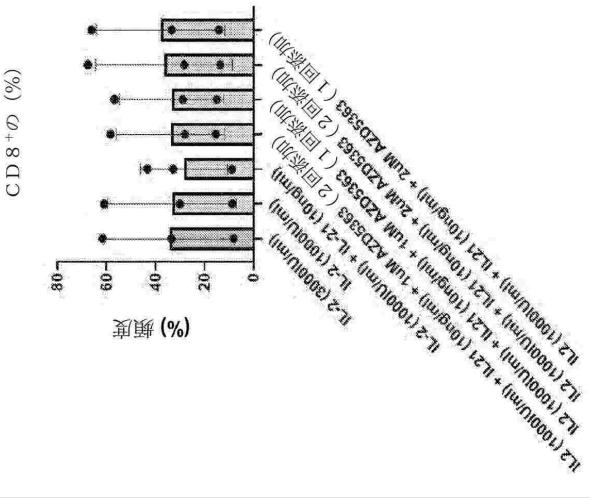
【図１０７Ａ】



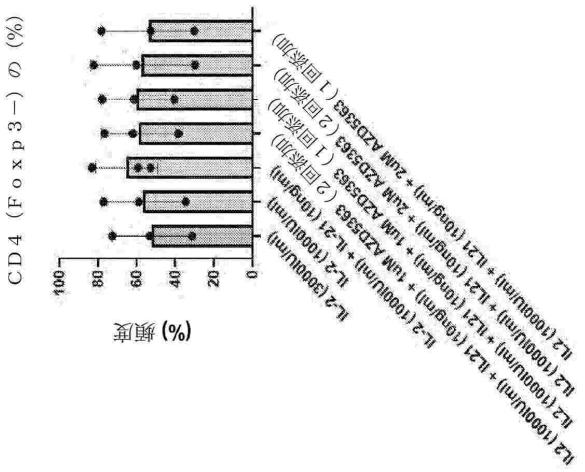
【図１０７Ｂ】



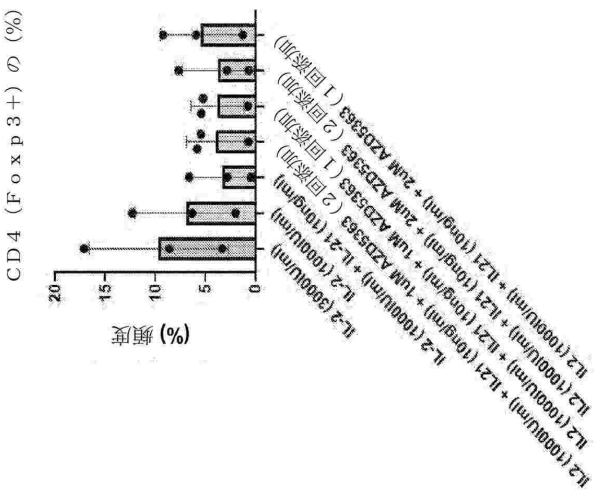
【図１０８Ａ】



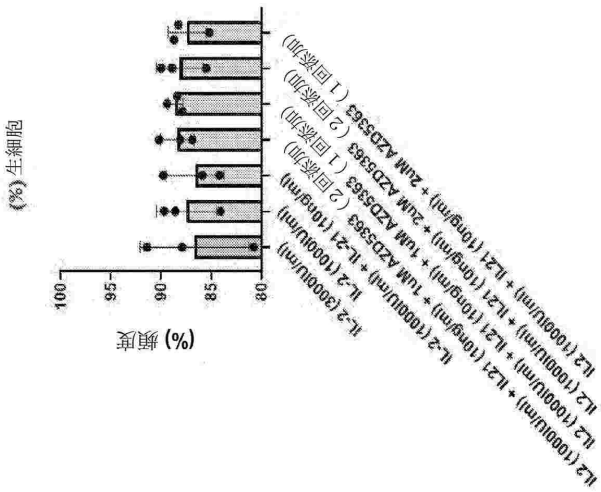
【図１０８Ｂ】



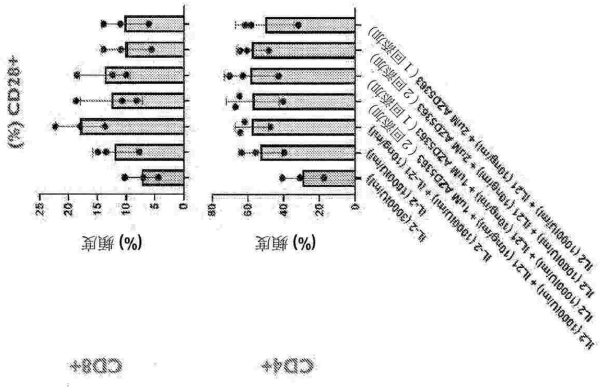
【図１０８Ｃ】



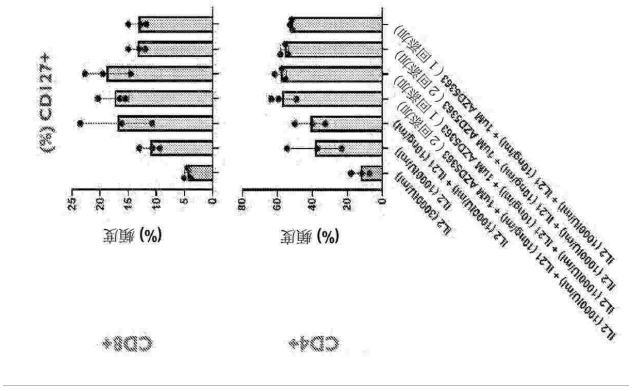
【図１０８Ｄ】



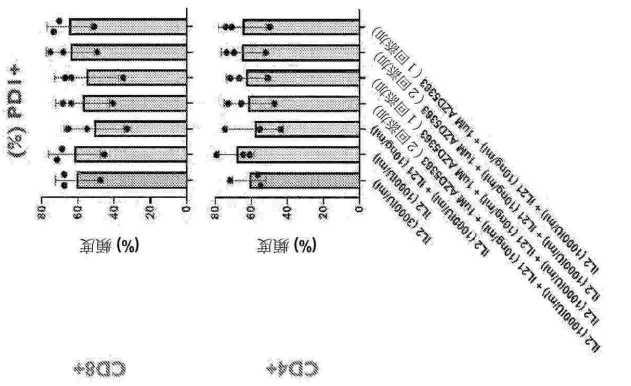
【図１０９Ａ】



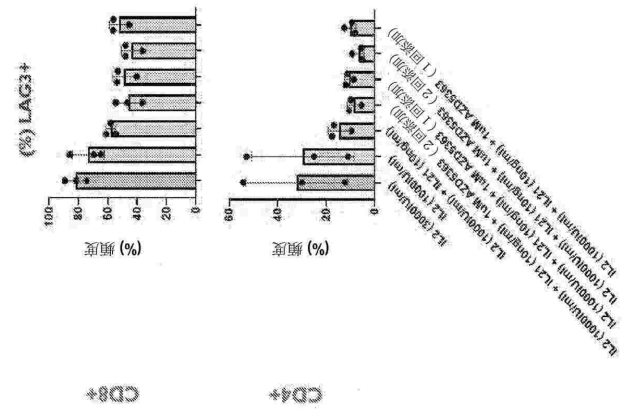
【図１０９Ｂ】



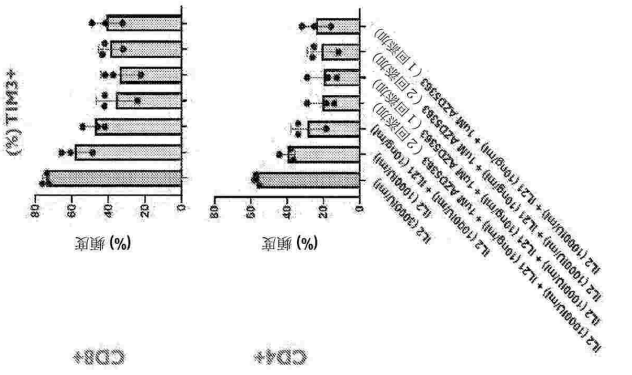
【図１０９Ｃ】



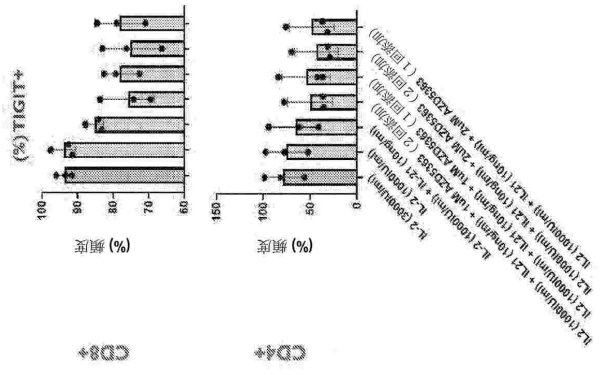
【図１０９Ｄ】



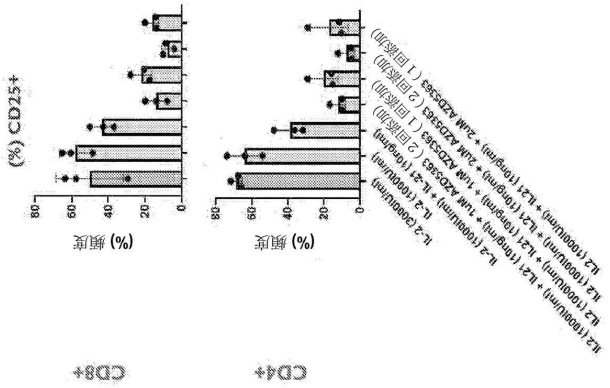
【図１０９Ｅ】



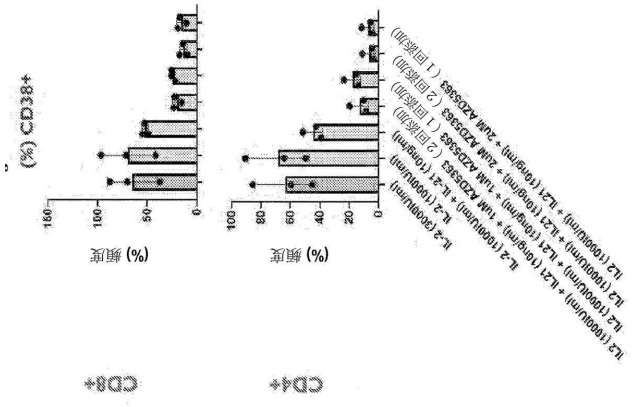
【図１０９Ｆ】



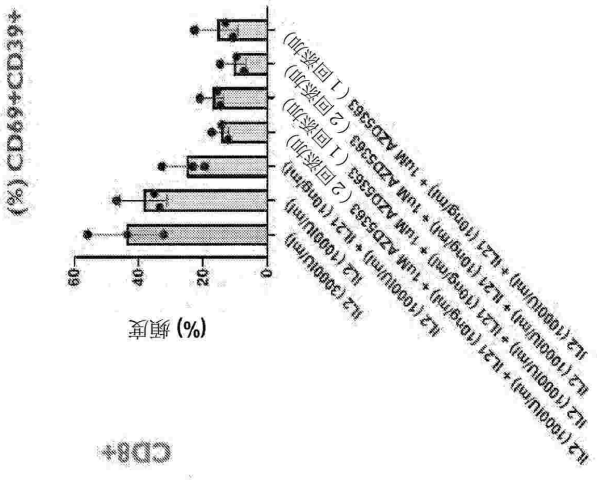
【図１１０Ａ】



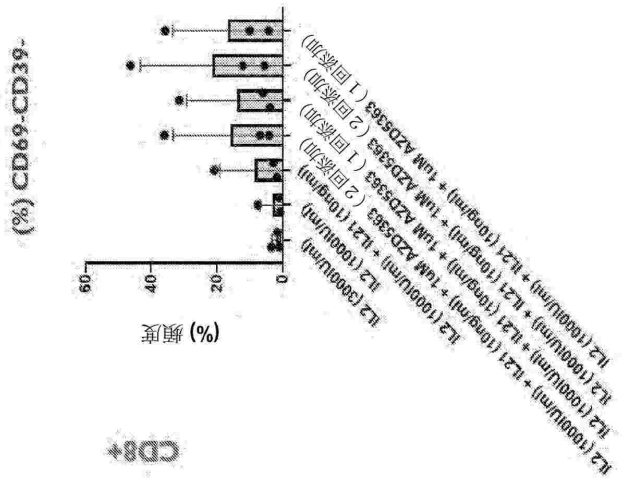
【図１１０Ｂ】



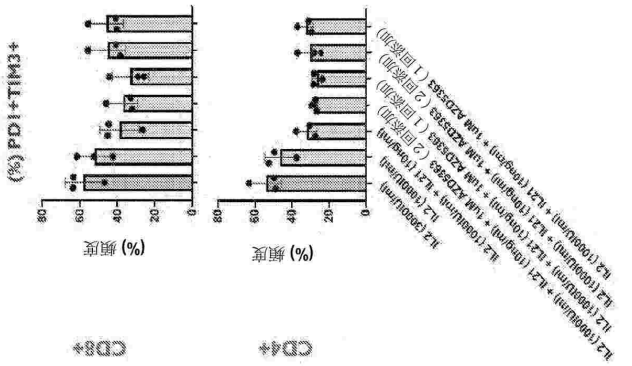
【図１１１Ａ】



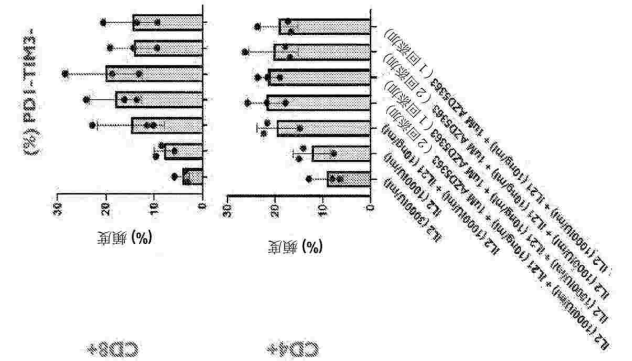
【図１１１Ｂ】



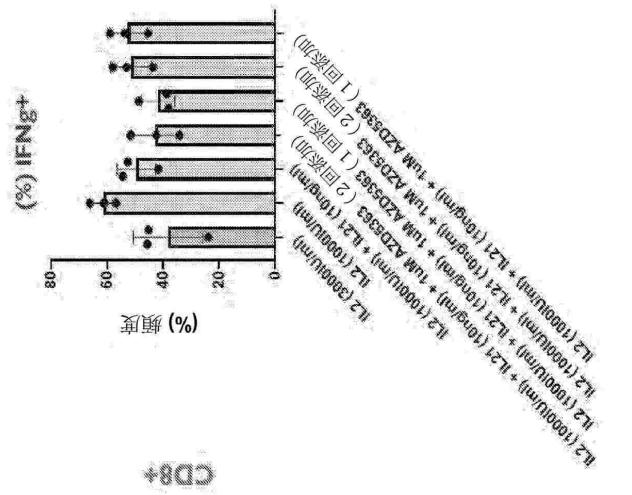
【図１１２Ａ】



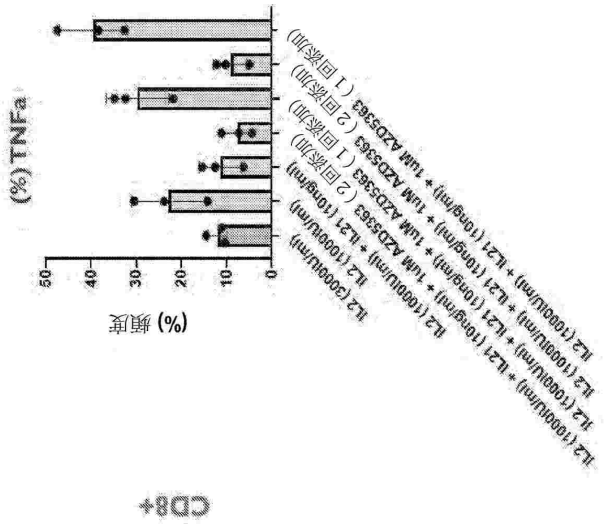
【図１１２Ｂ】



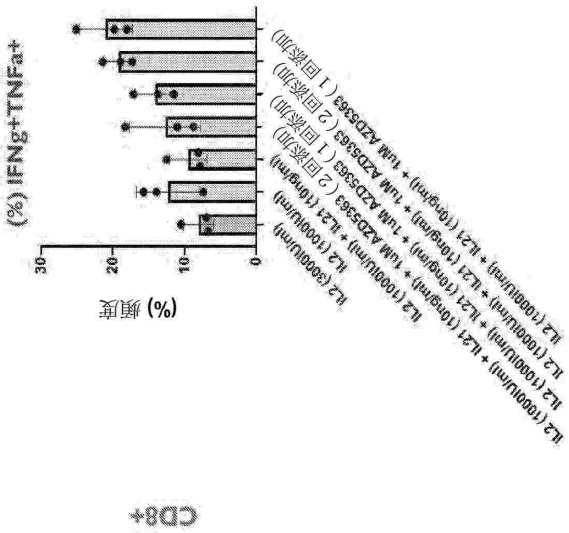
【図１１３Ａ】



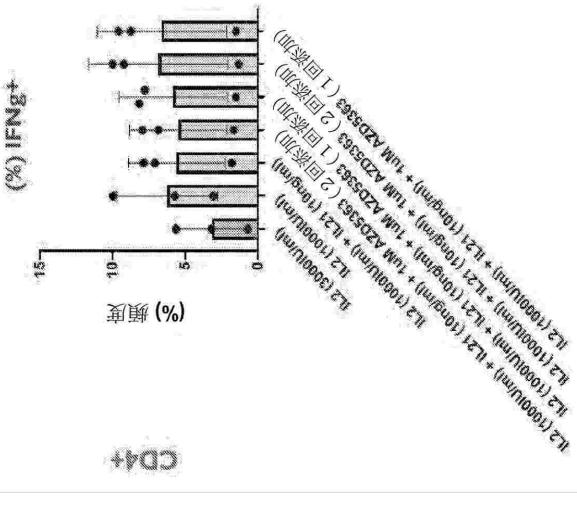
【図１１３Ｂ】



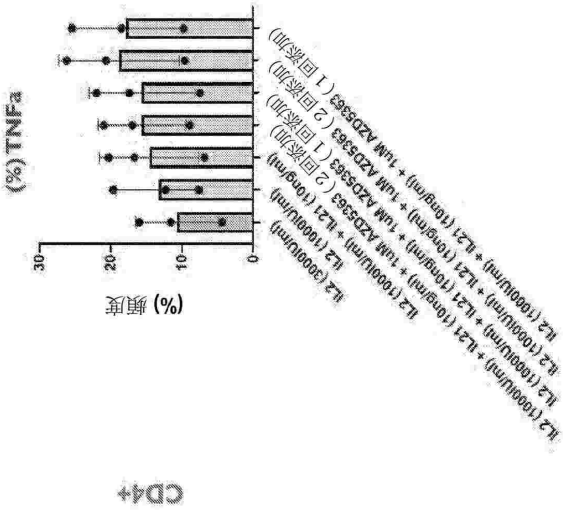
【図１１３Ｃ】



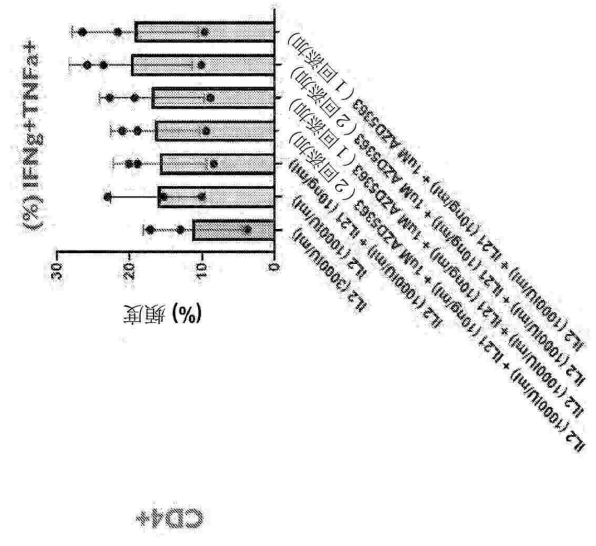
【図１１４Ａ】



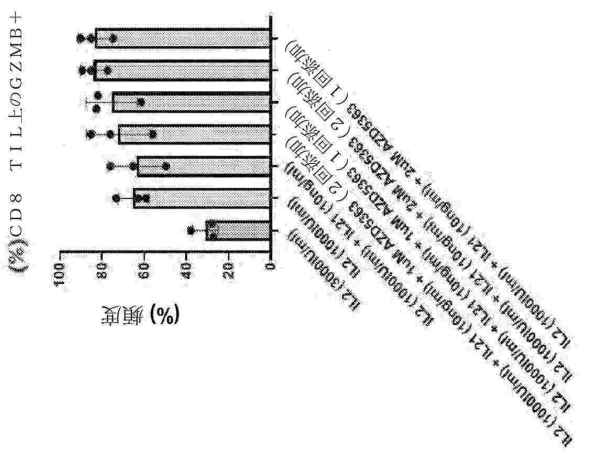
【図１１４Ｂ】



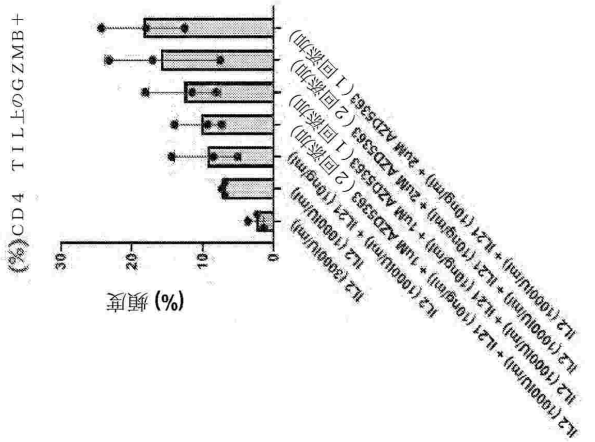
【図１１４Ｃ】



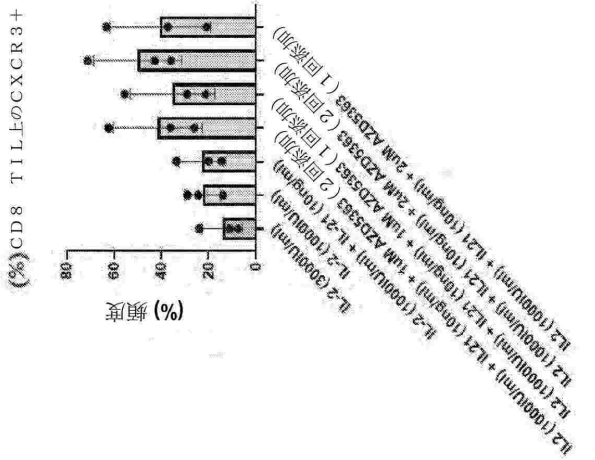
【図１１５Ａ】



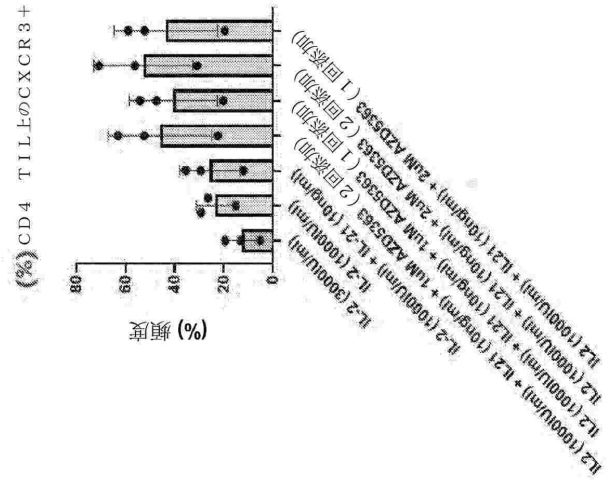
【図１１５Ｂ】



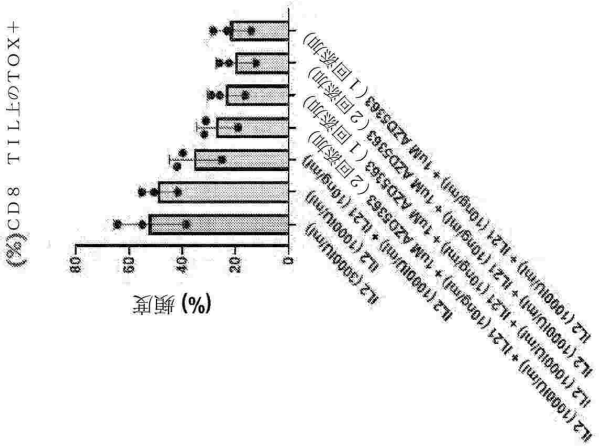
【図１１６Ａ】



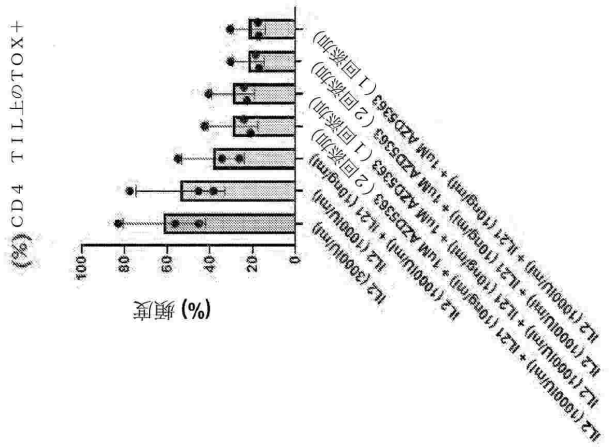
【図１１６Ｂ】



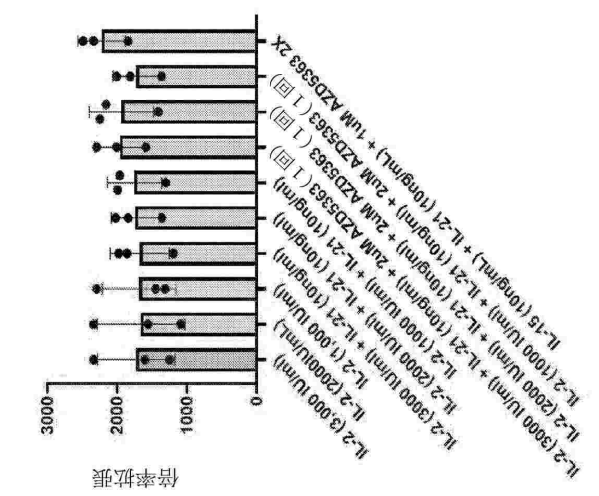
【図１１７Ａ】



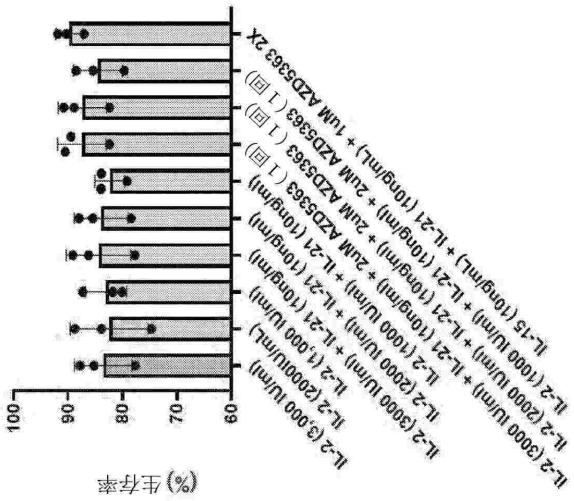
【図１１７Ｂ】



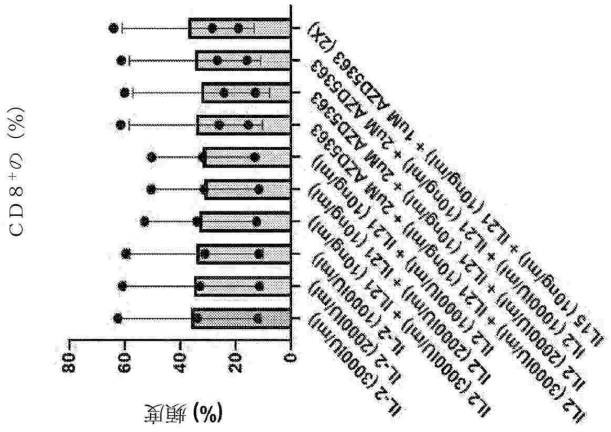
【図１１８Ａ】



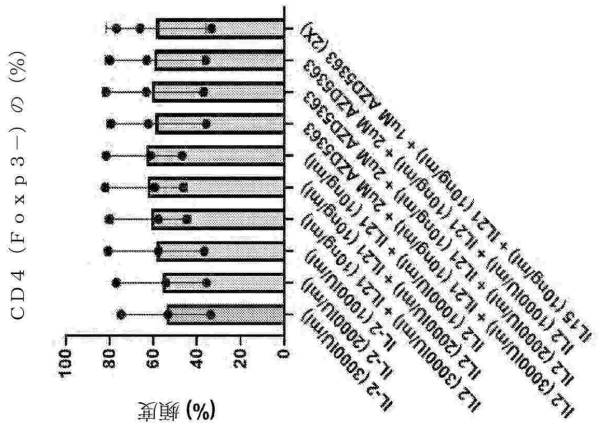
【図１１８Ｂ】



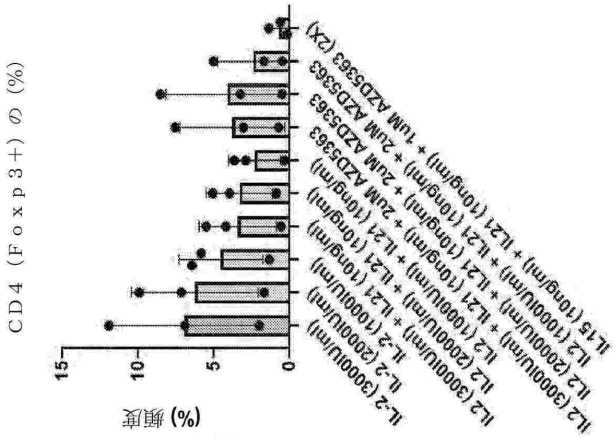
【図１１９Ａ】



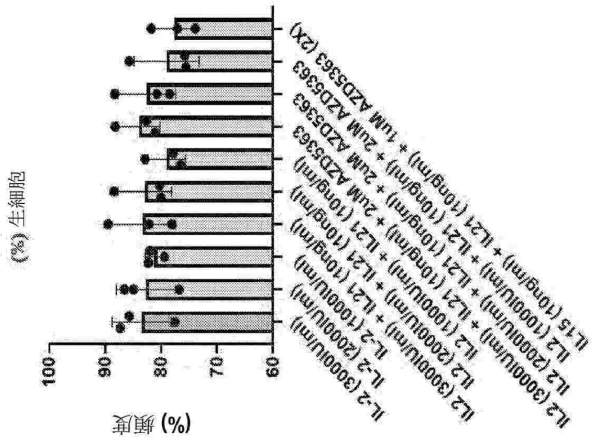
【図１１９Ｂ】



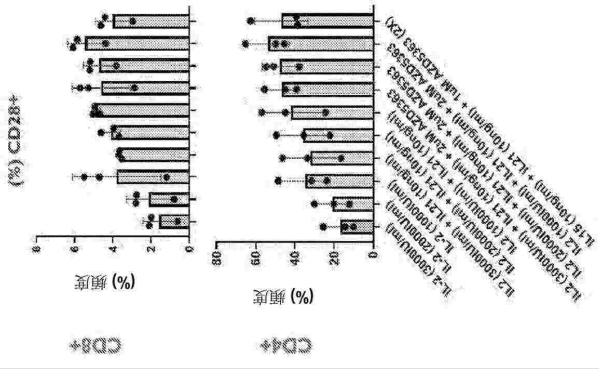
【図１１９Ｃ】



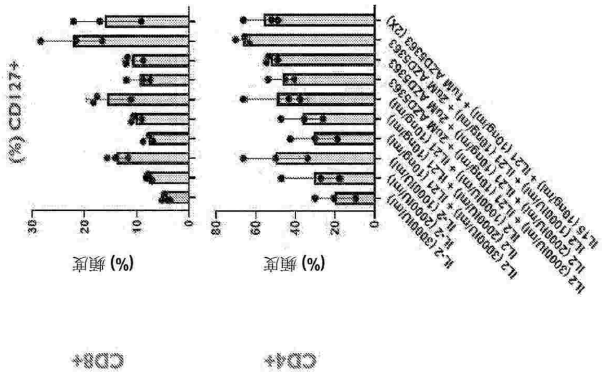
【図１１９Ｄ】



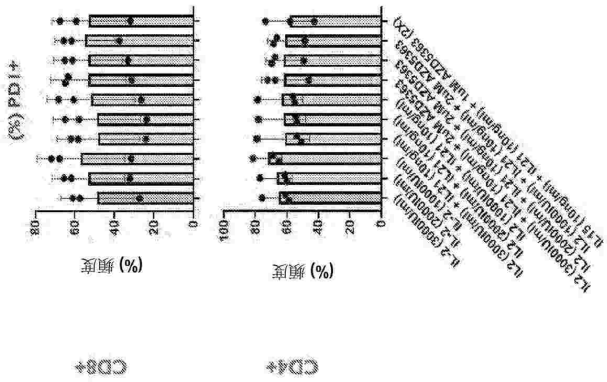
【図１２０Ａ】



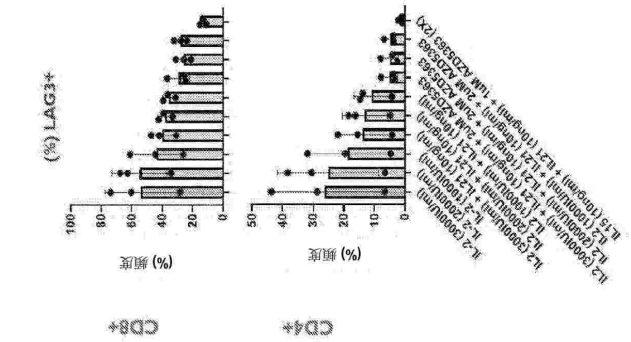
【図１２０Ｂ】



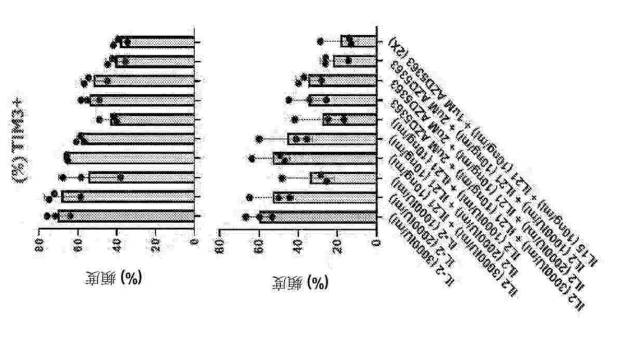
【図１２０Ｃ】



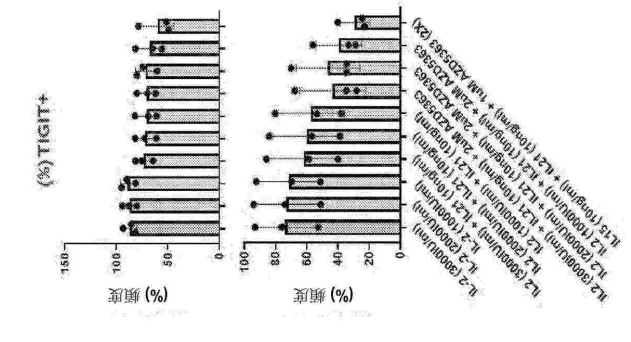
【図１２０Ｄ】



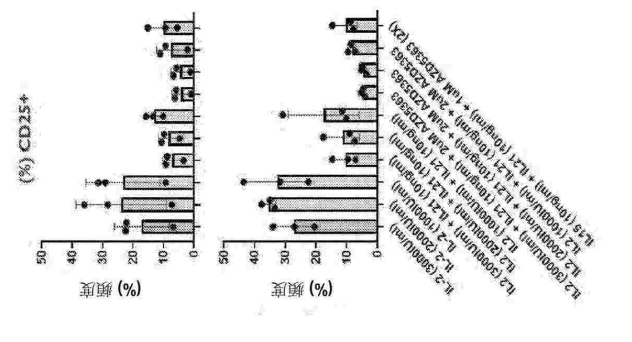
【図１２０Ｅ】



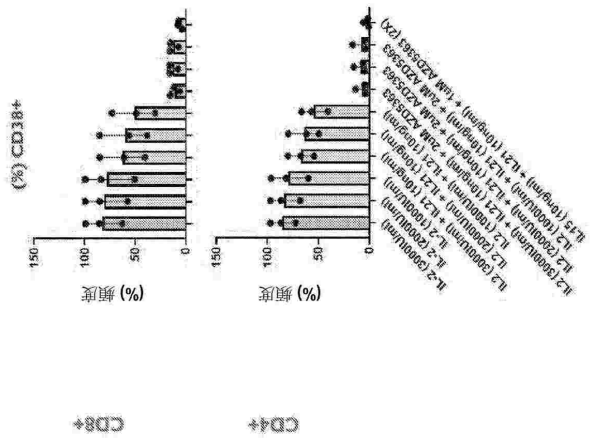
【図１２０Ｆ】



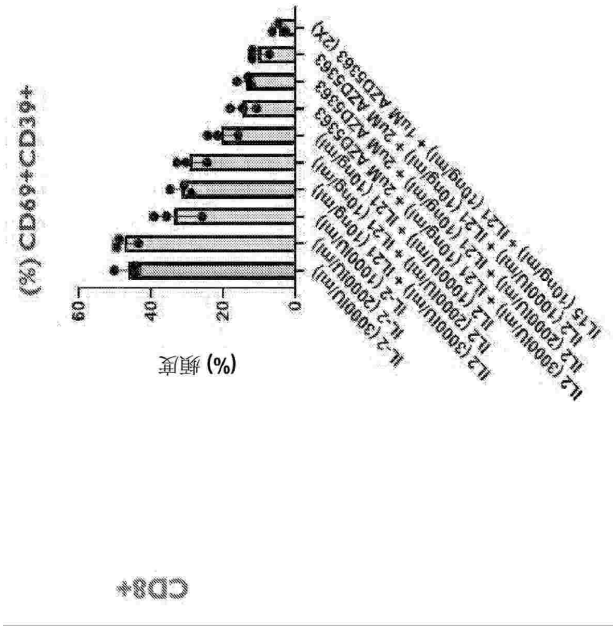
【図１２１Ａ】



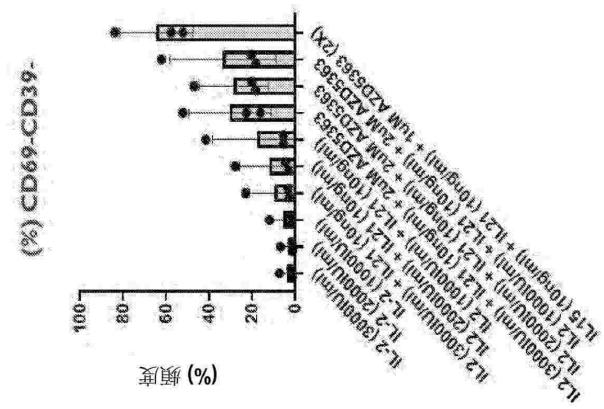
【図１２１Ｂ】



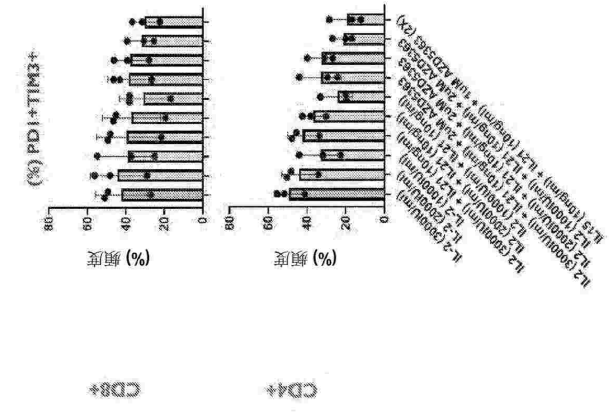
【図１２２Ａ】



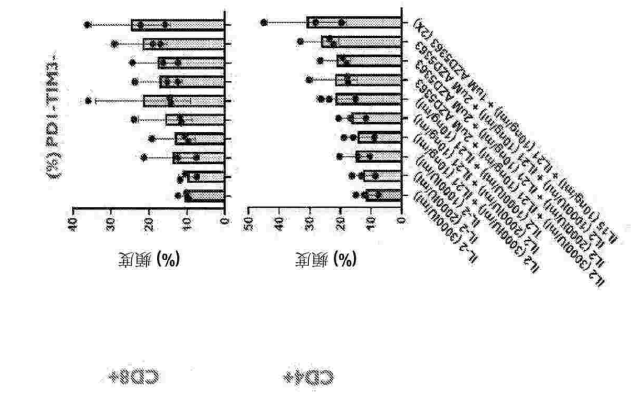
【図１２２Ｂ】



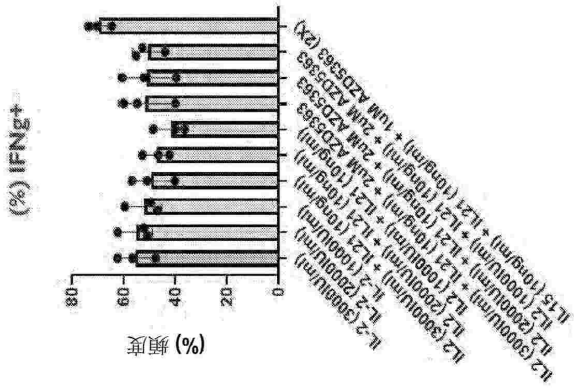
【図１２３Ａ】



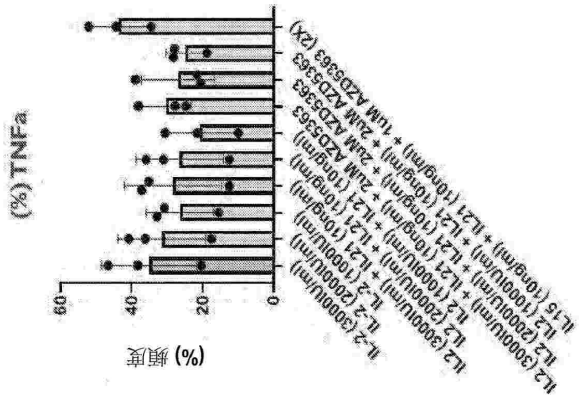
【図１２３Ｂ】



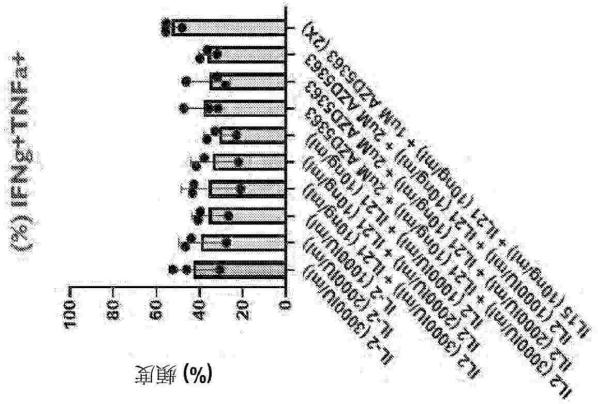
【図１２４Ａ】



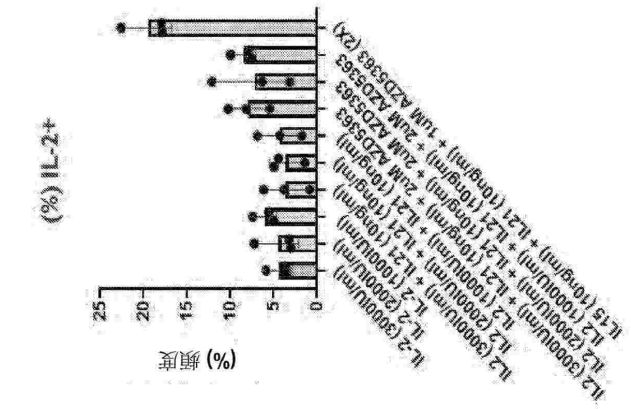
【図１２４Ｂ】



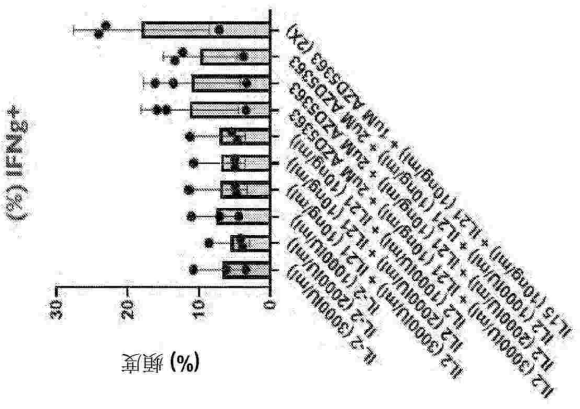
【図１２４Ｃ】



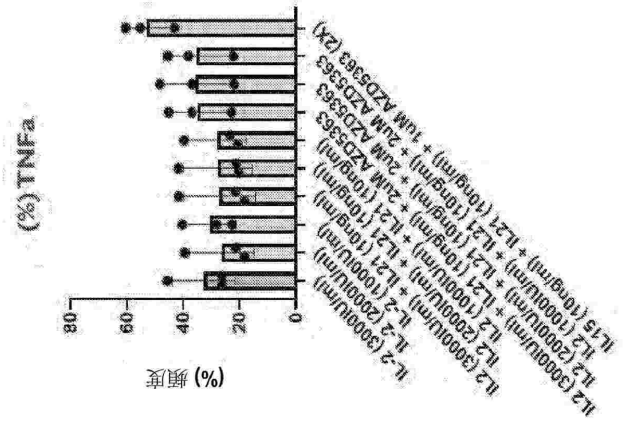
【図１２４Ｄ】



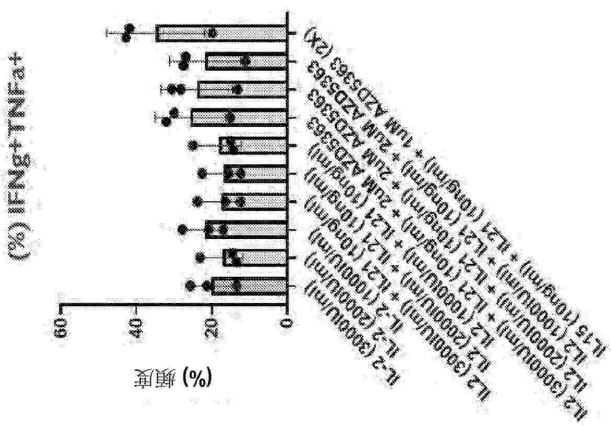
【図１２５Ａ】



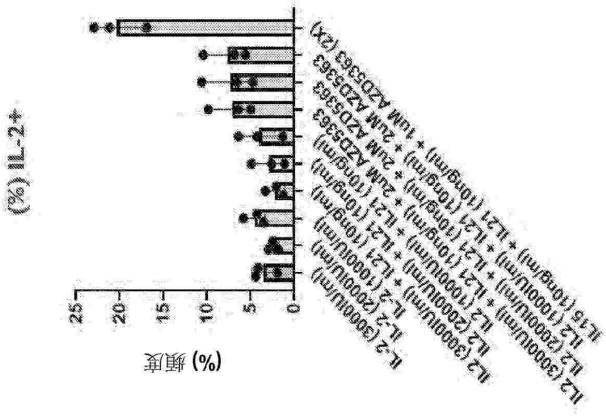
【図１２５Ｂ】



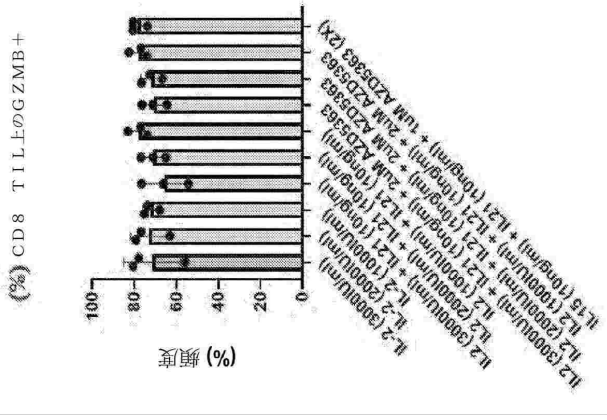
【図１２５Ｃ】



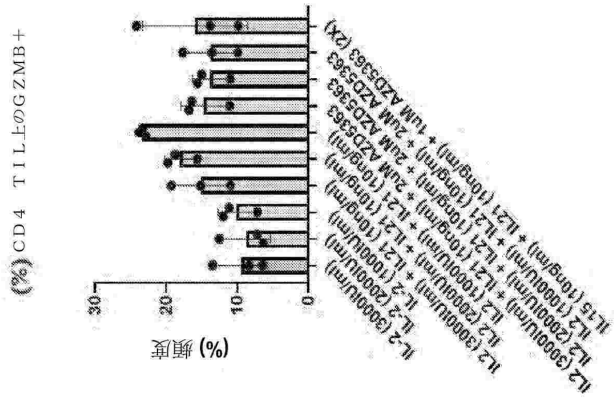
【図１２５Ｄ】



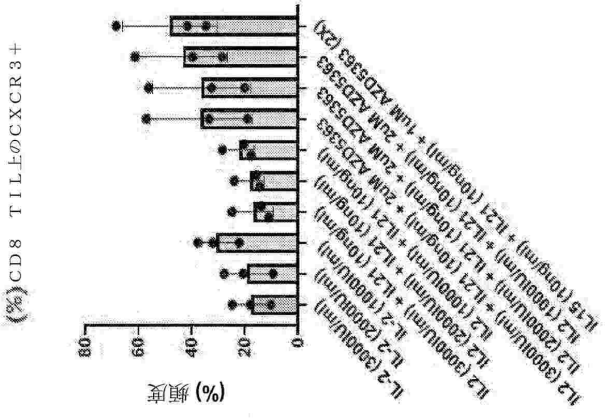
【図１２６Ａ】



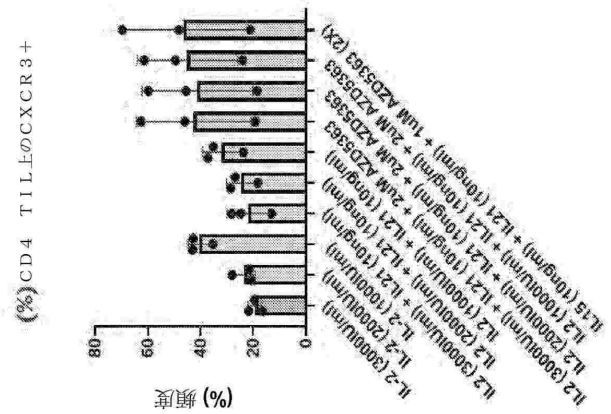
【図１２６Ｂ】



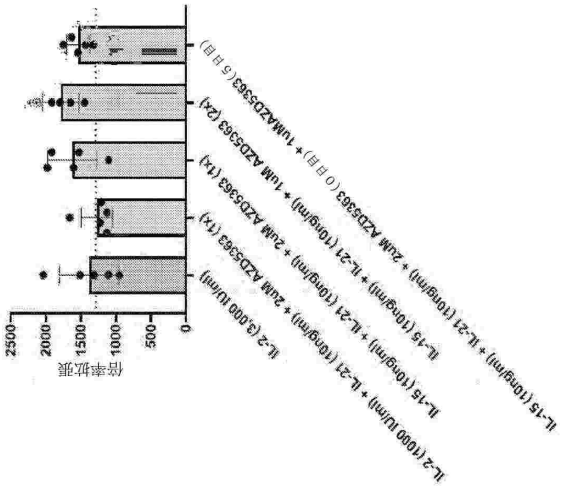
【図１２７Ａ】



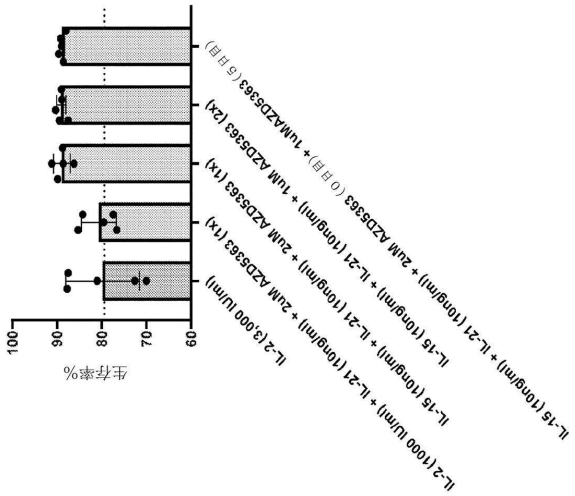
【図１２７Ｂ】



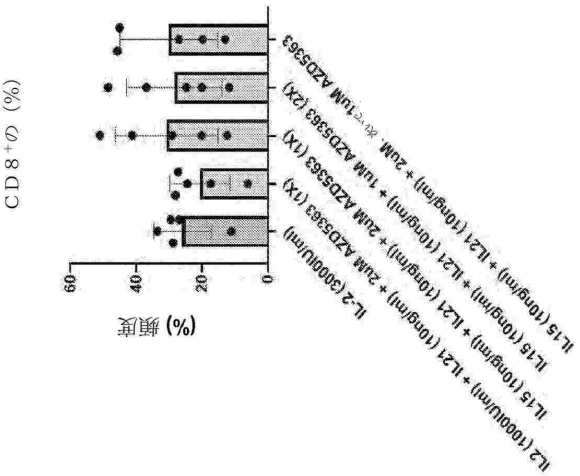
【図１２８Ａ】



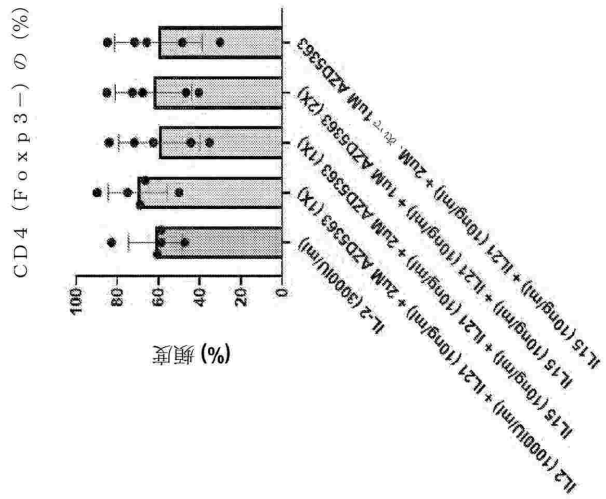
【図１２８Ｂ】



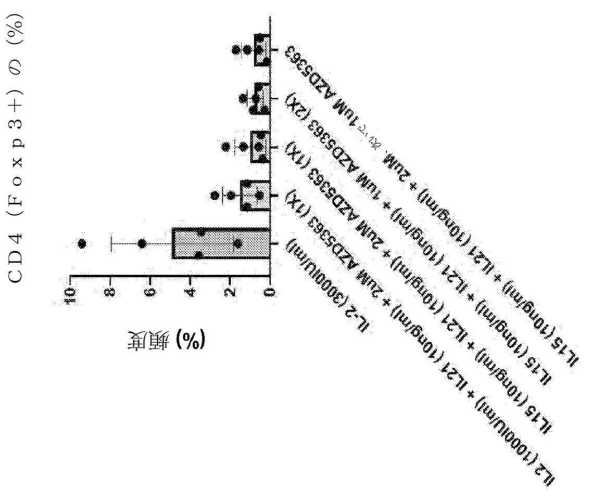
【図１２９Ａ】



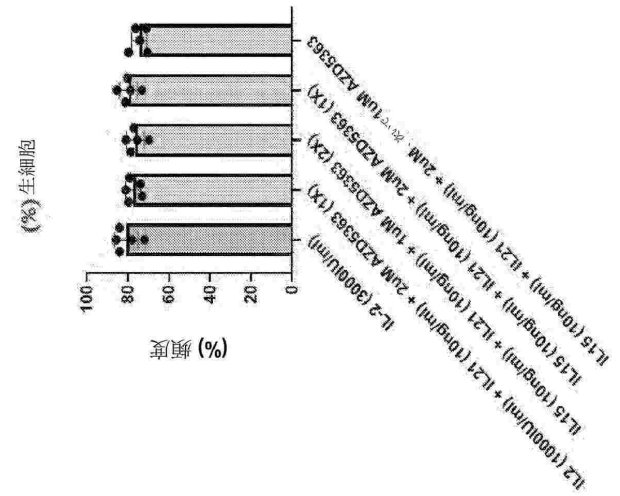
【図１２９Ｂ】



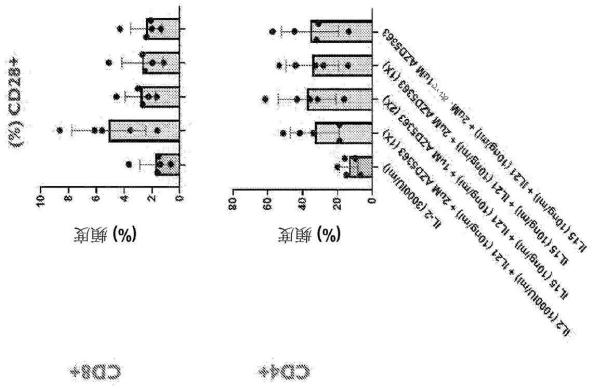
【図１２９Ｃ】



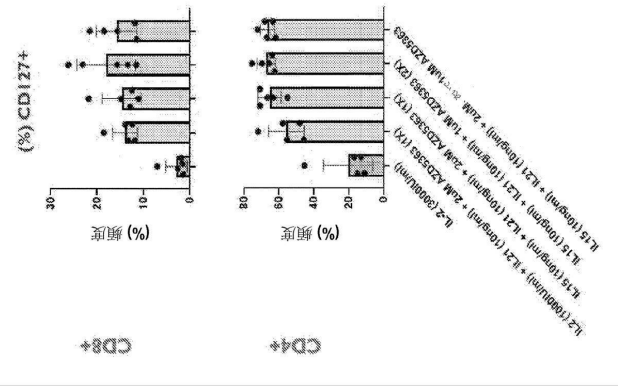
【図１２９Ｄ】



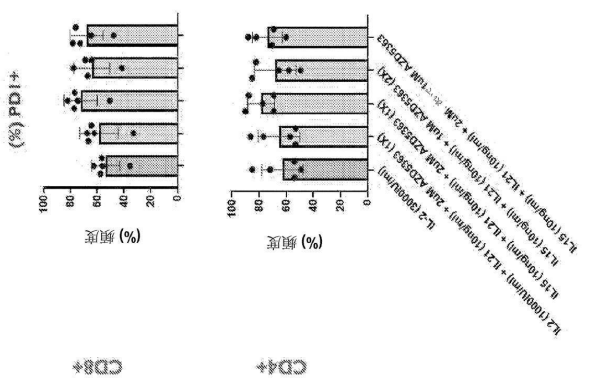
【図１３０Ａ】



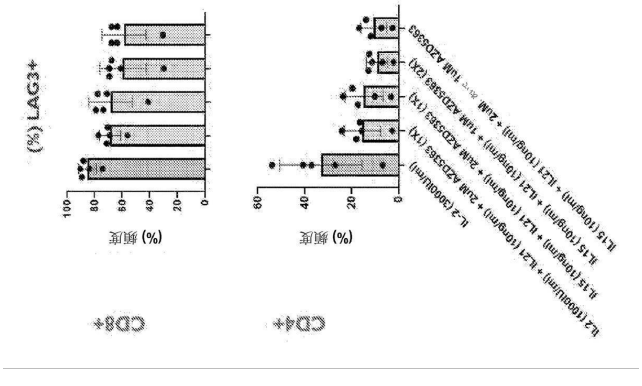
【図１３０Ｂ】



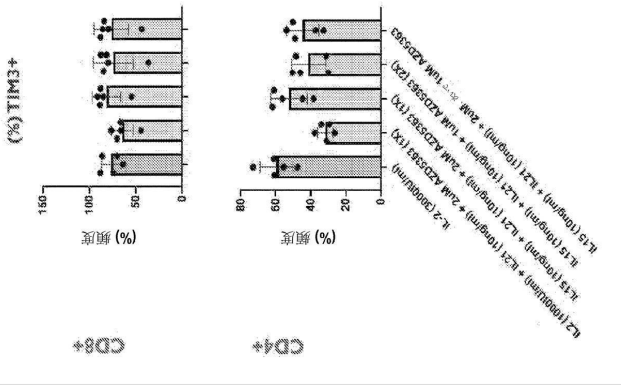
【図１３０Ｃ】



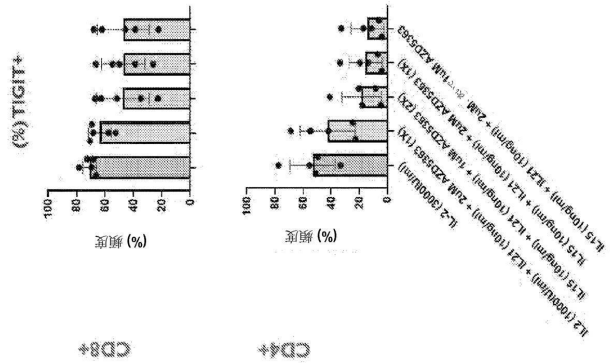
【図１３０Ｄ】



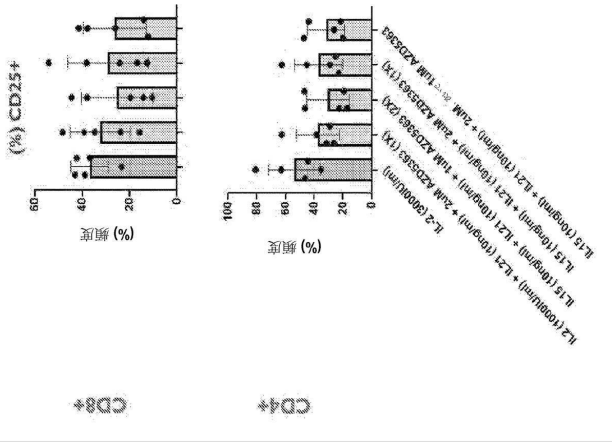
【図１３０Ｅ】



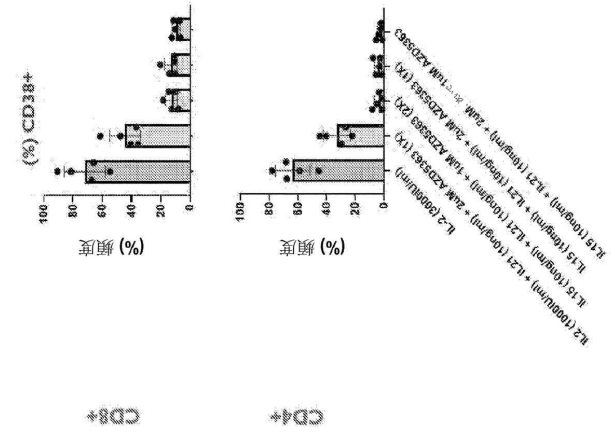
【図１３０Ｆ】



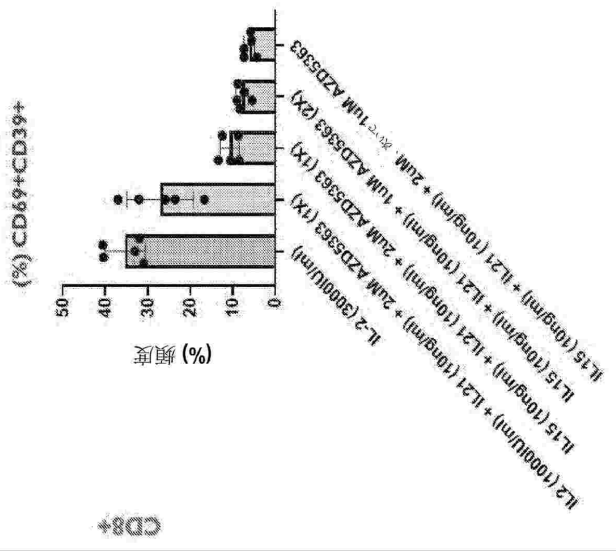
【図１３１Ａ】



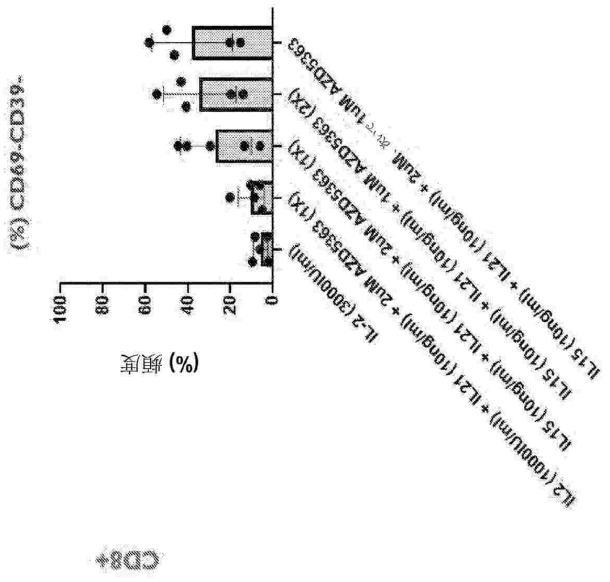
【図１３１Ｂ】



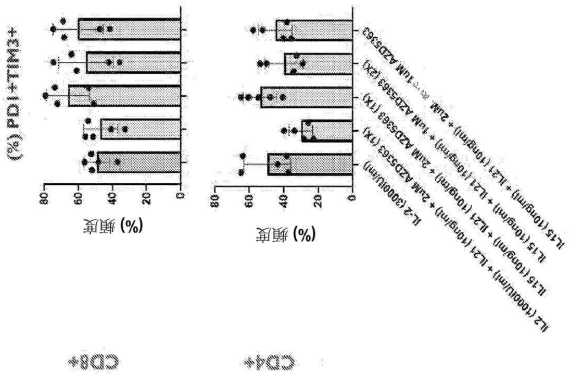
【図１３２Ａ】



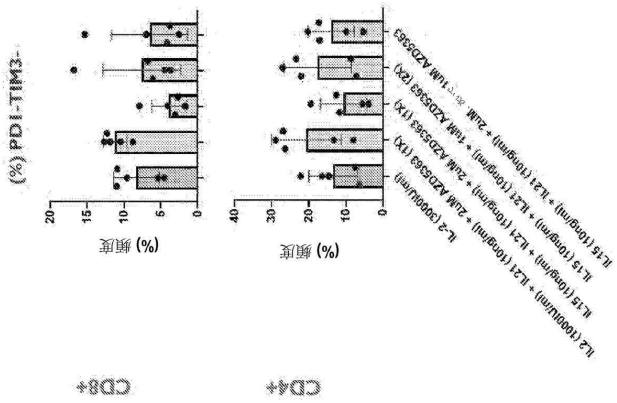
【図１３２Ｂ】



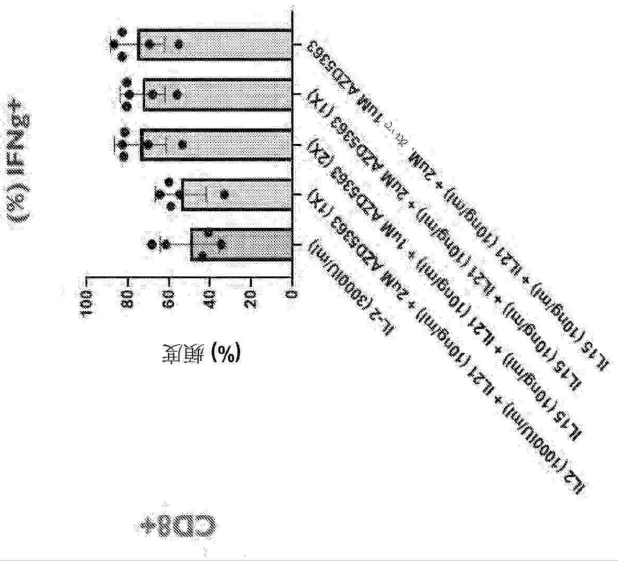
【図１３３Ａ】



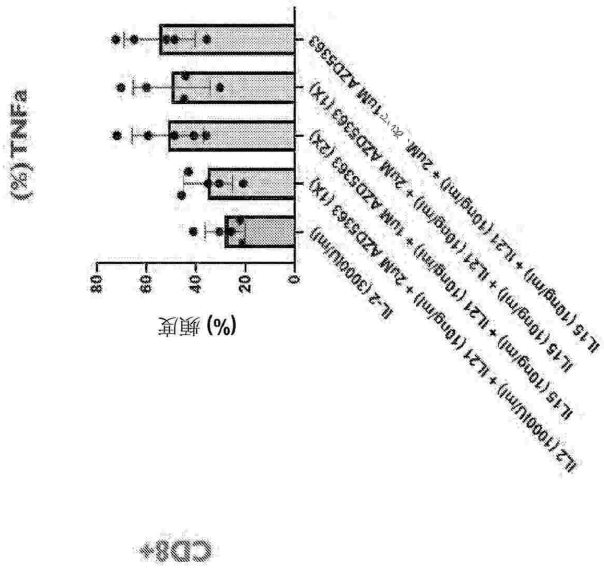
【図１３３Ｂ】



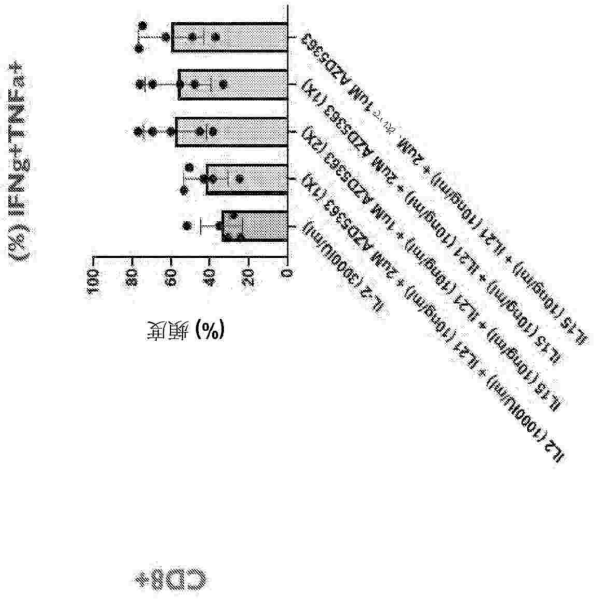
【図１３４Ａ】



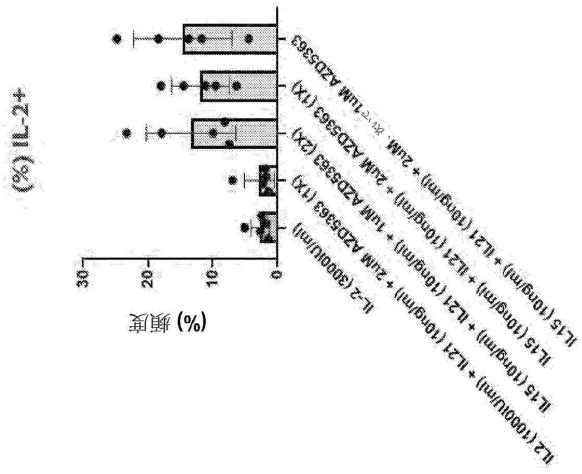
【図１３４Ｂ】



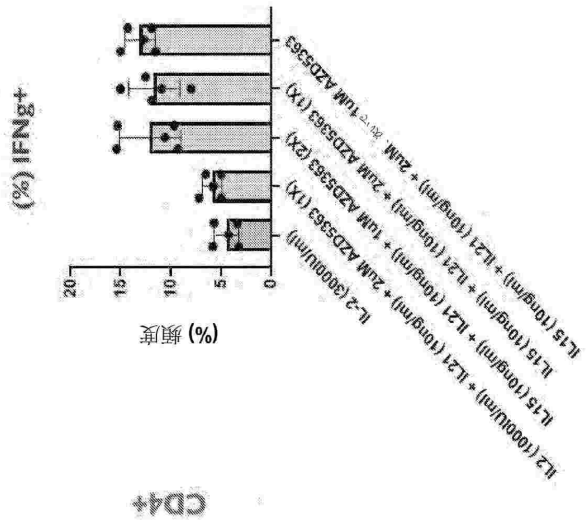
【図１３４Ｃ】



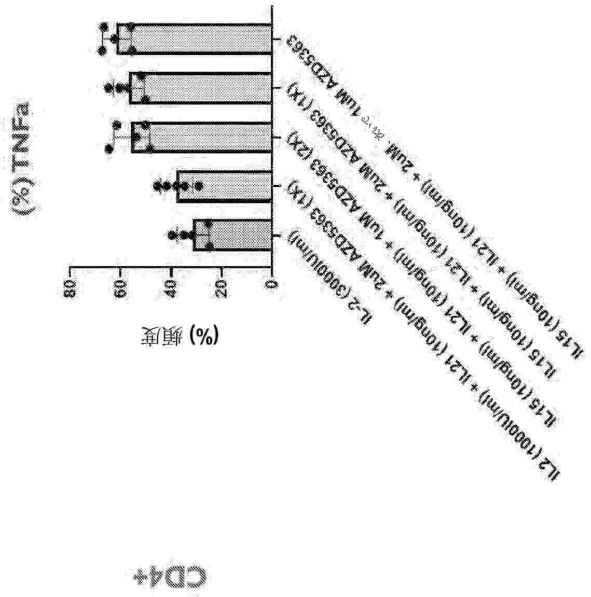
【図１３４Ｄ】



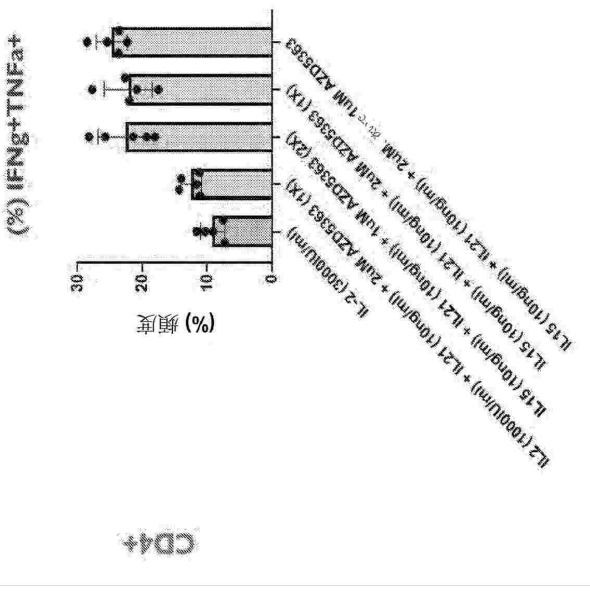
【図１３５Ａ】



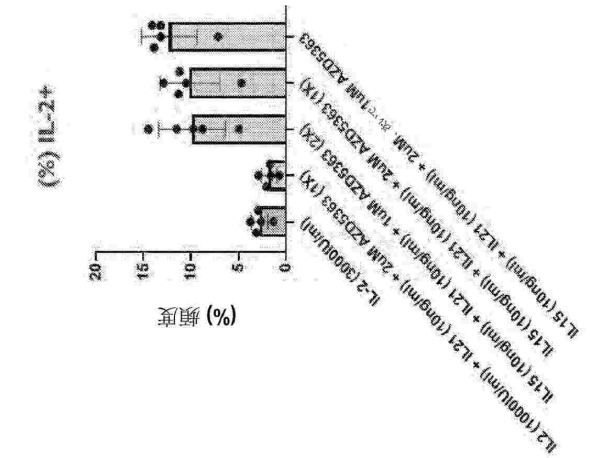
【図１３５Ｂ】



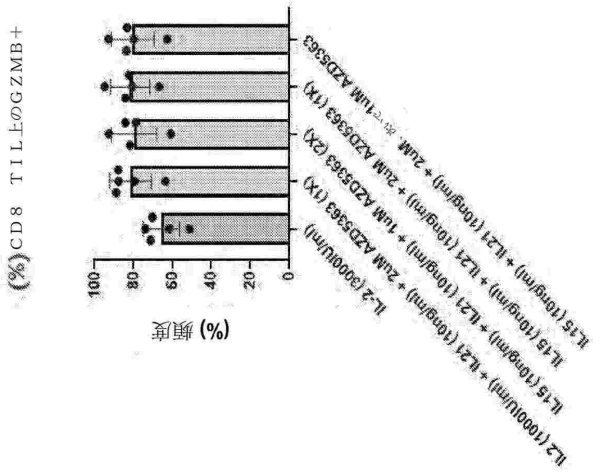
【図１３５Ｃ】



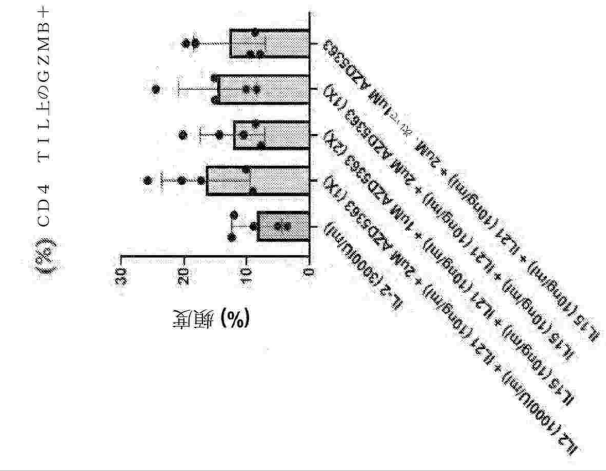
【図１３５Ｄ】



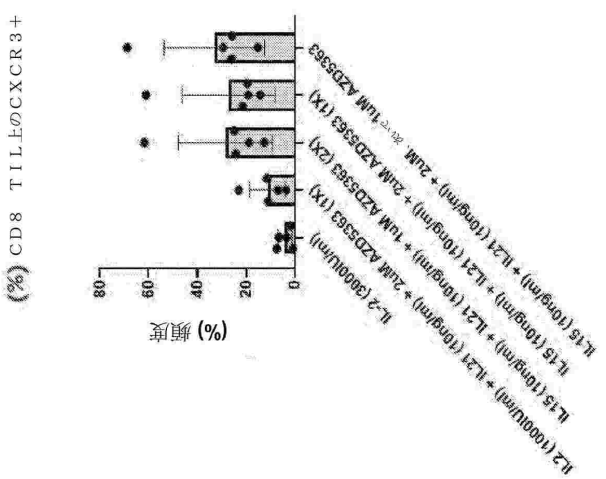
【図１３６Ａ】



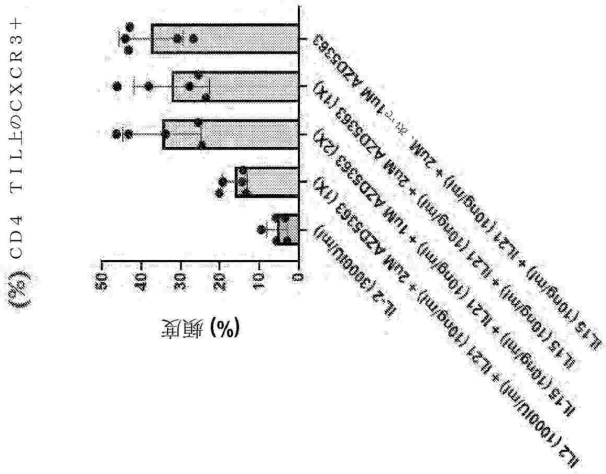
【図１３６Ｂ】



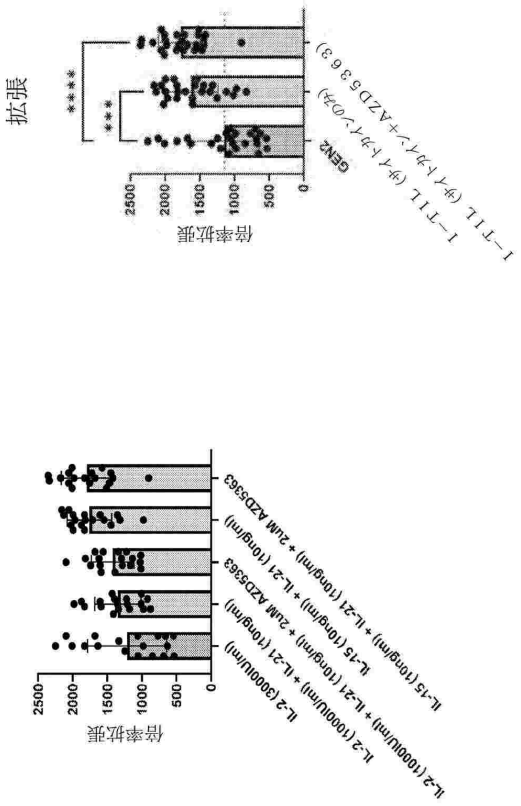
【図１３７Ａ】



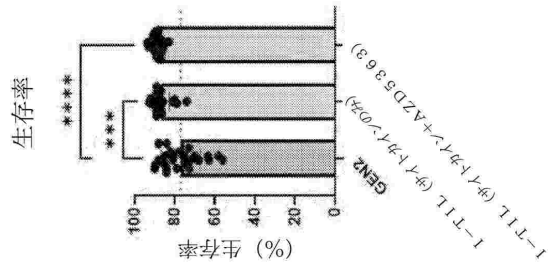
【図１３７Ｂ】



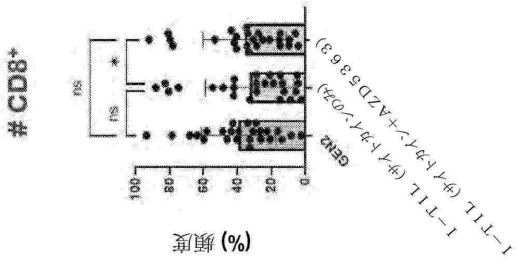
【図１３８Ａ】

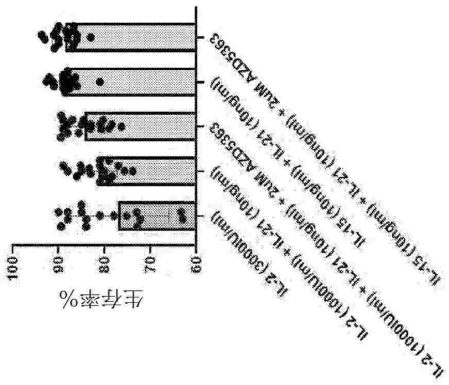


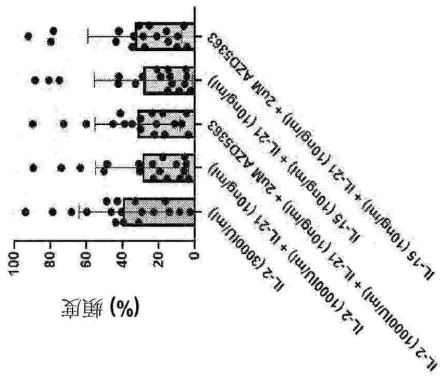
【図１３８Ｂ】



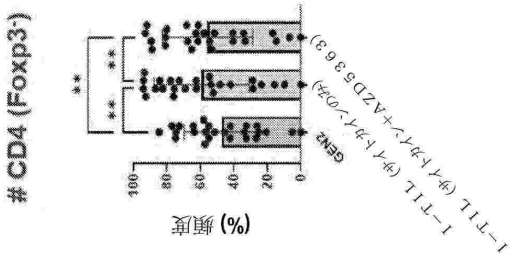
【図１３９Ａ】



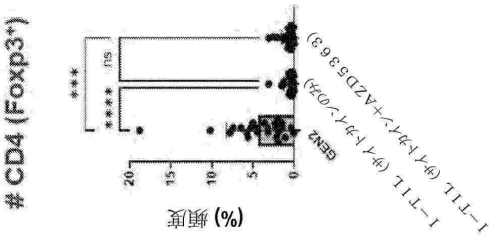


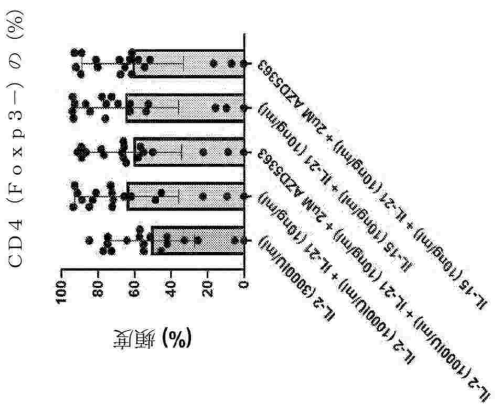


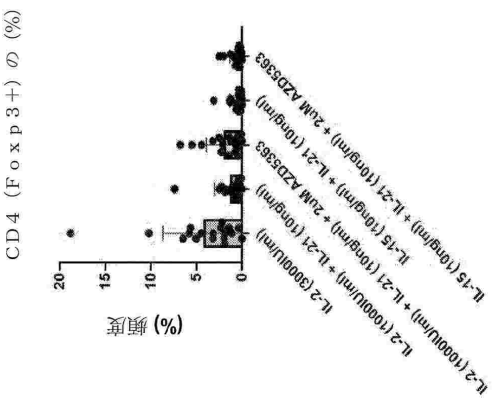
【図１３９Ｂ】



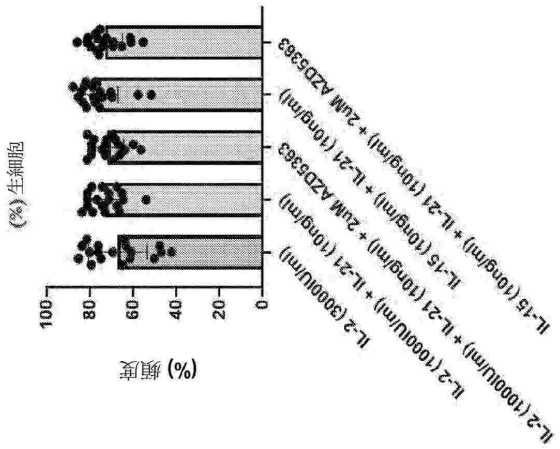
【図１３９Ｃ】



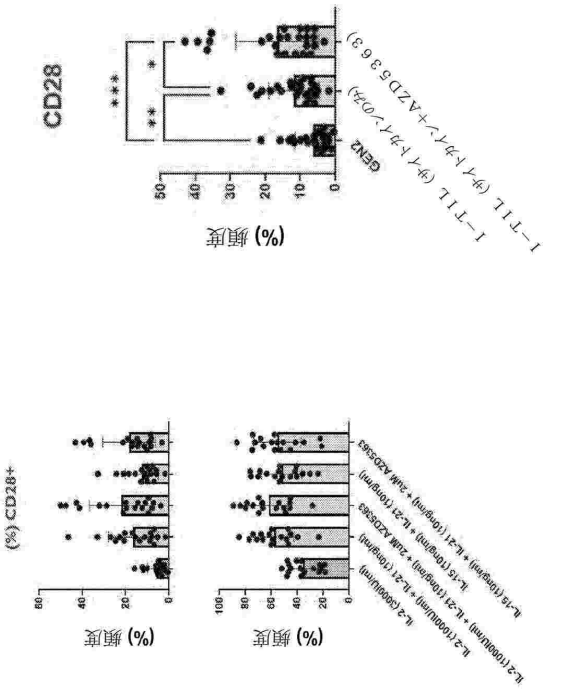




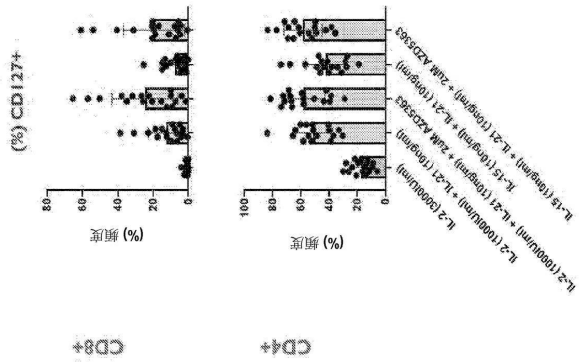
【図１３９Ｄ】



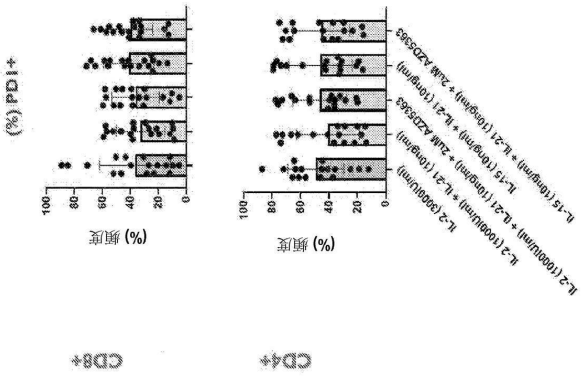
【図１４０Ａ】



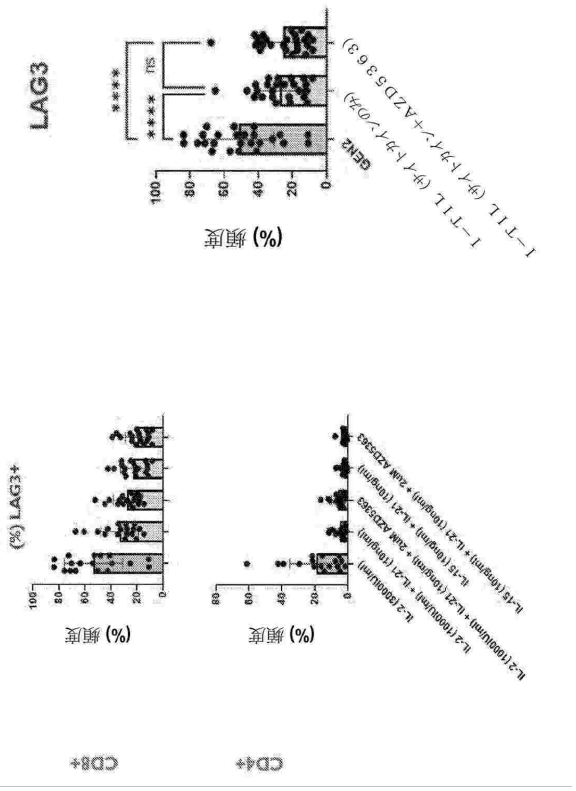
【図１４０Ｂ】



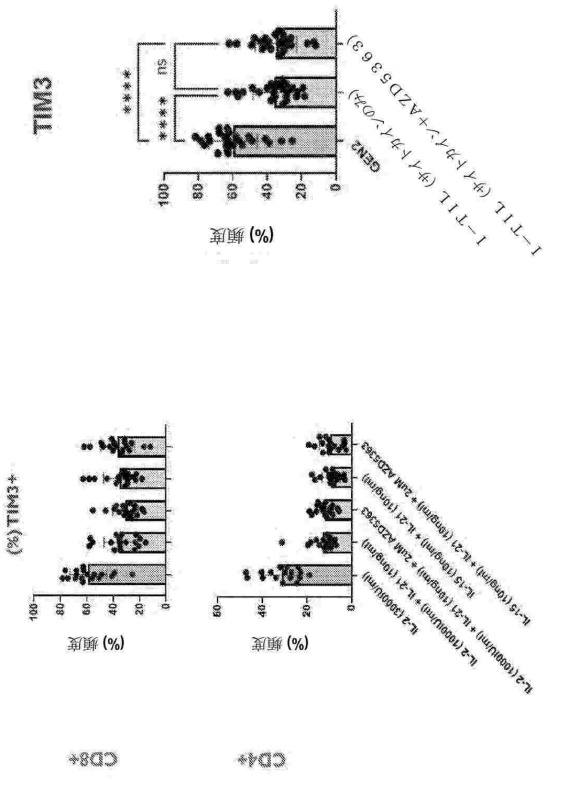
【図１４０Ｃ】



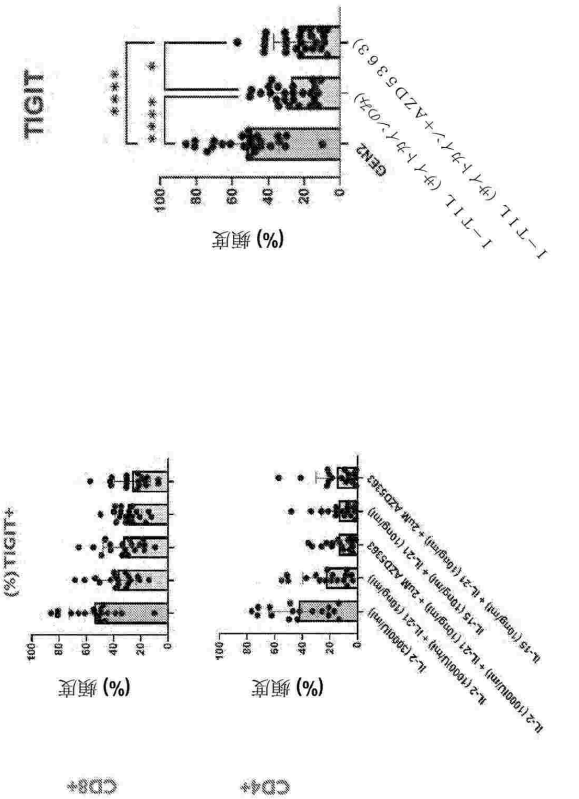
【図１４０Ｄ】



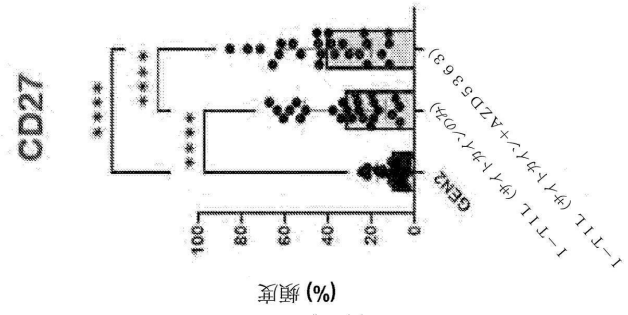
【図１４０Ｅ】



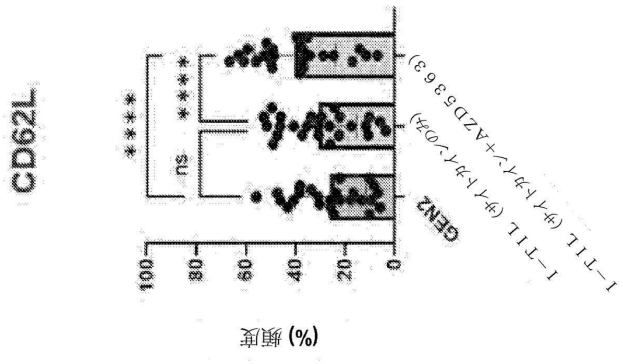
【図１４０Ｆ】



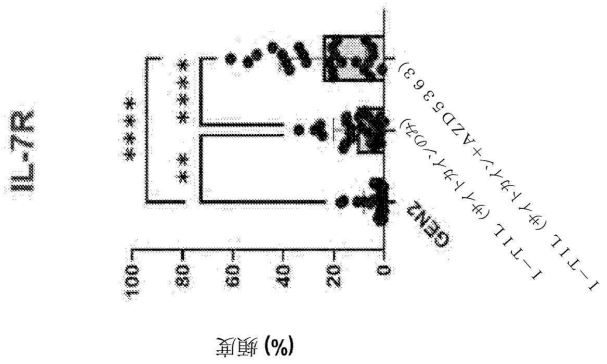
【図１４０Ｇ】



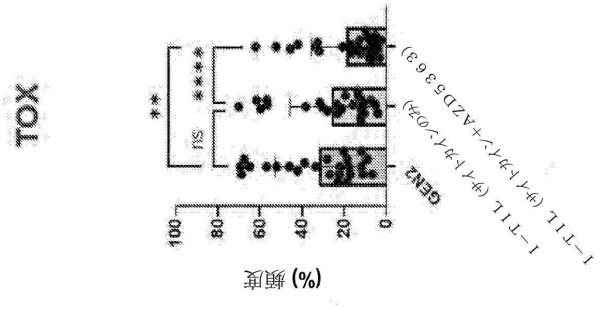
【図１４０Ｈ】



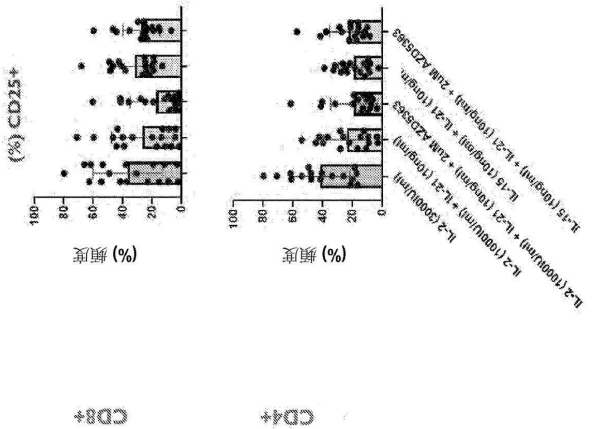
【図１４０Ｉ】



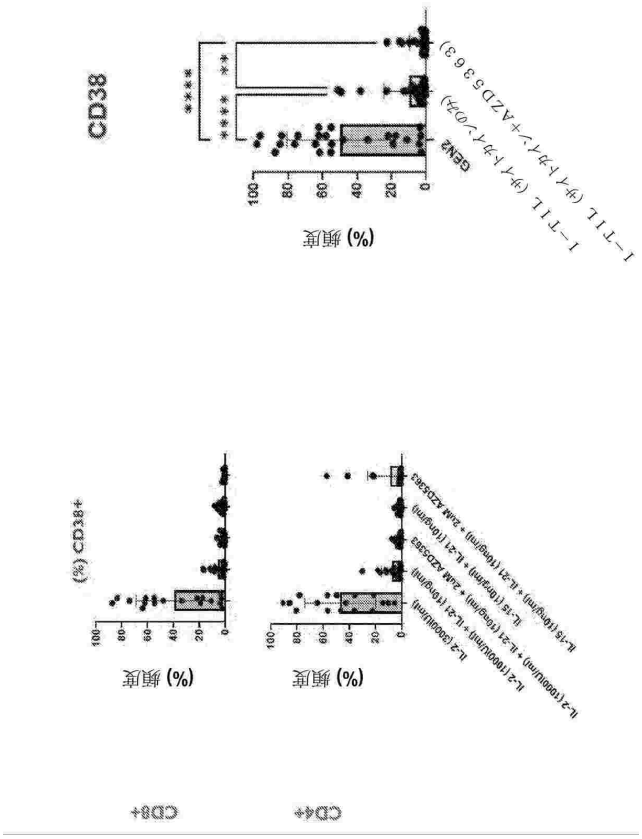
【図１４０Ｊ】



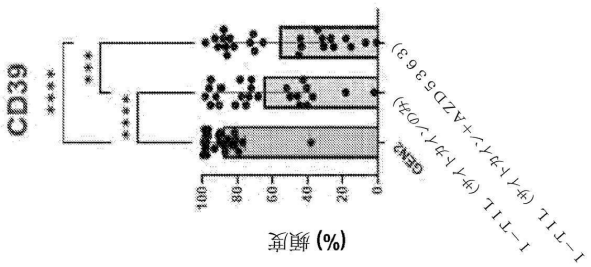
【図１４１Ａ】



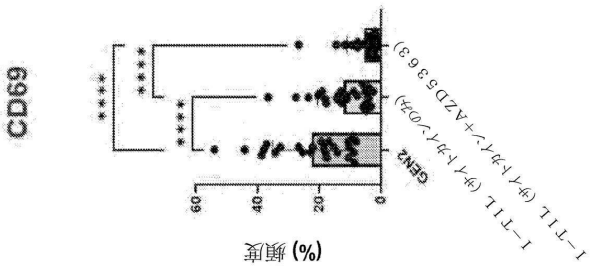
【図１４１Ｂ】



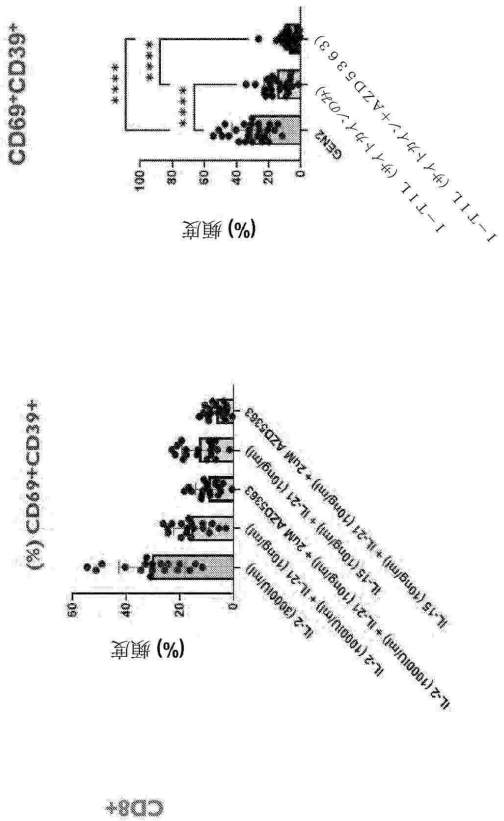
【図１４１Ｃ】



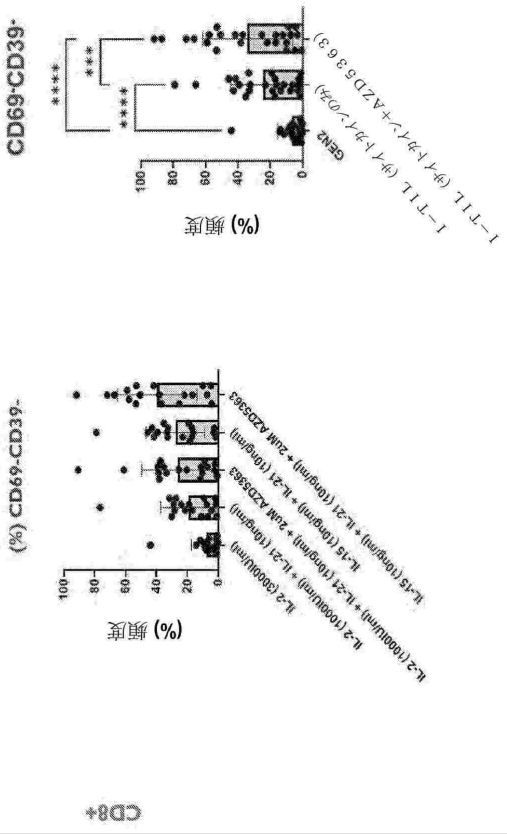
【図１４１Ｄ】



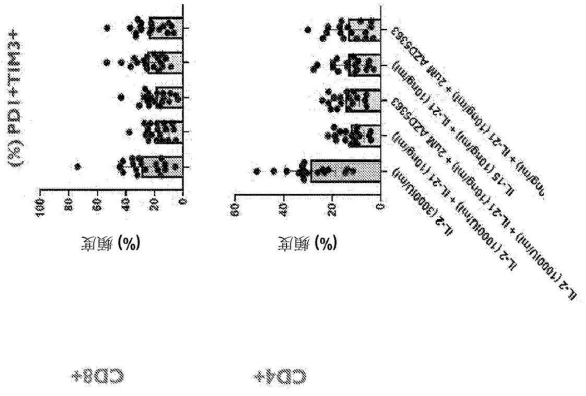
【図１４２Ａ】



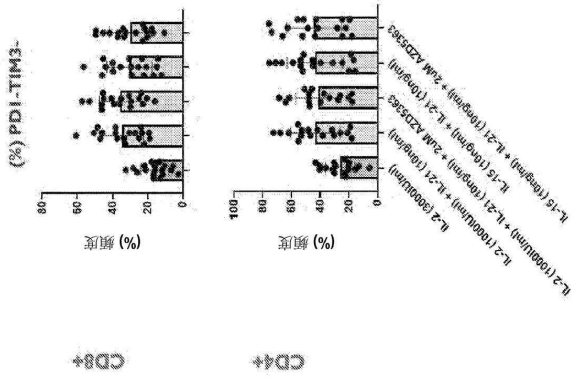
【図１４２Ｂ】



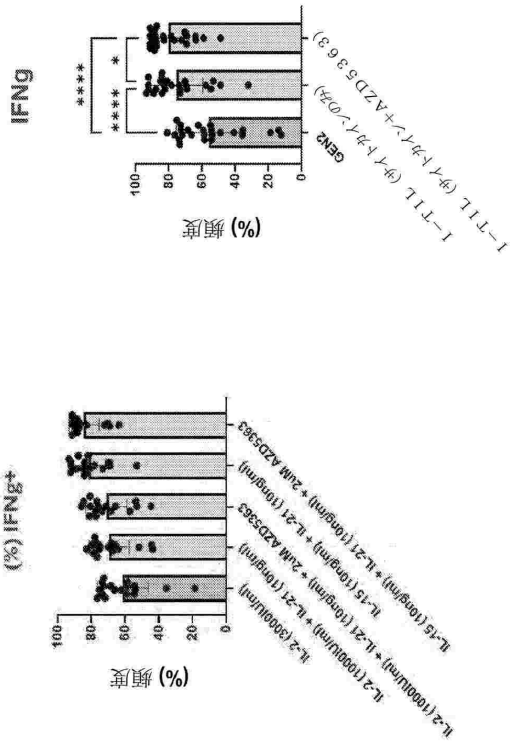
【図１４３Ａ】



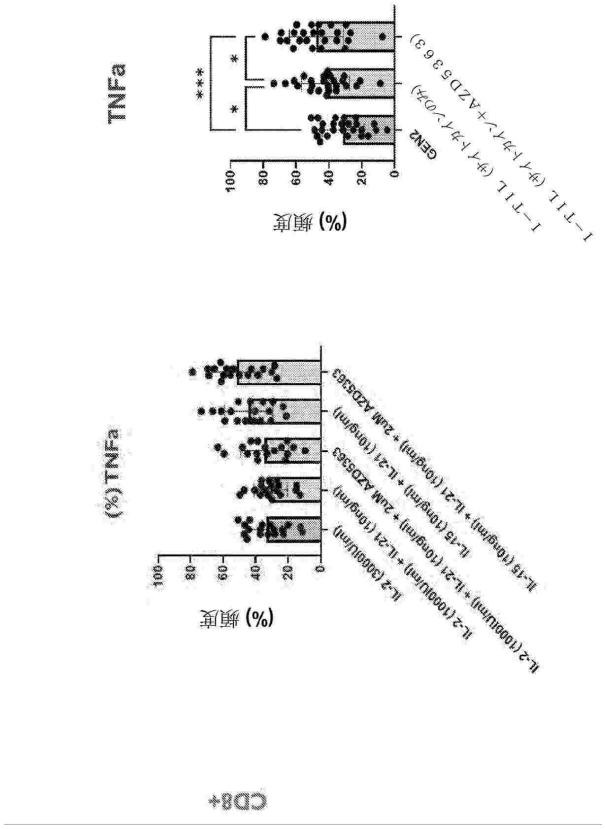
【図１４３Ｂ】



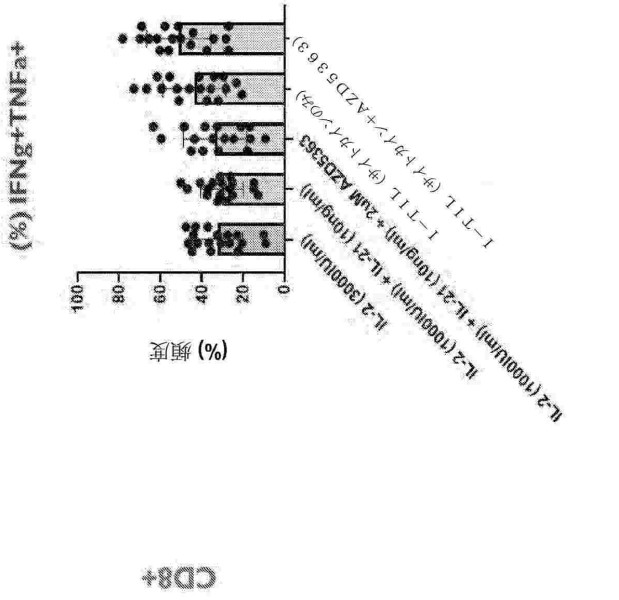
【図１４４Ａ】



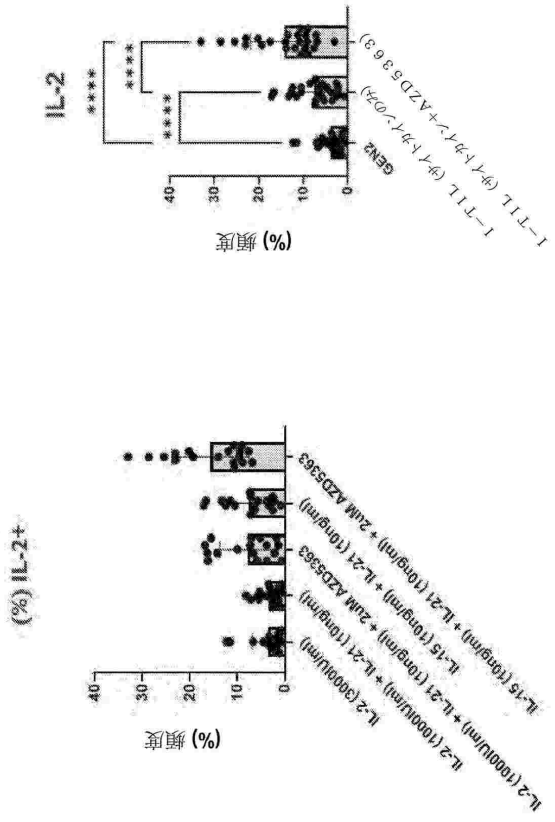
【図１４４Ｂ】



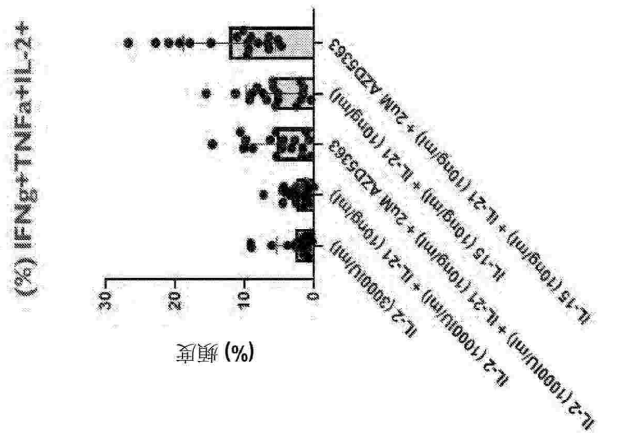
【図１４４Ｃ】



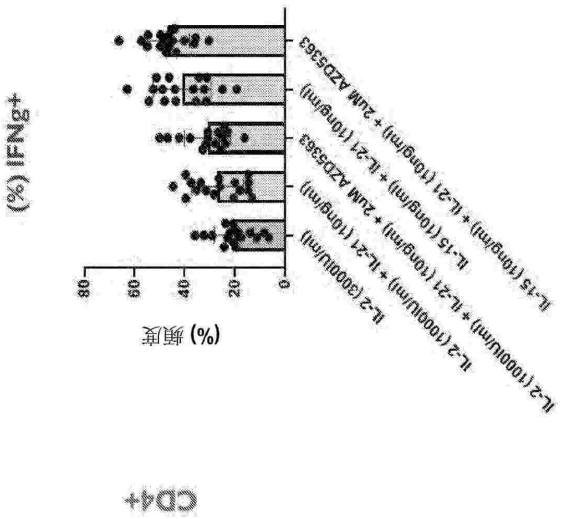
【図１４４Ｄ】



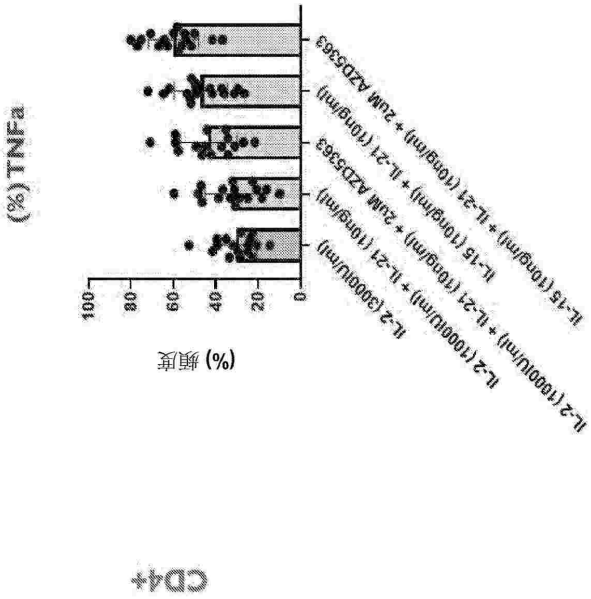
【図１４４Ｅ】



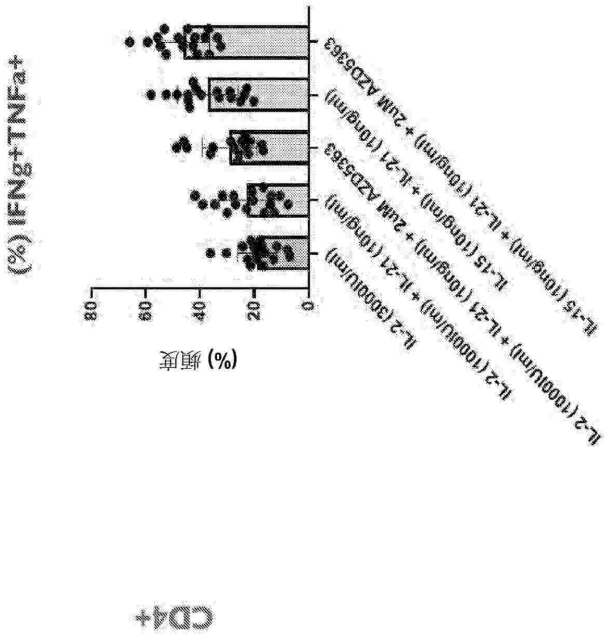
【図１４５Ａ】



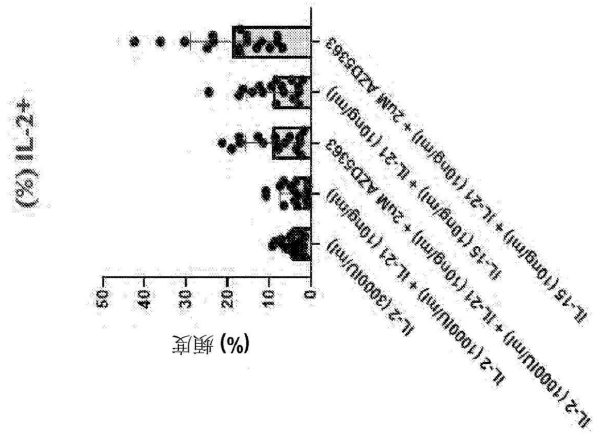
【図１４５Ｂ】



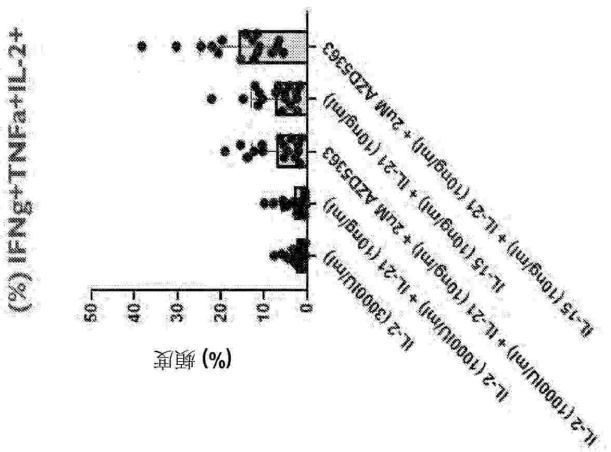
【図１４５Ｃ】



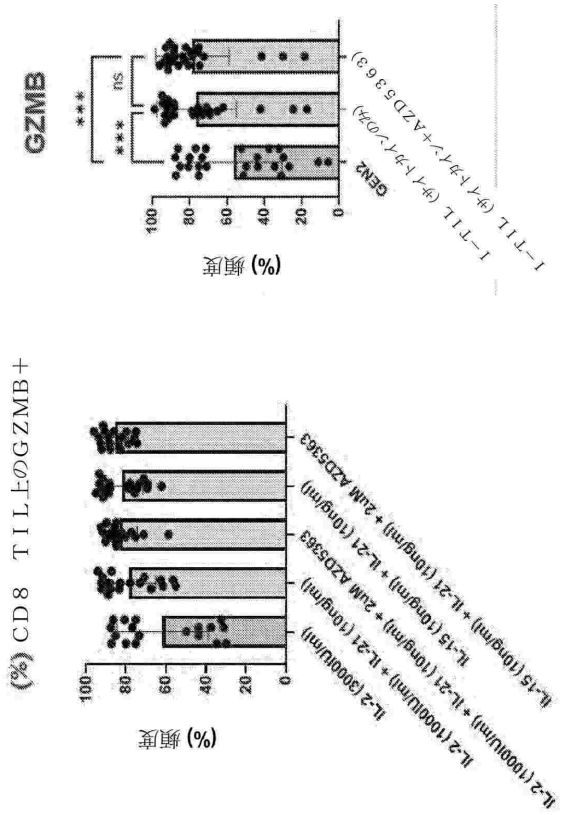
【図１４５Ｄ】



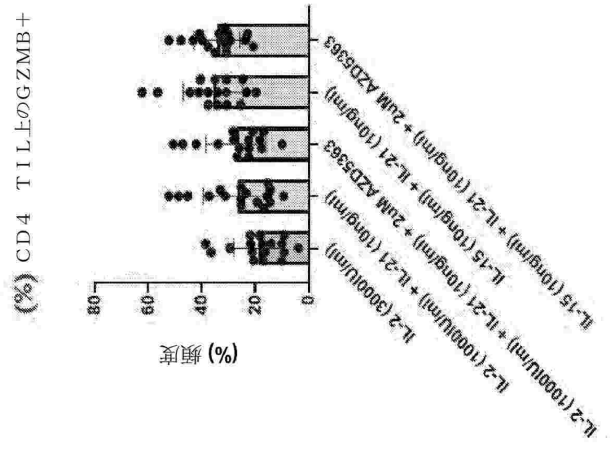
【図１４５Ｅ】



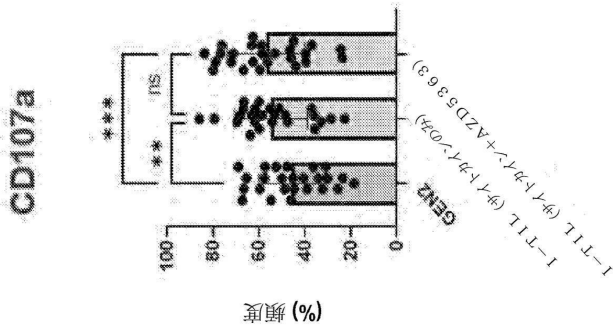
【図１４６Ａ】



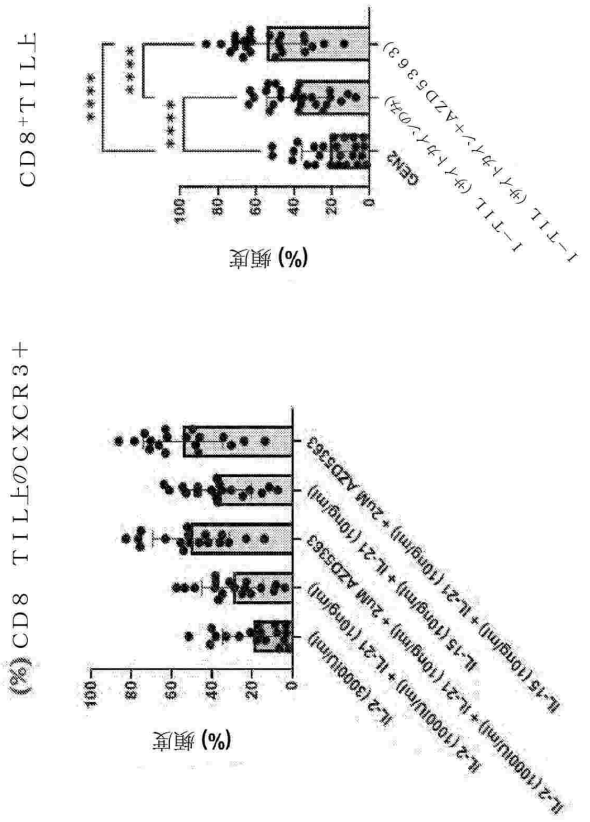
【図１４６Ｂ】



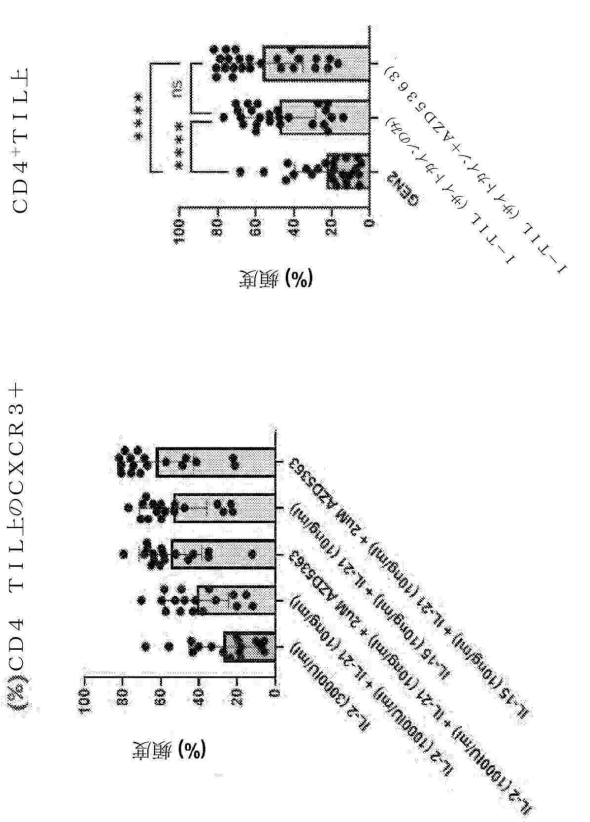
【図１４６Ｃ】



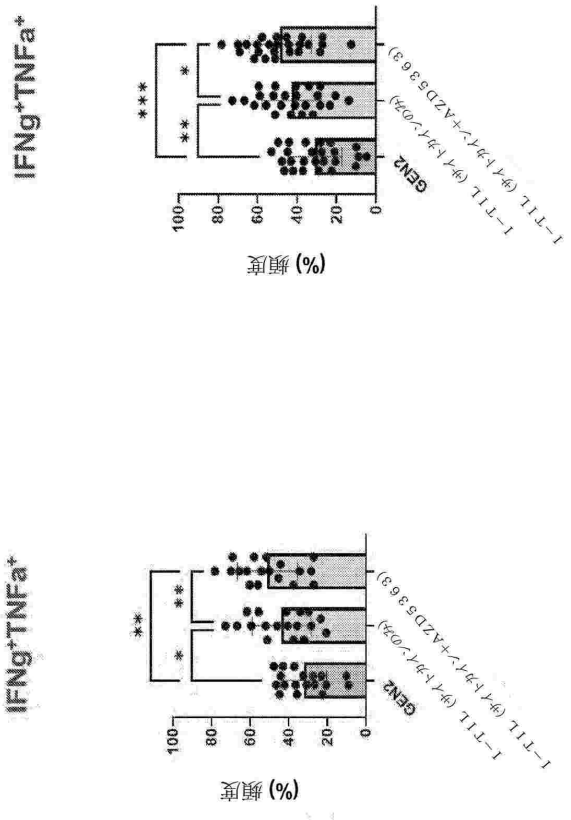
【図１４７Ａ】



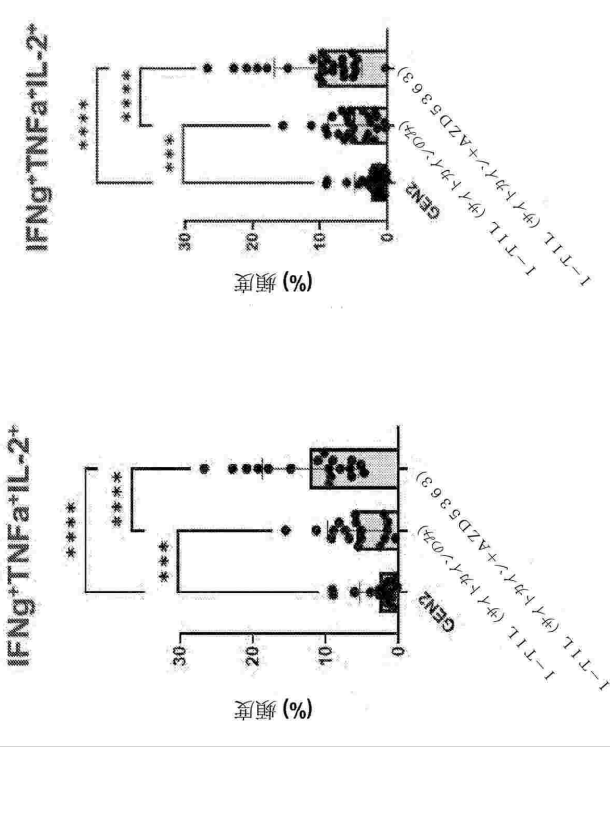
【図１４７Ｂ】



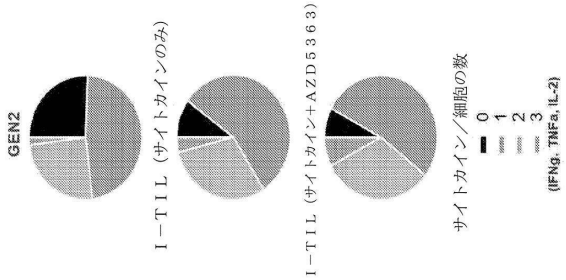
【図１４８Ａ】



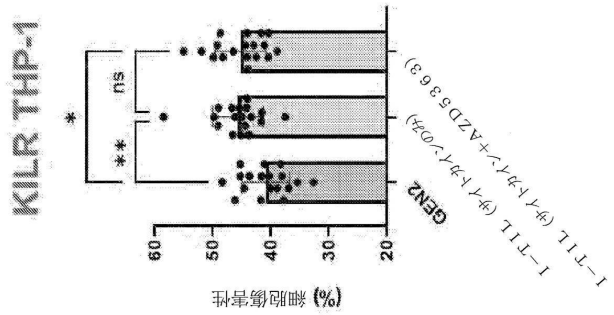
【図１４８Ｂ】



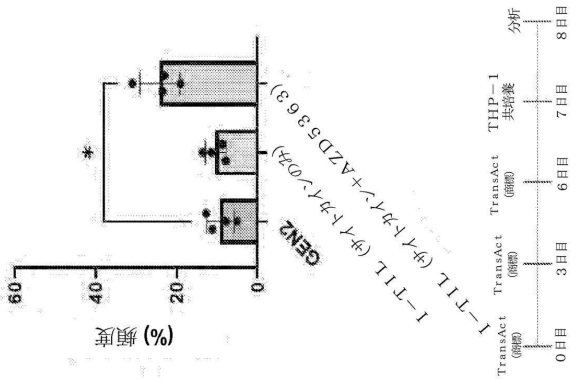
【図１４８Ｃ】



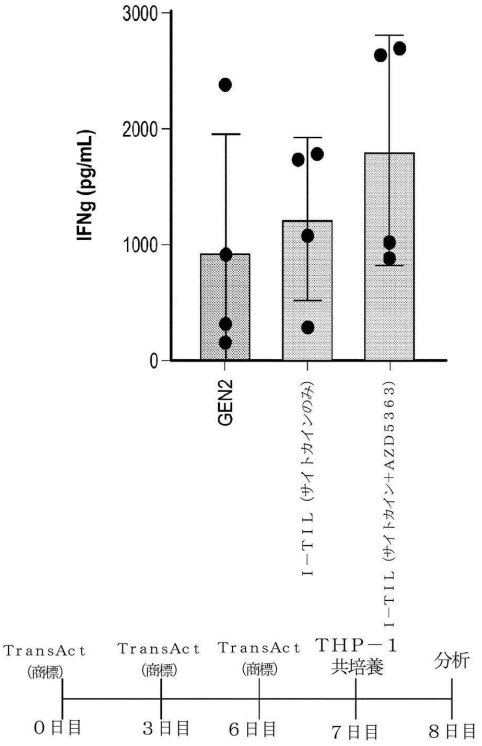
【図１４９Ａ】



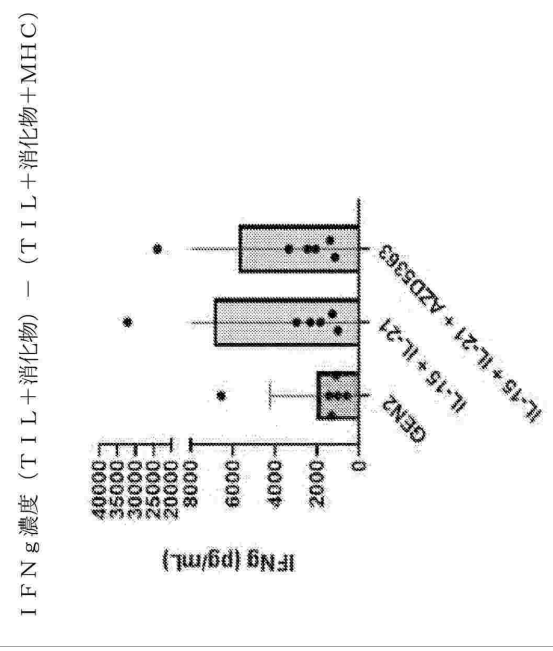
【図１４９Ｂ】



【図１４９Ｃ】

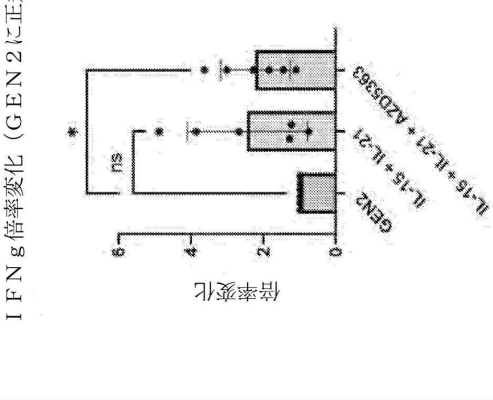


【図１４９Ｄ】



ＩＦＮｇ濃度（ＴＩＬ＋消化物）－（ＴＩＬ＋消化物＋ＭＨＣ）

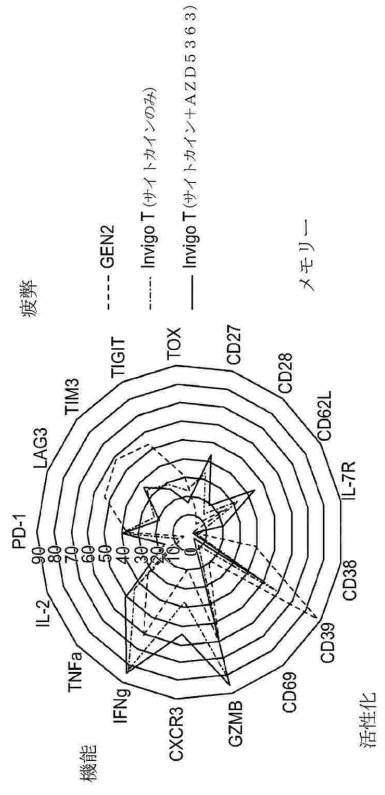
【図１４９Ｅ】



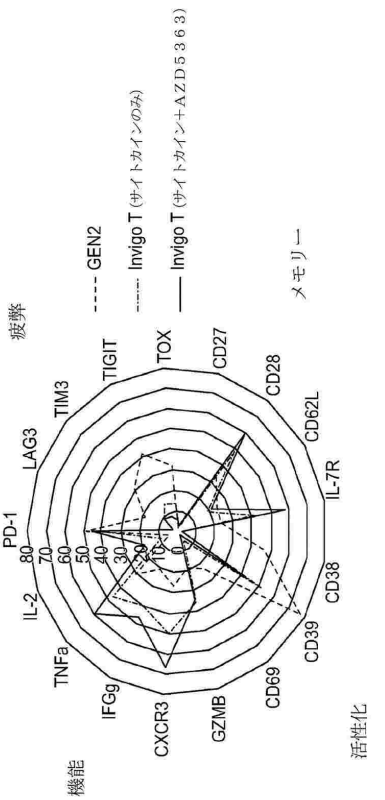
ＩＦＮｇ倍率変化（ＧＥＮ２に正規化）

ＩＦＮｇ（ｐｇ／ｍｌ）濃度は、（ＴＩＬ＋消化物）－（ＴＩＬ＋消化物＋ＭＨＣ）として計算する。データをＧＥＮ２値に正規化する

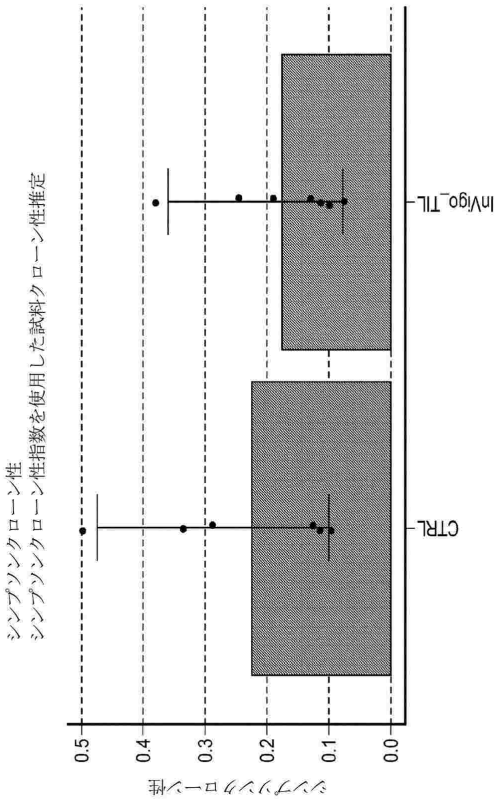
【図１５０Ａ】



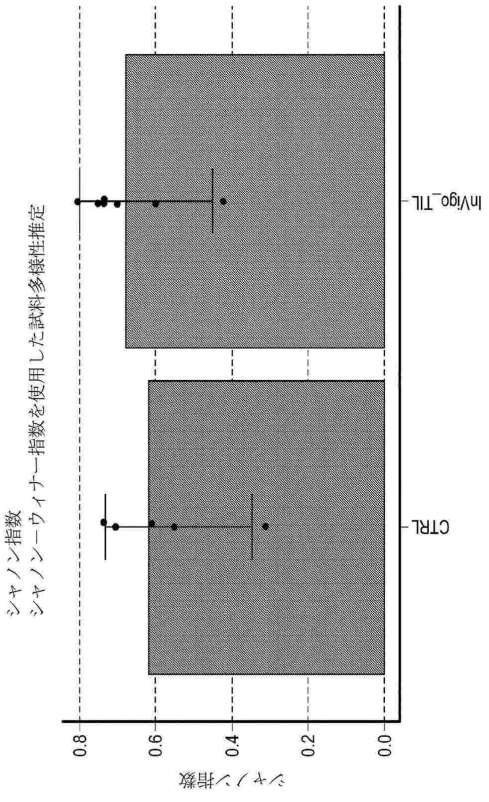
【図１５０Ｂ】



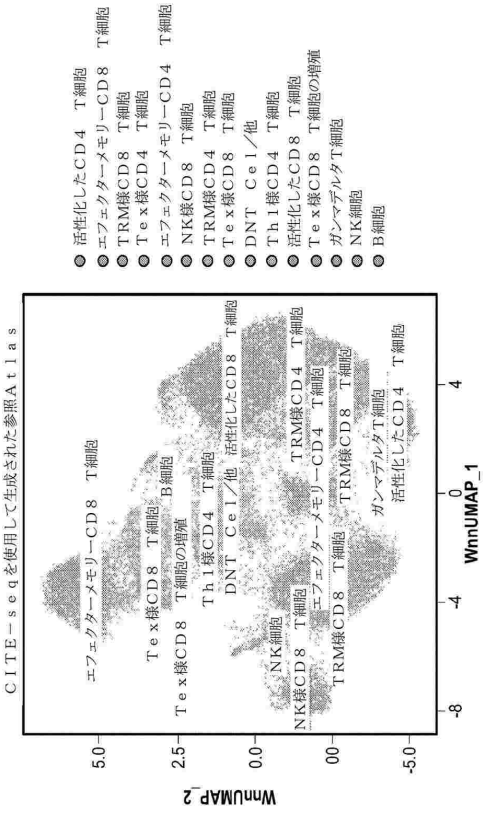
【図１５１Ａ】



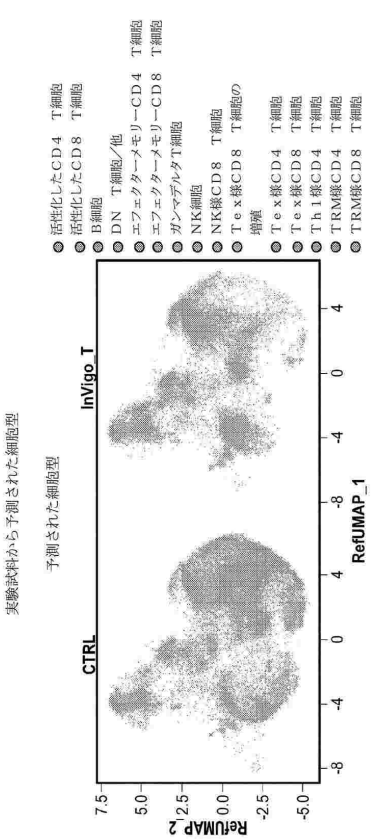
【図１５１Ｂ】



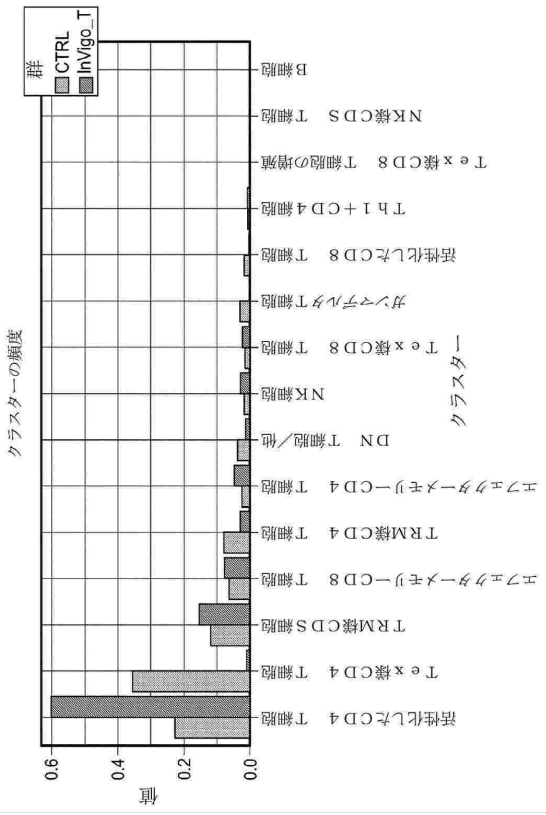
【図１５２Ａ】



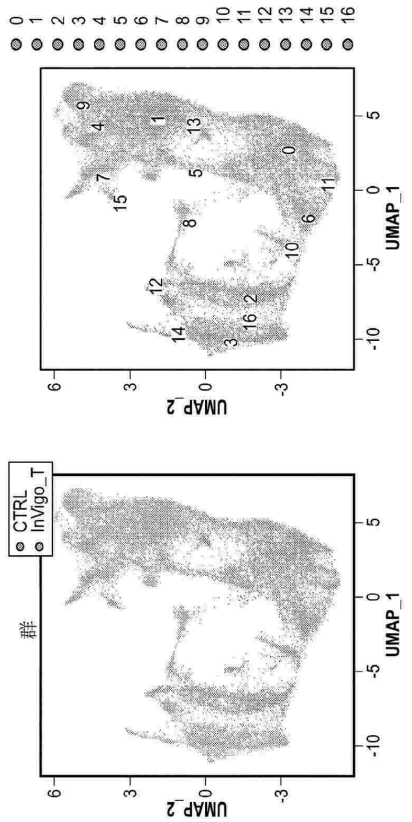
【図１５２Ｂ】



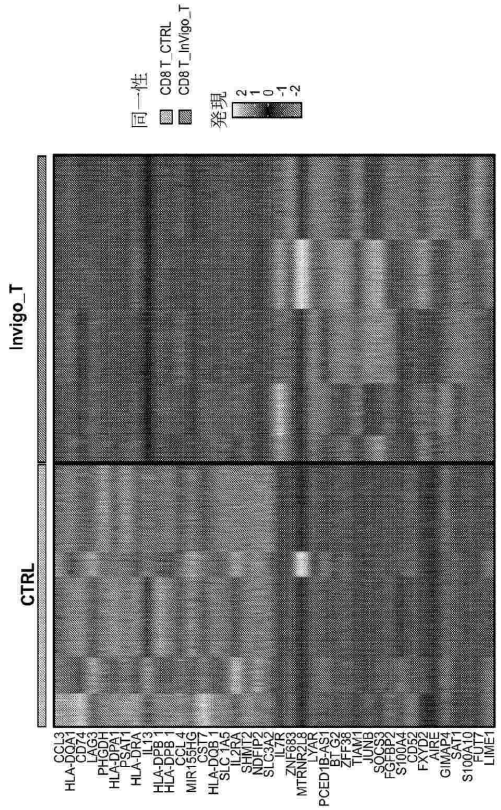
【図１５２Ｃ】



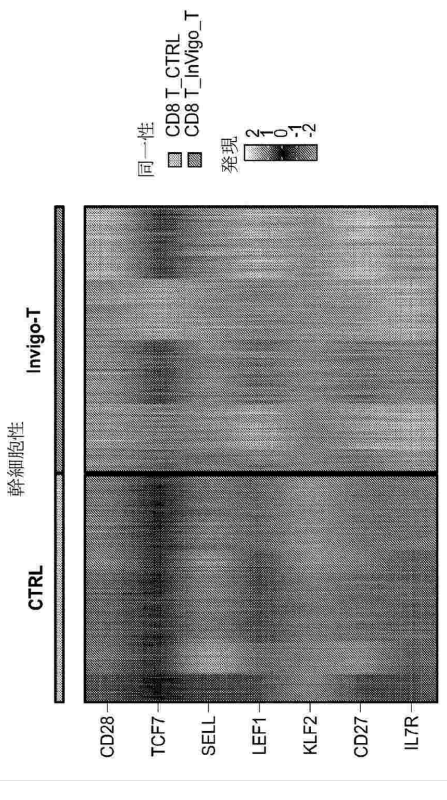
【図１５３】



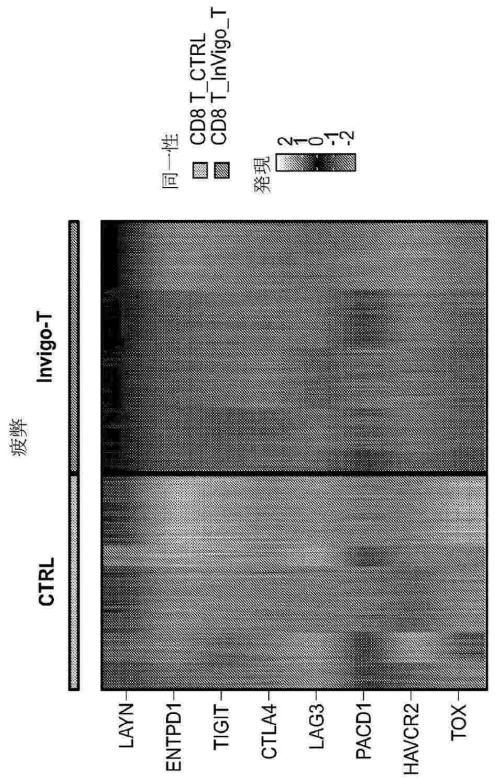
【図１５４Ａ】



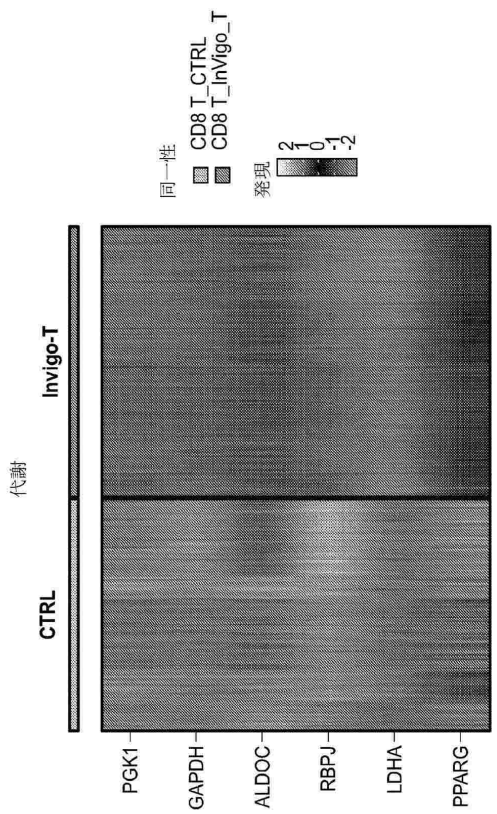
【図１５４Ｂ－１】



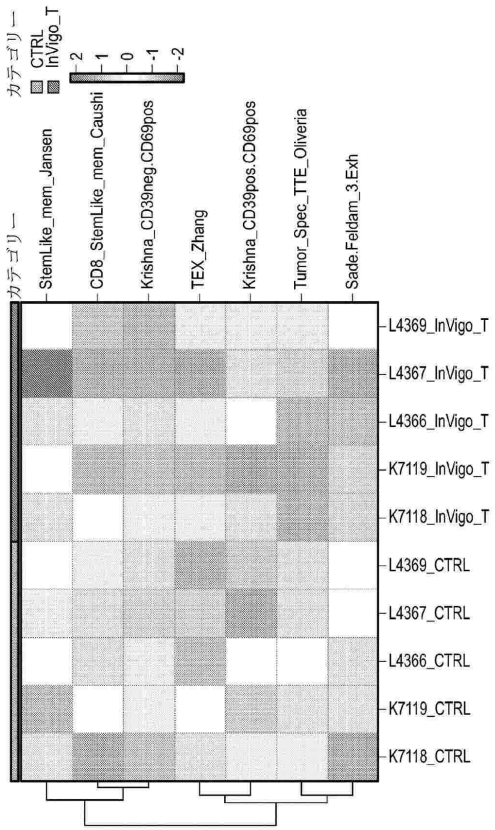
【図１５４Ｂ－２】



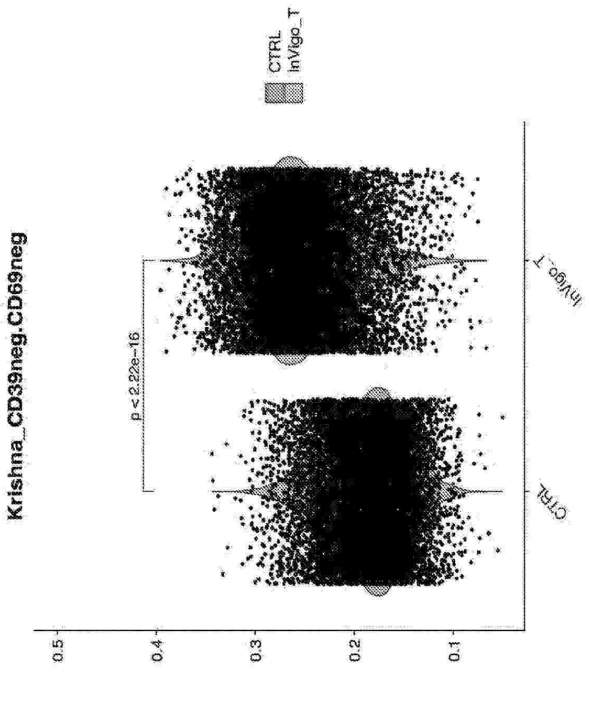
【図１５４Ｂ－３】



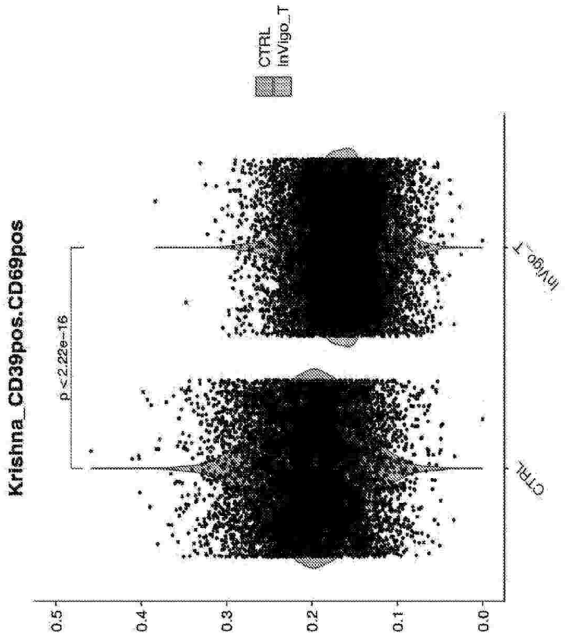
【図１５４Ｃ】



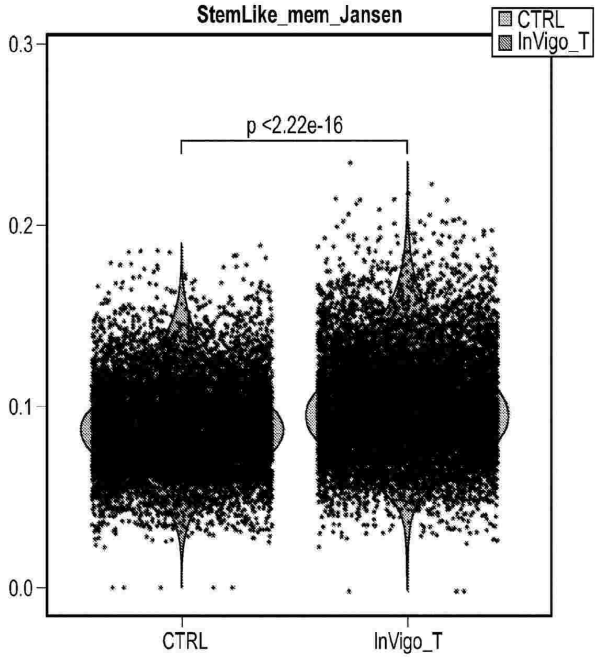
【図１５５Ａ】



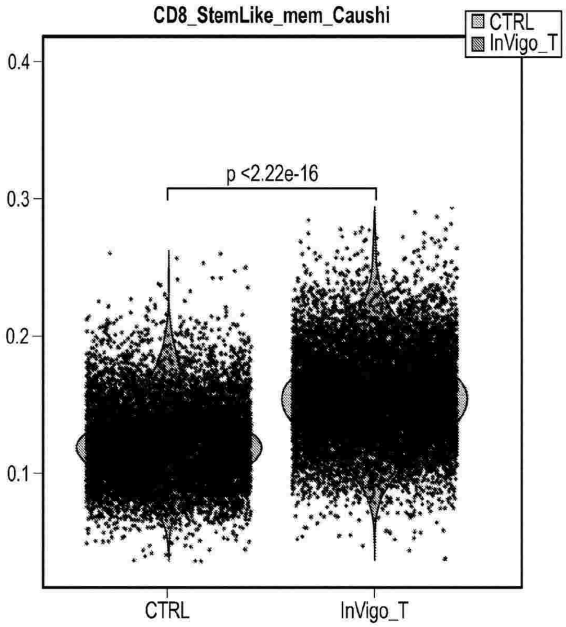
【図１５５Ｂ】



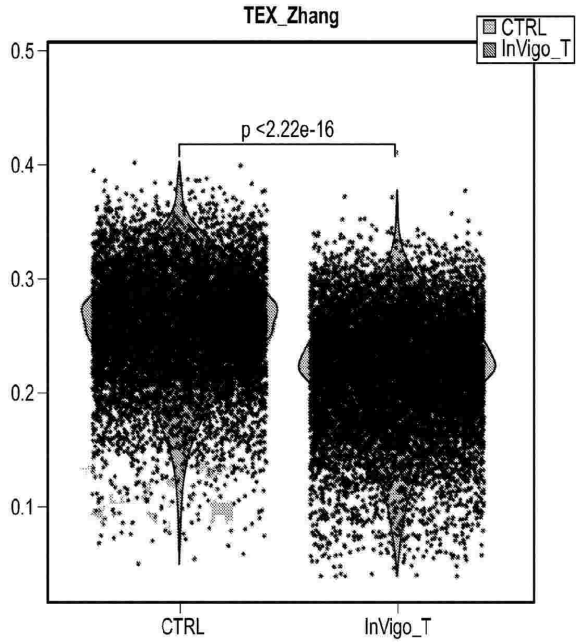
【図１５５Ｃ－１】



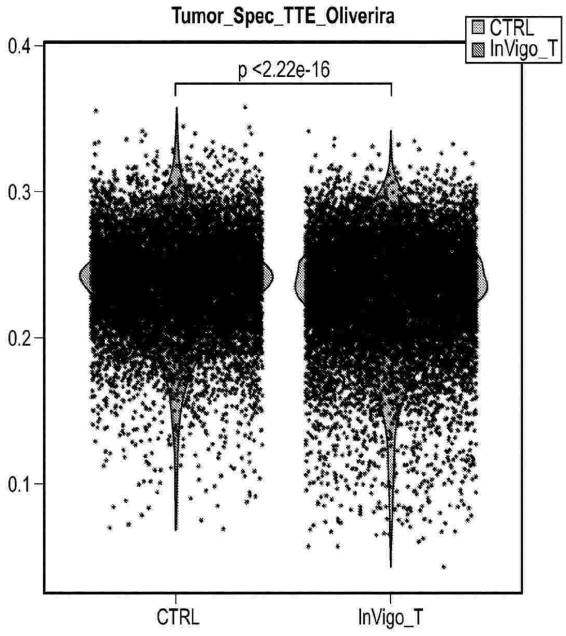
【図１５５Ｃ－２】



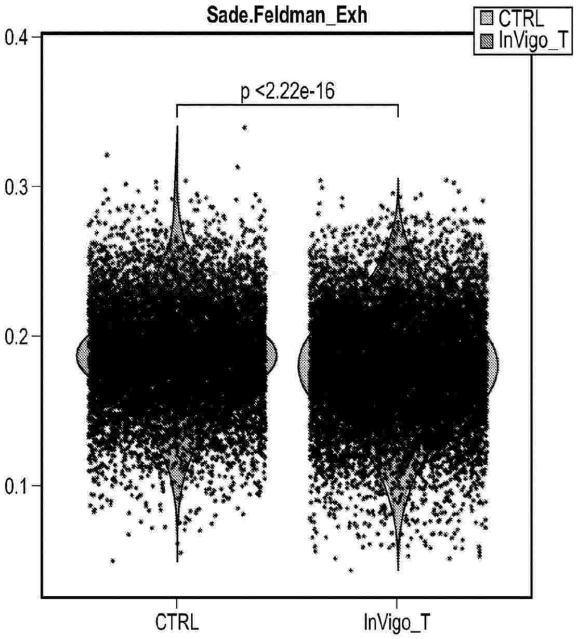
【図１５５Ｃ－３】



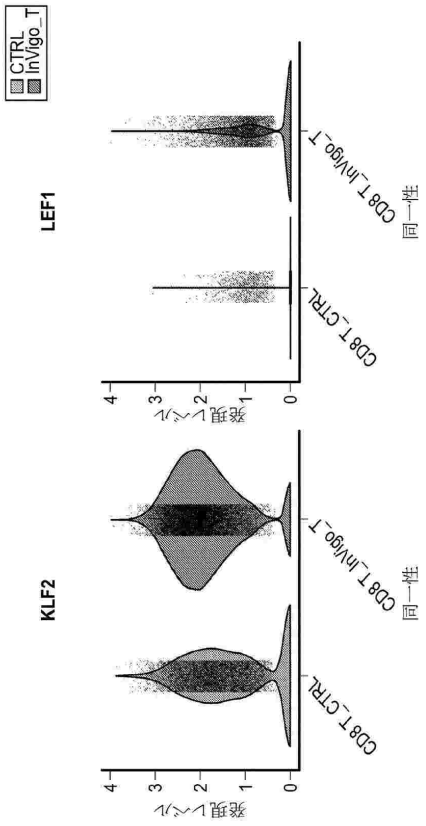
【図１５５Ｃ－４】



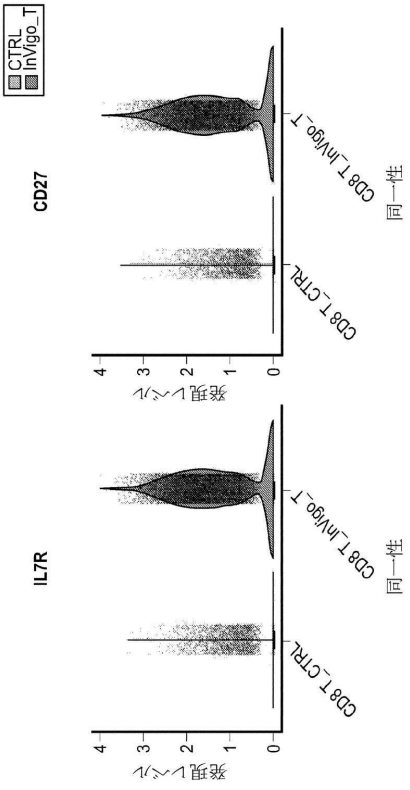
【図１５５Ｃ－５】



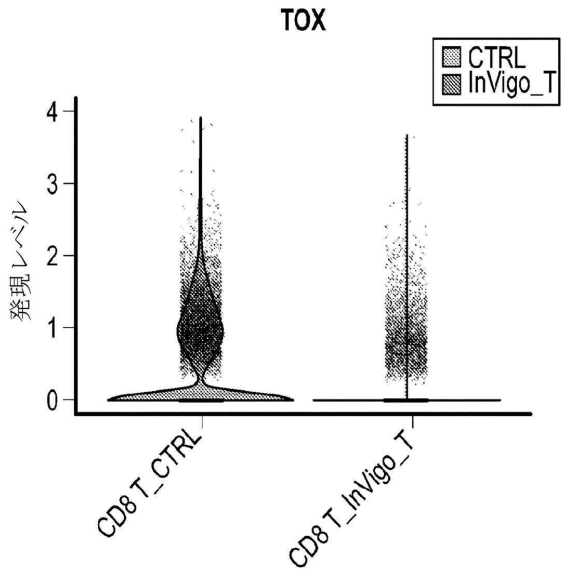
【図１５６－１】



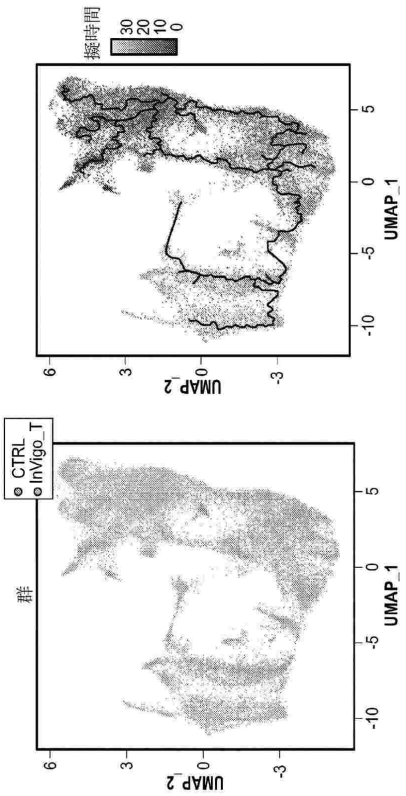
【図１５６－２】



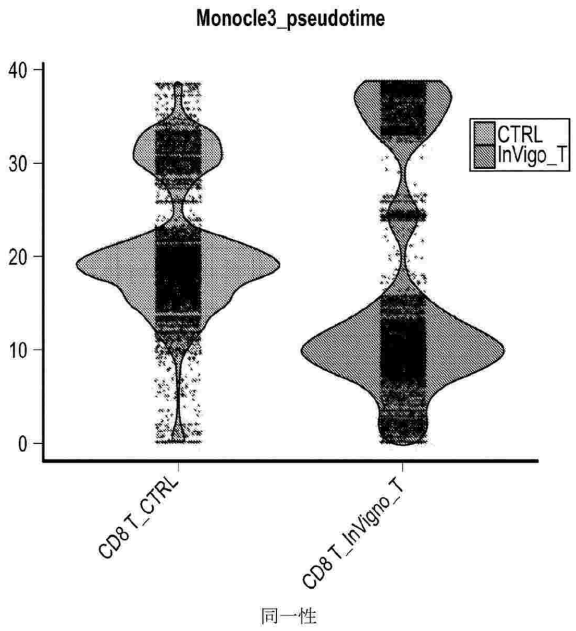
【図１５６－３】



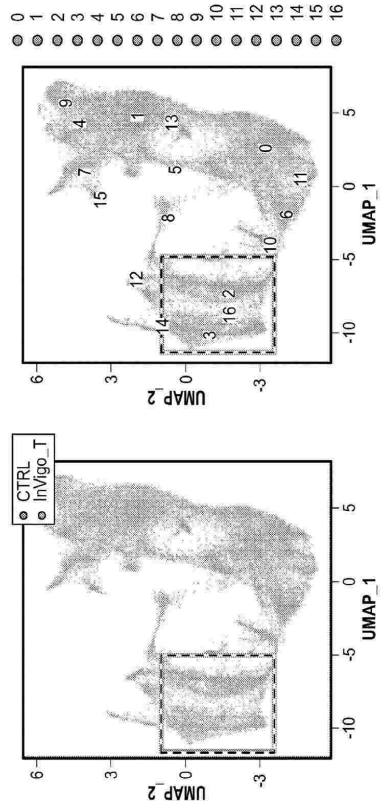
【図１５７Ａ】



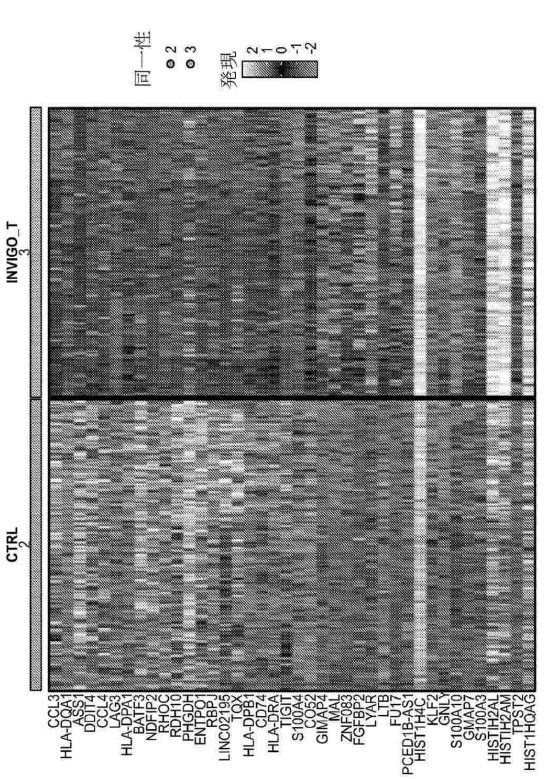
【図１５７Ｂ】



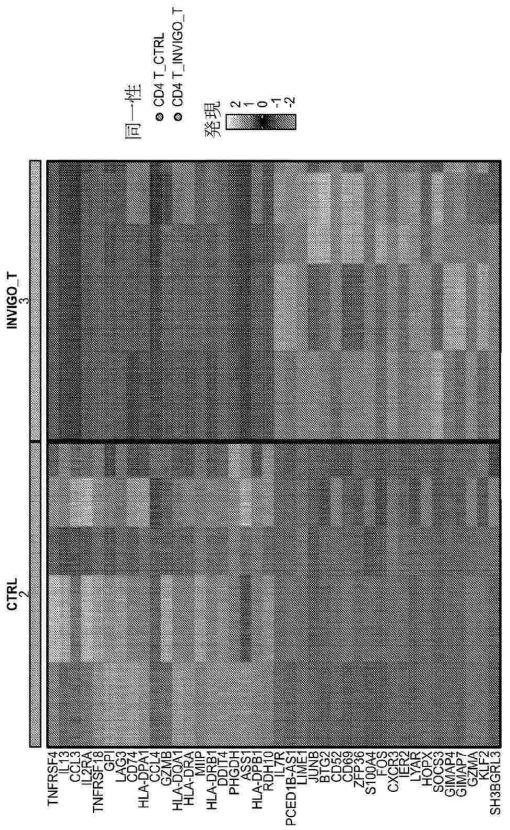
【図１５７Ｃ】



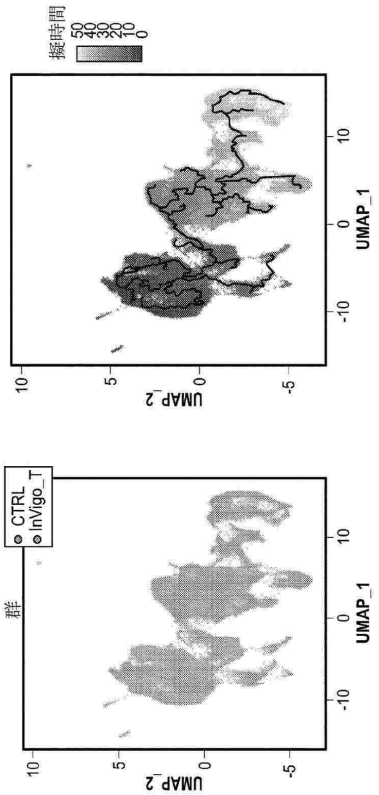
【図１５７Ｄ】



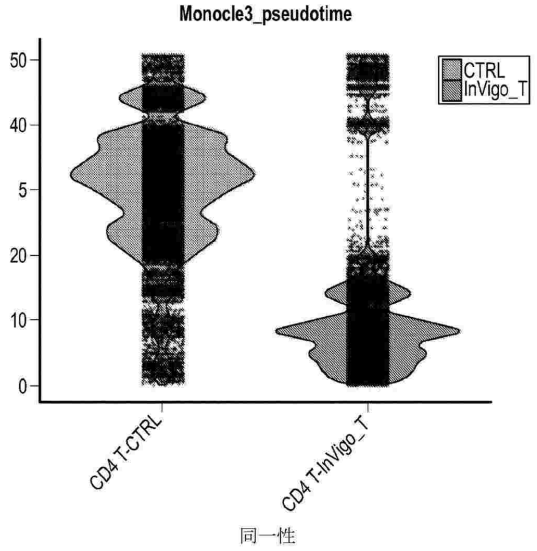
【図１５８】



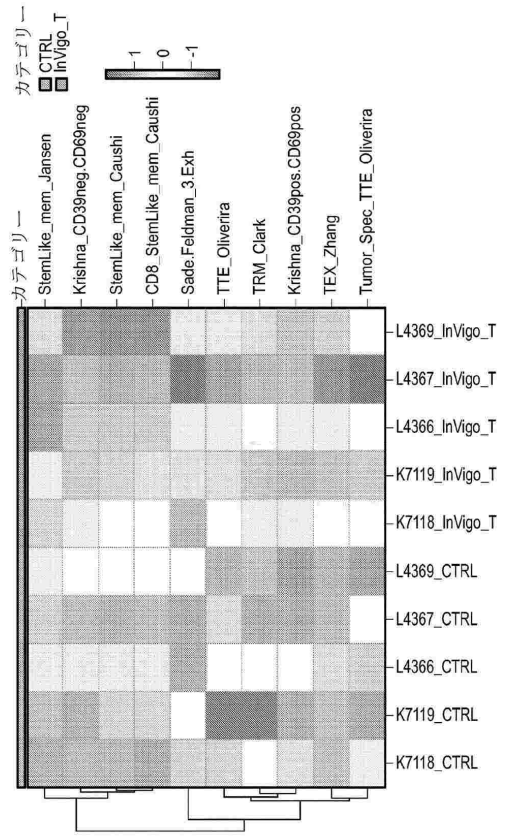
【図１５９Ａ】



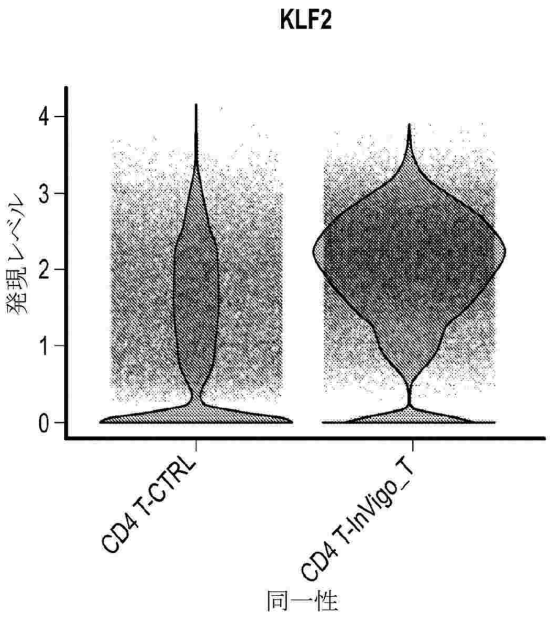
【図１５９Ｂ】



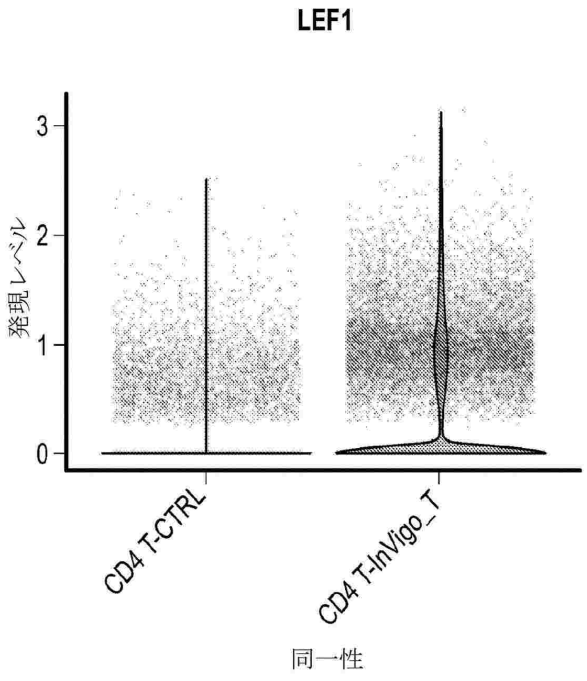
【図１６０Ａ】



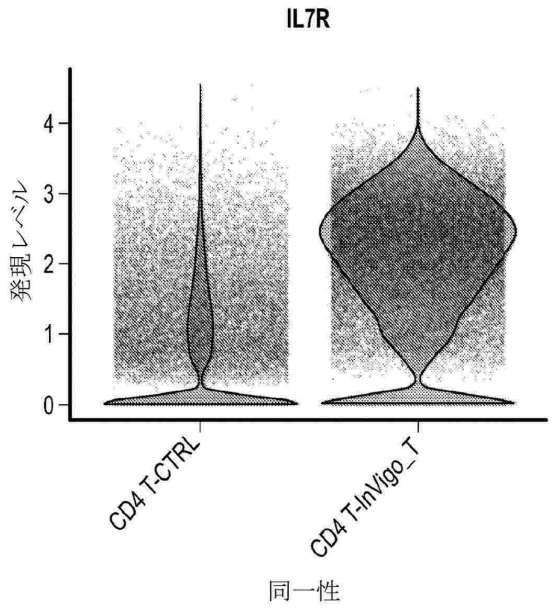
【図１６０Ｂ－１】



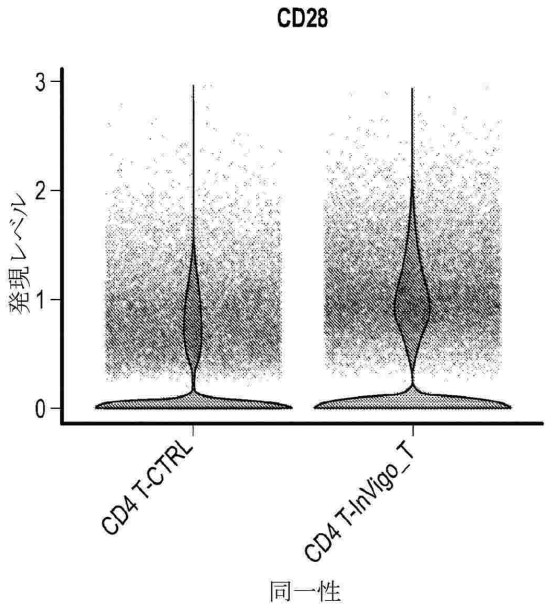
【図１６０Ｂ－２】



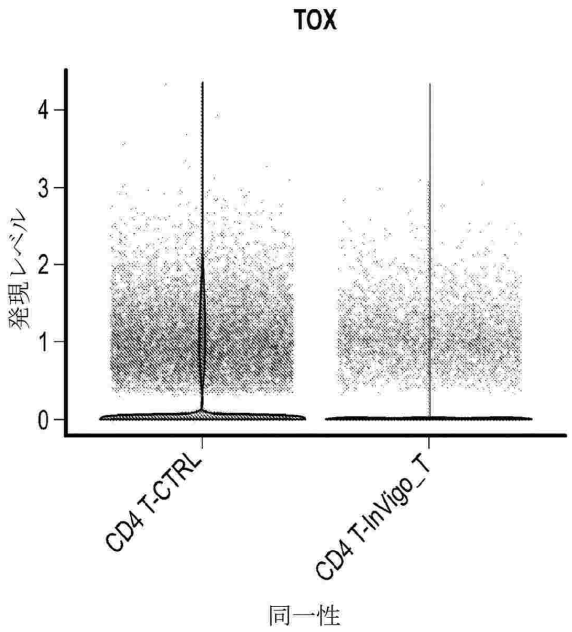
【図１６０Ｂ－３】



【図１６０Ｂ－４】



【図１６０Ｂ－５】



【図　　】

Process 2A: about 22 days from Steps A - E

1. **STEP A**

Obtain Patient Tumor Sample

2. **STEP B**

Fragmentation and First Expansion

3 days to 14 days

3. **STEP C**

First Expansion to Second Expansion Transition

No Storage and Closed System

4. **STEP D**

Second Expansion

IL-2, OKT-3, and antigen-presenting feeder cells

Closed System

5. **STEP E**

Harvest TILS from Step D

Closed System

6. **STEP F**

Final Formulation and/or Transfer to Infusion Bag

(optionally cryopreserve)

Figure 1

【図　　】

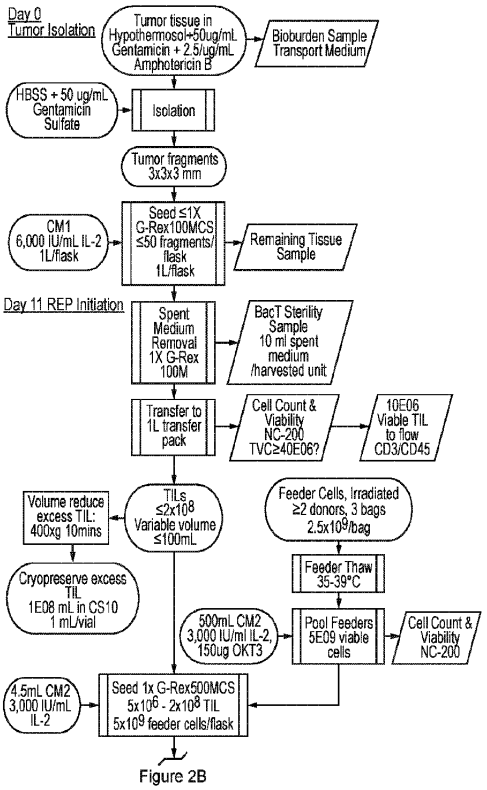


Figure 2A

【図　】

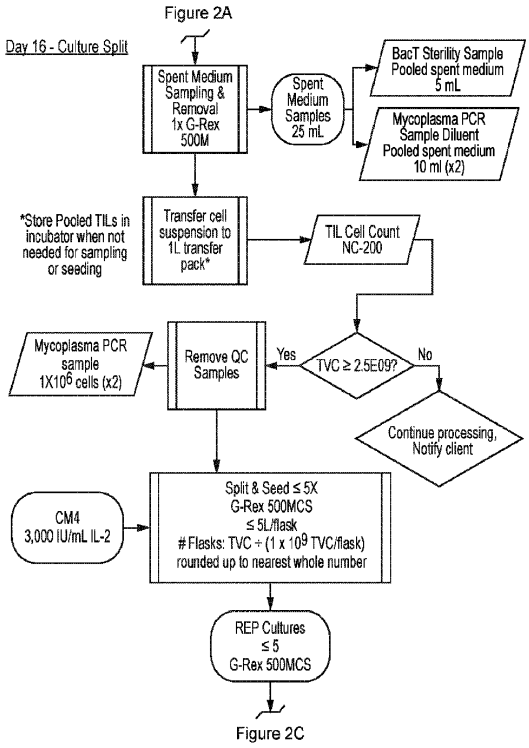


Figure 2B

【図　】

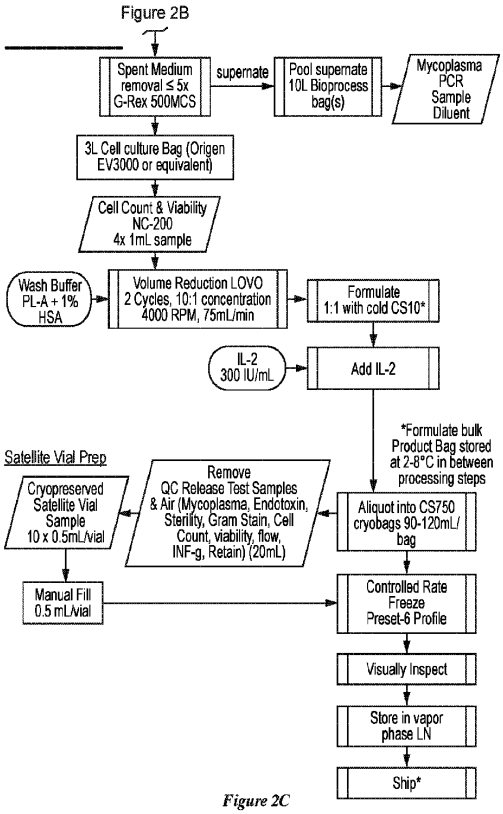


Figure 2C

【図　】

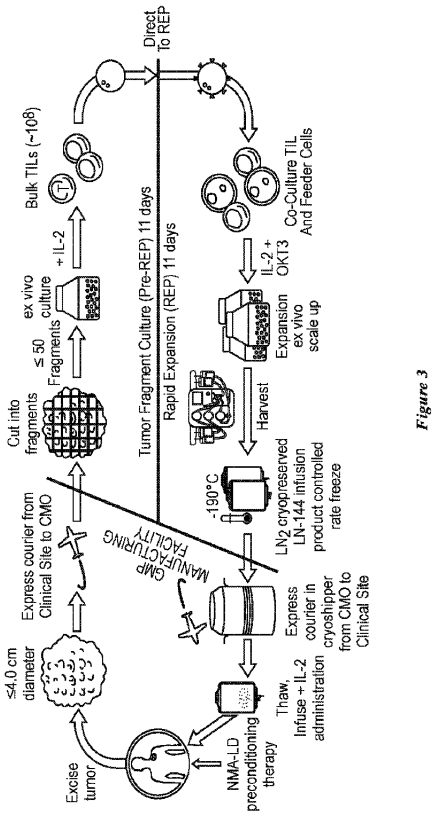


Figure 3

【図　】

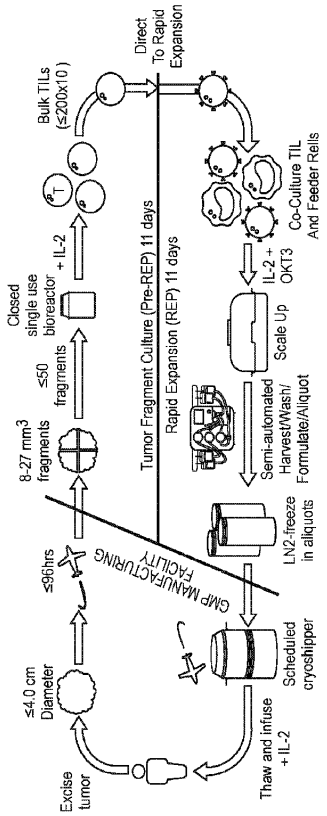


Figure 4

【図　　】

Process 1C: 43-55 Days for Steps A - E	Process 2A: about 22 days from Steps A - E
1. STEP A Obtain Patient Tumor Sample	1. STEP A Obtain Patient Tumor Sample
2. STEP B Fragmentation and First Expansion 11 days to 21 days	2. STEP B Fragmentation and First Expansion 3 days to 14 days
3. STEP C First Expansion to Second Expansion Transition Optional Storage until Selection	3. STEP C First Expansion to Second Expansion Transition No Storage and Closed System
4. STEP D Second Expansion IL-2, OKT-3, antigen-presenting feeder cells Optionally repeat one or more times	4. STEP D Second Expansion IL-2, OKT-3, antigen-presenting feeder cells Closed System
5. STEP E Harvest TILs from Step D	5. STEP E Harvest TILs from Step D Closed System
6. STEP F Final Formulation and/or Transfer to Infusion Bag	6. STEP F Final Formulation and/or Transfer to Infusion Bag (optionally cryopreserve)

Figure 5

【図　　】

Process Step	Process 1C Embodiment	Process 2A Embodiment	Advantages
Pre-REP	• 4 fragments per 10 GREX-10 flasks • 11-21 day duration	• 40 fragments per 1 GREX-100M flask • 11 day duration	• Increased tumor fragments per flask • Shortened culture time • Reduced number of steps • Amenable to closed system
Pre-REP to REP Transition	• Pre-REP TIL are frozen until phenotyped for selection then thawed to proceed to the REP (-day 30) • REP requires >40x10^6 TIL	• Pre-REP TIL directly move to REP on day 11 • REP requires 25-200x10^6 TIL	• Shortened pre-REP-to-REP process • Reduced number of steps • Eliminated phenotyping selection • Amenable to closed system
REP	• 6 GREX-100M flasks on REP day 0 • 5x10^6 TIL and 5x10^8 PBMC feeders per flask on REP day 0 • Split to 18-36 flasks on REP day 7 • 14 day duration	• 1 GREX-500M flask on day 11 • 25-200x10^6 TIL and 5x10^9 PBMC feeders on day 11 • Split to ≤ 6 GREX-500M flasks on day 16 • 11 day duration	• Reduced number of steps • Shorter REP duration • Closed system transfer of TIL between flasks • Closed system media exchanges
Harvest	• TIL harvested via centrifugation	• TIL harvested via LOVO automated cell washing system	• Reduced number of steps • Automated cell washing • Closed system • Reduced loss of product during wash
Final Formulation	• Fresh product in Hypothermosol • Single infusion bag • Limited shipping stability	• Cryopreserved product in PlasmaLyte-A + 1% HSA and CS10 stored in LN_2 • Multiple aliquots • Longer shipping stability	• Shipping flexibility • Flexible patient scheduling • More timely release testing
Overall Estimated Process Time	• 43 -55 days	• 22 days	• Faster turnaround to patient

Figure 6

【図　　】

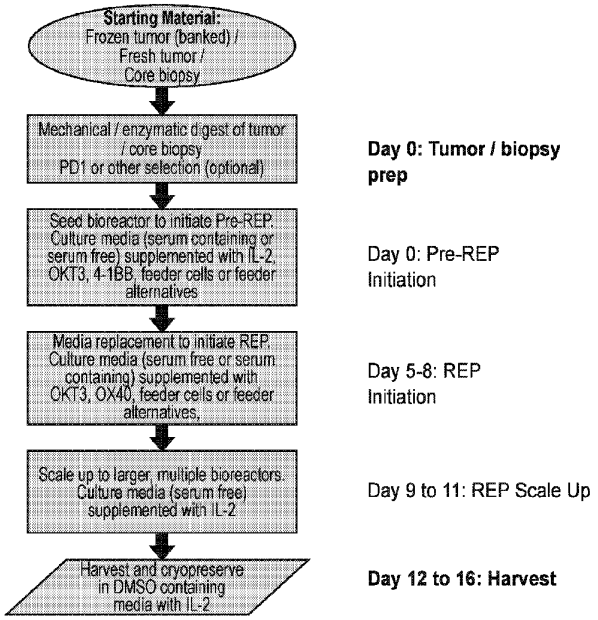


Figure 7

【図　　】

Process 2A: about 22 days from Steps A-E	Process GEN3: about 14-18 days from Steps A-E
STEP A Obtain Patient Tumor Sample (optionally can be frozen before Step B)	STEP A Obtain Patient Tumor Sample (optionally can be frozen before Step B)
STEP B First Expansion (physical fragmentation to at least 40 fragments per container grown for about 3 days to 14 days with media comprising IL-2)	STEP B Priming First Expansion (physical fragmentation of up to 60 fragments per container grown for about 1 days to 7 days with media comprising IL-2, OKT-3, and antigen-presenting feeder cells)
STEP C First Expansion to Second Expansion Transition (Step B TILs directly move to Step D, optionally on Step B day 11)	STEP C Priming First Expansion to Rapid Second Expansion Transition (Step B TILs directly move to Step D on day 7)
STEP D Second Expansion (TILs grown in growth media medium comprising IL-2, OKT-3, and antigen-presenting feeder cells in a closed container)	STEP D Rapid Second Expansion (TILs grown in growth media medium comprising IL-2, OKT-3, and 2X antigen-presenting feeder cells; Days 10-11 scale up and add additional IL -2)
STEP E Harvest TILS from Step D (TILs harvested via closed system)	STEP E Harvest TILS from Step D
STEP F Final Formulation and/or Transfer to Infusion Bag (optionally cryopreserve)	STEP F Final Formulation and/or Transfer to Infusion Bag (optionally cryopreserve)

Figure 8A

【図　　】

Process GEN 3: about 14-18 days from Steps A-E

STEP A
Obtain Patient Tumor Sample
(optionally can be frozen before Step B)

STEP B
Priming First Expansion
(physical fragmentation of up to 60 fragments per container grown for about 1 days to 7 days with media comprising IL-2, OKT-3, and antigen-presenting feeder cells)

STEP C
Priming First Expansion to Rapid Second Expansion Transition
(Step B TILs directly move to Step D on day 7)

STEP D
Rapid Second Expansion
(TILs grown in growth media medium comprising IL-2, OKT-3, and 2X antigen-presenting feeder cells; Days 10-11 scale up and add additional IL-2)

STEP E
Harvest TILS from Step D

STEP F
Final Formulation and/or Transfer to Infusion Bag
(optionally cryopreserve)

Figure 8B

【図　　】

Embodiment GEN 3.0: about 14-18 days from Steps A - E	Embodiment GEN 3.1 control: about 14-18 days from Steps A - E	Embodiment GEN 3.1 Test/F: about 14-18 days from Steps A - E
STEP A Obtain Patient Tumor Sample (optionally can be frozen before Step B)	**STEP A** Obtain Patient Tumor Sample (optionally can be frozen before Step B)	**STEP A** Obtain Patient Tumor Sample (optionally can be frozen before Step B)
STEP B Priming First Expansion (physical fragmentation of up to 60 fragments per container grown for about 1 days to 7/8 days with media comprising IL-2)	**STEP B** Priming First Expansion (physical fragmentation of up to 60 fragments per container grown for about 1 days to 7/8 days with media comprising IL-2, and OKT-3)	**STEP B** Priming First Expansion (physical fragmentation of up to 60 fragments per container grown for about 1 days to 7/8 days with media comprising IL-2, OKT-3, and antigen-presenting feeder cells)
STEP C Priming First Expansion to Rapid Second Expansion Transition (Step B TILs directly move to Step D on day 7/8)	**STEP C** Priming First Expansion to Rapid Second Expansion Transition (Step B TILs directly move to Step D on day 7/8)	**STEP C** Priming First Expansion to Rapid Second Expansion Transition (Step B TILs directly move to Step D on day 7/8)
STEP D Rapid Second Expansion (TILs grown in growth media medium comprising IL-2, OKT-3, and antigen-presenting feeder cells; Days 10-11 scale up and add additional IL-2)	**STEP D** Rapid Second Expansion (TILs grown in growth media medium comprising IL-2, OKT-3, and 2X antigen-presenting feeder cells; Days 10-11 scale up and add additional IL-2)	**STEP D** Rapid Second Expansion (TILs grown in growth media medium comprising IL-2, OKT-3, and 2X antigen-presenting feeder cells; Days 10-11 scale up and add additional IL-2)
STEP E Harvest TILS from Step D	**STEP E** Harvest TILS from Step D	**STEP E** Harvest TILS from Step D
STEP F Final Formulation and/or Transfer to Infusion Bag (optionally cryopreserve)	**STEP F** Final Formulation and/or Transfer to Infusion Bag (optionally cryopreserve)	**STEP F** Final Formulation and/or Transfer to Infusion Bag (optionally cryopreserve)

Figure 8C

【図　　】

Modified Gen 2-like Process: about 22 days from Steps A - E

STEP A
Obtain Patient Tumor Sample
(optionally can be frozen before Step B;
optionally tumor sample can be a core/small biopsy)

STEP B1
Initial Culture
physical fragmentation of up to 60 tumor fragments or up to 10 cores/small biopsies per container, TILs grown for 3 days in growth medium comprising IL-2

STEP B2
Priming First Expansion
TILs grown for 8 days in growth medium comprising IL-2, OKT-3, and antigen-presenting feeder cells)

STEP C
Priming First Expansion to Rapid Second Expansion Transition
(Step B TILs directly move to Step D on day 11)

STEP D
Rapid Second Expansion
(volume reduced; TILs grown in growth media medium comprising IL-2, OKT-3, and 50X antigen-presenting feeder cells; Day 16 scale up and add additional IL-2)

STEP E
Harvest TILS from Step D

STEP F
Final Formulation and/or Transfer to Infusion Bag
(optionally cryopreserve)

Figure 8D

【図　　】

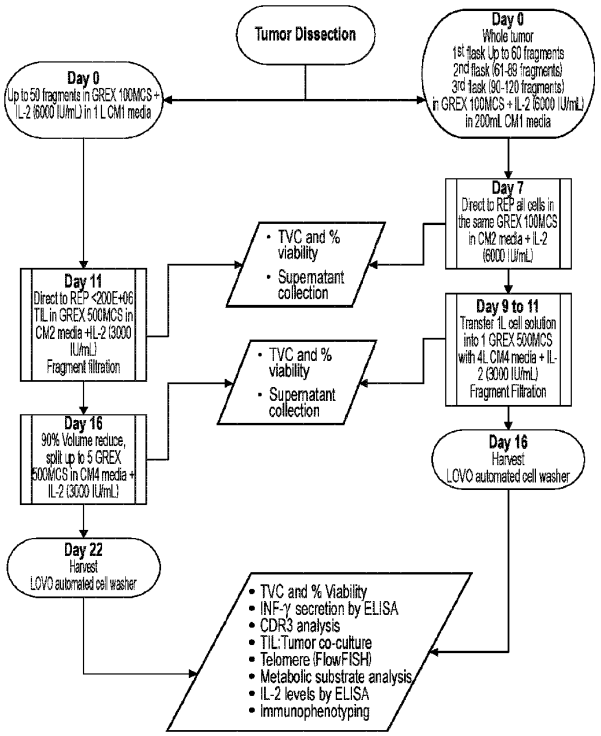


Figure 9

【図 】

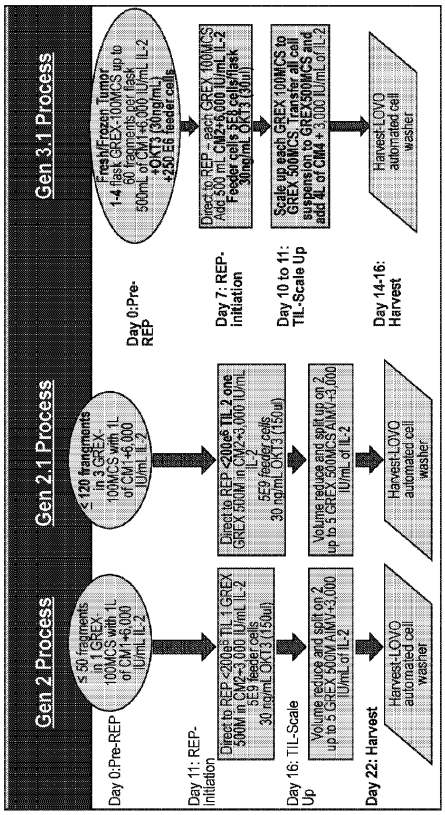


Figure 10

【図 】

STEP	Gen 2	Gen 2.1	Gen 3.0 Optimized
Pre REP-day 0	≤ 50 fragments/ 1 G-Rex 100MCS - 11 days	≤ 180 fragments/ 3 G-Rex Pre-formulated CM1 warmed media 100MCS - 11 days	*Fresh or Frozen tumor* Whole tumor with ≤ 30 fragments up to 60 fragments per 1 G-Rex 100MCS (up to 4 G-Rex), pre-formulated warmed media - 7 days. Pre REP. Feeders 2.5 E8 cells + OKT-3 (30ng/mL)
REP Initiation	Direct to REP- Day 11- <200 E6 TIL 1 G-Rex 500MCS	Direct to REP- Day 11- <2l0 E6 TIL Pre-formulated CM2 warmed media in one G-Rex 500MCS	Direct to REP - Day 7-all cells TIL - same G-Rex 100MCS (100MCS up to 4 GREX), Standard media or Defined Media (Serum free), Addition Feeders 5 E8 cells + OKT-3 (30ng/mL)
TIL-propagation or Scale up	1 to 5 G-REX 500MCS Split day 16	2 to 5 G-REX 500MCS Pre-formulated CM4 warmed media Split day 16	From G-REX 100MCS transfer TIL suspension to G-REX 500MCS, up to 4 GREX 500 MCS-Standard media or Defined Media (Serum Free) Scale up on day 10 or 11
Harvest	Harvest day 22, LOVO-automated cell washer (5 wash cycle)	Harvest day 22, LOVO-automated cell washer (5 wash cycle)	Harvest day 14 or 16 LOVO- automated cell washer (5 wash cycle)
Final formulation	Cryopreserved Product 300IU/ml IL2- CS10 in LN_2 multiple aliquots	Cryopreserved Product 300 IU/ml IL2- CS10 in LN_2 multiple aliquots	Cryopreserved product 300IU/ml IL-2- CS10 in LN_2 multiple aliquots
Process time	22 days	22 days	16 days

Figure 11

【図 】

Process Day	Conditions	Gen 3.1
Day 0: pre REP initiation	Media CM1	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	OKT-3 (30ng/mL)	+
	Feeders (250 E+06)	+

Process Day	Conditions	Gen 3.1
Day 7: REP initiation	Media CM2	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	OKT-3 (30ng/mL) added on Day 7	+
	Feeders Added on Day 7	500 E06
	Total Feeders at Day	750 E+06

Process Day	Conditions	Gen 3.1
Day 9-11 - Scale Up	From G-REX 100MCS transfer TIL suspension to 1 G-REX 500MCS (up to 3 GREX 500MCS)	Yes
Day 16 - Harvest	LOVO- automated cell washer	Yes

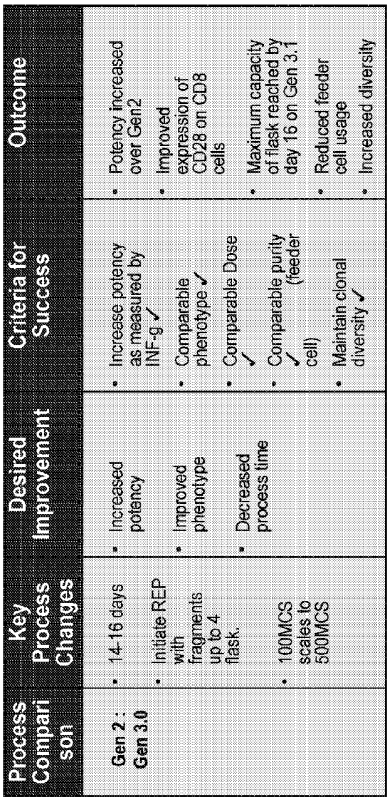
Figure 12

【図 】

Process Comparison	Key Process Changes	Benefit
Gen 2 : Gen 2.1	• Initiate process with two flasks instead of one flask • Divide REP initiation feeder layer between 2 G-Rex500MCS Flasks • Pre-formulate media and warm prior to use	• Potential doubling of final cell count (dose) with increased TIL repertoire. • Process redundancy throughout process
Gen 2.1 : Gen 3.1	• Fresh or Frozen tumor • 14-16 day process (from 22 day) • Reduce total feeder layer on process • Feeder layer and OKT3 present at Day 0 • REP initiated with fragments • 100MCS scales to 500MCS • Scales to multiple pre-REP flasks • Standard Media and Defined Media (Serum Free)	• Increased potency • Improved phenotype • Decreased process time • Reduced reagent testing • Decreased process variability • Defined reagents • Increased repertoire • Reduce impurities (feeder) • Comparable or Higher Dose

Figure 13

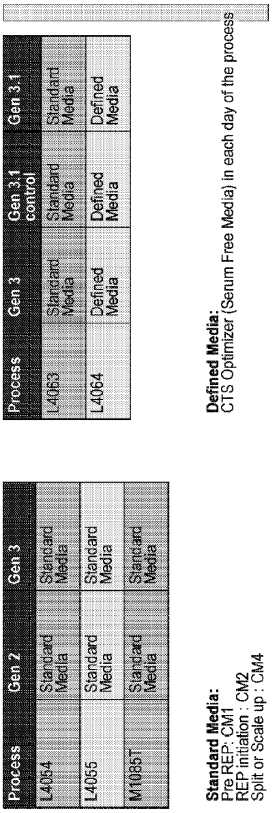
【図 】



Process Comparison	Key Process Changes	Desired Improvement	Criteria for Success	Outcome
Gen 2 : Gen 3.0	• 14-16 days • Initiate REP with fragments up to 4 flask. • 100MCS scales to 500MCS	• Increased potency • Improved phenotype • Decreased process time	• Increase potency as measured by INF-g ✓ • Comparable phenotype ✓ • Comparable Dose ✓ • Comparable purity (feeder cell) ✓ • Maintain clonal diversity ✓	• Potency increased over Gen2 • Improved expression of CD28 on CD8 cells • Maximum capacity of flask reached by day 16 on Gen 3.1 • Reduced feeder cell usage • Increased diversity

Figure 14

【図 】



Process	Gen 2	Gen 3
L4064	Standard Media	Standard Media
L4055	Standard Media	Standard Media
M10857	Standard Media	Standard Media

Standard Media:
Pre REP: CM1
REP initiation : CM2
Split or Scale up : CM4

Process	Gen 3	Gen 3.1 control	Gen 3.1
L4063	Standard Media	Standard Media	Standard Media
L4064	Defined Media	Defined Media	Defined Media

Defined Media:
CTS Optimizer (Serum Free Media) in each day of the process

Figure 15

【図 】

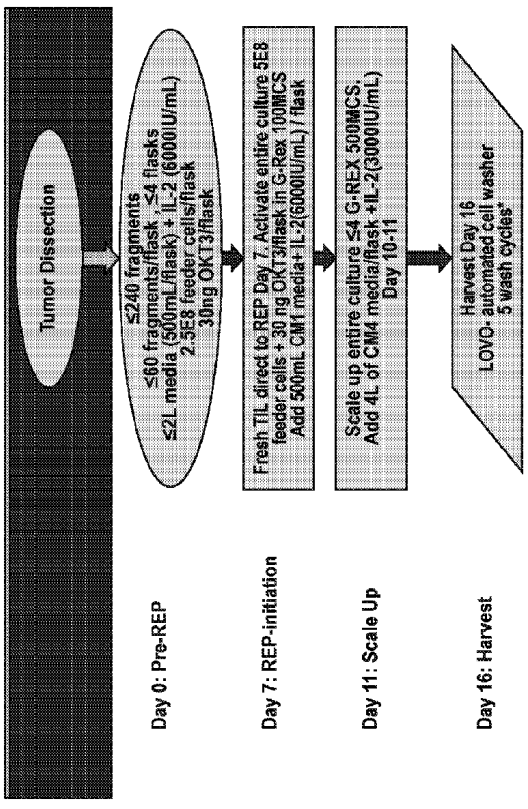


Figure 16

【図 】

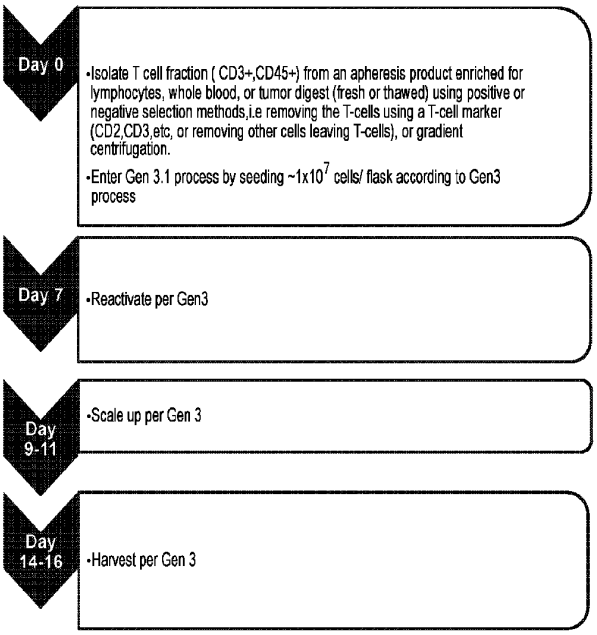


Figure 17

【図　　】

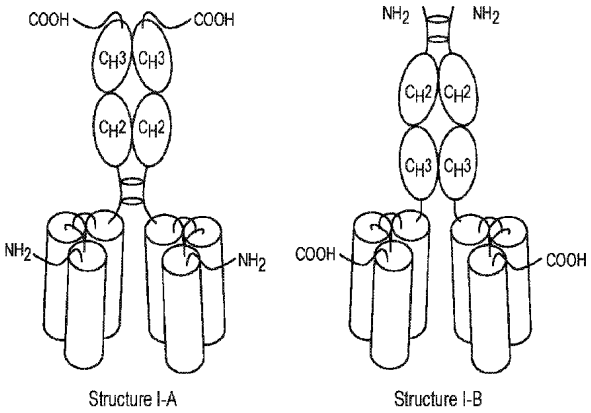


Figure 18

【図　　】

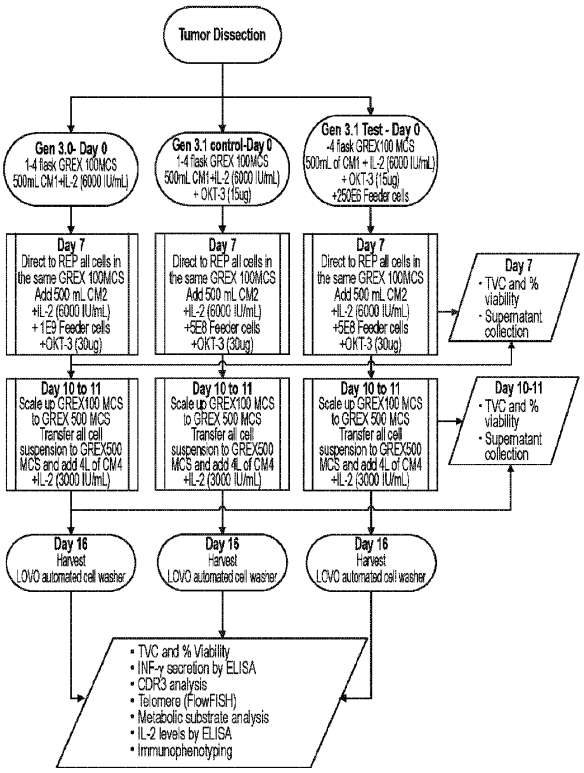


Figure 19

【図　　】

Process Day	Conditions	Gen 3.1 Test
Day 0- pre REP initiation	Media CM1	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	OKT-3 (15ug)	+
	Feeders (250 E+06)	+

Process Day	Conditions	Gen 3.1 Test
Day 7- REP initiation	Media CM2	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	OKT-3 (30ug) added on Day 7	+
	Feeders Added on Day 7	500 E06
	Total Feeders at Day	750 E+06

Process Day	Conditions	Gen 3.1 Test
Day 9-11 - Scale Up	From G-REX 100MCS transfer TIL suspension to 1 G-REX 500MCS (up to 3 GREX 500MCS)	Yes
Day 16 - Harvest	LOVO- automated cell washer	Yes

Figure 20

【図　　】

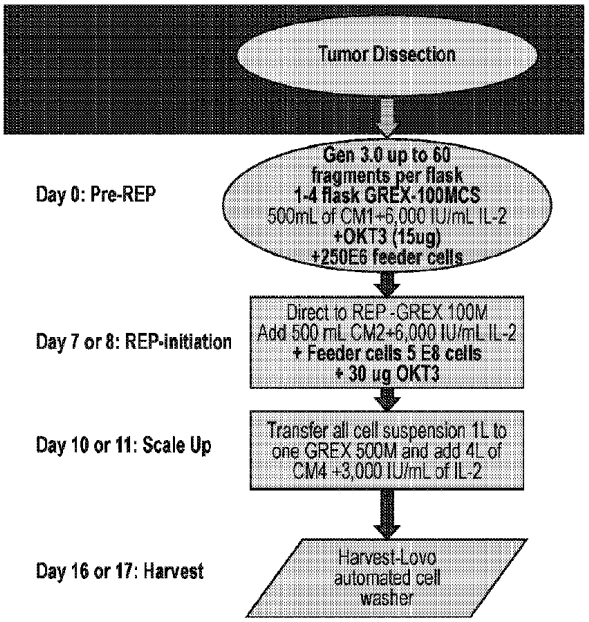


Figure 21

【図 】

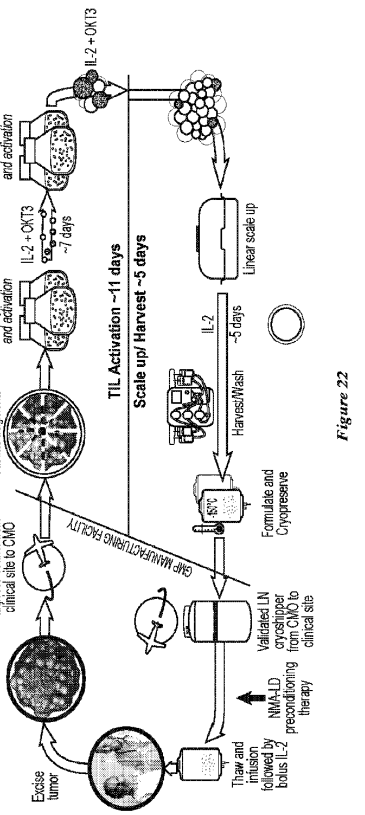


Figure 22

【図 】

Total Culture Time	Gen 2	Gen 3
Pre-REP	22d	16-17d
Fragments/flask	≤80 fragments in 1 flask	≤80 fragments in up to 4 flasks
Media volume	1L - Single addition	1L - 2 x 500mL additions
Target preREP cell numbers	≤200e6 TIL	All cell carried through continuous process
Screening	No screen	No screen
Selection of flasks	No selection	Bac-T sterility, visual inspection for contaminants
REP/Scale up		
Feeders		Reduced by ≥40%
Media	Contains HSAB	Defined
Scale up	Pooled culture Volume reduce to 500mL on Day 5 split up to 5 flasks (2500 cm2)	Flasks scaled linearly and treated as subcomponents.
OKT3	150ug	≤180ug at max scale
IL-2	High dose	High dose
Number of flasks	1-5	1-4
Harvest/volume reduction	Closed 10:1	Closed 10:1
Concentrate/wash	LOVO 100:1	LOVO 100:1
Formulation	1:1 CS10 (5% DMSO)	1:1 CS10 (5% DMSO)
Shipment	Vapor phase LN	Vapor phase LN
Infusion	Thawed IV gravity	Thawed IV gravity

Figure 23B

【図 】

Total Culture Time	Gen 2	Gen 3
Pre-REP	22d	16-17d
Fragments/flask	≤80 fragments in 1 flask	≤80 fragments in up to 4 flasks
Media volume	1L - Single addition	1L - 2 x 500mL additions
Target preREP cell numbers	≤200e6 TIL	All cell carried through continuous process
Screening	No screen	No screen
Selection of flasks	No selection	Bac-T sterility, visual inspection for contaminants
REP/Scale up		
Feeders		Reduced by ≥40%
Media	Contains HSAB	Defined
Scale up	Pooled culture Volume reduce to 500mL on Day 5 split up to 5 flasks (2500 cm2)	Flasks scaled linearly and treated as subcomponents.
OKT3	150ug	≤180ug at max scale
IL-2	High dose	High dose
Number of flasks	1-5	1-4
Harvest/volume reduction	Closed 10:1	Closed 10:1
Concentrate/wash	LOVO 100:1	LOVO 100:1
Formulation	1:1 CS10 (5% DMSO)	1:1 CS10 (5% DMSO)
Shipment	Vapor phase LN	Vapor phase LN
Infusion	Thawed IV gravity	Thawed IV gravity

Figure 23A

【図 】

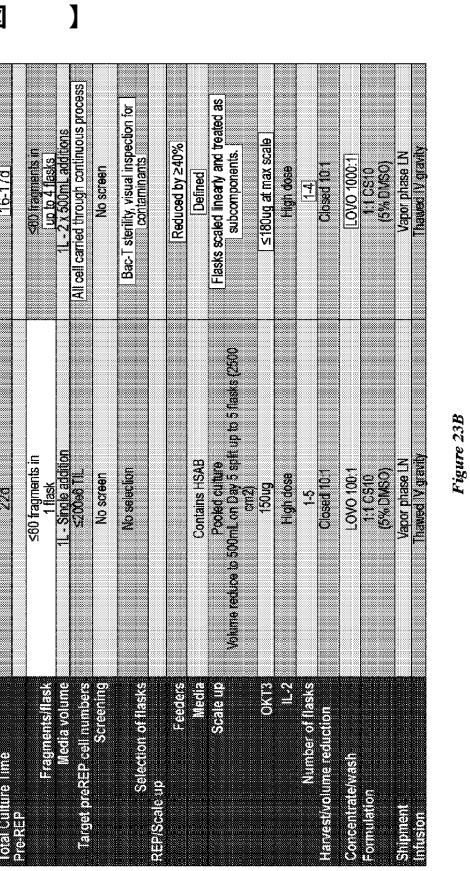


Figure 24

【図 】

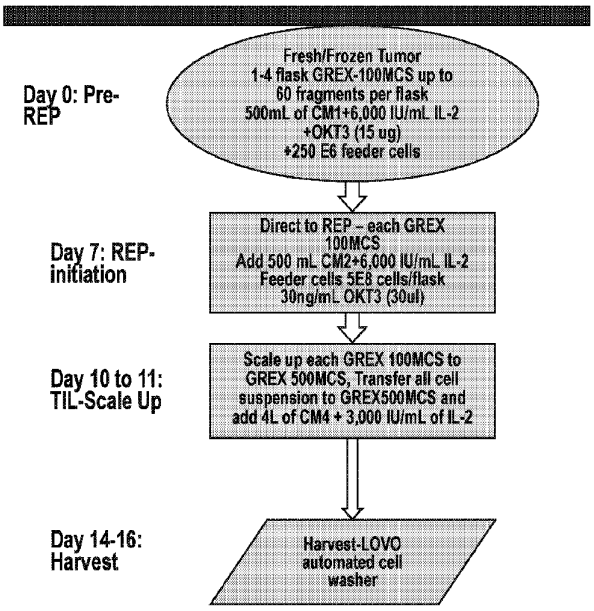


Figure 25

【図 】

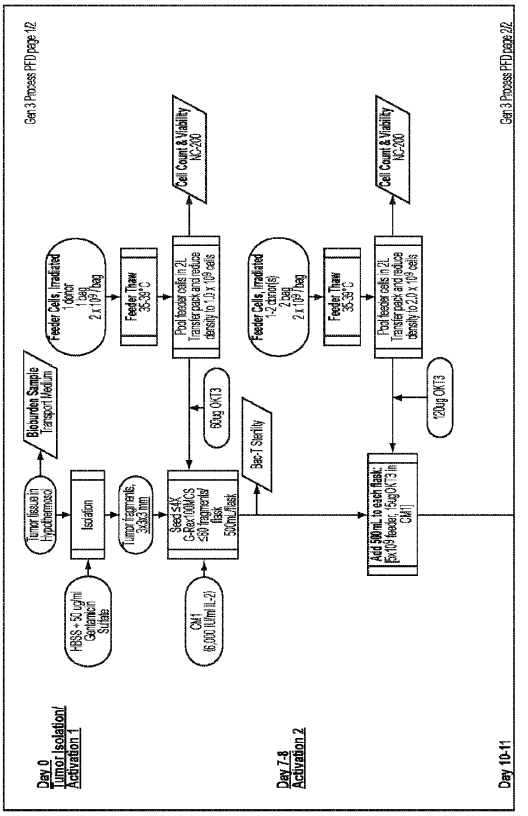


Figure 26A

【図 】

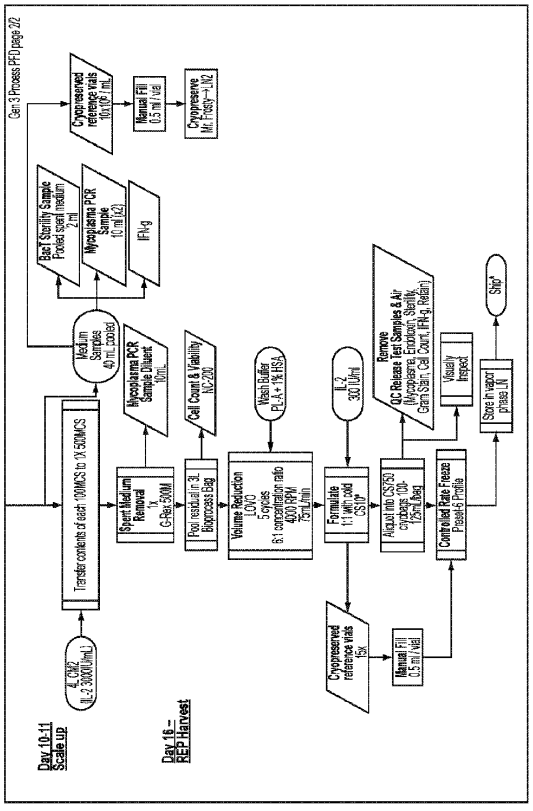


Figure 26B

【図 】

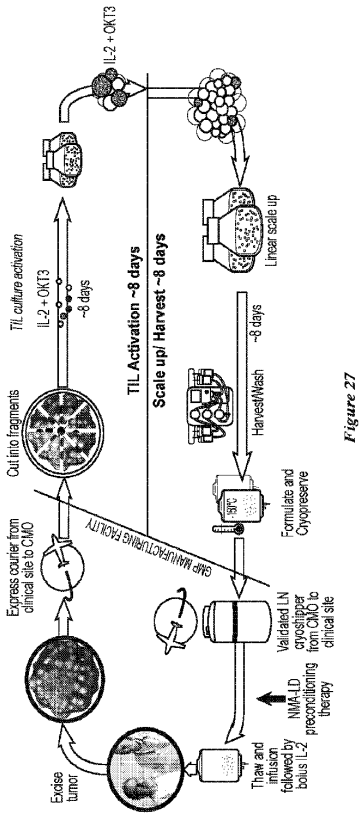


Figure 27

【図 】

STEP	Gen 2	Gen 2.1	Gen 3.0
Pre REP- day 0	≤ 50 fragments/ 1 G-Rex 100MCS - 11 days	≤ 180 fragments/ 2 G-Rex, Pre-formulated CM1 warmed media 100MCS - 11 days	*Fresh or Frozen Tumor* Whole Tumor with ≤ 30 fragments up to 60 fragments per 1 G-Rex 100MCS (up to 4 G-Rex) pre-formulated warmed media - 7 days. Pre REP. Feeders 250e6 cells + OKT-3 (15ug)
REP Initiation	Direct to REP- Day 11- <200e6 TIL 1 G-Rex 500MCS	Direct to REP- Day 11- <200e6 TIL Pre-formulated CM2 warmed media in one G-Rex 500MCS	Direct to REP - Day 7-all cells TIL- same G-Rex 100MCS (1100MCS up to 4 GREX), Standard media or Defined Media (Serum free). Addition Feeders 500e6 cells +OKT-3 (30ug)
TIL propagation or Scale up	1 to 5 G-REX 500MCS Pre-formulated CM4 warmed media Split day 16	2 to 5 G-REX 500MCS Pre-formulated CM4 warmed media Split day 16	From G-REX 100MCS transfer TIL suspension to G-REX 500MCS, up to 4 GREX 500 MCS- Standard media or Defined Media (Serum Free) Scale up on day 10 or 11
Harvest	Harvest day 22, LOVO-automated cell washer (5 wash cycle)	Harvest day 22, LOVO-automated cell washer (5 wash cycle)	Harvest day 14 or 16 LOVO- automated cell washer (5 wash cycle)
Final formulation	Cryopreserved Product 300U/ml IL2. CS10 in LN_2 multiple aliquots	Cryopreserved Product 300 U/ml IL2. CS10 in LN_2 multiple aliquots	Cryopreserved product 300U/ml IL-2. CS10 in LN_2 multiple aliquots
Process time	22 days	22 days	16 days

Figure 28

【図 】

Process Comparison	Process Changes	Differences
Gen 2 : Gen 2.1	• Initiate process with two flasks instead of one flask. • Divide REP Initiation feeder layer between 2 G-Rex500MCS Flasks • Pre-formulate media and warm prior to use.	• Potential doubling of final cell count (dose with increased TIL repertoire. • Process redundancy throughout process
Gen 2.1 : Gen 3.1	• Fresh or Frozen tumor • 14-16 day process (from 22 day) • Reduce total feeder layer on process • Feeder layer and OKT3 present at Day 0 • REP initiated with fragments • 100MCS scales to 500MCS • Scales to multiple pre-REP flasks • Standard Media and Defined Media (Serum Free)	• Increased potency • Improved phenotype • Decreased process time • Reduced reagent testing • Decreased process variability • Defined reagents • Increased repertoire • Reduce impurities (feeder) • Comparable or Higher Dose.

Figure 29

【図 】

Process Day	Conditions	Gen 3.0	Gen 3.1 control	Gen 3.1 Test
Day 0 : Tumor Fragment Isolation and Activation	Media (*)	500 mL	500 mL	500 mL
	IL-2	6000 IU/mL	6000 IU/mL	6000 IU/mL
	OKT-3	-	15 ug	15 ug
	Feeders	-	-	2.5E+06
Process Day	**Conditions**	**Gen 3.0**	**Gen 3.1 control**	**Gen 3.1 Test**
Day 7 - 8 : TIL Culture Reactivation	Media (*)	500 mL	500 mL	500 mL
	IL-2	6000 IU/mL	6000 IU/mL	6000 IU/mL
	OKT-3	30 ug	30 ug	30 ug
	Feeders	1 E+09	500 E+06	500E+06
	Total Feeders added through Day 7	1 E+09	500 E+06	750E+06
Process Day	**Conditions**	**Gen 3.0**	**Gen 3.1 control**	**Gen 3.1 Test**
Day 10-11 : Culture Scale Up	From GREX 100 transfer whole TIL suspension to 1 GREX 500 containing 4L media with IL-2 (3000 IU/mL)			
Process Day	**Conditions**	**Gen 3.0**	**Gen 3.1 control**	**Gen 3.1 Test**
Day 16-17: Harvest/Wash/Formulate	LOVO automated cell washer and cryopreservation with CS10.			

(*) Media can be standard media or CTS serum free media.

Figure 30

【図 】

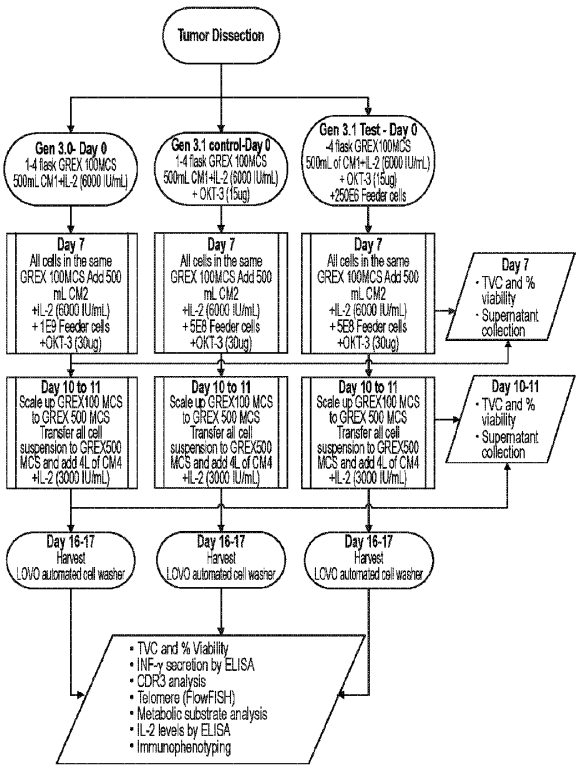


Figure 31

【図　】

Step	Process Gen 3-Optimized
Day 0 Tumor isolation and Activation	≤240 fragments ≤60 fragments/flask ≤4 flasks ≤2L media (500mL/flask) IL-2 (6000IU/mL) 2.5x10^8 feeder cells/flask 15ug OKT3/flask
Day 7 - 8 Reactivation	Fresh TIL direct to REP Activate entire culture 5x10^8 feeder cells 30 ug OKT3/flask G-Rex 100MCS Add 500mL media+ IL-2(6000IU/mL)
Day 10 - 11 Scale up or TIL Sub-culture	≤4 G-REX 500MCS Scale up entire culture transferring 1L from GREX 100MCS into GREX 500MCS and add 4L of media +IL-2 (3000 IU/mL) /flask
Day 16 - 17 Harvest	Harvest LOVO- automated cell washer Cryopreservation on Plasmalyte 1% HSA: CS10

Figure 32

【図　】

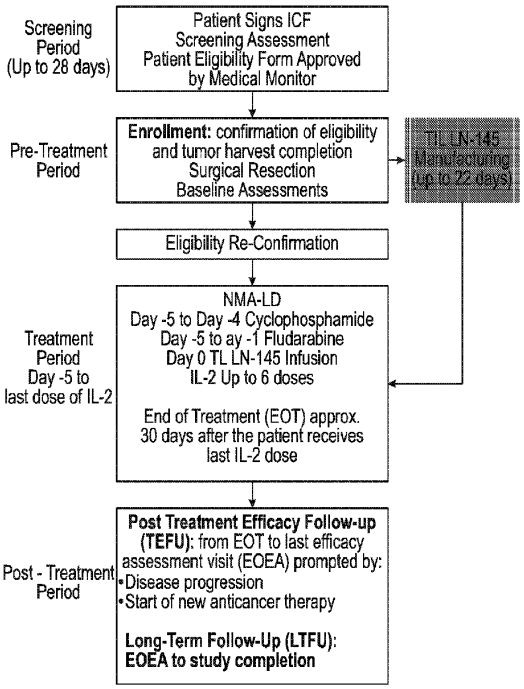
Test	Acceptance Criteria	Gen 3.1 Test vs Gen 3.0 Process
Cell Count (TVC)	Gen 3.1 > 30% to Process Gen 3.0	Met
% Viability	≥70% Viability	Met
Immunophenotyping (%CD3+/ %CD45+)	≤5% difference between Gen 3.1 and Gen 3.0 process	Met
IFNγ secretion	Gen 3.1 ≥ to Process Gen 3.0	Met

Figure 33

【図　】

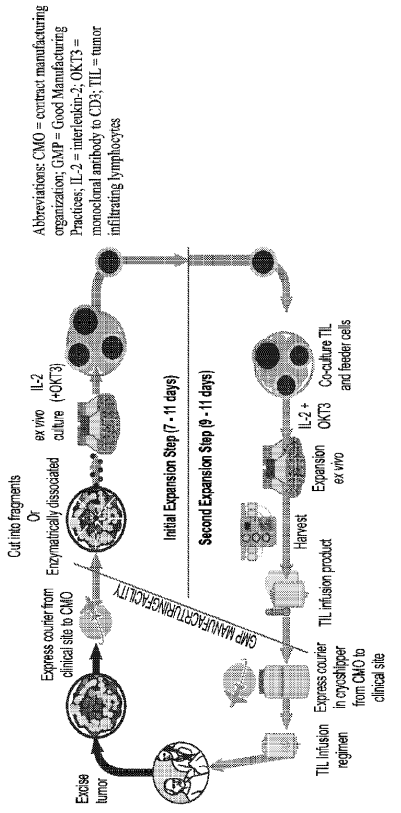
FIG. 34

Figure 1 Diagram of Study Design



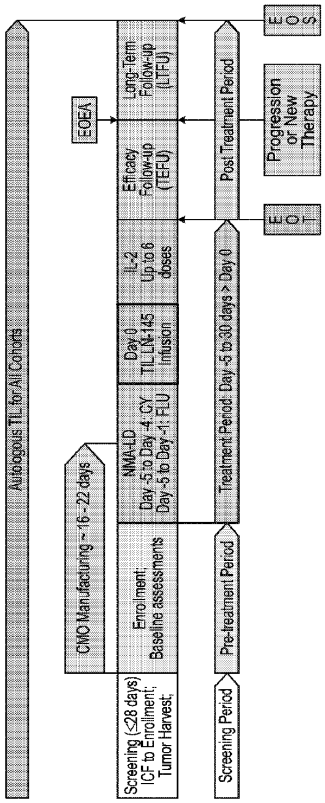
【図　】

FIG. 35



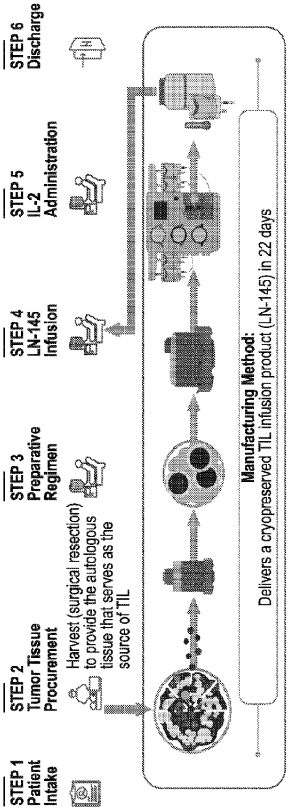
【図】

FIG. 36



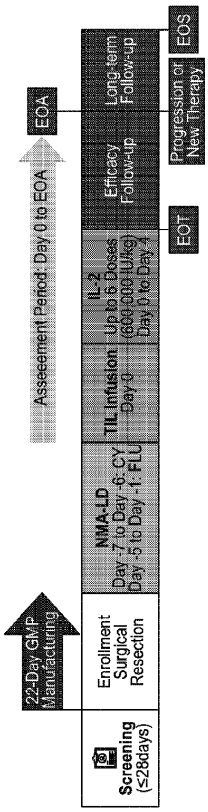
【図】

FIG. 37



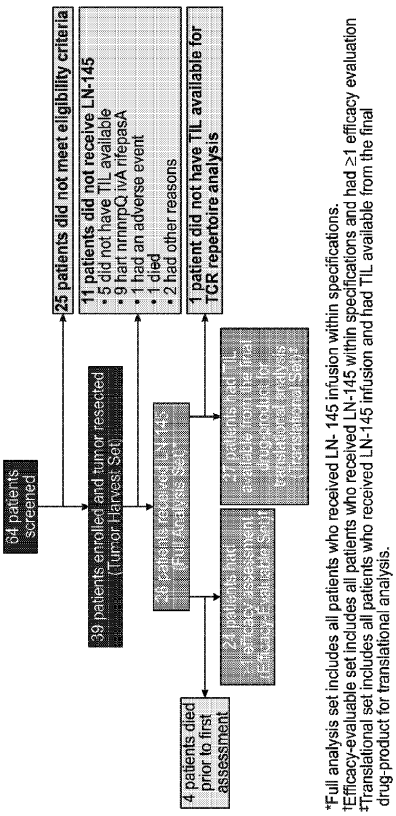
【図】

FIG. 38



【図】

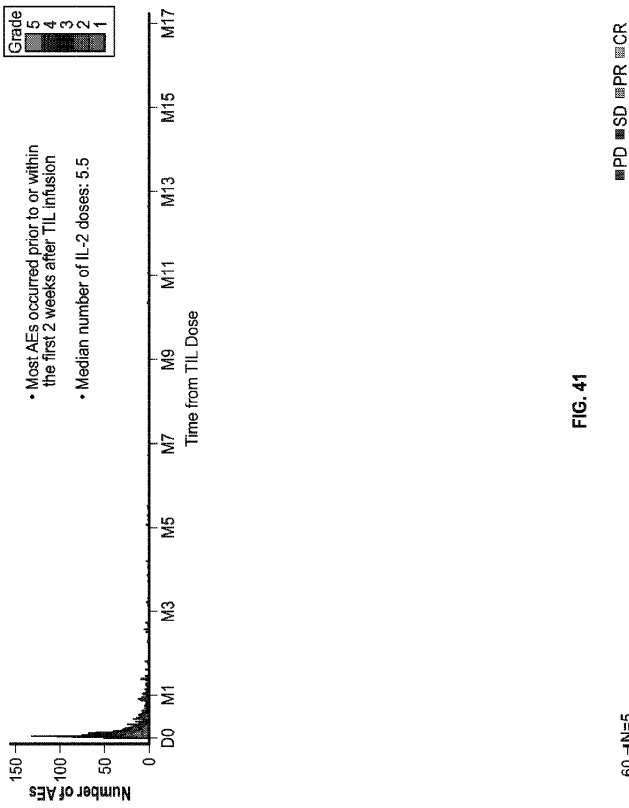
FIG. 39



*Full analysis set includes all patients who received LN- 145 infusion within specifications.
†Efficacy-evaluable set includes all patients who received LN-145 within specifications and had ≥1 efficacy evaluation
‡Translational set includes all patients who received LN-145 infusion and had TIL available from the final drug-product for translational analysis.

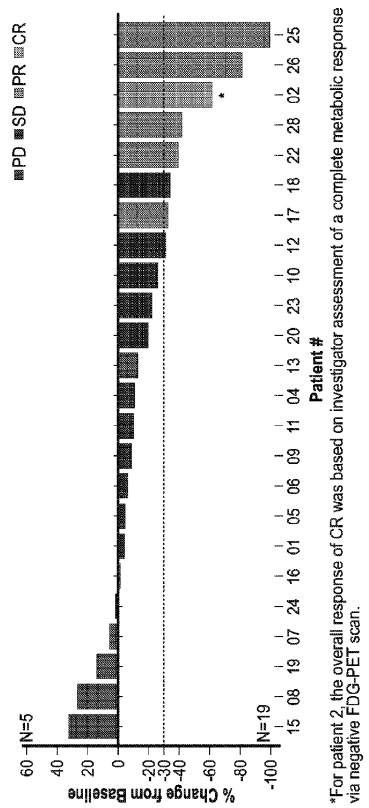
【図】

FIG. 40



【図】

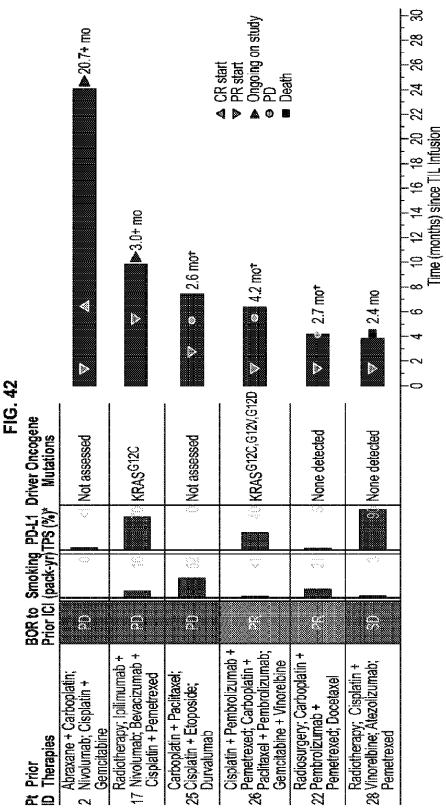
FIG. 41



*For patient 2, the overall response of CR was based on investigator assessment of a complete metabolic response via negative FDG-PET scan.

【図】

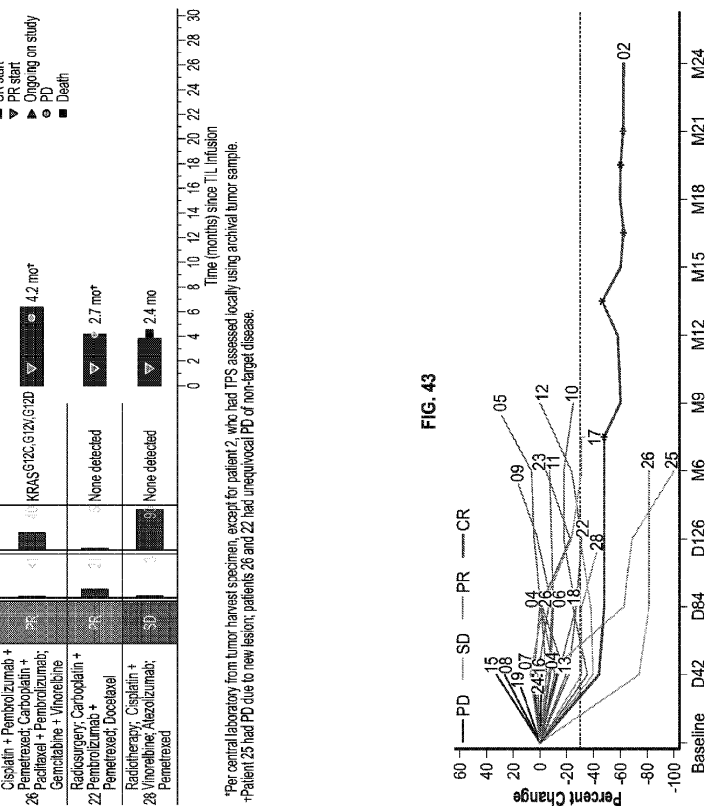
FIG. 42



*Per central laboratory from tumor harvest specimen, except for patient 2, who had TPS assessed locally using archival tumor sample.
+Patient 25 had PD due to new lesion; patients 26 and 22 had unequivocal PD of non-target disease.

【図】

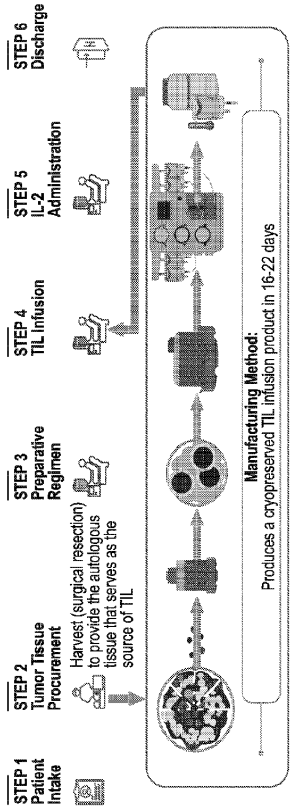
FIG. 43



*The overall response of CR is based on a negative FDG-PET scan by Investigator.

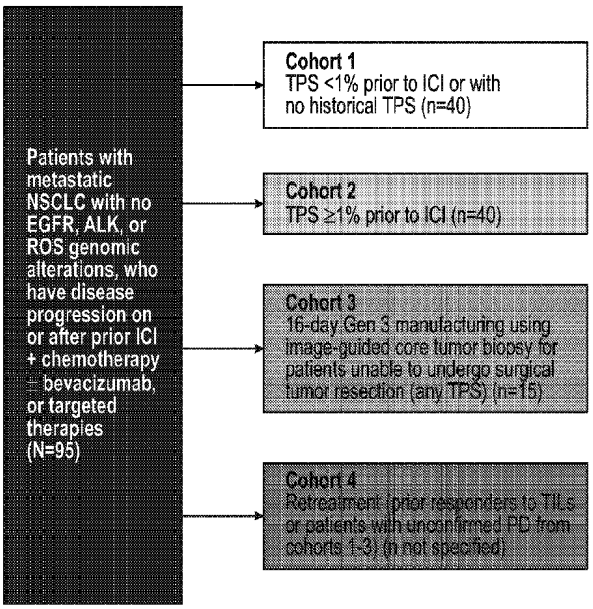
【図 】

FIG. 44



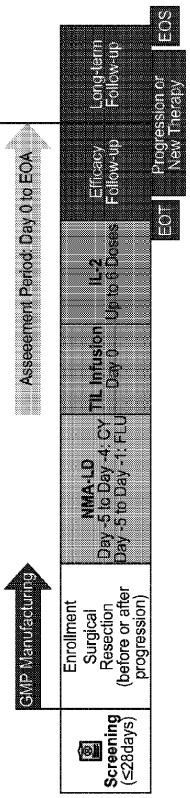
【図 】

FIG. 45



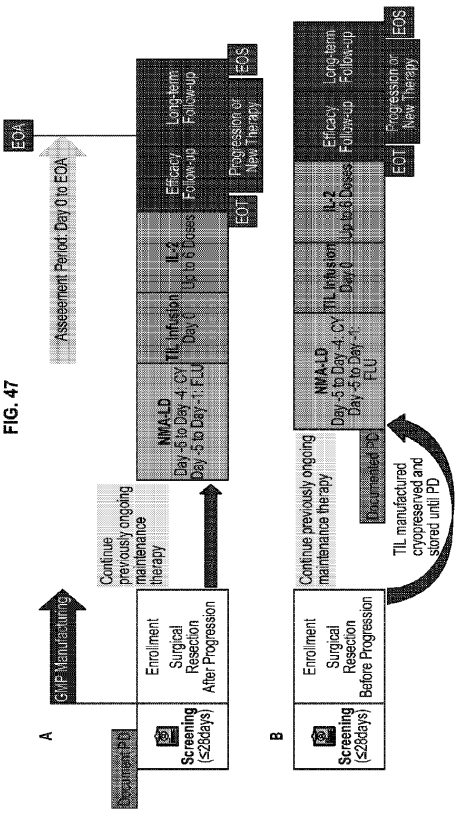
【図 】

FIG. 46



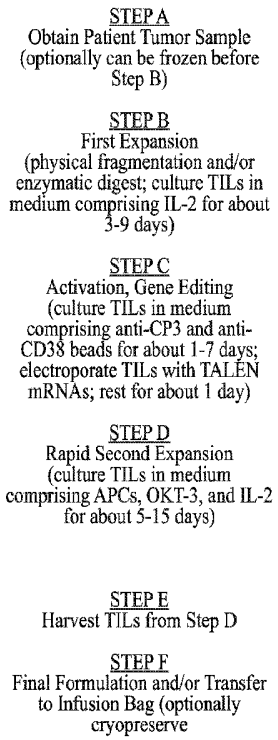
【図 】

FIG. 47



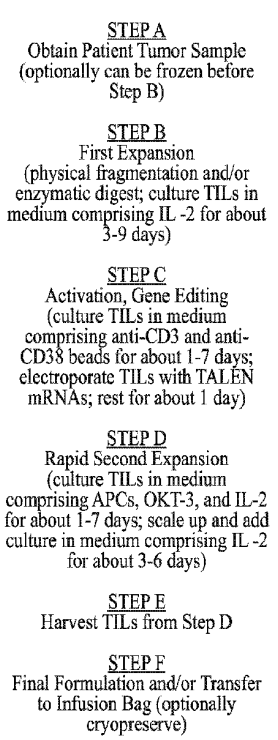
【図　】

FIG. 48A



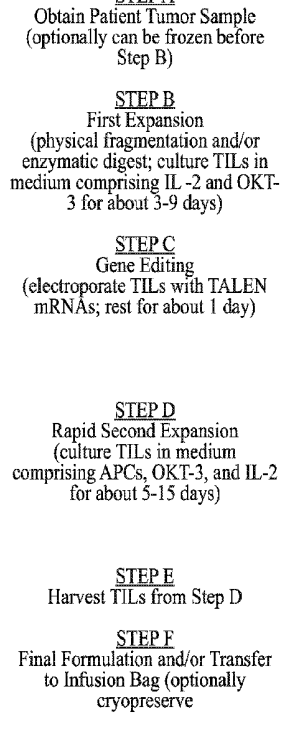
【図　】

FIG. 48B



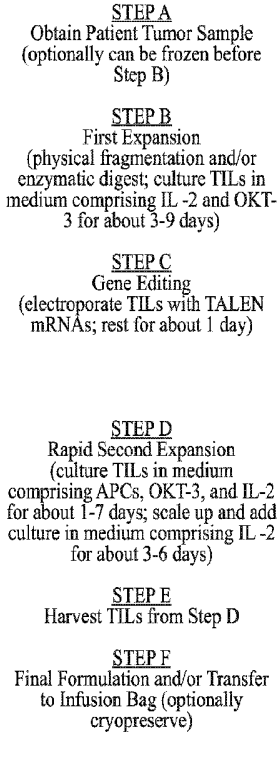
【図　】

FIG. 48C



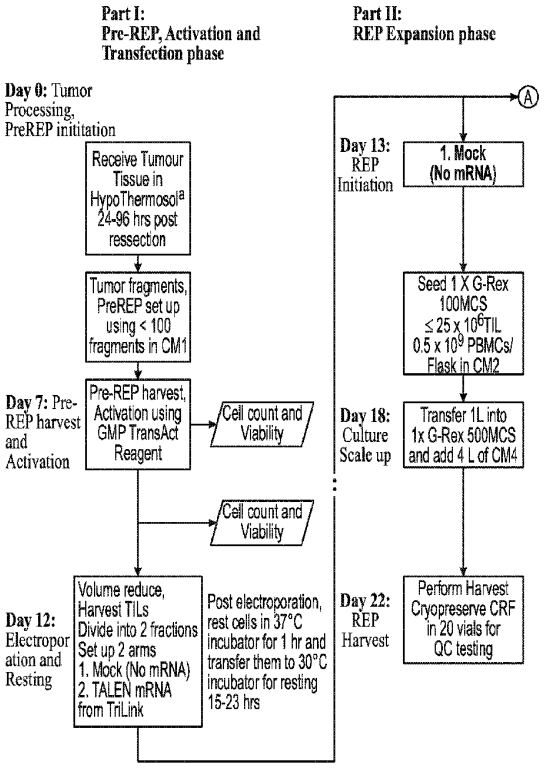
【図　】

FIG. 48D



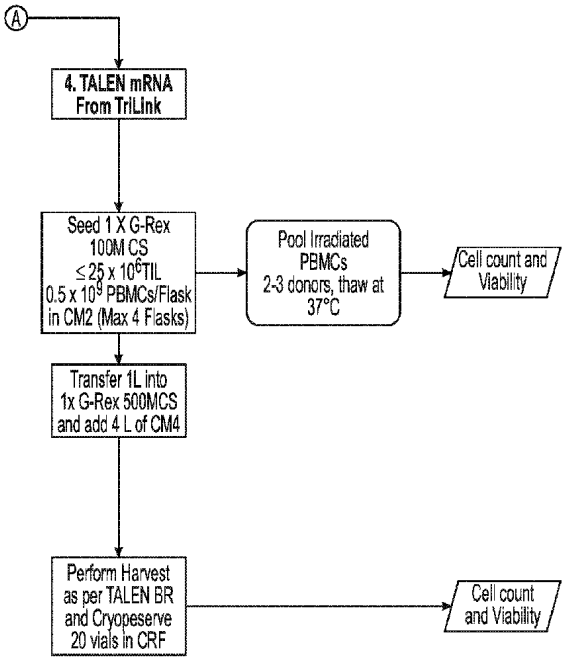
【図　　】

FIG. 49



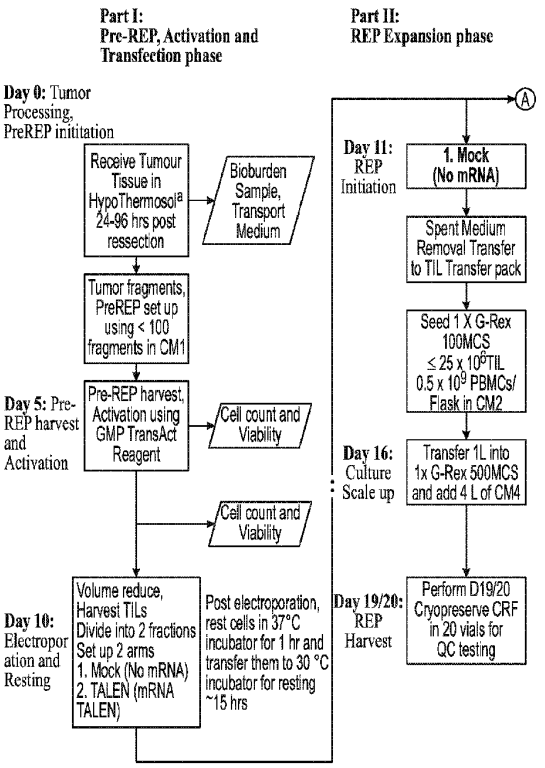
【図　　】

FIG. 49
(Continued)



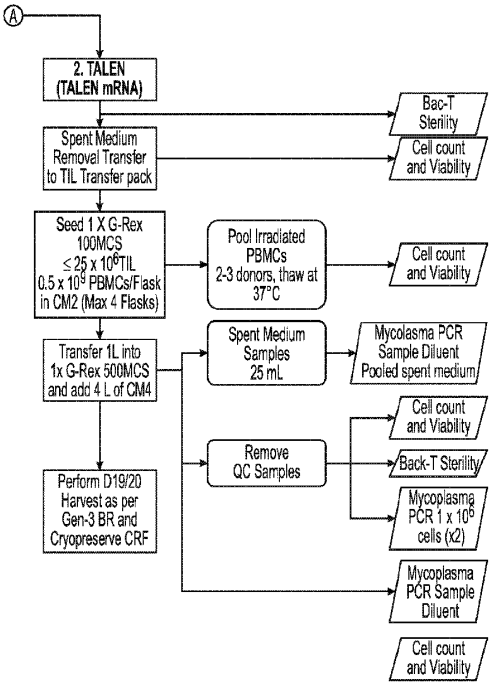
【図　　】

FIG. 50



【図　　】

FIG. 50
(Continued)



【図　　】

FIG. 51A

Signal Sequence: MDWTWILFLVAAATRVHS (SEQ ID NO:252)
Linker (Ln): GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQ (SEQ ID NO:246)
Anchor (Ar2): (human B7.1 transmembrane-intracellular amino acid sequence)
LLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCKERRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:239)
FurinA-P2A sequence: RAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:251)

Tethered IL-12-Lr1-Ar2

MDWTWILFLVAAATRVHSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT
LTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTT
ISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYE
NYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTS
ATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNML
QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYE
DLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAF
RIRAVTIDRVMSYLNAS
RERRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:303)

Tethered IL-12-Lr1-Ar2

ATGGATTGGACCTGGATTCTGTTCCTGGTGGCCGCCGCTACCCGCGTGCACTCCATCTGGGAGCTGAAGAAAGAC
GTGTACGTGGTGGAATTGGATTGGTACCCCGACGCCCCAGGCGAGATGGTGGTCCTGACTTGCGACACGCCTGGA
GGAGGACGGCATCACCTGGACGCTGGACCAGAGCCAGCGAAGTGCTGGGCTCTGGTAAGACCTTAACCATCCAGG
TCAAGGAGTTCGGTGATGCAGGACAGTACACGTGTCACAAGGGCGGGGAGGTCCTGTCCCATAGCCTGCTGCTCC
TGCACAAGAAGGAAGACGGCATCTGGTCTACGCATATCCTTAAAGACCAGAAGGAGCCCAAGAACAAAACCTTCC
TGCGATGCGAGGCTAAGAATTACTCCGGCCGCCTTTACCTGTTGGTGGCTCACAACCATCTCGACCGACCTGACCTT
CTCCCTGAAGTCTTCCAGGGGATCTTCTGATCCGCAAGGCGTTACCTGCGGGGCCGCTACCCTGTCGGCTGAGGGC
GTCGGTGGTGACAACAAGGAGTACGAGTACTCGGTGGAATGCCAGGAGGACAGCGCCTGCCCAGCGGCCGAAGA
GTCCTTGCCCATCGAGGTGATGGTGGACGCTGTACACAAGCTCAAGTACGAGAACTACACCTCCTCCTTCTTTATAC
GCGACATCATCAAGCCTGACCCCCCTAAAAACCTGCAGCTGAAGCCCCTTAAAAACTCTCGACAGGTCGAGGTATC
CTGGGAGTACCCCGACACCTGGTCTACTCCTCATTCGTATTTCAGCCTGACCTTCTGCGTGCAGGTCCAGGGCAAG
TCCAAGCGCGAGAAGAAGGACCGCGTGTTCACCGACAAAACCAGCGCGACTGTCATTTGTCGGAAGAACGCGAG
CATCTCCGTACGGGCACAGGATCGCTATTACCCAGCAGTTGGTCAGAGTGGGCTTCGGTCCGTGTTCTGGAGGA
GGTGGCGGCGGCTCACGCAACCTGCCCGTGGCGACGCCGGACTCCGGGTATGTTCCTTGTCTGCACCACTCTCAG
AACTTGCTCCGTGCCGTCTCGAACATGCTGCAGAAGGCCGCCAGACTCTGGAGTTCTATCCATGCACTAGTGAGG
AGATCGATCATGAGGACATCACCAAGGACAAGACATCCACCGTGGAGCCTTGTCTGCCGCTGGAGTTGCAAAAGA
ACGAGAGCTGCCTCAATACCCGCGAGACTTCCTTCATCACCAACGGCTCCTGCCTCGCCAGCCGTAAGACCTCCTT
TATGATGGCGCTGTGCCTGTCAAGTATCTACGAAGATCTGAAAATGTATCAGGTGGAGTTCAAAACTATGAACGC
AAAACTCCTGATGGATCCCAAGCGCCAAATTTTCTTGGACCAGAACATGCTTGCCGTGATCGACGAGCTGATGCAG
GCCCTGAACTTCAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAAGTCGTCTCTGGAGGAACCCGACTTTTACAAGACAAAGATCA
AGCTGTGCATCCTGCTACAGCGGTTCGGCATCGGCGGTGATCATTGACCGCGTGATGTCCTACCTGAATGCCTC
GTCCGGCGGGGGGGGCTCCGGTGGGGCCGGCTCTGCCGGAGGCGGCTCAGGTGGCGGCCGGCTCCGGCGGAGG
TTCGCTTCAGCTTCTGCCCAGTTGGGCAATCACTCTGATTTCCGTCAACGGAACTTCGTCATCTGCTGCCTGACCTA
CTCTTTGCTCCCAGATGTAGAGAGCGCCCCCCGCAACGAGCGCCTGCGTCGTGAGAGCGTGAGGCCTGTG (SEQ
ID NO:304)

【図　　】

FIG. 51B

Tethered IL-18-Lr1-Ar2

MDWTWILFLVAAATRVHSYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDS
QPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKE
RDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED
CLIYCFAPRCRERRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:305)

Tethered IL-18-Lr1-Ar2

ATGGATTGGACCTGGATTTTGTTCCTGGTGGCTGCAGCCCACTCCGGGTCCACAGCCTACTTCGGCCAAGCTG
GAGAGTAAACTTTCCGTGATCCGCAACCTCAACGACCAAGTGCTGTTCATTGACCAGGGCAACCGCCCC
CTCTTTGAAGACATGACCGACAGCGATTGTCGTGACAATGCGCCCCGCACCATCTTTATAATTTCCATGT
ACAAGGATGAGCCAGCCGCGGGAATGGCGGTAACGATCTCGGTGAAGTGTGAAAAAATCTCGACCCTG
TCATCGCGAGAACAAGATCATTTCCTTCAAAGAGATGAATCCACCCGACAACATCAAGGACACCAAGTCC
GACATCATCTTCTTCCAGCGCAGCGTGCCTGGGCATGACAACAAGATGCAGTTCGAGAGCTCGTCTTAC
GAGGGCTATTTCCTGGCCTGCGAGAAGGAGCGTGACCTGTTCAAGCTTATCCTGAAGAAGGAGGACGA
GCTGGGGGACGGCAGCATCATGTTTACAGTGCAGAACGAGGATTCTGGTGGCGGCGGTAGCGGGGGC
GGGGGTTCTGGCGGCGGAGGCTCCGGTGGAGGAGGCTCCGGCGGCGGTCGTTGCAGCTGCTGCCCA
GTTGGGCCATCACTCTAATCTCCGTCAACGGCATCTTCGTCATCTGTTGCCTGACCTACTGCTTTGCTCCG
AGGTGTAGAGAGCGACGCCGCAACGAGCGCCTCCGCCGTGAGTCCGTGCGCCCTGTT (SEQ ID
NO:306)

Tethered DR-IL-18 (6-27 variant)-Lr1-Ar2 (yellow highlight: mutated residues)

MDWTWILFLVAAATRVHSYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDS
QPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDL
FKLILKKEDELGDRSIMFTVQNEDS
YCFAPRCRERRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:307)

Tethered DR-IL-18 (6-27 variant)-Lr1-Ar2

ATGGATTGGACCTGGATCCTGTTCCTGGTGGCGGCGGCAACTCGGCGTACATAGCTATTTCGGCAAGCTG
GAGAGCAAACTATCAGTGATCCGCAACCTCAACGACCAGGTCTTGTTTATTGACCAGGGCAACCGCCCC
CTGTTCGAAGACATGACGACAGCGATTGTCGCGACAATGCTCCTCGCGACCATCTTTATCATCTCCAAGT
ACTCCGATTCTCGAGCCAGAGGTCTCGCCGTGACCATCTCCGTGAAGTGCGAGAAGATATCCACTCTTTC
ATGCCGAGAACAAGATCATTTCCTTCAAGGAGATGAATCCACCCGACAACATCAAGGACACCAAGTCCGA
CATCATCTTCTTCGCTCGTGTGCCTGGCCACGGCCGCAAGACCCAGTTCGAGAGTTCCAGCTACGAGGG
CTACTTCCTGGCCTGTGAGAAAGAGCGGGACCTTTTCAAATTGATTCTGAAGAAGGAGGACGAGCTGG
GCGACCGTAGCATCATGTTTACGGTGCAGAACGAGGATTCTGGCGGGGGCGGTTCTGGAGGGGGTGG
GTCGGGCGGTGGTGGCTCCGGGGGAGGCGGCTCCGGAGGAGGCTCGCTGCAGCTGCTGCCCAGTTGG
GCCATCACGCTCATTTCTGTCAACGGCATCTTCGTCATCTGTTGCCTGACCTACTGCTTTGCTCCGAGGTG
TAGGGAACGTCGTCGCAACGAGCGCCTGCGCCCGCGAGTCTGTTCGGCCGGTG (SEQ ID NO:308)

【図　　】

FIG. 51C

Tethered IL-12/IL-15

MDWTWILFLVAAATRVHSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT
LTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTT
ISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYE
NYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTS
ATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNML
QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYE
DLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAF
RIRAVTIDRVMSYLNAS
RERRNERLRRESVRPVRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMDWTWILFLVAAATRVHSNWVNVISD
LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLS
CKRCEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
RERRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:309)

Tethered IL-12/IL-15

ATGGATTGGACCTGGATTCTGTTTTGGTGGCGGCGGCCACCGGGTCCATTCCATATGGGAATTAAAGAAGGACGTGTACGT
GGTGGAGCTTGACTGGTACCCTGACGCCCCGGCGAGATGGTGGTCCTGACCTGCGATACCCCCGAGGAGGACGGCATCACC
TGGACCCTGGACCAGAGCTCCGAGGTGCTGGGAGCGGCTAAAACCCTCACCATACAGGTGAAGGAGTTCGGTGATGCTGCC
ACTACACCTGTCACAAAGGCGGCGAGGTACTTCCCATTGCCTGCTCCTCCTTCACAGAAGCGAACGCGCATTGGTCGACC
GATATTCTGAAGGACCAGAAGGAACCAAAAAACAAGACCTTTTTCGTTCGGAGCCAAGAACTATTCCGCCGCTTCACCTG
CTGGTGGCTAAGGACCATCTCAACCGACCTGACCTTCTCCGTTAAGTCTAGCCGTGGTGACGTCCAGCCGGAAGGGTAACCTG
CGGGGCTGCGAGCCTGAGTGCGGAGCGGCTACGCGGCGACAACAAGGAGTACGAGTACTCCGTGGAATGTCAGGAGGATA
GTGCCTGCCCAGCGGCCGAGGAGTCCCTGCCCATCGAGGTAATGGTGGACGCGGTCCACAAGCTGAAGTACGAGAACTACAC
TAGCTCCTTCTTTATTAGACATCATCAAGCCCGACCCCCCTAAGAACCTGCAGCTGAAGCCACTGAAAAACTCTCGCCAGGT
TCAAGTGTCGTGGCAGTACCCTGACACCTGGTCTACTCCCCATTCGTACTTCAGCCTGACCTTCTGCGTGCAGGTGCAGGGC
AAGTCCAAGCGCGAGAAGAAGGACCGCGTGTTCACCGACAAAACCTCTGCTACAGTGATCTGCCGAAGAACGCTTCTATCTCC
GTGCGTGCAGGACCGCTACTACTCATCAAGCTGGAGTGAGTGGGCCTCCGTGCCATGTTCCGGGGGGGCGGCGGTGGCT
CCCGCAACCTGCCGGTGGCAACGCCGACCGGGTATGTTCCCATTGCCTGCACCACTCCCAGAATCTGTTACGTGCTGTAAGCA
ATATGCTTCAGAAGGCTCGCCAGACTCTGGAGTTCTACCCCTGCACTTCGGAGGAGATCGACCATGAGGACATCACCAAGGAC
AAGACATCCACCGTGGAGGCCTGCCTCCTTTGGAGCTCACAAAGAACGAGTCCTGCCTCTAAACTCAAGGAGACTAGCTTCAT
CACTAATGGATGGTGTCTGCCGTCGGCGAAACACCTCTTTCATGATGCCCTGTGCCTGCCAGCATCTATGACGACCTTAAAAT
GTATCAGGTCGAGTTCAAGACTATGAACGCAAACCTGCTGATGGATCCCAAGCGGCAAATTTTCCTGGACCAGAACATGCTGG
CGGTGATCGACGAGCTGATGCAGGCCCTCAACTTCAACAGCGAAACTGTTCCTCAGAAGTCCTCCCTGGAGGAGCCGGACTTT
TACAAGACCAAGATCAAGCTATGTATTTGTTACACGCCTTCGGCATCCGCGTGTCACTATTGACCGCGTGATGTCCTACCTGA
ACGCATCTAGTGGGGGCGGAGGTTCCGGGGGAGGCGGCTCTGGCGGTGGCGGTTCAGGAGCGGC
TCCTTCAGCTGCTCCCGTGGTGGCCATCACACTGATCTCTGTGAACGGCATCTTCGTCATCTGTTGTCTACTTACTGCTTTGC
CCCCAGCTGTAGGGAGAGACGCCGCAATGAACGCCTGAGGCGTGAGACGCCTGCGCCCGGTGAGGCCTAAGCGCAGCGGCT
CCGGCCCGACCAACTTTCCCTCCTGAAGCAGCCCGGGACGTCGCAGCACAATCCAGCCCGATCGATTGCACCTGGATCCT
GTTCTTGGTGGCCGCGGCTACTCGGGTGCACTCTAATTGGGTCAACGTGATCTCCGACTTGAAAAAGATCGAGGATCTGATCC
AGAGCATGCATATCGACGCCACGCTGTACACCGAGAGCGATGTGCACCCCTCTTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTG
CTGGAGCTGCAGGTCATCTCTCTTGAGTCGGGCGATGCATCTATTCATGACACCGTCGAGAACCTAATCATCCTGGCCAACAAC
TCACTGTCTTCAAACGGCAACGTGACCGAGTCTGGGTCAAGGAATCTGAGGAATTGGAGGAGAAAAACATCAAGGAGTTCC
TCCAGTCCTTCGTCCACATCGTGCAGATGTTTATTAACACGAGTAGTGGCGGAGGTGGCGACGGCGAGGGCGGCGGCTCCGGCGG
TGGAGGAACTGGAGCCGCGGCTCTGGTGGCGGTTCCCTACAATTCCTTCCTTTGGCCTATCACCCTCATCAGCGTCAACG
GTATCTTCGTCATCTGTTGTCTGACCTACTGCTTTGCCCCTCGATGCCGAGACCCCGTCCGCAACGAGGCCCTGCCCCGGAGT
CCGTGCGCCCCGTT (SEQ ID NO:310)

【図　　】

FIG. 51D

Tethered IL-18/IL-15

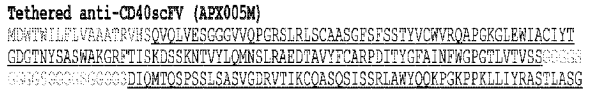
MDWTWILFLVAAATRVHSYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDS
QPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKE
RDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNEDCLIYCFAPRCRERRNERLRRESVRPVRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMDWTWILFLVAAATRVH
SNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLS
SNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
AITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:311)

Tethered IL-18/IL-15

ATGGATTGGACCTGGATCCTTTTCTTGGTGGCGGCTGCAACCCGGGTTCATAGCTATTTCGGCAAGCTG
GAGTCCAAGCTCTCCGTGATCCGCAACCTCAACGACCAGGTGCTGTTCATCGACCAGGGCAACCGCCCC
CTGTTTGAGGACATGACAGATTCTGATTGCGCGCGACAACGGGCCGCCGCACCATCTTCATTATCTCTATGT
ACAAGGACTCCCAGCCACGTGGTATGGCCGTCACGATCAGCGTGAAGTGCGAGAAGATTTCTACCCTGT
CCTGCGAGAACAAGATCATCTCGTTCAAGGAGATGAACCCTCCCGACAATATCAAGGACACCAAGTCCG
ACATCATCTTCTTCCAGCGATCAGTGCCAGGCCCACGACAACAAGATGCAGTTCGAGAGCAGCAGCTACG
AGGGCTACTTCCTTGCGTGCGAGAAAGAGCGCGATCTGTTCAAACTGATCCTCAAGAAGGAAGACGAG
CTCGGGGGACCGCAGCATCATGTTTACCGTACAGAACGAGGACAGCGCCGGCGGCGGCGGCTCCGGTGGAG
GCGGTAGTGGCGGAGGCGGCTCAGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGTGGGTCGTTGCAGCTCTTGCCGAG
TTGGGCTATCACTCTTATCTCCGCAAACGGCATCTTCGTGATATGCTGCCTGACGTACTCTTTTGCTCCTA
GGTGTCGCGAGCGCCCGCCGAACGAGAGACTGCGACGGGAATCCGTGCGCCCGGTCCGCGCCAAGCG
TAGTGCTCCGGTGCTACCAACTCTTCTCTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCC
TATGGACTGGACATGGATCCTGTCCTGGTGGCTGCGGCCACCCGCGTCCACTCAAATTGGGTCAATGT
GATTTCTGACCTGAAGAAAATTGAGGATCTCATCCAGTCCATGCACATTGACGCCACTCTGTACACCGAG
AGCGATGTTCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAGTGTTTCCTGTTGGAGCTGCAGGTCATTTCGC
TCGAGTCTGGCGACGCATCGATCCATGACACCCGTGGAGAACCTGATTATCCTGGCCAACAACTCCCTTTC
TTCAAATGGCAACGTCACTGAAAGCGGGTGCAAAGAGTGTGAGGAGCTGGAAGAAAACAACATCAAA
GAGTTCCTGCAATCTTTCGTCCACATTGTCCAGATGTTTATTAACACGTCCTCGGGTGGCGGGGGGGTCG
GGCGGGGGTGGTTCCGGCGGAGGCGGGTCCGGAGGAGGGGGGCTCTGGTGGGGGATCCCTACAGCTA
CTGCCCTCTTGGGCCATCACCCTTATCTCCGTCAACGGTATCTTCGTGATCTGTTGCCTGACTTACTGCTTT
GCCCCGAGATGTCGTGAGCGTAGGAGGAACGAGCGCCTGCGCCGCGAGAGCGTGCGTCCCGTG (SEQ
ID NO:312)

【図　　】

FIG. 51E



Tethered anti-CD40scFV (APX005M)

MDWTWILFLVAAATRVHSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSTYVCWVRQAPGKGLEWIACIYT
GDGTNYSASWAKGRFTISKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARPDITYGFAINFWGPGTLVTVSS[GGGGS
GGGGSGGGGSGGGGS]DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIKCQASQSISSRLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQCTGYGISWPIGGGTKVEIK[GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGSLQLLFSWAITLIGVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:313)

Tethered anti-CD40scFV (APX005M)

ATGGATTGGACCTGGATCCTGTTCCTGGTGGCGGCCGCTACACGAGTCCACAGCCAGGTCCAGCTCGTG
GAGAGCGGAGGCGGCGTGGTGCAGCCAGGCCGCTCGCTGCGCCTGTCATGCGCAGCGTCCGGTTTCTC
CTTCTCGTCGACCTACGTGTGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAGTGGATTGCTTGTAT
TTATACCGGCGACGGCACCAACTACAGCGCAAGTTGGGCCAAGGGCCGTTTCACCATCTCCAAGGATAG
TAGCAAGAACACGGTATACCTGCAGATGAACTCTCTTCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTATTTCTGTGCC
CGGCCCGACATCACTTATGGCTTCGCGATTAACTTTTGGGGCCCTGGAACCCTGGTGACCGTGTCCTCCG
GCGGCGGTGGCTCTGGGGGGGGCGGGTCCGGCGGAGGCGGCAGCGGAGGCGGCGGCTCCGACATCC
AGATGACCCAGTCGCCCAGTTCTTTGTCCGCTTCCGTGGGGGACAGGGTCACCATAAAGTGCCAGGCTT
CTCAGAGCATCTGGTCCCGCCTGGCGTGGTACCAGCAGAAGCCCGGGAAGCCCCCAAAGCTGCTCATCT
ACCGGGCTTCCACTCTGGCCAGCGGTGCTCCTTCCCGCTTCTCTGGCTCCGGGTCGGGCACTGACTTTAC
ATTGACGATCTCTTCGCTTCAGCCGGAAGATGTAGCTACTTACTACTGTCAATGCACTGGCTACGGCATC
AGTTGGCCCATCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAGATCAAAAGCGGGGGAGGCGGTTCTGGCGGTGGAG
GGTCTGCCGGGGGTGGCTCCGGGGGCGGTGGTAGCGGTGGTGGATCCCTACAGCTGCTGCCCTCTTGG
GCCATCACGCTCATTTCAGTTAATGGCATCTTCGTCATCTGCTGCCTGACCTACTGCTTTGCGCCGAGGTG
TAGAGAGCGGCGTCGCAACGAGCGCCTGCGTCGCGAGAGCGTGCGCCCGGTG (SEQ ID NO:314)

【図　　】

FIG. 51F



Tethered anti-CD40scFV (Dacetuzumab)

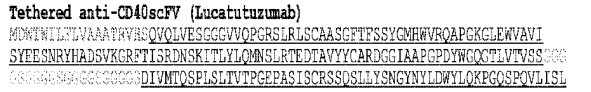
MDWTWILFLVAAATRVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWVRQAPGKGLEWVARVI
PNAGGTSYNQKFKGRFTLSVDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARECIYWWGQGTLVTVSS[GGGGSGGG
GSGGGGSGGGGS]DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSN
RFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGQGTKVEIK[GGGGSGGGGSGGGGSGG
GGGSGSSLQSLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:315)

Tethered anti-CD40scFV (Dacetuzumab)

ATGGATTGGACCTGGATCCTGTTCCTGGTGGCGGCCGCTACACGTGTCACTCCGAGGTGCAGTTGGTG
GAGAGCGGCGGTGGTCTGGTGCAGCCGGGCGGGAGCCTGCGCCTGTCGTGCGCCGCTTCCGGCTACTC
CTTCACCGGTTATTACATCCACTGGGTGCGACAGGCCCCGGGCAAAGGCCTGGAGTGGGTCGCTCGCGT
AATTCCTAACGCGGGTGGCACCAGCTACAACCAGAAATTTAAGGGCAGATTCACCCTCAGCGTTGACAA
CTCCAAGAACACGGCCTACCTGCAGATGAACTCCCTTCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCT
CGCGAGGGCATCTATTGGTGGGGCCAGGGAACTCTAGTTACCGTGTCCTCCGGCGGCGGCGGCTCGGG
CGGCGGGGGTTCTGGTGGGGGCGGTTCCGGAGGGGGAGGGTCCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCC
TCTAGTCTGAGCGCATCCGTGGGGGACAGGGTCACCATCACCTGCCGCTCGTCACAATCGCTTGTCCACT
CAAATGGCAACACTTTCCTGCATTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCGCCCAAGCTGCTCATCTACA
CCGTGAGCAACCGCTTTTCAGGCGTGCCATCCCGCTTCTCTGGCTCCGGCTCCGGTACAGATTTCACCCTT
ACCATTAGCTCGTTGCAGCCAGAAGACTTTGCCACCTATTTCTGTTCTCAGACGACTCACGTCCCGTGGA
CCTTCGGACAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGCCGAGGTGGGAGTGGAGGCGGCGGGTCCG
GAGGGGCCGGTTCTGGCGGCGGTGGTTCTGCGGAGGGTCTCTGCAGCTGCTACCCAGTTGGGCCATC
ACTCTCATTTCTGTCAACGGCATCTTCGTCATATGTTGCCTGACCTACTGCTTTGCTCCCAGGTGTCGTGA
GCGCCGCCGCAACGAGCGGTTGCGGCGTGAATCCGTGCGCCCTGTA (SEQ ID NO:316)

【図　　】

FIG. 51G



Tethered anti-CD40scFV (Lucatutuzumab)

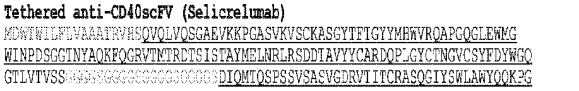
MDWTWILFLVAAATRVHSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
SYEESNRYHADSVKGRFTISRDNSKITLYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTLVTVSS[GGG
GSGGGGSGGGGSGGGGS]DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLISL
GSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTPFTFGPGTKVDIR[GGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSQSLQLLFSWAITLIGVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:317)

Tethered anti-CD40scFV (Lucatutuzumab)

ATCGACTGGACCTGGATCCTGTTCCTGGTCGCCACCGGCCACCCGCGTACATTCTCAGGTGCAGCTGGTG
GAATCCGGCGGTGGCGGTCAGCCAGGCCGTAGCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCGTTTAC
TTTTTCGTCTTACGGCATGCACTGGGTCGCCCAGGCCCCGGGTAAGGGCTTGGAGTGGGTCGCGGTTAT
CAGCTATGAGGAGAGCAACCGCTACCACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCGCGGGACA
ACTCCAAGATAACCCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGGACTGAAGACACCGCCGTGTACTACTGTGC
CCGCGATGGCGGAATCGCCGCTCCCGGGCCCGACTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTTACCGTCTCCTC
GGCAGGCGGCGGCAGTGGTGGTGGAGGTTCCGGCGGCGGGGGCTCCGGGGGGTGGCGGCTCTGACAT
CGTGATGACGCAGAGCCCTTTGAGCCTAACAGTTACCCCCGGGGAGCCCGCTTCGATTTCATGCCGCTCC
TCCCAGAGCCTGCTGTACTCAAATGGCTACAACTACCTGGACTGGTACCTCCAGAAGCCGGGTCAGTCCC
CTCAGGTGCTCATCTCGTTGGGCAGCAACAGGGCCTCTGGCGTGCCAGACCGCTTCTCCGGATCTGGCA
GCGGAACCGATTTCACCCTGAAGATCTCTAGAGTGGAGGCTGAGGACGTGGGCGTGTATTACTGTATGC
AGCCCCGACAGACTCCCTTCACCTTCGGCCCCGGCACCAAGGTGGATATCCGCTCGGGAGCGCGGCGGC
AGCGGTGGGGGAGGCAGCGGTGGTGGCGGATCCGGGGGGGGCGGCTCTGGTGGCCGATCCCTCCAG
CTCCTCCCGAGTTGGGCTATCACTCTTATTTCCGTAAATGGGATTTTCGTCATCTGCTGCCTTACCTACTG
CTTTGCACCTAGATGTCGCGAGCGTAGGCGCAACGAGCGGCTTCGTCGCGAGTCCGTCCGCCCTGTC
(SEQ ID NO:318)

【図　　】

FIG. 51H



Tethered anti-CD40scFV (Selicrelumab)

MDWTWILFLVAAATRVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMG
WINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQ
GTLVTVSS[GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS]DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIYSWLAWYQQKPG
KAPNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKVEIK[GGGGSGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID
NO:319)

Tethered anti-CD40scFV (Selicrelumab)

ATGGATTGGACCTGGATCCTGTTCCTGGTGGCTGCTGCCACCCGTGTGCACAGCCAGGTGCAGCTGGTG
CAATCCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAGGTATCGTGTAAGGCTTCGGGCTACAC
GTTCACCGGCTACTACATGCATTGGGTCCGCCAGGCCCCCGGACAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTGGA
TTAACCCCGACTCCGGCGGCACCAACTACGCGCAGAAATTTCAGGGGCGAGTGACTATGACAAGGGAC
ACTTCCATCTCCACAGCCTACATGGAGCTCAACCGCCTGCGGCAGCGATGACACCGCAGTGTACTATTGTG
CTCGCGACCAGCCTCTAGGTTACTGCACTAATGGCGTATGTAGCTATTTCGACTATTGGGGCCAGGGCAC
CCTGGTCACCGTGTCCAGCGGCGGAGGGGGCTCAGGCGGAGGTGGCTCAGGAGGTGGCGGCTCGGGG
GGCGGTGGGTCCGACATTCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCGTCTCTGCTTCTGTGGGAGACCGCGTG
ACGATAACCTGCCGTGCCTCCCAGGGCATCTACAGTTGGCTTGCGTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAG
GCGCCAAACCTGCTGATTTACACCGCATCCACTCTTCAGTCAGGCGTTCCTTCCCGCTTCAGTGGCTCTGG
TTCTGGCACCGATTTCACGCTGACCATCTCCTCCTTGCAGCCGGAAGACTTTGCCACTTACTACTGCCAAC
AGCCCAACATCTTCCCTCTGACCTTCGGCGGTGGCACCAAGGTGGAGATCAAATCTGGCGGAGGCGGC
TCGGGCGGGGGGTGGTTCTGGCGGCGGGGGAAGTGGTGGGGGCGGATCTGGTGGTGGTAGCCTGCAG
CTCTTGCCCTCCTGGGCGATCACCCTCATCAGCGTCAATGGCATCTTCGTCATCTGTTGCCTGACCTACTG
CTTTGCGCCGAGATGTCGAGAGCGCCGGCGCAACGAGCGCCTGCGTCGGGAGTCCGTGCGCCCCGTG
(SEQ ID NO:320)

【図　　】

FIG. 51I

CD40L

MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNT
GERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYT
MSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQ
QSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLK (SEQ ID NO:273)

CD40L

ATGATCGAGACCTACAACCAGACTTCCCCACGTAGCGCCGCCACTGGTCTACCCATCTCGATGAAAATCT
TCATGTATCTGCTGACCGTGTTCCTGATCACCCAGATGATTGGCTCCGCTCTGTTTGCCGTCTACTTGCAC
CGCCGCCTGGACAAAATTGAGGACGAGCGGAATCTGCACGAAGATTTCGTATTTATGAAGACCATCCAG
AGGTGTAACACTGGCGAGCGTTCTCTTTCGTTGCTTAACTGCGAAGAGATCAAGAGCCAGTTCGAGGGC
TTCGTCAAGGACATCATGCTCAACAAGGAGGAGACTAAGAAGGAGAACTCCTTTGAGATGCAGAAGGG
TGATCAGAACCCCCAAATTGCAGCGCATGTGATAAGCGAGGCTTCCTCCAAGACAACCAGTGTGCTGCA
GTGGGCGGAGAAGGGCTACTACACCATGTCAAATAACCTGGTGACCCTGGAGAACGGCAAGCAGCTGA
CGGTGAAGCGCCAGGGGCTCTATTACATCTACGCGCAGGTCACGTTCTGTTCGAACCGCGAAGCCTCCT
CTCAGGCTCCCTTCATCGCCTCACTGTGCCTGAAATCTCCGGGACGCTTCGAGCGAATCCTGCTCCGCGC
CGCCAACACGCACTCCTCCGCCAAGCCTTGCGGGCAGCAGACGCATCCACCTTGGTGGGGTTTTTGAGCT
GCAGCCTGGCGCGTCCGTGTTCGTCAACGTGACCGACCCGTCCCAGGTCTCTCATGGAACCGGCTTCACC
TCCTTCGGCCTGCTCAAGTTG (SEQ ID NO:321)

【図　　】

FIG. 51J

Tethered CD40L/IL-15

MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNT
GERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYT
MSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQ
QSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSLQLLP
SWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPVRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMDW
TWLFLVAAATRVHSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIH
DTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG
GSGGGSGLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:322)

Tethered CD40L/IL-15

ATGATCGAAACTTACAACCAGACGAGCCCGCGCTCCGCCGCCACCGGGCTGCCCATCTCTATGAAAATCT
TCATGTATCTGCTGACCGTGTTTCTGATCACCCAGATGATCGGTTCCGCGCTGTTTGCCGTGTACCTGCAC
CGCCGCCTGGACAAGATAGAAGACGAGCGCAACCTGCACGAAGATTTCGTCTTCATGAAGACCATCCAG
CGGTGTAATACCGGCGAGAGGAGCCTGAGCTTGCTCAACTGCGAGGAGATCAAAAGTCAGTTCGAGGG
CTTCGTTAAGGACATCATGCTCAACAAGGAGGAGACCAAGAAGGAGAACTCCTTCGAGATGCAAAAGG
GGGACCAGAACCCTCAGATCGCCGCGCATGTAATTTCCGAGGCCTCATCCAAGACGACTTCTGTCCTACA
GTGGGCAGAGAAGGCTACTACACCATGTCTAATAACCTGGTCACCCTTGAGAACGGCAAGCAACTGAC
AGTGAAGCGCCAGGGCCICTACTACATCTACGCGCAGGTGACCTTCTGCAGCAACCGCGAGGCTTCCTC
CCAAGCTCCCTTCATCGCATCTCTGTGCCTGAAAAGCCCTGGCCGCTTCGAGCGGATTCTCCTTCGTGCA
GCAAACACTCACTCGTCCGCCAAGCCCTGTGGACAGCAGAGCATCCACCTGGGCGGCGTGTTCGAGCTG
CAGCCAGGCGCCTCCGTGTTCGTCAAIGTGACCGACCCGTCCCAGGTGTCCCATGGCAGTGGCTTCACCT
CCITCGGCCTCCTCAAACTGTCCGGCGGCGGTGGCAGTGGTCGCGGCGGGGAICAGGTGGCGGCGGCTCC
GGAGGTGGCGGGTCCGGCGGAGGTTCTCTTCAGCTTCTGCCIAGCTGGGCGATCACCCTGATCTCCGTT
AATGGCATCTTCGTCATTTGTTGTTTGACCTATTGCTTTGCCCCGAGATGTCGAGAGCGTAGACGCAACG
AGCGCCTGCGCCGTGAAAGCGTGCGACCTGTGCGCGCTAAGCGCAGCGGCTCCGGCGCTACCAACITCT
CATTACTCAAGCAGGCTGGAGATGTACAGGAGAATCCAGGGCCAATGGATTGGACCTCGATCCTGTTCC
TGGTGGCCGCCCCGACTCGCGTCCACAGTAATTGGGTCAACCTGATCTCTGACCTGAAAAAGATTGAGG
ACTTGATCCAGAGCATGCACATTGACGCTACCCTGTACACGGAGAGTGACGTGCACCCCTCGTGCAAGG
TGACAGCCATGAAGTGCTTTTTGCTGGAGTTGCAGGTCATCTCTCTAGAGAGCGGTGATGCCTCCATCCA
TGACACCGTGGAGAACCTTATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGTCGAGCAACGGCAACGTGACCGAGTC
CGGGTGCAAGGAATGTGAGGAGCTGGAGGAGAAAAACATCAAGGAGTTCCTGCAGTCGTTTGTGCACA
TCGTGCAGATGTTTATTAACACCTCTTCTGGCGGTGGGGGATCGGGGGGGGGCGGCTCCGGCGGTGGC
GGTTCTGGAGGCGGTGGTTCTGGCGGGGGATCTTTACAGCTGCTGCCCAGTTGGGCGATCACTCTCATT
TCCGTGAACGGCATTTTCGTCATTTGCTGTTTGACCTACTGCTTTGCTCCGAGGTGTCGCGAGCGTCGCC
GCAACGAGCGCCTACGGCGGGAATCGGTGAGGCCCGTG (SEQ ID NO:323)

【図　　】

FIG. 52A

Signal Sequence: MDWTWILFLVAAATRVHS (SEQ ID NO:252)
Signal Sequence: MYRMQLLSCIALSLALVTNS (SEQ ID NO:254)
Linker (G4S): GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQ (SEQ ID NO:246)
Anchor (Ar2): {human B7.1 transmembrane-intracellular amino acid sequence}
LLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:239)
FurinA-P2A sequence: RAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:251)
}

Tethered IL-2

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE
ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:324)

Tethered IL-2

ATGTATCGGATGCAGCTGCTGTCTTGTATTGCTCTATCACTGGCGCTGGTGACCAACTCCGCTCCTACTTCCAGCTC
GACCAAGAAGACCCAGCTCCAACTTGAGCACCTGCTGCTTGATCTTCAGATGATCCTGAACGGCATCAACAACTAC
AAAAACCCCAAGCTGACCCGCATGCTCACTTTCAAGTTCTACATGCCTAAAAAGGCCACCGAGCTCAAGCACTTGC
AGTGCCTGGAGGAGGAGTTGAAGCCGTTGGAAGAGGTGCTCAACCTGGCCCAGTCCAAGAACTTCCACCTAAGAC
CCCGCGACCTGATCTCTAACATCAACGTGATTGTACTGGAGCTGAAGGGCTCCGAGACCACCTTCATGTGCGAGTA
CGCGGACGAGACTGCAACCATCGTGGAGTTCCTGAACCGCTGGATCACGTTCTGTCAGAGCATCATCTCGACCCTT
ACATCTGGCGGCGGGGGGGTCGGCGGCGTGGGGGTCTGGAGGAGGCGGTAGTGGGGGTGGCGGCTCCGGTGGA
GGCAGCCTGCAGCTGCTCCCAAGTTGGGCCATCACCCTGATTAGCGTCAATGGCATCTTCGTCATATTGTTGTCTGA
CCTACTGCTTTGCCCCCCGCTGCCGAGAACGTCGCCGCAACGAGCGGCTGCGCAGGGAGTCCGTGCGCCCGGTGT
GA(SEQ ID NO:325)

【図　　】

FIG. 52B

Tethered IL-12

MDWTWILFLVAAATRVHSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEF
GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGS
SDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQL
KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW
ASVPCSGGGGGGRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPL
ELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELM
QALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGTGSGGTGGGTGSGGTGSGGTGSLQ
LLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:326)

Tethered IL-12

ATGTATCGGATGCAGCTGCTGTCTTGTATTGCTCTATCACTGGCGCTGGTGACCAACTCCGCTCCTACTTCCAGCTC
GACCAAGAAGACCCAGCTCCAACTTGAGCACCTGCTGCTTGATCTTCAGATGATCCTGAACGGCATCAACAACTAC
AAAAACCCCAAGCTGACCCGCATGCTCACTTTCAAGTTCTACATGCCTAAAAAGGCCACCGAGCTCAAGCACTTGC
AGTGCCTGGAGGAGGAGTTGAAGCCGTTGGAAGAGGTGCTCAACCTGGCCCAGTCCAAGAACTTCCACCTAAGAC
CCCGCGACCTGATCTCTAACATCAACGTGATTGTACTGGAGCTGAAGGGCTCCGAGACCACCTTCATGTGCGAGTA
CGCGGACGAGACTGCAACCATCGTGGAGTTCCTGAACCGCTGGATCACGTTCTGTCAGAGCATCATCTCGACCCTT
ACATCTGGCGGCGGGGGGGTCGGCGGCGTGGGGGTCTGGAGGAGGCGGTAGTGGGGGTGGCGGCTCCGGTGGA
GGCAGCCTGCAGCTGCTCCCAAGTTGGGCCATCACCCTGATTAGCGTCAATGGCATCTTCGTCATATTGTTGTCTGA
CCTACTGCTTTGCCCCCCGCTGCCGAGAACGTCGCCGCAACGAGCGGCTGCGCAGGGAGTCCGTGCGCCCGGTGT
GA (SEQ ID NO:327)

【図　　】

FIG. 52C

Tethered IL-15

MDWTWILFLVAAATGVHSNWVVVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDT
VENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS**SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQ**
LIESNATTLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:328)

Tethered IL-15

ATGGATTGGACCTGGATCCTGTTCCTGCTGGCTGCGGCCCACCCGTGTACACAGCAACTGGGTCAATGTGATCTCCG
ACCTGAAGAAGATTGAGGACCTCATCCAGTCTATGCACATTGACGCAACACTTTACACCGAGAGCGATGTGCACCC
CTCTTGCAAGGTGACTGCCATCAAATGTTTCTTGCTCGAATTGCAGGTCATCTCTCTGGAGAGTGGGGACGCTTCC
ATACATGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTCTCGTCAAATGCCAACGTGACTGAGAGC
GGGTGCAAAGAGTGTGAGGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTCCTGCAGAGCTTCGTCCACATCGTGCA
GATGTTTATTAACACGTCGTCCGGAGGCGGGGGCTCTGGTGGCGGCGGCTCCGGGGGAGGCGGCTCCGGTGGC
GGTGGTTCCGGCGGAGGCTCGCTACAGCTGCTGCCCAGTTGGGCCATCACCCTTATTTCTGTCAACGGCATCTTCG
TTATCTGTTGCCTGACCTACTGCTTTGCGCCGAGGTGTCGCGAGCGGCGTCGCAACGAGCGCCTGCGCCGAGAAT
CCGTGCGCCCTGTGTGA (SEQ ID NO:329)

CD40L

MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLL
NCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYTMSNNLVTLENGKQ
LTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFVNV
TDPSQVSHGTGFTSFGLLKL (SEQ ID NO:273)

CD40L

ATGATCGAGACCTACAACCAGACTTCCCCACGTAGCGCCGCCACTGGTCTACCCATCTCGATGAAAATCTTCATGTA
TCTGCTGACCGTGTTCCTGATCACCCAGATGATTGGCTCCGCTCTGTTTGCCGTGTACTTGCACCGCCGCCTGGACA
AAATTGAGGACGAGCGGAATCTGCACGAAGATTTCGTATTTATGAAGACCATCCAGAGGTGTAACACTGGCGAGC
GTTCTCTTTCGTTGCTTAACTGCCAAGACATCAAGAGCCAGTTCGAGGCCTTCGTCAAGGACATCATGCTCAACAA
GGAGGACACTAAGAAGGAGAACTCCTTTGAGATGCAGAAGGGTGATCAGAACCCCCAAATTCCAGCGCATGTGA
TAAGCGAGGCTTCCTCCAAGACAACCAGTGTGCTGCAGTGGGCGGAGAAGGGCTACTACACCATGTCAAATAACC
TGGTGACCCTGGAGAACGGCAAGCAGCTGACGGTGAAGCGCCAGGGGCTCTATTACATCTACGCGCAGGTCACG
TTCTGTTCGAACCGCGAAGCCTCCTCTCAGGCTCCTTCATCGCCTCACTGTGCCTGAAATCTCCGGGACGCTTCGA
CCGAATCCTGCTCCGGCCGCCAACACCCACTCCTCCGCCAAGCCTTGCCGGCAGCAGACATCCACCTTGGTGG
GGTTTTTGAGCTGCAGCCTGGCGCGTCCGTGTTCGTCAACGTGACCGACCCCTCCCAGGTCTCTCATGGAACCGGC
TTCACCTCCTTCGGCCTGCTCAAGTTG (SEQ ID NO:321)

【図　　】

FIG. 52D

GFP

ATGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCA
CAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCAC
CGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCC
GACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCA
AGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTG
AAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGT
CTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCA
GCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACT
ACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGA
CCGCCGCCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGA (SEQ ID NO:330)

Tethered IL-21

MDWTWILFLVAAATRVHSQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQK
AQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRT
HGSEDS**SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQLIPSWAIILISVNGIFVICC**
LTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:331)

【誤訳訂正書】
【提出日】令和6年12月4日(2024.12.4)
【誤訳訂正１】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】全文
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０２２年４月６日に出願された米国仮出願第６３／３２８，２３６号の優先権を主張し、これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００２】
局所進行性または転移性非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）患者の新たな治療選択肢に対する満たされていない重要なニーズが存在し、これらの患者は、新たに診断されたＮＳＣＬＣ患者のおよそ７０％を占める（Ｍｏｌｉｎａ ＪＲ，Ｙａｎｇ Ｐ，Ｃａｓｓｉｖｉ ＳＤ，Ｓｃｈｉｌｄ ＳＥ，Ａｄｊｅｉ ＡＡ．Ｍａｙｏ Ｃｌｉｎ Ｐｒｏｃ．２００８；８３（５）：５８４－９４）。肺癌は、世界のがん死亡の主な原因であり、２０１５年にはおよそ１７０万人の死亡が報告されている。肺癌による死亡のうち、＞８０％は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）に起因していた（２１）。２０２０年には、米国で肺癌及び気管支癌に起因する推定２２８，８２０人の新規症例及び１３５，７２０人の死亡が推定されると予想された（Ｓｉｅｇｅｌ ＲＬ，２０１５．ＣＡ Ｃａｎｃｅｒ Ｊ Ｃｌｉｎ．２０１５；６５（１）：５－２９）。したがって、ＮＳＣＬＣの治療及び転帰に革命をもたらしたチェックポイント阻害剤（ＣＰＩ）の承認にもかかわらず、ＮＳＣＬＣには満たされていない重要な医療ニーズが残っている。
【０００３】
全体として、男性及び女性において、喫煙状況に関係なく肺癌を発症する生涯リスクは、それぞれ、およそ１４分の１及び１７分の１である。しかしながら、肺癌を発症するリスクは、非喫煙者に対して喫煙者でははるかに高く、例えば、喫煙する男性は、がんを発症する可能性が２３倍高く、同様に、喫煙する女性は、喫煙しない女性よりも、肺癌を発症する可能性が１３倍高い（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｌｕｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ－Ｌｕｎｇ ｃａｎｃｅｒ ｆａｃｔ ｓｈｅｅｔ ２０１７［Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｌｕｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ－Ｌｕｎｇ ｃａｎｃｅｒ ｆａｃｔ ｓｈｅｅｔ］、ワールドワイドウェブｌｕｎｇ．ｏｒｇ／ｌｕｎｇ－ｈｅａｌｔｈ－ａｎｄ－ｄｉｓｅａｓｅｓ／ｌｕｎｇ－ｄｉｓｅａｓｅ－ｌｏｏｋｕｐ／ｌｕｎｇ－ｃａｎｃｅｒ／ｒｅｓｏｕｒｃｅ－ｌｉｂｒａｒｙ／ｌｕｎｇ－ｃａｎｃｅｒ－ｆａｃｔ－ｓｈｅｅｔ．ｈｔｍｌから入手可能）。
【０００４】
チェックポイント阻害剤に先立って、白金ダブレット化学療法が治癒不能なＮＳＣＬＣ患者の初期治療に利用され（ＳｃｈｉｌｌｅｒＪ．Ｈ．ｅｔ ａｌ．２００２ Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ３４６（２）：９２－８．）、耐久性が限られた客観的奏効率（ＯＲＲ）は、２０％～３０％であった。ペムブロリズマブは、単独または細胞傷害性療法と組み合わせて治療に革命をもたらし、より高い奏効率をもたらし、より耐久性があることも証明された（Ｇａｎｄｈｉ Ｌｅｅｎａ ｅｔ ａｌ．２０１８ Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ３７８（２２）：２０７８－２０９２、Ｐａｚ－Ａｒｅｓ Ｌ．ｅｔ ａｌ．２０１８ Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ３７９（２１）：２０４０－２０５１、Ｖｉｔｅｒｉ Ｓ．ｅｔ ａｌ．２０２０ Ｔｒａｎｓｌ Ｌｕｎｇ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ９（３）：８２８－８３２、ＰａｃｈｅｃｏＪ．Ｍ．２０２０ Ｔｒａｎｓｌ Ｌｕｎｇ Ｃａｎ

ｃｅｒ Ｒｅｓ ９（１）：１４８－１５３、Ｍｏｋ Ｔ．Ｓ．Ｋ．ｅｔ ａｌ．２０１９ Ｌａｎｃｅｔ ３９３（１０１８３）：１８１９－１８３０、Ｎｏｓａｋｉ Ｋ．ｅｔ ａｌ．２０１９ Ｌｕｎｇ Ｃａｎｃｅｒ １３５：１８８－１９５、Ｍｏｒｇｅｎｓｚｔｅｒｎ Ｄ．２０１９ Ｊ Ｔｈｏｒａｃ Ｄｉｓ １１（Ｓｕｐｐｌ １５）：Ｓ１９６３－Ｓ１９６５、Ｒｅｃｋ Ｍ．ｅｔ ａｌ．２０１６ Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ３７５（１９）：１８２３－１８３３）。他のＣＰＩは、ＮＳＣＬＣの第一選択設定において化学療法と組み合わせたＯＲＲ及び耐久性の改善を実証している（Ｓｏｃｉｎｓｋｉ ＭＡ ｅｔ ａｌ ２０１８ Ｎｅｗ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ３７８：２２８８－３０１）。これらの印象的な結果にもかかわらず、完全な反応はほとんどなく、ほぼすべての患者が反応しないか進行しているため、その後の治療が必要である。

【０００５】

同定されたドライバー変異を有するＮＳＣＬＣ患者の場合、好ましい選択肢は、関連する変異（例えば、表皮成長因子受容体［ＥＧＦＲ］変異のためのオシメルチニブ、ＡＬＫ変異のためのセリチニブ、またはＲＯＳ－１変異のためのクリゾチニブ）に向けられた標的ＴＫＩによる治療である。腫瘍がＰＤ－Ｌ１を発現しているＮＳＣＬＣの以前に治療されていない患者の場合、利用可能な治療選択肢には、ペムブロリズマブ単独療法（ＰＤ－Ｌ１発現の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）が少なくとも５０％の患者にのみ一般的に使用される）または化学療法との併用のペムブロリズマブが含まれる。ＮＳＣＬＣ及びＰＤ－Ｌ１発現が＜５０％の患者の場合、好ましい選択肢は、ペメトレキセド、カルボプラチンまたはシスプラチン、及びペムブロリズマブの組み合わせである。ＰＤ－Ｌ１に対するＴＰＳが＜１％であり、アクショナブルな（ａｃｔｉｏｎａｂｌｅ）変異がない患者には、実行可能な治療選択肢がなく、ＰＤ－１またはＰＤ－Ｌ１ ＣＰＩの候補ではない。白金ベースのダブレット化学療法、ベバシズマブ、及びアテゾリズマブの併用は、ニボルマブ、イピリムマブ、及び細胞傷害性療法の併用と同様に、ＮＳＣＬＣ患者における別の潜在的な治療選択肢である（Ｈｅｌｌｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．２０１９ Ｎｅｗ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ３８１：２０２０－３１）。

【０００６】

チェックポイント阻害剤療法＋化学療法で患者の疾患が進行すると、治療選択肢は限られ、有効性が低く、客観的奏効率は約１０％であり、無増悪生存期間（ＰＦＳ）が短く、毒性も高い。最も一般的に使用される薬剤は、ドセタキソールであるが、ＶＥＧＦ阻害剤と組み合わせた他の単剤細胞傷害剤または細胞傷害剤が用いられることがあるが、いずれも同様の、不良な転帰を有する。故に、チェックポイント阻害剤療法＋化学療法後の第２の選択治療において、より良い治療選択肢のための緊急の必要性が存在する。

【０００７】

さらに、現在のＴＩＬ製造及び治療プロセスは、長さ、コスト、無菌性の懸念、及び本明細書に記載の他の要因によって制限され、したがって、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１及び／またはＶＥＧＦ阻害剤治療に対して不応性である患者を治療する可能性が著しく制限されている。実行可能な治療選択肢がほとんどまたはまったく残っていない患者を治療する際の使用に適したＴＩＬ製造プロセス及びかかるプロセスに基づく療法を提供することが緊急に必要である。本発明は、難治性及び／または進行性非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）患者の治療に用いられ得るＴＩＬの生成における使用のための短縮された製造プロセスを提供することによって、この必要性を満たす。

【発明の概要】

【０００８】

いくつかの実施形態では、本発明は、ＮＳＣＬＣ患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであり、方法が、

（ａ）患者ががん治療を受ける前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容すること、

（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保

存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することを含み、
その後、患者が、ＩＣＩ治療及び／または標準治療の治療を受け、
任意選択で、患者がＩＣＩ及び／または標準治療の治療時またはその後に進行性疾患を示す場合、第１のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団にさらに拡張される、方法を提供する。
【０００９】
いくつかの実施形態では、本発明は、ＮＳＣＬＣ患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、中断されている維持療法を受けており、方法が、
（ａ）維持療法を再開する前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容すること、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することを含み、
その後、患者が、維持療法を再開し、
任意選択で、患者が維持療法の再開の時またはその後に進行性疾患を示す場合、第１のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団にさらに拡張される、方法を提供する。
【００１０】
いくつかの実施形態では、本発明は、ＮＳＣＬＣ患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであり、
（ａ）患者ががん治療を受ける前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、を含む、方法を提供する。
【００１１】
いくつかの実施形態では、本発明は、ＮＳＣＬＣ患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであり、
（ａ）患者ががん治療を受ける前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、
（ｄ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が、約１～７／８日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣで補充することにより、急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、を含む、方法を提供する。

【００１２】

いくつかの実施形態では、急速拡張は、急速拡張の開始後、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、または１０日間続行することができる。

【００１３】

いくつかの実施形態では、本開示は、ＮＳＣＬＣ患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、中断されている維持療法を受けており、
（ａ）維持療法を再開する前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む

注入バッグを凍結保存することと、を含む、方法を提供する。
【００１４】
いくつかの実施形態では、本開示は、ＮＳＣＬＣ患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、中断されている維持療法を受けており、
（ａ）維持療法を再開する前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、
（ｄ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が、約１～７／８日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣで補充することにより、急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、を含む、方法を提供する。
【００１５】
いくつかの実施形態では、がん患者は、任意のがん治療に対してナイーブである。
【００１６】
いくつかの実施形態では、患者は、ＩＣＩ治療、抗ＶＥＧＦ治療、または化学療法治療に対してナイーブである。
【００１７】
いくつかの実施形態では、患者は、ステップ（ａ）の時点で中断されている維持療法を受けており、維持療法は、ステップ（ａ）の後に再開される。
【００１８】
いくつかの実施形態では、患者は、ステップ（ａ）の開始時にウォッシュアウト期間にある。
【００１９】
いくつかの実施形態では、患者が、がん治療を受けるか、または維持療法を再開し、患者が進行性疾患を示した後に、解凍のステップ及び後続のステップが行われる。
【００２０】
いくつかの実施形態では、患者は、凍結保存のステップ（ｂ）の少なくとも約１週間、２週間、３週間、１か月、２か月、３か月、４か月、５か月、６か月、７か月、８か月、９か月、１０か月、１１か月、１２か月、１３か月、１４か月、１５か月、１６か月、１７か月、１８か月、１９か月、２０か月、２１か月、２２か月、２３か月、２４か月、２５か月、２６か月、２７か月、２８か月、２９か月、３０か月、３１か月、３２か月、３

３か月、３４か月、３５か月、３６か月後、進行性疾患を示す。
【００２１】
いくつかの実施形態では、患者は、第１選択ＩＣＩ治療及び／または標準治療を受けるか、または受けることになる。
【００２２】
いくつかの実施形態では、患者は、第２選択ＩＣＩ治療及び／または標準治療を受けるか、または受けることになる。
【００２３】
いくつかの実施形態では、患者は、ＮＳＣＬＣと診断される。
【００２４】
いくつかの実施形態では、患者は、転移性ステージＩＶのＮＳＣＬＣと診断される。
【００２５】
いくつかの実施形態では、対象または患者は、
ｉ）＜１％のＰＤ－Ｌ１の所定の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）、
ｉｉ）１％～４９％のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコア、または
ｉｉｉ）１つ以上のドライバー変異の所定の非存在のうちの少なくとも１つを有する。
【００２６】
いくつかの実施形態では、患者または対象は、１％～４９％のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳを有する。
【００２７】
いくつかの実施形態では、患者または対象は、＜１％のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳを有し、１つ以上のドライバー変異の所定の非存在を有する。
【００２８】
いくつかの実施形態では、１つ以上のドライバーは、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＥＧＦＲエクソン２０、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＢＲＡＦ　Ｖ６００変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、ＲＥＴ融合、ＥＲＢＢ２変異、ＥＲＢＢ２増幅、ＢＲＣＡ変異、ＭＡＰ２Ｋ１変異、ＰＩＫ３ＣＡ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＰＴＥＮ変異、ＵＭＤ変異、ＮＲＡＳ変異、ＫＲＡＳ変異、ＮＦ１変異、ＭＥＴ変異、ＭＥＴスプライス及び／または変化したＭＥＴシグナル伝達、ＴＰ５３変異、ＣＲＥＢＢＰ変異、ＫＭＴ２Ｃ変異、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１変異、ＡＴＭ変異、ＳＥＴＤ２変異、ＦＬＴ３変異、ＰＴＰＮ１１変異、ＦＧＦＲ１変異、ＥＰ３００変異、ＭＹＣ変異、ＥＺＨ２変異、ＪＡＫ２変異、ＦＢＸＷ７変異、ＣＣＮＤ３変異、及びＧＮＡ１１変異からなる群から選択される。
【００２９】
いくつかの実施形態では、患者または対象は、＜１％のＴＰＳを有し、ＥＧＦＲ阻害剤、ＢＲＡＦ阻害剤、ＡＬＫ阻害剤、ｃ－Ｒｏｓ阻害剤、ＲＥＴ阻害剤、ＥＲＢＢ２阻害剤、ＢＲＣＡ阻害剤、ＭＡＰ２Ｋ１阻害剤、ＰＩＫ３ＣＡ阻害剤、ＣＤＫＮ２Ａ阻害剤、ＰＴＥＮ阻害剤、ＵＭＤ阻害剤、ＮＲＡＳ阻害剤、ＫＲＡＳ阻害剤、ＮＦ１阻害剤、ＭＥＴ阻害剤、ＴＰ５３阻害剤、ＣＲＥＢＢＰ阻害剤、ＫＭＴ２Ｃ阻害剤、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１阻害剤、ＡＴＭ阻害剤、ＳＥＴＤ２阻害剤、ＦＬＴ３阻害剤、ＰＴＰＮ１１阻害剤、ＦＧＦＲ１阻害剤、ＥＰ３００阻害剤、ＭＹＣ阻害剤、ＥＺＨ２阻害剤、ＪＡＫ２阻害剤、ＦＢＸＷ７阻害剤、ＣＣＮＤ３阻害剤、及びＧＮＡ１１阻害剤による治療のために適応されていないＮＳＣＬＣを有する。
【００３０】
いくつかの実施形態では、１つ以上のドライバー変異は、ＥＧＦＲ、ＡＬＫ、またはＲＯＳのゲノム変化を含む。
【００３１】
いくつかの実施形態では、１つ以上のドライバー変異は、ＥＧＦＲ、ＡＬＫ、またはＲＯＳのゲノム変化からなる。
【００３２】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ＰＤ－Ｌ１の発現が低いか、または全くない。

【００３３】

いくつかの実施形態では、患者は、１つ以上のドライバー変異の所定の非存在を有する。

【００３４】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、化学療法剤による治療に対して不応性または耐性である。

【００３５】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤による治療に対して不応性または耐性である。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、化学療法剤で治療されているが、現在は化学療法剤で治療されていない。

【００３６】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、化学療法剤で治療されているが、現在は化学療法剤で治療されておらず、＜１％のＴＰＳを有する。

【００３７】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されてきたが、現在はＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されていない。

【００３８】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されているがされていない、いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されているが、現在は化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されていない。

【００３９】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されているが、現在は化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されておらず、＜１％のＴＰＳを有する。

【００４０】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されていない。

【００４１】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で以前に治療されている。

【００４２】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で以前に治療されているが、現在は化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されていない。

【００４３】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で以前に治療されているが、現在はＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されていない。

【００４４】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で以前に治療されているが、現在は化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されていない。

【００４５】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、ＰＤ－Ｌ１の発現が低いか、または全くない。

【００４６】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で以前に治療されているが、現在は化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されておらず、＜１％のＴＰＳを有する。

【００４７】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１及び／または抗ＰＤ－Ｌ２抗体で以前に治療されている。

【００４８】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で以前に治療されている。

【００４９】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体による治療に対して不応性または耐性である。

【００５０】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。

【００５１】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定されているか、またはＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－１抗体治療の前に決定された。

【００５２】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されている。

【００５３】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。

【００５４】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。

【００５５】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、化学療法剤で治療されており、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。

【００５６】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されているが、現在は化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されておらず、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。

【００５７】

いくつかの実施形態では、最大腫瘍直径が、横断面もしくは冠状面のいずれかで測定して７ｃｍより大きいか、または腫れたリンパ節が２０ｍｍ以上の短軸直径を有する場合、巨大腫瘤病変が示される。

【００５８】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ネオアジュバント療法またはアジュバント療法を含まない、少なくとも２つの以前の全身治療過程に対して不応性または耐性である。

【００５９】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ＪＳ００１、ＴＳＲ－０４２、ピジリズマブ、ＢＧＢ－Ａ３１７、ＳＨＲ－１２１０、ＲＥＧＮ２８１０、ＭＤＸ－１１０６、ＰＤＲ００１、クローン由来の抗ＰＤ－１：ＲＭＰ１－１４、

米国特許第８，００８，４４９号に開示される抗ＰＤ－１抗体、デュルバルマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、ならびにそれらの断片、誘導体、バリアント、及びバイオシミラーからなる群から選択される抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対して不応性または耐性である。

【００６０】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性または耐性である。

【００６１】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ニボルマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性または耐性である。

【００６２】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＣＴＬＡ－４抗体に対して不応性または耐性である。

【００６３】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＣＴＬＡ－４抗体、及びペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性または耐性である。

【００６４】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＣＴＬＡ－４抗体、及びニボルマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性または耐性である。

【００６５】

いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーである。

【００６６】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、デュルバルマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性または耐性である。

【００６７】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、アテゾリズマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性または耐性である。

【００６８】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、アベルマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性または耐性である。

【００６９】

いくつかの実施形態では、化学療法剤は、白金ダブレット化学療法剤（複数可）である。

【００７０】

いくつかの実施形態では、白金ダブレット化学療法剤療法は、
ｉ）シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤、
ｉｉ）及びビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはｎａｂ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療法剤を含む。

【００７１】

いくつかの実施形態では、第１及び／または第２の化学療法剤を含む化学療法剤は、ペメトレキセドとの組み合わせである。

【００７２】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、及びシスプラチンを含む併用療法に対して不応性または耐性である。

【００７３】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、シスプラチン、ニボルマブ、及びイピリムマブを含む併用療法に対して不応性または耐性である。

【００７４】
いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤に対して不応性または耐性である。
【００７５】
いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ベバシズマブ、ラニビズマブ、及びイクルクマブからなる群から選択されるＶＥＧＦ－Ａ阻害剤に対して不応性または耐性である。
【００７６】
いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ベバシズマブに対して不応性または耐性である。
【００７７】
いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、１つ以上のドライバー変異の非存在または存在について分析されている。
【００７８】
いくつかの実施形態では、１つ以上のドライバー変異は存在しない。
【００７９】
いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ治療は、１つ以上のドライバー変異の存在または非存在とは無関係である、請求項６４または６５に記載の方法。
【００８０】
いくつかの実施形態では、１つ以上のドライバー変異は、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異、ｃ－ＲＯＳ変異、ＥＭＬ４－ＡＬＫ、及びＭＥＴ変異からなる群から選択される。
【００８１】
いくつかの実施形態では、ＥＧＦＲ変異は、ＮＳＣＬＣから小細胞肺癌（ＳＣＬＣ）への腫瘍形質転換をもたらす。
【００８２】
いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ治療は、高腫瘍変異負荷（高－ＴＭＢ）及び／またはマイクロサテライト不安定性－高（ＭＳＩ－高）状態の存在または非存在とは無関係である。
【００８３】
いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、高－ＴＭＢ及び／またはＭＳＩ－高状態を示す。
【００８４】
いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、
（ａ）患者ががん治療を受ける前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）がん治療時またはその後に患者が進行性疾患を示すのを待つことと、
（ｄ）凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、
（ｅ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３

のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｈ）ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｇ）から（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｉ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、を含む、方法を提供する。

【００８５】

いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、中断されている維持療法を受けており、
（ａ）維持療法を再開する前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）がん治療時またはその後に患者が進行性疾患を示すのを待つことと、
（ｄ）凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、
（ｅ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｈ）ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｇ）から（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｉ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、を含む、方法を提供する。

【００８６】

いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、
（ａ）患者ががん治療を受ける前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）がん治療時またはその後に患者が進行性疾患を示すのを待つことと、
（ｄ）凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、
（ｅ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩ

Ｌ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が、約１～７／８日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを補充することにより、急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療用ＴＩＬ集団であり、急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｈ）ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｇ）から（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｉ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、を含む、方法を提供する。

【００８７】

いくつかの実施形態では、急速拡張は、急速拡張の開始後、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、または１０日間続行することができる。

【００８８】

いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、
（ａ）患者ががん治療を受ける前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）がん治療時またはその後に患者が進行性疾患を示すのを待つことと、
（ｄ）凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、
（ｅ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が、約１～７／８日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを補充することにより、急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療用ＴＩＬ集団であり、急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｈ）ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｇ）から（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｉ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、を含む、方法を提供する。

【００８９】
いくつかの実施形態では、患者は、任意のがん治療に対してナイーブである。
【００９０】
いくつかの実施形態では、患者は、第１選択ＩＣＩ治療及び／または標準治療を受ける。
【００９１】
いくつかの実施形態では、患者は、第２選択ＩＣＩ治療及び／または標準治療を受ける。
【００９２】
いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）は、腫瘍断片または腫瘍消化物のフラッシュ凍結を含む。
【００９３】
いくつかの実施形態では、フラッシュ凍結は、
ｉ）腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存培地中でインキュベートすること、任意選択で、約３０分～約６０分間、約２℃～約８℃で、１０％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む凍結保存培地中でインキュベートすることと、
ｉｉ）腫瘍を凍結することであって、凍結が、液体窒素の気相を使用したフラッシュ凍結である、凍結することと、を含む。
【００９４】
いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）は、腫瘍断片または腫瘍消化物の制御された速度の凍結を含む。
【００９５】
いくつかの実施形態では、制御された速度の凍結は、
ｉ）閉鎖可能な容器に凍結保存培地を添加することと、
ｉｉ）制御された速度の凍結装置で閉鎖可能な容器を予め冷却することと、
ｉｉｉ）腫瘍を、凍結保存培地を含む閉鎖可能な容器に入れ、容器を閉じることと、
ｉｖ）腫瘍及び凍結保存培地を含む閉鎖容器を、約３０～６０分間の時間、約２～８℃の温度でインキュベートすることと、
ｖ）制御された速度の凍結装置中で容器をゆっくり凍結することと、を含む。
【００９６】
いくつかの実施形態では、がん患者は、任意のがん治療に対してナイーブである。
【００９７】
いくつかの実施形態では、患者は、ＩＣＩ治療、抗ＶＥＧＦ治療、または化学療法治療に対してナイーブである。
【００９８】
いくつかの実施形態では、患者は、ステップ（ａ）の時点で中断されている維持療法を受けており、維持療法は、ステップ（ａ）の後に再開される。
【００９９】
いくつかの実施形態では、患者は、第１選択ＩＣＩ治療及び／または標準治療を受ける。
【０１００】
いくつかの実施形態では、患者は、第２選択ＩＣＩ治療及び／または標準治療を受ける。
【０１０１】
いくつかの実施形態では、患者は、ＮＳＣＬＣと診断される。
【０１０２】
いくつかの実施形態では、患者は、転移性ステージＩＶのＮＳＣＬＣと診断される。
【０１０３】
いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維

持療法を受けており、方法が、
（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得すること、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生すること、
（ｃ）凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加すること、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生すること、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生すること、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取すること、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すこと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することを含む、方法を提供する。
【０１０４】
いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、
（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ス

テップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、を含む、方法を提供する。
【０１０５】
いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、
（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、を含む、方法を提供する。
【０１０６】
いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、
（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者の腫瘍からの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む試料を凍結保存して、凍結保存された試料を産生することと、
（ｃ）凍結保存された試料を解凍し、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）から

ステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

【０１０７】

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

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

（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、を含む、方法を提供する。

【０１０８】

いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、

（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、対象または患者から腫瘍を切除することであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍からの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、切除することと、

（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む試料を凍結保存して、凍結保存された試料を産生することと、

（ｃ）凍結保存された試料を解凍し、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、

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

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

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

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

（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、を含む、方法を提供する。

【０１０９】

いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、

（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、

（ｄ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩ

Ｌ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が、約１～７／８日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣで補充することにより、急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、を含む、方法を提供する。

【０１１０】

いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、
（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む試料を凍結保存して、凍結保存された試料を産生することと、
（ｃ）凍結保存された試料を解凍し、閉鎖系内で第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地と接触させることと、
（ｄ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が、約１～７／８日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣで補充することにより、急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）ステップ（ｆ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｇ）ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、を含む、方法を提供する。

【０１１１】

いくつかの実施形態では、急速拡張は、急速拡張の開始後、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、または１０日間続行することができる。

【０１１２】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、存在する場合、第１の細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの間の初期濃度で存在する。
【０１１３】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在し、ＯＫＴ－３抗体が、第２中に約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在し、初期拡張が、存在する場合、ガス透過性容器を使用して行われる。
【０１１４】
いくつかの実施形態では、急速拡張は、存在する場合、ガス透過性容器を使用して行われる。
【０１１５】
いくつかの実施形態では、第１の細胞培養培地は、存在する場合、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。
【０１１６】
いくつかの実施形態では、第２の細胞培養培地は、存在する場合、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。
【０１１７】
いくつかの実施形態では、採取されたＴＩＬ集団は、治療上有効なＴＩＬ集団を含み、治療上有効なＴＩＬ集団が、約２．３×１０１０～約１３．７×１０１０個のＴＩＬを含む。
【０１１８】
いくつかの実施形態では、初期拡張は、２１日以内の期間にわたって行われる。
【０１１９】
いくつかの実施形態では、初期拡張は、７日以内の期間にわたって行われる。
【０１２０】
いくつかの実施形態では、急速拡張は、７日以内の期間にわたって行われる。
【０１２１】
いくつかの実施形態では、第１の拡張及び第２の拡張は、各々１１日の期間内に個別に行われる。
【０１２２】
いくつかの実施形態では、第１の拡張を行うステップから採取のステップは、約１０日～約２４日で行われる。
【０１２３】
いくつかの実施形態では、第１の拡張を行うステップから採取のステップは、約１０日～約２２日で行われる。
【０１２４】
いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬの各々は、その表面膜と会合する免疫調節組成物を含むように、採取の前の任意の時点で、ＴＩＬの一部分を修飾するステップをさらに含む。
【０１２５】
いくつかの実施形態では、修飾のステップは、ＴＩＬを遺伝子編集して、ＴＡＬＥＮ系、ＣＲＩＳＰＲ系、及びジンクフィンガー系からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子編集系の修飾されたＴＩＬへの移入を達成することを含む。
【０１２６】
いくつかの実施形態では、修飾するステップ中に、修飾されたＴＩＬの細胞膜は、少なくとも１つの遺伝子編集系の移入を達成するために、マイクロ流体プラットフォームまたは無菌エレクトロポレーションを使用することによって、一時的に破壊される。
【０１２７】

いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺプラットフォームである。

【０１２８】

いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、１つ以上の膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、各々は、１つ以上の免疫調節剤及び細胞膜アンカー部分を含む。

【０１２９】

いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、２つ以上の異なる膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、異なる膜アンカー免疫調節融合タンパク質の各々は、各々異なる免疫調節剤を含む。

【０１３０】

いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、ＴＩＬ表面抗原結合ドメインに連結された１つ以上の免疫調節剤を含む融合タンパク質を含む。

【０１３１】

いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、複数の免疫調節剤を含むナノ粒子を含む。

【０１３２】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、１つ以上のサイトカインを含む。

【０１３３】

いくつかの実施形態では、１つ以上のサイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、ＩＦＮガンマ、ＴＮＦａ、ＩＦＮアルファ、ＩＦＮベータ、ＧＭ－ＣＳＦ、もしくはＧＣＳＦ、またはそれらのバリアントを含む。

【０１３４】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＣＤ４０アゴニストを含む。

【０１３５】

いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、Ｎ末端からＣ末端へ、式：Ｓ－ＩＡ－Ｌ－Ｃに従うものであり、式中、Ｓがシグナルペプチドであり、ＩＡが免疫調節剤であり、Ｌがリンカーであり、Ｃが細胞膜アンカー部分である。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、細胞膜アンカー部分は、ＣＤ８ａ膜貫通細胞内ドメイン、Ｂ７－１膜貫通ドメイン、Ｂ７－２膜貫通ドメイン、またはＣＤ８ａ膜貫通ドメインを含む。

【０１３７】

いくつかの実施形態では、１つ以上の免疫調節剤は、１つ以上のサイトカインを含む。

【０１３８】

いくつかの実施形態では、１つ以上のサイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、ＩＦＮガンマ、ＴＮＦａ、ＩＦＮアルファ、ＩＦＮベータ、ＧＭ－ＣＳＦ、もしくはＧＣＳＦ、またはそれらのバリアントを含む。

【０１３９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ表面抗原結合ドメインは、抗体可変重ドメイン及び可変軽ドメインを含む。

【０１４０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ表面抗原結合ドメインは、抗体またはその断片を含む。

【０１４１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ表面抗原結合ドメインは、以下のＴＩＬ表面抗原：ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ３、ＣＤｌｌａ、ＣＤｌｌｂ、ＣＤｌｌｃ、ＣＤ１８、ＣＤ２５、ＣＤ１２７、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ１９７、ＣＤ３８、ＣＤ２７、ＣＤ１９６、ＣＸＣＲ３、ＣＸＣＲ４、ＣＸＣＲ５、ＣＤ８４、ＣＤ２

２９、ＣＣＲ１、ＣＣＲ５、ＣＣＲ４、ＣＣＲ６、ＣＣＲ８、ＣＣＲ１０、ＣＤ１６、ＣＤ５６、ＣＤ１３７、ＯＸ４０、またはＧＩＴＲのうちの１つ以上に対する親和性を示す。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、リポソーム、タンパク質ナノゲル、ヌクレオチドナノゲル、ポリマーナノ粒子、または固体ナノ粒子である。

【０１４３】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、ナノゲルである。

【０１４４】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、以下の抗原：ＣＤ４５、ＣＤ１ｌａ（インテグリンアルファ－Ｌ）、ＣＤ１８（インテグリンベーター２）、ＣＤ１ｌｂ、ＣＤ１ｌｃ、ＣＤ２５、ＣＤ８、またはＣＤ４のうちの１つ以上に結合する抗原結合ドメインをさらに含む。

【０１４５】

いくつかの実施形態では、修飾は、融合タンパク質をコードする異種核酸をＴＩＬの一部に導入し、融合タンパク質を修飾されたＴＩＬの表面上に発現させることを含む。

【０１４６】

いくつかの実施形態では、異種核酸は、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、ジンクフィンガー法、及びそれらの組み合わせから選択される１つ以上の方法を使用して、修飾されたＴＩＬのゲノムに導入される。

【０１４７】

いくつかの実施形態では、修飾は、融合タンパク質の、ＴＩＬの一部への結合を可能にする条件下で、融合タンパク質をＴＩＬの一部とインキュベートすることを含む。

【０１４８】

いくつかの実施形態では、修飾は、免疫調節組成物をＴＩＬの一部の表面に付着させることを含む。

【０１４９】

いくつかの実施形態では、修飾は、第１の拡張からのＴＩＬ、または第２の拡張からのＴＩＬ、またはその両方で実行される。

【０１５０】

いくつかの実施形態では、修飾は、プライミングによる第１の拡張からのＴＩＬ、または急速な第２の拡張からのＴＩＬ、またはその両方で実行される。

【０１５１】

いくつかの実施形態では、修飾は、第１の拡張の後、及び第２の拡張の前に実行される。

【０１５２】

いくつかの実施形態では、修飾は、プライミングによる第１の拡張の後、及び急速な第２の拡張の前、またはその両方に実行される。

【０１５３】

いくつかの実施形態では、修飾は、第２の拡張の後に実行される。

【０１５４】

いくつかの実施形態では、修飾は、急速な第２の拡張後に実行される。

【０１５５】

いくつかの実施形態では、修飾は、採取後に実行される。

【０１５６】

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは低減する遺伝子修飾をさらに含む。

【０１５７】

いくつかの実施形態では、当該１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、

ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲを含む群から選択される。

【０１５８】

いくつかの実施形態では、当該１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、及びＰＫＡを含む群から選択される。

【０１５９】

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる遺伝子修飾をさらに含み、免疫チェックポイント遺伝子（複数可）は、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ　１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）、及び／またはＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１を含む群から選択される。

【０１６０】

いくつかの実施形態では、遺伝子修飾は、当該１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼを使用して産生される。

【０１６１】

いくつかの実施形態では、遺伝子修飾は、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、ジンクフィンガー法、及びそれらの組み合わせから選択される１つ以上の方法を使用して産生される。

【０１６２】

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、細胞表面上で免疫調節組成物を一過的に発現するように修飾される。

【０１６３】

いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、１つ以上の膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、各融合タンパク質は、１つ以上の免疫調節剤及び細胞膜アンカー部分を含む。

【０１６４】

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、融合タンパク質をコードする核酸でＴＩＬをトランスフェクトすることによって修飾される。

【０１６５】

いくつかの実施形態では、核酸は、ＲＮＡである。

【０１６６】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡは、ｍＲＮＡである。

【０１６７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＳＱＺプラットフォームまたはエレクトロポレーションによってｍＲＮＡでトランスフェクトされる。

【０１６８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、第１の拡張の後及び第２の拡張の前にＳＱＺプラットフォームまたはエレクトロポレーションによってｍＲＮＡでトランスフェクトされる。

【０１６９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、第１の拡張の前に、ＳＱＺプラットフォームまたはエレクトロポレーションによってｍＲＮＡでトランスフェクトされる。

【０１７０】

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、マイクロ流体装置を使用して融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトされ、ＴＩＬの細胞膜を一時的に破壊し、それによって核酸のトランスフェクションを可能にする。

【０１７１】

いくつかの実施形態では、方法は、ＴＩＬをｍＲＮＡでトランスフェクトする前に、抗ＣＤ３アゴニストでのインキュベーションによってＴＩＬを活性化することをさらに含む。

【０１７２】

いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニストは、ＯＫＴ－３である。

【０１７３】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬをｍＲＮＡでトランスフェクトする前に、ＴＩＬを抗ＣＤ３アゴニストで約１～３日間インキュベートすることによってＴＩＬが活性化される。

【０１７４】

いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、

（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍組織を凍結保存して、凍結保存された腫瘍組織を産生することと、

（ｃ）凍結保存された腫瘍組織を解凍し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）抗ＣＤ３アゴニストビーズもしくは抗体、または抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストビーズもしくは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、

を含む、方法を提供する。

【０１７５】

いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、

（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、

（ｄ）凍結保存された腫瘍消化物を解凍し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗ＣＤ３アゴニストビーズもしくは抗体、または抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストビーズもしくは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生すること、

（ｆ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｇ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む、方法を提供する。

【０１７６】

いくつかの実施形態では、酵素培地は、ＤＮａｓｅを含む。

【０１７７】

いくつかの実施形態では、酵素培地は、コラゲナーゼを含む。

【０１７８】

いくつかの実施形態では、酵素培地は、中性プロテアーゼを含む。

【０１７９】

いくつかの実施形態では、酵素培地は、ヒアルロニダーゼを含む。

【０１８０】

いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、

（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍組織を凍結保存して、凍結保存された腫瘍組織を産生することと、

（ｃ）凍結保存された腫瘍組織を解凍し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）抗ＣＤ３アゴニストビーズもしくは抗体、または抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストビーズもしくは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第５のＴＩＬ集団の培養物を産生することと、

（ｇ）第５のＴＩＬ集団の培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～６日間培養し、複数のサブ培養物を組み合わせて、増加した数のＴＩＬを提供することと、を含む、方法を提供する。

【０１８１】

いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、

（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、

（ｄ）凍結保存された腫瘍消化物を解凍し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗ＣＤ３アゴニストビーズもしくは抗体、または抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストビーズもしくは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｇ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第５のＴＩＬ集団の培養物を産生すること

と、
（ｈ）第５のＴＩＬ集団の培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～６日間培養し、複数のサブ培養物を組み合わせて、増加した数のＴＩＬを提供することと、を含む、方法を提供する。
【０１８２】
いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、
（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍組織を凍結保存して、凍結保存された腫瘍組織を産生することと、
（ｃ）凍結保存された腫瘍組織を解凍し、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む、方法を提供する。
【０１８３】
いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、
（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、
（ｄ）凍結保存された腫瘍消化物を解凍し、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む、方法を提供する。
【０１８４】
いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、
（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍組織を凍結保存して、凍結保存された腫瘍組織を産生することと、
（ｃ）凍結保存された腫瘍組織を解凍し、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第４のＴＩＬ集団の培養物を産生することと、
（ｆ）第４のＴＩＬ集団の培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～７日間培養し、複数のサブ培養物を組み合わせて、増加した数のＴＩＬを含む第５のＴＩＬ集団を提供することと、を含む、方法を提供する。
【０１８５】
いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、
（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、
（ｄ）凍結保存された腫瘍消化物を解凍し、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第４のＴＩＬ集団の培養物を産生することと、
（ｇ）第４のＴＩＬ集団の培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～７日間培養し、複数のサブ培養物を組み合わせて、増加した数のＴＩＬを含む第５のＴＩＬ集団を提供することと、を含む、方法を提供する。
【０１８６】
いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、
（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍組織を凍結保存して、凍結保存された腫瘍組織を産生することと、
（ｃ）凍結保存された腫瘍組織を解凍し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む、方法を提供する。
【０１８７】
いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、
（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織か

ら第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、
（ｄ）凍結保存された腫瘍消化物を解凍し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、
を含む、方法を提供する。

【０１８８】

いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、
（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍組織を凍結保存して、凍結保存された腫瘍組織を産生することと、
（ｃ）凍結保存された腫瘍組織を解凍し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第４のＴＩＬ集団の培養物を産生することと、
（ｇ）第４のＴＩＬ集団の培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～７日間培養し、複数のサブ培養物を組み合わせて、増加した数のＴＩＬを含む第５のＴＩＬ集団を提供することと、を含む、方法を提供する。

【０１８９】

いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、
（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、
（ｄ）凍結保存された腫瘍消化物を解凍し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中

で第４のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第５のＴＩＬ集団の培養物を産生することと、
（ｈ）第５のＴＩＬ集団の培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～６日間培養し、複数のサブ培養物を組み合わせて、増加した数のＴＩＬを含む第５のＴＩＬ集団を提供することと、を含む、方法。
【０１９０】
いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、
（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容すること、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍組織を凍結保存して、凍結保存された腫瘍組織を産生すること、
（ｃ）凍結保存された腫瘍組織を解凍し、第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、約３～８日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得すること、
（ｄ）抗ＣＤ３アゴニストビーズもしくは抗体、または抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストビーズもしくは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～６日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生すること、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生すること、
（ｆ）第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、増加した数のＴＩＬ集団を取得することであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日間進行することができる、増加した数のＴＩＬ集団を取得することを含む、方法を提供する。
【０１９１】
いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、
（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍組織を凍結保存して、凍結保存された腫瘍組織を産生することと、
（ｃ）がんの進行後に凍結保存された腫瘍組織を解凍し、第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、約３～８日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｄ）第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、増加した数のＴＩＬ集団を取得することであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日間進行することができる、増加した数のＴＩＬ集団を取得す

ることと、を含む、方法を提供する。
【０１９２】
いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、
（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容すること、
（ｂ）腫瘍断片を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生すること、
（ｃ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生すること、
（ｄ）凍結保存された腫瘍消化物を解凍し、第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、約１～８日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得すること、
（ｅ）抗ＣＤ３アゴニストビーズもしくは抗体、または抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストビーズもしくは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～６日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生すること、
（ｆ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生すること、
（ｇ）第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、増加した数のＴＩＬ集団を取得することであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日間進行することができる、増加した数のＴＩＬ集団を取得することを含む、方法を提供する。
【０１９３】
いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、
（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍断片を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、
（ｄ）凍結保存された腫瘍消化物を解凍し、第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、約１～８日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、増加した数のＴＩＬ集団を取得することであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日間進行することができる、増加した数のＴＩＬ集団を取得することと、を含む、方法を提供する。
【０１９４】
いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製す

る方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、
（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象から腫瘍組織を取得するための他の手段によって産生される腫瘍組織の試料から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍組織を凍結保存して、凍結保存された腫瘍組織を産生することと、
（ｃ）凍結保存された腫瘍組織を解凍し、腫瘍組織を閉鎖系に添加し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～９日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗ＣＤ３アゴニストビーズもしくは抗体、またはＣＤ３アゴニスト及びＣＤ２８アゴニストビーズもしくは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を培養することによって第２の拡張を行い、第５のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約５～１５日間行われて、第５のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第５のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第５のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｃ）～（ｇ）の各々が、閉鎖した滅菌系で行われ、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行、及び／またはステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、を含む、方法を提供する。

【０１９５】

いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、方法が、
（ａ）がん治療または維持療法の再開の前に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象から腫瘍組織を取得するための他の手段によって産生される腫瘍組織の試料から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織の試料を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物組織を産生することと、
（ｄ）凍結保存された腫瘍消化物を解凍し、腫瘍消化物を閉鎖系に添加し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～９日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗ＣＤ３アゴニストビーズもしくは抗体、またはＣＤ３アゴニスト及びＣＤ２８アゴニストビーズもしくは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を培養することによって第２の拡張を行い、第５のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約５～１５日間行われて、第５のＴＩＬ集団を取得し

、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第５のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第５のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）～（ｇ）の各々が、閉鎖した滅菌系で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行、及び／またはステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、を含む、方法を提供する。

【０１９６】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約１～７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３～６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、増加した数のＴＩＬを提供する。

【０１９７】

いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団または第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集するステップは、第２のＴＩＬ集団または第３のＴＩＬ集団に対して滅菌エレクトロポレーションステップまたはＳＱＺマイクロ流体膜破壊ステップを行うことを含み、滅菌エレクトロポレーションステップまたはＳＱＺマイクロ流体膜破壊ステップは、少なくとも２つの遺伝子エディターの移入を媒介する。

【０１９８】

いくつかの実施形態では、エレクトロポレーションステップまたはＳＱＺマイクロ流体膜破壊ステップは、少なくとも２つの遺伝子エディターの移入を媒介する単一の事象からなる。

【０１９９】

いくつかの実施形態では、エレクトロポレーションステップまたはＳＱＺマイクロ流体膜破壊ステップにおいて、少なくとも２つの遺伝子エディターの各々が、任意の他の遺伝子エディターの移入とは独立した事象によって個別に移入される。

【０２００】

いくつかの実施形態では、エレクトロポレーションステップは、各事象の後の休止期間をさらに含む。

【０２０１】

いくつかの実施形態では、エレクトロポレーションステップまたはＳＱＺマイクロ流体膜破壊ステップは、第１のタンパク質の発現を調節するための第１の遺伝子エディターの移入を媒介する第１の事象、第１の休止期間、第２のタンパク質の発現を調節するための第２の遺伝子エディターの移入を媒介する第２の事象、及び第２の休止期期間を含み、第１の休止期間及び第２の休止期間は、同じか、または異なる。

【０２０２】

いくつかの実施形態では、第１の休止期間及び第２の休止期間は、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることを含む。

【０２０３】

いくつかの実施形態では、第１の休止期間及び第２の休止期間は、第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を、約３０～４０℃、約５％のＣＯ２でインキュベートすることを含む。

【０２０４】

いくつかの実施形態では、第１の休止期間及び第２の休止期間は、独立して、約１０時間～５日である。

【０２０５】

いくつかの実施形態では、第１の休止期間及び第２の休止期間は、独立して、約１０時間～３日である。

【０２０６】
いくつかの実施形態では、第１の休止期間は、約１～３日である。
【０２０７】
いくつかの実施形態では、第１の休止期間は、約３日である。
【０２０８】
いくつかの実施形態では、第２の休止期間は、約１０時間～１日である。
【０２０９】
いくつかの実施形態では、第２の休止期間は、約１２時間～２４時間である。
【０２１０】
いくつかの実施形態では、第２の休止期間は、約１５時間～約１８時間である。
【０２１１】
いくつかの実施形態では、第２の休止期間は、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を、約１５時間～２３時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。
【０２１２】
いくつかの実施形態では、第２の休止期間は、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を、約約１時間、３７℃で、続いて約１５時間～２３時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。
【０２１３】
いくつかの実施形態では、第２の休止期間は、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を、約約１時間、３７℃で、続いて約１５時間～２２時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。
【０２１４】
いくつかの実施形態では、第１の休止期間は、約３日であり、第２の休止期間は、約１０～１６時間である。
【０２１５】
いくつかの実施形態では、少なくとも２つの遺伝子エディターは、第１のタンパク質の発現を調節するための第１のＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む第１の遺伝子エディターと、第２のタンパク質の発現を調節するための第２のＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む第２の遺伝子エディターと、を含む。
【０２１６】
いくつかの実施形態では、エレクトロポレーションステップまたはＳＱＺマイクロ流体膜破壊ステップは、第１のＴＡＬＥヌクレアーゼ系の移入を媒介する第１の事象、第１の休止期間、第２のＴＡＬＥヌクレアーゼ系の移入を媒介する第２の事象、及び第２の休止期期間を含み、第１の休止期間及び第２の休止期間は、同じか、または異なる。
【０２１７】
いくつかの実施形態では、第１の休止期間及び第２の休止期間は、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることを含む。
【０２１８】
いくつかの実施形態では、第１の休止期間及び第２の休止期間は、第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を、約３０～４０℃、約５％のＣＯ２でインキュベートすることを含む。
【０２１９】
いくつかの実施形態では、第１の休止期間及び第２の休止期間は、独立して、約１０時間～５日である。
【０２２０】
いくつかの実施形態では、第１の休止期間及び第２の休止期間は、独立して、約１０時間～３日である。
【０２２１】

いくつかの実施形態では、第１の休止期間は、約１～３日である。
【０２２２】
いくつかの実施形態では、第１の休止期間は、約３日である。
【０２２３】
いくつかの実施形態では、第２の休止期間は、約１０時間～１日である。
【０２２４】
いくつかの実施形態では、第２の休止期間は、約１２時間～２４時間である。
【０２２５】
いくつかの実施形態では、第２の休止期間は、約１５時間～約１８時間である。
【０２２６】
いくつかの実施形態では、第２の休止期間は、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を、約１５時間～２３時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。
【０２２７】
いくつかの実施形態では、第２の休止期間は、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を、約約１時間、３７℃で、続いて約１５時間～２３時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。
【０２２８】
いくつかの実施形態では、第２の休止期間は、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を、約約１時間、３７℃で、続いて約１５時間～２２時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。
【０２２９】
いくつかの実施形態では、第１の休止期間は、約３日であり、第２の休止期間は、約１０～１６時間である。
【０２３０】
いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団または第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集するステップは、第２のＴＩＬ集団または第３のＴＩＬ集団に対して滅菌エレクトロポレーションステップまたはＳＱＺマイクロ流体膜破壊ステップを行うことを含み、滅菌エレクトロポレーションステップまたはＳＱＺマイクロ流体膜破壊ステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移入を媒介する。
【０２３１】
いくつかの実施形態では、遺伝子エディターは、少なくとも１つのタンパク質の発現を調節するためのＴＡＬＥヌクレアーゼ系である。
【０２３２】
いくつかの実施形態では、ＴＡＬＥヌクレアーゼ系は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＢＬ－Ｂ、及び／またはＬＡＧ－３の発現を調節する。
【０２３３】
いくつかの実施形態では、遺伝子エディターは、ＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４の発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む。
【０２３４】
いくつかの実施形態では、遺伝子エディターは、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む。
【０２３５】
いくつかの実施形態では、遺伝子エディターは、ＰＤ－１及びＣＩＳＨの発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む。
【０２３６】
いくつかの実施形態では、遺伝子エディターは、ＰＤ－１及びＣＢＬ－Ｂの発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む。
【０２３７】
いくつかの実施形態では、遺伝子エディターは、ＰＤ－１及びＴＩＧＩＴの発現を調節

するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む。
【０２３８】
いくつかの実施形態では、遺伝子エディターは、ＣＴＬＡ－４及びＬＡＧ－３の発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む。
【０２３９】
いくつかの実施形態では、遺伝子エディターは、ＣＴＬＡ－４及びＣＩＳＨの発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む。
【０２４０】
いくつかの実施形態では、遺伝子エディターは、ＣＴＬＡ－４及びＣＢＬ－Ｂの発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む。
【０２４１】
いくつかの実施形態では、遺伝子エディターは、ＣＩＳＨ及びＣＢＬ－Ｂの発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む。
【０２４２】
いくつかの実施形態では、遺伝子エディターは、ＣＩＳＨ及びＴＩＧＩＴの発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む。
【０２４３】
いくつかの実施形態では、遺伝子エディターは、ＰＤ－１の発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む。
【０２４４】
いくつかの実施形態では、遺伝子エディターは、ＣＴＬＡ－４の発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む。
【０２４５】
いくつかの実施形態では、遺伝子エディターは、ＬＡＧ－３の発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む。
【０２４６】
いくつかの実施形態では、遺伝子エディターは、ＣＩＳＨの発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む。
【０２４７】
いくつかの実施形態では、遺伝子エディターはＣＢＬ－Ｂの発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む。
【０２４８】
いくつかの実施形態では、遺伝子エディターは、ＴＩＧＩＴの発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む。
【０２４９】
いくつかの実施形態では、方法は、遺伝子編集ステップの後、及び第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を培養するステップの前に、第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を休止させるステップをさらに含む。
【０２５０】
いくつかの実施形態では、休止ステップは、第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を、約３０～４０℃、約５％のＣＯ２でインキュベートすることを含む。
【０２５１】
いくつかの実施形態では、方法は、遺伝子編集ステップの後、及び第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を培養するステップの前に、第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を約１日間休止させるステップをさらに含む。
【０２５２】
方法が、遺伝子編集ステップの後、及び第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を培養するステップの前に、第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を約１２時間～２４時間休止させるステップをさらに含む、請求項３５２～３６９のいずれかに記載の方法。
【０２５３】

いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を休止させるステップは、第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を約１５時間～１８時間休止させることを含む。

【０２５４】

いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を休止させるステップは、第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を約１５時間休止させることを含む。

【０２５５】

いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を休止させるステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることを含む。

【０２５６】

いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を休止させるステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を、約１５時間～２３時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。

【０２５７】

いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を休止させるステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１５時間～２３時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。

【０２５８】

いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を休止させるステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１５時間～２２時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。

【０２５９】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質及び第２のタンパク質は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂからなる群から独立して選択され、ただし、第１のタンパク質及び第２のタンパク質が異なることを条件とする。

【０２６０】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質及び第２のタンパク質は、ＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４からなる群から選択される。

【０２６１】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質及び第２のタンパク質は、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３からなる群から選択される。

【０２６２】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質及び第２のタンパク質は、ＰＤ－１及びＣＩＳＨからなる群から選択される。

【０２６３】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質及び第２のタンパク質は、ＰＤ－１及びＣＢＬ－Ｂからなる群から選択される。

【０２６４】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質及び第２のタンパク質は、ＰＤ－１及びＴＩＧＩＴからなる群から選択される。

【０２６５】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質及び第２のタンパク質は、ＣＴＬＡ－４及びＬＡＧ－３からなる群から選択される。

【０２６６】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質及び第２のタンパク質は、ＣＴＬＡ－４及びＣＩＳＨからなる群から選択される。

【０２６７】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質及び第２のタンパク質は、ＣＴＬＡ－４及びＣＢＬ－Ｂからなる群から選択される。

【０２６８】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質及び第２のタンパク質は、ＬＡＧ－３及びＣＩＳＨからなる群から選択される。

【０２６９】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質及び第２のタンパク質は、ＬＡＧ－３及びＣＢＬ－Ｂからなる群から選択される。

【０２７０】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質及び第２のタンパク質は、ＣＩＳＨ及びＣＢＬ－Ｂからなる群から選択される。

【０２７１】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＰＤ－１であり、第２のタンパク質は、ＣＴＬＡ－４である。

【０２７２】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＣＴＬＡ－４であり、第２のタンパク質は、ＰＤ－１である。

【０２７３】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＰＤ－１であり、第２のタンパク質は、ＬＡＧ－３である。

【０２７４】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＬＡＧ－３であり、第２のタンパク質は、ＰＤ－１である。

【０２７５】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＰＤ－１であり、第２のタンパク質は、ＣＩＳＨである。

【０２７６】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＣＩＳＨであり、第２のタンパク質は、ＰＤ－１である。

【０２７７】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＰＤ－１であり、第２のタンパク質は、ＣＢＬ－Ｂである。

【０２７８】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＣＢＬ－Ｂであり、第２のタンパク質は、ＰＤ－１である。

【０２７９】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＰＤ－１であり、第２のタンパク質は、ＴＩＧＩＴである。

【０２８０】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＴＩＧＩＴであり、第２のタンパク質は、ＰＤ－１である。

【０２８１】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＣＴＬＡ－４であり、第２のタンパク質は、ＬＡＧ－３である。

【０２８２】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＬＡＧ－３であり、第２のタンパク質は、ＣＴＬＡ－４である。

【０２８３】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＣＴＬＡ－４であり、第２のタンパク質は、ＣＩＳＨである。

【０２８４】
いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＣＩＳＨであり、第２のタンパク質は、ＣＴＬＡ－４である。
【０２８５】
いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＣＴＬＡ－４であり、第２のタンパク質は、ＣＢＬ－Ｂである。
【０２８６】
いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＣＢＬ－Ｂであり、第２のタンパク質は、ＣＴＬＡ－４である。
【０２８７】
いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＬＡＧ－３であり、第２のタンパク質は、ＣＩＳＨである。
【０２８８】
いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＣＩＳＨであり、第２のタンパク質は、ＬＡＧ－３である。
【０２８９】
いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＬＡＧ－３であり、第２のタンパク質は、ＣＢＬ－Ｂである。
【０２９０】
いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＣＢＬ－Ｂであり、第２のタンパク質は、ＬＡＧ－３である。
【０２９１】
いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＣＩＳＨであり、第２のタンパク質は、ＣＢＬ－Ｂである。
【０２９２】
いくつかの実施形態では、第１のタンパク質は、ＣＢＬ－Ｂであり、第２のタンパク質は、ＣＩＳＨである。
【０２９３】
いくつかの実施形態では、第１のタンパク質または第２のタンパク質は、ＰＤ－１である。
【０２９４】
いくつかの実施形態では、第１のタンパク質または第２のタンパク質は、ＣＴＬＡ－４である。
【０２９５】
いくつかの実施形態では、第１のタンパク質または第２のタンパク質は、ＬＡＧ－３である。
【０２９６】
いくつかの実施形態では、第１のタンパク質または第２のタンパク質は、ＣＩＳＨである。
【０２９７】
いくつかの実施形態では、第１のタンパク質または第２のタンパク質は、ＣＢＬ－Ｂである。
【０２９８】
いくつかの実施形態では、第１のタンパク質または第２のタンパク質は、ＴＩＧＩＴである。
【０２９９】
いくつかの実施形態では、第１の遺伝子エディターは、第１のタンパク質の発現を下方調節し、第２の遺伝子エディターは、第２のタンパク質の発現を下方調節する。
【０３００】
いくつかの実施形態では、増加した数のＴＩＬは、治療的ＴＩＬ集団を含む。

【０３０１】
いくつかの実施形態では、抗原提示細胞（ＡＰＣ）はＰＢＭＣである。
【０３０２】
いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは放射線照射されており、同種異系である。
【０３０３】
いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、人工抗原提示細胞である。
【０３０４】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２濃度は約１０，０００ＩＵ／ｍＬ～約５，０００ＩＵ／ｍＬである。
【０３０５】
いくつかの実施形態では、第１の細胞培養培地及び／または第２の細胞培養培地は、４－１ＢＢアゴニスト及び／またはＯＸ４０アゴニストをさらに含む。
【０３０６】
いくつかの実施形態では、患者は、ＩＣＩ治療、抗ＶＥＧＦ治療、化学療法治療、またはそれらの組み合わせに対してナイーブである。
【０３０７】
いくつかの実施形態では、患者は、任意のがん治療に対してナイーブである。
【０３０８】
いくつかの実施形態では、患者は、第１選択ＩＣＩ治療及び／または標準治療を受ける。
【０３０９】
いくつかの実施形態では、患者は、第２選択ＩＣＩ治療及び／または標準治療を受ける。
【０３１０】
いくつかの実施形態では、患者が、がん治療を受けるか、または維持療法を再開し、進行性疾患を示した後に、解凍のステップ及び後続のステップが行われる。
【０３１１】
いくつかの実施形態では、患者は、ステップ（ａ）の開始時にウォッシュアウト期間にある。
【０３１２】
いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団の投与を必要とするがん患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することによってがん患者を治療する方法であって、がん患者が、少なくとも１つの前の療法を受けており、少なくとも１つの前の療法の時またはその後にがん進行を示し、ＴＩＬ集団の取得が、多病変試料採取を含み、ＴＩＬ集団が、がん患者が少なくとも１つの前の療法を受ける前に採取された腫瘍試料から作製され、ＴＩＬ集団が、がん患者が少なくとも１つの前の療法の時またはその後にがん進行を示した後に、対象または患者に投与される、方法を提供する。
【０３１３】
いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団の投与を必要とするがん患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することによってがん患者を治療する方法であって、がん患者が、少なくとも１つの前の療法を受けており、少なくとも１つの前の療法の時またはその後にがん進行を示し、ＴＩＬ集団の取得が、多病変試料採取を含み、ＴＩＬ集団が、がん患者が少なくとも１つの前の療法を受ける前に採取された腫瘍試料から作製され、ＴＩＬ集団が、がん患者が少なくとも１つの前の療法の時またはその後にがん進行を示した後に、対象または患者に投与される、方法を提供する。
【０３１４】
いくつかの実施形態では、腫瘍試料を採取する時点で、がん患者は、任意のがん治療に対してナイーブである。
【０３１５】
いくつかの実施形態では、腫瘍試料を採取する時点で、患者は、ＩＣＩ治療、抗ＶＥＧ

Ｆ治療、または化学療法治療に対してナイーブである。
【０３１６】
いくつかの実施形態では、腫瘍試料を採取する時点で、患者は、ステップ（ａ）の時点で中断されている維持療法を受けており、維持療法は、凍結保存の後に再開される。
【０３１７】
いくつかの実施形態では、腫瘍試料を採取する時点で、患者は、凍結保存のステップの開始時にウォッシュアウト期間にある。
【０３１８】
いくつかの実施形態では、患者は、第１選択ＩＣＩ治療及び／または標準治療を受けるか、または受けることになる。
【０３１９】
いくつかの実施形態では、患者は、第２選択ＩＣＩ治療及び／または標準治療を受けるか、または受けることになる。
【０３２０】
いくつかの実施形態では、方法は、ＩＣＩをがん患者に投与することをさらに含む。
【０３２１】
いくつかの実施形態では、ＩＣＩは、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲからなる群から選択される遺伝子の阻害剤である。
【０３２２】
ＴＩＬ集団を患者に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで患者を治療するステップをさらに含む、請求項１～７６のいずれか１項に記載の方法。
【０３２３】
骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ２／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ２／日の用量で５日間投与するステップを含む、請求項７７に記載の方法。
【０３２４】
骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ２／日の用量で、及びフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ２／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ２／日の用量で３日間投与するステップを含む、請求項７７に記載の方法。
【０３２５】
シクロホスファミドは、メスナとともに投与される、請求項７９～７９に記載の方法。
【０３２６】
患者へのＴＩＬ集団の投与の翌日に開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む、請求項１～８０のいずれか１項に記載の方法。
【０３２７】
患者へのＴＩＬ集団の投与と同日に開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む、請求項１～８０のいずれか１項に記載の方法。
【０３２８】
ＩＬ－２レジメンが、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される、６００，０００もしくは７２０，０００ＩＵ／ｋｇのアルデスロイキン、また

はそのバイオシミラーもしくはバリアントを含む高用量ＩＬ－２レジメンである、請求項１～８２のいずれか１項に記載の方法。

【０３２９】

請求項１～２９１のいずれかに記載の方法によって製造された増加した数の腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）または治療的ＴＩＬ集団。

【０３３０】

本明細書で提供される増加した数のＴＩＬまたは治療的ＴＩＬ集団と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

【０３３１】

本明細書で開示される方法を使用して製造されたＴＩＬ集団。

【０３３２】

本明細書に開示されるＴＩＬ集団を含む、薬学的組成物。

【０３３３】

ＩＣＩをさらに含む、本明細書で開示される薬学的組成物。

【０３３４】

ＩＣＩが、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲからなる群から選択される遺伝子の阻害剤である、本明細書で開示される薬学的組成物。

【０３３５】

いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者に、本明細書で開示されるＴＩＬ集団または本明細書で開示される薬学的組成物を投与することによって、がん患者を治療する方法であって、がん患者が、少なくとも１つの前の療法を受けており、がん患者が、少なくとも１つの前の療法の時またはその後に、がん進行を示す、方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【０３３６】

【図１】ステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的なＧｅｎ２（プロセス２Ａ）タイプチャート。

【図２Ａ】Ｇｅｎ２（プロセス２Ａ）タイププロセスの例示的なプロセスフローチャート。

【図２Ｂ】Ｇｅｎ２（プロセス２Ａ）タイププロセスの例示的なプロセスフローチャート。

【図２Ｃ】Ｇｅｎ２（プロセス２Ａ）タイププロセスの例示的なプロセスフローチャート。

【図３】凍結保存されたＴＩＬの例示的な製造プロセス（約２２日）の実施形態の図を示す。

【図４】ＴＩＬ製造のための２２日プロセスであるＧｅｎ２の実施形態の図を示す。

【図５】プロセス１Ｃ及びＧｅｎ２の例示的な実施形態からのステップＡ～Ｆの比較表。

【図６】プロセス１Ｃの実施形態とＧｅｎ２の実施形態との詳細な比較。

【図７】ＮＳＣＬＣ腫瘍の例示的なＧｅｎ３タイププロセス。

【図８Ａ】２Ａプロセス（およそ２２日プロセス）と、ＴＩＬ製造のためのＧｅｎ３プロセス（およそ１４日～１６日プロセス）の実施形態との比較を示す。

【図８Ｂ】ステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的なプロセスＧｅｎ３チャート（およそ

１４日～１６日プロセス）。
【図８Ｃ】３つのプロセスバリエーションの各々について、ステップＡ～Ｆ（およそ１４日～１６日プロセス）の概要とともに３つの例示的なＧｅｎ３プロセスを提供するチャート。
【図８Ｄ】ステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的な修正Ｇｅｎ２様プロセス（およそ２２日プロセス）。
【図９】Ｇｅｎ２（Ｇｅｎ２）とＧｅｎ３との比較のための実験フローチャートを提供する。
【図１０】様々なＧｅｎ２（２Ａプロセス）とＧｅｎ３．１プロセス実施形態との比較を示す。
【図１１】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１及びＧｅｎ３．０プロセスの実施形態の様々な特徴を説明する表。
【図１２】Ｇｅｎ３．１と称される、Ｇｅｎ３プロセスの実施形態のための培地条件の概要。
【図１３】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１及びＧｅｎ３．０プロセスの実施形態の様々な特徴を説明する表。
【図１４】Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３．０プロセスの実施形態の様々な特徴を比較する表。
【図１５】記載された拡張プロセスの様々な実施形態における培地の使用を提供する表。
【図１６】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図１７】Ｇｅｎ３拡張プラットフォームを使用して造血器悪性腫瘍からＴ細胞を拡張するための方法の例示的な実施形態の概略図。
【図１８】構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂを提供し、円筒は、個々のポリペプチド結合ドメインを指す。構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂは、例えば、４－１ＢＢＬまたは４－１ＢＢに結合する抗体から誘導される３つの線形に結合したＴＮＦＲＳＦ結合ドメインを含み、これらを折り畳んで三価タンパク質を形成し、次いでこれをＩｇＧ１－Ｆｃ（ＣＨ３及びＣＨ２ドメインを含む）によって第２の三価タンパク質に結合し、次いでこれを使用して、三価タンパク質のうちの２つをジスルフィド結合（小さい長楕円）によって一緒に結合し、構造を安定化し、６つの受容体及びシグナル伝達タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを一緒にして、シグナル伝達複合体を形成することができるアゴニストを提供する。円筒として示されるＴＮＦＲＳＦ結合ドメインは、例えば、親水性残基及び柔軟性のためのＧｌｙ及びＳｅｒ配列、ならびに溶解性のためのＧｌｕ及びＬｙｓを含み得るリンカーによって結合されたＶＨ鎖及びＶＬ鎖を含む、ｓｃＦｖドメインであり得る。
【図１９】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２０】Ｇｅｎ３．１プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態のプロセス概要を提供する。
【図２１】Ｇｅｎ３．１試験プロセス（１６～１７日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２２】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２３Ａ】例示的なＧｅｎ２プロセス及び例示的なＧｅｎ３プロセスの比較表。
【図２３Ｂ】例示的なＧｅｎ２プロセス及び例示的なＧｅｎ３プロセスの比較表。
【図２４】Ｇｅｎ３プロセス（１６／１７日プロセス）の調製タイムラインの例示的な実施形態の概略図。
【図２５】Ｇｅｎ３プロセス（１４～１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２６Ａ】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２６Ｂ】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２７】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２８】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１、及びＧｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の実施形態の比較。
【図２９】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１、及びＧｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の実施形態の比較。

【図３０】Ｇｅｎ３実施形態の構成要素。
【図３１】Ｇｅｎ３実施形態のフローチャート比較（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、Ｇｅｎ３．１試験）。
【図３２】Ｇｅｎ３プロセス（１６～１７日プロセス）の例示的な実施形態の構成要素が示される。
【図３３】承認基準表。
【図３４】実施例１９に記載の研究に関連する研究設計の図。
【図３５】実施例１９に記載の研究に関連するＴＩＬベースの免疫療法製造プロセスの概略図。略語：ＣＭＯ＝受託製造組織、ＧＭＰ＝適正製造規範、ＩＬ－２＝インターロイキン－２、ＯＫＴ３＝ＣＤ３に対するモノクローナル抗体、ＴＩＬ＝腫瘍浸潤リンパ球。
【図３６】研究フローチャート（全４コホート）。
【図３７】ペイシェントジャーニー及び中央Ｇｅｎ２　ＧＭＰ製造。
【図３８】コホート３Ｂ患者治療スキーマ。
【図３９】患者の性質。
【図４０】経時的な有害事象（ＦＡＳ）。
【図４１】標的病変の直径和におけるベースラインからの最良の変化率（有効性評価対象セット）。
【図４２】ＰＲ以上を達成した確認された応答者に対する最初の奏効までの時間、奏効期間、及び有効性評価の時間。
【図４３】標的病変の直径和（ＦＡＳ）におけるベースラインからの変化率。
【図４４】ＴＩＬ製造及び患者の遍歴。
【図４５】研究設計及びエンドポイント。
【図４６】治療スキーマ。
【図４７】進行後及び進行前の腫瘍採取を有する患者の治療スキーマ。
【図４８Ａ】ＫＯ　ＴＩＬ　ＴＡＬＥＮプロセスの例示的な実施形態の概略図。
【図４８Ｂ】ＫＯ　ＴＩＬ　ＴＡＬＥＮプロセスの例示的な実施形態の概略図。
【図４８Ｃ】ＫＯ　ＴＩＬ　ＴＡＬＥＮプロセスの例示的な実施形態の概略図。
【図４８Ｄ】ＫＯ　ＴＩＬ　ＴＡＬＥＮプロセスの例示的な実施形態の概略図。
【図４９－１】フルスケールＰＤ－１　ＫＯ　ＴＩＬ　ＴＡＬＥＮプロセスの実験フロー図。
【図４９－２】フルスケールＰＤ－１　ＫＯ　ＴＩＬ　ＴＡＬＥＮプロセスの実験フロー図。
【図５０－１】フルスケールＰＤ－１　ＫＯ　ＴＩＬ　ＴＡＬＥＮプロセスの実験フロー図。
【図５０－２】フルスケールＰＤ－１　ＫＯ　ＴＩＬ　ＴＡＬＥＮプロセスの実験フロー図。
【図５１Ａ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図５１Ｂ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図５１Ｃ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図５１Ｄ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図５１Ｅ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図５１Ｆ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図５１Ｇ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図５１Ｈ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図５１Ｉ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。

【図５１Ｊ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図５２Ａ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図５２Ｂ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図５２Ｃ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図５２Ｄ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【０３３７】
配列表の簡単な説明
配列番号１は、ムロモナブの重鎖のアミノ酸配列である。
【０３３８】
配列番号２は、ムロモナブの軽鎖のアミノ酸配列である。
【０３３９】
配列番号３は、組換えヒトＩＬ－２タンパク質のアミノ酸配列である。
【０３４０】
配列番号４は、アルデスロイキンのアミノ酸配列である。
【０３４１】
配列番号５は、ＩＬ－２形態である。
【０３４２】
配列番号６は、ネムバロイキンアルファのアミノ酸配列である。
【０３４３】
配列番号７は、ＩＬ－２形態である。
【０３４４】
配列番号８は、ムチンドメインポリペプチドである。
【０３４５】
配列番号９は、組換えヒトＩＬ－４タンパク質のアミノ酸配列である。
【０３４６】
配列番号１０は、組換えヒトＩＬ－７タンパク質のアミノ酸配列である。
【０３４７】
配列番号１１は、組換えヒトＩＬ－１５タンパク質のアミノ酸配列である。
【０３４８】
配列番号１２は、組換えヒトＩＬ－２１タンパク質のアミノ酸配列である。
【０３４９】
配列番号１３は、ＩＬ－２配列である。
【０３５０】
配列番号１４は、ＩＬ－２ムテイン配列である。
【０３５１】
配列番号１５は、ＩＬ－２ムテイン配列である。
【０３５２】
配列番号１６は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２である。
【０３５３】
配列番号１７は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ２である。
【０３５４】
配列番号１８は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ３である。
【０３５５】
配列番号１９は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２カバットである。

【０３５６】
配列番号２０は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ２カバットである。
【０３５７】
配列番号２１は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ３カバットである。
【０３５８】
配列番号２２は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２クロチアである。
【０３５９】
配列番号２３は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ２クロチアである。
【０３６０】
配列番号２４は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ３クロチアである。
【０３６１】
配列番号２５は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２　ＩＭＧＴである。
【０３６２】
配列番号２６は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ２　ＩＭＧＴである。
【０３６３】
配列番号２７は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ３　ＩＭＧＴである。
【０３６４】
配列番号２８は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＶＨ鎖である。
【０３６５】
配列番号２９は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１の重鎖である。
【０３６６】
配列番号３０は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ１カバットである。
【０３６７】
配列番号３１は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ２カバットである。
【０３６８】
配列番号３２は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ３カバットである。
【０３６９】
配列番号３３は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ１クロチアである。
【０３７０】
配列番号３４は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ２クロチアである。
【０３７１】
配列番号３５は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ３　ｃｈｏｔｈｉａである。
【０３７２】
配列番号３６は、ＶＬ鎖である。
【０３７３】
配列番号３７は、軽鎖である。
【０３７４】
配列番号３８は、軽鎖である。
【０３７５】
配列番号３９は、軽鎖である。
【０３７６】
配列番号４０は、ヒト４－１ＢＢのアミノ酸配列である。
【０３７７】
配列番号４１は、マウス４－１ＢＢのアミノ酸配列である。
【０３７８】
配列番号４２は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖である。
【０３７９】

配列番号４３は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖である。

【０３８０】

配列番号４４は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖可変領域（V_H）である。

【０３８１】

配列番号４５は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖可変領域（V_L）である。

【０３８２】

配列番号４６は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖ＣＤＲ１である。

【０３８３】

配列番号４７は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖ＣＤＲ２である。

【０３８４】

配列番号４８は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖ＣＤＲ３である。

【０３８５】

配列番号４９は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖ＣＤＲ１である。

【０３８６】

配列番号５０は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖ＣＤＲ２である。

【０３８７】

配列番号５１は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖ＣＤＲ３である。

【０３８８】

配列番号５２は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖である。

【０３８９】

配列番号５３は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖である。

【０３９０】

配列番号５４は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖可変領域（ＶＨ）である。

【０３９１】

配列番号５５は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。

【０３９２】

配列番号５６は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖ＣＤＲ１である。

【０３９３】

配列番号５７は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖ＣＤＲ２である。

【０３９４】

配列番号５８は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖ＣＤＲ３である。

【０３９５】

配列番号５９は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖ＣＤＲ１である。

【０３９６】
配列番号６０は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０３９７】
配列番号６１は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０３９８】
配列番号６２は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のＦｃドメインである。
【０３９９】
配列番号６３は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０４００】
配列番号６４は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０４０１】
配列番号６５は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０４０２】
配列番号６６は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０４０３】
配列番号６７は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０４０４】
配列番号６８は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０４０５】
配列番号６９は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０４０６】
配列番号７０は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０４０７】
配列番号７１は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０４０８】
配列番号７２は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０４０９】
配列番号７３は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のＦｃドメインである。
【０４１０】
配列番号７４は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０４１１】
配列番号７５は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０４１２】
配列番号７６は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０４１３】
配列番号７７は、４－１ＢＢリガンド（４－１ＢＢＬ）アミノ酸配列である。
【０４１４】
配列番号７８は、４－１ＢＢＬポリペプチドの可溶性部分である。
【０４１５】
配列番号７９は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン１の重鎖可変領域（V_H）である。
【０４１６】
配列番号８０は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン１の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０４１７】
配列番号８１は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン２の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０４１８】

配列番号８２は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン２の軽鎖可変領域（V_L）である。

【０４１９】

配列番号８３は、４－１ＢＢアゴニスト抗体Ｈ３９Ｅ３－２の重鎖可変領域（V_H）である。

【０４２０】

配列番号８４は、４－１ＢＢアゴニスト抗体Ｈ３９Ｅ３－２の軽鎖可変領域（V_L）である。

【０４２１】

配列番号８５は、ヒトＯＸ４０のアミノ酸配列である。

【０４２２】

配列番号８６は、マウスＯＸ４０のアミノ酸配列である。

【０４２３】

配列番号８７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖である。

【０４２４】

配列番号８８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖である。

【０４２５】

配列番号８９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖可変領域（V_H）である。

【０４２６】

配列番号９０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖可変領域（V_L）である。

【０４２７】

配列番号９１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖ＣＤＲ１である。

【０４２８】

配列番号９２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖ＣＤＲ２である。

【０４２９】

配列番号９３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖ＣＤＲ３である。

【０４３０】

配列番号９４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖ＣＤＲ１である。

【０４３１】

配列番号９５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖ＣＤＲ２である。

【０４３２】

配列番号９６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖ＣＤＲ３である。

【０４３３】

配列番号９７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖である。

【０４３４】

配列番号９８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖である。

【０４３５】

配列番号９９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖可変領域（V_H）である。

【０４３６】

配列番号１００は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖可変領域（V_L）である。

【０４３７】

配列番号１０１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ１である。

【０４３８】

配列番号１０２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ２である。

【０４３９】

配列番号１０３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ３である。

【０４４０】

配列番号１０４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ１である。

【０４４１】

配列番号１０５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ２である。

【０４４２】

配列番号１０６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ３である。

【０４４３】

配列番号１０７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖である。

【０４４４】

配列番号１０８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖である。

【０４４５】

配列番号１０９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖可変領域（V_H）である。

【０４４６】

配列番号１１０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖可変領域（V_L）である。

【０４４７】

配列番号１１１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ１である。

【０４４８】

配列番号１１２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ２である。

【０４４９】

配列番号１１３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ３である。

【０４５０】

配列番号１１４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ１である。

【０４５１】

配列番号１１５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ２である。

【０４５２】

配列番号１１６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ３である。

【０４５３】

配列番号１１７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖

可変領域（V_H）である。
【０４５４】
配列番号１１８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０４５５】
配列番号１１９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖ＣＤＲ１である。
【０４５６】
配列番号１２０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖ＣＤＲ２である。
【０４５７】
配列番号１２１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖ＣＤＲ３である。
【０４５８】
配列番号１２２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０４５９】
配列番号１２３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０４６０】
配列番号１２４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０４６１】
配列番号１２５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖可変領域（V_H）である。
【０４６２】
配列番号１２６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０４６３】
配列番号１２７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖ＣＤＲ１である。
【０４６４】
配列番号１２８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖ＣＤＲ２である。
【０４６５】
配列番号１２９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖ＣＤＲ３である。
【０４６６】
配列番号１３０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０４６７】
配列番号１３１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０４６８】
配列番号１３２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０４６９】
配列番号１３３は、ＯＸ４０リガンド（ＯＸ４０Ｌ）アミノ酸配列である。
【０４７０】
配列番号１３４は、ＯＸ４０Ｌポリペプチドの可溶性部分である。

【０４７１】
配列番号１３５は、ＯＸ４０Ｌポリペプチドの代替可溶性部分である。
【０４７２】
配列番号１３６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体００８の重鎖可変領域（V_H）である。
【０４７３】
配列番号１３７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体００８の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０４７４】
配列番号１３８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０１１の重鎖可変領域（V_H）である。
【０４７５】
配列番号１３９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０１１の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０４７６】
配列番号１４０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２１の重鎖可変領域（V_H）である。
【０４７７】
配列番号１４１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２１の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０４７８】
配列番号１４２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２３の重鎖可変領域（V_H）である。
【０４７９】
配列番号１４３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２３の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０４８０】
配列番号１４４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０４８１】
配列番号１４５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０４８２】
配列番号１４６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０４８３】
配列番号１４７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０４８４】
配列番号１４８は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０４８５】
配列番号１４９は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０４８６】
配列番号１５０は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０４８７】
配列番号１５１は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。

【０４８８】
配列番号１５２は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０４８９】
配列番号１５３は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０４９０】
配列番号１５４は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０４９１】
配列番号１５５は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０４９２】
配列番号１５６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０４９３】
配列番号１５７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０４９４】
配列番号１５８は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０４９５】
配列番号１５９は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０４９６】
配列番号１６０は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０４９７】
配列番号１６１は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０４９８】
配列番号１６２は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０４９９】
配列番号１６３は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０５００】
配列番号１６４は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０５０１】
配列番号１６５は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０５０２】
配列番号１６６は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０５０３】
配列番号１６７は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０５０４】
配列番号１６８は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０５０５】
配列番号１６９は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０５０６】
配列番号１７０は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０５０７】
配列番号１７１は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。

【０５０８】
配列番号１７２は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０５０９】
配列番号１７３は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０５１０】
配列番号１７４は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０５１１】
配列番号１７５は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０５１２】
配列番号１７６は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０５１３】
配列番号１７７は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０５１４】
配列番号１７８は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０５１５】
配列番号１７９は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０５１６】
配列番号１８０は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０５１７】
配列番号１８１は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０５１８】
配列番号１８２は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０５１９】
配列番号１８３は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０５２０】
配列番号１８４は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０５２１】
配列番号１８５は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０５２２】
配列番号１８６は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０５２３】
配列番号１８７は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０５２４】
配列番号１８８は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０５２５】
配列番号１８９は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【０５２６】
配列番号１９０は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０５２７】
配列番号１９１は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０５２８】
配列番号１９２は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０５２９】
配列番号１９３は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０５３０】
配列番号１９４は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０５３１】
配列番号１９５は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０５３２】
配列番号１９６は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０５３３】
配列番号１９７は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０５３４】
配列番号１９８は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０５３５】
配列番号１９９は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０５３６】
配列番号２００は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０５３７】
配列番号２０１は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０５３８】
配列番号２０２は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０５３９】
配列番号２０３は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０５４０】
配列番号２０４は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０５４１】
配列番号２０５は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０５４２】
配列番号２０６は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０５４３】
配列番号２０７は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０５４４】
配列番号２０８は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０５４５】
配列番号２０９は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【０５４６】
配列番号２１０は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０５４７】
配列番号２１１は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０５４８】
配列番号２１２は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０５４９】
配列番号２１３は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０５５０】
配列番号２１４は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０５５１】
配列番号２１５は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０５５２】
配列番号２１６は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０５５３】
配列番号２１７は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０５５４】
配列番号２１８は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０５５５】
配列番号２１９は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０５５６】
配列番号２２０は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０５５７】
配列番号２２１は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０５５８】
配列番号２２２は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０５５９】
配列番号２２３は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０５６０】
配列番号２２４は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０５６１】
配列番号２２５は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０５６２】
配列番号２２６は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０５６３】

配列番号２２７は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。

【０５６４】

配列番号２２８は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖アミノ酸配列である。

【０５６５】

配列番号２２９は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【０５６６】

配列番号２３０は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。

【０５６７】

配列番号２３１は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。

【０５６８】

配列番号２３２は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。

【０５６９】

配列番号２３３は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。

【０５７０】

配列番号２３４は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。

【０５７１】

配列番号２３５は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。

【０５７２】

配列番号２３６は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。

【０５７３】

配列番号２３７は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。

【０５７４】

配列番号２３８は、ＣＤ８ａ膜貫通ドメインである。

【０５７５】

配列番号２３９は、Ｂ７－１膜貫通細胞内ドメインである。

【０５７６】

配列番号２４０～２４５は、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質において有用である例示的なグリシン－セリンリンカーである。

【０５７７】

配列番号２４６は、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質において有用である例示的なリンカーである。

【０５７８】

配列番号２４７は、２Ａペプチド Ｃ末端配列である。

【０５７９】

配列番号２４８は、ブタテシオウイルス－１　２Ａペプチドである。

【０５８０】

配列番号２４９は、ウマ鼻炎Ａウイルス２Ａペプチドである。

【０５８１】

配列番号２５０は、口蹄疫ウイルス２Ａペプチドである。

【０５８２】

配列番号２５１は、例示的なフリン切断可能な２Ａペプチドである。

【０５８３】
配列番号２５２及び２５３は、ヒトＩｇＥシグナルペプチド配列である。
【０５８４】
配列番号２５４は、ヒトＩＬ－２シグナルペプチド配列である。
【０５８５】
配列番号２５５は、６×ＮＦＡＴ　ＩＬ－２最小プロモーターである。
【０５８６】
配列番号２５６は、ＮＦＡＴ応答性エレメントである。
【０５８７】
配列番号２５７は、ヒトＩＬ－２プロモーター配列である。
【０５８８】
配列番号２５８は、ヒトＩＬ－１５（Ｎ７２Ｄ変異体）である。
【０５８９】
配列番号２５９は、ヒトＩＬ－１５Ｒ－アルファ－Ｓｕ／Ｆｃドメインである。
【０５９０】
配列番号２６０は、ヒトＩＬ－１５Ｒ－アルファ－Ｓｕ（６５ａａ切断細胞外ドメイン）である。
【０５９１】
配列番号２６１は、ヒトＩＬ－１５アイソフォーム２である。
【０５９２】
配列番号２６２は、ヒトＩＬ－１５アイソフォーム１である。
【０５９３】
配列番号２６３は、ヒトＩＬ－１５（シグナルペプチドを含まない）である。
【０５９４】
配列番号２６４は、ヒトＩＬ－１５Ｒ－アルファ（８５ａａ切断細胞外ドメイン）である。
【０５９５】
配列番号２６５は、ヒトＩＬ－１５Ｒ－アルファ（１８２ａａ切断細胞外ドメイン）である。
【０５９６】
配列番号２６６は、ヒトＩＬ－１５Ｒ－アルファである。
【０５９７】
配列番号２６７は、ヒトＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットである。
【０５９８】
配列番号２６８は、ヒトＩＬ－１２　ｐ４０サブユニットである。
【０５９９】
配列番号２６９は、ヒトＩＬ－１８である。
【０６００】
配列番号２７０は、ヒトＩＬ－１８バリアントである。
【０６０１】
配列番号２７１は、ヒトＩＬ－２１である。
【０６０２】
配列番号２７２は、ヒトＩＬ－２である。
【０６０３】
配列番号２７３は、ヒトＣＤ４０Ｌである。
【０６０４】
配列番号２７４は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＨ（ソチガリマブ）である。
【０６０５】
配列番号２７５は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＬ（ソチガリマブ）である。
【０６０６】

配列番号２７６は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ｓｃＦｖ（ソチガリマブ）である。
【０６０７】
配列番号２７７は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＨ（ダセツズマブ）である。
【０６０８】
配列番号２７８は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＬ（ダセツズマブ）である。
【０６０９】
配列番号２７９は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ｓｃＦｖ（ダセツズマブ）である。
【０６１０】
配列番号２８０は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＨ（ルカツツズマブ）である。
【０６１１】
配列番号２８１は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＬ（ルカツツズマブ）である。
【０６１２】
配列番号２８２は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ｓｃＦｖ（ルカツツズマブ）である。
【０６１３】
配列番号２８３は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＨ（セリクレルマブ）である。
【０６１４】
配列番号２８４は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＬ（セリクレルマブ）である。
【０６１５】
配列番号２８５は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ｓｃＦｖ（セリクレルマブ）である。
【０６１６】
配列番号２８６は、標的ＰＤ－１配列である。
【０６１７】
配列番号２８７は、標的ＰＤ－１配列である。
【０６１８】
配列番号２８８は、反復ＰＤ－１左反復配列である。
【０６１９】
配列番号２８９は、反復ＰＤ－１右反復配列である。
【０６２０】
配列番号２９０は、反復ＰＤ－１左反復配列である。
【０６２１】
配列番号２９１は、反復ＰＤ－１右反復配列である。
【０６２２】
配列番号２９２は、ＰＤ－１左ＴＡＬＥＮヌクレアーゼ配列である。
【０６２３】
配列番号２９３は、ＰＤ－１右ＴＡＬＥＮヌクレアーゼ配列である。
【０６２４】
配列番号２９４は、ＰＤ－１左ＴＡＬＥＮヌクレアーゼ配列である。
【０６２５】
配列番号２９５は、ＰＤ－１右ＴＡＬＥＮヌクレアーゼ配列である。
【０６２６】
配列番号２９６は、配列番号３２８のテザリングされたＩＬ－１５をコードする核酸配列である。
【０６２７】
配列番号２９７は、配列番号３３１のテザリングされたＩＬ－２１融合タンパク質をコードする核酸配列である。
【０６２８】
配列番号２９８は、配列番号３２８のテザリングされたＩＬ－１５融合タンパク質及び配列番号３３１のテザリングされたテザーＩＬ－２１融合タンパク質をコードする核酸配列である。
【０６２９】

配列番号２９９は、配列番号３０３のテザリングされたＩＬ－１２融合タンパク質をコードする核酸配列である。核酸配列は、ＮＦＡＴプロモーターを含む。

【０６３０】

配列番号３００は、配列番号３２８のテザリングされたＩＬ－１５融合タンパク質をコードする核酸配列である。核酸配列は、ＮＦＡＴプロモーターを含む。

【０６３１】

配列番号３０１は、配列番号３３１のテザリングされたＩＬ－２１融合タンパク質をコードする核酸配列である。核酸配列は、ＮＦＡＴプロモーターを含む。

【０６３２】

配列番号３０２は、配列番号３２８のテザリングされたＩＬ－１５融合タンパク質及び配列番号３３１のテザリングされたテザーＩＬ－２１融合タンパク質をコードする核酸配列である。核酸配列は、ＮＦＡＴプロモーターを含む。

【０６３３】

配列番号３０３は、例示的なテザリングされたＩＬ－１２（テザリングされたＩＬ－１２－Ｌｒ１－Ａｒ２）のアミノ酸配列である。

【０６３４】

配列番号３０４は、配列番号３０３のテザリングされたＩＬ－１２をコードする核酸配列である。

【０６３５】

配列番号３０５は、例示的なテザリングされたＩＬ－１８（テザリングされたＩＬ－１８－Ｌｒ１－Ａｒ２）のアミノ酸配列である。

【０６３６】

配列番号３０６は、配列番号３０５のテザリングされたＩＬ－１８をコードする核酸配列である。

【０６３７】

配列番号３０７は、例示的なテザリングされたバリアントＩＬ－１８（テザリングされたＤＲ－ＩＬ－１８（６－２７バリアント）－Ｌｒ１－Ａｒ２）のアミノ酸配列である。

【０６３８】

配列番号３０８は、配列番号３０７のテザリングされたバリアントＩＬ－１８をコードする核酸配列である。

【０６３９】

配列番号３０９は、例示的なテザリングされたＩＬ－１２／ＩＬ－１５のアミノ酸配列である。

【０６４０】

配列番号３１０は、配列番号３０９のテザリングされたＩＬ－１２／ＩＬ－１５をコードする核酸配列である。

【０６４１】

配列番号３１１は、例示的なテザリングされたＩＬ－１８／ＩＬ－１５のアミノ酸配列である。

【０６４２】

配列番号３１２は、配列番号３１１のテザリングされたＩＬ－１８／ＩＬ－１５をコードする核酸配列である。

【０６４３】

配列番号３１３は、例示的なテザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ＡＰＸ００５Ｍ）のアミノ酸配列である。

【０６４４】

配列番号３１４は、配列番号３１３のテザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ＡＰＸ００５Ｍ）をコードする核酸配列である。

【０６４５】

配列番号３１５は、例示的なテザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ダセツズマブ）の

アミノ酸配列である。
【０６４６】
配列番号３１６は、配列番号３１５のテザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ダセツズマブ）をコードする核酸配列である。
【０６４７】
配列番号３１７は、例示的なテザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ルカツツズマブ）のアミノ酸配列である。
【０６４８】
配列番号３１８は、配列番号３１７のテザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ルカツツズマブ）をコードする核酸配列である。
【０６４９】
配列番号３１９は、例示的なテザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（セリクレルマブ）のアミノ酸配列である。
【０６５０】
配列番号３２０は、配列番号３１９のテザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（セリクレルマブ）をコードする核酸配列である。
【０６５１】
配列番号３２１は、配列番号２７３のＣＤ４０Ｌをコードする核酸配列である。
【０６５２】
配列番号３２２は、例示的なテザリングされたＣＤ４０Ｌ／ＩＬ－１５のアミノ酸配列である。
【０６５３】
配列番号３２３は、配列番号３１１のテザリングされたＣＤ４０Ｌ／ＩＬ－１５をコードする核酸配列である。
【０６５４】
配列番号３２４は、例示的なテザリングされたＩＬ－２のアミノ酸配列である。
【０６５５】
配列番号３２５は、配列番号３１３のテザリングされたＩＬ－２をコードする核酸配列である。
【０６５６】
配列番号３２６は、例示的なテザリングされたＩＬ－１２のアミノ酸配列である。
【０６５７】
配列番号３２７は、配列番号３１５のテザリングされたＩＬ－１２をコードする核酸配列である。
【０６５８】
配列番号３２８は、例示的なテザリングされたＩＬ－１５のアミノ酸配列である。
【０６５９】
配列番号３２９は、配列番号３１７のテザリングされたＩＬ－１５をコードする核酸配列である。
【０６６０】
配列番号３３０は、ＧＦＰをコードする核酸配列である。
【０６６１】
配列番号３３１は、例示的なテザリングされたＩＬ－２１のアミノ酸配列である。
【発明を実施するための形態】
【０６６２】
Ｉ．導入
急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）によってエクスビボで培養されたＴＩＬを利用した養子細胞療法は、黒色腫などのがんを有する患者の宿主免疫抑制後の養子細胞療法に成功している。現在の注入受容パラメータは、ＴＩＬの組成（例えば、ＣＤ２８、ＣＤ８、またはＣＤ４陽性）の読み取り値、ならびにＲＥＰ産物の拡張の数値倍率及び生存率に依存して

いる。
【０６６３】
現在のＲＥＰプロトコルは、患者に注入されるＴＩＬの健康状態についてほとんど洞察を与えていない。Ｔ細胞は、ナイーブＴ細胞からエフェクターＴ細胞への成熟の過程で深刻な代謝シフトを受ける（Ｃｈａｎｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１６，１７，３６４（その全体が本明細書に明示的に組み込まれる）、特に嫌気性及び好気性代謝の考察及びマーカーについて参照）。例えば、ナイーブＴ細胞は、ミトコンドリア呼吸に依存してＡＴＰを産生するが、ＴＩＬなどの成熟した健康なエフェクターＴ細胞は、高度に解糖系であり、好気性解糖に依存して増殖、移動、活性化、及び抗腫瘍効果に必要な生体エネルギー基質を提供する。
【０６６４】
現在のＴＩＬの製造及び治療プロセスは、長さ、コスト、無菌性の懸念、及び本明細書に記載される他の要因によって制限されているため、抗ＰＤ１に対して不応性であるために患者を治療する可能性は厳しく制限されている。実行可能な治療選択肢がほとんどまたはまったく残っていない患者を治療する際の使用に適したＴＩＬ製造プロセス及びかかるプロセスに基づく療法を提供することが緊急に必要である。本発明は、抗ＰＤ－１治療に対して不応性である非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）患者の治療に用いることができるＴＩＬを生成する際に使用するための短縮された製造プロセスを提供することによって、この必要性を満たす。
【０６６５】
ＩＩ．定義
他に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味と同じである。本明細書で参照されるすべての特許及び刊行物は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。
【０６６６】
本明細書で使用される「同時投与」、「同時投与すること」、「組み合わせて投与される」、「組み合わせて投与すること」、「同時（ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓ）」、及び「同時（ｃｏｎｃｕｒｒｅｎｔ）」という用語は、両方の医薬品有効成分及び／またはそれらの代謝物が、対象において同時に存在するように、対象へ２つ以上の医薬品有効成分（本発明の好ましい実施形態では、例えば、複数のＴＩＬ）投与することを包含する。同時投与には、別々の組成物での同時投与、別々の組成物での異なる時間での投与、または２つ以上の医薬品有効成分が存在する組成物での投与が含まれる。別々の組成物での同時投与及び両方の薬剤が存在する組成物での投与が好ましい。
【０６６７】
「インビボ」という用語は、対象の体内で起こる事象を指す。
【０６６８】
「インビトロ」という用語は、対象の体外で起こる事象を指す。インビトロアッセイには、生きている細胞または死んでいる細胞が用いられる細胞ベースのアッセイが包含され、無傷の細胞が用いられない無細胞アッセイも含み得る。
【０６６９】
「エクスビボ」という用語は、対象の体から除去された細胞、組織、及び／または器官に対する治療または処置の実施を伴う事象を指す。適切には、細胞、組織、及び／または器官は、外科手術または治療の方法で対象の体に戻され得る。
【０６７０】
「急速拡張」という用語は、１週間の期間にわたって少なくとも約３倍（または４、５、６、７、８、もしくは９倍）、より好ましくは１週間の期間にわたって少なくとも約１０倍（または２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、もしくは９０倍）、あるいは最も好ましくは１週間の期間にわたって少なくとも約１００倍の抗原特異的ＴＩＬの数の増加を意味する。本明細書では、いくつかの急速拡張プロトコルが説明されている。
【０６７１】

本明細書における「腫瘍浸潤リンパ球」または「ＴＩＬ」とは、対象の血流を離れて腫瘍に移動した白血球として最初に取得された細胞の集団を意味する。ＴＩＬには、ＣＤ８＋細胞傷害性Ｔ細胞（リンパ球）、Ｔｈ１及びＴｈ１７　ＣＤ４＋Ｔ細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、ならびにＭ１マクロファージが含まれるが、これらに限定されない。ＴＩＬには、一次ＴＩＬ及び二次ＴＩＬの両方が含まれる。「一次ＴＩＬ」は、本明細書に概説されるように患者組織試料から得られるもの（「新たに採取された」と称されることもある）であり、「二次ＴＩＬ」は、本明細書で考察される拡張または増殖された任意のＴＩＬ細胞集団であり、バルクＴＩＬ及び拡張ＴＩＬ（「ＲＥＰ　ＴＩＬ」または「ｐｏｓｔ－ＲＥＰ　ＴＩＬ」）が含まれるが、これらに限定されない。ＴＩＬ細胞集団には、遺伝子修飾ＴＩＬが含まれ得る。

【０６７２】

本明細書における「細胞の集団」（ＴＩＬを含む）とは、共通の形質を共有するいくつかの細胞を意味する。一般に、集団は、概して１×１０^{6}～１×１０^{10}の数の範囲であり、異なるＴＩＬ集団は、異なる数を含む。例えば、ＩＬ－２の存在下での一次ＴＩＬの初期成長は、およそ１×１０^{8}細胞のバルクＴＩＬの集団をもたらす。ＲＥＰ拡張は、一般に、注入用の１．５×１０^{9}～１．５×１０^{10}細胞の集団を提供するために行われる。

【０６７３】

本明細書における「凍結保存されたＴＩＬ」とは、一次、バルク、または拡張（ＲＥＰ　ＴＩＬ）のいずれかのＴＩＬが、約－１５０℃～－６０℃の範囲で処理及び保管されることを意味する。凍結保存のための一般的な方法は、実施例を含む本明細書の他の場所にも記載されている。明確にするために、「凍結保存されたＴＩＬ」は、一次ＴＩＬのソースとして使用される可能性のある凍結組織試料と区別することができる。

【０６７４】

本明細書における「解凍された凍結保存ＴＩＬ」とは、以前に凍結保存され、その後、細胞培養温度またはＴＩＬが患者に投与され得る温度を含むがこれらに限定されない、室温以上に戻るように処理されたＴＩＬの集団を意味する。

【０６７５】

ＴＩＬは、一般に、細胞表面マーカーを使用して生化学的に定義されるか、または腫瘍に浸潤して治療を達成するそれらの能力によって機能的に定義されるかのいずれかであり得る。ＴＩＬは、一般に、ＣＤ４、ＣＤ８、ＴＣＲαβ、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ５６、ＣＣＲ７、ＣＤ４５Ｒａ、ＣＤ９５、ＰＤ－１、及びＣＤ２５のうちの１つ以上のバイオマーカーの発現によって分類され得る。さらに及び代替的に、ＴＩＬは、患者への再導入時に固形腫瘍に浸潤する能力により機能的に定義され得る。

【０６７６】

「凍結保存培地（ｃｒｙｏｐｒｅｓｅｒｖａｔｉｏｎ　ｍｅｄｉａ）」または「凍結保存培地（ｃｒｙｏｐｒｅｓｅｒｖａｔｉｏｎ　ｍｅｄｉｕｍ）」という用語は、細胞の凍結保存に使用できる任意の培地を指す。かかる培地は、７％～１０％のＤＭＳＯを含む培地を含むことができる。例示的な培地には、ＣｒｙｏＳｔｏｒ　ＣＳ１０、Ｈｙｐｅｒｔｈｅｒｍａｓｏｌ、及びそれらの組み合わせが含まれる。「ＣＳ１０」という用語は、Ｓｔｅｍｃｅｌｌ　ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓまたはＢｉｏｌｉｆｅ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓから入手した凍結保存培地を指す。ＣＳ１０培地は、商品名「ＣｒｙｏＳｔｏｒ（登録商標）ＣＳ１０」と称され得る。ＣＳ１０培地は、ＤＭＳＯを含む無血清の動物成分を含まない培地である。

【０６７７】

「セントラルメモリーＴ細胞」という用語は、ヒトではＣＤ４５Ｒ０＋であり、ＣＣＲ７（ＣＣＲ７^{高}）及びＣＤ６２Ｌ（ＣＤ６２^{高}）を構成的に発現するＴ細胞のサブセットを指す。セントラルメモリーＴ細胞の表面表現型には、ＴＣＲ、ＣＤ３、ＣＤ１２７（ＩＬ－７Ｒ）、及びＩＬ－１５Ｒも含まれる。セントラルメモリーＴ細胞の転写因子には、ＢＣＬ－６、ＢＣＬ－６Ｂ、ＭＢＤ２、及びＢＭＩ１が含まれる。セントラルメモリーＴ

細胞は、ＴＣＲトリガー後、エフェクター分子としてＩＬ－２及びＣＤ４０Ｌを主に分泌する。セントラルメモリーＴ細胞は、血液中のＣＤ４コンパートメントで優勢であり、ヒトではリンパ節及び扁桃腺において比例して濃縮される。

【０６７８】

「エフェクターメモリーＴ細胞」という用語は、セントラルメモリーＴ細胞と同様にＣＤ４５Ｒ０＋であるが、ＣＣＲ７の構成的発現を失い（ＣＣＲ７^{低}）、ＣＤ６２Ｌ発現が不均一であるかまたは低い（ＣＤ６２Ｌ^{低}）、ヒトまたは哺乳動物Ｔ細胞のサブセットを指す。セントラルメモリーＴ細胞の表面表現型には、ＴＣＲ、ＣＤ３、ＣＤ１２７（ＩＬ－７Ｒ）、及びＩＬ－１５Ｒも含まれる。セントラルメモリーＴ細胞の転写因子には、ＢＬＩＭＰ１が含まれる。エフェクターメモリーＴ細胞は、インターフェロンガンマ、ＩＬ－４、及びＩＬ－５を含む、抗原刺激後に高レベルの炎症性サイトカインを急速に分泌する。エフェクターメモリーＴ細胞は、血液中のＣＤ８コンパートメントで優勢であり、ヒトでは肺、肝臓、及び腸において比例して濃縮される。ＣＤ８＋エフェクターメモリーＴ細胞は、大量のパーフォリンを担持する。

【０６７９】

「閉鎖系」という用語は、外部環境に対して閉鎖されている系を指す。細胞培養法に適した任意の閉鎖系を、本発明の方法で用いることができる。閉鎖系には、例えば、密閉Ｇ容器が含まれるが、これに限定されない。腫瘍セグメントが閉鎖系に付加されると、ＴＩＬを患者に投与する準備ができるまで、系は外部環境に開かれない。

【０６８０】

腫瘍を破壊するためのプロセスを説明するために本明細書で使用される「断片化すること」、「断片」、及び「断片化された」という用語は、腫瘍組織を破砕、スライス、分割、及び細切するなどの機械的断片化法、ならびに腫瘍組織の物理的構造を破壊するための任意の他の方法を含む。

【０６８１】

「末梢血単核細胞」及び「ＰＢＭＣ」という用語は、リンパ球（Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞）及び単球を含む、丸い核を有する末梢血細胞を指す。抗原提示細胞として使用される場合（ＰＢＭＣは抗原提示細胞の一種である）、末梢血単核細胞は、好ましくは、照射された同種異系末梢血単核細胞である。

【０６８２】

「末梢血リンパ球」及び「ＰＢＬ」という用語は、末梢血から拡張したＴ細胞を指す。いくつかの実施形態では、ＰＢＬは、ドナーからの全血またはアフェレーシス産物から分離される。いくつかの実施形態では、ＰＢＬは、ＣＤ３＋ＣＤ４５＋のＴ細胞表現型などのＴ細胞表現型の正または負の選択によって、ドナー由来の全血またはアフェレーシス産物から分離される。

【０６８３】

「抗ＣＤ３抗体」という用語は、成熟Ｔ細胞のＴ細胞抗原受容体におけるＣＤ３受容体に対するヒト、ヒト化、キメラ、またはマウス抗体を含む、抗体またはそのバリアント、例えば、モノクローナル抗体を指す。抗ＣＤ３抗体には、ムロモナブとしても知られるＯＫＴ－３が含まれる。抗ＣＤ３抗体には、Ｔ３及びＣＤ３εとしても知られるＵＨＣＴ１クローンも含まれる。他の抗ＣＤ３抗体には、例えば、オテリキシズマブ、テプリズマブ、及びビシリズマブが含まれる。

【０６８４】

「ＯＫＴ－３」（本明細書では「ＯＫＴ３」とも称される）という用語は、成熟Ｔ細胞のＴ細胞抗原受容体におけるＣＤ３受容体に対するヒト、ヒト化、キメラ、またはマウス抗体を含む、モノクローナル抗体またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを指し、市販の形態、例えば、ＯＫＴ－３（３０ｎｇ／ｍＬ、ＭＡＣＳ ＧＭＰ ＣＤ３ ｐｕｒｅ、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）及びムロモナブ、またはそれらのバリアント、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、またはバイオシミラーを含む。ムロモナブの重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を表１に示す

（配列番号１及び配列番号２）。ＯＫＴ－３を産生することができるハイブリドーマは、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎに寄託され、ＡＴＣＣ受託番号ＣＲＬ８００１が割り当てられている。ＯＫＴ－３を産生することができるハイブリドーマは、Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ａｕｔｈｅｎｔｉｃａｔｅｄ　Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅｓ（ＥＣＡＣＣ）にも寄託され、カタログ番号８６０２２７０６が割り当てられている。

【０６８５】

【表１】

表１．ムロモナブのアミノ酸配列（例示的なＯＫＴ－３抗体）。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号１ ムロモナブ重鎖	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY	60
	NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA	120
	KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL	180
	YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	240
	PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN	300
	STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE	360
	LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW	420
	QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	450
配列番号２ ムロモナブ軽鎖	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH	60
	FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS	120
	SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL	180
	TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC	213

【０６８６】

「ＩＬ－２」（本明細書では「ＩＬ２」とも称される）という用語は、インターロイキン－２として知られるＴ細胞成長因子を指し、ヒト及び哺乳動物形態、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、バイオシミラー、及びバリアントを含む、ＩＬ－２のすべての形態を含む。ＩＬ－２は、例えば、Ｎｅｌｓｏｎ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００４，１７２，３９８３－８８及びＭａｌｅｋ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００８，２６，４５３－７９に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－２のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号３）。例えば、ＩＬ－２という用語は、アルデスロイキン（ＰＲＯＬＥＵＫＩＮ、単回使用バイアル当たり２２００万ＩＵで複数の供給業者から市販されている）などのヒト組換えＩＬ－２形態、ならびにＣｅｌｌＧｅｎｉｘ，Ｉｎｃ．，Ｐｏｒｔｓｍｏｕｔｈ，ＮＨ，ＵＳＡ（ＣＥＬＬＧＲＯ　ＧＭＰ）またはＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ　ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ　Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ　Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡによって市販されている組換えＩＬ－２形態（カタログ番号ＣＹＴ－２０９－ｂ）及び他のベンダーからの他の商用同等物を包含する。アルデスロイキン（デス－アラニル－１、セリン－１２５ヒトＩＬ－２）は、およそ１５ｋＤａの分子量を有する非グリコシル化ヒト組換えＩＬ－２形態である。本発明での使用に好適なアルデスロイキンのアミノ酸配列を表２に示す（配列番号４）。ＩＬ－２という用語はまた、ペグ化ＩＬ２プロドラッグベンペガルデスロイキン（ＮＫＴＲ－２１４、平均６個のリジン残基が［（２，７－ビス｛［メチルポリ（オキシエチレン）］カルバモイル｝－９Ｈ－フルオレン－９－イル）メトキシ］カルボニル）で置換されたＮ^{6}である、配列番号４のようなペグ化ヒト組換えＩＬ－２）を含む、本明細書に記載のＩＬ－２のペグ化形態も包含し、Ｎｅｋｔａｒ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（Ｓｏｕｔｈ　Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）から入手可能であるか、または国際特許出願公開第ＷＯ２０１８／１３２４９６　Ａ１号の実施例１９に記載の方法、または米国特許出願公開第２０１９／０２７５１３３　Ａ１号の実施例１に記載の方法など、当該技術分野で知られている方法によって調製することができ、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適なベンペガルデスロイキン（ＮＫＴＲ－２１４）及び他のペグ化ＩＬ－２分子は、米国特許出願公開第２０１４／０３２８７９１

Ａ１号及び国際特許出願公開第ＷＯ２０１２／０６５０８６　Ａ１号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適な複合化ＩＬ－２の代替形態は、米国特許第４，７６６，１０６号、同第５，２０６，３４４号、同第５，０８９，２６１号、及び同第４，９０２，５０２号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適なＩＬ－２の製剤は、米国特許第６，７０６，２８９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０６８７】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、Ｓｙｎｔｈｏｒｘ，Ｉｎｃ．から入手可能なＴＨＯＲ－７０７である。本発明での使用に好適なＴＨＯＲ－７０７及びＩＬ－２の追加の代替形態の調製ならびに特性は、米国特許出願公開第２０２０／０１８１２２０　Ａ１号及び同第２０２０／０３３０６０１　Ａ１号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、単離及び精製ＩＬ－２ポリペプチドと、Ｋ３５、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｋ４３、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｋ６４、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択されるアミノ酸位置で単離及び精製ＩＬ－２ポリペプチドに結合する複合部分と、を含む、インターロイキン２（ＩＬ－２）複合体であり、アミノ酸残基の番号付けは配列番号５に対応する。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｋ６４、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｔ３７、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｒ３８及びＫ６４から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｅ６１、Ｅ６２、及びＥ６８から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｅ６２である。いくつかの実施形態では、Ｋ３５、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｋ４３、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｋ６４、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択されるアミノ酸残基は、リジン、システイン、またはヒスチジンにさらに変異する。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基は、システインに変異する。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基は、リジンに変異する。いくつかの実施形態では、Ｋ３５、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｋ４３、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｋ６４、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択されるアミノ酸残基は、非天然アミノ酸にさらに変異する。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）、Ｎ６－プロパルギルエトキシ－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、ＢＣＮ－Ｌ－リジン、ノルボルネンリジン、ＴＣＯ－リジン、メチルテトラジンリジン、アリルオキシカルボニルリジン、２－アミノ－８－オキソノナン酸、２－アミノ－８－オキソオクタン酸、ｐ－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジドメチル－Ｌ－フェニルアラニン（ｐＡＭＦ）、ｐ－ヨード－Ｌ－フェニルアラニン、ｍ－アセチルフェニルアラニン、２－アミノ－８－オキソノナン酸、ｐ－プロパルギルオキシフェニルアラニン、ｐ－プロパルギル－フェニルアラニン、３－メチル－フェニルアラニン、Ｌ－ドーパ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジド－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アシル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ベンゾイル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ブロモフェニルアラニン、ｐ－アミノ－Ｌ－フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、Ｏ－アリルチロシン、Ｏ－メチル－Ｌ－チロシン、Ｏ－４－アリル－Ｌ－チロシン、４－プロピル－Ｌ－チロシン、ホスホノチロシン、トリ－Ｏ－アセチル－ＧｌｃＮＡｃｐ－セリン、Ｌ－ホスホセリン、ホスホノセリン、Ｌ－３－（２－ナフチル）アラニン、２－アミノ－３－（（２－（（３－（ベンジルオキシ）－３－オキソプロピル）アミノ）エチル）セラニル）プロパン酸、２－アミノ－３－（フェニルセラニル）プロパン酸、またはセレノシステインを含む。いくつかの実施形態で

は、ＩＬ－２複合体は、野生型ＩＬ－２ポリペプチドと比較して、ＩＬ－２受容体α（ＩＬ－２Ｒα）サブユニットに対する減少した親和性を有する。いくつかの実施形態では、減少した親和性は、野生型ＩＬ－２ポリペプチドと比較して、ＩＬ－２Ｒαに対する結合親和性の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、または９９％を超える減少である。いくつかの実施形態では、減少した親和性は、野生型ＩＬ－２ポリペプチドと比較して、約１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、３０倍、５０倍、１００倍、２００倍、３００倍、５００倍、１０００倍以上である。いくつかの実施形態では、複合部分は、ＩＬ－２とＩＬ－２Ｒαとの結合を損なうかまたは遮断する。いくつかの実施形態では、複合部分は、水溶性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、水溶性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリ（プロピレングリコール）（ＰＰＧ）、エチレングリコール及びプロピレングリコールのコポリマー、ポリ（オキシエチル化ポリオール）、ポリ（オレフィンアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリルアミド）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリレート）、ポリ（サッカライド）、ポリ（α－ヒドロキシ酸）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン（ＰＯＺ）、ポリ（Ｎ－アクリロイルモルホリン）、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ＰＥＧを含む。いくつかの実施形態では、ＰＥＧは、直鎖状ＰＥＧまたは分岐状ＰＥＧである。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ポリサッカライドを含む。いくつかの実施形態では、ポリサッカライドは、デキストラン、ポリシアル酸（ＰＳＡ）、ヒアルロン酸（ＨＡ）、アミロース、ヘパリン、ヘパランサルフェート（ＨＳ）、デキストリン、またはヒドロキシエチルデンプン（ＨＥＳ）を含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、グリカンを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ポリアミンを含む。いくつかの実施形態では、複合部分は、タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、アルブミン、トランスフェリン、またはトランスサイレチンを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、Ｆｃ部分を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、ＩｇＧのＦｃ部分を含む。いくつかの実施形態では、複合部分は、ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、ＸＴＥＮペプチド、グリシンリッチホモアミノ酸ポリマー（ＨＡＰ）、ＰＡＳポリペプチド、エラスチン様ポリペプチド（ＥＬＰ）、ＣＴＰペプチド、またはゼラチン様タンパク質（ＧＬＫ）ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、単離及び精製ＩＬ－２ポリペプチドは、グルタミル化によって修飾される。いくつかの実施形態では、複合部分は、単離及び精製ＩＬ－２ポリペプチドと直接的に結合される。いくつかの実施形態では、複合部分は、リンカーを介して単離及び精製されたＩＬ－２ポリペプチドと間接的に結合される。いくつかの実施形態では、リンカーは、ホモ二官能性リンカーを含む。いくつかの実施形態では、ホモ二官能性リンカーは、ロマント試薬ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）ＤＳＰ、３’３’－ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（ＤＴＳＳＰ）、ジスクシンイミジルスベラート（ＤＳＳ）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベラート（ＢＳ）、ジスクシンイミジルタータラート（ＤＳＴ）、ジスルホスクシンイミジルタータラート（スルホＤＳＴ）、エチレングリコビス（スクシンイミジルスクシネート）（ＥＧＳ）、ジスクシンイミジルグルタラート（ＤＳＧ）、Ｎ，Ｎ’－ジスクシンイミジルカーボナート（ＤＳＣ）、ジメチルアジピミデート（ＤＭＡ）、ジメチルピメリミデート（ＤＭＰ）、ジメチルスベリミデート（ＤＭＳ）、ジメチル－３，３’－ジチオビスプロピオンイミデート（ＤＴＢＰ）、１，４－ジ－（３’－（２’－ピリジルジチオ）プロピオンアミド）ブタン（ＤＰＤＰＢ）、ビスマレイミドヘキサン（ＢＭＨ）、ハロゲン化アリール含有化合物（ＤＦＤＮＢ）、例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼンまたは１，３－ジフルオロ－４，６－ジニトロベン

ゼン、４，４’－ジフルオロ－３，３’－ジニトロフェニルスルホン（ＤＦＤＮＰＳ）、ビス－［β－（４－アジドサリチルアミド）エチル］ジスルフィド（ＢＡＳＥＤ）、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、１，４－ブタンジオールジグリシジルエーテル、アジピン酸ジヒドラジド、カルボヒドラジド、ｏ－トルイジン、３，３’－ジメチルベンジジン、ベンジジン、α，α’－ｐ－ジアミノジフェニル、ジヨード－ｐ－キシレンスルホン酸、Ｎ，Ｎ’－エチレン－ビス（ヨードアセトアミド）、またはＮ，Ｎ’－ヘキサメチレンビス（ヨードアセトアミド）を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、ヘテロ二官能性リンカーを含む。いくつかの実施形態では、ヘテロ二官能性リンカーは、Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ｓＰＤＰ）、長鎖Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＬＣ－ｓＰＤＰ）、水溶性長鎖Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（スルホ－ＬＣ－ｓＰＤＰ）、スクシンイミジルオキシカルボニル－α－メチル－α－（２－ピリジルジチオ）トルエン（ｓＭＰＴ）、スルホスクシンイミジル－６－［α－メチル－α－（２－ピリジルジチオ）トルアミド］ヘキサノエート（スルホ－ＬＣ－ｓＭＰＴ）、スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ｓＭＣＣ）、スルホスクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（スルホ－ｓＭＣＣ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル（スルホ－ＭＢ）、Ｎ－スクシンイミジル（４－ヨードアセチル）アミノベンゾエート（ｓＩＡＢ）、スルホスクシンイミジル（４－ヨードアセチル）アミノベンゾエート（スルホ－ｓＩＡＢ）、スクシンイミジル－４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート（ｓＭＰＢ）、スルホスクシンイミジル－４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート（スルホ－ｓＭＰＢ）、Ｎ－（γ－マレイミドブチリルオキシ）スクシンイミドエステル（ＧＭＢ）、Ｎ－（γ－マレイミドブチリルオキシ）スルホスクシンイミドエステル（スルホ－ＧＭＢ）、スクシンイミジル６－（（ヨードアセチル）アミノ）ヘキサノエート（ｓＩＡＸ）、スクシンイミジル６－［６－（（（ヨードアセチル）アミノ）ヘキサノイル）アミノ］ヘキサノエート（ｓｌＡＸＸ）、スクシンイミジル４－（（（ヨードアセチル）アミノ）メチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ｓＩＡＣ）、スクシンイミジル６－（（（（（４－ヨードアセチル）アミノ）メチル）シクロヘキサン－１－カルボニル）アミノ）ヘキサノエート（ｓＩＡＣＸ）、ｐ－ニトロフェニルヨードアセテート（ＮＰＩＡ）、カルボニル反応性及びスルフヒドリル反応性架橋剤、例えば、４－（４－Ｎ－マレイミドフェニル）酪酸ヒドラジド（ＭＰＢＨ）、４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシル－ヒドラジド－８（Ｍ２Ｃ２Ｈ）、３－（２－ピリジルジチオ）プロピオニルヒドラジド（ＰＤＰＨ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジル－４－アジドサリチル酸（ＮＨｓ－ＡｓＡ）、Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミジル－４－アジドサリチル酸（スルホ－ＮＨｓ－ＡｓＡ）、スルホスクシンイミジル－（４－アジドサリチルアミド）ヘキサノエート（スルホ－ＮＨｓ－ＬＣ－ＡｓＡ）、スルホスクシンイミジル－２－（ｐ－アジドサリチルアミド）エチル－１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡｓＤ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジル－４－アジドベンゾエート（ＨｓＡＢ）、Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミジル－４－アジドベンゾエート（スルホ－ＨｓＡＢ）、Ｎ－スクシンイミジル－６－（４’－アジド－２’－ニトロフェニルアミノ）ヘキサノエート（ｓＡＮＰＡＨ）、スルホスクシンイミジル－６－（４’－アジド－２’－ニトロフェニルアミノ）ヘキサノエート（スルホ－ｓＡＮＰＡＨ）、Ｎ－５－アジド－２－ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド（ＡＮＢ－ＮＯ）、スルホスクシンイミジル－２－（ｍ－アジド－ｏ－ニトロベンズアミド）－エチル－１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡＮＤ）、Ｎ－スクシンイミジル－４（４－アジドフェニル）１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡＤＰ）、Ｎ－スルホスクシンイミジル（４－アジドフェニル）－１，３’－ジチオプロピオネート（スルホ－ｓＡＤＰ）、スルホスクシンイミジル４－（ｐ－アジドフェニル）ブチレート（スルホ－ｓＡＰＢ）、スルホスクシンイミジル２－（７－アジド－４－メチルクマリン－３－アセトアミド）エチル－１，３’－ジチオプロピオネート（

ｓＡＥＤ）、スルホスクシンイミジル７－アジド－４－メチルクマリン－３－アセテート（スルホ－ｓＡＭＣＡ）、ｐ－ニトロフェニルジアゾピルベート（ｐＮＰＤＰ）、ｐ－ニトロフェニル－２－ジアゾ－３，３，３－トリフルオロプロピオネート（ＰＮＰ－ＤＴＰ）、１－（ρ－アジドサリチルアミド）－４－（ヨードアセトアミド）ブタン（ＡｓＩＢ）、Ｎ－［４－（ρ－アジドサリチルアミド）ブチル］－３’－（２’－ピリジルジチオ）プロピオンアミド（ＡＰＤＰ）、ベンゾフェノン－４－ヨードアセトアミド、ｐ－アジドベンゾイルヒドラジド（ＡＢＨ）、４－（ρ－アジドサリチルアミド）ブチルアミン（ＡｓＢＡ）、またはｐ－アジドフェニルグリオキサール（ＡＰＧ）を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、任意選択でジペプチドリンカーを含む、切断可能なリンカーを含む。いくつかの実施形態では、ジペプチドリンカーは、Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｖａｌ－Ａｌａ、またはＶａｌ－Ｌｙｓを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、切断不可能なリンカーを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、任意選択で、マレイミドカプロイル（ｍｃ）、スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ｓＭＣＣ）、またはスルホスクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（スルホ－ｓＭＣＣ）を含むマレイミド基を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、スペーサーをさらに含む。いくつかの実施形態では、スペーサーは、ｐ－アミノベンジルアルコール（ＰＡＢ）、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢＣ）、その誘導体、または類似体を含む。いくつかの実施形態では、複合部分は、ＩＬ－２複合体の血清半減期を延長することができる。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、ＩＬ－２複合体の血清半減期を延長することができる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、本明細書に記載のＩＬ－２形態のうちのいずれかの断片である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、米国特許出願公開第２０２０／０１８１２０　Ａ１号及び米国特許出願公開第２０２０／０３３０６０１　Ａ１号に開示されているようにペグ化されている。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む複合部分に共有結合したＮ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含むＩＬ－２ポリペプチドを含む、ＩＬ－２複合体であり、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５と少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＡｚＫは、配列番号５内のアミノ酸位置に関して、Ｋ３５位、Ｆ４２位、Ｆ４４位、Ｋ４３位、Ｅ６２位、Ｐ６５位、Ｒ３８位、Ｔ４１位、Ｅ６８位、Ｙ４５位、Ｖ６９位、またはＬ７２位でアミノ酸を置換する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５に対して１残基のＮ末端欠失を含む。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ＩＬ－２Ｒアルファ鎖会合を欠いているが、中間親和性ＩＬ－２Ｒベーターガンマシグナル伝達複合体との正常な結合を保持している。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む複合部分に共有結合したＮ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含むＩＬ－２ポリペプチドを含む、ＩＬ－２複合体であり、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５と少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＡｚＫは、配列番号５内のアミノ酸位置に関して、Ｋ３５位、Ｆ４２位、Ｆ４４位、Ｋ４３位、Ｅ６２位、Ｐ６５位、Ｒ３８位、Ｔ４１位、Ｅ６８位、Ｙ４５位、Ｖ６９位、またはＬ７２位でアミノ酸を置換する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む複合部分に共有結合したＮ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含むＩＬ－２ポリペプチドを含む、ＩＬ－２複合体であり、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５と少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＡｚＫは、配列番号５内のアミノ酸位置に関して、Ｋ３５位、Ｆ４２位、Ｆ４４位、Ｋ４３位、Ｅ６２位、Ｐ６５位、Ｒ３８位、Ｔ４１位、Ｅ６８位、Ｙ４５位、Ｖ６９位、またはＬ７２位でアミノ酸を置換する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む複合部分に共有結合したＮ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含むＩＬ－２ポリペプチドを含む、ＩＬ－２複合体であり、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５と少なくとも

９８％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＡｚＫは、配列番号５内のアミノ酸位置に関して、Ｋ３５位、Ｆ４２位、Ｋ４４位、Ｋ４３位、Ｅ６２位、Ｐ６５位、Ｒ３８位、Ｔ４１位、Ｅ６８位、Ｙ４５位、Ｖ６９位、またはＬ７２位でアミノ酸を置換する。

【０６８８】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ＡＬＫＳ－４２３０（配列番号６）としても知られるネムバルキンアルファであり、Ａｌｋｅｒｍｅｓ，Ｉｎｃ．から入手可能である。ネムバルキンアルファは、ペプチジルリンカー（^{60}ＧＧ^{61}）を介してヒトインターロイキン２断片（６２－１３２）と融合し、ペプチジルリンカー（^{133}ＧＳＧＧＧＳ^{138}）を介してヒトインターロイキン２受容体α鎖断片（１３９－３０３）と融合し、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞で産生され、グリコシル化されている、ヒトインターロイキン２断片（１－５９）、バリアント（Ｃｙｓ^{125}＞Ｓｅｒ^{51}）；Ｇ^{2}ペプチドリンカー（６０－６１）を介してヒトインターロイキン２（ＩＬ－２）（４－７４）－ペプチド（６２－１３２）と融合し、ＧＳＧ$_{3}$Ｓペプチドリンカー（１３３－１３８）を介してヒトインターロイキン２受容体α鎖（ＩＬ２Ｒサブユニットアルファ、ＩＬ２Ｒα、ＩＬ２ＲＡ）（１－１６５）－ペプチド（１３９－３０３）と融合し、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞で産生され、アルファグリコシル化されている、ヒトインターロイキン２（ＩＬ－２）（７５－１３３）－ペプチド［Ｃｙｓ$_{125}$（５１）＞Ｓｅｒ］－変異体（１－５９）としても知られている。ネムバロイキンアルファのアミノ酸配列は、配列番号６に示されている。いくつかの実施形態では、ネムバロイキンアルファは、以下の翻訳後修飾を示す：以下の位置でのジスルフィド架橋：３１－１１６、１４１－２８５、１８４－２４２、２６９－３０１、１６６－１９７、または１６６－１９９、１６８－１９９または１６８－１９７（配列番号６の番号付けを使用する）、及び以下の位置でのグリコシル化部位：配列番号６の番号付けを使用する、Ｎ１８７、Ｎ２０６、Ｔ２１２。ネムバルイキンアルファの調製及び特性、ならびに本発明での使用に好適な追加の代替形態のＩＬ－２は、米国特許出願公開第２０２１／００３８６８４　Ａ１号及び米国特許第１０，１８３，９７９号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、配列番号６と少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または少なくとも９０％の配列同一性を有するタンパク質である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、配列番号６で示されるアミノ酸配列またはその保存的アミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、配列番号７のアミノ酸２４～４５２、またはそのバリアント、断片、もしくは誘導体を含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、配列番号７のアミノ酸２４～４５２と少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、もしくは少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列、またはそのバリアント、断片、もしくは誘導体を含む融合タンパク質である。本発明での使用に好適な他のＩＬ－２形態は、米国特許第１０，１８３，９７９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。任意選択で、いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ムチンドメインポリペプチドリンカーによって第２の融合パートナーと連結された第１の融合パートナーを含む融合タンパク質であり、第１の融合パートナーは、ＩＬ－１Ｒα、またはＩＬ－１Ｒαと少なくとも９８％のアミノ酸配列同一性を有し、ＩＬ－Ｒαの受容体アンタゴニスト活性を有するタンパク質であり、第２の融合パートナーは、Ｆｃ領域を含む免疫グロブリンの全部または一部を含み、ムチンドメインポリペプチドリンカーは、配列番号８、または配列番号８と少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、融合タンパク質の半減期は、ムチンドメインポリペプチドリンカーの非存在下での第２の融合パートナーとの第１の融合パートナーの融合と比較して改善される。

【０６８９】

【表２－１】

表2．インターロイキンのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号3 組換えヒトIL-2(rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN RWITFCQSII STLT	60 120 134
配列番号4 アルデスロイキン	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFSQSIIST LT	60 120 132
配列番号5 IL-2形態	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT	60 120 133
配列番号6 ネムパロイキンアルファ	SKNFHLRPRD LISNINVIVL ELKGSETTFM CEYADETATI VEFLNRWITF SQSIISTLTG GSSSTKKTQL QLEHLLLDLQ MILNGINNYK NPKLTRMLTF KFYMPKKATE LKHLQCLEEE LKPLEEVLNL AQGSGGGSEL CDDDPPEIPH ATFKAMAYKE GTMLNCECKR GFRRIKSGSL YMLCTGNSSH SSWDNQCQCT SSATRNTTKQ VTPQPEEQKE RKTTEMQSPM QPVDQASLPG HCREPPPWEN EATERIYHFV VGQMVYYQCV QGYRALHRGP AESVCKMTHG KTRWTQPQLI CTG	60 120 180 240 300 303
配列番号7 IL-2形態	MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SARRPSGRKS SKMQAFRIWD VNQKTFYLRN NQLVAGYLQG PNVNLEEKID VVPIEPHALF LGIHGGKMCL SCVKSGDETR LQLEAVNITD LSENRKQDKR FAFIRSDSGP TTSFESAACP GWFLCTAMEA DQPVSLTNMP DEGVMVTKFY FQEDESGSGG ASSESSASSD GPHPVITESR ASSESSASSD GPHPVITESR EPKSSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK	60 120 180 240 300 360 420 452
配列番号8 ムチンドメインポリペプチド	SESSASSDGP HPVITP	16
配列番号9 組換えヒトIL-4(rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI MREKYSKCSS	60 120 130
配列番号10 組換えヒトIL-7(rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH	60 120 153

【表２－２】

配列番号11 組換えヒトIL-15(rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS	60 115
配列番号12 組換えヒトIL-21(rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ HLSSRTHGSE DS	60 120 132

【０６９０】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（V_H）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（V_L）と、V_HまたはV_LのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含む抗体サイトカイン移植タンパク質を含み、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（V_H）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（V_L）と、V_HまたはV_LのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含み、ＩＬ－２分子は、ムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、米国特許出願公開第２０２０／０

２７０３３４　Ａ１号に記載されている抗体の投与を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）と、V_HまたはV_LのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含み、ＩＬ－２分子は、ムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させ、抗体は、配列番号３９を含むＩｇＧクラス軽鎖及び配列番号３８を含むＩｇＧクラス重鎖、配列番号３７を含むＩｇＧクラスの軽鎖及び配列番号２９を含むＩｇＧクラスの重鎖、配列番号３９を含むＩｇＧクラス軽鎖及び配列番号２９を含むＩｇＧクラス重鎖、配列番号３７を含むＩｇＧクラス軽鎖及び配列番号３８を含むＩｇＧクラス重鎖からなる群から選択されるＩｇＧクラスの重鎖及びＩｇＧクラスの軽鎖をさらに含む。

【０６９１】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、V_HのＨＣＤＲ１に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、V_HのＨＣＤＲ２に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、V_HのＨＣＤＲ３に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、V_LのＬＣＤＲ１に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、V_LのＬＣＤＲ２に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、ＶＬのＬＣＤＲ３に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。

【０６９２】

ＩＬ－２分子の挿入は、ＣＤＲのＮ末端領域もしくはその近く、ＣＤＲの中間領域、またはＣＤＲのＣ末端領域もしくはその近くであり得る。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、ＣＤＲに組み込まれたＩＬ－２分子を含み、ＩＬ２配列はＣＤＲ配列をフレームシフトしない。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、ＣＤＲに組み込まれたＩＬ－２分子を含み、ＩＬ－２配列はＣＤＲ配列のすべてまたは一部を置き換える。ＩＬ－２分子による置き換えは、ＣＤＲのＮ末端領域、ＣＤＲの中間領域、またはＣＤＲのＣ末端領域もしくはその近くであり得る。ＩＬ－２分子による置き換えは、ＣＤＲ配列のわずか１個もしくは２個のアミノ酸、またはＣＤＲ配列全体であり得る。

【０６９３】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子は、ペプチドリンカーなしで、ＣＤＲ配列とＩＬ－２配列との間に追加のアミノ酸なしで、ＣＤＲに直接的に移植される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子は、ペプチドリンカーを用いて、ＣＤＲ配列とＩＬ－２配列との間に１つ以上の追加のアミノ酸を伴って、ＣＤＲに間接的に移植される。

【０６９４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＩＬ－２分子は、ＩＬ－２ムテインである。いくつかの事例では、ＩＬ－２ムテインは、Ｒ６７Ａ置換を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ムテインは、配列番号１４または配列番号１５のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ムテインは、米国特許出願公開第２０２０／０２７０３３４　Ａ１号の表１のアミノ酸配列を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０６９５】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号１６、配列番号１９、配列番号２２、及び配列番号２５からなる群から選択されるＨＣＤＲ１を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号７、配列番号１０、配列番号１３及び配列番号１６からなる群から選択されるＨＣＤＲ１を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号１７、配列番号２０、配列番号２３、及び配列番号２６からなる群から選択されるＨＣＤＲ２からなる群から選

択されるＨＣＤＲ１を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号１８、配列番号２１、配列番号２４、及び配列番号２７からなる群から選択されるＨＣＤＲ３を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号２８のアミノ酸配列を含むV_H領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号３６のアミノ酸配列を含むV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号３７のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号２８のアミノ酸配列を含むV_H領域及び配列番号３６のアミノ酸配列を含むV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号３７のアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号３９のアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号３８のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号３７のアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号３８のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号３９のアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、米国特許出願公開第２０２０／０２７０３３４　Ａ１号のＩｇＧ．ＩＬ２Ｆ７１Ａ．Ｈ１もしくはＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１、またはそのバリアント、誘導体、もしくは断片、またはその保存的アミノ酸置換体、またはそれと少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または少なくとも９８％の配列同一性を有するタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質の抗体成分は、免疫グロブリン配列、フレームワーク配列、またはパリビズマブのＣＤＲ配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質は、アルデスロイキンまたは同等の分子などであるがこれらに限定されない野生型ＩＬ－２分子よりも長い血清半減期を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質は、表３に記載される配列を有する。

【０６９６】

【表３－１】

表３：例示的なバリビズマブ抗体－ＩＬ－２移植タンパク質の配列

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 13 IL-2	MYRMQLLSCI ALSLALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML 60 TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE 120 TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT 153
配列番号 14 IL-2 ムテイン	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLT 133
配列番号 15 IL-2 ムテイン	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TAKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLT 133
配列番号 16 HCDR1_IL-2	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL 60 QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE 120 FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMSVG 145
配列番号 17 HCDR2	DIWWDDKKDY NPSLKS 16
配列番号 18 HCDR3	SMITNWYFDV 10
配列番号 19 HCDR1_IL-2 カバット	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLTSTSGMSV G 141
配列番号 20 HCDR2 カバット	DIWWDDKKDY NPSLKS 16
配列番号 21 HCDR3 カバット	SMITNWYFDV 10
配列番号 22 HCDR1_IL-2 クロチア	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL 60 QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE 120 FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GM 142
配列番号 23 HCDR2 クロチア	WWDDK 5
配列番号 24 HCDR3 クロチア	SM1TNWYFDV 10

【表３－２】

配列番号25 HCDR1_IL-2 IMGT	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL 60 QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE 120 FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMS 143
配列番号26 HCDR2 IMGT	IWWDDKK 7
配列番号27 HCDR3 IMGT	ARSMITNWYF DV 12
配列番号28 V_H	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY 60 KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV 120 IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL 180 EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWYF 240 DVWGAGTTVT VSS 253
配列番号29 重鎖	QMILNGINNY KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR 60 PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG 120 WIRQPPGKAL EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC 180 ARSMITNWYF DVWGAGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV 240 TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR 300 VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV AVSHEDPEVK 360 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALAAPIEK 420 TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT 480 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK 533
配列番号30 LCDR1 カバット	KAQLSVGYMH 10
配列番号31 LCDR2 カバット	DTSKLAS 7
配列番号32 LCDR3 カバット	FQGSGYPFT 9
配列番号33 LCDR1 クロチア	QLSVGY 6
配列番号34 LCDR2 クロチア	DTS 3

【表３－３】

配列番号35 LCDR3 クロチア	GSGYPF 6
配列番号36 V_L	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR 60 FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIK 106
配列番号37 軽鎖	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR 60 FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213
配列番号38 軽鎖	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY 60 KNPKLTRMLT AKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV 120 IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL 180 EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWYF 240 DVWGAGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT 300 SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH 360 TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV AVSHEDPEVK FNWYVDGVEV 420 HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALAAPIEK TISKAKGQPR 480 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF 540 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK 583
配列番号39 軽鎖	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR 60 FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213

【０６９７】
「ＩＬ－４」（本明細書では「ＩＬ４」とも称される）という用語は、インターロイキン４として知られるサイトカインを指し、これは、Ｔｈ２　Ｔ細胞、ならびに好酸球、好塩基球、及び肥満細胞によって産生される。ＩＬ－４は、ナイーブヘルパーＴ細胞（Ｔｈ０細胞）からＴｈ２　Ｔ細胞への分化を調節する。Ｓｔｅｉｎｋｅ　ａｎｄ　Ｂｏｒｉｓｈ，Ｒｅｓｐｉｒ．Ｒｅｓ．２００１，２，６６－７０。ＩＬ－４によって活性化されると、Ｔｈ２　Ｔ細胞は、その後、正のフィードバックループで追加のＩＬ－４を産生する。ＩＬ－４は、Ｂ細胞増殖及びクラスＩＩ　ＭＨＣ発現も刺激し、Ｂ細胞からのＩｇＥ及びＩｇＧ$_1$発現へのクラス切り替えを誘導する。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－４は、ＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ　ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ　Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ　Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡ（カタログ番号ＣＹＴ－２１１）及びＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ（ヒトＩＬ－１５組換えタンパク質、カタログ番号Ｇｉｂｃｏ　ＣＴＰ００４３）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－４のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号９）。

【０６９８】
「ＩＬ－７」（本明細書では「ＩＬ７」とも称される）という用語は、インターロイキン７として知られるグリコシル化組織由来のサイトカインを指し、これは、間質細胞及び上皮細胞、ならびに樹状細胞から得ることができる。Ｆｒｙ　ａｎｄ　Ｍａｃｋａｌｌ，Ｂｌｏｏｄ　２００２，９９，３８９２－９０４。ＩＬ－７は、Ｔ細胞の発達を刺激することができる。ＩＬ－７は、ＩＬ－７受容体アルファ及び共通ガンマ鎖受容体からなるヘテロ二量体であるＩＬ－７受容体に結合し、これは、胸腺内でのＴ細胞発生及び末梢内での生存に重要な一連のシグナルである。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－７は、ＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ　ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ　Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ　Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡ（カタログ番号ＣＹＴ－２５４）及びＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ（ヒトＩＬ－１５組換えタンパク質、カタログ番号Ｇｉｂｃｏ　ＰＨＣ００７１）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－７のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号１０）。

【０６９９】
「ＩＬ－１５」（本明細書では「ＩＬ１５」とも称される）という用語は、インターロイキン－１５として知られるＴ細胞成長因子を指し、ヒト及び哺乳動物形態、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、バイオシミラー、及びバリアントを含む、ＩＬ－２のすべての形態を含む。ＩＬ－１５は、例えば、Ｆｅｈｎｉｇｅｒ　ａｎｄ　Ｃａｌｉｇｉｕｒｉ，Ｂｌｏｏｄ　２００１，９７，１４－３２に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＩＬ－１５は、β及びγシグナル伝達受容体サブユニットをＩＬ－２と共有する。組換えヒトＩＬ－１５は、１２．８ｋＤａの分子量を有する１１４個のアミノ酸（及びＮ末端メチオニン）を含む単一の非グリコシル化ポリペプチド鎖である。組換えヒトＩＬ－１５は、ＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ　ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ　Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ　Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡ（カタログ番号ＣＹＴ－２３０－ｂ）及びＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ（ヒトＩＬ－１５組換えタンパク質、カタログ番号３４－８１５９－８２）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－１５のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号１１）。

【０７００】
「ＩＬ－２１」（本明細書では「ＩＬ２１」とも称される）という用語は、インターロイキン－２１として知られる多面発現性サイトカインタンパク質を指し、ヒト及び哺乳動物形態、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、バイオシミラー、及びバリアントを含む、ＩＬ－２１のすべての形態を含む。ＩＬ－２１は、例えば、Ｓｐｏｌｓｋｉ　ａｎｄ　Ｌｅｏｎａｒｄ，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｄｒｕｇ．Ｄｉｓｃ．２０１４，１３，３７９－９５

に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＩＬ－２１は、主にナチュラルキラーＴ細胞及び活性化ヒトＣＤ４＋Ｔ細胞によって産生される。組換えヒトＩＬ－２１は、１５．４ｋＤａの分子量を有する１３２個のアミノ酸を含む単一の非グリコシル化ポリペプチド鎖である。組換えヒトＩＬ－２１は、ＰｒｏＳｐｅｃ－ＴａｎｙＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡ（カタログ番号ＣＹＴ－４０８－ｂ）及びＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ（ヒトＩＬ－２１組換えタンパク質、カタログ番号１４－８２１９－８０）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号１２）。

【０７０１】

「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」、または「治療量」が示される場合、投与される本発明の組成物の正確な量は、患者（対象）の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染または転移の程度、及び健康状態の個人差を考慮して、医師によって決定され得る。本明細書に記載される腫瘍浸潤リンパ球（例えば、二次ＴＩＬまたは遺伝子修飾細胞傷害性リンパ球）を含む薬学的組成物が、10^{4}～10^{11}細胞／ｋｇ体重（例えば、10^{5}～10^{6}、10^{5}～10^{10}、10^{5}～10^{11}、10^{6}～10^{10}、10^{6}～10^{11}、10^{7}～10^{11}、10^{7}～10^{10}、10^{8}～10^{11}、10^{8}～10^{10}、10^{9}～10^{11}、または10^{9}～10^{10}細胞／ｋｇ体重）（それらの範囲内のすべての整数値を含む）の投与量で投与され得ると概説され得る。ＴＩＬ（場合によっては、遺伝子修飾細胞傷害性リンパ球を含む）組成物もまた、これらの投与量で複数回投与され得る。ＴＩＬ（場合によっては、遺伝的を含む）は、免疫療法で一般的に知られている注入技法を使用することにより投与され得る（例えば、Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｗ Ｅｎｇ．Ｊ．ｏｆ Ｍｅｄ．１９８８，３１９：１６７６を参照）。特定の患者に最適な投薬量及び治療レジーム（ｒｅｇｉｍｅ）は、患者を疾患の兆候について監視し、適宜に治療を調整することによって、医学分野の技術者によって容易に決定され得る。

【０７０２】

「血液学的悪性腫瘍」、「血液系悪性腫瘍」という用語または相関する意味の用語は、血液、骨髄、リンパ節、及びリンパ系の組織を含むが、これらに限定されない、哺乳動物の造血組織及びリンパ組織のがん及び腫瘍を指す。血液学的悪性腫瘍は、「液体腫瘍」とも称される。血液学的悪性腫瘍には、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ性リンパ腫（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、多発性骨髄腫、急性単球性白血病（ＡＭｏＬ）、ホジキンリンパ腫、及び非ホジキンリンパ腫が含まれ得るが、これらに限定されない。「Ｂ細胞血液学的悪性腫瘍」という用語は、Ｂ細胞を冒す血液学的悪性腫瘍を指す。

【０７０３】

「液体腫瘍」という用語は、本来流体である異常な細胞塊を指す。液体腫瘍癌には、白血病、骨髄腫、及びリンパ腫、ならびに他の血液学的悪性腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。液体腫瘍から取得されたＴＩＬは、本明細書では骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）とも称され得る。末梢血中で循環する液体腫瘍を含む液体腫瘍から得られるＴＩＬは、本明細書ではＰＢＬとも称され得る。ＭＩＬ、ＴＩＬ、及びＰＢＬという用語は、本明細書で互換的に使用され、細胞が由来する組織タイプに基づいてのみ異なる。

【０７０４】

本明細書で使用される「微小環境」という用語は、全体としての固形もしくは血液学的腫瘍微小環境、または微小環境内の細胞の個々のサブセットを指し得る。本明細書で使用される腫瘍微小環境は、Ｓｗａｒｔｚ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，２０１２，７２，２４７３に記載されるように、「腫瘍性形質転換を促進し、腫瘍成長及び浸潤を支持し、腫瘍を宿主免疫から保護し、治療抵抗性を助長し、かつ優勢な転移を成功させるニッチを提供する、細胞、可溶性因子、シグナル伝達分子、細胞外マトリックス、及び機械的手がかり」の複合混合物を指す。腫瘍はＴ細胞によって認識されるべき抗原を発現するが、微小環境による免疫抑制のため、免疫系による腫瘍クリアランスはまれである。

【０７０５】
いくつかの実施形態では、本発明は、ＴＩＬ集団でがんを治療する方法を含み、患者は、本発明によるＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団が提供され得、患者は、本発明によるＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド６０ｍｇ／ｋｇ／日で２日間（ＴＩＬ注入の２７日前及び２６日前）、ならびにフルダラビン２５ｍｇ／ｍ２／日で５日間（ＴＩＬ注入の２７日前～２３日前）である。いくつかの実施形態では、本発明による骨髄非破壊的化学療法及びＴＩＬ注入（０日目）後、患者は、生理学的許容範囲まで８時間毎に７２０，０００ＩＵ／ｋｇでＩＬ－２の静脈内注入を受ける。

【０７０６】
実験的発見は、腫瘍特異的Ｔリンパ球の養子移入前のリンパ球枯渇が、制御性Ｔ細胞及び免疫系の競合要素（「サイトカインシンク」）を排除することによって治療有効性を増強する上で重要な役割を果たすことを示す。したがって、本発明のいくつかの実施形態は、本発明のＴＩＬを導入する前に、患者に対してリンパ球枯渇ステップ（「免疫抑制コンディショニング」と称されることもある）を利用する。

【０７０７】
「有効量」または「治療有効量」という用語は、疾患治療を含むが、これに限定されない、意図された用途を達成するのに十分である、本明細書に記載の化合物または化合物の組み合わせの量を指す。治療有効量は、意図される用途（インビトロもしくはインビボ）、または治療される対象及び病状（例えば、対象の体重、年齢、及び性別）、病状の重症度、または投与方法に応じて異なり得る。この用語は、標的細胞において特定の応答（例えば、血小板粘着及び／または細胞遊走の低減）を誘導する用量にも適用される。特定の用量は、選択された特定の化合物、従うべき投薬レジメン、化合物が他の化合物と組み合わせて投与されるか、投与のタイミング、それが投与される組織、及び化合物が運ばれる物理的送達系に応じて異なる。

【０７０８】
「治療」、「治療すること」、「治療する」などの用語は、所望の薬理学的及び／または生理学的効果を得ることを指す。その効果は、その疾患または症状を完全にまたは部分的に予防するという観点において予防的であり得、及び／または疾患及び／またはその疾患に起因する副作用の部分的または完全な治癒という観点において治療的であり得る。「治療」は、本明細書で使用される場合、哺乳動物、特にヒトにおける疾患の任意の治療を包含し、（ａ）疾患にかかりやすい可能性があるが、まだ疾患を有すると診断されていない対象に疾患が生じるのを予防すること、（ｂ）疾患を抑制すること、すなわち、その発症または進行を抑止すること、及び（ｃ）疾患を軽減すること、すなわち、疾患の退行を引き起こし、及び／または１つ以上の疾患症状を軽減することを含む。「治療」は、疾患または状態がない場合でさえも、薬理学的効果を提供するための薬剤の送達を包含するようにも意図されている。例えば、「治療」は、病状がない場合、例えば、ワクチンの場合に免疫応答を誘発するか、または免疫を与えることができる組成物の送達を包含する。

【０７０９】
本明細書で使用される場合、「免疫チェックポイント阻害剤（ＩＣＩ）」という用語は、当該技術分野におけるその一般的な意味を有し、免疫阻害チェックポイントタンパク質の機能を阻害する任意の化合物を指す。本明細書で使用される場合、「免疫チェックポイントタンパク質」という用語は、当該技術分野におけるその一般的な意味を有し、シグナルを高める発現させる（刺激チェックポイント分子）か、またはシグナルを抑える（阻害チェックポイント分子）かのいずれかの点でＴ細胞によって発現される分子を指す。免疫チェックポイント分子は、ＣＴＬＡ－４及びＰＤ－１依存性経路と同様の免疫チェックポイント経路を構成することが当技術分野で認識されている（例えば、Ｐａｒｄｏｌｌ，２０１２．Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖ Ｃａｎｃｅｒ １２：２５２－２６４、Ｍｅｌｌｍａｎ ｅｔ ａｈ，２０１１．Ｎａｔｕｒｅ ４８０：４８０－４８９を参照されたい）。阻害

性チェックポイント分子の例としては、Ａ２ＡＲ、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＣＤ２７７、ＩＤＯ、ＫＩＲ、ＶＩＳＴＡ、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが挙げられる。例えば、本発明のＴＩＬにおいてサイレンシングまたは阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、Ｃｉｓｈ、ＣＢＬ－Ｂ、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβ、及びＰＫＡを含む群から選択されてもよい。ＢＡＦＦ（ＢＲ３）は、Ｂｌｏｏｍ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２０１８，ｉｎ　ｐｒｅｓｓに記載されている。別の実施例によれば、本発明のＴＩＬにおいてサイレンスまたは阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせを含む群から選択されてもよい。

【０７１０】

阻害には、機能の低減及び完全な遮断が含まれる。好ましい免疫チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイントタンパク質を特異的に認識する抗体である。いくつかの免疫チェックポイント阻害剤が既知であり、これらの既知の免疫チェックポイントタンパク質阻害剤に類似して、代替の免疫チェックポイント阻害剤が（近い）将来、開発される可能性がある。免疫チェックポイント阻害剤には、ペプチド、抗体、核酸分子、及び小分子が含まれる。

【０７１１】

「異種」という用語は、核酸またはタンパク質の一部に関して使用される場合、核酸またはタンパク質が、自然界では互いに同じ関係では見出されない２つ以上の部分配列を含むことを示す。例えば、核酸は、典型的には、組換え的に産生され、新たな機能的核酸、例えば、ある供給源からのプロモーター及び別の供給源からのコード領域、または異なる供給源からのコード領域を作製するように配置された無関係の遺伝子由来の２つ以上の配列を有する。同様に、異種タンパク質は、そのタンパク質が、自然界では互いに同じ関係では見出されない２つ以上の部分配列を含むことを示す（例えば、融合タンパク質）。

【０７１２】

２つ以上の核酸またはポリペプチドの文脈における「配列同一性」、「同一性パーセント」、及び「配列同一性パーセント」（もしくはそれらの同義語、例えば「９９％同一」）という用語は、同じであるか、または配列同一性の一部としていかなる保存的アミノ酸置換も考慮せずに、最大一致のために比較し整列させた場合（必要に応じてギャップを導入する）、特定のパーセンテージの同じヌクレオチドもしくはアミノ酸残基を有する２つ以上の配列または部分配列を指す。同一性パーセントは、配列比較ソフトウェアもしくはアルゴリズムを使用して、または目視検査によって測定することができる。アミノ酸またはヌクレオチド配列のアラインメントを取得するために使用され得る様々なアルゴリズム及びソフトウェアが当該技術分野で知られている。配列同一性パーセントの決定に好適なプログラムには、例えば、米国政府の国立生物工学情報センターのＢＬＡＳＴウェブサイトから入手可能なＢＬＡＳＴプログラム一式が含まれる。２つの配列間の比較は、ＢＬＡＳＴＮまたはＢＬＡＳＴＰアルゴリズムのいずれかを使用して実行することができる。ＢＬＡＳＴＮは、核酸配列を比較するために使用され、ＢＬＡＳＴＰは、アミノ酸配列を比較するために使用される。ＤＮＡＳＴＡＲから入手可能なＡＬＩＧＮ、ＡＬＩＧＮ－２（

Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）、またはＭｅｇＡｌｉｇｎは、配列を整列させるために使用することができる追加の公的に入手可能なソフトウェアプログラムである。当業者であれば、特定のアラインメントソフトウェアによって最大アラインメントに適切なパラメータを決定することができる。ある特定の実施形態では、アラインメントソフトウェアのデフォルトパラメータが使用される。

【０７１３】

本明細書で使用される場合、「バリアント」という用語は、参照抗体のアミノ酸配列内または隣接する特定の位置における１つ以上の置換、欠失、及び／または付加により参照抗体のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む抗体または融合タンパク質を包含するが、これらに限定されない。バリアントは、参照抗体のアミノ酸配列と比較して、そのアミノ酸配列に１つ以上の保存的置換を含み得る。保存的置換は、例えば、同様に荷電したまたは非荷電のアミノ酸の置換を含み得る。バリアントは、参照抗体の抗原に特異的に結合する能力を保持している。バリアントという用語は、ペグ化抗体またはタンパク質も含む。

【０７１４】

本明細書における「腫瘍浸潤リンパ球」または「ＴＩＬ」とは、対象の血流を離れて腫瘍に移動した白血球として最初に取得された細胞の集団を意味する。ＴＩＬには、ＣＤ８$^+$細胞傷害性Ｔ細胞（リンパ球）、Ｔｈ１及びＴｈ１７　ＣＤ４$^+$Ｔ細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、ならびにＭ１マクロファージが含まれるが、これらに限定されない。ＴＩＬには、一次ＴＩＬ及び二次ＴＩＬの両方が含まれる。「一次ＴＩＬ」は、本明細書に概説されるように患者組織試料から得られるもの（「新たに採取された」と称されることもある）であり、「二次ＴＩＬ」は、本明細書で考察されるように拡張または増殖された任意のＴＩＬ細胞集団であり、本明細書で考察されるバルクＴＩＬ、拡張ＴＩＬ（「ＲＥＰ　ＴＩＬ」）、ならびに「ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬ」が含まれるが、これらに限定されない。ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬは、例えば、第２の拡張ＴＩＬまたは第２の追加の拡張ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬと称されるＴＩＬを含む、図８のステップＤに記載されているものなど）を含み得る。

【０７１５】

ＴＩＬは、一般に、細胞表面マーカーを使用して生化学的に定義されるか、または腫瘍に浸潤して治療を達成するそれらの能力によって機能的に定義されるかのいずれかであり得る。ＴＩＬは、一般に、ＣＤ４、ＣＤ８、ＴＣＲαβ、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ５６、ＣＣＲ７、ＣＤ４５Ｒａ、ＣＤ９５、ＰＤ－１、及びＣＤ２５のうちの１つ以上のバイオマーカーの発現によって分類され得る。さらに及び代替的に、ＴＩＬは、患者への再導入時に固形腫瘍に浸潤する能力により機能的に定義され得る。ＴＩＬは、効力によってさらに特徴付けられ得、例えば、インターフェロン（ＩＦＮ）放出が、約５０ｐｇ／ｍＬを超える、約１００ｐｇ／ｍＬを超える、約１５０ｐｇ／ｍＬを超える、または約２００ｐｇ／ｍＬを超える場合、ＴＩＬは強力であるとみなされ得る。例えば、インターフェロン（ＩＦＮγ）放出が、約５０ｐｇ／ｍＬを超える、約１００ｐｇ／ｍＬを超える、約１５０ｐｇ／ｍＬを超える、または約２００ｐｇ／ｍＬを超える、約３００ｐｇ／ｍＬを超える、約４００ｐｇ／ｍＬを超える、約５００ｐｇ／ｍＬを超える、約６００ｐｇ／ｍＬを超える、約７００ｐｇ／ｍＬを超える、約８００ｐｇ／ｍＬを超える、約９００ｐｇ／ｍＬ、約１０００ｐｇ／ｍＬを超える場合、ＴＩＬは強力であるとみなされ得る。

【０７１６】

「デオキシリボヌクレオチド」という用語は、天然及び合成の、未修飾の及び修飾されたデオキシリボヌクレオチドを包含する。修飾には、糖部分、塩基部分、及び／またはオリゴヌクレオチド中のデオキシリボヌクレオチド間の結合への変更が含まれる。

【０７１７】

「ＲＮＡ」という用語は、少なくとも１つのリボヌクレオチド残基を含む分子を定義する。「リボヌクレオチド」という用語は、ｂ－Ｄ－リボフラノース部分の２’位にヒドロ

キシル基を有するヌクレオチドを定義する。ＲＮＡという用語には、二本鎖ＲＮＡ、一本鎖ＲＮＡ、部分的に精製されたＲＮＡなどの単離されたＲＮＡ、本質的に純粋なＲＮＡ、合成ＲＮＡ、組換え的に産生されたＲＮＡ、ならびに１つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換、及び／または変化によって天然に存在するＲＮＡとは異なる変化したＲＮＡが含まれる。本明細書に記載のＲＮＡ分子のヌクレオチドはまた、非天然に存在するヌクレオチドまたは化学的に合成されたヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドなどの非標準ヌクレオチドを含み得る。これらの変化したＲＮＡは、類似体または天然に存在するＲＮＡの類似体と称され得る。

【０７１８】

「薬学的に許容される担体」または「薬学的に許容される賦形剤」という用語は、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤、ならびに不活性成分を含むよう意図されている。医薬品有効成分のためのかかる薬学的に許容される担体または薬学的に許容される賦形剤の使用は、当該技術分野で周知である。任意の従来の薬学的に許容される担体または薬学的に許容される賦形剤が医薬品有効成分と適合しない場合を除いて、本発明の治療用組成物におけるその使用が企図される。他の薬物などの追加の医薬品有効成分を、記載された組成物及び方法に組み込むこともできる。

【０７１９】

「約」及び「およそ」という用語は、値の統計的に有意な範囲内を意味する。かかる範囲は、所与の値または範囲の１桁以内、好ましくは５０％以内、より好ましくは２０％以内、なおより好ましくは１０％以内、さらにより好ましくは５％以内であり得る。「約」または「およそ」という用語によって包含される許容偏差は、研究中の特定のシステムに依存し、当業者によって容易に理解され得る。さらに、本明細書で使用される場合、「約」及び「およそ」という用語は、寸法、サイズ、配合、パラメータ、形状、ならびに他の量及び特徴が正確でなく、かつ正確である必要はないが、公差、変換係数、四捨五入、測定誤差など、及び当業者に知られている他の要因を反映して、必要に応じて、およそであってもよく、及び／またはそれよりも大きくても小さくてもよいことを意味する。一般に、寸法、サイズ、配合、パラメータ、形状、または他の量もしくは特徴は、そのように明示的に述べられているかにかかわらず、「約」または「およそ」である。非常に異なるサイズ、形状、及び寸法の実施形態が記載された配置を採用し得ることに留意されたい。

【０７２０】

添付の特許請求の範囲で使用される場合、「含む」、「から本質的になる」、及び「からなる」という移行用語は、元の形式及び補正された形式で、存在する場合、列挙されていない追加のクレーム要素またはステップが特許請（複数可）求の範囲から除外されるかに関して特許請求の範囲を定義する。「含む」という用語は、包括的または自由形式であるよう意図されており、いずれの追加の列挙されていない要素、方法、ステップ、または材料も除外しない。「からなる」という用語は、特許請求の範囲で指定されたもの以外のいずれの要素、ステップ、または材料も除外し、後者の場合、指定された材料（複数可）に通常関連する不純物も除外する。「から本質的になる」という用語は、特許請求の範囲を、特定の要素、ステップ、または材料（複数可）、及び特許請求された本発明の基本的及び新規の特徴（複数可）に実質的に影響を及ぼさないに限定する。本発明を具体化する本明細書に記載のすべての組成物、方法、及びキットは、代替の実施形態では、「含む」、「から本質的になる」、及び「からなる」という移行用語のうちのいずれかによってより具体的に定義され得る。

【０７２１】

「抗体（ａｎｔｉｂｏｄｙ）」及びその複数形の「抗体（ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ）」という用語は、免疫グロブリン全体及び任意の抗原結合断片（「抗原結合部分」）またはその一本鎖を指す。「抗体」はさらに、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも２つの重鎖（Ｈ）鎖及び２つの軽（Ｌ）鎖を含む糖タンパク質、またはその抗原結合部分を指す。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではV_Hと略される）及び重鎖定常領域で

構成される。重鎖定常領域は、ＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３の３つのドメインで構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではV_Lと略される）及び軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は、１つのドメイン、C_Lで構成される。抗体のV_H及びV_L領域は、相補性決定領域（ＣＤＲ）または超可変領域（ＨＶＲ）と称され、フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる、より保存された領域が点在し得る、超可変性の領域にさらに細分化することができる。各V_H及びV_Lは、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序で配列された３つのＣＤＲ及び４つのＦＲで構成される：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４。重鎖及び軽鎖の可変領域は、１つまたは複数の抗原エピトープと相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）及び古典的な補体系の第１の成分（Ｃｌｑ）を含む宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。

【０７２２】

「抗原」という用語は、免疫応答を誘導する物質を指す。いくつかの実施形態では、抗原は、主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）分子によって提示される場合、抗体またはＴＣＲによって結合されることができる分子である。本明細書で使用される「抗原」という用語はまた、Ｔ細胞エピトープを包含する。抗原は、追加として免疫系によって認識されることができる。いくつかの実施形態では、抗原は、体液性免疫応答または細胞性免疫応答を誘導することができ、Ｂリンパ球及び／またはＴリンパ球の活性化につながる。場合によっては、これは、抗原がＴｈ細胞エピトープを含むか、またはそれに結合されることを必要とし得る。抗原はまた、１つ以上のエピトープ（例えば、Ｂ－及びＴ－エピトープ）を有し得る。いくつかの実施形態では、抗原は、好ましくは、典型的には非常に特異的かつ選択的な方法で、対応する抗体またはＴＣＲと反応し、他の抗原によって誘導され得る多数の他の抗体またはＴＣＲとは反応しない。

【０７２３】

「モノクローナル抗体」、「ｍＡｂ」、「モノクローナル抗体組成物」という用語、またはそれらの複数形は、単一分子組成の抗体分子の調製物を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性及び親和性を示す。特定の受容体に特異的なモノクローナル抗体は、試験対象に好適な抗原を注入し、次いで、所望の配列または機能的特徴を有する抗体を発現するハイブリドーマを単離するという当該技術分野における知識及び技術を使用して作製することができる。モノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、従来の手順を使用して（例えば、モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離され、配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、かかるＤＮＡの好ましい供給源として機能する。一旦単離されると、ＤＮＡは、発現ベクターに入れられ、次いで、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、または免疫グロブリンタンパク質を産生しない骨髄腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトされて、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を取得することができる。抗体の組換え産生については、以下でより詳細に説明する。

【０７２４】

本明細書で使用される、抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合断片」（または単に「抗体部分」もしくは「断片」）という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の１つ以上の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって行われ得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例には、（ｉ）V_L、V_H、C_L、及びＣＨ１ドメインからなる一価断片である、Ｆａｂ断片、（ｉｉ）ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合された２つのＦａｂ断片を含む二価断片である、Ｆ（ａｂ’）２断片、（ｉｉｉ）V_H及びＣＨ１ドメインからなるＦｄ断片、（ｉｖ）抗体の単一アームのV_L及びV_HドメインからなるＦｖ断片、（ｖ）V_HまたはV_Lドメインからなり得るドメイン抗体（ｄＡｂ）断片（Ｗａｒｄ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，１９８９，３４１，５４４－５４６）、ならびに（ｖｉ）単離した相補性決定領域（ＣＤＲ）が含まれる。Ｆｖ断片の２つのドメイン、V_L及びV_Hは、別々の

遺伝子によってコードされるが、これらは、組み換え方法を使用して、V_L及びV_H領域が対合して、一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）として知られる一価分子を形成する単一タンパク質鎖としてそれらを作製することを可能にする合成リンカーによって接合され得、例えば、Ｂｉｒｄ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ １９８８，２４２，４２３－４２６、及びＨｕｓｔｏｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １９８８，８５，５８７９－５８８３）を参照されたい。かかるｓｃＦｖ抗体はまた、抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合断片」という用語に包含されることを意図している。これらの抗体断片は、当業者に知られている従来の技法を使用して得られ、断片は、無傷の抗体と同じ方法で有用性についてスクリーニングされる。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖタンパク質ドメインは、V_H部分及びV_L部分を含む。ｓｃＦｖ分子は、V_LドメインがｓｃＦｖ分子のＮ末端部分である場合、V_L－Ｌ－V_H、またはV_HドメインがｓｃＦｖ分子のＮ末端部分である場合、V_H－Ｌ－V_Lのいずれかとして示される。ｓｃＦｖ分子を作製し、好適なペプチドリンカーを設計するための方法は、米国特許第４，７０４，６９２号、米国特許第４，９４６，７７８号、Ｒ．Ｒａａｇ ａｎｄ Ｍ．Ｗｈｉｔｌｏｗ，“Ｓｉｎｇｌｅ Ｃｈａｉｎ Ｆｖｓ．”ＦＡＳＥＢ Ｖｏｌ ９：７３－８０（１９９５）及びＲ．Ｅ．Ｂｉｒｄ ａｎｄ Ｂ．Ｗ．Ｗａｌｋｅｒ，Ｓｉｎｇｌｅ Ｃｈａｉｎ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｖａｒｉａｂｌｅ Ｒｅｇｉｏｎｓ，ＴＩＢＴＥＣＨ，Ｖｏｌ ９：１３２－１３７（１９９１）に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０７２５】

本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、フレームワーク及びＣＤＲ領域の両方が、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する抗体を含むことを意図している。さらに、抗体が定常領域を含む場合、定常領域はまた、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基を含み得る（例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的変異誘発によって、またはインビボでの体細胞変異によって導入される変異）。本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系に由来するＣＤＲ配列が、ヒトフレームワーク配列に移植されている抗体を含むことを意図しない。

【０７２６】

「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、フレームワーク領域及びＣＤＲ領域の両方がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する単一の結合特異性を示す抗体を指す。いくつかの実施形態では、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合したヒト重鎖導入遺伝子及び軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、トランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスから取得されたＢ細胞を含むハイブリドーマによって産生される。

【０７２７】

本明細書で使用される「組換えヒト抗体」という用語は、組換え手段によって調製、発現、作成、または単離されるすべてのヒト抗体、例えば（ａ）ヒト免疫グロブリン遺伝子またはそれから調製されたハイブリドーマ（以下でさらに説明される）についてトランスジェニックまたはトランス染色体である動物（マウスなど）から単離された抗体、（ｂ）ヒト抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から、例えば、トランスフェクトーマから単離された抗体、（ｃ）組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体、及び（ｄ）ヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のＤＮＡ配列へのスプライシングを含む、任意の他の手段によって調製、発現、作成、または単離された抗体を含む。かかる組換えヒト抗体は、フレームワーク及びＣＤＲ領域がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する。しかしながら、ある特定の実施形態では、かかる組換えヒト抗体は、インビトロ変異誘発（または、ヒトＩｇ配列についてトランスジェニックな動物が使用される場合、インビボ体細胞変異誘発）に供され得、したがって、組換え抗体のV_H及びV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系V_H及びV_L配列に由来し、関連

しているが、インビボでヒト抗体生殖細胞系レパートリー内に自然に存在しない可能性がある配列である。

【０７２８】

本明細書で使用される場合、「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス（例えば、ＩｇＭまたはＩｇＧ１）を指す。

【０７２９】

「抗原を認識する抗体」及び「抗原に特異的な抗体」という句は、本明細書では「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と互換的に使用される。

【０７３０】

「ヒト抗体誘導体」という用語は、抗体と別の医薬品有効成分または抗体とのコンジュゲートを含む、ヒト抗体の任意の修飾形態を指す。「コンジュゲート」、「抗体薬物コンジュゲート」、「ＡＤＣ」、または「免疫コンジュゲート」という用語は、別の治療部分にコンジュゲートされた抗体またはその断片を指し、これは当該技術分野において使用可能な方法を使用して、本明細書に記載の抗体にコンジュゲートされ得る。

【０７３１】

「ヒト化抗体」、「ヒト化抗体（複数）」、及び「ヒト化」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系に由来するＣＤＲ配列が、ヒトフレームワーク配列に移植されている抗体を指すことを意図している。追加のフレームワーク領域の修飾は、ヒトフレームワーク配列内で行うことができる。非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、レシピエントの超可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、ウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）または非ヒト霊長類の１５超可変領域からの残基によって置き換えられる。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク（ＦＲ）残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体には見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体の性能をさらに向上させるために行われる。一般に、ヒト化抗体は、超可変ループのすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、ＦＲ領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的すべてを含むことになる。ヒト化抗体はまた、任意選択で、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含むであろう。さらなる詳細については、Ｊｏｎｅｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　１９８６，３２１，５２２－５２５、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　１９８８，３３２，３２３－３２９、及びＰｒｅｓｔａ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．１９９２，２，５９３－５９６を参照されたい。本明細書に記載される抗体はまた、エフェクター機能及び／またはＦｃＲ結合の改善（例えば、低減）を与えることが知られている任意のＦｃバリアントを用いるように修飾され得る。Ｆｃバリアントは、例えば、国際特許出願公開第ＷＯ１９８８／０７０８９Ａ１号、同第ＷＯ１９９６／１４３３９Ａ１号、同第ＷＯ１９９８／０５７８７Ａ１号、同第ＷＯ１９９８／２３２８９Ａ１号、同第ＷＯ１９９９／５１６４２Ａ１号、同第ＷＯ９９／５８５７２Ａ１号、同第ＷＯ２０００／０９５６０Ａ２号、同第ＷＯ２０００／３２７６７Ａ１号、同第ＷＯ２０００／４２０７２Ａ２号、同第ＷＯ２００２／４４２１５Ａ２号、同第ＷＯ２００２／０６０９１９Ａ２号、同第ＷＯ２００３／０７４５６９Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０１６７５０Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０２９２０７Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０３５７５２Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０６３３５１Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０７４４５５Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０９９２４９Ａ２号、同第ＷＯ２００５／０４０２１７Ａ２号、同第ＷＯ２００５／０７０９６３Ａ１号、同第ＷＯ２００５／０７７９８１Ａ２号、同第ＷＯ２００５／０９２９２５Ａ２号、同第ＷＯ２００５／１２３７８０Ａ２号、同第ＷＯ２００６／０１９４４７Ａ１号、同第ＷＯ２００６／０４７３５０Ａ２号、及び同第ＷＯ２００６／０８５９６７Ａ２号、ならびに米国特許第５，６４８，２６０号、同第５，７

３９，２７７号、同第５，８３４，２５０号、同第５，８６９，０４６号、同第６，０９６，８７１号、同第６，１２１，０２２号、同第６，１９４，５５１号、同第６，２４２，１９５号、同第６，２７７，３７５号、同第６，５２８，６２４号、同第６，５３８，１２４号、同第６，７３７，０５６号、同第６，８２１，５０５号、同第６，９９８，２５３号、及び同第７，０８３，７８４号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるアミノ酸置換のうちのいずれか１つを含み得る。

【０７３２】

「キメラ抗体」という用語は、可変領域配列が１つの種に由来し、定常領域配列が別の種に由来する抗体、例えば、可変領域配列がマウス抗体に由来し、定常領域配列がヒト抗体に由来する抗体を指すことを意図している。

【０７３３】

「二重特異性抗体（ｄｉａｂｏｄｙ）」は、２つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片である。断片は、同じポリペプチド鎖（V_H-V_LまたはV_L-V_H）中に軽鎖可変ドメイン（V_L）に接続された重鎖可変ドメイン（V_H）を含む。同じ鎖上の２つのドメインをペアリングするには短すぎるリンカーを使用すると、ドメインは別のチェーンの相補ドメインとペアリングさせられ、２つの抗原結合部位が作成される。二重特異性抗体は、例えば、欧州特許第ＥＰ４０４，０９７号、国際特許公開第ＷＯ９３／１１１６１号、及びＢｏｌｌｉｇｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １９９３，９０，６４４４－６４４８においてより完全に記載されている。

【０７３４】

「グリコシル化」という用語は、抗体の修飾誘導体を指す。非グリコシル化抗体は、グリコシル化を欠いている。グリコシル化は、例えば、抗原に対する抗体の親和性を増加させるように変化され得る。かかる炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内の１つ以上のグリコシル化部位を変化させることによって達成され得る。例えば、１つ以上の可変領域フレームワークのグリコシル化部位の排除をもたらす、１つ以上のアミノ酸置換を行ない、それによってその部位でのグリコシル化を排除することができる。米国特許第５，７１４，３５０号及び同第６，３５０，８６１号に記載されているように、非グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を高める可能性がある。加えてまたは代替的に、改変した種類のグリコシル化を有する抗体、例えば、フコシル残基の量が低減した低フコシル化抗体または二分ＧｌｃＮａｃ構造が増加した抗体が作製され得る。かかるグリコシル化パターンの変化は、抗体の能力を増加させることが実証されている。かかる炭水化物修飾は、例えば、抗体をグリコシル化機構が変化した宿主細胞で発現させることによって達成され得る。グリコシル化機構が変化した細胞については、当該技術分野で説明されており、本発明の組換え抗体を発現させ、それによりグリコシル化が変化した抗体を産生する宿主細胞として使用され得る。例えば、Ｍｓ７０４、Ｍｓ７０５、及びＭｓ７０９細胞株で発現される抗体が、それらの炭水化物上のフコースを欠くように、細胞株Ｍｓ７０４、Ｍｓ７０５、及びＭｓ７０９は、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子ＦＵＴ８（アルファ（１，６）フコシルトランスフェラーゼ）を欠く。Ｍｓ７０４、Ｍｓ７０５、及びＭｓ７０９ ＦＵＴ８－／－細胞株は、２つの置換ベクターを使用したＣＨＯ／ＤＧ４４細胞中のＦＵＴ８遺伝子の標的破壊によって作成された（例えば、米国特許公開第２００４／０１１０７０４号またはＹａｍａｎｅ－Ｏｈｎｕｋｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．，２００４，８７，６１４－６２２を参照）。別の例として、欧州特許第ＥＰ１，１７６，１９５号は、フコシルトランスフェラーゼをコードし、それによりかかる細胞株で発現される抗体が、アルファ１，６結合関連酵素を低減または排除することによって低フコシル化を示す、機能的に破壊されたＦＵＴ８遺伝子を有する細胞株を説明しており、抗体のＦｃ領域に結合するＮ－アセチルグルコサミンにフコースを付加するための酵素活性が低いか、または酵素活性を有しない細胞株、例えばラット骨髄腫細胞株ＹＢ２／０（ＡＴＣＣ ＣＲＬ １６６２）についても説明している。国際特許公開第ＷＯ０３／０３５８３５号は、フコースをＡｓｎ（２９７）結合型炭水化物に付着させる能力が低減し、さらにその宿主細胞で発現される抗体の低フコシル化ももたらすバリアントＣＨＯ細胞株

、Ｌｅｃ１３細胞について説明している（Ｓｈｉｅｌｄｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２００２，２７７，２６７３３－２６７４０も参照）。国際特許公開第ＷＯ９９／５４３４２号は、糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ（例えば、ベータ（１，４）－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩＩ（ＧｎＴＩＩＩ））を発現するように操作され、それにより操作された細胞株で発現される抗体が、二分性ＧｌｃＮａｃ構造の増加を示し、抗体のＡＤＣＣ活性の増加をもたらす、細胞株について記載している（Ｕｍａｎａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１９９９，１７，１７６－１８０も参照）。代替てきに、フコシダーゼ酵素を使用して、抗体のフコース残基を切断でき得る。例えば、フコシダーゼアルファ－Ｌ－フコシダーゼは、Ｔａｒｅｎｔｉｎｏ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．１９７５，１４，５５１６－５５２３に記載されているように、抗体からフコシル残基を除去する。

【０７３５】

「ペグ化」は、１つ以上のＰＥＧ基が抗体または抗体断片に付着する条件下で、ＰＥＧの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体などのポリエチレングリコール（ＰＥＧ）と反応させる、修飾抗体またはその断片を指す。ペグ化は、例えば、抗体の生物学的（例えば、血清）半減期を増加させることができる。好ましくは、ペグ化は、反応性ＰＥＧ分子（または類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実行される。本明細書で使用される場合、「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{10}$）アルコキシ－もしくはアリールオキシ－ポリエチレングリコール、またはポリエチレングリコール－マレイミドなどの、他のタンパク質を誘導体化するために使用されているＰＥＧの形態のうちのいずれかを包含することが意図される。ペグ化される抗体は、非グリコシル化抗体であり得る。ペグ化のための方法は、当該技術分野で知られており、例えば欧州特許第ＥＰ０１５４３１６号及び同第ＥＰ０４０１３８４号、ならびに米国特許第５，８２４，７７８号（各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、本発明の抗体に適用することができる。

【０７３６】

「バイオシミラー」という用語は、モノクローナル抗体またはタンパク質を含む、臨床的に不活性な成分にわずかな違いがあるにもかかわらず、米国で認可された参照バイオ製品と非常に類似しており、製品の安全性、純度、及び効力に関してバイオ製品と参照製品との間に臨床的に意味のある差異がない、バイオ製品を意味する。さらに、類似のバイオまたは「バイオシミラー」医薬品は、欧州医薬品庁によって既に使用が許可されている別のバイオ医薬品に類似したバイオ医薬品である。「バイオシミラー」という用語は、他の国及び地域の規制機関によっても同義的に使用されている。バイオ製品またはバイオ医薬品は、細菌または酵母などの生物源によって作製された、またはそれに由来する医薬品である。それらは、ヒトインスリンもしくはエリスロポエチンなどの比較的小さな分子、またはモノクローナル抗体などの複雑な分子からなり得る。例えば、参照ＩＬ－２タンパク質がアルデスロイキン（ＰＲＯＬＥＵＫＩＮ）である場合、アルデスロイキンに関して薬物規制当局によって承認されたタンパク質は、アルデスロイキンの「バイオシミラー」であるか、またはアルデスロイキンの「そのバイオシミラー」である。欧州では、類似のバイオまたは「バイオシミラー」医薬品は、欧州医薬品庁（ＥＭＡ）によって既に使用が許可されている別のバイオ医薬品に類似したバイオ医薬品である。欧州における同様の生物学的用途に関連する法的根拠は、補正されたＲｅｇｕｌａｔｉｏｎ（ＥＣ）Ｎｏ　７２６／２００４の第６条及びＤｉｒｅｃｔｉｖｅ　２００１／８３／ＥＣの第１０（４）条であり、したがって欧州では、バイオシミラーは、Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ（ＥＣ）Ｎｏ　７２６／２００４の第６条及びＤｉｒｅｃｔｉｖｅ　２００１／８３／ＥＣの第１０（４）条の下で、認可または認可申請の対象について認可、承認され得る。すでに認可されているオリジナルのバイオ医薬品は、欧州では「参照医薬品」と称されることがある。バイオシミラーとみなされる製品に対する要件のうちのいくつかは、バイオシミラー医薬品に関するＣＨＭＰガイドラインに概説されている。さらに、モノクローナル抗体バイオシミラーに関連するガイドラインを含む製品固有のガイドラインは、ＥＭＡによって製品毎に提

供され、そのウェブサイトで公開されている。本明細書に記載のバイオシミラーは、品質特徴、生物活性、作用機序、安全性プロファイル、及び／または有効性の点で、参照医薬品に類似している可能性がある。さらに、バイオシミラーは、参照医薬品と同じ状態を治療するために使用され得るか、または使用を意図され得る。したがって、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した品質特徴を有するとみなされ得る。代替的に、またはさらに、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した生物活性を有するとみなされ得る。代替的に、またはさらに、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した安全性プロファイルを有するとみなされ得る。代替的に、またはさらに、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した効力を有するとみなされ得る。本明細書に記載されているように、欧州におけるバイオシミラーは、ＥＭＡによって認可された参照医薬品と比較される。しかしながら、場合によっては、バイオシミラーは、特定の研究で欧州経済領域外で認可されたバイオ医薬品（ＥＥＡ認可されていない「コンパレーター」）と比較される場合がある。かかる研究には、例えば、特定の臨床研究及びインビボ非臨床研究が含まれる。本明細書で使用される場合、「バイオシミラー」という用語は、ＥＥＡ認可されていないコンパレーターと比較された、または比較され得るバイオ医薬品にも関する。特定のバイオシミラーは、抗体、抗体断片（例えば、抗原結合部分）、及び融合タンパク質などのタンパク質である。タンパク質バイオシミラーは、ポリペプチドの機能に有意な影響を及ぼさない、アミノ酸構造にわずかな修飾（例えば、アミノ酸の欠失、付加、及び／または置換を含む）を有するアミノ酸配列を有し得る。バイオシミラーは、その参照医薬品のアミノ酸配列に対して９７％以上、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。バイオシミラーは、その違いが医薬品の安全性及び／または有効性の変化をもたらさないならば、１つ以上の翻訳後修飾、例えば、限定されないが、参照医薬品の翻訳後修飾とは異なる、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び／または切断を含み得る。バイオシミラーは、参照医薬品と同一または異なるグリコシル化パターンを有し得る。特に、排他的ではないが、バイオシミラーは、その違いが参照医薬品に関連する安全性の懸念に対処するか、対処することを意図している場合、異なるグリコシル化パターンを有し得る。加えて、バイオシミラーは、医薬品の安全性及び有効性が損なわれないならば、例えば、その強度、剤形、製剤、賦形剤、及び／または提示において参照医薬品から逸脱する可能性がある。バイオシミラーは、参照医薬品と比較して、例えば薬物動態（ＰＫ）及び／または薬力学的（ＰＤ）プロファイルの違いを含み得るが、それでも、認可される、または認可に適しているとみなされるように、参照医薬品と十分に類似しているとみなされる。特定の状況において、バイオシミラーは、参照医薬品と比較して異なる結合特徴を示し、異なる結合特徴は、ＥＭＡなどの規制当局によって類似のバイオ製品としての認可の障壁ではないとみなされる。「バイオシミラー」という用語は、他の国及び地域の規制機関によっても同義的に使用されている。

【０７３７】

ＩＩＩ．腫瘍採取から凍結保存されたＴＩＬ調製物の作製

本明細書で提供される本発明のいくつかの実施形態は、患者が免疫チェックポイント阻害剤（ＩＣＩ）及び／または標準治療の治療を受ける前に、がん患者から採取された腫瘍試料から凍結保存されたＴＩＬ調製物を作製する方法に関する。

【０７３８】

いくつかの実施形態では、患者は、腫瘍採取及び凍結保存後にＩＣＩ処置（本明細書に記載の抗免疫チェックポイント抗体など）を受ける。

【０７３９】

いくつかの実施形態では、患者は、腫瘍採取及び凍結保存の後、がんの標準治療の治療を受ける。本明細書に記載のいくつかの治療方法は、標準治療の治療を患者に施すことを含む。本明細書で使用される場合、「標準治療の治療」は、特定のタイプの患者、疾患、または臨床状況に対して適切、認められた、及び／または広く使用されていると医師によ

って認識される薬物もしくは薬物の組み合わせ、放射線療法、手術、または他の医療介入を含む治療プロセスである。種々のタイプのがんを治療するための標準治療の治療は、当業者に周知である。例えば、米国の２１の主要がんセンターの連合体であるＮａｔｉｏｎａｌ Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｃａｎｃｅｒ Ｎｅｔｗｏｒｋ（ＮＣＣＮ）は、ＮＣＣＮ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｐｒａｃｔｉｃｅ Ｇｕｉｄｅｌｉｎｅｓ ｉｎ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ（ＮＣＣＮ ＧＵＩＤＥＬＩＮＥＳ（登録商標））を発行し、これは、多種多様ながんの標準治療の治療に関する詳細な最新情報を提供している（ＮＣＣＮ ＧＵＩＤＥＬＩＮＥＳ（登録商標）、２０１３を参照されたい）。いくつかの実施形態では、標準治療の治療は、化学療法、放射線療法、手術、標的療法、またはそれらの任意の組み合わせである。

【０７４０】

いくつかの実施形態では、患者または対象からの凍結保存された腫瘍採取物は、患者がＩＣＩ及び／または標準治療の治療で治療され、がんの進行を示した後にＴＩＬの集団を作製するために使用される。いくつかの実施形態では、腫瘍採取物の凍結保存後、患者または対象は、免疫チェックポイント阻害剤（ＩＣＩ）及び／または標準治療の治療を受け、がんの進行について監視される。いくつかの実施形態では、がんの進行は、自己ＴＩＬ療法の必要性を示す。

【０７４１】

他の実施形態では、患者または対象からの腫瘍採取物の凍結保存は、がんの進行の前に完了する。

【０７４２】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法は、ペーティント（ｐａｅｔｉｎｔ）が進行性疾患を発症しない場合、またはそうでなければ、将来的にＴＩＬ療法のために適応される場合に、ＴＩＬ産生のコストを回避するという形態で薬学的経済的利点を提供する。

【０７４３】

患者が、凍結保存のステップの少なくとも約１週間、２週間、３週間、１か月、２か月、３か月、４か月、５か月、６か月、７か月、８か月、９か月、１０か月、１１か月、１２か月、１３か月、１４か月、１５か月、１６か月、１７か月、１８か月、１９か月、２０か月、２１か月、２２か月、２３か月、２４か月、２５か月、２６か月、２７か月、２８か月、２９か月、３０か月、３１か月、３２か月、３３か月、３４か月、３５か月、３６か月後、進行性疾患を示す、請求項１～１４のいずれか１項に記載の方法。

【０７４４】

いくつかの実施形態では、凍結保存されたＴＩＬ調製物は、患者または対象から取得及び／または受容されるＴＩＬ集団を含む腫瘍試料から作製され得る。患者の腫瘍試料は、一般に外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段を介して、当該技術分野で知られている方法を使用して取得することができる。いくつかの実施形態では、多病変試料採取が使用される。いくつかの実施形態では、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段は、多病変試料採取を含む（すなわち、患者の１つ以上の腫瘍部位及び／または場所、ならびに同じ場所または近接した１つ以上の腫瘍から試料を取得する）。一般に、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍試料は、血液系悪性腫瘍から取得された腫瘍などの液体腫瘍であり得る。固形腫瘍は、肺組織のものであり得る。いくつかの実施形態では、有用なＴＩＬは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）から得られる。固形腫瘍は、皮膚組織のものであり得る。いくつかの実施形態では、有用なＴＩＬは、黒色腫から取得される。

【０７４５】

取得された時点で、腫瘍試料は、一般に、鋭的解剖を使用して１～約８mm^3の小片に断片化され、約２～３mm^3が特に有用である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、酵

素腫瘍消化物を使用してこれらの断片から培養される。かかる腫瘍消化物は、酵素培地（例えば、Ｒｏｓｗｅｌｌ Ｐａｒｋ Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＲＰＭＩ）１６４０緩衝液、２ｍＭグルタメート、１０ｍｃｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０単位／ｍＬ ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（例えば、組織解離機を使用する）によって産生され得る。腫瘍消化物は、腫瘍を酵素培地に入れ、腫瘍をおよそ１分間機械的に解離させ、続いて５％のＣＯ２中、３７℃で３０分間インキュベートし、続いて、小さな組織片のみが存在するまで、前述の条件下で機械的解離及びインキュベーションのサイクルを繰り返すことによって産生され得る。このプロセスの最後に、細胞懸濁液中に多数の赤血球または死細胞が含まれている場合、ＦＩＣＯＬＬ分岐親水性多糖類を使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。米国特許出願公開第２０１２／０２４４１３３Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものなどの当該技術分野で知られている代替の方法を使用することができる。前述の方法のうちのいずれかが、ＴＩＬを拡張する方法またはがんを治療する方法について本明細書に記載される実施形態のうちのいずれかにおいて使用され得る。

【０７４６】

いくつかの実施形態では、凍結保存されたＴＩＬ調製物は、将来の使用のために保管される。いくつかの実施形態では、腫瘍採取物の凍結保存は、進行前に完了する。いくつかの実施形態では、凍結保存されたＴＩＬ調製物の作製後、患者は、ＩＣＩ及び／または標準治療の治療時またはその後に進行性疾患の発現を監視される。いくつかの実施形態では、患者は、ＩＣＩ及び／または標準治療の治療時またはその後に進行性癌を示し、自己ＴＩＬ療法に適応される。いくつかの実施形態では、進行後、凍結保存されたＴＩＬ調製物を解凍し、以下のセクションに記載の拡張方法に従って拡張する。

【０７４７】

いくつかの実施形態では、患者は、ＮＳＣＬＣ癌患者である。いくつかの実施形態では、患者は、ＮＳＣＬＣに罹患しているか、罹患したか、またはＮＳＣＬＣに罹患しやすい。いくつかの実施形態では、患者は、転移性ＮＳＣＬＣを有する。いくつかの実施形態では、患者は、転移性ステージＩＶのＮＳＣＬＣを有する。

【０７４８】

いくつかの実施形態では、対象または患者は、

ｉ．＜１％のＰＤ－Ｌ１の所定の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）、

ｉｉ．１％～４９％のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコア、または

ｉｉｉ．１つ以上のドライバー変異の所定の非存在のうちの少なくとも１つを有する。

【０７４９】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、１つ以上のアクショナブルなドライバー変異を有しない。いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるアクショナブルなドライバー変異には、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＥＧＦＲエクソン２０、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＢＲＡＦ Ｖ６００Ｅ変異、ＢＲＡＦ Ｖ６００Ｋ変異、ＢＲＡＦ Ｖ６００変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、ＲＥＴ融合、ＥＲＢＢ２変異、ＥＲＢＢ２増幅、ＢＲＣＡ変異、ＭＡＰ２Ｋ１変異、ＰＩＫ３ＣＡ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＰＴＥＮ変異、ＵＭＤ変異、ＮＲＡＳ変異、ＫＲＡＳ変異、ＮＦ１変異、ＭＥＴ変異、ＭＥＴスプライス及び／または変化したＭＥＴシグナル伝達、ＴＰ５３変異、ＣＲＥＢＢＰ変異、ＫＭＴ２Ｃ変異、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１変異、ＡＴＭ変異、ＳＥＴＤ２変異、ＦＬＴ３変異、ＰＴＰＮ１１変異、ＦＧＦＲ１変異、ＥＰ３００変異、ＭＹＣ変異、ＥＺＨ２変異、ＪＡＫ２変異、ＦＢＸＷ７変異、ＣＣＮＤ３変異、及びＧＮＡ１１変異が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、＜１％のＴＰＳを示し、１つ以上のドライバー変異の所定の非存在を有する。

【０７５０】

いくつかの実施形態では、凍結保存されたＴＩＬ調製物が作製される時点で、患者は、

すべてのがん治療にナイーブである。いくつかの実施形態では、患者は、標的療法にナイーブである。いくつかの実施形態では、凍結保存されたＴＩＬ調製物が作製される時点で、患者は、ＩＣＩ治療にナイーブである。いくつかの実施形態では、凍結保存されたＴＩＬ調製物が作製される時点で、患者は、抗ＶＥＧＦ（例えば、ａｖａｓｔｉｎ／ベバシズマブ）治療にナイーブである。いくつかの実施形態では、凍結保存されたＴＩＬ調製物が作製される時点で、患者は、化学療法治療にナイーブである。いくつかの実施形態では、凍結保存されたＴＩＬ調製物が作製される時点で、患者は、前述の治療のうちの２つ以上の組み合わせにナイーブである。

【０７５１】

いくつかの実施形態では、凍結保存されたＴＩＬ調製物が作製される時点で、患者は、維持療法を受けている。いくつかの実施形態では、凍結保存されたＴＩＬ調製物が作製される時点で、患者の維持療法は中断される。いくつかの実施形態では、凍結保存されたＴＩＬ調製物が作製される時点で、患者は、維持療法の中断後のウォッシュアウト期間にあり、続いて、維持療法の再開または異なる療法が行われる。いくつかの実施形態では、維持療法は、腫瘍試料が患者から採取された後に再開される。いくつかの実施形態では、がん（ＮＳＣＬＣなど）は、維持療法時またはその後に処理される。

【０７５２】

いくつかの実施形態では、凍結保存されたＴＩＬ調製物が作製される時点で、患者は、がんの第１選択（１Ｌ）ＩＣＩ及び／または標準療法を受けることになる。

【０７５３】

いくつかの実施形態では、凍結保存されたＴＩＬ調製物が作製される時点で、患者は、がんの第２選択（２Ｌ）ＩＣＩ及び／または標準療法を受けることになる。

【０７５４】

いくつかの実施形態では、患者の採取された腫瘍試料は、フラッシュ凍結方法または制御された速度の凍結を使用して凍結保存される。例示的なフラッシュ凍結方法及び制御された速度の凍結方法は、国際特許公開第ＷＯ／２０２０／０６１４２９号に見出され得、これは、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０７５５】

いくつかの実施形態では、本発明のフラッシュ凍結方法は、

（ｉ）腫瘍組織を断片化することと、

（ｉｉ）凍結保存培地中で断片をインキュベートすることと、

（ｉｉｉ）断片を凍結することであって、凍結が、液体窒素の気相を使用したフラッシュ凍結である、凍結することと、を含む。

【０７５６】

ある実施形態では、腫瘍組織は、約１．５ｍｍ～約６ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。好ましい実施形態では、ほぼ球形の断片は、約６ｍｍの直径を有する。一実施形態では、ほぼ球形の断片は、約３ｍｍの直径を有する。

【０７５７】

いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、少なくとも１．５ｍｍの最短辺長及び約６ｍｍの最長辺長を有する概して長方形の断片に断片化される。ある実施形態では、腫瘍組織は、約１．５ｍｍ～６ｍｍの辺長を有する概して立方体の断片に断片化される。ある実施形態では、概して立方体の断片は、約６ｍｍの辺長を有する。ある実施形態では、概して立方体の断片は、約３ｍｍの辺長を有する。

【０７５８】

いくつかの実施形態では、組織試料は、腫瘍組織から非腫瘍組織を分離するようにトリミングされる。

【０７５９】

いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、解剖された腫瘍由来のものである。ある実施形態では、腫瘍組織は、腫瘍生検由来のものである。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、切開生検由来のものである。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、切除生検由来のも

のである。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、１つ以上のコア針生検由来のものであり得る。

【０７６０】

いくつかの実施形態では、新鮮な腫瘍組織は、約１．５ｍｍ×１．５ｍｍ、約２ｍｍ×２ｍｍ、約２．５ｍｍ×２．５ｍｍ、約３ｍｍ×３ｍｍ、約３．５ｍｍ×３．５ｍｍ、約４ｍｍ×４ｍｍ、約４．５ｍｍ×４．５ｍｍ、約５ｍｍ×５ｍｍ、約５．５ｍｍ×約５．５ｍｍ、または約６ｍｍ×約６ｍｍの横断面を有する断片にトリミングされる。

【０７６１】

ある実施形態では、腫瘍組織は、１２時間未満の古さのものである。ある実施形態では、腫瘍組織は、８時間未満の古さのものである。ある実施形態では、腫瘍組織は、３時間未満、２時間未満、または１時間未満の古さのものである。

【０７６２】

本開示を考慮して、当業者に既知の任意の好適な凍結保存培地が、本明細書に記載の方法において使用され得る。好適な凍結保存培地の例としては、ＣｒｙｏＳｔｏｒ（登録商標）ＣＳ１０、ＨｙｐｏＴｈｅｒｍｏｓｏｌ（登録商標）、またはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約２％ｖ／ｖのＤＭＳＯ～約１５％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約２％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約２％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約３％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約４％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約５％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約６％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約７％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約８％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約９％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１０％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１１％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１２％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１３％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１４％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１５％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、少なくとも１つの抗菌剤を含む。本開示を考慮して、当業者に既知の任意の好適な抗菌剤が、本明細書に記載の方法において使用され得る。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、ゲンタマイシンを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、少なくとも５０μｇ／ｍＬの濃度のゲンタマイシンを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、少なくとも４０μｇ／ｍＬの濃度のゲンタマイシンを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、少なくとも３０μｇ／ｍＬの濃度のゲンタマイシンを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、少なくとも２０μｇ／ｍＬの濃度のゲンタマイシンを含む。

【０７６３】

いくつかの実施形態では、腫瘍断片を、凍結保存培地中で約２０分～約７０分間インキュベートする。いくつかの実施形態では、腫瘍断片を、凍結保存培地中で約３０分～約６０分間インキュベートする。いくつかの実施形態では、インキュベーションは、少なくとも１０分、少なくとも２０分、少なくとも２５分、少なくとも３０分、少なくとも３５分、少なくとも４０分、少なくとも４５分、少なくとも５０分、少なくとも５５分、少なくとも６０分、または少なくとも７０分である。いくつかの実施形態では、インキュベーションは、約１０分、約２０分、約２５分、約３０分、約３５分、約４０分、約４５分、約５０分、約５５分、約６０分、または約７０分である。いくつかの実施形態では、インキュベーションは、１０分未満、２０分未満、２５分未満、３０分未満、３５分未満、４０分未満、４５分未満、５０分未満、５５分未満、６０分未満、または７０分未満である。いくつかの実施形態では、インキュベーション時間は、腫瘍断片密度に比例する。いくつ

かの実施形態では、インキュベーション時間は、腫瘍断片の表面対体積比に比例する。
【０７６４】
いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、凍結保存媒体中で、約２℃～約８℃の温度でインキュベートされる。
【０７６５】
いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、生理学的緩衝等張生理食塩水溶液中で洗浄される。いくつかの実施形態では、洗浄は、各々少なくとも３分の３回の連続洗浄を含み、各連続洗浄後に生理学的緩衝等張生理食塩水溶液が置き換えられる。いくつかの実施形態では、生理学的緩衝等張生理食塩水溶液は、ハンクス平衡塩溶液（ＨＢＳＳ）を含む。いくつかの実施形態では、生理学的緩衝等張生理食塩水溶液は、トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）を含む。いくつかの実施形態では、生理学的緩衝等張生理食塩水溶液は、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）を含む。いくつかの実施形態では、生理学的緩衝等張生理食塩水溶液は、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（ＤＰＢＳ）を含む。いくつかの実施形態では、１つの連続洗浄中の生理学的緩衝等張生理食塩水溶液は、他の連続洗浄のうちの１つ以上において使用されるものとは異なる生理学的緩衝等張生理食塩水溶液であってもよい。
【０７６６】
ある実施形態では、凍結は、約－１２５℃～約－１９６℃の範囲の温度で行われる。ある実施形態では、凍結は、約－１４０℃～約－１８５℃の範囲の温度で行われる。ある実施形態では、凍結は、約－１４０℃～約－１７５℃の範囲の温度で行われる。ある実施形態では、凍結は、約－１４５℃の温度で行われる。いくつかの実施形態では、凍結は、液体窒素の気相で行われる。
【０７６７】
当該技術分野で周知の問題は、凍結プロセス中に細胞または組織を損傷することなく凍結保存することである。理論に拘束されないが、凍結中の損傷の１つの原因は、細胞破裂をもたらす細胞内氷核形成である。Ｍｕｌｄｒｅｗ及びＭｃＧａｎｎは、“Ｔｈｅ ｏｓｍｏｔｉｃ ｒｕｐｔｕｒｅ ｈｙｐｏｔｈｅｓｉｓ ｏｆ ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｆｒｅｅｚｉｎｇ ｉｎｊｕｒｙ”，Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ，６６：５３２－４１（１９９４）で、細胞、特に全組織凍結保存についてのこの周知で、広く認識されている困難についての定量的な理論を概説している。Ａｃｋｅｒ及びＭｃＧａｎｎは、その後の論文“Ｍｅｍｂｒａｎｅ ｄａｍａｇｅ ｏｃｃｕｒｓ ｄｕｒｉｎｇ ｔｈｅ ｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｏｆ ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｉｃｅ，”ＣｒｙｏＬｅｔｔｅｒ，２２：２４１－５４（２００１）で、細胞内氷形成及び細胞損傷の基本的な機構をさらに発展させている。
【０７６８】
凍結中の損傷が検出され、解凍時に、組織が生理学的構造を実質的に失ったか、または組織を構成する細胞が実質的にその生存能を失っている。生存率は、増殖するか、または正常な細胞機能のマーカーを示すそのような細胞の数と比較して、培地に導入された細胞の割合によって決定され得る。生存細胞の割合を特定するための多数の方法、例えば、限定されないが、トリパンブルー排除などの染料除外試験が、当該技術分野で知られている。例えば、Ｓｔｒｏｂｅｒ，Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔｏｃ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２００１，Ａｐｐｅｎｄｉｘ ３Ｂ，ａｖａｉｌａｂｌｅ ａｔ ｈｔｔｐｓ：／／ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１００２／０４７１１４２７３５．ｉｍａ０３ｂｓ２１を参照されたい。限定されないが、生存率はまた、ＭＴＴアッセイなどの代謝活性アッセイによって決定され得、ＭＴＴ、３－（４，５－ジメチルチアゾール－２－イル）－２，５－ジフェニルテトラゾリウムブロミドは、細胞酵素によってホルマザンに代謝される。この酵素反応は、黄色のＭＴＴを紫色のホルマザンに変換する。例えば、Ｂｅｒｒｉｄｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｔｅｔｒａｚｏｌｉｕｍ ｄｙｅｓ ａｓ ｔｏｏｌｓ ｉｎ ｃｅｌｌ ｂｉｏｌｏｇｙ：ｎｅｗ ｉｎｓｉｇｈｔｓ ｉｎｔｏ ｔｈｅｉｒ ｃｅｌｌｕｌａｒ ｒｅｄｕｃｔｉｏｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ａｎｎｕａｌ Ｒｅｖｉｅｗ，１１：１２７－１５２（２００５）、Ｍｏｓｍａｎｎ，“Ｒａｐｉｄ ｃｏｌｏｒｉｍｅｔｒｉｃ ａｓ

ｓａｙ ｆｏｒ ｃｅｌｌｕｌａｒ ｇｒｏｗｔｈ ａｎｄ ｓｕｒｖｉｖａｌ：ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｔｏ ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ ａｎｄ ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ ａｓｓａｙｓ，”Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ６５（１－２）：５５－６３（１９８３）を参照されたい。

【０７６９】

理論に拘束されないが、ゆっくりとした冷却は無害な細胞内の氷を産生すると仮定されており、Ａｃｋｅｒ ａｎｄ ＭｃＧａｎｎ，“Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ ｅｆｆｅｃｔ ｏｆ ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｉｃｅ ｄｕｒｉｎｇ ｆｒｅｅｚｉｎｇ？”Ｃｒｙｏｂｉｏｌｏｇｙ，４６（２）：１９７－２０２（２００３）を参照されたい。過度の細胞損傷なしに凍結を達成するか、または細胞生存率を著しく低減させることなく凍結を達成する従来のアプローチは、ゆっくりとした凍結速度を採用することであった。Ｗａｔｓｏｎ ｅｔ ａｌ．、米国特許第５，８９１，６１７号は、このアプローチを強調し、例えば、請求項１のステップ（ｃ）は、非常に遅い冷却速度：「毎分約－０．３℃以下」を教示する。同様に、Ｃｏｍｈａｉｒｅ ｅｔ ａｌ．、米国特許第９，９３８，４９５号は、幹細胞について「解凍後の高い細胞生存率は、ＤＭＳＯを含まない凍結保存培地を使用してゆっくり凍結することによって得られた」と教示している。

【０７７０】

これらの例示的な教示に基づいて、本開示の方法及び産物は驚くべきものであり、予想外である。さらに、実施例及びその中のデータを含む、本開示は、治療のための腫瘍浸潤リンパ球の製造における使用のために、腫瘍組織、腫瘍断片、または腫瘍検体を迅速かつ効率的に凍結保護する問題に対する技術的解決策を実証する。

【０７７１】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の製造のための腫瘍組織の凍結保存方法は、少なくとも－１３０℃を下回る温度で凍結された断片を保管するステップ（ｉｖ）をさらに含む。いくつかの実施形態では、凍結された断片は、液体窒素の気相中に保管される。いくつかの実施形態では、凍結された断片は、液体窒素に浸されて保管される。いくつかの実施形態では、凍結保存された断片は、自己治療的使用のための、後のＴＩＬの製造のために保管される。

【０７７２】

いくつかの実施形態では、本開示は、制御された速度の凍結／ゆっくりとした凍結方法を使用して腫瘍組織を凍結保存するための方法を本明細書で提供する。

【０７７３】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍組織を凍結保存するための方法、ならびに

（ｉ）閉鎖可能な容器に凍結保存培地を添加するステップと、

（ｉｉ）制御された速度の凍結装置で閉鎖可能な容器を予め冷却するステップと、

（ｉｉｉ）腫瘍組織を断片化して、腫瘍断片を得るステップと、

（ｉｖ）腫瘍断片を、凍結保存培地を含む閉鎖可能な容器に入れ、容器を閉鎖するステップと、

（ｖ）任意選択で、腫瘍断片及び凍結保存培地を含む閉鎖容器をインキュベートするステップと、

（ｖｉ）制御された速度の凍結装置中で容器をゆっくり凍結するステップと、

（ｖｉｉ）容器を液体窒素冷凍庫に移すステップと、を含むプロセスによって調製された凍結保存された腫瘍組織を提供する。

【０７７４】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍組織を凍結保存するための方法、ならびに

（ｉ）腫瘍組織の断片化から取得された腫瘍断片を凍結保存培地を含む予め冷却された閉鎖可能な容器中に入れ、容器を閉鎖するステップと、

（ｉｉ）任意選択で、腫瘍断片及び凍結保存培地を含む閉鎖容器をインキュベートするステップと、

（ｉｉｉ）制御された速度の凍結装置中で容器をゆっくり凍結するステップと、

（ｉｖ）容器を液体窒素冷凍庫に移すステップと、を含むプロセスによって調製された凍結保存された腫瘍組織を提供する。

【０７７５】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍組織を凍結保存するための方法、ならびに

（ｉ）酵素培地中での腫瘍消化物の消化から取得された腫瘍消化物または腫瘍組織の断片化から産生された腫瘍断片を凍結保存培地を含む予め冷却された閉鎖可能な容器中に入れ、容器を閉鎖するステップと、

（ｉｉ）任意選択で、腫瘍消化物及び凍結保存培地を含む閉鎖容器をインキュベートするステップと、

（ｉｉｉ）制御された速度の凍結装置中で容器をゆっくり凍結するステップと、

（ｉｖ）容器を液体窒素冷凍庫に移すステップと、を含むプロセスによって調製された凍結保存された腫瘍組織を提供する。

【０７７６】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍組織を凍結保存するための方法、ならびに

（ｉ）閉鎖可能な容器に凍結保存培地を添加するステップと、

（ｉｉ）制御された速度の凍結装置で閉鎖可能な容器を予め冷却するステップと、

（ｉｉｉ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を取得するステップと、

（ｉｖ）腫瘍消化物を閉鎖可能な容器中の凍結保存培地中に入れ、容器を閉鎖するステップと、

（ｖ）任意選択で、腫瘍消化物及び凍結保存培地を含む閉鎖容器をインキュベートするステップと、

（ｖｉ）制御された速度の凍結装置中で容器をゆっくり凍結するステップと、

（ｖｉｉ）容器を液体窒素冷凍庫に移すステップと、を含むプロセスによって調製された凍結保存された腫瘍組織を提供する。

【０７７７】

本開示を考慮して、当業者に既知の任意の好適な凍結保存培地が、本明細書に記載の方法において使用され得る。好適な凍結保存培地の例としては、ＣｒｙｏＳｔｏｒ（登録商標）ＣＳ１０、ＨｙｐｏＴｈｅｒｍｏｓｏｌ（登録商標）、またはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約２％ｖ／ｖのＤＭＳＯ～約１５％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約２％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約２％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約３％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約４％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約５％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約６％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約７％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約８％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約９％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１０％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１１％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１２％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１３％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１４％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１５％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、少なくとも１つの抗菌剤を含む。本開示を考慮して、当業者に既知の任意の好適な抗菌剤が、本明細書に記載の方法において使用され得る。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、ゲンタマイシンを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、少なくとも５０μｇ／ｍＬの濃度のゲンタマイシンを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、少なくとも４０μｇ／ｍＬの濃度のゲンタマイシンを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、少なくとも３０μｇ／ｍＬの濃度のゲンタマイシンを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、少なくとも２０μ

ｇ／ｍＬの濃度のゲンタマイシンを含む。

【０７７８】

本開示を考慮して、当業者に既知の任意の好適な閉鎖可能な容器が、本明細書に記載の方法において使用され得る。好適な閉鎖可能な容器の例としては、キャップ付きマイクロ遠心チューブ、蓋付きマイクロ遠心チューブ、及び極低温検体保管バイアルが含まれるが、これらに限定されない。「極低温検体保管バイアル」という用語は、容器を極低温（－８０℃以下であることを意味し、任意選択で液体窒素に浸されるか、または約－１９６℃の温度で液体窒素の上の気相につるされる）で安全かつ確実に保管することができる、任意の及びすべての閉鎖、密封、または再閉鎖可能な容器（例えば、ねじキャップまたは摩擦密封スナップキャップを有する）を含む、クライオバイアル、極低温容器、極低温チューブなどの用語を含むことを意味する。一般的にポリエチレンまたはポリプロピレンから製造されるキャップ付きまたは蓋付きのマイクロ遠心チューブ及びクライオバイアルは、多くの場合、極低温検体保管バイアルとして使用される。

【０７７９】

いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約５０％～約８５％の体積が凍結保存培地で満たされる。いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約５０％～約８５％の体積が凍結保存培地で満たされる。いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約５０％～約７５％の体積が凍結保存培地で満たされる。いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約５０％～約６５％の体積が凍結保存培地で満たされる。いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約５０％～約５５％の体積が凍結保存培地で満たされる。いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約６０％～約８５％の体積が凍結保存培地で満たされる。いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約６０％～約７５％の体積が凍結保存培地で満たされる。いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約６０％～約６５％の体積が凍結保存培地で満たされる。いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約７０％～約８５％の体積が凍結保存培地で満たされる。いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約７０％～約７５％の体積が凍結保存培地で満たされる。いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約８０％～約８５％の体積が凍結保存培地で満たされる。

【０７８０】

いくつかの実施形態では、予め冷却するステップは、閉鎖可能な容器を、約－８０℃～約８℃の温度である制御された速度の凍結装置に、少なくとも約５分～約８時間の期間入れることを含む。いくつかの実施形態では、予め冷却するステップは、閉鎖可能な容器を、約８０℃、約－７９℃、約－７８℃、約－７７℃、約－７６℃、約－７５℃、約－７０℃、約－６５℃、約－６０℃、約－５５℃、約－５０℃、約－４５℃、約－４０℃、約－３５℃、約－３０℃、約－２５℃、約－２０℃、約－１５℃、約－１０℃、約－５℃、約０℃、約１℃、約２℃、約３℃、約４℃、約５℃、約６℃、約７℃、約８℃、または間の任意の温度である制御された速度の凍結装置に、少なくとも約５分、少なくとも約１０分、少なくとも約１５分、少なくとも約２０分、少なくとも約２５分、少なくとも約３０分、少なくとも約３５分、少なくとも約４０分、少なくとも約４５分、少なくとも約５０分、少なくとも約５５分、少なくとも約１時間、少なくとも約１．５時間、少なくとも約２時間、少なくとも約３時間、少なくとも約４時間、少なくとも約５時間、少なくとも約６時間、少なくとも約７時間、少なくとも約８時間、またはそれ以上の期間入れることを含む。

【０７８１】

いくつかの実施形態では、腫瘍断片及び凍結保存媒体を含む閉鎖容器を、約２～８℃の温度で約３０～６０分間インキュベート後、制御された速度の凍結装置中で容器をゆっくりと凍結する。いくつかの実施形態では、腫瘍断片及び凍結保存媒体を含む容器を、約２℃、約３℃、約４℃、約５℃、約６℃、約７℃、約８℃、またはその間の任意の温度で、約５分間、約１０分間、約１５分間、約２０分間、約２５分間、約３０分間、約３５分間、約４０分間、約４５分間、約５０分間、約５５分間、約６０分間、またはそれ以上の期間インキュベート後、制御された速度の凍結装置中で容器をゆっくりと凍結する。

【０７８２】
本開示を考慮して、当業者に既知の任意の好適な制御された速度の凍結装置が、本明細書に記載の方法において使用され得る。好適な制御された速度の凍結装置の例としては、Ｃｏｒｎｉｎｇ ＣｏｏｌＣｅｌｌ（商標）装置またはＮａｌｇｅｎｅ Ｍｒ．Ｆｒｏｓｔｙ（商標）装置が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、制御された速度の凍結装置は、約－０．１℃／分～約－１０℃／分の速度で冷却する、ＩＰＡを含まない制御された速度の凍結装置である。いくつかの実施形態では、制御された速度の凍結装置は、約－０．１℃／分～約－１０℃／分、約－０．２℃／分～約－５℃／分、約－０．５℃／分～約－２．５℃／分、約－１℃／分～約－２℃／分の速度で冷却する、ＩＰＡを含まない制御された速度の凍結装置である。いくつかの実施形態では、制御された速度の凍結装置は、約－１℃／分の速度で冷却するＩＰＡフリーの制御された速度の凍結装置である。
【０７８３】
いくつかの実施形態では、制御された速度の凍結装置の位置のすべては、凍結保存培地を含有する閉鎖可能な容器で満たされる。いくつかの実施形態では、制御された速度の凍結装置の位置の９０％以上は、凍結保存培地を含有する閉鎖可能な容器で満たされる。いくつかの実施形態では、制御された速度の凍結装置の位置の８０％以上は、凍結保存培地を含有する閉鎖可能な容器で満たされる。いくつかの実施形態では、制御された速度の凍結装置の位置の７０％以上は、凍結保存培地を含有する閉鎖可能な容器で満たされる。いくつかの実施形態では、制御された速度の凍結装置の位置の６０％以上は、凍結保存培地を含有する閉鎖可能な容器で満たされる。いくつかの実施形態では、制御された速度の凍結装置の位置の５０％以上は、凍結保存培地を含有する閉鎖可能な容器で満たされる。いくつかの実施形態では、制御された速度の凍結装置の位置の４０％以上は、凍結保存培地を含有する閉鎖可能な容器で満たされる。
【０７８４】
本明細書で使用される「ゆっくりとした凍結方法」という用語は、液体窒素などで最終的に凍結保存する前に、試料を冷却環境で制御された速度で冷却するプロセスを指す。いくつかの実施形態では、冷却速度は、約－０．１℃／分～約－１０℃／分、約－０．２℃／分～約－５℃／分、約－０．５℃／分～約－２．５℃／分、約－１℃／分～約－２℃／分である。いくつかの実施形態では、冷却速度は、約－１℃／分である。いくつかの実施形態では、冷却環境は、約－９０℃、約－８９℃、約－８８℃、約－８７℃、約－８６℃、約－８５℃、約－８４℃、約－８３℃、約－８２℃、約－８１℃、約－８０℃、約－７９℃、約－７８℃、約－７７℃、約－７６℃、約－７５℃、約－７４℃、約－７３℃、約－７２℃、約－７２℃、約－７１℃、もしくはその間の任意の温度などの約－９０℃～約７０℃の間に設定された－８０℃冷凍庫またはドライアイスである。
【０７８５】
いくつかの実施形態では、ゆっくりとした凍結は、制御された速度の凍結装置を約－７０℃～約－９０℃の温度でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、ゆっくりとした凍結は、制御された速度の凍結装置を約－７５℃～約－８５℃の温度でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、ゆっくりとした凍結は、制御された速度の凍結装置を約－７８℃～約－８０℃の温度でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、ゆっくりとした凍結は、制御された速度の凍結装置をドライアイスでインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、ゆっくりとした凍結は、制御された速度の凍結装置を－８０℃の冷凍庫中でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、ゆっくりとした凍結は、制御された速度の凍結装置をドライアイス中でインキュベートすることを含む。
【０７８６】
いくつかの実施形態では、ゆっくりとした凍結は、制御された速度の凍結装置を約－８０℃の温度で約３～５時間インキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、ゆっくりとした凍結は、制御された速度の凍結装置を約－８０℃の温度で約３時間インキュ

ベートすることを含む。いくつかの実施形態では、ゆっくりとした凍結は、制御された速度の凍結装置を約－８０℃の温度で約４時間インキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、ゆっくりとした凍結は、制御された速度の凍結装置を約－８０℃の温度で約５時間インキュベートすることを含む。

【０７８７】

いくつかの実施形態では、凍結から回復した後、細胞は、少なくとも約８０％の解凍後生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結から回復した後、細胞は、少なくとも約７５％の解凍後生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結から回復した後、細胞は、少なくとも約７０％の解凍後生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結から回復した後、細胞は、少なくとも約６５％の解凍後生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結から回復した後、細胞は、少なくとも約６０％の解凍後生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結から回復した後、細胞は、少なくとも約５５％の解凍後生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結から回復した後、細胞は、少なくとも約５０％の解凍後生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結から回復した後、細胞は、少なくとも約４５％の解凍後生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結から回復した後、細胞は、少なくとも約４０％の解凍後生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結から回復した後、細胞は、少なくとも約３５％の解凍後生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結から回復した後、細胞は、少なくとも約３０％の解凍後生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結から回復した後、細胞は、少なくとも約２５％の解凍後生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結から回復した後、細胞は、少なくとも約２０％の解凍後生存率を有する。本開示を考慮して、当該技術分野で既知の解凍後生存率を測定または決定するための任意の好適な方法が、本明細書に記載の方法において使用され得る。

【０７８８】

いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、ＲＰＭＩ１６４０、２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼであるが、これらに限定されない酵素培地中で腫瘍をインキュベートすること、続いて、機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって生成される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはタイプのコラゲナーゼを含む）、Ａｃｃｕｔａｓｅ（商標）、Ａｃｃｕｍａｘ（商標）、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、キモトリプシン、キモパパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパイン、プロテアーゼタイプＸＩＶ（プロナーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）、トリプシン阻害剤、任意の他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びこれらの任意の組み合わせ等の１つ以上の解離（消化）酵素を含むが、これらに限定されない腫瘍解離酵素混合物の中に配置される。他の実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはタイプのコラゲナーゼを含む）、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）及びデオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）を含む腫瘍解離酵素混合物中に配置される。

【０７８９】

ＩＶ．遺伝子編集プロセス

Ａ．概要：ＴＩＬ拡張＋遺伝子編集

本発明のいくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を拡張するための方法に関し、本方法は、それらの治療効果を増強するために、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集する１つ以上のステップを含む。本明細書で使用される場合、「遺伝子編集」、「遺伝子編集」、及び「ゲノム編集」は、ＤＮＡが細胞のゲノム内で永続的に修飾され、例えば、ＤＮＡが細胞のゲノム内で挿入、欠失、修飾、または置換される遺伝子修飾のタイプを指す。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ＤＮＡ配列の発現をサイレンシング（遺伝子ノックアウトと称されることもある）または阻害／低減（遺伝子ノックダウンと称されることもある）させる。他の実施形態では、遺伝子編集は、ＤＮＡ配列の発現を増強させる（例えば、過剰発現を引き起こすことによって）。本発明の実施形態によれば、遺伝子編集技術は

、ＴＩＬの治療的集団の有効性を増強するために使用される。本発明の例示的な遺伝子編集プロセス／方法、ならびに遺伝子編集されたＴＩＬ産物はまた、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２２／１４４２５号、米国仮出願第６３／３０４，４９８号及び同第６３／２４２，３７３号に見出され得、これらはすべて、関連するすべての目的のために参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【０７９０】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態に従って実行することができ（例えば、プロセス２Ａとして知られる例示的なＴＩＬ拡張法を以下に記載する）、この方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。さらなる実施形態によれば、ＴＩＬを治療的集団のＴＩＬに拡張するための方法は、米国特許第１０，５１７，８９４号、米国特許出願公開第２０２０／０１２１７１９Ａ１号、または米国特許第１０，８９４，０６３号（これらは参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている方法のうちのいずれかの実施形態に従って実行され、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。したがって、本発明のいくつかの実施形態は、本明細書に記載される任意の実施形態に従って拡張された治療的ＴＩＬ集団を提供し、治療的集団の少なくとも一部は遺伝子編集されており、例えば、注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部は、永続的に遺伝子編集される。

【０７９１】

ＴＩＬ集団を拡張するための方法を対象とする本発明のいくつかの実施形態では、方法は、（ｉ）培養物中で拡張するときのサイトカインへの依存性の低減及び／または（ｉｉ）治療効果の増強を伴って、修飾されたＴＩＬを生成するために、免疫調節タンパク質、例えば、膜アンカーに融合した免疫調節タンパク質を含む免疫調節融合タンパク質の一過性発現のために、ＴＩＬ核酸、例えば、ｍＲＮＡの少なくとも一部に導入する１つ以上のステップを含む。本明細書で使用される場合、「一過性遺伝子編集」、「一過性遺伝子編集」、「一過性表現型改変」、「一過性表現型修飾」、「一過性表現型改変」、「一時的表現型修飾」、「一過性細胞変化」、「一過性細胞修飾」、「一時的細胞改変」、「一時的細胞修飾」、「一過性発現」、「発現の一過性改変」、「タンパク質発現の一過性改変」、「一過性修飾」、「一時的表現型改変」、「非永続的表現型改変」、「一過的に修飾された」、「一時的に修飾された」、「非永続的に修飾された」、「一過的に改変された」、「一時的に改変された」、前述のうちのいずれかの文法的変形、及び同様の意味を有する任意の発現は、細胞表面上の膜アンカー免疫調節融合タンパク質の一過的表示などの、細胞における一過性または非永続的表現型変化をもたらすために、核酸（例えば、ｍＲＮＡ）が細胞内に導入される（例えば、エレクトロポレーションによる細胞への核酸の移入、リン酸カルシウムトランスフェクション、ウイルス形質導入など）、及び細胞において発現される（例えば、膜アンカーに融合された免疫調節タンパク質を含む免疫調節融合タンパク質などの免疫調節タンパク質の発現）細胞修飾または表現型変化のタイプを指す。本発明の実施形態によれば、一過性表現型改変技術は、培養物中のＴＩＬの拡張におけるサイトカインへの依存を低減する、及び／または治療的ＴＩＬ集団の有効性を高めるために使用される。

【０７９２】

いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、本明細書に提供される免疫調節融合タンパク質をコードする核酸の細胞内送達のために使用される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。ＳＱＺプラットフォームは、Ｔ細胞を含む様々な一次ヒト細胞に核酸及びタンパク質を送達することができる（Ｓｈａｒｅｉ ｅｔ ａｌ．ＰＮＡＳ ２０１３、ならびにＳｈａｒｅｉ ｅｔ ａｌ．ＰＬＯＳ ＯＮＥ ２０１５及びＧｒｅｉｓｂｅｃｋ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ｖｏｌ．１９５，２０１５）。ＳＱＺプラットフォームでは、修飾のための細胞（例えば、ＴＩＬ）の細胞膜は、マイクロ流体収縮によって一時的に破壊され、それによって、免疫調節融合タンパク質をコード

する核酸を細胞内に送達することを可能にする。国際特許出願公開第ＷＯ２０１３／０５９３４３Ａ１号、同第ＷＯ２０１７／００８０６３Ａ１号、または同第ＷＯ２０１７／１２３６６３Ａ１号、または米国特許出願公開第２０１４／０２８７５０９Ａ１号、同第２０１８／０２０１８８９Ａ１号、または同第２０１８／０２４５０８９Ａ１号（参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に記載のそうような方法は、対象の免疫調節融合タンパク質をコードする核酸をＴＩＬ集団に送達するために本発明とともに用いられ得る。いくつかの実施形態では、送達された核酸は、修飾されたＴＩＬにおける免疫調節融合タンパク質の一過性のタンパク質発現を可能にする。いくつかの実施形態では、ＳＱＺプラットフォームは、免疫調節融合タンパク質をコードする送達核酸をＴＩＬ細胞ゲノムに安定的に組み込むために使用される。ＳＱＺプラットフォーム及びその使用に関する追加の例示的な開示は、国際特許出願公開第ＷＯ／２０１９／１３６４５６号に見出され得、これはすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０７９３】

Ｂ．ＴＩＬ拡張中の遺伝子編集／一過性表現型改変のタイミング

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、

（ｃ）ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３（例えば、ＯＫＴ－３は拡張プロセスの開始日に開始して細胞培地中に存在し得る）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

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

（ｅ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、

（ｆ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｇ）ステップ（ｆ）の注入バッグへの移行前の方法中の任意の時点で、ＴＩＬ細胞の少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬ細胞の表面上に免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む免疫調節組成物を発現させることと、を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【０７９４】

上記の実施形態のステップ（ｇ）に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ステップ（ｆ）における注入バッグへの移送前のＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよく、これは、遺伝子編集が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）のうちのいずれかの間、

または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｅ）のうちのいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行されてもよいことを意味する。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、拡張方法中に収集され（例えば、拡張方法は、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、拡張プロセスを継続するために拡張方法に戻され（例えば、培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬを活性化し、活性化されたＴＩＬに対して遺伝子編集ステップを行い、本明細書に記載のプロセスに従って遺伝子編集ＴＩＬを拡張することによって、拡張の前に実行されてもよい。いくつかの実施形態では、遺伝子編集のための核酸は、マイクロ流体プラットフォームを使用してＴＩＬに送達される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０７９５】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、第１のＴＩＬ拡張ステップの後に実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、第１のＴＩＬ拡張ステップの後及び第２の拡張ステップの前に実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬが活性化された後に実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、第１の拡張ステップの後、及びＴＩＬが活性化された後、しかし第２の拡張ステップの前に実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、第１の拡張ステップの後及びＴＩＬが活性化された後に実行され、ＴＩＬは、遺伝子編集の後及び第２の拡張ステップの前に静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集後、及び第２の拡張ステップの前に、約１～２日間静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニストは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体であり、抗ＣＤ２８アゴニストは、抗ＣＤ２８アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体は、ＯＫＴ－３である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズは、ＭｉｌｔｅｎｙｉのＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）生成物である。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、レトロウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、レンチウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー免疫調節融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、２つ以上の異なる膜結合融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で免疫調節組成物を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節融合タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。

【０７９６】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、レトロウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、レンチウイルス形質導入

によって実行される。

【０７９７】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、

（ｃ）ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３（例えば、ＯＫＴ－３は拡張プロセスの開始日に開始して細胞培地中に存在し得る）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第２のＴＩＬ集団におけるＴＩＬ細胞の少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬ細胞の表面上に免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む免疫調節組成物を発現させることと、

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

（ｆ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、

（ｇ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含む。

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集ステップ後及び第２の拡張ステップ前に静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集後、及び第２の拡張ステップの前に、約１～２日間静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニストは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体であり、抗ＣＤ２８アゴニストは、抗ＣＤ２８アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体は、ＯＫＴ－３である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズは、ＭｉｌｔｅｎｙｉのＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）生成物である。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で約２日間、ＴＩＬのレトロウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で約２日間、ＴＩＬのレンチウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー免疫調節融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、２つ以上の異なる膜結合融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、免

疫調節組成物は、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で免疫調節組成物を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節融合タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。

【０７９８】

拡張プロセスの代替実施形態は、上記に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｇ）を有し得ないか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える拡張を含み得、第３または第４の拡張中にＴＩＬに対して遺伝子編集が実施され得ることなどが可能である。

【０７９９】

他の実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、

（ｃ）ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３（例えば、ＯＫＴ－３は拡張プロセスの開始日に開始して細胞培地中に存在し得る）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

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

（ｅ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、

（ｆ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｇ）ステップ（ｆ）における注入バッグへの移行前の方法中の任意の時点で、ＴＩＬ細胞の少なくとも一部に一過性表現型改変を導入して、ＴＩＬ細胞の表面上に免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む免疫調節組成物を発現させることと、を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、一過性表現型改変のための核酸は、マイクロ流体プラットフォームを使用してＴＩＬに送達される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まない

マイクロ流体プラットフォームである。

【０８００】

上記の実施形態のステップ（ｇ）に記載されるように、一過性表現型改変プロセスは、ステップ（ｆ）における注入バッグへの移送前のＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよく、これは、一過性表現型改変が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）のうちのいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｅ）のうちのいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行されてもよいことを意味する。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、拡張方法中に収集され（例えば、拡張方法は、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、一過性修飾プロセスに供され、場合によっては、その後、拡張プロセスを継続するために拡張方法に戻され（例えば、培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が、一過的に改変されて、ＴＩＬ細胞の表面上に免疫調節組成物を発現する。いくつかの実施形態では、一過性細胞修飾プロセスは、ＴＩＬを活性化し、活性化されたＴＩＬに対して一過性表現型改変ステップを行い、本明細書に記載のプロセスに従って修飾されたＴＩＬを拡張することによって、拡張の前に実行されてもよい。

【０８０１】

拡張プロセスの代替実施形態は、上記に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｇ）を有し得ないか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、一過性細胞修飾プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える拡張を含み得、第３または第４の拡張中にＴＩＬに対して一過性細胞修飾が実施され得ることなどが可能である。

【０８０２】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第１の集団、第２の集団、及び第３の集団のうちの１つ以上からのＴＩＬ上で実行される。例えば、遺伝子編集は、第１のＴＩＬ集団上で、または第１の集団から収集されたＴＩＬの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらのＴＩＬをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。代替的に、遺伝子編集は、第２もしくは第３の集団からのＴＩＬ上で、または第２もしくは第３の集団から収集されたＴＩＬの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらのＴＩＬをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。他の実施形態によれば、遺伝子編集は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び拡張が実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも拡張から「除去」されるわけではない。

【０８０３】

いくつかの実施形態によれば、一過性細胞修飾プロセスは、第１の集団、第２の集団、及び第３の集団のうちの１つ以上からのＴＩＬ上で実行される。例えば、一過性細胞修飾は、第１のＴＩＬ集団上で、または第１の集団から収集されたＴＩＬの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらの一過的に修飾されたＴＩＬをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。代替的に、一過性細胞修飾は、第２もしくは第３の集団からのＴＩＬ上で、または第２もしくは第３の集団から収集されたＴＩＬの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらの修飾されたＴＩＬをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。他の実施形態によれば、一過性細胞修飾は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び拡張が実行されている間に行われ、すなわち、一過性細胞修飾を実施するために必ずしも拡張から「除去」されるわけではない。

【０８０４】

他の実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第１の拡張からのＴＩＬ、または第２の拡張からのＴＩＬ、またはその両方で実行される。例えば、第１の拡張または第２の拡張中に、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され得、遺伝子編集プロ

セスの後、それらのＴＩＬは、その後、例えば、それらを培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

【０８０５】

他の実施形態によれば、一過性細胞修飾プロセスは、第１の拡張からのＴＩＬ、または第２の拡張からのＴＩＬ、またはその両方で実行される。例えば、第１の拡張または第２の拡張中に、一過性細胞修飾は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され得、一過性細胞修飾プロセスの後、それらの修飾されたＴＩＬは、その後、例えば、それらを培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

【０８０６】

他の実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第１の拡張後及び第２の拡張前にＴＩＬの少なくとも一部上で実行される。例えば、第１の拡張後に、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され得、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、例えば、それらを第２の拡張のための培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

【０８０７】

他の実施形態によれば、一過性細胞修飾プロセスは、第１の拡張後及び第２の拡張前にＴＩＬの少なくとも一部上で実行される。例えば、第１の拡張後に、一過性細胞修飾は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され得、一過性細胞修飾プロセスの後、それらの修飾されたＴＩＬは、その後、例えば、それらを第２の拡張のための培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

【０８０８】

代替実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、ステップ（ｃ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｂ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ（ｄ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｃ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ（ｅ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｄ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、またはステップ（ｆ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｅ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）に実行される。

【０８０９】

代替実施形態によれば、一過性細胞修飾プロセスは、ステップ（ｃ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｂ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ（ｄ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｃ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ（ｅ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｄ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、またはステップ（ｆ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｅ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）に実行される。

【０８１０】

ＯＫＴ－３に関しては、ある特定の実施形態によれば、細胞培養培地は、開始日（０日目）、または第１の拡張の１日目に開始するＯＫＴ－３を含んでもよく、その結果、遺伝子編集または一過性細胞修飾は、０日目及び／または１日目に細胞培養培地中でＯＫＴ－３に曝露した後にＴＩＬ上で実行される。他の実施形態によれば、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＯＫＴ－３を含み、ＯＫＴ－３が細胞培養培地に導入される前に、遺伝子編集または一過性細胞修飾が実行される。代替的に、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＯＫＴ－３を含み、ＯＫＴ－３が細胞培養培地中に導入された後に、遺伝子編集または一過性細胞修飾が実行される。

【０８１１】

４－１ＢＢアゴニストに関しては、ある特定の実施形態によれば、細胞培養培地は、開始日（０日目）、または第１の拡張の１日目に開始する４－１ＢＢを含んでもよく、その結果、遺伝子編集または一過性細胞修飾は、０日目及び／または１日目に細胞培養培地中で４－１ＢＢに曝露した後にＴＩＬ上で実行されることも留意されたい。他の実施形態によれば、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中に４－１ＢＢを含み、４－１ＢＢアゴニストが細胞培養培地に導入される前に、遺伝子編集または一過性細胞修

飾が実行される。代替的に、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中に４－１ＢＢアゴニストを含み、４－１ＢＢアゴニストが細胞培養培地中に導入された後に、遺伝子編集または一過性細胞修飾が実行される。

【０８１２】

ＩＬ－２に関しては、ある特定の実施形態によれば、細胞培養培地は、開始日（０日目）、または第１の拡張の１日目に開始するＩＬ－２を含んでもよく、その結果、遺伝子編集または一過性細胞修飾は、０日目及び／または１日目に細胞培養培地中でＩＬ－２に曝露した後にＴＩＬ上で実行されることも留意されたい。他の実施形態によれば、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＩＬ－２を含み、ＩＬ－２が細胞培養培地に導入される前に、遺伝子編集または一過性細胞修飾が実行される。代替的に、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＩＬ－２を含み、ＩＬ－２が細胞培養培地中に導入された後に、遺伝子編集または一過性細胞修飾が実行される。

【０８１３】

上述のように、ＯＫＴ－３、４－１ＢＢアゴニスト及びＩＬ－２のうちの１つ以上は、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれてもよい。いくつかの実施形態によれば、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれ、及び／または４－１ＢＢアゴニストは、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれ、及び／またはＩＬ－２は、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれる。他の実施例によれば、細胞培養培地は、第１の拡張の０日目または１日目に開始するＯＫＴ－３及び４－１ＢＢアゴニストを含む。他の実施例によれば、細胞培養培地は、第１の拡張の０日目または１日目に開始するＯＫＴ－３、４－１ＢＢアゴニスト、及びＩＬ－２を含む。当然のことながら、本明細書に記載の様々な実施形態に記載されるように、ＯＫＴ－３、４－１ＢＢアゴニスト及びＩＬ－２のうちの１つ以上を、拡張プロセス中の１つ以上の追加の時点で細胞培地に添加してもよい。

【０８１４】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～２日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を活性化することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、活性化することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団におけるＴＩＬ細胞の少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬ細胞の表面上に免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む免疫調節組成物を発現させることと、

（ｆ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集ステップ後及び第２の拡張ステップ前に静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集後、及び第２の拡張ステップの前に、約１～２日間静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、約２日間の抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニストは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体であり、抗ＣＤ２８アゴニストは、抗ＣＤ２８アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体は、ＯＫＴ－３である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズは、ＭｉｌｔｅｎｙｉのＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）生成物である。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で約２日間、ＴＩＬのレトロウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で約２日間、ＴＩＬのレンチウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー免疫調節融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、２つ以上の異なる膜結合融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で免疫調節組成物を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節融合タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。

【０８１５】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含み、
第２のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの滅菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【０８１６】
他の実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの核酸分子を第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含み、
第２のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの核酸分子の無菌エレクトロポレーシ

ョンが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【０８１７】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含み、

第２のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの滅菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【０８１８】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一過的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含み、
第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に送達される少なくとも１つの遺伝子エディターが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。
【０８１９】
他の実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一過的に破壊して、少なくとも１つの核酸分子を第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含み、
第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に送達される少なくとも１つの核酸分子が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。
【０８２０】
いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一過的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ

集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含み、
第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に送達される少なくとも１つの遺伝子エディターが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。
【０８２１】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの滅菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【０８２２】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～

７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第２のＴＩＬ集団におけるＴＩＬ細胞の少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬ細胞の表面上に免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む免疫調節組成物を発現させることと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む。
【０８２３】
いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト　ＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集ステップ後及び第２の拡張ステップ前に静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集後、及び第２の拡張ステップの前に、約１～２日間静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、約２日間の抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニストは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体であり、抗ＣＤ２８アゴニストは、抗ＣＤ２８アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体は、ＯＫＴ－３である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズは、ＭｉｌｔｅｎｙｉのＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）生成物である。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で約２日間、ＴＩＬのレトロウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で約２日間、ＴＩＬのレンチウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー免疫調節融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、２つ以上の異なる膜結合融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で免疫調節組成物を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節融合タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。
【０８２４】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に送達される少なくとも１つの核酸分子が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【０８２５】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団におけるＴＩＬ細胞の少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬ細胞の表面上に免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む免疫調節組成物を発現させることと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む。
【０８２６】
いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集ステップ後及び第２の拡張ステップ前に静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集後、及び第２の拡張ステップの前に、約１～２日間静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、約２日間の抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニストは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体であり、抗ＣＤ２８アゴニストは、抗ＣＤ２８アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体は、ＯＫＴ－３である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズは、ＭｉｌｔｅｎｙｉのＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）生成物である。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で約２日間、ＴＩ

Ｌのレトロウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で約２日間、ＴＩＬのレンチウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー免疫調節融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、２つ以上の異なる膜結合融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で免疫調節組成物を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節融合タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。

【０８２７】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの滅菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【０８２８】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～

７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に送達される少なくとも１つの核酸分子が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【０８２９】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。
【０８３０】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの核酸分子の移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。
【０８３１】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。
【０８３２】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの核酸分子の移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【０８３３】

いくつかの実施形態では、前述の方法のうちのいずれかは、第４のＴＩＬ集団を培養するステップが、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第５のＴＩＬ集団の培養物を産生するステップと、
（ｇ）第５のＴＩＬ集団の培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～７日間培養し、複数のサブ培養物を組み合わせて、増加した数のＴＩＬを提供するステップとで置き換えられるように修正される。

【０８３４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８３５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第７のＴＩＬ集団を活性化するステップが約２～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８３６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第７のＴＩＬ集団を活性化するステップが約３～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８３７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第７のＴＩＬ集団を活性化するステップが約４～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８３８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第７のＴＩＬ集団を活性化するステップが約５～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８３９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第７のＴＩＬ集団を活性化するステップが約６～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８４０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第６のＴＩＬ集団を活性化するステップが約１～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８４１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第５のＴＩＬ集団を活性化するステップが約１～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８４２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第４のＴＩＬ集団を活性化するステップが約１～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８４３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３のＴＩＬ集団を活性化するステップが約１～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８４４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約１～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８４５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第６のＴＩＬ集団を活性化するステップが約２～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８４６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第６のＴＩＬ集団を活性化するステップが約３～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８４７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第６のＴＩＬ集団を活性化するステップが約４～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８４８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第６のＴＩＬ集団を活性化するステップが約５～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８４９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第５のＴＩＬ集団を活性化するステップが約３～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８５０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第４のＴＩＬ集団を活性化するステップが約３～

２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８５１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第５のＴＩＬ集団を活性化するステップが約２～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８５２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第４のＴＩＬ集団を活性化するステップが約２～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８５３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３のＴＩＬ集団を活性化するステップが約２～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８５４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第５のＴＩＬ集団を活性化するステップが約４～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８５５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８５６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８５７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８５８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８５９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８６０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８６１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８６２】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／また

は受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの滅菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【０８６３】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの核酸分子を第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの核酸分子の無菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【０８６４】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子

エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第２のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの滅菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－２１からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【０８６５】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの核酸分子を第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第２のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの核酸分子の無菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【０８６６】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと

、を含み、
第２のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０８６７】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの核酸分子を第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第２のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０８６８】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地

中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第２のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０８６９】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの核酸分子を第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第２のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの核酸分子の移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０８７０】

いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、第３のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約１～７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３～７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【０８７１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日または１１日間

行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８７２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８７３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約５～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８７４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約６～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８７５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約７～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８７６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約８～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８７７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約９～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８７８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約１０～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８７９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８８０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約５～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８８１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約６～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８８２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約７～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８８３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約８～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８８４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約９～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８８５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約４～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８８６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８８７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８８８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８８９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８９０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約３～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８９１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約３～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８９２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約３～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８９３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約３～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８９４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約３～４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８９５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約４～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８９６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養

するステップが、約４～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８９７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約４～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８９８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約４～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０８９９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９００】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９０１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９０２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９０３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９０４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９０５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約４～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９０６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９０７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９０８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９０９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９１０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９１１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９１２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９１３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９１４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９１５】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの滅菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【０９１６】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの核酸分子の無菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【０９１７】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの滅菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【０９１８】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの核酸分子の無菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【０９１９】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いく

つかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０９２０】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの核酸分子の移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０９２１】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１

８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０９２２】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの核酸分子の移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０９２３】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第３の細胞培養培地中で約１～７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第４の培養培地中で約３～７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【０９２４】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を第１の培養培地中で培養するステップにおいて、第１の培養培地は、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体をさらに含む。

【０９２５】

いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体は、第１の培養培地中にＯＫＴ－３を含む。

【０９２６】

いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で培養するステップに

おいて、第２の培養培地は、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体をさらに含む。

【０９２７】

いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体は、第２の培養培地中にＯＫＴ－３を含む。

【０９２８】

いくつかの実施形態によれば、前述の方法は、凍結保存培地を使用して採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することをさらに含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地はジメチルスルホキシド系凍結保存培地である。他の実施形態では、凍結保存培地は、ＣＳ１０である。

【０９２９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で培養するステップが約２～３日間行われるように、該当する場合に修正された、上記の任意の前段落に記載の方法を提供する。

【０９３０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で培養するステップが約３～４日間行われるように、該当する場合に修正された、上記の任意の前段落に記載の方法を提供する。

【０９３１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で培養するステップが約２日間行われるように、該当する場合に修正された、上記の任意の前段落に記載の方法を提供する。

【０９３２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で培養するステップが約３日間行われるように、該当する場合に修正された、上記の任意の前段落に記載の方法を提供する。

【０９３３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で培養するステップが、約４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９３４】

いくつかの実施形態では、本発明は、該当する場合に第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、１４日、または１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９３５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９３６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９３７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９３８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約９～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９３９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１０～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９４０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１１～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９４１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１２～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９４２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１３～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９４３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１４～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９４４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９４５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９４６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９４７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９４８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約９～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９４９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１０～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９５０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１１～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９５１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の

細胞培養培地中で培養するステップが、約１２～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９５２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１３～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９５３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９５４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９５５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９５６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９５７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９５８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９５９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９６０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９６１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９６２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９６３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９６４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９６５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９６６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９６７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９６８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９６９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９７０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９７１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９７２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９７３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９７４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９７５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９７６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の

細胞培養培地中で培養するステップが、約８～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９７７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９７８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９７９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約９～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９８０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約９～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９８１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約９～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９８２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約９～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９８３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１０～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９８４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１０～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９８５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１０～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９８６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１１～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９８７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１１～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９８８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１２～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０９８９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９９０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９９１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９９２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９９３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９９４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９９５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９９６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９９７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９９８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０９９９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１０００】
いくつかの実施形態によれば、前述の方法のうちのいずれかを使用して、がんを有するヒト対象の治療のために自己採取されたＴＩＬ集団を提供することができる。
【１００１】
Ｃ．ＰＤ－１　ＴＡＬＥＮノックダウン
いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方

法は、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、
を含む。
【１００２】
いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、
を含む。
【１００３】
いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第５のＴＩＬ集団の培養物を産生することと、
（ｆ）第５のＴＩＬ集団の培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～７日間培養し、複数のサブ培養物を組み合わせて、増加した数のＴＩＬを提供することと、を含む。
【１００４】
いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第５のＴＩＬ集団の培養物を産生するステップと、
（ｇ）第５のＴＩＬ集団の培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～７日間培養し、複数のサブ培養物を組み合わせて、増加した数のＴＩＬを提供するステップとで置き換えられるように修正される。

【１００５】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３～９日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３～９日、約３～８日、約４～８日、約５～８日、約６～８日、約７～８日、約３～７日、約４～７日、約５～７日、約６～７日、約３～６日、約４～６日、約５～６日、約３～５日、約４～５日、約３～４日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約７日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約８日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約９日間行われる。

【１００６】

いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約１～７日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約１～７日、約１～６日、約２～６日、約３～６日、約４～６日、約５～６日、約１～５日、約２～５日、約３～５日、約４～５日、約１～４日、約２～４日、約３～４日、約１～３日、約２～３日、約１～２日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約１日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約２日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約７日間行われる。

【１００７】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５～１５日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５～１５日、約６～１５日、約７～１５日、約８～１５日、約９～１５日、約１０～１５日、約１１～１５日、約１２～１５日、約１３～１５日、約１４～１５日、約５～１４日、約６～１４日、約７～１４日、約８～１４日、約９～１４日、約１０～１４日、約１１～１４日、約１２～１４日、約１３～１４日、約５～１３日、約６～１３日、約７～１３日、約８～１３日、約９～１３日、約１０～１３日、約１１～１３日、約１２～１３日、約５～１２日、約６～１２日、約７～１２日、約８～１２日、約９～１２日、約１０～１２日、約１１～１２日、約５～１１日、６～１１日、７～１１日、約８～１１日、約９～１１日、約１０～１１日、約５～１０日、６～１０日、７～１０日、約８～１０日、約９～１０日

、約５～９日、６～９日、７～９日、約８～９日、約５～８日、約６～８日、７～８日、約５～７日、約６～７日、約５～６日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約７日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約８日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約９日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１０日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１１日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１２日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１３日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１４日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１５日間行われる。

【１００８】

いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２２日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約８日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約９日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１０日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１１日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１２日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１３日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１４日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１５日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１６日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１７日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１８日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１９日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２０日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２１日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２２日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２３日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２４日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２５日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２６日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２７日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２８日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２９日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約３０日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約３１日の期間内に完了する。

【１００９】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０１０】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０１１】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団

を第２の培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０１２】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０１３】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０１４】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０１５】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０１６】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０１７】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０１８】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０１９】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２

を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０２０】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０２１】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０２２】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０２３】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０２４】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０２５】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０２６】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０２７】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０２８】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１０２９】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１０３０】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１０３１】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１０３２】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１０３３】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１０３４】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１０３５】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１０３６】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団

を第２の培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０３７】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０３８】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０３９】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０４０】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０４１】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０４２】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０４３】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０４４】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２

を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０４５】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０４６】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行され得、これは、遺伝子編集が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｅ）、（ａ）～（ｆ）、もしくは（ａ）～（ｇ）のうちのいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｅ）、（ａ）～（ｆ）、もしくは（ａ）～（ｇ）のうちのいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行され得ることを意味する。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で２回以上実行され得る。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、培養ステップ中に収集され（例えば、培養ステップは、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、培養ステップを継続するために培養ステップに戻され（例えば、培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。

【１０４７】

拡張プロセスの代替実施形態は、上に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｅ）、（ａ）～（ｆ）、もしくは（ａ）～（ｇ）を有しなくてもよいか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える培養ステップを含み得、第３または第４の培養ステップ中にＴＩＬに対して遺伝子編集が実施され得ることなどが可能である。

【１０４８】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び培養ステップが実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも培養ステップから「除去」されるわけではない。いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、培養培地に戻される。

【１０４９】

いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、

を含む。

【１０５０】

いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または

受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、
を含む、方法を提供する。

【１０５１】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３～９日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３～９日、約３～８日、約４～８日、約５～８日、約６～８日、約７～８日、約３～７日、約４～７日、約５～７日、約６～７日、約３～６日、約４～６日、約５～６日、約３～５日、約４～５日、約３～４日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップ５日。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約７日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約８日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約９日間行われる。

【１０５２】

いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５～１５日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５～１５日、約６～１５日、約７～１５日、約８～１５日、約９～１５日、約１０～１５日、約１１～１５日、約１２～１５日、約１３～１５日、約１４～１５日、約５～１４日、約６～１４日、約７～１４日、約８～１４日、約９～１４日、約１０～１４日、約１１～１４日、約１２～１４日、約１３～１４日、約５～１３日、約６～１３日、約７～１３日、約８～１３日、約９～１３日、約１０～１３日、約１１～１３日、約１２～１３日、約５～１２日、約６～１２日、約７～１２日、約８～１２日、約９～１２日、約１０～１２日、約１１～１２日、約５～１１日、６～１１日、７～１１日、約８～１１日、約９～１１日、約１０～１１日、約５～１０日、６～１０日、７～１０日、約８～１０日、約９～１０日、約５～９日、６～９日、７～９日、約８～９日、約５～８日、約６～８日、７～８日、約５～７日、約６～７日、約５～６日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約７日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約８日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約９日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１０日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１１日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１２日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１３日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１４日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１５日間行われる。

【１０５３】

いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２２日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約８日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約９日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のス

テップは、約１０日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１１日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１２日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１３日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１４日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１５日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１６日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１７日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１８日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１９日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２０日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２１日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２２日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２３日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２４日の期間内に完了する。

【１０５４】

いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、第３のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０５５】

いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、第３のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０５６】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行され得、これは、遺伝子編集が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｄ）もしくは（ａ）～（ｅ）のうちのいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｄ）もしくは（ａ）～（ｅ）のうちのいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行され得ることを意味する。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で２回以上実行され得る。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、培養ステップ中に収集され（例えば、培養ステップは、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、培養ステップを継続するために培養ステップに戻され（例えば、培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。

【１０５７】

拡張プロセスの代替実施形態は、上に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｄ）もしくは（ａ）～（ｅ）を有しなくてもよいか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える培養ステップを含み得、第３または第４の培養ステップ中にＴＩＬに対して遺伝子編集が実施され得ることなどが可能である。

【１０５８】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び培養ステップが実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも培養ステップから「除去」されるわけではない。いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され、遺伝子編集プロセスの後、それ

らのＴＩＬは、その後、培養培地に戻される。
【１０５９】
いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第４のＴＩＬ集団の培養物を産生することと、
（ｅ）第４のＴＩＬ集団の培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～７日間培養し、複数のサブ培養物を組み合わせて、増加した数のＴＩＬを含む第５のＴＩＬ集団を提供することと、を含む。
【１０６０】
いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第４のＴＩＬ集団の培養物を産生することと、
（ｆ）第４のＴＩＬ集団の培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～７日間培養し、複数のサブ培養物を組み合わせて、増加した数のＴＩＬを含む第５のＴＩＬ集団を提供することと、を含む。
【１０６１】
いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３～９日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３～９日、約３～８日、約４～８日、約５～８日、約６～８日、約７～８日、約３～７日、約４～７日、約５～７日、約６～７日、約３～６日、約４～６日、約５～６日、約３～５日、約４～５日、約３～４日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約７日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約８日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約９日間行われる。
【１０６２】
いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１～７日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１～７日、約２～７日、約３～７日、約４～７日、約５～７日、約６～７日、約１～６日、約２～６日、約３～６日、約４～６日、約５～６日、約１～５日、約２～５日、約３～５日、約４

～５日、約１～４日、約２～４日、約３～４日、約１～３日、約２～３日、約１～２日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約２日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約７日間行われる。

【１０６３】

いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約３～６日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約３～６日、約４～６日、約５～６日、約３～５日、約４～５日、約３～４日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約７日間行われる。

【１０６４】

いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２２日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約８日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約９日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１０日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１１日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１２日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１３日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１４日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１５日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１６日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１７日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１８日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１９日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２０日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２１日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２２日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２３日の期間内に完了する。

【１０６５】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行され得、これは、遺伝子編集が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｅ）もしくは（ａ）～（ｆ）のうちのいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｅ）もしくは（ａ）～（ｆ）のうちのいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行され得ることを意味する。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で２回以上実行され得る。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、培養ステップ中に収集され（例えば、培養ステップは、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、培養ステップを継続するために培養ステップに戻され（例えば、培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。

【１０６６】

拡張プロセスの代替実施形態は、上に示される方法とは異なり得ることに留意されたく

、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｅ）もしくは（ａ）～（ｆ）を有しなくてもよいか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える培養ステップを含み得、第３または第４の培養ステップ中にＴＩＬに対して遺伝子編集が実施され得ることなどが可能である。

【１０６７】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び培養ステップが実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも培養ステップから「除去」されるわけではない。いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、培養培地に戻される。

【１０６８】

いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、

を含む。

【１０６９】

いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、

を含む。

【１０７０】

いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を培養するステップは、約２～４日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約２～４日、約３～４日、約２～３日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を培養するステップは、約２日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約２日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約２日間行われる。

【１０７１】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５～１５日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５～１５

日、約６～１５日、約７～１５日、約８～１５日、約９～１５日、約１０～１５日、約１１～１５日、約１２～１５日、約１３～１５日、約１４～１５日、約５～１４日、約６～１４日、約７～１４日、約８～１４日、約９～１４日、約１０～１４日、約１１～１４日、約１２～１４日、約１３～１４日、約５～１３日、約６～１３日、約７～１３日、約８～１３日、約９～１３日、約１０～１３日、約１１～１３日、約１２～１３日、約５～１２日、約６～１２日、約７～１２日、約８～１２日、約９～１２日、約１０～１２日、約１１～１２日、約５～１１日、６～１１日、７～１１日、約８～１１日、約９～１１日、約１０～１１日、約５～１０日、６～１０日、７～１０日、約８～１０日、約９～１０日、約５～９日、６～９日、７～９日、約８～９日、約５～８日、約６～８日、７～８日、約５～７日、約６～７日、約５～６日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約７日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約８日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約９日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１０日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１１日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１２日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１３日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１４日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１５日間行われる。

【１０７２】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０７３】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０７４】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０７５】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０７６】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数の

サブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１０７７】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１０７８】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１０７９】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１０８０】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１０８１】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１０８２】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１０８３】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１０８４】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１０８５】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０８６】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０８７】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０８８】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０８９】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０９０】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０９１】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０９２】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０９３】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終

了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０９４】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０９５】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０９６】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０９７】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０９８】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１０９９】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１００】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１０１】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数の

サブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１１０２】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１１０３】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１１０４】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１１０５】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１１０６】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１１０７】
いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２２日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約８日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約９日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１０日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１１日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１２日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１３日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１４日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１５日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１６日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１７日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１８日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１９日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２０日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２１日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２２日の期間内に完了する。
【１１０８】
いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行され得、これは、遺伝子編集が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）もしくは（ａ）～（

ｇ）のうちのいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）もしくは（ａ）～（ｇ）のうちのいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行され得ることを意味する。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で２回以上実行され得る。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、培養ステップ中に収集され（例えば、培養ステップは、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、培養ステップを継続するために培養ステップに戻され（例えば、培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。

【１１０９】

拡張プロセスの代替実施形態は、上に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｆ）もしくは（ａ）～（ｇ）を有しなくてもよいか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える培養ステップを含み得、第３または第４の培養ステップ中にＴＩＬに対して遺伝子編集が実施され得ることなどが可能である。

【１１１０】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び培養ステップが実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも培養ステップから「除去」されるわけではない。いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、培養培地に戻される。

【１１１１】

いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第４のＴＩＬ集団の培養物を産生することと、

（ｆ）第４のＴＩＬ集団の培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～７日間培養し、複数のサブ培養物を組み合わせて、増加した数のＴＩＬを含む第５のＴＩＬ集団を提供することと、を含む。

【１１１２】

いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生す

ることと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第５のＴＩＬ集団の培養物を産生するステップと、
（ｇ）第５のＴＩＬ集団の培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～７日間培養し、複数のサブ培養物を組み合わせて、増加した数のＴＩＬを含む第５のＴＩＬ集団を提供することと、を含む。
【１１１３】
いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を培養するステップは、約２～４日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約２～４日、約３～４日、約２～３日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を培養するステップは、約２日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約２日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約２日間行われる。
【１１１４】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１～７日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１～７日、約１～６日、約２～６日、約３～６日、約４～６日、約５～６日、約１～５日、約２～５日、約３～５日、約４～５日、約１～４日、約２～４日、約３～４日、約１～３日、約２～３日、約１～２日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約２日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約７日間行われる。
【１１１５】
いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約３～６日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約３～６日、約４～６日、約５～６日、約３～５日、約４～５日、約３～４日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約７日間行われる。
【１１１６】
いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２２日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約８日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約９日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１０日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１１日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１２日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１３日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１４日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１５日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１６日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１７日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１８日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１９日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２０日の

期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２１日の期間内に完了する。

【１１１７】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行され得、これは、遺伝子編集が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）もしくは（ａ）～（ｇ）のうちのいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）もしくは（ａ）～（ｇ）のうちのいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行され得ることを意味する。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で２回以上実行され得る。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、培養ステップ中に収集され（例えば、培養ステップは、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、培養ステップを継続するために培養ステップに戻され（例えば、培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。

【１１１８】

拡張プロセスの代替実施形態は、上に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｆ）もしくは（ａ）～（ｇ）を有しなくてもよいか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える培養ステップを含み得、第３または第４の培養ステップ中にＴＩＬに対して遺伝子編集が実施され得ることなどが可能である。

【１１１９】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び培養ステップが実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも培養ステップから「除去」されるわけではない。いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、培養培地に戻される。

【１１２０】

いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、約３～９日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、増加した数のＴＩＬ集団を取得することであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日間進行することができる、増加した数のＴＩＬ集団を取得することと、を含む。

【１１２１】

いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方

法は、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、約３～９日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、増加した数のＴＩＬ集団を取得することであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日間進行することができる、増加した数のＴＩＬ集団を取得することと、を含む。
【１１２２】
いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍断片を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、約１～９日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、増加した数のＴＩＬ集団を取得することであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日間進行することができる、増加した数のＴＩＬ集団を取得することを含む。
【１１２３】
いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍断片を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、約１～９日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｄ）第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、増加した数のＴＩＬ集団を取得することであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日間進行することができる、増加した数のＴＩＬ集団を取得することを含む。

【１１２４】

いくつかの実施形態では、初期拡張は、約３～９日間行われる。いくつかの実施形態では、初期拡張は、約１～９日、２～９日、３～９日、約４～９日、約５～９日、約６～９日、約７～９日、約８～９日、約１～８日、約２～８日、約３～８日、約４～８日、約５～８日、約６～８日、約７～８日、約１～７日、約２～７日、約３～７日、約４～７日、約５～７日、約６～７日、約１～６日、約２～６日、約３～６日、約４～６日、約５～６日、約１～５日、約２～５日、約３～５日、約４～５日、約１～４日、約２～４日、約３～４日、約１～３日、約２～３日、または約１～２日間行われる。いくつかの実施形態では、初期拡張は、約１日間行われる。いくつかの実施形態では、初期拡張は、約２日間行われる。いくつかの実施形態では、初期拡張は、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、初期拡張は、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、初期拡張は、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、初期拡張は、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、初期拡張は、約７日間行われる。いくつかの実施形態では、初期拡張は、約８日間行われる。いくつかの実施形態では、初期拡張は、約９日間行われる。

【１１２５】

いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約１～７日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約１～７日、約２～７日、約３～７日、約４～７日、約５～７日、約６～７日、約１～６日、約２～６日、約３～６日、約４～６日、約５～６日、約１～５日、約２～５日、約３～５日、約４～５日、約１～４日、約２～４日、約３～４日、約１～３日、約２～３日、または約１～２日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約１日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約２日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約７日間行われる。

【１１２６】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約５～１５日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約５～１５日、約６～１５日、約７～１５日、約８～１５日、約９～１５日、約１０～１５日、約１１～１５日、約１２～１５日、約１３～１５日、約１４～１５日、約５～１４日、約６～１４日、約７～１４日、約８～１４日、約９～１４日、約１０～１４日、約１１～１４日、約１２～１４日、約１３～１４日、約５～１３日、約６～１３日、約７～１３日、約８～１３日、約９～１３日、約１０～１３日、約１１～１３日、約１２～１３日、約５～１２日、約６～１２日、約７～１２日、約８～１２日、約９～１２日、約１０～１２日、約１１～１２日、約５～１１日、６～１１日、７～１１日、約８～１１日、約９～１１日、約１０～１１日、約５～１０日、６～１０日、７～１０日、約８～１０日、約９～１０日、約５～９日、６～９日、７～９日、約８～９日、約５～８日、約６～８日、７～８日、約５～７日、約６～７日、約５～６日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約７日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約８日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約９日間行われる。

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約１０日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約１１日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約１２日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約１３日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約１４日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約１５日間行われる。

【１１２７】

いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２２日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約８日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約９日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１０日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１１日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１２日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１３日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１４日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１５日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１６日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１７日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１８日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１９日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２０日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２１日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２２日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２３日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２４日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２５日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２６日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２７日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２８日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２９日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約３０日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約３１日の期間内に完了する。

【１１２８】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、第３のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、増加した数のＴＩＬを提供する。

【１１２９】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、第３のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、増加した数のＴＩＬを提供する。

【１１３０】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行され得、これは、遺伝子編集が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｅ）もしくは（ａ）～（ｆ）のうちのいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｅ）もしくは（ａ）～（ｆ）のうちのいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行され得ることを意味する。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で２回以上実行され得る。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、培養ステップ中に収集され（例えば、培養ステップは、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、培

養ステップを継続するために培養ステップに戻され（例えば、培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。

【１１３１】

拡張プロセスの代替実施形態は、上に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｅ）もしくは（ａ）～（ｆ）を有しなくてもよいか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える培養ステップを含み得、第３または第４の培養ステップ中にＴＩＬに対して遺伝子編集が実施され得ることなどが可能である。

【１１３２】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び培養ステップが実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも培養ステップから「除去」されるわけではない。いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、培養培地に戻される。

【１１３３】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象から腫瘍組織を取得するための他の手段によって産生される腫瘍組織の試料から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を閉鎖系に添加し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～９日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）ＣＤ３及びＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を培養することによって第２の拡張を行い、第５のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約５～１５日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第５のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第５のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｂ）～（ｆ）の各々が、閉鎖した滅菌系で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行、及び／またはステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、を含む。

【１１３４】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象から腫瘍組織を取得するための他の手段によって産生される腫瘍組織の試料から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織または腫瘍断片の試料を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）腫瘍組織を閉鎖系に添加し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ

集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～９日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＣＤ３及びＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を培養することによって第２の拡張を行い、第５のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約５～１５日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第５のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第５のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｃ）～（ｇ）の各々が、閉鎖した滅菌系で行われ、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行、及び／またはステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、を含む。

【１１３５】

いくつかの実施形態では、第１の拡張は、約３～９日間行われる。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、約３～９日、約３～８日、約３～７日、約３～６日、約３～５日、約３～４日、約４～９日、約４～８日、約５～９日、約５～８日、約６～９日、約６～８日、約７～９日、約７～８日、約３～７日、約４～７日、約５～７日、約６～７日、約３～６日、約４～６日、約５～６日、約３～５日、約４～５日、約３～４日間行われる。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、約７日間行われる。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、約８日間行われる。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、約９日間行われる。

【１１３６】

いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約１～７日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約１～７日、約２～７日、約３～７日、４～７日、約５～７日、約６～７日、約１～６日、約２～６日、約３～６日、約４～６日、約５～６日、約１～５日、約２～５日、約３～５日、約４～５日、約１～４日、約２～４日、約３～４日、約１～３日、約２～３日、約１～２日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約１日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約２日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約７日間行われる。

【１１３７】

いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約５～１５日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約５～１５日、約６～１５日、約７～１５日、約８～１５日、約９～１５日、約１０～１５日、約１１～１５日、約１２～１５日、約１３～１５日、約１４～１５日、約５～１４日、約６～１４日、約７～１４日、約８～１４日、約９～１４日、約１０～１４日、約１１～１４日、約１２～１４日、約１３～１４日、約５～１３日、約６～１３日、約７～１３日、約８～１３日、約９～１３日、約１０～１３日、約１１～

１３日、約１２～１３日、約５～１２日、約６～１２日、約７～１２日、約８～１２日、約９～１２日、約１０～１２日、約１１～１２日、約５～１１日、６～１１日、７～１１日、約８～１１日、約９～１１日、約１０～１１日、約５～１０日、６～１０日、７～１０日、約８～１０日、約９～１０日、約５～９日、６～９日、７～９日、約８～９日、約５～８日、約６～８日、７～８日、約５～７日、約６～７日、約５～６日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約７日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約８日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約９日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約１０日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約１１日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約１２日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約１３日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約１４日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約１５日間行われる。

【１１３８】

いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２２日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約８日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約９日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１０日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１１日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１２日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１３日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１４日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１５日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１６日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１７日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１８日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約１９日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２０日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２１日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２２日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２３日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２４日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２５日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２６日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２７日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２８日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約２９日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約３０日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約３１日の期間内に完了する。いくつかの実施形態では、方法のステップは、約３２日の期間内に完了する。

【１１３９】

いくつかの実施形態では、第２の拡張は、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、増加した数のＴＩＬを提供する。

【１１４０】

いくつかの実施形態では、第２の拡張は、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、増加した数のＴＩＬを提供する。

【１１４１】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１４２】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１４３】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１４４】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１４５】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１４６】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１４７】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１４８】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１４９】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終

了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１５０】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１５１】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１５２】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１５３】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１５４】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１５５】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１５６】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１５７】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数の

サブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１１５８】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１１５９】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１１６０】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１１６１】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１１６２】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１１６３】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１１６４】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１１６５】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。
【１１６６】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１６７】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１６８】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１６９】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１７０】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１７１】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１７２】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１７３】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１７４】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終

了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１７５】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物は、複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々は、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物は、組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１１７６】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行され得、これは、遺伝子編集が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）もしくは（ａ）～（ｇ）のうちのいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）もしくは（ａ）～（ｇ）のうちのいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行され得ることを意味する。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で２回以上実行され得る。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、培養ステップ中に収集され（例えば、培養ステップは、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、培養ステップを継続するために培養ステップに戻され（例えば、培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。

【１１７７】

拡張プロセスの代替実施形態は、上に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｆ）もしくは（ａ）～（ｇ）を有しなくてもよいか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える培養ステップを含み得、第３または第４の培養ステップ中にＴＩＬに対して遺伝子編集が実施され得ることなどが可能である。

【１１７８】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び培養ステップが実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも培養ステップから「除去」されるわけではない。いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、培養培地に戻される。

【１１７９】

いくつかの実施形態では、第２または第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集するステップは、第２または第３のＴＩＬ集団に対して無菌エレクトロポレーションステップを行うことを含む。

【１１８０】

いくつかの実施形態では、無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移入を媒介する。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、少なくとも１つのタンパク質の発現を調節するためのＴＡＬＥヌクレアーゼ系である。いくつかの実施形態によれば、ＴＡＬＥヌクレアーゼ系は、ＰＤ－１の発現を下方調節する。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、ＣＴＬＡ－４の発現を下方調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、ＬＡＧ－３の発現を下方調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、ＣＩＳＨの発現を下方調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、ＣＢＬ－Ｂの発現を下方調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系をさらに含む。いくつかの実施形態に

よれば、遺伝子エディターは、ＴＩＧＩＴの発現を下方調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１ノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４ノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＬＡＧ－３ノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＩＳＨノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＢＬ－ＢノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＴＩＧＩＴノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１の下方調節された発現、ならびにＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂのうちの１つ以上の下方調節された発現を示す。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４の下方調節された発現、ならびにＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂのうちの１つ以上の下方調節された発現を示す。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＬＡＧ－３の下方調節された発現、ならびにＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂのうちの１つ以上の下方調節された発現を示す。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＩＳＨの下方調節された発現、ならびにＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂのうちの１つ以上の下方調節された発現を示す。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＢＬ－Ｂの下方調節された発現、ならびにＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＰＤ－１のうちの１つ以上の下方調節された発現を示す。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１／ＣＴＬＡ－４ダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１／ＬＡＧ－３ダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１／ＣＩＳＨダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１／ＣＢＬ－ＢダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１／ＴＩＧＩＴダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４／ＬＡＧ－３ダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４／ＣＩＳＨダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４／ＣＢＬ－ＢダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４／ＴＩＧＩＴダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＬＡＧ－３／ＣＩＳＨダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＬＡＧ－３／ＣＢＬ－ＢダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＬＡＧ－３／ＴＩＧＩＴダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＩＳＨ／ＣＢＬ－ＢダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＩＳＨ／ＴＩＧＩＴダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＢＬ－Ｂ／ＴＩＧＩＴダブルノックアウトＴＩＬである。

【１１８１】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集のステップは、休止ステップをさらに含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、第４のＴＩＬ集団を、約３０～４０℃、約５％のＣＯ２でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、約３０℃、約３０．５℃、約３１℃、約３１．５℃、約３２℃、約３２．５℃、約３３℃、約３３．５℃、約３４℃、約３４．５℃、約３５℃、約３５．５℃、約３６℃、約３６．５℃、約３７℃、約３７．５℃、約３８℃、約３８．５℃、約３９℃、約３９．５℃、約４０℃で実行される。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、約１時間、約２時間、約３時間、約４時間、約５時間、約６時間、約７時間、約８時間、約９時間、約１０時間、約１１時間、約１２時間、約１３時間、約１４時間、約１５時間、約１６時間、約１７時間、約１８時間、約１９時間、約２０時間、約２１時間、約２２時間、約２３時間、約２４時間実行される。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ

－２を含む細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１５時間～約２３時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１５時間～約２３時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１５時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１６時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１７時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１８時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１９時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約２０時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約２１時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約２２時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約２３時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。

【１１８２】

いくつかの実施形態では、抗原提示細胞（ＡＰＣ）はＰＢＭＣである。いくつかの実施形態によれば、ＰＢＭＣは、放射線照射される。いくつかの実施形態によれば、ＰＢＭＣは、同種異系である。いくつかの実施形態によれば、ＰＢＭＣは、放射線照射されており、同種異系である。いくつかの実施形態によれば、抗原提示細胞は、人工抗原提示細胞である。

【１１８３】

いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、解剖された腫瘍由来のものである。

【１１８４】

いくつかの実施形態では、解剖された腫瘍は、８時間未満の古さのものである。

【１１８５】

いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、黒色腫腫瘍組織、頭頸部腫瘍組織、乳房腫瘍組織、腎臓腫瘍組織、膵臓腫瘍組織、神経膠芽細胞腫腫瘍組織、肺腫瘍組織、結腸直腸腫瘍組織、肉腫腫瘍組織、トリプルネガティブ乳房腫瘍組織、子宮頸部腫瘍組織、卵巣腫瘍組織、及びＨＰＶ陽性腫瘍組織からなる群から選択される。

【１１８６】

いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約１．５ｍｍ～６ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約２ｍｍ～６ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約２．５ｍｍ～６ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約３ｍｍ～６ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約３．５ｍｍ～６ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約４ｍｍ～６ｍｍの直径を有する

ほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約４．５ｍｍ～６ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約５ｍｍ～６ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約５．５ｍｍ～６ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約１．５ｍｍ～５ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約２ｍｍ～５ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約２．５ｍｍ～５ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約３ｍｍ～５ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約３．５ｍｍ～５ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約４ｍｍ～５ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約４．５ｍｍ～５ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約１．５ｍｍ～４ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約２ｍｍ～４ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約２．５ｍｍ～４ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約３ｍｍ～４ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約３．５ｍｍ～４ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約１．５ｍｍ～３ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約２ｍｍ～３ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約２．５ｍｍ～３ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約１．５ｍｍ～２ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。

【１１８７】

いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、少なくとも１．５ｍｍの最短辺長及び約６ｍｍの最長辺長を有する概して長方形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、少なくとも２ｍｍの最短辺長及び約６ｍｍの最長辺長を有する概して長方形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、少なくとも２．５ｍｍの最短辺長及び約６ｍｍの最長辺長を有する概して長方形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、少なくとも３ｍｍの最短辺長及び約６ｍｍの最長辺長を有する概して長方形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、少なくとも３．５ｍｍの最短辺長及び約６ｍｍの最長辺長を有する概して長方形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、少なくとも４ｍｍの最短辺長及び約６ｍｍの最長辺長を有する概して長方形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、少なくとも４．５ｍｍの最短辺長及び約６ｍｍの最長辺長を有する概して長方形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、少なくとも５ｍｍの最短辺長及び約６ｍｍの最長辺長を有する概して長方形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、少なくとも５．５ｍｍの最短辺長及び約６ｍｍの最長辺長を有する概して長方形の断片に断片化される。

【１１８８】

いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約３ｍｍまたは約６ｍｍの辺長を有する概して立方体の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約３ｍｍの辺長を有する概して立方体の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約３．５ｍｍの辺長を有する概して立方体の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約４ｍｍの辺長を有する概して立方体の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約４．５ｍｍの辺長を有する概して立方体の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約５ｍｍの辺長を有する概して立方体の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約５．５ｍｍの辺長を有する概して立方体の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約６ｍｍの辺

長を有する概して立方体の断片に断片化される。

【１１８９】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載の方法によって産生される治療的腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）産物集団を提供する。

【１１９０】

いくつかの実施形態では、本発明は、患者に、有効量の本明細書に記載の方法によって産生される治療的ＴＩＬ集団を投与することを含む、患者におけるがん治療のための方法を提供する。いくつかの実施形態では、がんは、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭ）、胃腸癌、黒色腫、転移性黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、転移性ＮＳＣＬＣ、肺癌、膀胱癌、乳癌、子宮内膜癌、胆管癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、腎癌、腎細胞癌、多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、急性リンパ球性白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、非ホジンリンリンパ腫、ホジンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、及びマントル細胞リンパ腫からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、皮膚黒色腫、眼黒色腫、ブドウ膜黒色腫、結膜悪性黒色腫、転移性黒色腫、多形黄色星細胞腫、胚芽異形成神経上皮腫瘍、神経節膠腫、及び毛様細胞性星細胞腫、著しい粘液分化を有する類内膜腺癌（ＥＣＭＤ）、甲状腺乳頭癌、漿液性低悪性度または境界卵巣癌、有毛細胞白血病、及びランゲルハンス細胞組織球症からなる群から選択される。

【１１９１】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１５００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に２０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に２５００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に３０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に３５００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に４０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に４５００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に５０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に５５００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～５０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１５００ＩＵ／ｍＬ～５０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に２０００ＩＵ／ｍＬ～５０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に２５００ＩＵ／ｍＬ～５０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に３０００ＩＵ／ｍＬ～５０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に３５００ＩＵ／ｍＬ～５０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に４０００ＩＵ／ｍＬ～５０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に４５００ＩＵ／ｍＬ～５０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では

、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～４０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１５００ＩＵ／ｍＬ～４０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に２０００ＩＵ／ｍＬ～４０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に２５００ＩＵ／ｍＬ～４０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に３０００ＩＵ／ｍＬ～４０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に３５００ＩＵ／ｍＬ～４０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１５００ＩＵ／ｍＬ～３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に２０００ＩＵ／ｍＬ～３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に２５００ＩＵ／ｍＬ～３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～２０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１５００ＩＵ／ｍＬ～２０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。

【１１９２】

いくつかの実施形態では、第２の拡張ステップ、ＩＬ－２は、１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在し、ＯＫＴ－３抗体は、約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する。

【１１９３】

いくつかの実施形態では、第１の細胞培養培地及び／または第２の細胞培養培地は、４－１ＢＢアゴニスト及び／またはＯＸ４０アゴニストをさらに含む。

【１１９４】

いくつかの実施形態では、第１の拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。

【１１９５】

いくつかの実施形態では、第１の細胞培養培地は、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。いくつかの実施形態では、第２の細胞培養培地及び／または第３の細胞培養培地は、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。

【１１９６】

いくつかの実施形態では、この方法は、ＴＩＬまたはＰＢＬ産物を患者に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、この方法は、ＴＩＬまたはＰＢＬ産物を患者に投与した翌日から開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、この方法は、ＴＩＬまたはＰＢＬ産物を患者に投与したのと同じ日に開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、アルデスロイキン、ネムバロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを含む。

【１１９７】

いくつかの実施形態では、治療有効量のＴＩＬ産物は、約２．３×１０１０～約１３．７×１０１０個のＴＩＬを含む。

【１１９８】

いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数が少なくと

も５０倍多い。
【１１９９】
ＰＤ－１　ＴＡＬＥＮノックダウンの例示的な開示は、米国仮出願第６３／２４２，３７３号に提供され、これはすべての関連目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【１２００】
Ｄ．遺伝子編集法
上で考察されたように、本発明の実施形態は、それらの治療効果を増強する（例えば、その細胞表面での免疫調節融合タンパク質の発現）ために遺伝子編集を介して遺伝子修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を提供する。本発明の実施形態は、１つ以上のタンパク質の発現の促進及び１つ以上のタンパク質の発現の阻害の両方、ならびにそれらの組み合わせのために、ＴＩＬ集団へのヌクレオチド挿入（ＲＮＡまたはＤＮＡ）による遺伝子編集を包含する。本発明の実施形態は、ＴＩＬを治療用集団に拡張するための方法も提供し、方法は、ＴＩＬを遺伝子編集することを含む。ＴＩＬ集団を遺伝子修飾するために使用され得るいくつかの遺伝子編集技術が存在し、それらは本発明による使用に好適である。
【１２０１】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、１つ以上のタンパク質の産生のために遺伝子の安定した組み込みステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レトロウイルス形質導入ステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レンチウイルス形質導入ステップを含む。レンチウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｌｅｖｉｎｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．２００６，１０３，１７３７２－７７、Ｚｕｆｆｅｒｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９７，１５，８７１－７５、Ｄｕｌｌ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　１９９８，７２，８４６３－７１、及び米国特許第６，６２７，４４２号（それらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、ガンマレトロウイルス形質導入ステップを含む。ガンマレトロウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｃｅｐｋｏ　ａｎｄ　Ｐｅａｒ，Ｃｕｒ．Ｐｒｏｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９６，９．９．１－９．９．１６に記載されており、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入ステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入系は、当該技術分野で知られており、トランスポザーゼが、ＤＮＡ発現ベクターとしてまたは発現可能なＲＮＡもしくはタンパク質として提供される系を含み、これにより、トランスポザーゼ、例えば、ｍＲＮＡ（例えば、キャップ及びポリＡ尾部を含むｍＲＮＡ）として提供されるトランスポザーゼの長期発現がトランスジェニック細胞で起こらないようになる。ＳＢ１０、ＳＢ１１、及びＳＢ１００ｘなどのサケ科型Ｔｅｌ様トランスポザーゼ（ＳＢまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼ）を含む好適なトランスポゾン媒介遺伝子導入系、ならびに増加した酵素活性を有する操作された酵素は、例えば、Ｈａｃｋｅｔｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ　２０１０，１８，６７４－８３及び米国特許第６，４８９，４５８号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。
【１２０２】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、１つ以上のタンパク質の産生または阻害（例えば、サイレンシング）のために遺伝子の安定した組み込みステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、エレクトロポレーションステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｔｓｏｎｇ，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．１９９１，６０，２９７－３０６及び米国特許出願公開第２０１４／０２２７２３７Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。米国特許第５，０１９，０３４号、同第５，１２

８，２５７号、同第５，１３７，８１７号、同第５，１７３，１５８号、同第５，２３２，８５６号、同第５，２７３，５２５号、同第５，３０４，１２０号、同第５，３１８，５１４号、同第６，０１０，６１３号、及び同第６，０７８，４９０号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどの当該技術分野で知られている他のエレクトロポレーション法が使用され得る。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、滅菌エレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルスエレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる、及び（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬにおける細孔形成を誘導するステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる、及び（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なり、これにより、誘導された細孔が比較的長期間にわたって持続され、ＴＩＬの生存率が維持される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法（リン酸カルシウムＤＮＡ沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス）は、当該技術分野で知られており、Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９７３，５２，４５６－４６７、Ｗｉｇｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１９７９，７６，１３７３－１３７６、及びＣｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｒｅａ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌ

ｌ．Ｂｉｏｌ．１９８７，７，２７４５－２７５２、ならびに米国特許第５，５９３，８７５号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、リポソームトランスフェクションステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－ｎ，ｎ，ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）及びジオレオイルホスホチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム製剤を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Ｒｏｓｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１９９１，１０，５２０－５２５及びＦｅｌｇｎｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８７，８４，７４１３－７４１７、ならびに米国特許第５，２７９，８３３号、同第５，９０８，６３５号、同第６，０５６，９３８号、同第６，１１０，４９０号、同第６，５３４，４８４号、及び同第７，６８７，０７０号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、米国特許第５，７６６，９０２号、同第６，０２５，３３７号、同第６，４１０，５１７号、同第６，４７５，９９４号、及び同第７，１８９，７０５号に記載の方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１２０３】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。かかるプログラム可能なヌクレアーゼは、特定のゲノム遺伝子座に切断を導入することによって正確なゲノム編集を可能にし、すなわち、ゲノム内の特定のＤＮＡ配列の認識に依存して、ヌクレアーゼドメインをこの位置に標的し、標的配列での二本鎖切断の生成を媒介する。ＤＮＡの二本鎖切断は、その後、内因性修復機構を切断部位に動員して、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）または相同指向修復（ＨＤＲ）のいずれかによるゲノム編集を媒介する。したがって、切断の修復は、標的遺伝子産物を破壊する（例えば、サイレンス、抑制、または増強する）挿入／欠失変異の導入をもたらす可能性がある。

【１２０４】

部位特異的ゲノム編集を可能にするために開発されたヌクレアーゼの主要なクラスには、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写活性化因子様ヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、及びＣＲＩＳＰＲ関連ヌクレアーゼ（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９）が含まれる。これらのヌクレアーゼシステムは、ＤＮＡ認識のモードに基づいて大きく２つのカテゴリーに分類され得、ＺＦＮ及びＴＡＬＥＮは、タンパク質－ＤＮＡ相互作用を介して特定のＤＮＡ結合を達成するが、Ｃａｓ９などのＣＲＩＳＰＲシステムは、標的ＤＮＡと直接塩基対を形成する短いＲＮＡガイド分子によって、かつタンパク質－ＤＮＡ相互作用によって特定のＤＮＡ配列を標的とする。例えば、Ｃｏｘ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２０１５，Ｖｏｌ．２１，Ｎｏ．２を参照されたい。

【１２０５】

本発明のＴＩＬ拡張法に従って使用され得る遺伝子編集法の非限定的な例には、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、及びＺＦＮ法が含まれ、これらの実施形態は以下でより詳細に説明される。いくつかの実施形態によれば、ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法を、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、もしくはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、方法は、増強された治療効果を提供することができるＴＩＬを生成するために、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはＺＦＮ法のうちの１つ以上によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集されたＴＩＬは、インビトロでそれらを修飾されていないＴＩＬと比較することによって、例えば、修飾されていないＴＩＬと比較してインビトロでのエフェクター機能、サイトカインプロファイルなどを評価することによって、治療効果の改善について評価され得る。

【１２０６】
本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションは、ＣＲＩＳＰＲシステム、ＴＡＬＥＮシステム、及びＺＦＮシステムなどの遺伝子編集システムの送達のために使用される。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、フローエレクトロポレーションシステムである。本発明のいくつかの実施形態との使用に好適な、好適なフローエレクトロポレーションシステムの例は、市販のＭａｘＣｙｔｅ　ＳＴＸシステムである。本発明との使用に好適であり得る、ＢＴＸ－Ｈａｒｖａｒｄ　Ａｐｐａｒａｔｕｓから入手可能なＡｇｉｌｅＰｕｌｓｅシステムもしくはＥＣＭ８３０、Ｃｅｌｌａｘｅｓｓ　Ｅｌｅｋｔｒａ（Ｃｅｌｌｅｃｔｒｉｃｏｎ）、Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（Ｌｏｎｚａ／Ａｍａｘａ）、ＧｅｎｅＰｕｌｓｅｒ　ＭＸｃｅｌｌ（ＢＩＯＲＡＤ）、ｉＰｏｒａｔｏｒ－９６（Ｐｒｉｍａｘ）、またはｓｉＰＯＲＴｅｒ９６（Ａｍｂｉｏｎ）などのいくつかの代替の市販エレクトロポレーション機器が存在する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、ＴＩＬ拡張法の残りとともに、閉鎖した滅菌系を形成する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、本明細書に記載のパルスエレクトロポレーションシステムであり、ＴＩＬ拡張法の残りとともに、閉鎖した滅菌系を形成する。
【１２０７】
いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、遺伝子編集系の送達のために使用される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。
【１２０８】
ａ．ＣＲＩＳＰＲ法
ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、もしくはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、この方法は、ＣＲＩＳＰＲ法（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１）によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣＲＩＳＰＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の細胞表面での少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子を治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは減少させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣＲＩＳＰＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の細胞表面での少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子を治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【１２０９】
ＣＲＩＳＰＲは、「Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ　Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ　Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ　Ｓｈｏｒｔ　Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ　Ｒｅｐｅａｔｓ（クラスター化された定期的に間隔をあけた短いパリンドロミックリピート）」の略語である。遺伝子編集のためにＣＲＩＳＰＲシステムを使用する方法は、本明細書ではＣＲＩＳＰＲ法とも称される。ＣＲＩＳＰＲ系は、クラス１及びクラス２の２つの主要なクラスに分類され得、これらは、異なるタイプ及びサブタイプにさらに分類される。ＣＲＩＳＰＲ系の分類は、特定の核酸を

切断することができるエフェクターＣａｓタンパク質に基づいている。クラス１ＣＲＩＳＰＲ系では、エフェクターモジュールは、マルチタンパク質複合体からなるが、クラス２の系は、１つのエフェクタータンパク質のみを使用する。クラス１ＣＲＩＳＰＲには、Ｉ型、ＩＩＩ型、及びＩＶ型が含まれ、クラス２　ＣＲＩＳＰＲには、ＩＩ型、Ｖ型、及びＶＩ型が含まれる。これらの型のＣＲＩＳＰＲ系のうちのいずれかは、本発明に従って使用され得るが、ＲＮＡ及びＣａｓタンパク質を組み込み、かつ本発明に従って使用されることが好ましいＣＲＩＳＰＲ系には、３つの型：Ｉ型（Ｃａｓ３によって例示される）、ＩＩ型（Ｃａｓ９によって例示される）、及びＩＩＩ型（Ｃａｓ１０によって例示される）がある。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲは、最もよく特徴付けられている系のうちの１つである。

【１２１０】

ＣＲＩＳＰＲ技術は、細菌及び古細菌（単細胞微生物のドメイン）の自然防御機構から適合された。これらの生物は、ＣＲＩＳＰＲ由来のＲＮＡ及びＣａｓ９を含む様々なＣａｓタンパク質を使用して、外来侵入物のＤＮＡを切り刻んで破壊することによって、ウイルス及び他の異物による攻撃を阻止する。ＣＲＩＳＰＲは、ヌクレオチド反復配列及びスペーサーの存在という２つの異なる特徴を有するＤＮＡの特殊な領域である。ヌクレオチドの反復配列は、ＣＲＩＳＰＲ領域全体に分布しており、外来ＤＮＡ（スペーサー）の短いセグメントが反復配列の間に散在している。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムでは、スペーサーは、ＣＲＩＳＰＲゲノム遺伝子座内に組み込まれ、転写され、短いＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）に処理される。これらのｃｒＲＮＡは、トランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）にアニーリングし、Ｃａｓタンパク質による病原性ＤＮＡの配列特異的切断及びサイレンシングを指示する。Ｃａｓ９タンパク質による標的認識には、ｃｒＲＮＡ内の「シード」配列、及びｃｒＲＮＡ結合領域の上流にある保存されたジヌクレオチドを含むプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列が必要である。これにより、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムが再標的されて、ｃｒＲＮＡを再設計することにより、実質的にいずれのＤＮＡ配列も切断することができる。したがって、ある特定の実施形態によれば、Ｃａｓ９は、ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡ認識時にＤＮＡを切断するＲＮＡ誘導ＤＮＡエンドヌクレアーゼとして機能する。天然システムにおけるｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、遺伝子操作で使用するために、およそ１００ヌクレオチドの単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）に簡略化され得る。ｓｇＲＮＡは、Ｃａｓ結合に必要な足場配列と、修飾されるゲノム標的を定義するユーザ定義のおよそ１７～２０ヌクレオチドスペーサーとを含む合成ＲＮＡである。したがって、ユーザは、ｓｇＲＮＡに存在する標的配列を変更することによって、Ｃａｓタンパク質のゲノム標的を変更することができる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼを発現するプラスミドとＲＮＡ成分（例えば、ｓｇＲＮＡ）を同時送達することにより、ヒト細胞に直接運搬可能である。Ｃａｓタンパク質の異なるバリアント（例えば、Ｃｐｆ１などのオルソログ）を使用して、標的の制限を低減することができる。

【１２１１】

いくつかの実施形態によれば、操作された、プログラム可能な、天然に存在しないＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、Ｃａｓ９タンパク質及びＴＩＬにおいてＤＮＡ分子の標的配列を標的とし、それにハイブリダイズする少なくとも１つのガイドＲＮＡを含み、ＤＮＡ分子が少なくとも１つの免疫チェックポイント分子をコードし、ＴＩＬが少なくとも１つの免疫チェックポイント分子を発現し、Ｃａｓ９タンパク質がＤＮＡ分子を切断し、それによって、少なくとも１つの免疫チェックポイント分子の発現が改変され、Ｃａｓ９タンパク質及びガイドＲＮＡが、天然に一緒に存在しない。いくつかの実施形態によれば、２つ以上の免疫チェックポイント分子の発現が改変される。いくつかの実施形態によれば、ガイドＲＮＡ（複数可）は、ｔｒａｃｒ配列に融合したガイド配列を含む。例えば、ガイドＲＮＡは、ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡまたはｓｇＲＮＡを含み得る。本発明の態様によれば、「ガイドＲＮＡ」、「単一ガイドＲＮＡ」及び「合成ガイドＲＮＡ」という用語は、互換的に使用され得、ガイド配列を含むポリヌクレオチド配列を指し、これは、標的部位を特定するガイドＲＮＡ内の約１７～２０ｂｐの配列である。

【１２１２】
Ｃａｓ９と比較して改善されたオンターゲット特異性を有するＣａｓ９のバリアントもまた、本発明の実施形態に従って使用され得る。そのようなバリアントは、高忠実度Ｃａｓ－９と称され得る。いくつかの実施形態によれば、デュアルニッカーゼアプローチを利用してもよく、反対のＤＮＡ鎖を標的とする２つのニッカーゼは、標的ＤＮＡ内でＤＳＢを生成する（多くの場合、ダブルニッカーゼまたはデュアルニッカーゼＣＲＩＳＰＲ系と称される）。例えば、このアプローチは、２つのＣａｓ９ヌクレアーゼドメインのうちの１つの変異を伴い、Ｃａｓ９をヌクレアーゼからニッカーゼに変えることを伴い得る。高忠実度Ｃａｓ９の非限定的な例としては、ｅＳｐＣａｓ９、ＳｐＣａｓ９－ＨＦ１及びＨｙｐａＣａｓ９が挙げられる。そのようなバリアントは、非標的ＤＮＡ部位における望ましくない変化を低減または排除し得る。例えば、Ｓｌａｙｍａｋｅｒ ＩＭ，ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ．２０１５ Ｄｅｃ １、Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ ＢＰ，ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ．２０１６ Ｊａｎ ６、及びＲａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｐｒｏｔｏｃ．２０１３ Ｎｏｖ；８（１１）：２２８１－２３０８（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【１２１３】
追加として、特定の実施形態によれば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２０１６／０１０２３２４号に開示されているものなどの、細胞へのＣａｓ９の遺伝子送達を改善し、標的特異性を改善する、Ｃａｓ９足場を使用することができる。例えば、Ｃａｓ９足場は、（Ｄ－［Ｉ／Ｌ］－Ｇ－Ｘ－Ｘ－Ｓ－Ｘ－Ｇ－Ｗ－Ａ）によって定義されるＲｕｖＣモチーフ及び／または（Ｙ－Ｘ－Ｘ－Ｄ－Ｈ－Ｘ－Ｘ－Ｐ－Ｘ－Ｓ－Ｘ－Ｘ－Ｘ－Ｄ－Ｘ－Ｓ）によって定義されるＨＮＨモチーフを含んでよく、Ｘは、２０個の天然に存在するアミノ酸のうちのいずれか１つを表し、［Ｉ／Ｌ］は、イソロイシンまたはロイシンを表す。ＨＮＨドメインは、標的ｄｓＤＮＡの一方の鎖をニッキングすることに関与し、ＲｕｖＣドメインは、ｄｓＤＮＡの他方の鎖の切断に関与する。したがって、これらのドメインの各々は、ＰＡＭのすぐ近くのプロトスペーサー内の標的ＤＮＡの鎖をニックし、ＤＮＡの鈍い切断をもたらす。これらのモチーフを互いに組み合わせて、よりコンパクト及び／またはより特異的なＣａｓ９足場を作製してもよい。さらに、モチーフを使用して、分割されたＣａｓ９タンパク質（すなわち、ＲｕｖＣドメインまたはＨＮＨドメインのいずれかを含むＣａｓ９タンパク質またはＣａｓ９バリアントの還元型または切断型）を作製してもよく、分割されたＣａｓ９タンパク質は、２つの別個のＲｕｖＣドメイン及びＨＮＨドメインに分割され、標的ＤＮＡを一緒にまたは別個に処理することができる。

【１２１４】
特定の実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ法は、Ｃａｓ９ヌクレアーゼ及び免疫チェックポイント遺伝子（複数可）の標的ＤＮＡ配列に特異的なおよそ１７～２０ヌクレオチドの配列を含むガイドＲＮＡ（例えば、ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡまたはｓｇＲＮＡ）を導入することによって、ＴＩＬにおける１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。ガイドＲＮＡは、ＲＮＡとして、またはプロモーターの下でガイドＲＮＡコード配列を有するプラスミドを形質転換することによって送達されてもよい。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ酵素は、ｓｇＲＮＡにより定義された標的配列に基づいて、特定の位置に二本鎖切断（ＤＳＢ）を導入する。ＤＳＢは、ＤＮＡの挿入または欠失（インデル）を頻繁に引き起こす機序である、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）によって細胞内で修復され得る。インデルは、多くの場合、フレームシフトをもたらし、例えば、標的遺伝子のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）内で早期停止コドンを引き起こすことによって、機能対立遺伝子の喪失を引き起こす。ある特定の実施形態によれば、結果は、標的免疫チェックポイント遺伝子内の機能喪失変異である。

【１２１５】
代替的に、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ酵素によって誘導されるＤＳＢは、ＮＨＥＪの代わりに相同性指向修復（ＨＤＲ）によって修復されてもよい。ＮＨＥＪ媒介ＤＳＢ修復は、し

ばしば遺伝子のオープンリーディングフレームを破壊するが、相同指向修復（ＨＤＲ）を使用して、単一ヌクレオチド変化から大きな挿入までの範囲の特異的なヌクレオチド変化を生成することができる。いくつかの実施形態によれば、ＨＤＲは、ｓｇＲＮＡ（複数可）及びＣａｓ９またはＣａｓ９ニッカーゼを有するＴＩＬに所望の配列を含むＤＮＡ修復テンプレートを送達することによって、免疫チェックポイント遺伝子を遺伝子編集するために使用される。修復テンプレートは、好ましくは、所望の編集、ならびに標的遺伝子のすぐ上流及び下流の追加の相同配列（多くの場合、左及び右の相同アームと称される）を含む。

【１２１６】

特定の実施形態によれば、酵素的に不活性なバージョンのＣａｓ９（ｄｅａｄＣａｓ９またはｄＣａｓ９）は、開始を遮断することによって転写を抑制するために、転写開始部位を標的とし得る。したがって、標的とされた免疫チェックポイント遺伝子は、ＤＳＢを使用せずに抑制され得る。ｄＣａｓ９分子は、ｓｇＲＮＡ標的化配列に基づいて標的ＤＮＡに結合する能力を保持している。本発明のいくつかの実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ法は、標的遺伝子（複数可）の転写を阻害または防止することによって、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンスまたは減少させることを含む。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法は、Ｋｒｕｐｐｅｌ関連ボックス（ＫＲＡＢ）ドメインなどの転写リプレッサードメインをＣａｓ９の酵素不活性バージョンに融合させ、それによって、例えば、免疫チェックポイント遺伝子の転写開始部位を標的とするｄＣａｓ９－ＫＲＡＢを形成し、遺伝子の転写の阻害または防止をもたらすことを含み得る。好ましくは、リプレッサードメインは、転写開始部位の下流、例えば、約５００ｂｐ下流のウィンドウを標的とする。ＣＲＩＳＰＲ干渉（ＣＲＩＳＰＲｉ）と称され得るこのアプローチは、標的ＲＮＡの転写還元を介して堅牢な遺伝子ノックダウンをもたらす。

【１２１７】

特定の実施形態によれば、酵素的に不活性なバージョンのＣａｓ９（ｄｅａｄＣａｓ９またはｄＣａｓ９）は、転写を活性化するために、転写開始部位を標的とし得る。このアプローチは、ＣＲＩＳＰＲ活性化（ＣＲＩＳＰＲａ）と称され得る。いくつかの実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ法は、標的遺伝子（複数可）の転写を活性化することによって１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を増加させることを含む。そのような実施形態によれば、標的とされた免疫チェックポイント遺伝子は、ＤＳＢを使用せずに活性化され得る。ＣＲＩＳＰＲ法は、例えば、ＶＰ６４などの転写活性化因子をｄＣａｓ９に融合させ、それによって例えば、免疫チェックポイント遺伝子の転写開始部位を標的とするｄＣａｓ９－ＶＰ６４を形成することによって、転写活性化ドメインを転写開始部位に標的化することを含み得、遺伝子の転写の活性化をもたらす。好ましくは、活性化因子ドメインは、転写開始部位から上流のウィンドウ、例えば、約５０～４００ｂｐ下流を標的とする。

【１２１８】

本発明の追加の実施形態は、哺乳動物細胞における標的遺伝子の強力な活性化のために開発された活性化戦略を利用し得る。非限定的な例としては、エピトープタグ付きｄＣａｓ９及び抗体活性化剤エフェクタータンパク質（例えば、ＳｕｎＴａｇ系）の共発現、複数の異なる活性化ドメインに直列に融合したｄＣａｓ９（例えば、ｄＣａｓ９－ＶＰＲ）、またはｄＣａｓ９－ＶＰ６４と修飾された足場ｇＲＮＡ及び追加のＲＮＡ結合ヘルパー活性化因子（例えば、ＳＡＭ活性化因子）との共発現が挙げられる。

【１２１９】

他の実施形態によれば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第９，９８２，２７８号に開示されるように、ＣＲＩＳＰＲ支援合理的タンパク質操作（ＣＡＲＰＥ）と称されるＣＲＩＳＰＲ媒介ゲノム編集方法を、本発明の実施形態に従って使用してもよい。ＣＡＲＰＥは、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）または二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）編集カセットからの指向性変異をゲノムに直接組み込む「ドナー」及び「デスティネーション」ライブラリーの生成を伴う。ドナーライブラリーの構築は、標的ＤＮＡ配列にハイブリダ

イズするガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を用いて、合理的に設計された編集オリゴヌクレオチドを細胞に同時形質転換することを伴う。編集オリゴヌクレオチドは、ＰＡＭの欠失または変異を、隣接遺伝子内の１つ以上の所望のコドンの変異とカップリングするように設計される。これにより、ドナーライブラリー全体を単一の形質転換で生成することができる。ドナーライブラリーは、編集オリゴヌクレオチドからの合成特徴、すなわち、遺伝子の３’末端に同時に組み込まれる第２のＰＡＭ欠失または変異を使用して、ＰＣＲ反応などによる組換え染色体の増幅によって回収される。これは、ＰＡＭ欠失に指向されたコドン標的変異を共有結合する。次いで、ドナーライブラリーを、デスティネーションｇＲＮＡベクターを有する細胞に同時形質転換して、合理的に設計されたタンパク質ライブラリーを発現する細胞の集団を作製する。

【１２２０】

他の実施形態によれば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第９，９８２，２７８号に開示されるように、追跡可能なＣＲＩＳＰＲ濃縮組換えによるゲノム操作（ＧＥｎ－ＴｒａＣＥＲ）と称されるＣＲＩＳＰＲ媒介系を使用する、追跡可能な精密ゲノム編集のための方法を、本発明の実施形態に従って使用してもよい。ＧＥｎ－ＴｒａＣＥＲ方法及びベクターは、編集カセットを、単一のベクター上のｇＲＮＡをコードする遺伝子と組み合わせる。カセットは、所望の変異及びＰＡＭ変異を含有する。Ｃａｓ９もコードし得るベクターは、細胞または細胞集団に導入される。これは、細胞または細胞集団におけるＣＲＩＳＰＲ系の発現を活性化し、ｇＲＮＡにＣａｓ９を標的領域に動員させ、ｄｓＤＮＡ切断が発生し、ＰＡＭ変異の組み込みを可能にする。

【１２２１】

ＣＲＩＳＰＲ法によりＴＩＬを永久に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが含まれる。

【１２２２】

ＣＲＩＳＰＲ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）、及び／またはＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１が含まれる。

【１２２３】

ＣＲＩＳＰＲ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第８，６９７，３５９号、同第８，９９３，２３３号、同第８，７９５，９６５号、同第８，７７１，９４５号、同第８，８８９，３５６号、同第８，８６５，４０６号、同第８，９９９，６４１号、同第８，９４５，８３９号、同第８，９３２，８１４号、同第８，８７１，４４５号、同第８，９０６，６１６号、及び同第８，８９５，３０８号に記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１を発現するためのプラスミドなどのＣＲＩＳＰＲ法を行うための資源は、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔなどの企業から市販されている。

【１２２４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＴＩＬ集団の遺伝子修飾は、米国特許第９

７９０４９０号に記載されているＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１システムを使用して行うことができ、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１系は、Ｃｐｆ１関連ＣＲＩＳＰＲアレイが追加のｔｒａｃｒＲＮＡを必要とすることなく成熟したｃｒＲＮＡに処理されるという点で、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系とは機能的に異なる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１系で使用されるｃｒＲＮＡは、スペーサーまたはガイド配列及び直接反復配列を有する。この方法を使用して形成されるＣｐｆ１ｐ－ｃｒＲＮＡ複合体は、それ自体で標的ＤＮＡを切断するのに十分である。

【１２２５】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップは、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）／Ｃａｓ９系及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１系からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系は、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、少なくとも１つのチェックポイントタンパク質の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、少なくとも１つのチェックポイントタンパク質発現を調節する。

【１２２６】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の

拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップは、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）／Ｃａｓ９系及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１系からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系は、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現を阻害する。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１２２７】

ｂ．ＴＡＬＥ法

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って、またはＷＯ２０１８／０８１４７３、ＷＯ２０１８／１２９３３２、またはＷＯ２０１８／１８２８１７に記載されるように実行することができ、この方法は、ＴＡＬＥ法によってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、細胞表面での少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは減少させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、細胞表面での少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。

【１２２８】

ＴＡＬＥは、ＴＡＬＥＮ（「転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ」）を含む、

「Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ａｃｔｉｖａｔｏｒ－Ｌｉｋｅ Ｅｆｆｅｃｔｏｒ（転写活性化因子様エフェクター）」タンパク質の略語である。遺伝子編集のためにＴＡＬＥシステムを使用する方法は、本明細書ではＴＡＬＥ法とも称され得る。ＴＡＬＥは、植物病原菌Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ属由来の天然に存在するタンパク質であり、各々単一の塩基対を認識する一連の３３～３５アミノ酸反復ドメインで構成されるＤＮＡ結合ドメインを含む。ＴＡＬＥ特異性は、反復可変二残基（ＲＶＤ）として知られる２つの超可変アミノ酸によって決定される。モジュラーＴＡＬＥ反復配列は、隣接するＤＮＡ配列を認識するために一緒に結合される。ＤＮＡ結合ドメイン内の特定のＲＶＤは、標的遺伝子座内の塩基を認識し、予測可能なＤＮＡ結合ドメインを組み立てるための構造的特徴を提供する。ＴＡＬＥのＤＮＡ結合ドメインは、ＩＩＳ型ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼの触媒ドメインに融合して、標的可能なＴＡＬＥヌクレアーゼを作製する。部位特異的変異を誘導するために、１４～２０塩基対のスペーサー領域によって分離された２つの個々のＴＡＬＥＮアームがＦｏｋＩモノマーを密接に接近させて二量体化し、標的とされる二本鎖切断を産生する。

【１２２９】

様々な組み立て方法を利用したいくつかの大規模な系統的研究により、ＴＡＬＥ反復配列を組み合わせて、実質的にすべてのユーザ定義配列を認識することができることが示されている。カスタムＴＡＬＥアレイの迅速な組み立てを可能にする戦略には、ゴールデンゲート分子クローニング、高スループット固相組み立て、及びライゲーション非依存性クローニング技術が含まれる。カスタム設計されたＴＡＬＥアレイも、Ｃｅｌｌｅｃｔｉｓ Ｂｉｏｒｅｓｅａｒｃｈ（Ｐａｒｉｓ，Ｆｒａｎｃｅ）、Ｔｒａｎｓｐｏｓａｇｅｎ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ，ＫＹ，ＵＳＡ）、及びＬｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ，ＵＳＡ）から市販されている。追加として、所望の標的のためのカスタムＴＡＬエフェクター反復アレイの設計を可能にし、また、予測されるＴＡＬエフェクター結合部位を提供する、ＴＡＬエフェクター－ヌクレオチドターゲット２．０などのウェブベースのツールが利用可能である。Ｄｏｙｌｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１２，Ｖｏｌ．４０，Ｗ１１７－Ｗ１２２を参照されたい。本発明での使用に好適なＴＡＬＥ法及びＴＡＬＥＮ法の例は、米国特許公開第２０１１／０２０１１１８Ａ１号、同第２０１３／０１１７８６９Ａ１号、同第２０１３／０３１５８８４Ａ１号、同第２０１５／０２０３８７１Ａ１号、同第２０１６／０１２０９０６Ａ１号に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１２３０】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ＴＡＬＥ法は、標的遺伝子（複数可）の転写を阻害または防止することによって、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンスまたは減少させることを含む。例えば、ＴＡＬＥ法は、ＫＲＡＢ－ＴＡＬＥを利用することを含み得、この方法は、転写Ｋｒｕｐｐｅｌ関連ボックス（ＫＲＡＢ）ドメインを、遺伝子の転写開始部位を標的とするＤＮＡ結合ドメインに融合することを含み、遺伝子の転写の阻害または防止につながる。

【１２３１】

他の実施形態によれば、ＴＡＬＥ法は、標的遺伝子（複数可）に変異を導入することによって１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンスまたは減少させることを含む。例えば、ＴＡＬＥ法は、ＦｏｋＩなどのヌクレアーゼエフェクタードメインをＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメインに融合させ、ＴＡＬＥＮをもたらすことを含み得る。ＦｏｋＩは、二量体として活性であり、したがって、この方法は、ＦＯＫＬヌクレアーゼドメインを隣接するゲノム標的部位に位置決めするためのＴＡＬＥＮ対を構築することを含み、ＤＮＡ二本鎖切断を導入する。ＦｏｋＩの正しい位置決め及び二量体化後、二本鎖切断が完了し得る。二本鎖切断が導入されると、ＤＮＡ修復は、高忠実度相同組換え対（ＨＲＲ）（相同性指向修復またはＨＤＲとしても知られる）またはエラーが発生しやすい非相同性末端結合（ＮＨＥＪ）の２つの異なる機序を介して達成することができる。ＮＨＥＪを

介した二本鎖切断の修復は、好ましくは、ＤＮＡ標的部位の欠失、挿入または置換をもたらす、すなわち、ＮＨＥＪは、典型的には、切断部位での小さな挿入及び欠失の導入をもたらし、多くの場合、遺伝子機能をノックアウトするフレームシフトを誘導する。特定の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮ対は、遺伝子の最５’エクソンを標的とし、早期フレームシフト変異または早期停止コドンを促進する。ＴＡＬＥＮによって導入される遺伝子変異（複数可）は、好ましくは永続的である。したがって、いくつかの実施形態によれば、この方法は、二量体化ＴＡＬＥＮを利用して、エラーが発生しやすいＮＨＥＪを介して修復される部位特異的二本鎖切断を誘導し、標的免疫チェックポイント遺伝子に１つ以上の変異をもたらすことによって、免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。

【１２３２】

追加の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮは、非ランダム点変異、標的欠失、またはＤＮＡ断片の付加などのＨＲＲを介して遺伝子改変を導入するために利用される。ＤＮＡ二本鎖切断の導入は、好適なドナーＤＮＡの存在下での相同組換えを介した遺伝子編集を可能にする。いくつかの実施形態によれば、この方法は、部位特異的二本鎖切断を誘導し、１つ以上の導入遺伝子をＤＮＡに組み込むために、二量体化ＴＡＬＥＮ及び遺伝子座特異的相同性アームを有するドナープラスミドを同時送達することを含む。

【１２３３】

他の実施形態によれば、米国特許公開第２０１１／０２０１１１８号に開示されているように、ＦｏｋＩ及びＡｖｒＸａ７に由来するハイブリッドタンパク質であるＴＡＬＥＮを、本発明の実施形態に従って使用してもよい。このＴＡＬＥＮは、ＡｖｒＸａ７の標的ヌクレオチド及びＦｏｋＩの二本鎖ＤＮＡ切断活性に対する認識特異性を保持する。同じ方法を使用して、異なる認識特異性を有する他のＴＡＬＥＮを調製することができる。例えば、コンパクトＴＡＬＥＮは、ＤＮＡ結合特異性を変化させ、特定の単一のｄｓＤＮＡ標的配列を標的とするために、ＲＶＤの異なるセットを有するコアＴＡＬＥ足場を操作することによって生成され得る。米国特許公開第２０１３／０１１７８６９号を参照されたい。触媒ドメインの選択は、ＤＮＡ処理をもたらすために足場に付着させることができ、これは、触媒ドメインが、コアＴＡＬＥ足場に融合されたときに、単一のｄｓＤＮＡ標的配列の近くでＤＮＡを処理することができることを確実にするように操作され得る。ペプチドリンカーはまた、触媒ドメインを足場に融合させて、特定の単一のｄｓＤＮＡ配列を標的とするために二量体化を必要としない単一のポリペプチド鎖からなるコンパクトなＴＡＬＥＮを作製するように操作されてもよい。コアＴＡＬＥ足場はまた、ＴＡＬモノマーであり得る触媒ドメインをそのＮ末端に融合させることによって修飾され得、この触媒ドメインが別のＴＡＬモノマーに融合された別の触媒ドメインと相互作用する可能性を可能にし、それによって標的配列の近傍でＤＮＡを処理する可能性が高い触媒エンティティを作製する。米国特許公開第２０１５／０２０３８７１号を参照されたい。このアーキテクチャは、１つのＤＮＡ鎖のみを標的とすることを可能にするが、これは古典的なＴＡＬＥＮアーキテクチャの選択肢ではない。

【１２３４】

本発明のいくつかの実施形態によれば、従来のＲＶＤを使用して、遺伝子発現を大幅に低減することができるＴＡＬＥＮを作製してもよい。いくつかの実施形態では、４つのＲＶＤ、ＮＩ、ＨＤ、ＮＮ、及びＮＧを使用して、それぞれ、アデニン、シトシン、グアニン、及びチミンを標的とする。これらの従来のＲＶＤを使用して、例えば、ＰＤ－１遺伝子を標的とするＴＡＬＥＮを作製することができる。従来のＲＶＤを使用するＴＡＬＥＮの例としては、Ｇａｕｔｒｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ：Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｄｅｃ．２０１７，Ｖｏｌ．９：３１２－３２１（Ｇａｕｔｒｏｎ）（これは参照により本明細書に組み込まれる）に開示されているＴ３ｖ１及びＴ１ ＴＡＬＥＮが挙げられる。Ｔ３ｖ１及びＴ１ ＴＡＬＥＮは、ＰＤ－Ｌ１結合部位が位置するＰＤＣＤ１遺伝子座の第２のエクソンを標的とし、ＰＤ－１産生を著しく低減することができる。いくつかの実施形態では、Ｔ１ ＴＡＬＥＮは、標的配列番号２５６

を使用することによってそれを行い、Ｔ３ｖ１　ＴＡＬＥＮは、標的配列番号２５７を使用することによってそれを行う。

【１２３５】

他の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮは、Ｇａｕｔｒｏｎに開示されるような、標的遺伝子に対するそれらの活性及び特異性を改善するために、非従来型ＲＶＤを使用して修飾される。天然に存在するＲＶＤは、超可変アミノ酸位置の潜在的な多様性レパートリーのごく一部のみをカバーする。非従来のＲＶＤは、天然のＲＶＤの代替物を提供し、ＴＡＬＥＮによるオフサイト標的（標的配列に対していくつかのミスマッチを含むゲノム内の配列）の標的化を除外するために使用され得る、新規の固有の標的化特異性特徴を有する。非従来型ＲＶＤは、Ｊｕｉｌｌｅｒａｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｒｅｐｏｒｔｓ　５，Ａｒｔｉｃｌｅ　Ｎｕｍｂｅｒ　８１５０（２０１５）（これは参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるようなアレイの定義された位置における２つの超可変アミノ酸位置にアミノ酸の代替組み合わせを含むＴＡＬＥＮの集合を生成及びスクリーニングすることによって同定され得る。次に、ミスマッチの位置に存在するヌクレオチドを区別する非従来型ＲＶＤを選択してもよく、これにより、標的位置の適切な処理を依然として可能にしながら、オフサイト配列でのＴＡＬＥＮ活性を防止することができる。次いで、選択された非従来型ＲＶＤは、ＴＡＬＥＮ内の従来のＲＶＤを置き換えるために使用され得る。従来のＲＶＤが非従来型ＲＶＤに置き換えられたＴＡＬＥＮの例としては、Ｇａｕｔｒｏｎによって産生されたＴ３ｖ２及びＴ３ｖ３　ＰＤ－１　ＴＡＬＥＮが挙げられる。これらのＴＡＬＥＮは、従来のＲＶＤを使用したＴＡＬＥＮと比較した場合、特異性が増加していた。

【１２３６】

追加の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮを利用して、２つの遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させるための遺伝子改変を導入してもよい。例えば、２つの異なる遺伝子を標的とするために２つの別個のＴＡＬＥＮを生成し、次いで一緒に使用してもよい。２つのＴＡＬＥＮによってそれぞれの遺伝子座及び潜在的なオフターゲット部位で生成される分子事象は、ハイスループットＤＮＡ配列決定によって特徴付けられ得る。これにより、オフターゲット部位の分析、及び両方のＴＡＬＥＮの使用から生じる可能性のある部位の特定が可能になる。この情報に基づいて、一緒に使用されても特異性及び活性が増加したＴＡＬＥＮを操作するために、適切な従来型及び非従来型のＲＶＤが選択され得る。例えば、Ｇａｕｔｒｏｎは、Ｔ３ｖ４　ＰＤ－１及びＴＲＡＣ　ＴＡＬＥＮを併用して、強力なインビトロ抗腫瘍機能を維持したダブルノックアウトＣＡＲ　Ｔ細胞を産生することを開示する。

【１２３７】

いくつかの実施形態では、Ｇａｕｔｒｏｎの方法または本明細書に記載の他の方法は、ＴＩＬを遺伝子編集するために用いられてもよく、このＴＩＬは、次いで、本明細書に記載の手順のうちのいずれかによって拡張されてもよい。いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬの第１の集団を１～５日間活性化するステップと、

（ｂ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、遺伝子編集が、第２のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質の発現を阻害する、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップと、

（ｄ）ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、

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

（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる。

【１２３８】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１２３９】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬの第１の集団を１～５日間活性化するステップと、

（ｂ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、遺伝子編集が、第２のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質の発現を阻害する、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップと、

（ｄ）ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約６～９日間行われて、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約９～１１日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、

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

（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる。

【１２４０】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌま

たはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１２４１】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬの第１の集団を１～５日間活性化するステップと、

（ｂ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、遺伝子編集が、第２のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質の発現を阻害する、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートするステップと、

（ｄ）ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約６～９日間行われて、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約９～１１日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、

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

（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる。

【１２４２】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１２４３】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～

７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を取得することであって、遺伝子編集が、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させる、第４のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）任意選択で、第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む。

【１２４４】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１２４５】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を取得することであって、遺伝子編集が、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させる、第４のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｆ）任意選択で、第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートすることと、
（ｇ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む。

【１２４６】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１２４７】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊することによって第３のＴＩＬ集団を遺伝子編集して、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸を、第３のＴＩＬ集団に移入させ、第４のＴＩＬ集団を取得することであって、遺伝子編集が、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させる、第４のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）任意選択で、第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【１２４８】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊することによって第３のＴＩＬ集団を遺伝子編集して、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸を、第３のＴＩＬ集団に移入させ、第４のＴＩＬ集団を取得することであって、遺伝子編集が、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させる、第４のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）任意選択で、第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートすることと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【１２４９】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約１～７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３～７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１２５０】

他の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮは特異的に設計されてもよく、これにより、遺伝子の特異的選択を標的とすることができる標的細胞（複数可）内の、より高い割合のＤＳＢ

事象が可能になる。米国特許公開第２０１３／０３１５８８４号を参照されたい。そのようなまれな切断エンドヌクレアーゼの使用は、トランスフェクトされた細胞内で標的遺伝子の二重不活性化を得る可能性を高め、Ｔ細胞などの操作された細胞の産生を可能にする。さらに、変異誘発を増加させ、標的遺伝子不活性化を強化するために、追加の触媒ドメインをＴＡＬＥＮで導入することができる。米国特許公開第２０１３／０３１５８８４号に記載されているＴＡＬＥＮは、免疫療法に適するようにＴ細胞を操作するために首尾よく使用された。ＴＡＬＥＮを使用して、単一のＴ細胞内の少なくとも２つの遺伝子の不活性化を含む、Ｔ細胞内の様々な免疫チェックポイント遺伝子を不活性化することもできる。米国特許公開第２０１６／０１２０９０６号を参照されたい。追加として、ＴＡＬＥＮを使用して、参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開第２０１８／００２１３７９号に開示されるように、免疫抑制剤及びＴ細胞受容体の標的をコードする遺伝子を不活性化することができる。さらに、ＴＡＬＥＮは、米国特許公開第２０１９／００１０５１４号（これは参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるように、ベータ２－ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）及び／またはクラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーター（ＣＩＩＴＡ）の発現を阻害するために使用され得る。

【１２５１】

ＴＡＬＥ法によりＴＩＬを永久に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが含まれる。

【１２５２】

ＰＤ－１遺伝子を標的とするＴＡＬＥヌクレアーゼの非限定的な例を、以下の表に提供する。これらの実施例では、標的化ゲノム配列は、１５ｂｐのスペーサー（小文字で示される）によって分離された２つの１７塩基対（ｂｐ）の長い配列（大文字で示される、半分の標的と称される）を含有する。各半分の標的は、表１１に列挙される半分のＴＡＬＥヌクレアーゼの反復によって認識される。したがって、特定の実施形態によれば、本発明によるＴＡＬＥヌクレアーゼは、配列番号２８６及び配列番号２８７からなる群から選択される標的配列を認識し、切断する。ＴＡＬＥＮ配列及び遺伝子編集方法はまた、上述のＧａｕｔｒｏｎに記載されている。

【１２５３】

【表４－１】

表１１－ＴＡＬＥＮ　ＰＤ－１配列。

TALEN PD-1 No.1 配列	
標的 PD-1 配列 (配列番号 286)	TTCTCCCCAGCCCTGCT cgtggtgaccgaagg GGACAACGCCACCTTCA
反復 PD-1-左 (配列番号 288)	LTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAI ASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQ ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLL PVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL TPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIAS HDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALE TVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVL CQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPE QVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHD GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETV QRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQ AHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQV VAIASNGGGRPALE
反復 PD-1-右 (配列番号 289)	LTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAI ASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQAL ETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPV LCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP QQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASN NGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALET VQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGKQALETVQRLLPVLCQ AHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQV VAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGG KQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQR LLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAH GLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVA IASNGGGRPALE

【表４－２】

PD-1-左 TALEN (配列番号 290)	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCA TACGATGTTCCAGATTACGCTATCGATATCGCCGATCTACGC ACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACC GAAGGTTCGTTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGT CGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCCA ACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGA CATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCG TTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGG CCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTAC AGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCG GCGTGACCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCA CTGACGGGTGCCCCGCTCAACTTGACCCCCCAGCAGGTGGTG GCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGAC GGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTT GACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCG GCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTG CTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCC ATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT CCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGAC CCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCA AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGT GCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCG CCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAG CGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCG GAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCA GGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCA GGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAG CCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGC TGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGC AGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCC CACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAAT AATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTT GCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGT GGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGG AGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACG GCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATG GCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCG GTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTG

【表４－３】

	GCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGAC GGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTT GACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTG GCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTG CTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCC ATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT CCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGAC CCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCA AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGT GCCAGGCCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATCG CCAGCAATGGCGGCGGCAGGCCGGCGCTGGAGAGCATTGTT GCCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACC AACGACCACCTCGTCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGGCGTCCT GCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGGGGGATCCTATCAG CCGTTCCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAAT CCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTAC ATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCACCCAGGACCG TATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTA CGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCG ACGGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCCATCGACTACGGCG TGATCGTGGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTACAACCTGC CCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGTGGAGGAG AACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTG GAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTT CGTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCCAGCTGAC CAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCGCCGTGCTGTC CGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCG GCACCCTGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAAC GGCGAGATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA

10

20

30

40

50

【表４－４】

PD-1-右 TALEN (配列番号 291)	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGA GACCGCCGCTGCCAAGTTCGAGAGACAGCACATGGACAGCA TCGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGC AACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTCGTTCGACAGTGGCG CAGCACCACGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCG CACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACC GTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAG GCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTC CGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGA GTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCT CAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCAG TGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAACT TGACCCCCCAGCAAGTCGTCGCAATCGCCAGCAATAACGGAG GGAAGCAAGCCCTCGAAACCGTGCAGCGGTTGCTTCCTGTGC TCTGCCAGGCCCACGGCCTTACCCCTGAGCAGGTGGTGGCCA TCGCAAGTAACATTGGAGGAAAGCAAGCCTTGGAGACAGTG CAGGCCCTGTTGCCCGTGCTGTGCCAGGCACACGGCCTCACA CCAGAGCAGGTCGTGGCCATTGCCTCCAACATCGGGGGGAA ACAGGCTCTGGAGACCGTCCAGGCCCTGCTGCCCGTCCTCTG TCAAGCTCACGGCCTGACTCCCCAACAAGTGGTCGCCATCGC CTCTAATAACGGCGGGAAGCAGGCACTGGAAACAGTGCAGA GACTGCTCCCTGTGCTTTGCCAAGCTCATGGGTTGACCCCCCA ACAGGTCGTCGCTATTGCCTCAAACAACGGGGGCAAGCAGG CCCTTGAGACTGTGCAGAGGCTGTTGCCAGTGCTGTGTCAGG CTCACGGGCTCACTCCACAACAGGTGGTCGCAATTGCCAGCA ACGGCGGCGGAAAGCAAGCTCTTGAAACCGTGCAACGCCTC CTGCCCGTGCTCTGTCAGGCTCATGGCCTGACACCACAACAA GTCGTGGCCATCGCCAGTAATAATGGCGGGAAACAGGCTCTT GAGACCGTCCAGAGGCTGCTCCCAGTGCTCTGCCAGGCACAC GGGCTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCTATCGCCAGCAATAAT GGGGGCAAGCAGGCCCTGGAAACAGTCCAGCGCCTGCTGCC AGTGCTTTGCCAGGCTCACGGGCTCACTCCCGAACAGGTCGT GGCAATCGCCTCCAACGGAGGGAAGCAGGCTCTGGAGACCG TGCAGAGACTGCTGCCCGTCTTGTGCCAGGCCCACGGACTCA CACCTCAGCAGGTCGTCGCCATTGCCTCTAACAACGGGGGCA AACAAGCCCTGGAGACAGTGCAGCGGCTGTTGCCTGTGTTGT GCCAAGCCCACGGCTTGACTCCTCAACAAGTGGTCGCCATCG

10

20

30

40

50

【表４－５】

	CCTCAAATGGCGGCGGAAAACAAGCTCTGGAGACAGTGCAG AGGTTGCTGCCCGTCCTCTGCCAAGCCCACGGCCTGACTCCC CAACAGGTCGTCGCCATTGCCAGCAACGGCGGAGGAAAGCA GGCTCTCGAAACTGTGCAGCGGCTGCTTCCTGTGCTGTGTCA GGCTCATGGGCTGACCCCCCAGCAAGTGGTGGCTATTGCCTC TAACAATGGAGGCAAGCAAGCCCTTGAGACAGTCCAGAGGC TGTTGCCAGTGCTGTGCCAGGCCCACGGGCTCACACCCCAGC AGGTGGTCGCCATCGCCAGTAACGGCGGGGGCAAACAGGCA TTGGAAACCGTCCAGCGCCTGCTTCCAGTGCTCTGCCAGGCA CACGGACTGACACCCGAACAGGTGGTGGCCATTGCATCCCAT GATGGGGGCAAGCAGGCCCTGGAGACCGTGCAGAGACTCCT GCCAGTGTTGTGCCAAGCTCACGGCCTCACCCCTCAGCAAGT CGTGGCCATCGCCTCAAACGGGGGGGGCCGGCCTGCACTGG AGAGCATTGTTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGG CCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCCTTGGCCTGCCTCG GCGGGCGTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGGGG GATCCTATCAGCCGTTCCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAG GAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCC CCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCA CCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCA TGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCC AGGAAGCCCGACGGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCCATC GACTACGGCGTGATCGTGGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGC TACAACCTGCCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTA CGTGGAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCA ACGAGTGGTGGAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCA AGTTCCTGTTCGTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGG CCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCG CCGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGA TCAAGGCCGGCACCCTGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAG TTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA
TALEN PD-1 No.2 配列	
標的 PD-1 配列 (配列番号 287)	TACCTCTGTGGGGCCATctcectggccccaaGGCGCAGATCAAAGA GA

【表４－６】

反復 PD-1-左 (配列番号 292)	LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIA SHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQAL ETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPV LCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP QQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASN NGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALET VQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLC QAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQ VVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQ RLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVV AIASNGGGRPALE
反復 PD-1-右 (配列番号 293)	LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAI ASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQA LETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLP VLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT PQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIAS NNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALE TVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVL CQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQ QVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNN GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGKQALETVQ RLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVV AIASNGGGRPALE

【表４－７】

PD-1-左 TALEN (配列番号 294)	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCA TACGATGTTCCAGATTACGCTATCGATATCGCCGATCTACGC ACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACC GAAGGTTCGTTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGT CGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCCA ACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGA CATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCG TTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGG CCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTAC AGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCG GCGTGACCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCA CTGACGGGTGCCCCGCTCAACTTGACCCCGGAGCAGGTGGTG GCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGAC GGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTT GACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCG GCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTG CTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCC ATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT CCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGAC CCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCA AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGT GCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCG CCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAG CGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCC CAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCA GGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCA GGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAG CAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGC TGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGC AGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCC CACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAAT AATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTT GCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGT GGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGG AGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACG

【表４－８】

	GCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATG GTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCG GTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTG GCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGAC GGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTT GACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCG GCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTG CTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCC ATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT CCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGAC CCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAA GCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTG CCAGGCCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATCGC CAGCAATGGCGGCGGCAGGCCGGCGCTGGAGAGCATTGTTG CCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCA ACGACCACCTCGTCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGGCGTCCTG CGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGGGGGATCCTATCAGC CGTTCCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATC CGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACAT CGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCACCCAGGACCGTA TCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTACG GCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCGAC GGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCCATCGACTACGGCGTG ATCGTGGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTACAACCTGCCC ATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAA CCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGGA AGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCG TGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCCAGCTGACCA GGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCGCCGTGCTGTCCG TGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGC ACCCTGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGG CGAGATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA

【表４－９】

PD-1-右 TALEN (配列番号 295)	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGA GACCGCCGCTGCCAAGTTCGAGAGACAGCACATGGACAGCA TCGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGC AACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTCGTTCGACAGTGGCG CAGCACCACGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCG CACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACC GTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAG GCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTC CGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGA GTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCT CAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCAG TGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAACT TGACCCCCGAGCAAGTCGTCGCAATCGCCAGCCATGATGGAG GGAAGCAAGCCCTCGAAACCGTGCAGCGGTTGCTTCCTGTGC TCTGCCAGGCCCACGGCCTTACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCA TCGCAAGTAACGGAGGAGGAAAGCAAGCCTTGGAGACAGTG CAGCGCCTGTTGCCCGTGCTGTGCCAGGCACACGGCCTCACA CCAGAGCAGGTCGTGGCCATTGCCTCCCATGACGGGGGGAA ACAGGCTCTGGAGACCGTCCAGAGGCTGCTGCCCGTCCTCTG TCAAGCTCACGGCCTGACTCCCCAACAAGTGGTCGCCATCGC CTCTAATGGCGGCGGGAAGCAGGCACTGGAAACAGTGCAGA GACTGCTCCCTGTGCTTTGCCAAGCTCATGGGTTGACCCCCCA ACAGGTCGTCGCTATTGCCTCAAACGGGGGGGGCAAGCAGG CCCTTGAGACTGTGCAGAGGCTGTTGCCAGTGCTGTGTCAGG CTCACGGGCTCACTCCACAACAGGTGGTCGCAATTGCCAGCA ACGGCGGCGGAAAGCAAGCTCTTGAAACCGTGCAACGCCTC CTGCCCGTGCTCTGTCAGGCTCATGGCCTGACACCACAACAA GTCGTGGCCATCGCCAGTAATAATGGCGGGAAACAGGCTCTT GAGACCGTCCAGAGGCTGCTCCCAGTGCTCTGCCAGGCACAC GGGCTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCTATCGCCAGCAATATT GGGGGCAAGCAGGCCCTGGAAACAGTCCAGGCCCTGCTGCC AGTGCTTTGCCAGGCTCACGGGCTCACTCCCCAGCAGGTCGT GGCAATCGCCTCCAACGGCGGAGGGAAGCAGGCTCTGGAGA CCGTGCAGAGACTGCTGCCCGTCTTGTGCCAGGCCCACGGAC TCACACCTGAACAGGTCGTCGCCATTGCCTCTCACGATGGGG GCAAACAAGCCCTGGAGACAGTGCAGCGGCTGTTGCCTGTGT

【表４－１０】

	TGTGCCAAGCCCACGGCTTGACTCCTCAACAAGTGGTCGCCA TCGCCTCAAATGGCGGCGGAAAACAAGCTCTGGAGACAGTG CAGAGGTTGCTGCCCGTCCTCTGCCAAGCCCACGGCCTGACT CCCCAACAGGTCGTCGCCATTGCCAGCAACAACGGAGGAAA GCAGGCTCTCGAAACTGTGCAGCGGCTGCTTCCTGTGCTGTG TCAGGCTCATGGGCTGACCCCCGAGCAAGTGGTGGCTATTGC CTCTAATGGAGGCAAGCAAGCCCTTGAGACAGTCCAGAGGCT GTTGCCAGTGCTGTGCCAGGCCCACGGGCTCACACCCCAGCA GGTGGTCGCCATCGCCAGTAACAACGGGGGCAAACAGGCAT TGGAAACCGTCCAGCGCCTGCTTCCAGTGCTCTGCCAGGCAC ACGGACTGACACCCGAACAGGTGGTGGCCATTGCATCCCATG ATGGGGGCAAGCAGGCCCTGGAGACCGTGCAGAGACTCCTG CCAGTGTTGTGCCAAGCTCACGGCCTCACCCCTCAGCAAGTC GTGGCCATCGCCTCAAACGGGGGGGGCCGGCCTGCACTGGA GAGCATTGTTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCC GCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCCTTGGCCTGCCTCGGC GGGCGTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGGGGGA TCCTATCAGCCGTTCCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGA GAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCC ACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCACC CAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATG AAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAG GAAGCCCGACGGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCCATCGA CTACGGCGTGATCGTGGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTA CAACCTGCCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACG TGGAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAAC GAGTGGTGGAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAG TTCCTGTTCGTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCC CAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCGCC GTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATC AAGGCCGGCACCCTGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTT CAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA

【１２５４】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬの第１の集団を１～５日間活性化するステップと、

（ｂ）第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集するステップであって、遺伝子編集が、サイトポレーション培地中のＰＤ－１を標的とする転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して、第２のＴＩＬ集団を取得することを含み、遺伝子編集が、第２のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１の発現を阻害する、遺伝子編集するステップと、

（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートするステップと、

（ｄ）ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約６～９日間行われて、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約９～１１日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップ

と、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すステップと、を含み、
（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる。
【１２５５】
いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【１２５６】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集することであって、遺伝子編集が、サイトポレーション培地中のＰＤ－１を標的とする転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して、第４のＴＩＬ集団を取得することを含み、遺伝子編集が、第３のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１の発現を阻害する、遺伝子編集することと、
（ｅ）任意選択で、第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートすることと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む。
【１２５７】
いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【１２５８】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊することによって第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、ＰＤ－１を標的とする転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸を、第３のＴＩＬ集団に移入させ、第４のＴＩＬ集団を取得することであって、遺伝子編集が、第３のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１の発現を阻害する、第４のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）任意選択で、第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートすることと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む。

【１２５９】

いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１２６０】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬの第１の集団を１～５日間活性化するステップと、
（ｂ）第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集するステップであって、遺伝子編集が、サイトポレーション培地中の配列番号１４９または配列番号１５０を標的とする転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して、第２のＴＩＬ集団を取得することを含み、遺伝子編集が、第２のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１の発現を阻害する、遺伝子編集するステップと、
（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートするステップと、
（ｄ）ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約６～９日間行われて、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生する

ステップであって、第２の拡張が、約９～１１日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、

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

（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる。

【１２６１】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１２６２】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集することであって、遺伝子編集が、サイトポレーション培地中の配列番号１４９または配列番号１５０を標的とする転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して、第４のＴＩＬ集団を取得することを含み、遺伝子編集が、第３のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１の発現を阻害する、遺伝子編集することと、

（ｅ）任意選択で、第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートすることと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む。

【１２６３】

いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１２６４】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、配列番号１４９または配列番号１５０を標的とする転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸を、第３のＴＩＬ集団に移入させることによって、第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を取得することであって、遺伝子編集が、第３のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１の発現を阻害する、第４のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）任意選択で、第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートすることと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む。

【１２６５】
いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１２６６】
いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬの第１の集団を１～５日間活性化するステップと、
（ｂ）第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集するステップであって、遺伝子編集が、サイトポレーション培地中の配列番号１５７及び配列番号１５８または配列番号１５３及び配列番号１５４に従って転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して、第２のＴＩＬ集団を取得することを含み、遺伝子編集が、第２のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１の発現を阻害する、遺伝子編集するステップと、
（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートするステップと、
（ｄ）ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約６～９日間行われて、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約９～１１日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、

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

（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる。

【１２６７】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１２６８】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集することであって、遺伝子編集が、サイトポレーション培地中の配列番号１５７及び配列番号１５８または配列番号１５３及び配列番号１５４に従って転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して、第４のＴＩＬ集団を取得することを含み、遺伝子編集が、第３のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１の発現を阻害する、遺伝子編集することと、

（ｅ）任意選択で、第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートすることと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む。

【１２６９】

いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される

。
【１２７０】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、配列番号１５７及び配列番号１５８または配列番号１５３及び配列番号１５４に記載の転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを、第３のＴＩＬ集団に移入させることによって、第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を取得することであって、遺伝子編集が、第３のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１の発現を阻害する、第４のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）任意選択で、第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートすることと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む。
【１２７１】
いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【１２７２】
ＴＡＬＥ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の他の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）、及び／またはＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１が含まれる。
【１２７３】
ＴＡＬＥ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第８，５８６，５２６号に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。これらの開示される例は、反復ＲＶＤを含有する２つ以上のＴＡＬＥ反復単位を有する天然に存在しないＤＮＡ結合ポリペプチド、ＴＡＬＥタンパク質の残基からなるＮ－キャップポリペプチド、及びＴＡＬＥタンパク質の全長Ｃ末端領域の断片からなるＣ－キャップポリペプチドの使用を含む。
【１２７４】

ＴＡＬＥＮ介在性遺伝子組み込み及び不活性化を効率的に行うために使用することができ、本発明の実施形態に従って使用することができるＴＡＬＥＮ設計及び設計戦略、活性評価、スクリーニング戦略、ならびに方法の例は、Ｖａｌｔｏｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ，２０１４，６９，１５１－１７０（これは参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【１２７５】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップが、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質及び／または接着分子の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質及び／または接着分子の発現を調節する、ＴＡＬＥヌクレアーゼ系の送達を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１２７６】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一過的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
少なくとも１つの遺伝子エディターの移入ステップが、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質及び／または接着分子の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質及び／または接着分子の発現を調節する、ＴＡＬＥヌクレアーゼ系の送達を含む。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１２７７】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の

拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させるための第２のＴＩＬ集団上での無菌エレクトロポレーションステップと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップが、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現を抑制する、ＴＡＬＥヌクレアーゼ系の送達を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト ＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【１２７８】
いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一過的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、

少なくとも１つの遺伝子エディターの移入ステップが、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現を抑制する、ＴＡＬＥヌクレアーゼ系の送達を含む。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１２７９】

ｃ．ジンクフィンガー法

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、もしくはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、この方法は、ジンクフィンガーまたはジンクフィンガーヌクレアーゼ法によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、細胞表面での少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは減少させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、細胞表面での少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。

【１２８０】

個々のジンクフィンガーは、保存されたββα立体配置でおよそ３０個のアミノ酸を含む。αらせんの表面上のいくつかのアミノ酸は、典型的には、異なる選択性レベルでＤＮＡの主溝の３ｂｐと接触する。ジンクフィンガーは、２つのタンパク質ドメインを有する。第１のドメインは、ＤＮＡ結合ドメインであり、真核生物転写因子を含み、ジンクフィンガーを含む。第２のドメインは、ヌクレアーゼドメインであり、ＦｏｋＩ制限酵素を含み、ＤＮＡの触媒的切断を担っている。

【１２８１】

個々のＺＦＮのＤＮＡ結合ドメインは、典型的には、３～６個の個々のジンクフィンガ

ー反復配列を含み、各々９～１８塩基対を認識することができる。ジンクフィンガードメインが目的の標的部位に特異的である場合、合計１８塩基対を認識する３フィンガーＺＦＮの対でさえ、理論的には、哺乳動物ゲノムの単一遺伝子座を標的とすることができる。新たなジンクフィンガーアレイを生成するための１つの方法は、既知の特異性を有するより小さいジンクフィンガー「モジュール」を組み合わせることである。最も一般的なモジュラーアセンブリプロセスは、各々３塩基対のＤＮＡ配列を認識することができる３つの別個のジンクフィンガーを組み合わせて、９塩基対の標的部位を認識することができる３フィンガーアレイを生成することを含む。あるいは、オリゴマー化プールエンジニアリング（ＯＰＥＮ）などの選択ベースのアプローチを使用して、隣接するフィンガー間のコンテキスト依存的相互作用を考慮したランダム化ライブラリーから新たなジンクフィンガーアレイを選択することができる。設計されたジンクフィンガーは市販されており、Ｓａｎｇａｍｏ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｒｉｃｈｍｏｎｄ，ＣＡ，ＵＳＡ）は、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＵＳＡ）と協同して、ジンクフィンガー構築のための独自のプラットフォーム（ＣｏｍｐｏＺｒ（登録商標））を開発した。

【１２８２】

ジンクフィンガー法によりＴＩＬを永久に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが含まれる。

【１２８３】

ジンクフィンガー法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）、及び／またはＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１が含まれる。

【１２８４】

ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第６，５３４，２６１号、同第６，６０７，８８２号、同第６，７４６，８３８号、同第６，７９４，１３６号、同第６，８２４，９７８号、同第６，８６６，９９７号、同第６，９３３，１１３号、同第６，９７９，５３９号、同第７，０１３，２１９号、同第７，０３０，２１５号、同第７，２２０，７１９号、同第７，２４１，５７３号、同第７，２４１，５７４号、同第７，５８５，８４９号、同第７，５９５，３７６号、同第６，９０３，１８５号、及び同第６，４７９，６２６号に記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。

【１２８５】

ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の他の例は、Ｂｅａｎｅ，ｅｔａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１５，２３　１３８０－１３９０に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１２８６】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップが、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質及び／または接着分子の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質及び／または接着分子の発現を調節する、ジンクフィンガーヌクレアーゼ系の送達を含む。
いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト　ＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１２８７】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を

刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一過的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
少なくとも１つの遺伝子エディターの移入ステップが、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質及び／または接着分子の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質及び／または接着分子の発現を調節する、ジンクフィンガーヌクレアーゼ系の送達を含む。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト ＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【１２８８】
いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップが、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現を抑制する、ジンクフィンガーヌクレアーゼ系の送達を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト ＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１２８９】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一過的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
少なくとも１つの遺伝子エディターの移入ステップが、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現を抑制する、ジンクフィンガーヌクレアーゼ系の送達を含む。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１２９０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３のまたは第４のＴＩＬ集団を培養するステップ、または第２の拡張ステップが、第３のまたは第４のＴＩＬ集団を約１～７日間の第１の期間にわたって培養することによって行われるか、または第２の拡張を約１～７日間の第１の期間にわたって行い、第１の期間の終わりに、培養物を複数の継代培養物に分割し、複数の継代培養物の各々を追加のＩＬ－２で約３～７日間の第２の期間にわたって培養し、第２の期間の終わりに、複数の継代培養物を組み合わせて、増加した数のＴＩＬまたは治療的ＴＩＬ集団を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２９１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日または１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２９２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２９３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約５～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２９４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約６～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２９５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約７～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２９６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約８～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２９７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約９～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２９８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約１０～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２９９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３００】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約５～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３０１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約６～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３０２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約７～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３０３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約８～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３０４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約９～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３０５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３０６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約５～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３０７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約６～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３０８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約７～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のう

ちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３０９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約８～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３１０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約３～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３１１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約３～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３１２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約３～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３１３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約３～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３１４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約３～４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３１５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３１６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３１７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３１８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３１９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約５～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３２０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約５～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３２１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約５～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約６～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約６～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約７～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３３０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３３１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３３２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３３３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうち

のいずれかに記載の方法を提供する。
【１３３４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３３５】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化するステップが約１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３３６】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約２～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３３７】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約３～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３３８】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約４～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３３９】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約５～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３４０】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約６～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３４１】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約１～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３４２】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約１～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３４３】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約１～４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３４４】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約１～３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３４５】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約１～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３４６】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約２～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３４７】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約３～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３４８】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約４～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３４９】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約５～６日間行われるように修

正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３５０】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約３～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３５１】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約３～４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３５２】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約２～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３５３】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約２～４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３５４】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約２～３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３５５】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約４～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３５６】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３５７】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３５８】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３５９】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３６０】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３６１】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３６２】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３６３】
いくつかの実施形態では、本発明は、刺激ステップが約１日、２日、または３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３６４】
いくつかの実施形態では、本発明は、刺激ステップが約１～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３６５】
いくつかの実施形態では、本発明は、刺激ステップが約２～３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３６６】
いくつかの実施形態では、本発明は、刺激ステップが約１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３６７】
いくつかの実施形態では、本発明は、刺激ステップが約２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３６８】
いくつかの実施形態では、本発明は、刺激ステップが約３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３６９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが、約５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、１４日、または１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３７０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約６～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３７１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約７～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３７２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約８～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３７３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約９～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３７４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１０～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３７５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１１～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３７６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１２～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３７７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１３～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３７８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１４～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３７９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約５～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３８０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約６～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３８１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約７～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３８２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約８～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３８３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約９～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３８４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１０～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３８５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１１～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３８６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１２～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３８７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１３～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３８８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約５～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３８９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約５～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３９０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約５～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３９１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステッ

プまたは第２の拡張ステップが約５～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３９２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約５～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３９３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約５～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３９４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約５～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３９５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約５～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３９６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約６～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３９７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約６～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３９８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約６～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３９９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約６～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４００】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約６～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４０１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約６～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４０２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約６～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４０３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約７～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４０４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約７～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４０５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約７～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４０６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約７～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４０７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約７～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４０８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約７～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４０９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約８～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４１０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約８～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４１１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約８～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４１２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約８～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４１３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約８～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４１４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約９～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４１５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約９～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４１６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステッ

プまたは第２の拡張ステップが約９～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４１７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約９～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４１８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１０～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４１９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１０～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１０～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１１～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１１～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１２～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４３０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４３１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４３２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４３３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４３４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４３５】
Ｅ．一過性細胞修飾
いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、タンパク質発現を一過的に変化させるために、各々本明細書で提供されるように、閉鎖滅菌製造プロセス中を含む、拡張ステップ前、拡張ステップ中、または拡張ステップ後にさらに操作される。いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のタンパク質の発現の促進または１つ以上のタンパク質の発現の阻害、ならびに一組のタンパク質の促進及び別の組のタンパク質の阻害の両方の組み合わせの同時発生のために、ＴＩＬ集団へのリボ核酸（ＲＮＡ）挿入（メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の挿入を含む）などのヌクレオチド挿入による一過性細胞修飾を含む。
【１４３６】
いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、タンパク質発現の一過性の変化を受ける。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、第１の拡張前にバルクＴＩＬ集団において生じる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、第１の拡張後に生じる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、第２の拡張前にバルクＴＩＬ集団において生じる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、第２の拡張後に生じる。
【１４３７】
いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、免疫調節組成物の一過性の発現をもたらす。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、免疫調節融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、免疫調節剤に融合した膜アンカーを含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－２１からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニス

ト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択されるインターロイキンである。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択されるインターロイキンである。

【１４３８】

本明細書で考察されたように、本発明の実施形態は、それらの治療効果を増強するためにタンパク質発現の一過性の改変を介して一過的に修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を提供する。本発明の実施形態は、免疫調節組成物の発現のために、ＴＩＬ集団へのヌクレオチド挿入（例えば、ＲＮＡ）による一過性の修飾を包含する。本発明の実施形態は、ＴＩＬを治療用集団に拡張するための方法も提供し、方法は、ＴＩＬの一過性の修飾を含む。ＴＩＬ集団を一過的に修飾するために使用され得るいくつかの遺伝子編集技術が存在し、それらは本発明による使用に好適である。

【１４３９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に改変する方法は、ＴＩＬを、免疫調節組成物をコードする核酸（例えば、ｍＲＮＡ）と接触させ、次いで、細胞にエレクトロポレーションステップを課すことを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｔｓｏｎｇ，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．１９９１，６０，２９７－３０６及び米国特許出願公開第２０１４／０２２７２３７Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。米国特許第５，０１９，０３４号、同第５，１２８，２５７号、同第５，１３７，８１７号、同第５，１７３，１５８号、同第５，２３２，８５６号、同第５，２７３，５２５号、同第５，３０４，１２０号、同第５，３１８，５１４号、同第６，０１０，６１３号、及び同第６，０７８，４９０号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどの当該技術分野で知られている他のエレクトロポレーション法が使用され得る。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、滅菌エレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルスエレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる、及び（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起

こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬにおける細孔形成を誘導するステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる、及び（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なり、これにより、誘導された細孔が比較的長期間にわたって持続され、ＴＩＬの生存率が維持される。

【１４４０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法（リン酸カルシウム核酸沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス）は、当該技術分野で知られており、Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９７３，５２，４５６－４６７、Ｗｉｇｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１９７９，７６，１３７３－１３７６、及びＣｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｒｅａ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１９８７，７，２７４５－２７５２、ならびに米国特許第５，５９３，８７５号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リポソームトランスフェクションステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－ｎ，ｎ，ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）及びジオレオイルホスホチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム製剤を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Ｒｏｓｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １９９１，１０，５２０－５２５及びＦｅｌｇｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８７，８４，７４１３－７４１７、ならびに米国特許第５，２７９，８３３号、同第５，９０８，６３５号、同第６，０５６，９３８号、同第６，１１０，４９０号、同第６，５３４，４８４号、及び同第７，６８７，０７０号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、米国特許第５，７６６，９０２号、同第６，０２５，３３７号、同第６，４１０，５１７号、同第６，４７５，９９４号、及び同第７，１８９，７０５号に記載されている方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＴＩＬは、本明細書に記載のＴＩＬの第１の集団、第２の集団、及び／または第３の集団であり得る。

【１４４１】

いくつかの実施形態では、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームが、タンパク質発現を一過的に改変するために使用される。例えば、国際特許出願公開第ＷＯ２０１３／０５９３４３Ａ１号、同第ＷＯ２０１７／００８０６３Ａ１号、もしくは同第ＷＯ２０１７／１２３６６３Ａ１号、または米国特許出願公開第２０１４／０２８７５０９Ａ１号、同第２０１８／０２０１８８９Ａ１号、もしくは同第２０１８／０２４５０８９Ａ１号を参照されたい（これらのすべては、参照によりそれら全体が、特に核酸送達のためのマイクロ流体プラットフォームの開示について本明細書に組み込まれる）。ＳＱＺプラットフォームでは、修飾のためのＴＩＬの細胞膜は、マイクロ流体収縮によって一

時的に破壊され、それによって一過的に発現されたタンパク質をコードする核酸の送達を可能にする。ＴＩＬは、本明細書に記載のＴＩＬの第１の集団、第２の集団、及び／または第３の集団であり得る。

【１４４２】

Ｆ．免疫チェックポイント

本発明の特定の実施形態によれば、ＴＩＬ集団は、ＴＩＬ集団におけるＴＩＬ細胞の細胞表面で１つ以上の免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ集団における１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子を遺伝子修飾するように遺伝子編集される。別の言い方をすると、細胞表面で１つ以上の免疫調節組成物を発現させるようにＴＩＬ集団を改変することに加えて、ＴＩＬの１つ以上の免疫チェックポイントをコードするＴＩＬ内のＤＮＡ配列が、ＴＩＬのゲノム内で永続的に修飾される、例えば、挿入される、欠失される、または置換される。免疫チェックポイントは、阻害経路または刺激経路を介して免疫応答を調節するリンパ球によって発現される分子である。がんの場合、免疫チェックポイント経路は、しばしば活性化されて抗腫瘍応答を阻害する、すなわち、悪性細胞によるある特定の免疫チェックポイントの発現は、抗腫瘍免疫を阻害し、がん細胞の成長を促進する。例えば、Ｍａｒｉｎ－Ａｃｅｖｅｄｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ＆Ｏｎｃｏｌｏｇｙ（２０１８）１１：３９を参照されたい。したがって、ある特定の阻害チェックポイント分子は、本発明の免疫療法の標的として機能する。特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、ある特定の免疫チェックポイント経路を遮断または刺激し、それによって腫瘍に対する体の免疫学的活性を増強するように遺伝子編集される。

【１４４３】

本明細書で使用される場合、免疫チェックポイント遺伝子は、免疫チェックポイント分子をコードするＤＮＡ配列を含む。本発明の特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張法中の遺伝子編集ＴＩＬは、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは減少させる。例えば、遺伝子編集は、免疫反応を増強するために、ＰＤ－１またはＣＴＬＡ－４などの阻害性受容体の発現をサイレンスまたは減少させ得る。

【１４４４】

最も広く研究されているチェックポイントには、プログラムされた細胞死受容体－１（ＰＤ－１）及び細胞傷害性Ｔリンパ球関連分子－４（ＣＴＬＡ－４）が含まれ、これらは、それらが阻害リガンドと相互作用するときに、主要なエフェクター機能（例えば、活性化、増殖、サイトカイン放出、細胞傷害性など）を阻害する免疫細胞上の阻害性受容体である。以下でさらに詳細に論じられるように、ＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４に加えて、多数のチェックポイント分子が免疫療法の潜在的な標的として浮上している。

【１４４５】

本発明のＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが含まれる。例えば、本発明のＴＩＬにおいてサイレンシングまたは阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、Ｃｉｓｈ、ＣＢＬ－Ｂ、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβ、及びＰＫＡを含む群から選択されてもよい。ＢＡＦＦ（ＢＲ３）は、Ｂｌｏｏｍ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏ

ｔｈｅｒ．，２０１８，ｉｎ　ｐｒｅｓｓに記載されている。別の実施例によれば、本発明のＴＩＬにおいてサイレンスまたは阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせを含む群から選択されてもよい。

【１４４６】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われ、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップは、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）系、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）系、またはジンクフィンガー系からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系は、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、その分子の発現を阻害する。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１４４７】

１．ＰＤ－１

チェックポイント遮断の誘導のために最も研究されている標的のうちの１つは、Ｔ細胞調節因子のＣＤ２８スーパーファミリーのメンバーであるプログラム死受容体（ＰＤ１ま

たはＰＤ－１、ＰＤＣＤ１としても知られている）である。そのリガンドであるＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２は、メラノーマを含む様々な腫瘍細胞上で発現する。ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１との相互作用は、Ｔ細胞エフェクター機能を阻害し、慢性刺激の設定においてＴ細胞疲弊をもたらし、腫瘍微小環境においてＴ細胞アポトーシスを誘導する。ＰＤ１はまた、免疫監視からの腫瘍特異的エスケープにおいても役割を果たし得る。

【１４４８】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＤ１の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＰＤ１の発現をサイレンシングまたは抑制することによって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＰＤ１などの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ１の発現をサイレンシングまたは低減し得る。

【１４４９】

２．ＣＴＬＡ－４

ＣＴＬＡ－４発現は、活性化Ｔ細胞上でのＴ細胞活性化時に誘導され、抗原提示細胞活性化抗原ＣＤ８０及びＣＤ８６との結合について競合する。ＣＴＬＡ－４とＣＤ８０またはＣＤ８６との相互作用は、Ｔ細胞阻害を引き起こし、免疫応答のバランスを維持するのに役立つ。しかしながら、ＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４相互作用の阻害は、Ｔ細胞の活性化を延長し、したがって、がん抗原に対する免疫応答のレベルを増加させ得る。

【１４５０】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＣＴＬＡ－４の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４の両方の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは低減される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＣＴＬＡ－４の発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＣＴＬＡ－４などの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＣＴＬＡ－４の発現をサイレンスまたは抑制し得る。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＡＬＥＮ法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４の発現をサイレンシングまたは低減し得る。

【１４５１】

３．ＬＡＧ－３

リンパ球活性化遺伝子－３（ＬＡＧ－３、ＣＤ２２３）は、主要組織適合複合体（ＭＨＣ）クラスＩＩのライゲーション後に、Ｔ細胞及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞によって発現される。その機序は不明なままであるが、その調節は、Ｔ細胞機能に対して負の調節効果を引き起こし、組織損傷及び自己免疫を防止する。ＬＡＧ－３及びＰＤ－１は、Ｔ

ＩＬ上でしばしば共発現及び上方制御され、免疫疲弊及び腫瘍成長につながる。したがって、ＬＡＧ－３遮断は、抗腫瘍応答を改善する。例えば、Ｍａｒｉｎ－Ａｃｅｖｅｄｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ＆Ｏｎｃｏｌｏｇｙ（２０１８）１１：３９を参照されたい。

【１４５２】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＬＡＧ－３の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＬＡＧ－３の両方の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは低減される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＬＡＧ－３の発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＬＡＧ－３などの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。特定の実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＬＡＧ－３の発現をサイレンスまたは抑制し得る。いくつかの実施形態では、ＴＡＬＥＮ法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現をサイレンシングまたは低減し得る。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１４５３】

４．ＴＩＭ－３

Ｔ細胞免疫グロブリン－３（ＴＩＭ－３）は、Ｔ細胞の直接的な負の調節因子であり、ＮＫ細胞及びマクロファージ上で発現する。ＴＩＭ－３は、骨髄由来サプレッサー細胞（ＭＤＳＣ）の増殖を誘導することにより、間接的に免疫抑制を促進する。そのレベルは、機能不全及び疲弊したＴ細胞で特に上昇することが見出されており、悪性腫瘍における重要な役割を示唆している。

【１４５４】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＴＩＭ－３の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＴＩＭ－３の発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＭ－３などの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＴＩＭ－３の発現をサイレンスまたは抑制し得る。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１４５５】

５．Ｃｉｓｈ

サイトカインシグナル伝達（ＳＯＣＳ）ファミリーのサプレッサーのメンバーであるＣ

ｉｓｈは、ＣＤ８＋Ｔ細胞におけるＴＣＲ刺激によって誘導され、腫瘍に対するそれらの機能的不活性を阻害する。ＣＤ８＋Ｔ細胞におけるＣｉｓｈの遺伝的欠失は、それらの拡大、機能的親和性、及びサイトカイン多機能性を増強し得、確立された腫瘍の顕著で持続的な退縮をもたらす。例えば、Ｐａｌｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２１２（１２）：２０９５（２０１５）を参照されたい。

【１４５６】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＣｉｓｈの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＣｉｓｈの両方の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは低減される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＣｉｓｈの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、Ｃｉｓｈなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＣｉｓｈの発現をサイレンスまたは抑制し得る。いくつかの実施形態では、ＴＡＬＥＮ法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＣｉｓｈの発現をサイレンシングまたは低減し得る。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１４５７】

６．ＴＧＦβ

ＴＧＦβシグナル伝達経路は、細胞増殖、分化、アポトーシス、運動性及び侵入、細胞外マトリックス産生、血管新生、ならびに免疫応答を調節することにおいて複数の機能を有する。ＴＧＦβシグナル伝達の調節解除は、腫瘍において頻繁に行われ、腫瘍の開始、発達及び転移において重要な役割を有する。微小環境レベルでは、ＴＧＦβ経路は、発がん全体にわたる腫瘍成長及び転移のための好ましい微小環境を生成することに寄与する。例えば、Ｎｅｕｚｉｌｌｅｔ ｅｔ ａｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ＆Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｖｏｌ．１４７，ｐｐ．２２－３１（２０１５）を参照されたい。

【１４５８】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＴＧＦβの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＴＧＦβの両方の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは低減される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＴＧＦβの発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＧＦβなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＴＧＦβの発現をサイレンスまたは抑制し得る。いくつかの実施形態では、ＴＡＬＥＮ法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＴＧＦβの発現をサイレンシングまたは低減し得る。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパ

ク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１４５９】

いくつかの実施形態では、ＴＧＦβＲ２（ＴＧＦベータ受容体２）は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９系を使用してＴＧＦβＲ２をサイレンシングすることによって、または当該技術分野で知られている方法を使用してＴＧＦβＲ２優性陰性細胞外トラップを使用することによって抑制され得る。

【１４６０】

７．ＰＫＡ

タンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）は、セリン－トレオニンタンパク質キナーゼスーパーファミリーの周知のメンバーである。ｃＡＭＰ依存性タンパク質キナーゼとしても知られるＰＫＡは、ｃＡＭＰ結合時の活性化を介してＧタンパク質結合受容体のシグナル伝達を媒介するマルチユニットプロテインキナーゼである。それは、代謝からイオンチャネル活性化、細胞成長及び分化、遺伝子発現及びアポトーシスまでの多種多様な細胞プロセスの制御に関与する。重要なことに、ＰＫＡは、多くの腫瘍の開始及び進行に関与している。例えば、Ｓａｐｉｏ　ｅｔ　ａｌ．，ＥＸＣＬＩ　Ｊｏｕｒｎａｌ；２０１４；１３：８４３－８５５．

【１４６１】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＫＡの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンスまたは減少される。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＰＫＡの両方の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは低減される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＰＫＡの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＰＫＡなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＰＫＡの発現をサイレンスまたは抑制し得る。いくつかの実施形態では、ＴＡＬＥＮ法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＰＫＡの発現をサイレンシングまたは低減し得る。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１４６２】

８．ＣＢＬＢ

ＣＢＬＢ（またはＣＢＬ－Ｂ）は、Ｅ３ユビキチン－タンパク質リガーゼであり、Ｔ細胞活性化の負の制御因子である。Ｂａｃｈｍａｉｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２０００，４０３，２１１－２１６、Ｗａｌｌｎｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２，６９２６３９。

【１４６３】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＣＢＬＢの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンスまたは減少される。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＣＢＬ－Ｂの両方の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは低減される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩ

Ｌの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＣＢＬＢの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＣＢＬＢなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＰＫＡの発現をサイレンスまたは抑制し得る。いくつかの実施形態では、ＴＡＬＥＮ法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＣＢＬ－Ｂの発現をサイレンシングまたは低減し得る。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＣＢＬＢは、ＴＡＬＥＮノックアウトを使用してサイレンシングされる。いくつかの実施形態では、ＣＢＬＢは、ＴＡＬＥ－ＫＲＡＢ転写阻害剤ノックインを使用してサイレンシングされる。これらの方法のさらなる詳細は、Ｂｏｅｔｔｃｈｅｒ ａｎｄ ＭｃＭａｎｕｓ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｒｅｖｉｅｗ，２０１５，５８，５７５－５８５に見出すことができる。

【１４６４】

９．ＴＩＧＩＴ

Ｉｇ及びＩＴＩＭ（免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ）ドメインまたはＴＩＧＩＴを有するＴ細胞免疫受容体は、Ｉｇ様Ｖ型ドメインを有し、その細胞質ドメイン内にＩＴＩＭを有する膜貫通糖タンパク質受容体である。Ｋｈａｌｉｌ，ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１５，１２８，１－６８、Ｙｕ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２００９，Ｖｏｌ．１０，Ｎｏ．１，４８－５７。ＴＩＧＩＴは、いくつかのＴ細胞及びナチュラルキラー細胞によって発現される。追加として、ＴＩＧＩＴは、特にメラノーマを有する個体から、抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞及びＣＤ８＋ＴＩＬ上で過剰発現することが示されている。研究では、ＴＩＧＩＴ経路が腫瘍免疫回避に寄与し、ＴＩＧＩＴ阻害がポリクローナル及び抗原特異的刺激に応答して、Ｔ細胞の活性化及び増殖を増加させることが示されている。Ｋｈａｌｉｌ，ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１５，１２８，１－６８．さらに、ＰＤ－１またはＴＩＭ３のいずれかとのＴＩＧＩＴの共遮断は、マウスモデルにおいて固形腫瘍に対する相乗効果を示している。Ｉｄ．；Ｋｕｒｔｕｌｕｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ，２０１５，Ｖｏｌ．１２５，Ｎｏ．１１，４０５３－４０６２も参照されたい。

【１４６５】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＴＩＧＩＴの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンスまたは減少される。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＴＩＧＩＴの両方の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは低減される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＴＩＧＩＴの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＧＩＴなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＴＩＧＩＴの発現をサイレンスまたは抑制し得る。いくつかの実施形態では、ＴＡＬＥＮ法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＴＩＧＩＴの発現をサイレンシングまたは低減し得る。いくつかの実施形態では、少なくとも１

つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。ＴＩＧＩＴは、ＴＡＬＥＮノックアウトを使用してサイレンシングされる。いくつかの実施形態では、ＴＩＧＩＴは、ＴＡＬＥ－ＫＲＡＢ転写阻害剤ノックインを使用してサイレンシングされる。これらの方法のさらなる詳細は、Ｂｏｅｔｔｃｈｅｒ ａｎｄ Ｍｃ Ｍａｎｕｓ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｒｅｖｉｅｗ，２０１５，５８，５７５－５８５に見出すことができる。いくつかの実施形態では、ＴＡＬＥＮ法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＴＩＧＩＴの発現をサイレンシングまたは低減し得る。

【１４６６】

１０．ＴＯＸ

胸腺細胞選択関連高移動度群（ＨＭＧ）ボックス（ＴＯＸ）は、ＨＭＧボックスＤＮＡ結合ドメインを含有する転写因子である。ＴＯＸは、配列非依存であるが構造依存的な方法でＤＮＡに結合すると考えられるＨＭＧボックススーパーファミリーのメンバーである。

【１４６７】

ＴＯＸは、腫瘍特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞機能障害またはＴ細胞枯渇の重要な調節因子として同定され、例えば、Ｓｃｏｔｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２０１９，５７１，２７０－２７４及びＫｈａｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２０１９，５７１，２１１－２１８（これらの両方は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞疲弊を転写的かつ後成的にプログラムすることが見出された。ＴＯＸはまた、Ａｌｆｅｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２０１９，５７１，２６５－２６９（これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように、慢性感染中のＴ細胞機能不全の進行及び疲弊したＴ細胞の維持に対する重要な因子であることが見出された。ＴＯＸは、腫瘍及び慢性ウイルス感染からの機能不全または疲弊したＴ細胞において高度に発現される。インビトロでのエフェクターＴ細胞におけるＴＯＸの異所発現は、Ｔ細胞疲弊に関連する転写プログラムを誘導したが、Ｔ細胞におけるＴＯＸの欠失は、Ｔ疲弊プログラムを廃止した。

【１４６８】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＴＯＸの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンスまたは減少される。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＴＯＸの両方の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは低減される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＯＸの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＯＸなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＴＯＸの発現をサイレンスまたは抑制し得る。いくつかの実施形態では、ＴＡＬＥＮ法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＴＯＸの発現をサイレンシングまたは低減し得る。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１４６９】

Ｇ．共刺激受容体または接着分子の過剰発現

追加の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張法中の遺伝子編集ＴＩＬは、細胞表面における少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、１つ以上の共刺激受容体、接着分子及び／またはサイトカインの発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。例えば、遺伝子編集は、共刺激受容体、接着分子またはサイトカインの発現を増強させ得、これは、遺伝子修飾されていない共刺激受容体、接着分子またはサイトカインの発現と比較して、それが過剰発現されることを意味する。本発明のＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強された発現を示し得る共刺激性受容体、接着分子またはサイトカイン遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）、及び／またはＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１などのある特定のケモカイン受容体及びインターロイキンが含まれる。

【１４７０】

１．ＣＣＲｓ

養子Ｔ細胞免疫療法が有効であるためには、Ｔ細胞をケモカインによって腫瘍内に適切に輸送する必要がある。腫瘍細胞によって分泌されるケモカイン、末梢に存在するケモカイン、及びＴ細胞によって発現されるケモカイン受容体との間の一致は、Ｔ細胞の腫瘍床への輸送を成功させるために重要である。

【１４７１】

特定の実施形態によれば、本発明の遺伝子編集方法を使用して、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３及びＣＸ３ＣＲ１のうちの１つ以上などのＴＩＬにおけるある特定のケモカイン受容体の発現を増加させてもよい。ＣＣＲの過剰発現は、エフェクター機能及び養子移植後のＴＩＬの増殖を促進するのに役立ち得る。

【１４７２】

特定の実施形態によれば、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３及びＣＸ３ＣＲ１のうちの１つ以上のＴＩＬにおける発現は、本発明の組成物及び方法に従って増強される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧｅｎ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬ中のＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３及びＣＸ３ＣＲ１のうちの１つ以上の細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、発現を増強することを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１４７３】

以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ケモカイン受容体遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬにおけるある特定のケモカイン受容体の発現を増強することができる。

【１４７４】

いくつかの実施形態では、ＣＣＲ４及び／またはＣＣＲ５接着分子は、本明細書に記載のガンマ－レトロウイルスまたはレンチウイルス法を使用して、ＴＩＬ集団に挿入される。いくつかの実施形態では、ＣＸＣＲ２接着分子は、Ｆｏｒｇｅｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　２０１７，８，９０８またはＰｅｎｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１０，１６，５４５８（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるようなガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法を使用して、ＴＩＬ集団に挿入される。

【１４７５】
いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われ、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップが、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）系、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）系、またはジンクフィンガー系からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、ＰＤ－１及び任意選択でＬＡＧ－３の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１及び任意選択でＬＡＧ－３の発現を阻害し、さらに少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞の細胞表面でＣＸＣＲ２接着分子を発現させる、またはＣＸＣＲ２接着分子が、ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法によって第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団に挿入される。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。
【１４７６】
いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体

を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われ、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップが、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）系、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）系、またはジンクフィンガー系からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、ＰＤ－１及び任意選択でＬＡＧ－３の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１及び任意選択でＬＡＧ－３の発現を阻害し、さらに少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞の細胞表面でＣＣＲ４及び／またはＣＣＲ５接着分子を発現させる、またはＣＸＣＲ２接着分子が、ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法によって第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団に挿入される。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１４７７】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子

エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われ、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップが、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）系、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）系、またはジンクフィンガー系からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、ＰＤ－１及び任意選択でＬＡＧ－３の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１及び任意選択でＬＡＧ－３の発現を阻害し、さらに少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞の細胞表面でＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される接着分子を発現させる、または接着分子が、ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法によって第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団に挿入される。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１４７８】

２．インターロイキン

追加の実施形態によれば、本発明の遺伝子編集方法を使用して、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８及びＩＬ－２１のうちの１つ以上などのある特定のインターロイキンの発現を増加させてもよい。ある特定のインターロイキンは、Ｔ細胞のエフェクター機能を増加させ、腫瘍制御を媒介することが実証されている。

【１４７９】

特定の実施形態によれば、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－２１のうちの１つ以上のＴＩＬにおける発現は、本発明の組成物及び方法に従って増強される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧｅｎ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８及びＩＬ－２１のうちの１つ以上の発現を増強することによって遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、インターロイキン遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬにおけるある特定のインターロイキンの発現を増強することができる。

【１４８０】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を、第２のＴＩＬ集団内の複数の細胞内に約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われ、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップが、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）系、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）系、またはジンクフィンガー系からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、ＰＤ－１及び任意選択でＬＡＧ－３の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１及び任意選択でＬＡＧ－３の発現を阻害し、さらに少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞の細胞表面でＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるインターロイキンを発現させる、またはインターロイキンが、ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法によって第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団に挿入される。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－２１からなる群から選択される。

【１４８１】

Ｖ．Ｇｅｎ２　ＴＩＬ製造プロセス

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の凍結保存されたＴＩＬ調製物の作製後、患者は、ＩＣＩ及び／または標準治療の治療時またはその後に進行性疾患の発現を監視される。いくつかの実施形態では、患者は、ＩＣＩ及び／または標準治療の治療時またはその後に進行性癌を示し、自己ＴＩＬ療法に適応される。いくつかの実施形態では、進行後、凍結保存されたＴＩＬ調製物を解凍し、以下のセクションに記載の拡張方法に従って拡張する。

【１４８２】
これらの特徴のうちのいくつかを含む、Ｇｅｎ２として知られる（プロセス２Ａとしても知られる）ＴＩＬプロセスの例示的なファミリーが、図１及び２に示される。Ｇｅｎ２の実施形態を図２に示す。
【１４８３】
本明細書で考察されるように、本発明は、患者への移植前に凍結保存されたＴＩＬを再刺激して、それらの代謝活性、ひいては相対的健康を向上させることに関するステップ、及び当該代謝健康を試験する方法を含み得る。本明細書で一般に概説されるように、ＴＩＬは、一般に、患者試料から採取され、患者への移植前にそれらの数を拡張するように操作される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、以下で考察されるように、任意で遺伝子操作され得る。
【１４８４】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、凍結保存され得る。解凍した時点で、それらが再刺激されて、患者への注入前に代謝を高めることができる。
【１４８５】
いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図で詳細に考察されるように、第１の拡張（ＲＥＰ前と称されるプロセス、ならびに図１にステップＡとして示されるプロセスを含む）は、３～１４日に短縮され、第２の拡張（ＲＥＰと称されるプロセス、ならびに図１にステップＢとして示されるプロセスを含む）は、７～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、第１の拡張（例えば、図１にステップＢとして記載される拡張）は、１１日に短縮され、第２の拡張（例えば、図１にステップＤとして記載される拡張）は、１１日に短縮される。いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図で詳細に考察されるように、第１の拡張と第２の拡張との組み合わせ（例えば、図１にステップＢ及びステップＤとして記載される拡張）は、２２日に短縮される。
【１４８６】
以下の「ステップ」表記Ａ、Ｂ、Ｃなどは、図１を参照し、本明細書に記載のある特定の実施形態を参照する。以下及び図１におけるステップの順序は例示であり、ステップの任意の組み合わせまたは順序、ならびに追加のステップ、ステップの繰り返し、及び／またはステップの省略は、本出願及び本明細書に開示される方法によって企図される。
【１４８７】
Ａ．ステップＡ：患者の腫瘍試料を取得する
一般に、ＴＩＬは、最初に患者の腫瘍試料から取得され、その後、本明細書に記載されるさらなる操作のためにより大きい集団に拡張され、任意選択で凍結保存され、本明細書に概説されるように再刺激され、任意選択でＴＩＬ健康の指標として表現型及び代謝パラメータについて評価される。
【１４８８】
患者の腫瘍試料は、一般に外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段を介して、当該技術分野で知られている方法を使用して取得することができる。いくつかの実施形態では、多病変試料採取が使用される。いくつかの実施形態では、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段は、多病変試料採取を含む（すなわち、患者の１つ以上の腫瘍部位及び／または場所、ならびに同じ場所または近接した１つ以上の腫瘍から試料を取得する）。一般に、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍試料は、血液系悪性腫瘍から取得された腫瘍などの液体腫瘍であり得る。固形腫瘍は、肺組織のものであり得る。いくつかの実施形態では、有用なＴＩＬは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）から得られる。固形腫瘍は、皮膚組織のものであり得る。いくつかの実施形態では、有用なＴＩＬは、黒色腫から取得される。
【１４８９】
取得された時点で、腫瘍試料は、一般に、鋭的解剖を使用して１～約８mm^3の小片に

断片化され、約２～３ｍｍ^{3}が特に有用である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、酵素腫瘍消化物を使用してこれらの断片から培養される。かかる腫瘍消化物は、酵素培地（例えば、Ｒｏｓｗｅｌｌ Ｐａｒｋ Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＲＰＭＩ）１６４０緩衝液、２ｍＭグルタメート、１０ｍｃｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０単位／ｍＬ ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（例えば、組織解離機を使用する）によって産生され得る。腫瘍消化物は、腫瘍を酵素培地に入れ、腫瘍をおよそ１分間機械的に解離させ、続いて５％ CO_2中３７℃で３０分間インキュベートし、続いて小さな組織片のみが存在するまで、前述の条件下で機械的解離及びインキュベーションのサイクルを繰り返すことによって産生することができる。このプロセスの最後に、細胞懸濁液中に多数の赤血球または死細胞が含まれている場合、ＦＩＣＯＬＬ分岐親水性多糖類を使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。米国特許出願公開第２０１２／０２４４１３３Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものなどの当該技術分野で知られている代替の方法を使用することができる。前述の方法のうちのいずれかが、ＴＩＬを拡張する方法またはがんを治療する方法について本明細書に記載される実施形態のうちのいずれかにおいて使用され得る。

【１４９０】

腫瘍解離酵素混合物には、１つ以上の解離（消化）酵素、例えば、限定されないが、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはコラゲナーゼの種類を含む）、Ａｃｃｕｔａｓｅ（商標）、Ａｃｃｕｍａｘ（商標）、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、キモトリプシン、キモパパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパイン、ＸＩＶ型プロテアーゼ（プロナーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）、トリプシン阻害剤、任意の他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びそれらの任意の組み合わせが含まれ得る。

【１４９１】

いくつかの実施形態では、解離酵素は、凍結乾燥酵素から再構成される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥酵素は、ＨＢＳＳなどの滅菌緩衝液の量で再構成される。

【１４９２】

いくつかの事例では、コラゲナーゼ（アニマルフリー１型コラゲナーゼなど）を、１０ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液で再構成する。凍結乾燥ストック酵素は、２８９２ＰＺ Ｕ／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、５ｍＬ～１５ｍＬの緩衝液中で再構成される。いくつかの実施形態では、再構成後のコラゲナーゼストックは、約１００ＰＺ Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ Ｕ／ｍＬの範囲、例えば、約１００ＰＺ Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ Ｕ／ｍＬ～約３５０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ Ｕ／ｍＬ～約３００ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約２００ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約２１０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約２２０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約２３０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約２４０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約２５０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約２６０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約２７０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約２８０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約２８９．２ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約３００ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約３５０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、または約４００ＰＺ Ｕ／ｍＬである。

【１４９３】

いくつかの実施形態では、中性プロテアーゼは、１ｍｌの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥ストック酵素は、１７５ＤＭＣ Ｕ／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、再構成後の中性プロテアーゼストックは、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬの範囲、例えば、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約３５０ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約３００ＤＭＣ／ｍＬ、約１５０ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ、約１１０ＤＭＣ／ｍＬ、約１２０ＤＭＣ／ｍＬ、約１３０ＤＭＣ／ｍＬ、約１４０ＤＭＣ／ｍＬ、約１５０ＤＭＣ／ｍＬ、約１６０ＤＭＣ／ｍＬ、約１７０ＤＭＣ／ｍＬ、

約１７５ＤＭＣ／ｍＬ、約１８０ＤＭＣ／ｍＬ、約１９０ＤＭＣ／ｍＬ、約２００ＤＭＣ／ｍＬ、約２５０ＤＭＣ／ｍＬ、約３００ＤＭＣ／ｍＬ、約３５０ＤＭＣ／ｍＬ、または約４００ＤＭＣ／ｍＬである。

【１４９４】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡｓｅ　Ｉは、１ｍｌの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥したストック酵素は、４ＫＵ／バイアルの濃度であった。いくつかの実施形態では、再構成後のＤＮａｓｅ　Ｉストックは、約１ＫＵ／ｍＬ～１０ＫＵ／ｍＬ、例えば、約１ＫＵ／ｍＬ、約２ＫＵ／ｍＬ、約３ＫＵ／ｍＬ、約４ＫＵ／ｍＬ、約５ＫＵ／ｍＬ、約６ＫＵ／ｍＬ、約７ＫＵ／ｍＬ、約８ＫＵ／ｍＬ、約９ＫＵ／ｍＬ、または約１０ＫＵ／ｍＬの範囲である。

【１４９５】

いくつかの実施形態では、酵素のストックは可変であり、濃度を決定する必要があり得る。いくつかの実施形態では、凍結乾燥ストックの濃度を検証することができる。いくつかの実施形態では、消化カクテルに添加される酵素の最終量は、決定されたストック濃度に基づいて調整される。

【１４９６】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、約４．７ｍｌの滅菌ＨＢＳＳ中に約１０．２ｕｌの中性プロテアーゼ（０．３６ＤＭＣ　Ｕ／ｍＬ）、２１．３ｕｌのコラゲナーゼ（１．２ＰＺ／ｍＬ）及び２５０ｕｌのＤＮＡｓｅ　Ｉ（２００Ｕ／ｍＬ）を含む。

【１４９７】

上に示されるように、いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、固形腫瘍に由来する。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、断片化されない。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は断片化されず、全腫瘍として酵素消化に供される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％CO_2で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で、３７℃、５％CO_2で、回転を伴って１～２時間消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、３７℃、５％CO_2で一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、全腫瘍が酵素と組み合わされて、腫瘍消化反応混合物が形成される。

【１４９８】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、滅菌緩衝液中の凍結乾燥酵素で再構成される。いくつかの実施形態では、緩衝液は、滅菌ＨＢＳＳである。

【１４９９】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、コラゲナーゼを含む。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、コラゲナーゼＩＶである。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼの作業ストックは、１００ｍｇ／ｍＬの１０倍作業ストックである。

【１５００】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ＤＮＡｓｅを含む。いくつかの実施形態では、ＤＮＡｓｅの作業ストックは、１０，０００ＩＵ／ｍＬの１０倍作業ストックである。

【１５０１】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ヒアルロニダーゼを含む。いくつかの実施形態では、ヒアルロニダーゼの作業ストックは、１０ｍｇ／ｍＬの１０倍作業ストックである。

【１５０２】

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

【１５０３】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、１０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼ、５００ＩＵ／ｍＬのＤＮＡｓｅ、及び１ｍｇ／ｍＬのヒアルロニダーゼを含む。
【１５０４】
一般に、採取された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに採取された」細胞集団と呼ばれる。
【１５０５】
いくつかの実施形態では、断片化は、例えば、解剖及び消化を含む物理的断片化を含む。いくつかの実施形態では、断片化は、物理的断片化である。いくつかの実施形態では、断片化は、解剖である。いくつかの実施形態では、断片化は、消化によるものである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、患者から取得された腫瘍試料を消化または断片化することから取得された酵素腫瘍消化物及び腫瘍断片から最初に培養され得る。
【１５０６】
腫瘍が固形腫瘍であるいくつかの実施形態では、腫瘍試料が、例えば、ステップＡ（図１に提供される）で取得された後、腫瘍は物理的断片化を受ける。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存前に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存後に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、腫瘍を得た後に、いずれの凍結保存もない場合に起こる。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、１０、２０、３０、４０個またはそれ以上の断片または小片が、第１の拡張のために各容器内に配置される。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、３０または４０個の断片または小片が、第１の拡張のために各容器内に配置される。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、４０個の断片または小片が、第１の拡張のために各容器内に配置される。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約４～約５０個の断片を含み、各断片は、約２７mm^3の体積を有する。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１３００mm^3～約１５００mm^3の総体積を伴う約３０～約６０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１３５０mm^3の総体積を伴う約５０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１グラム～約１．５グラムの総質量を伴う約５０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約４個の断片を含む。
【１５０７】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍断片から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、鋭的解剖によって取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3～１０mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3～８mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約２mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約３mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約４mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約５mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約６mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約７mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約８mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約９mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１０mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、１～４ｍｍ×１～４ｍｍ×１～４ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍は、１ｍｍ×１ｍｍ×１ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍は、２ｍｍ×２ｍｍ×２ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍は、３ｍｍ×３ｍｍ×３ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍は、４ｍｍ×４ｍｍ×４ｍｍである。
【１５０８】
いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性、壊死性、及び／または脂肪性組織の量を最小化するために切除される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性組織の量を最小化するために切除される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の壊死性組織の量を最小化するために切除される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の脂肪性組織の量を最小化するために切除される。
【１５０９】

いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、腫瘍の内部構造を維持するために行われる。いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、メスでのこ引き動作を行うことなく行われる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、ＲＰＭＩ１６４０（２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）であるが、これに限定されない酵素培地中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって生成された。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍は、およそ１分間機械的に解離され得る。その後、溶液が５％CO_2中３７℃で３０分間インキュベートされ、その後、およそ１分間再び機械的に破壊され得る。５％　CO_2中３７℃で３０分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ１分間、３回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きい組織片が存在する場合、３回目の機械的破壊後、５％CO_2中３７℃でさらに３０分間インキュベートするかにかかわらず、１回または２回の追加の機械的解離が試料に適用された。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、Ｆｉｃｏｌｌを使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。

【１５１０】

いくつかの実施形態では、第１の拡張ステップの前に採取された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに採取された」細胞集団と呼ばれる。

【１５１１】

いくつかの実施形態では、細胞は、試料採取後に任意選択で凍結され、ステップＢに記載される拡張に入る前に凍結保存され得、これは、以下でさらに詳細に説明され、図１及び図８にも例示される。

【１５１２】

１．胸水Ｔ細胞またはＴＩＬ

いくつかの実施形態では、試料は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのＴ細胞またはＴＩＬの供給源は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、試料は、胸水由来試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのＴＩＬの供給源は、胸水由来試料である。例えば、米国特許公開第２０１４／０２９５４２６号に記載されている方法を参照されたく、これはすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【１５１３】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬと思われる、及び／またはＴＩＬを含む任意の胸腔内液または胸水を利用することができる。かかる試料は、ＮＳＣＬＣもしくはＳＣＬＣなどの原発性または転移性肺癌に由来し得る。いくつかの実施形態では、試料は、別の臓器、例えば、乳房、卵巣、結腸、または前立腺に由来する二次転移性がん細胞であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜浸出液である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜漏出液である。他の生体試料は、例えば、腹部からの腹水または膵嚢胞液を含む、ＴＩＬを含有する他の漿液を含み得る。腹水及び胸腔内液は、非常に類似した化学系を伴い、腹部及び肺の両方が、悪性腫瘍における同じ物質の胸膜空間及び腹部空間に中皮線及び流体形態を有し、いくつかの実施形態では、かかる流体は、ＴＩＬを含有する。本開示が胸水を例示するいくつかの実施形態では、同じ方法が、胸腔内液またはＴＩＬを含有する他の嚢胞液を使用して同様の結果で実行されてもよい。

【１５１４】

いくつかの実施形態では、胸腔内液は、患者から直接除去された未処理の形態である。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、接触ステップの前に、ＥＤＴＡまたはヘパリンチューブなどの標準的な採血管に入れられる。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、接触ステップの前に、標準的なＣｅｌｌＳａｖｅ（登録商標）チューブ（Ｖｅｒｉｄｅｘ）に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、生存ＴＩＬの数の減少

を避けるために、患者から採取した直後にＣｅｌｌＳａｖｅチューブに入れられる。生存ＴＩＬの数は、４℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置されると、２４時間以内に大幅に減少する可能性がある。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの除去後１時間、５時間、１０時間、１５時間、または最大２４時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、４℃で、患者からの除去後１時間、５時間、１０時間、１５時間、または最大２４時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

【１５１５】

いくつかの実施形態では、選択された対象からの胸腔内液試料は、希釈され得る。一実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：１０である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：９である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：８である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：５である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：２である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：１である。いくつかの実施形態では、希釈剤には、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、別の緩衝液、または生理学的に許容される希釈剤が含まれる。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの収集及び希釈の直後にＣｅｌｌＳａｖｅチューブ内に入れられ、生存ＴＩＬの減少を回避し、これは、４℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置された場合、２４～４８時間以内に有意に生じ得る。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、患者からの除去及び希釈後１時間、５時間、１０時間、１５時間、２４時間、３６時間、最大４８時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、４℃で、患者からの除去及び希釈後１時間、５時間、１０時間、１５時間、２４時間、３６時間、最大４８時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

【１５１６】

さらに別の実施形態では、胸腔内液試料は、さらなる処理ステップの前に、従来の手段によって濃縮される。いくつかの実施形態では、胸腔内液のこの前処理は、方法を実施する実験室への輸送のために、またはその後の分析のために（例えば、採取後２４～４８時間より後に）胸水を凍結保存しなければならない状況において好ましい。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、それが対象から採取された後に胸腔内液試料を遠心分離し、遠心分離物またはペレットを緩衝液中に再懸濁することによって調製される。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、輸送または後の分析及び／または処理のために凍結保存される前に、複数の遠心分離及び再懸濁に供される。

【１５１７】

いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、濾過法を使用することによって、さらなる処理ステップの前に濃縮される。いくつかの実施形態では、接触ステップで使用される胸腔内液試料は、胸腔内液が膜を通過することを可能にするが腫瘍細胞を保持する、既知で本質的に均一な孔径を含むフィルターをとおして流体を濾過することによって調製される。いくつかの実施形態では、膜の細孔の直径は、少なくとも４μＭであり得る。いくつかの実施形態では、細孔直径は、５μＭ以上であり得、他の実施形態では、６、７、８、９、または１０μＭのうちのいずれかである。濾過後、膜によって保持されたＴＩＬを含む細胞を、膜から適切な生理学的に許容される緩衝液にすすいでもよい。次いで、このように濃縮されたＴＩＬを含む細胞は、方法の接触ステップで使用することができる。

【１５１８】

いくつかの実施形態では、胸腔内液試料（例えば、未処理の胸腔内液を含む）、希釈胸水、または再懸濁細胞ペレットは、試料中に存在する無核赤血球を特異的に溶解する溶解試薬と接触させる。いくつかの実施形態では、このステップは、胸腔内液がかなりの数のＲＢＣを含む状況で、さらなる処理ステップの前に行われる。好適な溶解試薬には、単一の溶解試薬もしくは溶解試薬及びクエンチ試薬、または溶解剤、クエンチ試薬及び固定試薬が含まれる。好適な溶解システムは市販されており、ＢＤ　Ｐｈａｒｍ　Ｌｙｓｅ（商標）システム（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ）が含まれる。他の溶解システムには、Ｖｅｒｓａｌｙｓｅ（商標）システム、ＦＡＣＳｌｙｓｅ（商標）システム（Ｂｅｃｔ

ｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ）、Ｉｍｍｕｎｏｐｒｅｐ（商標）システム、またはＥｒｙｔｈｒｏｌｙｓｅ　ＩＩシステム（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）、または塩化アンモニウムシステムが含まれる。いくつかの実施形態では、溶解試薬は、赤血球の効率的な溶解、ならびに胸水におけるＴＩＬ及びＴＩＬの表現型特性の保存のような主要な要件によって異なり得る。溶解のための単一の試薬を利用することに加えて、本明細書に記載の方法に有用な溶解システムは、第２の試薬、例えば、方法の残りのステップ中に溶解試薬の効果をクエンチまたは遅延させるもの、例えばＳｔａｂｉｌｙｓｅ（商標）試薬（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）を含むことができる。溶解試薬の選択または方法の好ましい実施に応じて、従来の固定試薬を使用することもできる。

【１５１９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、未処理、希釈または多重遠心分離または処理された胸腔内液試料は、本明細書で提供されるようにさらに処理及び／または拡張される前に、約－１４０℃の温度で凍結保存される。

【１５２０】

Ａ１．ステップＡ１：進行前凍結保存

いくつかの実施形態では、本方法は、患者が免疫チェックポイント阻害剤（ＩＣＩ）及び／または標準治療の治療を受ける時または受けた後にがん進行を示す後、ステップＡから取得された採取された腫瘍試料を凍結保存し、将来のＴＩＬ製造のための凍結保存ＴＩＬ調製物を作製することを提供する。

【１５２１】

いくつかの実施形態では、凍結保存は、

（ａ）少なくとも１つの前の療法の前に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者のＮＳＣＬＣ腫瘍から腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容すること、

（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む試料を凍結保存して、凍結保存された試料を産生することを含む。

【１５２２】

いくつかの実施形態では、凍結保存は、

（ａ）少なくとも１つの前の療法の前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片を産生することと、を含む。

【１５２３】

いくつかの実施形態では、凍結保存は、

（ａ）少なくとも１つの前の療法の前に、対象から取得された腫瘍試料を、腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、を含む。

【１５２４】

いくつかの実施形態では、凍結保存は、

（ａ）少なくとも１つの前の療法の前に、対象または患者からＮＳＣＬＣ腫瘍を切除することであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはＮＳＣＬＣ腫瘍から腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、切除することと、

（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む試料を凍結保存して、凍結保存された試料を産生することと、を含む。

【１５２５】

いくつかの実施形態では、凍結保存は、

（ａ）少なくとも１つの前の療法の前に、対象または患者からＮＳＣＬＣ腫瘍を切除することであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはＮＳＣＬＣ腫瘍から腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、切除することと、
（ｂ）腫瘍を、腫瘍断片に断片化することと、
（ｃ）ステップ（ｂ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片を産生することと、を含む。
【１５２６】
いくつかの実施形態では、凍結保存は、
（ａ）少なくとも１つの前の療法の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、を含む。
【１５２７】
いくつかの実施形態では、凍結保存は、
（ａ）少なくとも１つの前の療法の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を解離して、解離された腫瘍物質を産生することと、
（ｃ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む解離された腫瘍物質を凍結保存して、凍結保存された解離された腫瘍物質を産生することと、を含む。
【１５２８】
Ｂ．ステップＢ：第１の拡張
いくつかの実施形態では、本方法は、対象／患者への投与時に複製サイクルを増加させることができ、したがって、より古いＴＩＬ（すなわち、対象／患者への投与前により多くの複製ラウンドをさらに受けたＴＩＬ）よりも追加の治療的利益を提供し得る、若いＴＩＬを得ることを提供する。若いＴＩＬの特徴は、文献、例えば、Ｄｏｎｉａ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃａｎｄ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２，７５，１５７－１６７、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１０，１６，６１２２－６１３１、Ｈｕａｎｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００５，２８，２５８－２６７、Ｂｅｓｓｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１３，１９，ＯＦ１－ＯＦ９、Ｂｅｓｓｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００９，３２：４１５－４２３、Ｒｏｂｂｉｎｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００４，１７３，７１２５－７１３０、Ｓｈｅｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００７，３０，１２３－１２９、Ｚｈｏｕ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００５，２８，５３－６２、及びＴｒａｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００８，３１，７４２－７５１に記載されており、それらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。
【１５２９】
Ｔリンパ球及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、及びＣ（一定）は、免疫グロブリン及びＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、生成するための方法を提供する。
【１５３０】
Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるＴＩＬ。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬ及び／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す

。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬ及び／または図５及び／または図６に例示されるようにプロセス１Ｃと称される方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第１の拡張で取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加する。

【１５３１】

例えば、図１のステップＡに記載されるものなどの腫瘍断片の解剖または消化後に、結果として得られた細胞は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長を好む条件下で、ＩＬ－２を含む血清中で培養される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を有する不活性化ヒトＡＢ血清を含む培地中２ｍＬのウェル中でインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に３～１４日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}バルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、７～１４日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}バルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、１０～１４日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}バルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、約１１日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}バルクＴＩＬ細胞を生じる。

【１５３２】

好ましい実施形態では、ＴＩＬの拡張は、以下及び本明細書に記載の初期バルクＴＩＬ拡張ステップ（例えば、ＲＥＰ前と称されるプロセスを含み得る、図１のステップＢに記載のものなど）、続いて以下のステップＤ及び本明細書に記載の第２の拡張（ステップＤ、急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）ステップと称されるプロセスを含む）、続いて任意の凍結保存、続いて以下及び本明細書に記載の第２のステップＤ（再刺激ＲＥＰステップと称されるプロセスを含む）を使用して行われ得る。このプロセスから取得されたＴＩＬは、本明細書に記載の表現型特徴及び代謝パラメータについて任意で特徴付けられ得る。

【１５３３】

ＴＩＬ培養物が２４ウェルプレートで開始される実施形態では、例えば、Ｃｏｓｔａｒ２４ウェル細胞培養クラスター、平底（Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｅｄ，Ｃｏｒｎｉｎｇ，ＮＹ）を使用して、ＩＬ－２（６０００ＩＵ／ｍＬ、Ｃｈｉｒｏｎ　Ｃｏｒｐ．，Ｅｍｅｒｙｖｉｌｌｅ，ＣＡ）を含む２ｍＬの完全培地（ＣＭ）中の１×１０^{6}個の腫瘍消化細胞または１つの腫瘍断片を、各ウェルに播種することができる。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１ｍｍ^{3}～１０ｍｍ^{3}である。

【１５３４】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、ステップＢのＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充した、ＧｌｕｔａＭＡＸを含むＲＰＭＩ　１６４０からなる。培養物が４０ｍＬ容量及び１０ｃｍ^{2}ガス透過性シリコン底部（例えば、Ｇ－ＲＥＸ１０、Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ　Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ，Ｎｅｗ　Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ）を有するガス透過性フラスコ内で開始される実施形態では、各フラスコに、ＩＬ－２を含む１０～４０ｍＬのＣＭ中の１０～４０×１０^{6}個の生きた腫瘍消化細胞または５～３０個の腫瘍断片を装填した。Ｇ－ＲＥＸ１０及び２４ウ

ェルプレートの両方を、５％CO_2中３７℃の加湿インキュベーター内でインキュベートし、培養開始から５日後、培地の半分を取り除き、新たなＣＭ及びＩＬ－２と交換し、５日後、培地の半分を２～３日毎に交換した。

【１５３５】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される拡張プロセスで使用される培地は、無血清培地または合成培地である。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、血清含有培地のロット間の変動に部分的に起因する実験変動を防止及び／または減少させるために使用される。

【１５３６】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ １６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。

【１５３７】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｅｒｕｍ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ、ＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代用物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代用物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代用物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の抗生物質、及び１つ以上の微量元素のうちの１つ以上が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／または２－メルカプトエタノールをさらに含む。

【１５３８】

いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔは、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＳＴ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ １６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。

【１５３９】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地中の総血清代替物濃度（ｖｏｌ％）は

、総無血清または合成培地の約１体積％、２体積％、３体積％、４体積％、５体積％、６体積％、７体積％、８体積％、９体積％、１０体積％、１１体積％、１２体積％、１３体積％、１４体積％、１５体積％、１６体積％、１７体積％、１８体積％、１９体積％、または２０体積％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約３％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約５％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約１０％である。

【１５４０】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【１５４１】

いくつかの実施形態では、合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標

）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【１５４２】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約０．１ｍＭ～約１０ｍＭ、０．５ｍＭ～約９ｍＭ、１ｍＭ～約８ｍＭ、２ｍＭ～約７ｍＭ、３ｍＭ～約６ｍＭ、または４ｍＭ～約５ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約２ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。

【１５４３】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５ｍＭ～約１５０ｍＭ、１０ｍＭ～約１４０ｍＭ、１５ｍＭ～約１３０ｍＭ、２０ｍＭ～約１２０ｍＭ、２５ｍＭ～約１１０ｍＭ、３０ｍＭ～約１００ｍＭ、３５ｍＭ～約９５ｍＭ、４０ｍＭ～約９０ｍＭ、４５ｍＭ～約８５ｍＭ、５０ｍＭ～約８０ｍＭ、５５ｍＭ～約７５ｍＭ、６０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約６５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。い

くつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【１５４４】

いくつかの実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる国際ＰＣＴ公開第ＷＯ／１９９８／０３０６７９号に記載されている合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の微量元素、及び１つ以上の抗生物質からなる群から選択される１つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベータ－メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、及び１つ以上の微量元素からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ　１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

【１５４５】

いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌの範囲であり、Ｌ－ヒスチジンの濃度は、約５～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－イソロイシンの濃度は、約５～３００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－メチオニンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－フェニルアラニンの濃度は、約５～４００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－プロリンの濃度は、約１～１０００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－ヒドロキシプロリンの濃度は、約１～４５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－セリンの濃度は、約１～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－スレオニンの濃度は、約１０～５００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－トリプトファンの濃度は、約２～１１０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－チロシンの濃度は、約３～１７５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－バリンの濃度は、約５～５００ｍｇ／Ｌであり、チアミンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、還元型グルタチオンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩の濃度は、約１～２００ｍｇ／Ｌであり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約１～５０ｍｇ／Ｌであり、インスリンの濃度は、約１～１００ｍｇ／Ｌであり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約０．０００００１～０．０００１ｍｇ／Ｌであり、アルブミン（例えば、ＡｌｂｕＭＡＸ（登録商標）Ｉ）の濃度は、約５０００～５０，０００ｍｇ／Ｌである。

【１５４６】

いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地中の濃度範囲」という見出しの下の列にリストされた濃度範囲で存在する。他の実施形態では

、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされた最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかでは、無血清サプリメントは、以下の表４の「サプリメント中の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。

【１５４７】

【表５】

表４：非微量元素部分成分の濃度

成分	サプリメント中の好ましい実施形態(mg/L)(About)	1×培地中の濃度範囲(mg/L)(About)	1×培地中の好ましい実施形態(mg/L)(About)
グリシン	150	5-200	53
L-ヒスチジン	940	5-250	183
L-イソロイシン	3400	5-300	615
L-メチオニン	90	5-200	44
L-フェニルアラニン	1800	5-400	336
L-プロリン	4000	1-1000	600
L-ヒドロキシプロリン	100	1-45	15
L-セリン	800	1-250	162
L-スレオニン	2200	10-500	425
L-トリプトファン	440	2-110	82
L-チロシン	77	3-175	84
L-バリン	2400	5-500	454
チアミン	33	1-20	9
還元型グルタチオン	10	1-20	1.5
アスコルビン酸-2-PO_4(Mg 塩)	330	1-200	50
トランスフェリン(鉄飽和)	55	1-50	8
インスリン	100	1-100	10
亜セレン酸ナトリウム	0.07	0.000001-0.0001	0.00001
AlbuMAX(登録商標)I	83,000	5000-50,000	12,500

【１５４８】

いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約２６０～３５０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約２８０～３１０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、合成培地には、最大約３．７ｇ／Ｌ、または約２．２ｇ／Ｌの重炭酸ナトリウムが補充されている。合成培地には、Ｌ－グルタミン（最終濃度約２ｍＭ）、１つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ、最終濃度約１００μＭ）、２－メルカプトエタノール（最終濃度約１００μＭ）がさらに補充されていてもよい。

【１５４９】

いくつかの実施形態では、Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ　Ｔｒａｎｓｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，４（１）２０１５（ｄｏｉ：１０．１０３８／ｃｔｉ．２０１４．３１）に記載の定義された培地が、本発明において有用である。簡潔には、ＲＰＭＩまたはＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）を基礎細胞培地として使用し、０、２％、５％、または１０％のいずれかのＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔを補充した。

【１５５０】

いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ベーター－メルカプトエタノール（ＢＭＥまたはβＭＥ、２－メルカプトエタノールとしても知られる、ＣＡＳ６０－２４－２）を欠いている。

【１５５１】
腫瘍断片の調製後、結果として得られた細胞（すなわち、断片）は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長を好む条件下で、ＩＬ－２を含む血清中で培養される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を有する不活性化ヒトＡＢ血清を含む培地中２ｍＬのウェル中（または、いくつかの事例では、本明細書で概説されるように、ＡＰＣ細胞集団の存在下）でインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に１０～１４日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約1×10^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、第１の拡張中の成長培地は、ＩＬ－２またはそのバリアントを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬは、組換えヒトＩＬ－２（ｒｈＩＬ－２）である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき$20\sim30\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき20×10^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき25×10^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき30×10^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、$4\sim8\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、$5\sim7\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、6×10^{6}ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、実施例５に記載されるように調製される。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約１０，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、または約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２さらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２さらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、約４０００ＩＵ／ｍＬ、約４５００ＩＵ／ｍＬ、約５０００ＩＵ／ｍＬ、約５５００ＩＵ／ｍＬ、約６０００ＩＵ／ｍＬ、約６５００ＩＵ／ｍＬ、約７０００ＩＵ／ｍＬ、約７５００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬ、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬ、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【１５５２】
いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１６０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１４０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、または約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約３００ＩＵ／

ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－１５をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。

【１５５３】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約４ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、または約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２１をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。

【１５５４】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、抗ＣＤ３アゴニスト抗体、例えば、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、及び約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇの間、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含まない。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３抗体は、ムロモナブである。例えば、表１を参照されたい。

【１５５５】

いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の開始（０日目）に細胞培養培養培地中に存在する。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張中の任意の時点で細胞培養培地に添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の１日目に細胞培養培地に添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の２日目に細胞培養培地に添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の３日目に細胞培養培地に添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の４日目に細胞培養培地に添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の５日目に細胞培養培地に添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の６日目に細胞培養培地に添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の７日目に細胞培養培地に添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の８日目に細胞培養培地に添加される。いくつかの実施形態で

は、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の９日目に細胞培養培地に添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の１０日目に細胞培養培地に添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の１１日目に細胞培養培地に添加される。

【１５５６】

いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の０日目～１１日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の０日目～３日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の０日目～２日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の０日目～１日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の１日目～２日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の１日目～３日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の２日目～３日目に１回以上添加される。

【１５５７】

いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の１日目～１１日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の２日目～１１日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の３日目～１１日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の４日目～１１日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の５日目～１１日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の６日目～１１日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の７日目～１１日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の８日目～１１日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の９日目～１１日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の１０日目～１１日目に１回以上添加される。

【１５５８】

いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の０日目～７日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の０日目～６日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の０日目～５日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の０日目～４日目に１回以上添加される。

【１５５９】

いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の１日目～７日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の１日目～６日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の１日目～５日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の１日目～４日目に１回以上添加される。

【１５６０】

いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の２日目～７日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の２日目～６日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の２日目～５日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の２日目～４日目に１回以上添加される。

【１５６１】

いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の３日目～７日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の３日目～６日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の３日目～５日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の３日目～４日目に１回以上添加される。

【１５６２】

いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の４日目～７日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の４日目～６日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の４日目～５日目に１回以上添加される。

【１５６３】

いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の５日目～７日目に１回以上添加される。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の５日目～６日目に１回以上添加される。

【１５６４】

いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の６日目～７日目に１回以上添加される。

【１５６５】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、細胞培養培地中に１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは４－１ＢＢアゴニストであり、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、ＥＵ－１０１、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリアント、バイオシミラー、及び組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、０．１μｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。

【１５６６】

いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、細胞培養培地は、ＩＬ－２を約３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、及びＯＫＴ－３を約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【１５６７】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、それは、ＣＭ１（培養培地１）と称される。いくつかの実施形態では、ＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充した、ＧｌｕｔａＭＡＸを含むＲＰＭＩ１６４０からなる。培養物が４０ｍＬ容量及び１０ｃｍ^{2}ガス透過性シリコン底部（例えば、Ｇ－ＲＥＸ１０、Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ　Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ，Ｎｅｗ　Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ）を有するガス透過性フラスコ内で開始される実施形態では、ＩＬ－２を含む１０～４０ｍＬのＣＭ中の１０～４０×１０^{6}個の生きた腫瘍消化細胞または５～３０個の腫瘍断片を、各フラスコに入れた。Ｇ－ＲＥＸ１０及び２４ウェルプレートの両方を、５％ＣＯ$_2$中３７℃の加湿インキュベーター内でインキュベートし、培養開始から５日後、培地の半分を取り除き、新たなＣＭ及びＩＬ－２と交換し、５日後、培地の半分を２～３日毎に交換した。いくつかの実施形態では、ＣＭは、実施例に記載されるＣＭ１であり、実施例１を参照されたい。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地は、ＩＬ－２を含む。

【１５６８】

いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、第１の拡張（例えば、ＲＥＰ前と称されることもあるものを含み得る、図１のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含む）プロセスは、３～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、実施例で考察され、かつ図４及び図５に示されるように、例えば、図１のステップＢに記載される拡張も含む、第１の拡張（例えば、ＲＥＰ前と称されることもあるものを含み得る、図１のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含む）は、７～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、ステップＢの第１の拡張は、１０～１４日に短縮される。い

くつかの実施形態では、第１の拡張は、例えば、図１のステップＢに記載される拡張において考察されるように、１１日に短縮される。

【１５６９】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、または１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、３日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、４日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、５日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、６日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、７日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、８日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、９日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１０日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１１日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１２日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１３日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、３日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、４日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、５日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、６日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、７日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、８日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、９日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１０日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１１日間続行することができる。

【１５７０】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１の組み合わせは、第１の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図１よる、かつ本明細書に記載されるステップＢのプロセス中を含む、第１の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の組み合わせは、第１の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図１による、かつ本明細書に記載されるステップＢのプロセス中に含まれ得る。

【１５７１】

いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、第１の拡張（ＲＥＰ前と称されるプロセスを含む、例えば、図１によるステップＢ）プロセスは、３～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、ステップＢの第１の拡張は、７～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、ステップＢの第１の拡張は、１０～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、１１日に短縮される。

【１５７２】

いくつかの実施形態では、第１の拡張、例えば、図１によるステップＢは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクタ

ーが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【１５７３】

１．サイトカイン及び他の添加物

本明細書に記載の拡張方法は、一般に、当該技術分野で知られているように、高用量のサイトカイン、特にＩＬ－２を含む培養培地を使用する。

【１５７４】

代替的に、ＴＩＬの急速拡張及び／または第２の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第２０１７／０１０７４９０Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせを用いて追加として可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２及びＩＬ－１５、ＩＬ－２及びＩＬ－２１、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２またはＩＬ－１５及びＩＬ－２１が含まれ、後者は、多くの実施形態において特定の用途を見出す。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにＴ細胞の生成に特に有利に働く。

【１５７５】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＫＴ－３抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、４－１ＢＢアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＸ－４０アゴニストの、培養培地への添加を含み得る。他の実施形態では、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（ＰＰＡＲ）－ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーターＩ－アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第２０１９／０３０７７９６　Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップＢ中の培養培地で使用されてもよい。

【１５７６】

Ｃ．ステップＣ：第１の拡張から第２の拡張へと移行

いくつかの事例では、例えば、図１に示されるステップＢから取得されたＴＩＬ集団を含む、第１の拡張から取得されたバルクＴＩＬ集団は、以下で考察されるプロトコルを使用して、直ちに凍結保存され得る。あるいは、第２のＴＩＬ集団と称される第１の拡張から取得されたＴＩＬ集団は、以下で考察されるように、第２の拡張（ＲＥＰと称されることもある拡張を含み得る）に供され、その後、凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾ＴＩＬが治療に使用される場合、第１のＴＩＬ集団（バルクＴＩＬ集団と称されることもある）または第２のＴＩＬ集団（いくつかの実施形態では、ＲＥＰ　ＴＩＬ集団と称される集団を含み得る）は、拡張前または第１の拡張後及び第２の拡張前に、好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。

【１５７７】

いくつかの実施形態では、第１の拡張から（例えば、図１に示されるステップＢから）取得されたＴＩＬは、選択のために表現型決定されるまで保管される。いくつかの実施形態では、第１の拡張から（例えば、図１に示されるステップＢから）取得されたＴＩＬは保管されず、第２の拡張に直接進む。いくつかの実施形態では、第１の拡張から取得されたＴＩＬは、第１の拡張後及び第２の拡張前に凍結保存されない。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、または１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約３日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約４日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約４日～１０日で起こる。いくつかの

実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約７日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約１４日で起こる。

【１５７８】

いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、または１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから３日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから４日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから５日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから６日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから７日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから８日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから９日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１０日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１１日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１２日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１３日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから２日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから３日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから４日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから５日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから６日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから７日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから８日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから９日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１０日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１１日で起こる。

【１５７９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、第１の拡張の後及び第２の拡張の前に保管されず、ＴＩＬは、第２の拡張に直接進む（例えば、いくつかの実施形態では、図１に示されるステップＢからステップＤへの移行中に保管されない）。いくつかの実施形態では、移行は、本明細書に記載されるように、閉鎖系内で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張由来のＴＩＬである第２のＴＩＬ集団は、移行期間なしで第２の拡張に直接進む。

【１５８０】

いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行、例えば、図１によるステップＣは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００である。いくつ

かの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【１５８１】

いくつかの実施形態では、第１の拡張から（例えば、図４８Ａ～Ｄに示されるステップＢから）取得されたＴＩＬは、活性化または遺伝子編集ステップに移行される。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、または１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～１３日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～１２日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～１０日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～９日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～６日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～５日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約４日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約４日～１３日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約４日～１２日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約４日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約４日～１０日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約４日～９日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約４日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約４日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約４日～６日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約４日～５日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約５日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約５日～１３日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約５日～１２日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約５日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約５日～１０日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約５日～９日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約５日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化

または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約５日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約５日～６日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約６日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約６日～１３日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約６日～１２日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約６日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約６日～１０日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約６日～９日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約６日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約６日～７日で起こる。

【１５８２】

いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、本明細書に記載の閉鎖系中で起こる。

【１５８３】

いくつかの実施形態では、活性化ステップは、ＴＩＬを、抗ＣＤ３及び／または抗ＣＤ３８ビーズを含む培地中で約１～７日間培養することを含む。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、ＴＩＬを、抗ＣＤ３ビーズを含む培地中で約１～７日間培養することを含む。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、ＴＩＬを、抗ＣＤ３８ビーズを含む培地中で約１～７日間培養することを含む。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、ＴＩＬを、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ３８ビーズを含む培地中で約１～７日間培養することを含む。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、約１～７日間行われる。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、約１～７日、約２～７日、約３～７日、約４～７日、約５～７日、約６～７日、約１～６日、約２～６日、約３～６日、約４～６日、約５～６日、約１～５日、約２～５日、約３～５日、約４～５日、約１～４日、約２～４日、約３～４日、約１～３日、約２～３日、または約１～２日間行われる。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、約１日間行われる。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、約２日間行われる。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、約７日間行われる。

【１５８４】

本明細書を考慮して、当業者に既知の任意の好適な抗ＣＤ３／抗ＣＤ３８ビーズが使用され得る。好適な抗ＣＤ３／抗ＣＤ３８ビーズには、Ｔ細胞拡大及び活性化のためのＤｙｎａｂｅａｄｓ（商標）ヒトＴ活性化剤ＣＤ３／ＣＤ２８（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎから市販されている）、ＩｍｍｕｎｏＣｕｌｔ（商標）ヒトＣＤ３／ＣＤ２８Ｔ細胞活性化剤（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから市販されている）、及びＴ　Ｃｅｌｌ　ＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃから市販されている）を含むが、これらに限定されない市販の製品が、含まれるがこれらに限定されない。

【１５８５】

いくつかの実施形態では、活性化ステップは、任意選択である。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、第１の拡張がＯＫＴ－３を含む場合、任意選択である。

【１５８６】

いくつかの実施形態では、第１の拡張から（例えば、図４８Ｃ～Ｄに示されるステップＢから）または活性化ステップから（例えば、図４８Ａ～Ｂに示されるステップＣから）

取得されたＴＩＬは、遺伝子編集ステップに移行される。

【１５８７】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集ステップは、ＴＩＬ集団に対して滅菌エレクトロポレーションステップを行うことを含む。いくつかの実施形態では、無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移入を媒介する。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、少なくとも１つのタンパク質の発現を調節するためのＴＡＬＥヌクレアーゼ系である。いくつかの実施形態によれば、ＴＡＬＥヌクレアーゼ系は、ＰＤ－１の発現を下方調節する。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、ＣＴＬＡ－４の発現を下方調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、ＬＡＧ－３の発現を下方調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、ＣＩＳＨの発現を下方調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、ＴＩＧＩＴの発現を下方調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、ＣＢＬ－Ｂの発現を下方調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１ノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４ノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＬＡＧ－３ノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＩＳＨノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＢＬ－ＢノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＴＩＧＩＴノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１の下方調節された発現、ならびにＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂのうちの１つ以上の下方調節された発現を示す。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４の下方調節された発現、ならびにＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂのうちの１つ以上の下方調節された発現を示す。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＬＡＧ－３の下方調節された発現、ならびにＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂのうちの１つ以上の下方調節された発現を示す。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＩＳＨの下方調節された発現、ならびにＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂのうちの１つ以上の下方調節された発現を示す。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＢＬ－Ｂの下方調節された発現、ならびにＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＰＤ－１のうちの１つ以上の下方調節された発現を示す。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＴＩＧＩＴの下方調節された発現、ならびにＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬ－Ｂ、及びＰＤ－１のうちの１つ以上の下方調節された発現を示す。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１／ＣＴＬＡ－４ダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１／ＬＡＧ－３ダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１／ＣＩＳＨダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１／ＣＢＬ－ＢダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１／ＴＩＧＩＴダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４／ＬＡＧ－３ダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４／ＣＩＳＨダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４／ＣＢＬ－ＢダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４／ＴＩＧＩＴダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＬＡＧ－３／ＣＩＳＨダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＬＡＧ－３／ＣＢＬ－ＢダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＬＡＧ－３／ＴＩＧＩＴダブルノックアウトＴＩＬである。いくつ

かの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＩＳＨ／ＣＢＬ－Ｂダブルノックアウト ＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＩＳＨ／ＴＩＧＩＴダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＢＬ－Ｂ／ＴＩＧＩＴダブルノックアウトＴＩＬである。

【１５８８】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集のステップは、休止ステップをさらに含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、第４のＴＩＬ集団を、約３０～４０℃、約５％のＣＯ２でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、約３０℃、約３０．５℃、約３１℃、約３１．５℃、約３２℃、約３２．５℃、約３３℃、約３３．５℃、約３４℃、約３４．５℃、約３５℃、約３５．５℃、約３６℃、約３６．５℃、約３７℃、約３７．５℃、約３８℃、約３８．５℃、約３９℃、約３９．５℃、約４０℃で実行される。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、約１時間、約２時間、約３時間、約４時間、約５時間、約６時間、約７時間、約８時間、約９時間、約１０時間、約１１時間、約１２時間、約１３時間、約１４時間、約１５時間、約１６時間、約１７時間、約１８時間、約１９時間、約２０時間、約２１時間、約２２時間、約２３時間、約２４時間実行される。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１５時間～約２３時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１５時間～約２３時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１５時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１６時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１７時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１８時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１９時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約２０時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約２１時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約２２時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約２３時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。

【１５８９】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集ステップまたは休止ステップから（例えば、図４８Ａ～Ｄに示されるステップＣから）取得されたＴＩＬは、第２の拡張ステップ（例えば、図４８Ａ～Ｄに示されるステップＤから）に移行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集ステップまたは休止ステップから第２の拡張ステップへの移行は、遺伝子編集ステップまたは休止ステップから約０．５日、１日、２日、３日、または４日で起こる。

【１５９０】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集ステップまたは休止ステップから第２の拡張ステップへの移行は、本明細書に記載の閉鎖系中で起こる。

【１５９１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集ステップまたは休止ステップの後及び第２の拡張の前に保管されず、ＴＩＬは、第２の拡張に直接進む（例えば、いくつかの実施形態では、図４８Ａ～Ｄに示されるステップＣからステップＤへの移行中に保管されない）。

【１５９２】

いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行、例えば、図４８によるステップＣは、閉鎖系バイオリアクター中で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００バイオリアクターである。

【１５９３】

Ｄ．ステップＤ：第２の拡張

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ細胞集団は、採取及び初期バルク処理後、例えば、図１に示される、ステップＡ及びステップＢ、ならびにステップＣと称される移行後に数が拡張される）。このさらなる拡張は、本明細書では第２の拡張と称され、これは、当該技術分野で一般に急速拡張プロセス（ＲＥＰ、ならびに図１のステップＤに示されるプロセス）と称される拡張プロセスを含み得る。第２の拡張は、概して、フィーダー細胞、サイトカイン源、及び抗ＣＤ３抗体を含むいくつかの成分を含む培養培地を使用して、ガス透過性容器中で達成される。

【１５９４】

いくつかの実施形態では、第２の拡張または第２のＴＩＬ拡張（ＲＥＰと称されることもある拡張、ならびに図１のステップＤに示されるプロセスを含み得る）は、当業者に知られている任意のＴＩＬフラスコまたは容器を使用して行われ得る。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、または１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約７日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約８日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約９日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１０日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１１日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１２日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１３日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１４日間続行することができる。

【１５９５】

いくつかの実施形態では、第２の拡張は、本開示の方法（例えば、ＲＥＰと称される拡張、ならびに図１のステップＤに示されるプロセスを含む）を使用して、ガス透過性容器内で行われ得る。例えば、ＴＩＬは、インターロイキン－２（ＩＬ－２）またはインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）の存在下で非特異的Ｔ細胞受容体刺激を使用して、急速に拡張され得る。非特異的Ｔ細胞受容体刺激は、例えば、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３、マウスモノクローナル抗ＣＤ３抗体（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ，Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪもしくはＭｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡから市販されている）またはＵＨＣＴ－１（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡから市販されている）などの抗ＣＤ３抗体を含み得る。ＴＩＬは、がんのエピトープ（複数可）などの抗原性部分を含む、第２の拡張中に１つ以上の抗原を含むことによって、インビトロでＴＩＬのさらなる刺激を誘導するように拡張することができ、これは、ベクター、例えば、ヒト白血球抗原Ａ２（ＨＬＡ－Ａ２）結合ペプチド、例えば、０．３μＭ　ＭＡＲＴ－

１：２６－３５（２７Ｌ）またはｇｐｌ００：２０９－２１７（２１０Ｍ）から、任意選択で３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２またはＩＬ－１５などのＴ細胞成長因子の存在下で任意で発現され得る。他の好適な抗原には、例えば、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、チロシナーゼがん抗原、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＳＳＸ－２、及びＶＥＧＦＲ２、またはそれらの抗原性部分が含まれ得る。ＴＩＬは、ＨＬＡ－Ａ２を発現する抗原提示細胞にパルスされたがんの同じ抗原（複数可）で再刺激することによっても急速に拡張され得る。あるいは、ＴＩＬは、例えば、例として放射線照射された自己リンパ球または放射線照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２でさらに再刺激され得る。いくつかの実施形態では、再刺激は、第２の拡張の一部として起こる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、放射線照射された自己リンパ球の存在下で、または放射線照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２を用いて起こる。

【１５９６】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、約４０００ＩＵ／ｍＬ、約４５００ＩＵ／ｍＬ、約５０００ＩＵ／ｍＬ、約５５００ＩＵ／ｍＬ、約６０００ＩＵ／ｍＬ、約６５００ＩＵ／ｍＬ、約７０００ＩＵ／ｍＬ、約７５００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬ、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬ、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ、または８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【１５９７】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、及び約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇの間、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含まない。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３抗体は、ムロモナブである。

【１５９８】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、細胞培養培地中に１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは４－１ＢＢアゴニストであり、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、ＥＵ－１０１、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリアント、バイオシミラー、及び組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、０．１μｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。

【１５９９】

いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、細胞培養培地

は、ＩＬ－２を約３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、及びＯＫＴ－３を約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【１６００】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１の組み合わせは、第２の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図１による、かつ本明細書に記載されるステップＤのプロセス中を含む、第２の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の組み合わせは、第２の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図１による、かつ本明細書に記載されるステップＤのプロセス中に含まれ得る。

【１６０１】

いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、抗原提示フィーダー細胞、及び任意でＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む補充された細胞培養培地において実施され得る。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、補充された細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、補充された細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、第２の細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ、抗原提示フィーダー細胞とも称される）を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞（すなわち、抗原提示細胞）を含む細胞培養培地中で起こる。

【１６０２】

いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１６０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１４０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、または約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－１５をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。

【１６０３】

いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約４ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、または約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１

ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２１をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。

【１６０４】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣ及び／または抗原提示細胞に対する比は、約１：２５、約１：５０、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００、約１：３２５、約１：３５０、約１：３７５、約１：４００、または約１：５００である。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣに対する比は、１：５０～１：３００である。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣに対する比は、１：１００～１：２００である。

【１６０５】

いくつかの実施形態では、ＲＥＰ及び／または第２の拡張は、バルクＴＩＬが１５０ｍＬの培地中の１００倍または２００倍過剰の不活性化フィーダー細胞、３０ｍｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗ＣＤ３抗体、及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２と混合されているフラスコ内で行われる。細胞が代替の成長チャンバに移されるまで、培地交換が行われる（一般に、新鮮な培地との呼吸による３分の２の培地交換）。代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、Ｇ－ＲＥＸフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【１６０６】

いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、第２の拡張（ＲＥＰプロセスと称されるプロセスを含み得る）は、７～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、１１日に短縮される。

【１６０７】

いくつかの実施形態では、ＲＥＰ及び／または第２の拡張は、以前に記載されたＴ－１７５フラスコ及びガス透過性バッグ（Ｔｒａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００８，３１，７４２－５１、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００３，２６，３３２－４２）またはガス透過性培養器具（Ｇ－ＲＥＸフラスコ）を使用して行われ得る。いくつかの実施形態では、第２の拡張（急速拡張と称される拡張を含む）は、Ｔ－１７５フラスコ内で行われ、１５０ｍＬの培地に懸濁された約１×10^6個のＴＩＬが、各Ｔ－１７５フラスコに添加され得る。ＴＩＬは、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３を補充した、１：１のＣＭとＡＩＭ－Ｖ培地との混合物中で培養され得る。Ｔ－１７５フラスコは、５％CO_2中３７℃でインキュベートされ得る。培地の半分が、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む５０／５０培地を使用して５日目に交換され得る。いくつかの実施形態では、７日目に、２つのＴ－１７５フラスコからの細胞が３Ｌバッグ内で組み合わせられ得、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む３００ｍＬのＡＩＭ　Ｖが、３００ｍＬのＴＩＬ懸濁液に添加された。各バッグ内の細胞の数が毎日または隔日計数され、新鮮な培地が添加されて、０．５～２．０×10^6細胞／ｍＬの細胞数を維持した。

【１６０８】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張、ならびに図１のステップＤで参照される拡張を含み得る）は、１００ｃｍのガス透過性シリコン底部（Ｇ－ＲＥＸ１００、Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ　Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｎｅｗ　Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ，ＵＳＡから市販されている）を有する５００ｍＬ容量のガス透過性フラスコ内で行われ得る。５×10^6または１０×10^6ＴＩＬは、５％ヒトＡＢ血清、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）を補充した４００ｍＬの５０／５０培地中、ＰＢＭＣで培養され得る。Ｇ－ＲＥＸ　１００フラスコは、５％CO_2中３７℃でインキュベートされ得る。５日目に、２５

０ｍＬの上清が除去され、遠心分離ボトルに入れられ、１５００ｒｐｍ（４９１×ｇ）で１０分間遠心分離される。ＴＩＬペレットが、５％ヒトＡＢ血清、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬの新鮮な培地で再懸濁され、元のＧ－ＲＥＸ１００フラスコに戻し添加され得る。ＴＩＬがＧ－ＲＥＸ１００フラスコ内で連続的に拡張される場合、７日目に、各Ｇ－ＲＥＸ１００内のＴＩＬが、各フラスコに存在する３００ｍＬの培地に懸濁され得、細胞懸濁液が３つの１００ｍＬアリコートに分割され得、それを使用して、３つのＧ－ＲＥＸ１００フラスコに播種することができる。その後、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのＡＩＭ－Ｖが各フラスコに添加され得る。Ｇ－ＲＥＸ　１００フラスコが５％CO_2中３７℃でインキュベートされ、４日後に、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのＡＩＭ－Ｖが、各Ｇ－ＲＥＸ　１００フラスコに添加され得る。培養１４日目に、細胞が採取され得る。

【１６０９】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）は、バルクＴＩＬが１５０ｍＬの培地中の１００倍または２００倍過剰の不活性化フィーダー細胞、３０ｍｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗ＣＤ３抗体、及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２と混合されているフラスコで行われる。いくつかの実施形態では、培地交換は、細胞が代替の成長チャンバに移されるまで行われる。いくつかの実施形態では、培地の３分の２が、新鮮な培地と呼吸によって交換される。いくつかの実施形態では、代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、Ｇ－ＲＥＸフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【１６１０】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）が行われ、優れた腫瘍反応性のためにＴＩＬが選択されるステップをさらに含む。当該技術分野で知られている任意の選択方法が使用され得る。例えば、米国特許出願公開第２０１６／００１００５８Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている方法が、優れた腫瘍反応性のためのＴＩＬの選択に使用され得る。

【１６１１】

任意選択で、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準的なアッセイを使用して、第２の拡張（ＲＥＰ拡張と称される拡張を含む）後に行われ得る。例えば、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンブルー排除アッセイが、バルクＴＩＬの試料上で行われ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ試料は、Ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２自動セルカウンター（Ｎｅｘｃｅｌｏｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｌａｗｒｅｎｃｅ，ＭＡ）を使用して計数され、生存率が決定され得る。いくつかの実施形態では、生存率は、標準のＣｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２　Ｉｍａｇｅ　Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ　Ａｕｔｏｍａｔｉｃ　Ｃｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｅｒプロトコルに従って決定される。

【１６１２】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）は、以前に記載されているＴ－１７５フラスコ及びガス透過性バッグ（Ｔｒａｎ，ｅｔ　ａｌ．，２００８，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，３１：７４２－７５１及びＤｕｄｌｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，２００３，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２６：３３２－３４２）またはガス透過性Ｇ－ＲＥＸフラスコを使用して行われ得る。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、フラスコを使用して行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ガス透過性Ｇ－ＲＥＸフラスコを使用して行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、Ｔ－１７５フラスコ内で行われ、約１×10^6個のＴＩＬが約１５０ｍＬの培地に懸濁され、これが各Ｔ－１７５フラスコに添加される。ＴＩＬは、「フィーダー」細胞として１対１００の比で放射線照射された（５０Ｇｙ）同種異系ＰＢＭＣと培養され、細胞が、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３を補充した、１：１のＣＭとＡＩＭ－Ｖ培地との混合物（５０／５０培地）中で培養された。Ｔ－１７５フラスコを、５％　CO_2中３７℃でインキュベートする。いくつかの実施形態では、培地の半分が、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む５０／５０培地を使用して５日目に交換される。いくつかの実施形態では、７日目に、２つのＴ－１７５フラスコからの細胞が３Ｌバッグ内で

組み合わせられ、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む３００ｍＬのＡＩＭ－Ｖが、３００ｍＬのＴＩＬ懸濁液に添加される。各バッグ内の細胞の数が毎日または隔日計数され得、新鮮な培地が添加されて、約０．５～約２．０×10^6細胞／ｍＬの細胞数を維持することができる。

【１６１３】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）は、１００ｃｍ^{2}のガス透過性シリコン底部（Ｇ－ＲＥＸ１００、Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ）を有する５００ｍＬ容量のフラスコ内で行われ、約５×10^6または１０×10^6ＴＩＬが、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３を補充した、４００ｍＬの５０／５０培地中、１対１００の比で放射線照射された同種異系ＰＢＭＣと培養される。Ｇ－ＲＥＸ　１００フラスコは、５％CO_2中３７℃でインキュベートされる。いくつかの実施形態では、５日目に、２５０ｍＬの上清が除去され、遠心分離ボトルに入れられ、１５００ｒｐｍ（４９１ｇ）で１０分間遠心分離される。その後、ＴＩＬペレットが、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬの新鮮な５０／５０培地に再懸濁され、元のＧ－ＲＥＸ１００フラスコに戻し添加され得る。ＴＩＬがＧ－ＲＥＸ１００フラスコ内で連続的に拡張される実施形態では、７日目に、各Ｇ－ＲＥＸ１００内のＴＩＬが、各フラスコ内に存在する３００ｍＬの培地に懸濁され、細胞懸濁液が３つの１００ｍＬアリコートに分割されて、それを使用して、３つのＧ－ＲＥＸ１００フラスコに播種された。その後、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのＡＩＭ－Ｖが各フラスコに添加される。Ｇ－ＲＥＸ　１００フラスコが５％CO_2中３７°Ｃでインキュベートされ、４日後に、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのＡＩＭ－Ｖが、各Ｇ－ＲＥＸ　１００フラスコに添加される。培養１４日目に、細胞が採取される。

【１６１４】

Ｔリンパ球及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、及びＣ（一定）は、免疫グロブリン及びＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第２の拡張において取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加する。

【１６１５】

いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地と称されることもある）は、以下でさらに詳細に考察されるように、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、ならびに抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。

【１６１６】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される拡張プロセスで使用される培地は、無血清培地または合成培地である。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、血清含有培地のロット間の変動に部分的に起因する実験変動を防止及び／または減少させるために使用される。

【１６１７】
いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ １６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。
【１６１８】
いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｅｒｕｍ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ、ＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代用物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代用物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代用物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の抗生物質、及び１つ以上の微量元素のうちの１つ以上が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／または２－メルカプトエタノールをさらに含む。
【１６１９】
いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔは、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＳＴ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ １６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。
【１６２０】
いくつかの実施形態では、無血清または合成培地中の総血清代替物濃度（ｖｏｌ％）は、総無血清または合成培地の約１体積％、２体積％、３体積％、４体積％、５体積％、６体積％、７体積％、８体積％、９体積％、１０体積％、１１体積％、１２体積％、１３体積％、１４体積％、１５体積％、１６体積％、１７体積％、１８体積％、１９体積％、または２０体積％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約３％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約５％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約１０％である。
【１６２１】
いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ

（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【１６２２】

いくつかの実施形態では、合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭに

は、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【１６２３】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約０．１ｍＭ～約１０ｍＭ、０．５ｍＭ～約９ｍＭ、１ｍＭ～約８ｍＭ、２ｍＭ～約７ｍＭ、３ｍＭ～約６ｍＭ、または４ｍＭ～約５ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約２ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。

【１６２４】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５ｍＭ～約１５０ｍＭ、１０ｍＭ～約１４０ｍＭ、１５ｍＭ～約１３０ｍＭ、２０ｍＭ～約１２０ｍＭ、２５ｍＭ～約１１０ｍＭ、３０ｍＭ～約１００ｍＭ、３５ｍＭ～約９５ｍＭ、４０ｍＭ～約９０ｍＭ、４５ｍＭ～約８５ｍＭ、５０ｍＭ～約８０ｍＭ、５５ｍＭ～約７５ｍＭ、６０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約６５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【１６２５】

いくつかの実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる国際ＰＣＴ公開第ＷＯ／１９９８／０３０６７９号に記載されている合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、１つ以上のアルブミ

ンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の微量元素、及び１つ以上の抗生物質からなる群から選択される１つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベータ－メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、及び１つ以上の微量元素からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ　１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

【１６２６】

いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌの範囲であり、Ｌ－ヒスチジンの濃度は、約５～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－イソロイシンの濃度は、約５～３００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－メチオニンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－フェニルアラニンの濃度は、約５～４００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－プロリンの濃度は、約１～１０００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－ヒドロキシプロリンの濃度は、約１～４５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－セリンの濃度は、約１～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－スレオニンの濃度は、約１０～５００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－トリプトファンの濃度は、約２～１１０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－チロシンの濃度は、約３～１７５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－バリンの濃度は、約５～５００ｍｇ／Ｌであり、チアミンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、還元型グルタチオンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩の濃度は、約１～２００ｍｇ／Ｌであり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約１～５０ｍｇ／Ｌであり、インスリンの濃度は、約１～１００ｍｇ／Ｌであり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約０．０００００１～０．０００１ｍｇ／Ｌであり、アルブミン（例えば、ＡｌｂｕＭＡＸ（登録商標）Ｉ）の濃度は、約５０００～５０，０００ｍｇ／Ｌである。

【１６２７】

いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地中の濃度範囲」という見出しの下の列にリストされた濃度範囲で存在する。他の実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされた最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかでは、無血清サプリメントは、表４の「サプリメント中の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。

【１６２８】

いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約２６０～３５０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約２８０～３１０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、合成培地には、最大約３．７ｇ／Ｌ、または約２．２ｇ／Ｌの重炭酸ナ

トリウムが補充されている。合成培地には、Ｌ－グルタミン（最終濃度約２ｍＭ）、１つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ、最終濃度約１００μＭ）、２－メルカプトエタノール（最終濃度約１００μＭ）がさらに補充されていてもよい。

【１６２９】

いくつかの実施形態では、Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ　Ｔｒａｎｓｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，４（１）２０１５（ｄｏｉ：１０．１０３８／ｃｔｉ．２０１４．３１）に記載の定義された培地が、本発明において有用である。簡潔には、ＲＰＭＩまたはＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）を基礎細胞培地として使用し、０、２％、５％、または１０％のいずれかのＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔを補充した。

【１６３０】

いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ベーター－メルカプトエタノール（ＢＭＥまたはβＭＥ、２－メルカプトエタノールとしても知られる、ＣＡＳ６０－２４－２）を欠いている。

【１６３１】

いくつかの実施形態では、第２の拡張、例えば、図１によるステップＤは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【１６３２】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～７日間培養することによって急速なまたは第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養でのＴＩＬを、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００－ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来のＴＩＬを、第２の容器内でのより大規模な培養で約４～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。

【１６３３】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～７日間培養することによって急速なまたは第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された第１の小規模培養由来のＴＩＬの一部が、第２の小規模培養で約４～７日間培養される。

【１６３４】

いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、ＴＩＬの複数の約２～５亜集団に配分される。

【１６３５】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～７日間培養することによって急速なまたは第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移し

て配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された小規模培養由来のＴＩＬの一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。

【１６３６】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳ容器内での小規模培養で約５日間培養することによって急速なまたは第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された小規模培養由来のＴＩＬの一部が、より大規模な培養で約６日間培養される。

【１６３７】

いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個のＴＩＬ、少なくとも10^9個のＴＩＬ、または少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。例示的な一実施形態では、各第２の容器は、少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。

【１６３８】

いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２～５亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２、３、４、または５亜集団に配分される。

【１６３９】

いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の完了後、複数の亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の完了後、１つ以上のＴＩＬの亜集団を一緒にプールして、治療有効量のＴＩＬを産生する。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、各ＴＩＬ亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。

【１６４０】

いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張は、複数のステップに分割される前に、約３～７日間行われる。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の分裂は、急速または第２の拡張の開始後約３日目、４日目、５日目、６日目、または７日目に起こる。

【１６４１】

いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の分裂は、第１の拡張（すなわち、ＲＥＰ前拡張）の開始後の約７日目、８日目、９日目、１０日目、１１日目、１２日目、１３日目、１４日目、１５日目、または１６日目、１７日目、または１８日目に起こる。例示的な一実施形態では、急速または第２の拡張の分裂は、第１の拡張の開始後約１６日目に起こる。

【１６４２】

いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張は、分裂後約７～１１日間、さらに行われる。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張は、分裂後約５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日間、さらに行われる。

【１６４３】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地と同じ成分を含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地とは異なる成分を含む。

【１６４４】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は

、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む。

【１６４５】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な細胞培養培地で置き換えることによって生成される。

【１６４６】

いくつかの実施形態では、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。

【１６４７】

いくつかの実施形態では、急速な膨張の分裂は、閉鎖系において起こる。

【１６４８】

いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張中のＴＩＬ培養物のスケールアップは、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に添加すること（ＴＩＬを供給することとも称される）を含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に頻繁に添加することを含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に一定の間隔で添加することを含む。いくつかの実施形態では、新鮮な細胞培養培地は、一定の流れを介してＴＩＬに供給される。いくつかの実施形態では、Ｘｕｒｉ Ｗ２５などの自動細胞拡張システムは、急速な拡張及び供給のために使用される。

【１６４９】

１．フィーダー細胞及び抗原提示細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順（例えば、図１のステップＤに記載されるような拡張、ならびにＲＥＰと称されるものを含む）は、ＲＥＰ　ＴＩＬ拡張中及び／または第２の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な献血者由来の標準の全血単位から得られる末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。

【１６５０】

一般に、同種異系ＰＢＭＣは、放射線照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、実施例に記載されるように、ＲＥＰ手順で使用され、これは、放射線照射された同種異系ＰＢＭＣの複製無能力を評価するための例示的なプロトコルを提供する。

【１６５１】

いくつかの実施形態では、１４日目の生細胞の総数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数よりも少ない場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。

【１６５２】

いくつかの実施形態では、７日目及び１４日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【１６５３】

いくつかの実施形態では、７日目及び１４日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、５～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び１０００～６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１０～５０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～５０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２０～４０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～４０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２５～３５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２５００～３５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【１６５４】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、約１：２５、約１：５０、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００、約１：３２５、約１：３５０、約１：３７５、約１：４００、または約１：５００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：５０～１：３００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの、抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：１００～１：２００である。

【１６５５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約２．５×10^9フィーダー細胞：約１００×10^6ＴＩＬの比を必要とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約２．５×10^9フィーダー細胞：約５０×10^6ＴＩＬの比を必要とする。さらに別の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約２．５×10^9フィーダー細胞：約２５×10^6ＴＩＬを必要とする。

【１６５６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、第２の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な献血者由来の標準の全血単位から得られる末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、人工抗原提示（ａＡＰＣ）細胞がＰＢＭＣの代わりに使用される。

【１６５７】

概して、同種異系ＰＢＭＣは、放射線照射または熱処理のいずれかを介して不活性化され、図及び実施例に記載の例示的な手順を含む、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順で使用される。

【１６５８】

いくつかの実施形態では、人工抗原提示細胞は、ＰＢＭＣの代替物として、またはＰＢＭＣと組み合わせて、第２の拡張において使用される。

【１６５９】

２．サイトカイン

本明細書に記載の拡張方法は、一般に、当該技術分野で知られているように、高用量のサイトカイン、特にＩＬ－２を含む培養培地を使用する。

【１６６０】

代替的に、ＴＩＬの急速な拡張及び／または第２の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願第２０１７／０１０７４９０　Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせを用いて追加として可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２及びＩＬ－１５、ＩＬ－２及びＩＬ－２１、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１が含まれ、後者は多くの実施形態において特定の用途を見出す。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにＴ細胞の生成に特に有利に働く。

【１６６１】

いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＫＴ－３抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、４－１ＢＢアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＸ－４０アゴニストの、培養培地への添加を含み得る。加えて、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（ＰＰＡＲ）－ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーターＩ－アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第２０１９／０３０７７９６　Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップＤ中の培養培地で使用されてもよい。

【１６６２】

Ｅ．ステップＥ：ＴＩＬを採取する

第２の拡張ステップ後、細胞が採取され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図１に提供されるように、１、２、３、４つ、またはそれ以上の拡張ステップ後に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図１に提供されるように、２つの拡張ステップ後に採取される。

【１６６３】

ＴＩＬは、例えば、遠心分離を含む、任意の適切な滅菌様式で採取され得る。ＴＩＬを採取するための方法は、当該技術分野で周知であり、いずれかのかかる既知の方法が本プロセスで用いられ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、自動化システムを使用して採取される。

【１６６４】

細胞採取機及び／または細胞処理システムは、例えば、Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ　Ｋａｂｉ、Ｔｏｍｔｅｃ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ、及びＩｎｏｔｅｃｈ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃを含む、様々な供給源から市販されている。任意の細胞ベースの採取機が本方法とともに用いられ得る。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理システムは、膜ベースの細胞採取機である。いくつかの実施形態では、細胞採取は、ＬＯＶＯシステム（Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ　Ｋａｂｉによって製造されたもの）などの細胞処理システムによるものである。「ＬＯＶＯ細胞処理システム」という用語は、細胞を含む溶液を、滅菌及び／または閉鎖系環境で回転膜または回転フィルターなどの膜またはフィルターをとおしてポンプ輸送し、連続フローを可能にし、細胞を処理して、ペレット化せずに上清または細胞培養培地を除去する、任意のベンダーによって製造された任意の機器または装置も指す。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理システムは、閉鎖した滅菌系内で、細胞分

離、洗浄、流体交換、濃縮、及び／または他の細胞処理ステップを行うことができる。

【１６６５】

いくつかの実施形態では、採取、例えば、図１によるステップＥは、閉鎖系バイオリアクターから行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【１６６６】

いくつかの実施形態では、図１によるステップＥは、本明細書に記載のプロセスに従って行われる。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、閉鎖系の無菌性及び閉鎖性を維持するために、滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、実施例に記載の閉鎖系が用いられる。

【１６６７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、実施例に記載の方法に従って採取される。いくつかの実施形態では、１日目～１１日目の間のＴＩＬは、実施例における１１日目のＴＩＬ採取のような、本明細書で言及されるステップにおいて記載される方法を使用して採取される。いくつかの実施形態では、１２日目～２４日目の間のＴＩＬは、実施例における２２日目のＴＩＬ採取のような、本明細書で言及されるステップにおいて記載される方法を使用して採取される。いくつかの実施形態では、１２日目～２２日目の間のＴＩＬは、実施例における２２日目のＴＩＬ採取のような、本明細書で言及されるステップにおいて記載される方法を使用して採取される。

【１６６８】

Ｆ．ステップＦ：最終製剤及び輸液容器への移行

図１に例示的な順序で提供され、かつ上及び本明細書で詳細に概説されるステップＡ～Ｅが完了した後、細胞は、注入バッグまたは無菌バイアルなどの患者への投与に使用するために容器に移される。いくつかの実施形態では、治療的に十分な数のＴＩＬが上記の拡張方法を使用して得られると、それらは、患者への投与に使用するために容器に移される。

【１６６９】

いくつかの実施形態では、本開示のＡＰＣを使用して拡張されたＴＩＬは、薬学的組成物として患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌緩衝液中のＴＩＬ懸濁液である。本開示のＰＢＭＣを使用して拡張されたＴＩＬは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、単回の動脈内または静脈内注入として投与され、これは、好ましくは、およそ３０～６０分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内投与が含まれる。

【１６７０】

ＶＩ．Ｇｅｎ３　ＴＩＬ製造プロセス

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の凍結保存されたＴＩＬ調製物の作製後、患者は、ＩＣＩ及び／または標準治療の治療時またはその後に進行性疾患の発現を監視される。いくつかの実施形態では、患者は、ＩＣＩ及び／または標準治療の治療時またはその後に進行性癌を示し、自己ＴＩＬ療法に適応される。いくつかの実施形態では、進行後、凍結保存されたＴＩＬ調製物を解凍し、以下のセクションに記載の拡張方法に従って拡張する。

【１６７１】

いかなる特定の理論にも限定されないが、本発明の方法に記載の、Ｔ細胞の活性化をプライミングするプライミングによる第１の拡張、それに続くＴ細胞の活性化を促進する急速な第２の拡張により、「より若い」表現型を保持する拡張されたＴ細胞の調製が可能になると考えられ、したがって、本発明の拡張されたＴ細胞が、他の方法によって拡張されたＴ細胞よりもがん細胞に対する高い細胞傷害性を示すことが予想される。特に、本発明

の方法によって教示される、抗ＣＤ３抗体（例えば、ＯＫＴ－３）、ＩＬ－２、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）への曝露によってプライミングされ、その後、追加の抗ＣＤ－３抗体（例えば、ＯＫＴ－３）、ＩＬ－２、及びＡＰＣへのその後の曝露によって促進されるＴ細胞の活性化が、培養下でＴ細胞の成熟を限定または回避し、成熟度の低い表現型を有するＴ細胞集団を産生し、これらのＴ細胞が、培養下での拡張によってあまり疲弊せず、より高いがん細胞に対する細胞傷害性を示すと考えられる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養でのＴ細胞を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来のＴ細胞を、第２の容器内でのより大規模な培養で約４～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分割されて、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来のＴ細胞を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴ細胞の一部が、第２の小規模培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分割されて、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴ細胞を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴ細胞の一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴ細胞を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴ細胞の一部が、より大規模な培養で約５日間培養される。

【１６７２】

いくつかの実施形態では、急速拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個のＴＩＬ、少なくとも10^9個のＴＩＬ、または少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。例示的な一実施形態では、各第２の容器は、少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。

【１６７３】

いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２～５亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２、３、４、または５亜集団に配分される。

【１６７４】

いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、複数の亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、１つ以上のＴＩＬの亜集団を一緒にプールして、治療有効量のＴＩＬを産生する。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了

後、ＴＩＬの各亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。

【１６７５】

いくつかの実施形態では、急速拡張は、複数のステップに分割される前に、約１～５日の期間行われる。いくつかの実施形態では、急速拡張の分裂は、急速拡張の開始後約１日目、２日目、３日目、４日目、または５日目に起こる。

【１６７６】

いくつかの実施形態では、急速拡張の分割は、第１の拡張（すなわち、ＲＥＰ前拡張）の開始後約８日目、９日目、１０日目、１１日目、１２日目、または１３日目に起こる。例示的な一実施形態では、急速拡張の分裂は、プライミングによる第１の拡張の開始後約１０日目に起こる。例示的な一実施形態では、急速拡張の分裂は、第１の拡張の開始後約１１日目に起こる。

【１６７７】

いくつかの実施形態では、急速拡張は、分割後約４～１１日の期間、さらに行われる。いくつかの実施形態では、急速拡張は、分裂後約３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日間、さらに行われる。

【１６７８】

いくつかの実施形態では、分割前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分割後の急速拡張に使用される細胞培養培地と同じ成分を含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地とは異なる成分を含む。

【１６７９】

いくつかの実施形態では、分割前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む。

【１６８０】

いくつかの実施形態では、分割前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な細胞培養培地で置き換えることによって生成される。

【１６８１】

いくつかの実施形態では、分割後の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。

【１６８２】

いくつかの実施形態では、急速な膨張の分裂は、閉鎖系において起こる。

【１６８３】

いくつかの実施形態では、急速拡張中のＴＩＬ培養物のスケールアップは、新鮮な細胞

培養培地をＴＩＬ培養物に添加すること（ＴＩＬを供給することとも称される）を含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に頻繁に添加することを含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に一定の間隔で添加することを含む。いくつかの実施形態では、新鮮な細胞培養培地は、一定の流れを介してＴＩＬに供給される。いくつかの実施形態では、Ｘｕｒｉ　Ｗ２５などの自動細胞拡張システムは、急速な膨張及び供給のために使用される。

【１６８４】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が減少、軽減、衰退、または沈静化し始めた後に行われる。

【１６８５】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、正確にまたは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％減少した後に行われる。

【１６８６】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、正確にまたは約１％～１００％の範囲のパーセンテージ減少した後に行われる。

【１６８７】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、正確にまたは約１％～１０％、１０％～２０％、２０％～３０％、３０％～４０％、４０％～５０％、５０％～６０％、６０％～７０％、７０％～８０％、８０％～９０％、または９０％～１００％の範囲のパーセンテージ減少した後に行われる。

【１６８８】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、少なくとも正確にまたは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％減少した後に行われる。

【１６８９】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、最大で正確にまたは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７

５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％減少した後に行われる。

【１６９０】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化の減少は、抗原による刺激に応答してＴ細胞によって放出されるインターフェロンガンマの量の低減によって決定される。

【１６９１】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、最大で正確にまたは約７日または約８日の期間中に行われる。

【１６９２】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、最大で正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日の期間中に行われる。

【１６９３】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日の期間中に行われる。

【１６９４】

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

【１６９５】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、最大で正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間中に行われる。

【１６９６】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間中に行われる。

【１６９７】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約７日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約１１日の期間中に行われる。

【１６９８】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、最大で正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、最大で正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間中に行われる。

【１６９９】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約８日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約９日の期間中に行われる。

【１７００】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、８日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、９日の期間中に行われる。

【１７０１】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約７日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約９日の期間中に行われる。

【１７０２】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、７日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、９日の期間中に行われる。

【１７０３】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）である。
【１７０４】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）である。
【１７０５】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、末梢血リンパ球（ＰＢＬ）である。
【１７０６】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、がんに罹患しているドナーから取得される。
【１７０７】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、がんに罹患している患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬである。
【１７０８】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、血液系悪性腫瘍に罹患している患者の骨髄から取得されたＭＩＬである。
【１７０９】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ドナー由来の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）から取得されたＰＢＬである。いくつかの実施形態では、ドナーは、がんに罹患している。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択されるがんである。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ドナーは、腫瘍に罹患している。いくつかの実施形態では、腫瘍は、液体腫瘍である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、ドナーは、血液系悪性腫瘍に罹患している。
【１７１０】
本開示の特定の態様では、免疫エフェクター細胞、例えば、Ｔ細胞は、ＦＩＣＯＬＬ分離などの当業者に知られている任意の数の技法を使用して対象から収集された血液の単位から得ることができる。好ましい一態様では、個体の循環血液由来の細胞は、アフェレーシスによって取得される。アフェレーシス産物は、典型的には、リンパ球、例えば、Ｔ細胞、単球、顆粒球、Ｂ細胞、他の有核白血球、赤血球、血小板を含む。一態様では、アフェレーシスによって収集された細胞が洗浄されて、血漿画分が除去され、任意選択で、その後の処理ステップのために細胞を適切な緩衝液または培地に入れられ得る。一実施形態では、細胞は、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で洗浄される。代替の実施形態では、洗浄溶液は、カルシウムを欠き、マグネシウムを欠き得るか、またはすべてではないが多くの二価カチオンを欠き得る。一態様では、Ｔ細胞は、赤血球を溶解し、かつ単球を枯渇させることによって、例えば、ＰＥＲＣＯＬＬ勾配による遠心分離によって、または対向流遠心溶出法によって末梢血リンパ球から単離される。
【１７１１】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ドナー由来のリンパ球が濃縮された全血またはアフェレーシス産物から分離されたＰＢＬである。いくつかの実施形態では、ドナーは、がんに罹患している。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択されるがんである。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭ

を含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ドナーは、腫瘍に罹患している。いくつかの実施形態では、腫瘍は、液体腫瘍である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、ドナーは、血液系悪性腫瘍に罹患している。いくつかの実施形態では、ＰＢＬは、正または負の選択法を使用することによって、すなわち、Ｔ細胞表現型について、マーカー（複数可）、例えば、ＣＤ３＋ＣＤ４５＋を使用してＰＢＬを除去することによって、または非Ｔ細胞表現型細胞を除去してＰＢＬを残すことによって、リンパ球が濃縮された全血またはアフェレーシス産物から単離される。他の実施形態では、ＰＢＬは、勾配遠心分離によって単離される。ドナー組織からＰＢＬを単離した時点で、ＰＢＬのプライミングによる第１の拡張は、本明細書に記載される方法のうちのいずれかのプライミングによる第１の拡張ステップに従って、プライミングによる第１の拡張培養下で好適な数の単離されたＰＢＬ（いくつかの実施形態では、およそ1×10^{7}ＰＢＬ）を播種することによって開始され得る。

【１７１２】

これらの特徴のうちのいくつかを含む、プロセス３として知られる（本明細書ではＧｅｎ３とも称される）例示的なＴＩＬプロセスが、図８及び図４８（ＫＯ　ＴＩＬ　ＴＡＬＥＮプロセス）（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に示され、ならびに本発明のこの実施形態のＧｅｎ２を超える利点のうちのいくつかが、図１、２、８、３０及び３１（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に記載される。Ｇｅｎ３の実施形態は、図１、８、及び３０（特に、図８Ａ、及び／または図８Ｂ、及び／または図８Ｃ、及び／または図８Ｄ、及び／または図４８Ａ、及び／または図４８Ｂ、及び／または図４８Ｃ、及び／または図４８Ｄ）に示される。プロセス２ＡまたはＧｅｎ２またはＧｅｎ２Ａはまた、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開第２０１８／０２８０４３６号にも記載されている。Ｇｅｎ３プロセスはまた、国際特許公開第ＷＯ２０２０／０９６９８８号に記載されている。

【１７１３】

本明細書で考察され、かつ一般に概説されるように、ＴＩＬは、患者試料から採取され、本明細書に記載され、かつＧｅｎ３と称されるＴＩＬ拡張プロセスを使用して患者に移植する前に、それらの数を拡張するように操作される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、以下で考察されるように、任意で遺伝子操作され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、拡張前または拡張後に凍結保存され得る。解凍した時点で、それらが再刺激されて、患者への注入前に代謝を高めることができる。

【１７１４】

いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図で詳細に考察されるように、プライミングによる第１の拡張（本明細書では急速な拡張前（ＲＥＰ前）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＢとして示されるプロセスを含む）は、１～８日に短縮され、急速な第２の拡張（本明細書では急速な拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＤとして示されるプロセスを含む）は、１～９日に短縮される。いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図で詳細に考察されるように、プライミングによる第１の拡張（本明細書では急速な拡張前（ＲＥＰ前）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＢとして示されるプロセスを含む）は、１～８日に短縮され、急速な第

２の拡張（本明細書では急速な拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＤとして示されるプロセスを含む）は、１～８日に短縮される。いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図で詳細に考察されるように、プライミングによる第１の拡張（本明細書では急速な拡張前（ＲＥＰ前）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＢとして示されるプロセスを含む）は、１～７日に短縮され、急速な第２の拡張（本明細書では急速な拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＤとして示されるプロセスを含む）は、１～９日に短縮される。いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図において詳細に考察されるように、プライミングによる第１の拡張（本明細書において急速拡張前（ＲＥＰ前）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば図１Ｂ及び／または図８Ｃ）においてステップＢとして示されるプロセスを含む）は、１～７日に短縮され、急速な第２の拡張（本明細書において急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）においてステップＤとして示されるプロセスを含む）は、１～１０日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＢとして記載の拡張）は、８日に短縮され、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＤに記載の拡張）は、７～９日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＢとして記載の拡張）は、８日であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＤに記載の拡張）は、８～９日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＢとして記載の拡張）は、７日に短縮され、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＤに記載の拡張）は、７～８日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＢとして記載の拡張）は、８日に短縮され、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＤに記載の拡張）は、８日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＢとして記載の拡張）は、８日であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図

８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＤに記載の拡張）は、９日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＢとして記載の拡張）は、８日であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＤに記載の拡張）は、１０日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＢとして記載の拡張）は、７日であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＤに記載の拡張）は、７～１０日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＢとして記載の拡張）は、７日であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＤに記載の拡張）は、８～１０日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＢとして記載の拡張）は、７日であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＤに記載の拡張）は、９～１０日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＢとして記載の拡張）は、７日に短縮され、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）でステップＤに記載の拡張）は、７～９日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張と急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図１Ｂ及び／または図８Ｃ）においてステップＢ及びステップＤとして記載される拡張）との組み合わせは、以下ならびに実施例及び図面において詳細に考察されるように、１４～１６日間である。特に、本発明のある特定の実施形態が、ＩＬ－２の存在下での抗ＣＤ３抗体、例えば、ＯＫＴ－３への曝露、または少なくともＩＬ－２及び抗ＣＤ３抗体、例えば、ＯＫＴ－３の存在下での抗原への曝露によってＴＩＬが活性化される、プライミングによる第１の拡張ステップを含むと考えられる。ある特定の実施形態では、上記のようにプライミングによる第１の拡張ステップで活性化されるＴＩＬは、第１のＴＩＬ集団であり、すなわち、一次細胞集団である。

【１７１５】

以下の「ステップ」表記Ａ、Ｂ、Ｃなどは、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）における非限定的な例を参照し、かつ本明細書に記載されるある特定の非限定的な実施形態を参照する。以下及び図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）におけるステ

ップの順序は例示的であり、ステップの任意の組み合わせまたは順序、ならびに追加のステップ、ステップの繰り返し、及び／またはステップの省略は、本出願及び本明細書に開示される方法によって企図される。

【１７１６】

Ａ．ステップＡ：患者の腫瘍試料を取得する

一般に、ＴＩＬは、最初に患者の腫瘍試料（「一次ＴＩＬ」）から、またはＴＩＬ様の特徴を有する末梢血リンパ球を含む末梢血リンパ球などの循環リンパ球から得られ、その後、本明細書に記載されるように、さらなる操作のためにより大きな集団に拡張され、任意選択で凍結保存され、任意選択でＴＩＬの健康の指標として表現型及び代謝パラメータについて評価される。

【１７１７】

患者の腫瘍試料は、一般に、外科的切除、針生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を得るための他の手段により、当該技術分野で知られている方法を使用して得ることができる。一般に、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍試料は、血液系悪性腫瘍から取得された腫瘍などの液体腫瘍であり得る。固形腫瘍は、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、結腸直腸癌、肺癌、脳癌、腎癌、胃癌、及び皮膚癌を含むが、これらに限定されない（扁平上皮癌、基底細胞癌、及び黒色腫を含むが、これらに限定されない）、任意の種類のがんであり得る。いくつかの実施形態では、がんは、子宮頸癌、頭頸部癌（例えば、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭ）、胃腸癌、卵巣癌、肉腫、膵臓癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、及び非小細胞肺癌から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。いくつかの実施形態では、悪性黒色腫腫瘍が特に高レベルのＴＩＬを有することが報告されているため、有用なＴＩＬは、悪性黒色腫腫瘍から取得される。

【１７１８】

取得された時点で、腫瘍試料は、一般に、鋭的解剖を使用して１～約８mm^3の小片に断片化され、約２～３mm^3が特に有用である。ＴＩＬは、酵素腫瘍消化物を使用してこれらの断片から培養される。かかる腫瘍消化物は、酵素培地（例えば、Ｒｏｓｗｅｌｌ Ｐａｒｋ Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＲＰＭＩ）１６４０緩衝液、２ｍＭグルタメート、１０ｍｃｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０単位／ｍＬ ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（例えば、組織解離機を使用する）によって産生され得る。腫瘍消化物は、腫瘍を酵素培地に入れ、腫瘍をおよそ１分間機械的に解離させ、続いて５％CO_2中３７℃で３０分間インキュベートし、続いて小さな組織片のみが存在するまで、前述の条件下で機械的解離及びインキュベーションのサイクルを繰り返すことによって産生することができる。このプロセスの最後に、細胞懸濁液中に多数の赤血球または死細胞が含まれている場合、ＦＩＣＯＬＬ分岐親水性多糖類を使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。米国特許出願公開第２０１２／０２４４１３３Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものなどの当該技術分野で知られている代替の方法を使用することができる。前述の方法のうちのいずれかが、ＴＩＬを拡張する方法またはがんを治療する方法について本明細書に記載される実施形態のうちのいずれかにおいて使用され得る。

【１７１９】

腫瘍解離酵素混合物には、１つ以上の解離（消化）酵素、例えば、限定されないが、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはコラゲナーゼの種類を含む）、Ａｃｃｕｔａｓｅ（商標）、Ａｃｃｕｍａｘ（商標）、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、キモトリプシン、キモパパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパイン、ＸＩＶ型プロテアーゼ（プロナーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）、トリプシン阻害剤、任意の他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びそれらの任意の組み合わせが含まれ得る。

【１７２０】
いくつかの実施形態では、解離酵素は、凍結乾燥酵素から再構成される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥酵素は、ＨＢＳＳなどの滅菌緩衝液の量で再構成される。
【１７２１】
いくつかの事例では、コラゲナーゼ（アニマルフリー１型コラゲナーゼなど）を、１０ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液で再構成する。凍結乾燥ストック酵素は、２８９２ＰＺ　Ｕ／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、５ｍＬ～１５ｍＬの緩衝液中で再構成される。いくつかの実施形態では、再構成後のコラゲナーゼストックは、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬの範囲、例えば、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約３５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約３００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２１０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２２０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２３０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２４０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２６０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２７０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２８０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２８９．２ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約３００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約３５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、または約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬである。
【１７２２】
いくつかの実施形態では、中性プロテアーゼは、１ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥ストック酵素は、１７５ＤＭＣＵ／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、再構成後の中性プロテアーゼストックは、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬの範囲、例えば、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約３５０ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約３００ＤＭＣ／ｍＬ、約１５０ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ、約１１０ＤＭＣ／ｍＬ、約１２０ＤＭＣ／ｍＬ、約１３０ＤＭＣ／ｍＬ、約１４０ＤＭＣ／ｍＬ、約１５０ＤＭＣ／ｍＬ、約１６０ＤＭＣ／ｍＬ、約１７０ＤＭＣ／ｍＬ、約１７５ＤＭＣ／ｍＬ、約１８０ＤＭＣ／ｍＬ、約１９０ＤＭＣ／ｍＬ、約２００ＤＭＣ／ｍＬ、約２５０ＤＭＣ／ｍＬ、約３００ＤＭＣ／ｍＬ、約３５０ＤＭＣ／ｍＬ、または約４００ＤＭＣ／ｍＬである。
【１７２３】
いくつかの実施形態では、ＤＮＡｓｅ　Ｉは、１ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥したストック酵素は、４ＫＵ／バイアルの濃度であった。いくつかの実施形態では、再構成後のＤＮａｓｅ　Ｉストックは、約１ＫＵ／ｍＬ～１０ＫＵ／ｍＬ、例えば、約１ＫＵ／ｍＬ、約２ＫＵ／ｍＬ、約３ＫＵ／ｍＬ、約４ＫＵ／ｍＬ、約５ＫＵ／ｍＬ、約６ＫＵ／ｍＬ、約７ＫＵ／ｍＬ、約８ＫＵ／ｍＬ、約９ＫＵ／ｍＬ、または約１０ＫＵ／ｍＬの範囲である。
【１７２４】
いくつかの実施形態では、酵素のストックは可変であり、濃度を決定する必要があり得る。いくつかの実施形態では、凍結乾燥ストックの濃度を検証することができる。いくつかの実施形態では、消化カクテルに添加される酵素の最終量は、決定されたストック濃度に基づいて調整される。
【１７２５】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、約４．７ｍｌの滅菌ＨＢＳＳ中に約１０．２ｕｌの中性プロテアーゼ（０．３６ＤＭＣ　Ｕ／ｍＬ）、２１．３μＬのコラゲナーゼ（１．２ＰＺ／ｍＬ）及び２５０ｕｌのＤＮＡｓｅ　Ｉ（２００Ｕ／ｍＬ）を含む。
【１７２６】
上に示されるように、いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、固形腫瘍に由来する。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、断片化されない。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は断片化されず、全腫瘍として酵素消化に供される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で消化される。い

くつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％CO_2で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で、３７℃、５％CO_2で、回転を伴って１～２時間消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、３７℃、５％CO_2で一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、全腫瘍が酵素と組み合わされて、腫瘍消化反応混合物が形成される。

【１７２７】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中中で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中中で１～２時間消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中中で１～２時間、３７℃、５％のＣＯ２で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中中で１～２時間、３７℃、５％のＣＯ２で回転を伴って消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、３７℃、５％のＣＯ２で、一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、全腫瘍が酵素と組み合わされて、腫瘍消化反応混合物が形成される。

【１７２８】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中中で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中中で１～２時間消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中中で１～２時間、３７℃、５％のＣＯ２で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中中で１～２時間、３７℃、５％のＣＯ２で回転を伴って消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、３７℃、５％のＣＯ２で、一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、全腫瘍が酵素と組み合わされて、腫瘍消化反応混合物が形成される。

【１７２９】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、滅菌緩衝液中の凍結乾燥酵素で再構成される。いくつかの実施形態では、緩衝液は、滅菌ＨＢＳＳである。

【１７３０】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、コラゲナーゼを含む。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、コラゲナーゼＩＶである。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼの作業ストックは、１００ｍｇ／ｍＬの１０倍作業ストックである。

【１７３１】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ＤＮＡｓｅを含む。いくつかの実施形態では、ＤＮＡｓｅの作業ストックは、１０，０００ＩＵ／ｍＬの１０倍作業ストックである。

【１７３２】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ヒアルロニダーゼを含む。いくつかの実施形態では、ヒアルロニダーゼの作業ストックは、１０ｍｇ／ｍＬの１０倍作業ストックである。

【１７３３】

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

【１７３４】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、１０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼ、５００ＩＵ

／ｍＬのＤＮＡｓｅ、及び１ｍｇ／ｍＬのヒアルロニダーゼを含む。

【１７３５】

一般に、腫瘍から取得された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに取得された」または「新たに単離された」細胞集団と呼ばれる。ある特定の実施形態では、新たに取得されたＴＩＬ細胞集団は、抗原提示細胞、ＩＬ－１２、及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地に曝露される。

【１７３６】

いくつかの実施形態では、断片化には、例えば、解剖及び消化を含む物理的断片化が含まれる。いくつかの実施形態では、断片化は、物理的断片化である。いくつかの実施形態では、断片化は、解剖である。いくつかの実施形態では、断片化は、消化によるものである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、最初に、患者から取得された酵素腫瘍消化物及び腫瘍断片から培養され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、最初に、患者から取得された酵素腫瘍消化物及び腫瘍断片から培養され得る。

【１７３７】

腫瘍が固形腫瘍であるいくつかの実施形態では、腫瘍試料が、例えば、ステップＡ（図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に提供される）で得られた後に、腫瘍は物理的断片化を受ける。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存前に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存後に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、腫瘍を得た後に、いずれの凍結保存もない場合に起こる。いくつかの実施形態では、断片化ステップは、インビトロまたはエクスビボプロセスである。いくつかの実施形態では、腫瘍が断片化され、１０、２０、３０、４０個、またはそれ以上の断片または小片が、プライミングによる第１の拡張のために各容器に入れられる。いくつかの実施形態では、腫瘍が断片化され、３０個または４０個の断片または小片が、プライミングによる第１の拡張のために各容器に入れられる。いくつかの実施形態では、腫瘍が断片化され、４０個の断片または小片が、プライミングによる第１の拡張のために各容器に入れられる。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約４～約５０個の断片を含み、各断片は、約２７mm^3の体積を有する。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１３００mm^3～約１５００mm^3の総体積を伴う約３０～約６０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１３５０mm^3の総体積を伴う約５０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１グラム～約１．５グラムの総質量を伴う約５０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約４個の断片を含む。

【１７３８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍断片から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、鋭的解剖によって取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3～１０mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3～８mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約２mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約３mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約４mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約５mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約６mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約７mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約８mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約９mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１０mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、１～４$mm^{\times}$１～４ｍｍ×１～４ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、１$mm^{\times}$１ｍｍ×１ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、２$mm^{\times}$２ｍｍ×２ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、３$mm^{\times}$３ｍｍ×３ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、４$mm^{\times}$４ｍｍ×４ｍｍである。

【１７３９】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性、壊死性、及び／または脂肪性組織の量を最小限に抑えるために断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性組織の量を最小限に抑えるために断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の壊死性組織の量を最小限に抑えるために断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の脂肪性組織の量を最小限に抑えるために断片化される。ある特定の実施形態では、腫瘍の断片化ステップは、インビトロまたはエクスビボ方法である。

【１７４０】

いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、腫瘍の内部構造を維持するために行われる。いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、メスでのこ引き動作を行うことなく行われる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、ＲＰＭＩ１６４０（２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）であるが、これに限定されない酵素培地中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって生成された。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍は、およそ１分間機械的に解離され得る。その後、溶液が５％CO_2中３７℃で３０分間インキュベートされ、その後、およそ１分間再び機械的に破壊され得る。５％　CO_2中３７℃で３０分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ１分間、３回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きい組織片が存在する場合、３回目の機械的破壊後、５％CO_2中３７℃でさらに３０分間インキュベートするかにかかわらず、１回または２回の追加の機械的解離が試料に適用された。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、Ｆｉｃｏｌｌを使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。

【１７４１】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張ステップ前の細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに取得された」または「新たに単離された」細胞集団と称される。

【１７４２】

いくつかの実施形態では、細胞は、試料単離後（例えば、腫瘍試料を得た後及び／または腫瘍試料から細胞懸濁液を得た後）、任意選択で凍結され得、ステップＢに記載の拡張に入る前に凍結保存され得、これは以下でさらに詳細に説明されるとともに、図８（特に、例えば図８Ｂ）に例示される。

【１７４３】

１．コア／小生検由来のＴＩＬ

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、最初に、コア生検または同様の手順によって取得された患者腫瘍試料（「一次ＴＩＬ」）から得られ、その後、本明細書に記載されるように、さらなる操作のためにより大きい集団に拡張され、任意で凍結保存され、任意で表現型及び代謝パラメータについて評価される。

【１７４４】

いくつかの実施形態では、患者の腫瘍試料は、一般に、小生検、コア生検、針生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を得るための他の手段により、当該技術分野で知られている方法を使用して取得することができる。一般に、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍試料は、血液系悪性腫瘍から取得された腫瘍などの液体腫瘍であり得る。いくつかの実施形態では、試料は、複数の小さい腫瘍試料または生検に由来し得る。いくつかの実施形態では、試料は、同じ患者由来の単一の腫瘍からの複数の腫瘍試料を含むことができる。いくつかの実施形態では、試料は、同じ患者由来の１、２、３、または４つの腫瘍からの複数の腫瘍試料を含むことができる。いくつかの実施形態では、試料は、同じ患者由来の複数の腫瘍からの複数の腫瘍試料を含むことができる。固形腫瘍は、肺癌及び／または非小細胞

肺癌（ＮＳＣＬＣ）であり得る。

【１７４５】

一般に、腫瘍コアまたは断片から取得された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに取得された」または「新たに単離された」細胞集団と呼ばれる。ある特定の実施形態では、新たに取得されたＴＩＬ細胞集団は、抗原提示細胞、ＩＬ－２、及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地に曝露される。

【１７４６】

いくつかの実施形態では、腫瘍が転移性であり、かつ原発性病変が過去に効率的に治療／除去された場合、転移性病変のうちの１つの除去が必要とされ得る。いくつかの実施形態では、最も侵襲性の低いアプローチは、皮膚病変、または利用可能な場合、首または腋窩領域のリンパ節を除去することである。いくつかの実施形態では、皮膚病変が除去されるか、またはその小生検が除去される。いくつかの実施形態では、リンパ節またはその小生検が除去される。いくつかの実施形態では、肺もしくは肝臓の転移性病変、または腹腔内リンパ節もしくは胸部リンパ節、または小生検が除去される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、黒色腫である。いくつかの実施形態では、黒色腫の小生検は、ほくろまたはその一部分を含む。

【１７４７】

いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検である。いくつかの実施形態では、パンチ生検は、皮膚に押し込まれた円形の刃で取得される。いくつかの実施形態では、パンチ生検は、疑わしいほくろの周りの皮膚に押し込まれた円形の刃で得られる。いくつかの実施形態では、パンチ生検は、皮膚に押し込まれた円形の刃で得られ、丸い皮膚片が採取される。いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検であり、腫瘍の丸い部分が採取される。

【１７４８】

いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検であり、ほくろまたは増殖全体が除去される。いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検であり、ほくろまたは増殖全体が、正常に見える皮膚の小縁とともに除去される。

【１７４９】

いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検であり、ほくろまたは増殖の最も不規則な部分のみが採取される。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検であり、切開生検は、疑わしいほくろが非常に大きい場合など、他の技法を達成することができない場合に使用される。

【１７５０】

いくつかの実施形態では、小生検は、肺生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、気管支鏡検査によって取得される。一般に、気管支鏡検査では、患者は麻酔をかけられ、小さい用具が鼻または口を通り、喉を下って気管支通路に入り、そこで小さい用具を使用していくらかの組織を採取する。気管支鏡検査によって腫瘍または成長に到達できないいくつかの実施形態では、経胸腔針生検が用いられ得る。一般に、経胸腔針生検の場合も、患者は麻酔をかけられ、針が皮膚をとおして疑わしい場所に直接挿入されて、小さい組織試料を採取する。いくつかの実施形態では、経胸壁針生検は、介入放射線医学（例えば、針をガイドするためのＸ線またはＣＴ走査の使用）を必要とし得る。いくつかの実施形態では、小生検は、針生検によって取得される。いくつかの実施形態では、小生検は、超音波内視鏡検査によって得られる（例えば、照明を備えた内視鏡であり、口をとおして食道に配置される）。いくつかの実施形態では、小生検は、外科的に取得される。

【１７５１】

いくつかの実施形態では、小生検は、頭頸部生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検であり、小さい組織片が異常に見える領域から切り取られる。いくつかの実施形態では、異常な領域に容易にアクセスできる場合、試料は、入院することなく採取され得る。いくつかの実施形態

では、腫瘍が口または喉のより深くにある場合、生検は、全身麻酔を用いて手術室で行われる必要があり得る。いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、全領域が除去される切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、細針吸引（ＦＮＡ）である。いくつかの実施形態では、小生検は、細針吸引（ＦＮＡ）であり、シリンジに取り付けられた非常に細い針を使用して、腫瘍または塊から細胞を抽出（吸引）する。いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検であり、パンチ鉗子を使用して、疑わしい領域の一片を採取する。

【１７５２】

いくつかの実施形態では、小生検は、子宮頸部生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、膣鏡検査によって取得される。一般に、膣鏡検査は、拡大双眼鏡に取り付けられた照明付き拡大器具（膣鏡）の使用を採用し、その後、これを使用して、子宮頸部の表面の小さい切片を生検する。いくつかの実施形態では、小生検は、円錐切除／錐体生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、円錐切除／錐体生検であり、子宮頸部からより大きい組織片を採取するために外来手術が必要になる場合がある。いくつかの実施形態では、錐体生検は、診断の確認を助けることに加えて、錐体生検が初期治療となり得る。

【１７５３】

「固形腫瘍」という用語は、通常、嚢胞または液体領域を含まない異常な組織塊を指す。固形腫瘍は、良性または悪性であり得る。「固形腫瘍がん」という用語は、悪性、腫瘍性、またはがん性の固形腫瘍を指す。固形腫瘍がんには、肺の癌が含まれる。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。いくつかの実施形態では、がんは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）である。固形腫瘍の組織構造には、実質（がん細胞）を含む相互依存的組織区画、及びがん細胞が分散しており、かつ支持微小環境を提供し得る支持間質細胞が含まれる。

【１７５４】

いくつかの実施形態では、腫瘍由来の試料は、細針吸引物（ＦＮＡ）、コア生検、小生検（例えば、パンチ生検を含む）として取得される。いくつかの実施形態では、試料は、最初にＧ－ＲＥＸ　１０に入れられる。いくつかの実施形態では、１つまたは２つのコア生検及び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初にＧ－ＲＥＸ　１０に入れられる。いくつかの実施形態では、３、４、５、６、８、９、または１０個以上のコア生検及び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初にＧ－ＲＥＸ１００に入れられる。いくつかの実施形態では、３、４、５、６、８、９、または１０個以上のコア生検及び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初にＧ－ＲＥＸ５００に入れられる。

【１７５５】

ＦＮＡは、例えば、黒色腫を含む皮膚腫瘍から取得することができる。いくつかの実施形態では、ＦＮＡは、転移性黒色腫を有する患者からの皮膚腫瘍などの皮膚腫瘍から取得される。いくつかの事例では、黒色腫を有する患者は、外科的治療を以前に受けたことがある。

【１７５６】

ＦＮＡは、例えば、ＮＳＣＬＣを含む肺腫瘍から得ることができる。いくつかの実施形態では、ＦＮＡは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を有する患者由来の肺腫瘍などの肺腫瘍から取得される。いくつかの事例では、ＮＳＣＬＣを有する患者は、外科的治療を以前に受けたことがある。

【１７５７】

本明細書に記載のＴＩＬは、ＦＮＡ試料から得られ得る。いくつかの事例では、ＦＮＡ試料は、１８ゲージ針～２５ゲージ針の範囲の細いゲージ針を使用して、患者から得られるか、または単離される。細いゲージ針は、１８ゲージ、１９ゲージ、２０ゲージ、２１ゲージ、２２ゲージ、２３ゲージ、２４ゲージ、または２５ゲージであり得る。いくつかの実施形態では、患者由来のＦＮＡ試料は、少なくとも４００，０００個のＴＩＬ、例えば、４００，０００個のＴＩＬ、４５０，０００個のＴＩＬ、５００，０００個のＴＩＬ

、５５０，０００個のＴＩＬ、６００，０００個のＴＩＬ、６５０，０００個のＴＩＬ、７００，０００個のＴＩＬ、７５０，０００個のＴＩＬ、８００，０００個のＴＩＬ、８５０，０００個のＴＩＬ、９００，０００個のＴＩＬ、９５０，０００個のＴＩＬ、またはそれ以上を含み得る。

【１７５８】

いくつかの事例では、本明細書に記載のＴＩＬは、コア生検試料から取得される。いくつかの事例では、コア生検試料は、１１ゲージ針～１６ゲージ針の範囲の外科用または医療用針を使用して、患者から得られるか、または単離される。針は、１１ゲージ、１２ゲージ、１３ゲージ、１４ゲージ、１５ゲージ、または１６ゲージであり得る。いくつかの実施形態では、患者由来のコア生検試料は、少なくとも４００，０００個のＴＩＬ、例えば、４００，０００個のＴＩＬ、４５０，０００個のＴＩＬ、５００，０００個のＴＩＬ、５５０，０００個のＴＩＬ、６００，０００個のＴＩＬ、６５０，０００個のＴＩＬ、７００，０００個のＴＩＬ、７５０，０００個のＴＩＬ、８００，０００個のＴＩＬ、８５０，０００個のＴＩＬ、９００，０００個のＴＩＬ、９５０，０００個のＴＩＬ、またはそれ以上を含み得る。

【１７５９】

一般に、採取された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに採取された」細胞集団と呼ばれる。

【１７６０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から得られない。いくつかの実施形態では、固形腫瘍コアは、断片化されない。

【１７６１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、ＲＰＭＩ１６４０（２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）であるが、これに限定されない酵素培地中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって生成された。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍は、およそ１分間機械的に解離され得る。その後、溶液が５％CO_2中３７℃で３０分間インキュベートされ、その後、およそ１分間再び機械的に破壊され得る。５％　CO_2中３７℃で３０分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ１分間、３回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きい組織片が存在する場合、３回目の機械的破壊後、５％CO_2中３７℃でさらに３０分間インキュベートするかにかかわらず、１回または２回の追加の機械的解離が試料に適用された。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、Ｆｉｃｏｌｌを使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。

【１７６２】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を取得することは、多病変試料採取法を含む。

【１７６３】

腫瘍解離酵素混合物には、１つ以上の解離（消化）酵素、例えば、限定されないが、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはコラゲナーゼの種類を含む）、Ａｃｃｕｔａｓｅ（商標）、Ａｃｃｕｍａｘ（商標）、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、キモトリプシン、キモパパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパイン、ＸＩＶ型プロテアーゼ（プロナーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）、トリプシン阻害剤、任意の他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びそれらの任意の組み合わせが含まれ得る。

【１７６４】

いくつかの実施形態では、解離酵素は、凍結乾燥酵素から再構成される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥酵素は、ハンクス平衡塩溶液（ＨＢＳＳ）などの滅菌緩衝液の量で

再構成される。

【１７６５】

いくつかの事例では、コラゲナーゼ（アニマルフリー１型コラゲナーゼなど）を、１０ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液で再構成する。凍結乾燥ストック酵素は、２８９２ＰＺ　Ｕ／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、５ｍＬ～１５ｍＬの緩衝液中で再構成される。いくつかの実施形態では、再構成後のコラゲナーゼストックは、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬの範囲、例えば、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約３５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約３００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２１０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２２０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２３０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２４０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２６０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２７０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２８０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２８９．２ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約３００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約３５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、または約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬである。

【１７６６】

いくつかの実施形態では、中性プロテアーゼは、１ｍｌの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥ストック酵素は、１７５ＤＭＣＵ／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、再構成後の中性プロテアーゼストックは、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬの範囲、例えば、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約３５０ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約３００ＤＭＣ／ｍＬ、約１５０ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ、約１１０ＤＭＣ／ｍＬ、約１２０ＤＭＣ／ｍＬ、約１３０ＤＭＣ／ｍＬ、約１４０ＤＭＣ／ｍＬ、約１５０ＤＭＣ／ｍＬ、約１６０ＤＭＣ／ｍＬ、約１７０ＤＭＣ／ｍＬ、約１７５ＤＭＣ／ｍＬ、約１８０ＤＭＣ／ｍＬ、約１９０ＤＭＣ／ｍＬ、約２００ＤＭＣ／ｍＬ、約２５０ＤＭＣ／ｍＬ、約３００ＤＭＣ／ｍＬ、約３５０ＤＭＣ／ｍＬ、または約４００ＤＭＣ／ｍＬである。

【１７６７】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡｓｅ　Ｉは、１ｍｌの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥したストック酵素は、４ＫＵ／バイアルの濃度であった。いくつかの実施形態では、再構成後のＤＮａｓｅ　Ｉストックは、約１ＫＵ／ｍＬ～１０ＫＵ／ｍＬ、例えば、約１ＫＵ／ｍＬ、約２ＫＵ／ｍＬ、約３ＫＵ／ｍＬ、約４ＫＵ／ｍＬ、約５ＫＵ／ｍＬ、約６ＫＵ／ｍＬ、約７ＫＵ／ｍＬ、約８ＫＵ／ｍＬ、約９ＫＵ／ｍＬ、または約１０ＫＵ／ｍＬの範囲である。

【１７６８】

いくつかの実施形態では、酵素のストックは変化する可能性があるため、凍結乾燥ストックの濃度を確認し、それに応じて消化カクテルに追加される酵素の最終量を修正することに留意されたい。

【１７６９】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、約４．７ｍｌの滅菌ＨＢＳＳ中に約１０．２ｕｌの中性プロテアーゼ（０．３６ＤＭＣ　Ｕ／ｍＬ）、２１．３ｕｌのコラゲナーゼ（１．２ＰＺ／ｍＬ）及び２５０ｕｌのＤＮＡｓｅ　Ｉ（２００Ｕ／ｍＬ）を含む。

【１７７０】

２．胸水Ｔ細胞及びＴＩＬ

いくつかの実施形態では、試料は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのＴ細胞またはＴＩＬの供給源は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、試料は、胸水由来試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのＴＩＬの供給源は、胸水由来試料である。例えば、米国特許公開第２０１４／０２９５４２６号に記載されている方法を参照されたく、これはすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【１７７１】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬと思われる、及び／またはＴＩＬを含む任意の胸腔内液または胸水を利用することができる。かかる試料は、ＮＳＣＬＣもしくはＳＣＬＣなどの原発性または転移性肺癌に由来し得る。いくつかの実施形態では、試料は、別の臓器、例えば、乳房、卵巣、結腸、または前立腺に由来する二次転移性がん細胞に由来し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜浸出液である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜漏出液である。他の生体試料は、例えば、腹部からの腹水または膵嚢胞液を含む、ＴＩＬを含有する他の漿液を含み得る。腹水及び胸腔内液は、非常に類似した化学系を伴い、腹部及び肺の両方が、悪性腫瘍における同じ物質の胸膜空間及び腹部空間に中皮線及び流体形態を有し、いくつかの実施形態では、かかる流体は、ＴＩＬを含有する。開示される方法が胸水を利用するいくつかの実施形態では、同じ方法が、ＴＩＬを含有する他の嚢胞液を使用して同様の結果で行われてもよい。

【１７７２】
いくつかの実施形態では、胸腔内液は、患者から直接除去された未処理の形態である。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、さらなる処理ステップの前に、ＥＤＴＡまたはヘパリンチューブなどの標準的な採血管に入れられる。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、さらなる処理ステップの前に、標準的なＣｅｌｌＳａｖｅ（登録商標）チューブ（Ｖｅｒｉｄｅｘ）に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、生存ＴＩＬの数の減少を避けるために、患者から採取した直後にＣｅｌｌＳａｖｅチューブに入れられる。生存ＴＩＬの数は、４℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置されると、２４時間以内に大幅に減少する可能性がある。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの除去後１時間、５時間、１０時間、１５時間、または最大２４時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、４℃で、患者からの除去後１時間、５時間、１０時間、１５時間、または最大２４時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

【１７７３】
いくつかの実施形態では、選択された対象からの胸腔内液試料は、希釈され得る。一実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：１０である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：９である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：８である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：５である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：２である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：１である。いくつかの実施形態では、希釈剤には、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、別の緩衝液、または生理学的に許容される希釈剤が含まれる。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの収集及び希釈の直後にＣｅｌｌＳａｖｅチューブ内に入れられ、生存ＴＩＬの減少を回避し、これは、４℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置された場合、２４～４８時間以内に有意に生じ得る。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、患者からの除去及び希釈後１時間、５時間、１０時間、１５時間、２４時間、３６時間、最大４８時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、４℃で、患者からの除去及び希釈後１時間、５時間、１０時間、１５時間、２４時間、３６時間、最大４８時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

【１７７４】
さらに別の実施形態では、胸腔内液試料は、さらなる処理ステップの前に、従来の手段によって濃縮される。いくつかの実施形態では、胸腔内液のこの前処理は、方法を実施する実験室への輸送のために、またはその後の分析のために（例えば、採取後２４～４８時間より後に）胸水を凍結保存しなければならない状況において好ましい。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、それが対象から採取された後に胸腔内液試料を遠心分離し、遠心分離物またはペレットを緩衝液中に再懸濁することによって調製される。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、輸送または後の分析及び／または処理のために凍結保存

される前に、複数の遠心分離及び再懸濁に供される。
【１７７５】
いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、濾過法を使用することによって、さらなる処理ステップの前に濃縮される。いくつかの実施形態では、さらなる処理で使用される胸腔内液試料は、胸腔内液が膜を通過することを可能にするが腫瘍細胞を保持する、既知で本質的に均一な孔径を含むフィルタを通して流体を濾過することによって調製される。いくつかの実施形態では、膜の細孔の直径は、少なくとも４μＭであり得る。いくつかの実施形態では、細孔直径は、５μＭ以上であり得、他の実施形態では、６、７、８、９、または１０μＭのうちのいずれかである。濾過後、膜によって保持されたＴＩＬを含む細胞を、膜から適切な生理学的に許容される緩衝液にすすいでもよい。次いで、このように濃縮されたＴＩＬを含む細胞は、方法のさらなる処理ステップで使用することができる。
【１７７６】
いくつかの実施形態では、胸腔内液試料（例えば、未処理の胸腔内液を含む）、希釈胸水、または再懸濁細胞ペレットは、試料中に存在する無核赤血球を特異的に溶解する溶解試薬と接触させる。いくつかの実施形態では、このステップは、胸腔内液がかなりの数のＲＢＣを含む状況で、さらなる処理ステップの前に行われる。好適な溶解試薬には、単一の溶解試薬もしくは溶解試薬及びクエンチ試薬、または溶解剤、クエンチ試薬及び固定試薬が含まれる。好適な溶解システムは市販されており、ＢＤ　Ｐｈａｒｍ　Ｌｙｓｅ（商標）システム（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ）が含まれる。他の溶解システムには、Ｖｅｒｓａｌｙｓｅ（商標）システム、ＦＡＣＳｌｙｓｅ（商標）システム（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ）、Ｉｍｍｕｎｏｐｒｅｐ（商標）システム、またはＥｒｙｔｈｒｏｌｙｓｅ　ＩＩシステム（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）、または塩化アンモニウムシステムが含まれる。いくつかの実施形態では、溶解試薬は、赤血球の効率的な溶解、ならびに胸水におけるＴＩＬ及びＴＩＬの表現型特性の保存のような主要な要件によって異なり得る。溶解のための単一の試薬を利用することに加えて、本明細書に記載の方法に有用な溶解システムは、第２の試薬、例えば、方法の残りのステップ中に溶解試薬の効果をクエンチまたは遅延させるもの、例えばＳｔａｂｉｌｙｓｅ（商標）試薬（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）を含むことができる。溶解試薬の選択または方法の好ましい実施に応じて、従来の固定試薬を使用することもできる。
【１７７７】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、未処理、希釈または多重遠心分離または処理された胸腔内液試料は、本明細書で提供されるようにさらに処理及び／または拡張される前に、約－１４０℃の温度で凍結保存される。
【１７７８】
１．末梢血から末梢血リンパ球（ＰＢＬ）を拡張する方法
ＰＢＬ法１。本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬは、本明細書に記載のプロセスを使用して拡張される。本発明のいくつかの実施形態では、方法は、全血からＰＢＭＣ試料を取得することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、非ＣＤ１９＋画分の負の選択を使用して、ＰＢＭＣから純粋なＴ細胞を単離することによってＴ細胞を濃縮することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、非ＣＤ１９＋画分の磁気ビーズベースの負の選択を使用して、ＰＢＭＣから純粋なＴ細胞を単離することによってＴ細胞を濃縮することを含む。
【１７７９】
本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬ法１は、以下のように行われる：０日目に、凍結保存されたＰＢＭＣ試料を解凍し、ＰＢＭＣを計数する。Ｔ細胞を、ヒトＰａｎ　Ｔ細胞単離キット及びＬＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して単離する。
【１７８０】
ＰＢＬ法２。本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬは、全血からＰＢＭＣ試料を得ることを含むＰＢＬ法２を使用して拡張される。ＰＢＭＣ由来のＴ細胞は、ＰＢＭＣを３７℃で少なくとも３時間インキュベートし、その後、非接着細胞を単離することによって

濃縮される。
【１７８１】
本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬ法２は、以下のように行われる：０日目に、凍結保存されたＰＭＢＣ試料を解凍し、ＰＢＭＣ細胞を、ＣＭ－２培地中の６ウェルプレートに６００万細胞／ウェルで播種し、３７℃で３時間インキュベートする。３時間後、ＰＢＬである非接着細胞を取り出し、計数する。
【１７８２】
ＰＢＬ方法３。本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬは、末梢血からＰＢＭＣ試料を得ることを含むＰＢＬ法３を使用して拡張される。Ｂ細胞は、ＣＤ１９＋選択を使用して単離され、Ｔ細胞は、ＰＢＭＣ試料の非ＣＤ１９＋画分の負の選択を使用して選択される。
【１７８３】
本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬ法３は、以下のように行われる：０日目に、末梢血から取得された凍結保存されたＰＢＭＣを解凍し、計数する。ＣＤ１９＋Ｂ細胞を、ＣＤ１９　Ｍｕｌｔｉｓｏｒｔキット、ヒト（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して選別する。非ＣＤ１９＋細胞画分のうち、Ｔ細胞を、ヒトＰａｎ　Ｔ細胞単離キット及びＬＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して精製する。
【１７８４】
いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、全血試料から単離される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、ＰＢＬを拡張するための出発材料として使用される。いくつかの実施形態では、試料は、拡張プロセス前に凍結保存される。他の実施形態では、新鮮な試料が、ＰＢＬを拡張するための出発材料として使用される。本発明のいくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、当該技術分野で知られている方法を使用してＰＢＭＣから単離される。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ヒトＴ汎細胞単離キット及びＬＳカラムを使用して単離される。本発明のいくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、当該技術分野で知られている抗体選択方法、例えば、ＣＤ１９の負の選択を使用して、ＰＢＭＣから単離される。
【１７８５】
本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、非接着細胞を特定するのに有効な所望の温度である期間インキュベートされる。本発明のいくつかの実施形態では、インキュベーション時間は、約３時間である。本発明のいくつかの実施形態では、温度は、約３７℃である。その後、非接着細胞は、上記のプロセスを使用して拡張される。
【１７８６】
いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで任意選択で前治療された対象または患者由来のものである。いくつかの実施形態では、腫瘍試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療された対象または患者由来のものである。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療されており、少なくとも１ヶ月間、少なくとも２ヶ月間、少なくとも３ヶ月間、少なくとも４ヶ月間、少なくとも５ヶ月間、少なくとも６ヶ月間、または１年間、またはそれ以上治療を受けた対象または患者由来のものである。他の実施形態では、ＰＢＭＣは、イブルチニブなどのＩＴＫ阻害剤レジメンを現在受けている患者に由来する。
【１７８７】
いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療されており、キナーゼ阻害剤またはイブルチニブなどのＩＴＫ阻害剤での治療に不応性である対象または患者由来のものである。
【１７８８】
いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療されたが、もはやキナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤での治療を受けていない対象または患者由来のものである。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療されたが、もはやキナーゼ阻害

剤またはＩＴＫ阻害剤での治療を受けておらず、少なくとも１ヶ月間、少なくとも２ヶ月間、少なくとも３ヶ月間、少なくとも４ヶ月間、少なくとも５ヶ月間、少なくとも６ヶ月間、または少なくとも１年間、またはそれ以上治療を受けていない対象または患者由来のものである。他の実施形態では、ＰＢＭＣは、ＩＴＫ阻害剤に以前に曝露されたが、少なくとも３ヶ月、少なくとも６ヶ月、少なくとも９ヶ月、または少なくとも１年以内に治療されていない患者に由来する。

【１７８９】

本発明のいくつかの実施形態では、０日目に、細胞がＣＤ１９＋について選択され、それに応じて選別される。本発明のいくつかの実施形態では、選択は、抗体結合ビーズを使用して行われる。本発明のいくつかの実施形態では、純粋なＴ細胞が、０日目にＰＢＭＣから単離される。

【１７９０】

本発明のいくつかの実施形態では、イブルチニブまたは他のＩＴＫ阻害剤で前治療されていない患者の場合、１０～１５ｍＬのバフィーコートは、約５×10^9のＰＢＭＣを産生し、これは、次いで、約５．５×10^7のＰＢＬを産生する。

【１７９１】

本発明のいくつかの実施形態では、イブルチニブまたは他のＩＴＫ阻害剤で前治療された患者の場合、拡張プロセスは、約２０×10^9のＰＢＬを産生する。本発明のいくつかの実施形態では、４０．３×10^6のＰＢＭＣは、約４．７×10^5のＰＢＬを産生する。

【１７９２】

前述の実施形態のうちのいずれにおいても、ＰＢＭＣは、全血試料から、アフェレーシスによって、バフィーコートから、またはＰＢＭＣを得るための当該技術分野で知られている任意の他の方法から得られ得る。

【１７９３】

いくつかの実施形態では、ＰＢＬは、米国特許出願公開第２０２０／０３４７３５０Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載される方法を使用して調製される。

【１７９４】

２．骨髄由来のＰＢＭＣから骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）を拡張する方法

ＭＩＬ方法３。本発明のいくつかの実施形態では、方法は、骨髄からＰＢＭＣを取得することを含む。０日目に、ＰＢＭＣがＣＤ３＋／ＣＤ３３＋／ＣＤ２０＋／ＣＤ１４＋について選択され、選別され、非ＣＤ３＋／ＣＤ３３＋／ＣＤ２０＋／ＣＤ１４＋細胞画分が超音波処理され、超音波処理された細胞画分の一部が選択された細胞画分に戻し追加される。

【１７９５】

本発明のいくつかの実施形態では、ＭＩＬ法３は、以下のように行われる：０日目に、凍結保存されたＰＢＭＣ試料を解凍し、ＰＢＭＣを計数する。細胞を、ＣＤ３、ＣＤ３３、ＣＤ２０、及びＣＤ１４抗体で染色し、選別されたＳ３ｅ細胞（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して選別する。細胞を、免疫細胞画分（またはＭＩＬ画分）（ＣＤ３＋ＣＤ３３＋ＣＤ２０＋ＣＤ１４＋）及びＡＭＬ芽球画分（非ＣＤ３＋ＣＤ３３＋ＣＤ２０＋ＣＤ１４＋）の２つの画分に選別する。

【１７９６】

本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、骨髄から取得される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、アフェレーシス、吸引、針生検、または当該技術分野で知られている他の同様の手段により骨髄から取得される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、新鮮である。他の実施形態では、ＰＢＭＣは、凍結保存される。

【１７９７】

本発明のいくつかの実施形態では、ＭＩＬは、１０～５０ｍＬの骨髄穿刺液から拡張される。本発明のいくつかの実施形態では、１０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。

他の実施形態では、２０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、３０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、４０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、５０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。

【１７９８】

本発明のいくつかの実施形態では、約１０～５０ｍＬの骨髄穿刺液から産生されたＰＢＭＣの数は、約5×10^{7}～約10×10^{7}ＰＢＭＣである。他の実施形態では、産生されるＰＭＢＣの数は、約7×10^{7}のＰＢＭＣである。

【１７９９】

本発明のいくつかの実施形態では、約5×10^{7}～約10×10^{7}個のＰＢＭＣから約0.5×10^{6}～約1.5×10^{6}個のＭＩＬが得られる。本発明のいくつかの実施形態では、約1×10^{6}ＭＩＬが産生される。

【１８００】

本発明のいくつかの実施形態では、骨髄穿刺液由来の12×10^{6}個のＰＢＭＣから、およそ1.4×10^{5}個のＭＩＬが得られる。

【１８０１】

前述の実施形態のうちのいずれにおいても、ＰＢＭＣは、全血試料から、骨髄から、アフェレーシスによって、バフィーコートから、またはＰＢＭＣを得るための当該技術分野で知られている任意の他の方法から得られ得る。

【１８０２】

いくつかの実施形態では、ＭＩＬは、米国特許出願公開第２０２０／０３４７３５０Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載される方法を使用して調製される。

【１８０３】

Ａ１．ステップＡ１：進行前凍結保存

いくつかの実施形態では、本方法は、患者が免疫チェックポイント阻害剤（ＩＣＩ）及び／または標準治療の治療を受ける時または受けた後にがん進行を示す後、ステップＡから取得された採取された腫瘍試料を凍結保存し、将来のＴＩＬ製造のための凍結保存ＴＩＬ調製物を作製することを提供する。

【１８０４】

いくつかの実施形態では、凍結保存は、

（ａ）少なくとも１つの前の療法の前に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者のＮＳＣＬＣ腫瘍から腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む試料を凍結保存して、凍結保存された試料を産生することと、を含む。

【１８０５】

いくつかの実施形態では、凍結保存は、

（ａ）少なくとも１つの前の療法の前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片を産生することと、を含む。

【１８０６】

いくつかの実施形態では、凍結保存は、

（ａ）少なくとも１つの前の療法の前に、対象から取得された腫瘍試料を、腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、を含む。

【１８０７】

いくつかの実施形態では、凍結保存は、
（ａ）少なくとも１つの前の療法の前に、対象または患者からＮＳＣＬＣ腫瘍を切除することであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはＮＳＣＬＣ腫瘍から腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、切除することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む試料を凍結保存して、凍結保存された試料を産生することと、を含む。
【１８０８】
いくつかの実施形態では、凍結保存は、
（ａ）少なくとも１つの前の療法の前に、対象または患者からＮＳＣＬＣ腫瘍を切除することであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはＮＳＣＬＣ腫瘍から腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、切除することと、
（ｂ）腫瘍を、腫瘍断片に断片化することと、
（ｃ）ステップ（ｂ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片を産生することと、を含む。
【１８０９】
いくつかの実施形態では、凍結保存は、
（ａ）少なくとも１つの前の療法の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、を含む。
【１８１０】
いくつかの実施形態では、凍結保存は、
（ａ）少なくとも１つの前の療法の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を解離して、解離された腫瘍物質を産生することと、
（ｃ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む解離された腫瘍物質を凍結保存して、凍結保存された解離された腫瘍物質を産生することと、を含む。
【１８１１】
Ｂ．ステップＢ：プライミングによる第１の拡張
いくつかの実施形態では、本方法は、より古いＴＩＬ（すなわち、対象／患者への投与前により多くの複製ラウンドをさらに受けたＴＩＬ）よりも追加の治療的利益を提供し得る、より若いＴＩＬを提供する。若いＴＩＬの特徴は、文献、例えば、Ｄｏｎｉａ，ｅｔａｌ．，Ｓｃａｎｄ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２，７５，１５７－１６７、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１０，１６，６１２２－６１３１、Ｈｕａｎｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００５，２８，２５８－２６７、Ｂｅｓｓｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１３，１９，ＯＦ１－ＯＦ９、Ｂｅｓｓｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００９，３２：４１５－４２３、Ｒｏｂｂｉｎｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００４，１７３，７１２５－７１３０、Ｓｈｅｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００７，３０，１２３－１２９、Ｚｈｏｕ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００５，２８，５３－６２、及びＴｒａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００８，３１，７４２－７５１に記載されており、それらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。
【１８１２】
例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）のステップＡに記載されるものなどの腫瘍断片及び／または腫瘍断片の解剖

または消化後に、結果として得られた細胞は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長を好む条件下で、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びフィーダー細胞（例えば、抗原提示フィーダー細胞）を含む血清中で培養される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びフィーダー細胞は、腫瘍消化物及び／または腫瘍断片とともに培養開始時に（例えば、０日目に）追加される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物及び／または腫瘍断片は、１容器当たり最大６０個の断片及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む容器内でインキュベートされる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に１～８日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約1×10^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に１～７日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約1×10^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、１～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約1×10^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、１～７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約1×10^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、５～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約1×10^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、５～７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約1×10^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約６～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に、約1×10^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約６～７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に、約1×10^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約７～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に、約1×10^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約1×10^{8}のバルクＴＩＬ細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約1×10^{8}のバルクＴＩＬ細胞をもたらす。

【１８１３】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの拡張は、以下及び本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張ステップ（例えば、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるプロセスを含み得、かつ０日目及び／または培養開始からフィーダー細胞を含む、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）のステップＢに記載されるものなど）、その後、以下のステップＤ及び本明細書に記載の急速な第２の拡張（ステップＤ、急速な拡張プロトコル（ＲＥＰ）ステップと称されるプロセスを含む）、続いて、任意の凍結保存、その後、以下及び本明細書に記載の第２のステップＤ（再刺激ＲＥＰステップと称されるプロセスを含む）を使用して行われ得る。このプロセスから取得されたＴＩＬは、本明細書に記載の表現型特徴及び代謝パラメータについて任意で特徴付けられ得る。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^{3}～１０mm^{3}である。

【１８１４】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、ステップＢのＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭＨｅｐｅｓ、及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充した、ＧｌｕｔａＭＡＸを含むＲＰＭＩ　１６４０からなる。

【１８１５】

いくつかの実施形態では、２４０個以下の腫瘍断片が存在する。いくつかの実施形態では、４つ以下の容器に入れられた２４０個以下の腫瘍断片が存在する。いくつかの実施形態では、容器は、Ｇ－ＲＥＸ１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、

６０個以下の腫瘍断片が１つの容器に入れられる。いくつかの実施形態では、各容器は、１容器当たり５００ｍＬ以下の培地を含む。いくつかの実施形態では、培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、抗原提示フィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり２．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、Ｇ－ＲＥＸ１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇのＯＫＴ－３、及び２．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び２．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【１８１６】

腫瘍断片の調製後、結果として得られた細胞（すなわち、一次細胞集団である断片）は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長を好み、かつ０日目の培養開始からＴＩＬプライミング及び加速された成長を可能にする条件下で、ＩＬ－２、抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含有する培地中で培養される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物及び／または腫瘍断片は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、ならびに抗原提示フィーダー細胞及びＯＫＴ－３とインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に１～８日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×10^8のバルクＴＩＬ細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張中の成長培地は、ＩＬ－２またはそのバリアント、ならびに抗原提示フィーダー細胞及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に１～７日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×10^8のバルクＴＩＬ細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張中の成長培地は、ＩＬ－２またはそのバリアント、ならびに抗原提示フィーダー細胞及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、組換えヒトＩＬ－２（ｒｈＩＬ－２）である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき２０～３０×10^6ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき２０×10^6ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき２５×10^6ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき３０×10^6ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、４～８×10^6ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、５～７×10^6ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、６×10^6ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、実施例Ｃに記載されるように調製される。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約１０，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、または約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２さらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。ある実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、ＩＬ－

２をさらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、約４０００ＩＵ／ｍＬ、約４５００ＩＵ／ｍＬ、約５０００ＩＵ／ｍＬ、約５５００ＩＵ／ｍＬ、約６０００ＩＵ／ｍＬ、約６５００ＩＵ／ｍＬ、約７０００ＩＵ／ｍＬ、約７５００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬ、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬ、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【１８１７】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１６０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１４０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、または約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、ＩＬ－１５をさらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。

【１８１８】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約４ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、または約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２１をさらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。

【１８１９】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、

約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、及び約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇの間、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、１５ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３抗体は、ムロモナブである。表１を参照されたい。

【１８２０】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、細胞培養培地中に１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは４－１ＢＢアゴニストであり、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、ＥＵ－１０１、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリアント、バイオシミラー、及び組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、０．１μｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。

【１８２１】

いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、ＩＬ－２を約３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、及びＯＫＴ－３を約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、ＩＬ－２を約６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、及びＯＫＴ－３を約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【１８２２】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、それは、ＣＭ１（培養培地１）と称される。いくつかの実施形態では、ＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充した、ＧｌｕｔａＭＡＸを含むＲＰＭＩ１６４０からなる。いくつかの実施形態では、ＣＭは、実施例に記載されるＣＭ１であり、実施例Ａを参照されたい。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培地または初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞（本明細書ではフィーダー細胞とも称される）を含む。

【１８２３】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される拡張プロセスで使用される培地は、無血清培地または合成培地である。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、血清含有培地のロット間の変動に部分的に起因する実験変動を防止及び／または減少させるために使用される。

【１８２４】
いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ １６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。
【１８２５】
いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｅｒｕｍ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ、ＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代用物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代用物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代用物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の抗生物質、及び１つ以上の微量元素のうちの１つ以上が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／または２－メルカプトエタノールをさらに含む。
【１８２６】
いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔは、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＳＴ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ １６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。
【１８２７】
いくつかの実施形態では、無血清または合成培地中の総血清代替物濃度（ｖｏｌ％）は、総無血清または合成培地の約１体積％、２体積％、３体積％、４体積％、５体積％、６体積％、７体積％、８体積％、９体積％、１０体積％、１１体積％、１２体積％、１３体積％、１４体積％、１５体積％、１６体積％、１７体積％、１８体積％、１９体積％、または２０体積％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約３％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約５％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約１０％である。
【１８２８】
いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ

（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【１８２９】

いくつかの実施形態では、合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭに

は、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【１８３０】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約０．１ｍＭ～約１０ｍＭ、０．５ｍＭ～約９ｍＭ、１ｍＭ～約８ｍＭ、２ｍＭ～約７ｍＭ、３ｍＭ～約６ｍＭ、または４ｍＭ～約５ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約２ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。

【１８３１】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５ｍＭ～約１５０ｍＭ、１０ｍＭ～約１４０ｍＭ、１５ｍＭ～約１３０ｍＭ、２０ｍＭ～約１２０ｍＭ、２５ｍＭ～約１１０ｍＭ、３０ｍＭ～約１００ｍＭ、３５ｍＭ～約９５ｍＭ、４０ｍＭ～約９０ｍＭ、４５ｍＭ～約８５ｍＭ、５０ｍＭ～約８０ｍＭ、５５ｍＭ～約７５ｍＭ、６０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約６５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【１８３２】

いくつかの実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる国際ＰＣＴ公開第ＷＯ／１９９８／０３０６７９号に記載されている合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、１つ以上のアルブミ

ンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の微量元素、及び１つ以上の抗生物質からなる群から選択される１つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベータ－メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、及び１つ以上の微量元素からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ　１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

【１８３３】

いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌの範囲であり、Ｌ－ヒスチジンの濃度は、約５～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－イソロイシンの濃度は、約５～３００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－メチオニンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－フェニルアラニンの濃度は、約５～４００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－プロリンの濃度は、約１～１０００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－ヒドロキシプロリンの濃度は、約１～４５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－セリンの濃度は、約１～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－スレオニンの濃度は、約１０～５００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－トリプトファンの濃度は、約２～１１０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－チロシンの濃度は、約３～１７５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－バリンの濃度は、約５～５００ｍｇ／Ｌであり、チアミンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、還元型グルタチオンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩の濃度は、約１～２００ｍｇ／Ｌであり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約１～５０ｍｇ／Ｌであり、インスリンの濃度は、約１～１００ｍｇ／Ｌであり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約０．０００００１～０．０００１ｍｇ／Ｌであり、アルブミン（例えば、ＡｌｂｕＭＡＸ（登録商標）Ｉ）の濃度は、約５０００～５０，０００ｍｇ／Ｌである。

【１８３４】

いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地中の濃度範囲」という見出しの下の列にリストされた濃度範囲で存在する。他の実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされた最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかでは、無血清サプリメントは、表４の「サプリメント中の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。

【１８３５】

いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約２６０～３５０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約２８０～３１０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、合成培地には、最大約３．７ｇ／Ｌ、または約２．２ｇ／Ｌの重炭酸ナ

トリウムが補充されている。合成培地には、Ｌ－グルタミン（最終濃度約２ｍＭ）、１つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ、最終濃度約１００μＭ）、２－メルカプトエタノール（最終濃度約１００μＭ）がさらに補充されていてもよい。

【１８３６】

いくつかの実施形態では、Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ　Ｔｒａｎｓｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，４（１）２０１５（ｄｏｉ：１０．１０３８／ｃｔｉ．２０１４．３１）に記載の定義された培地が、本発明において有用である。簡潔には、ＲＰＭＩまたはＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）を基礎細胞培地として使用し、０、２％、５％、または１０％のいずれかのＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔを補充した。

【１８３７】

いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ベーター－メルカプトエタノール（ＢＭＥまたはβＭＥ、２－メルカプトエタノールとしても知られる、ＣＡＳ６０－２４－２）を欠いている。

【１８３８】

いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、１～８日である。いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、２～８日である。いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、３～８日である。いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、４～８日である。いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、５～８日である。いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、６～８日である。いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、プライミングによる第１の拡張（例えば、図１（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び

／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）のステップＢに提供されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、７～８日である。いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）のステップＢに提供されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、８日である。いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、１～７日である。いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、２～７日である。いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、３～７日である。いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、４～７日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂ及び／または図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、５～７日間である。いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、６～７日である。いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）のステップＢに提供されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、７日である。

【１８３９】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによ

る第１の拡張ステップが開始されたときから２日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから２日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから３日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから３日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから４日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから４日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから５日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから５日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから６日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから６日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから７日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから７日間続行することができる。

【１８４０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬのプライミングによる第１の拡張は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ増殖は、１日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ増殖は、２日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、３日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ増殖は、３日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、４日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ増殖は、４日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、５日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ増殖は、５日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、６日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ増殖は、６日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、７日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ増殖は、７日間続行することができる。

【１８４１】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１の組み合わせは、プライミングによる第１の拡張中に組み合わせとして用いられる。いく

つかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）による、及び本明細書に記載のステップＢプロセス中を含む、プライミングによる第１の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の組み合わせは、プライミングによる第１の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）による、及び本明細書に記載のステップＢプロセス中に含まれ得る。

【１８４２】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）によるステップＢは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが容器として用いられる。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－１０である。

【１８４３】

１．フィーダー細胞及び抗原提示細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）からのステップＢに記載のもの、及びＲＥＰ前またはプライミングによるＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む）は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろプライミングによる第１の拡張中に添加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）からのステップＢに記載のもの、及びＲＥＰ前またはプライミングによるＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む）は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ４～８日目中の任意の時点で、プライミングによる第１の拡張中に添加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）からのステップＢに記載のもの、及びにＲＥＰ前またはプライミングによるＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む）は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ４～７日目中の任意の時点で、プライミングによる第１の拡張中に添加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）からのステップＢに記載のもの、及びにＲＥＰ前またはプライミングによるＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む）は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ５～８日目中の任意の時点で、プライミングによる第１の拡張中に添加される。いくつかの実施

形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）からのステップＢに記載のもの、及びにＲＥＰ前またはプライミングによるＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む）は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ５～７日目中の任意の時点で、プライミングによる第１の拡張中に添加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）からのステップＢに記載のもの、及びにＲＥＰ前またはプライミングによるＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む）は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ６～８日目中の任意の時点で、プライミングによる第１の拡張中に添加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）からのステップＢに記載のもの、及びにＲＥＰ前またはプライミングによるＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む）は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ６～７日目中の任意の時点で、プライミングによる第１の拡張中に添加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）からのステップＢに記載のもの、及びＲＥＰ前またはプライミングによるＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む）は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ７または８日目中の任意の時点で、プライミングによる第１の拡張中に添加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）からのステップＢに記載のもの、及びにＲＥＰ前またはプライミングによるＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む）は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ７日目中の任意の時点で、プライミングによる第１の拡張中に添加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）からのステップＢに記載のもの、及びＲＥＰ前またはプライミングによるＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む）は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ８日目中の任意の時点で、プライミングによる第１の拡張中に添加される。

【１８４４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時及びプライミングによる第１の拡張中にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要する。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者由来の標準の全血単位から取得される末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、2.5×10^{8}のフィーダー細胞が、プライミングによる第１の拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、容器当たり2.5×10^{8}のフィーダー細

胞が、プライミングによる第１の拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、ＧＲＥＸ－１０当たり２．５×１０^{8}のフィーダー細胞が、プライミングによる第１の拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、ＧＲＥＸ－１００当たり２．５×１０^{8}のフィーダー細胞が、プライミングによる第１の拡張中に使用される。

【１８４５】

一般に、同種異系ＰＢＭＣは、放射線照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、実施例に記載されるように、ＲＥＰ手順で使用され、これは、放射線照射された同種異系ＰＢＭＣの複製無能力を評価するための例示的なプロトコルを提供する。

【１８４６】

いくつかの実施形態では、１４日目の生細胞の総数が、プライミングによる第１の拡張の０日目に培養された初期の生細胞数よりも少ない場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。

【１８４７】

いくつかの実施形態では、７日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、プライミングによる第１の拡張の０日目に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【１８４８】

いくつかの実施形態では、７日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、プライミングによる第１の拡張の０日目に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、５～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び１０００～６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１０～５０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～５０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２０～４０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～４０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２５～３５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２５００～３５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【１８４９】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、約１：２５、約１：５０、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００、約１：３２５、約１：３５０、約１：３７５、約１：４００、または約１：５００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：５０～１：３００である。いくつかの実施形態では、第２の増殖におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：１００～１：２００である。

【１８５０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順は、約２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞：約１００×１０^{6}個のＴＩＬの比を必要とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順は、約２．

５×１０^{8}フィーダー細胞：約５０×１０^{6}ＴＩＬの比を必要とする。さらに別の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順は、約２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞：約２５×１０^{6}個のＴＩＬを必要とする。さらに別の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張には、約２．５×１０^{8}のフィーダー細胞が必要である。さらに別の実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、急速な第２の拡張で使用されるフィーダー細胞の数の４分の１、３分の１、１２分の５、または２分の１を必要とする。

【１８５１】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、容器当たり２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり３０ｎｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞当たり１５μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地及び１５μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、５００ｍＬの培養培地、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、１５μｇのＯＫＴ－３、及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞当たり１５μｇのＯＫＴ－３を含む。

【１８５２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順は、第２の拡張中にＴＩＬを超える過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者由来の標準の全血単位から取得される末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、人工抗原提示（ａＡＰＣ）細胞がＰＢＭＣの代わりに使用される。

【１８５３】

概して、同種異系ＰＢＭＣは、放射線照射または熱処理のいずれかを介して不活性化され、図及び実施例に記載の例示的な手順を含む、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順で使用される。

【１８５４】

いくつかの実施形態では、人工抗原提示細胞は、ＰＢＭＣの代替物として、またはＰＢＭＣと組み合わせて、プライミングによる第１の拡張において使用される。

【１８５５】

２．サイトカイン

本明細書に記載の拡張方法は、一般に、当該技術分野で知られているように、高用量のサイトカイン、特にＩＬ－２を含む培養培地を使用する。

【１８５６】

代替的に、国際公開第ＷＯ２０１５／１８９３５６号及び同第ＷＯ２０１５／１８９３

５７号（参照によりそれらの全体が本明細書に明示的に組み込まれる）に一般に概説されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせで、ＴＩＬのプライミングによる第１の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することもさらに可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２及びＩＬ－１５、ＩＬ－２及びＩＬ－２１、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１が含まれ、後者は多くの実施形態で特に有用である。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにＴ細胞の生成に特に有利に働く。表２を参照されたい。

【１８５７】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＫＴ－３抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、４－１ＢＢアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＸ－４０アゴニストの、培養培地への添加を含み得る。加えて、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（ＰＰＡＲ）－ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーターＩ－アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第２０１９／０３０７７９６　Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップＢ中の培養培地で使用されてもよい。

【１８５８】

Ｃ．ステップＣ：プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行

いくつかの事例では、例えば、例えば図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に示されるステップＢから取得されるＴＩＬ集団を含む、プライミングによる第１の拡張から取得されたバルクＴＩＬ集団（ＲＥＰ前と称されることもある拡張を含み得る）は、急速な第２の拡張（急速な拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されることもある拡張を含み得る）に供され、次いで、以下で論じられるように凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾されたＴＩＬが療法に使用される場合、プライミングによる第１の拡張由来の拡張されたＴＩＬ集団または急速な第２の拡張由来の拡張されたＴＩＬ集団は、拡張ステップ前またはプライミングによる第１の拡張後及び急速な第２の拡張前に好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。

【１８５９】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に示されるステップＢから）取得されたＴＩＬは、選択のために表現型決定されるまで保管される。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に示されるステップＢから）取得されたＴＩＬは、保管されず、急速な第２の拡張に直接進む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から取得されたＴＩＬは、プライミングによる第１の拡張後及び急速な第２の拡張前に凍結保存されない。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、腫瘍の断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約３日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約３日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによ

る第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約４日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約４日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約５日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約５日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約６日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約６日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約７日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約８日で起こる。

【１８６０】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから２日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから２日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから３日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから３日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから４日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから４日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから５日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから５日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化

が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから６日～７日で起こる。。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから６日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから７日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから８日で起こる。

【１８６１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、一次の第１の拡張後及び急速な第２の拡張前に保管されず、ＴＩＬは、急速な第２の拡張に直接進む（例えば、いくつかの実施形態では、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に示されるステップＢからステップＤへの移行中に保管されない）。いくつかの実施形態では、移行は、本明細書に記載されるように、閉鎖系内で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張由来のＴＩＬである第２のＴＩＬ集団は、移行期間なしで急速な第２の拡張に直接進む。

【１８６２】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）によるステップＣは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、ＧＲＥＸ－１０またはＧＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、容器サイズのスケールアップを伴う。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、急速な第２の拡張よりも小さい容器内で行われる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、ＧＲＥＸ－１００内で行われ、急速な第２の拡張は、ＧＲＥＸ－５００内で行われる。

【１８６３】

いくつかの実施形態では、第１の拡張から（例えば、図４８Ａ～Ｄに示されるステップＢから）取得されたＴＩＬは、活性化または遺伝子編集ステップに移行される。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、または１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～１３日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～１２日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～１０日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～９日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～

８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～６日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～５日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約３日～４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約４日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約４日～１３日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約４日～１２日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約４日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約４日～１０日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約４日～９日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約４日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約４日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約４日～６日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約４日～５日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約５日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約５日～１３日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約５日～１２日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約５日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約５日～１０日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約５日～９日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約５日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約５日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約５日～６日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約６日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約６日～１３日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約６日～１２日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約６日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約６日～１０日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約６日～９日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約６日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は、断片化が起こってから約６日～７日で起こる。

【１８６４】

いくつかの実施形態では、第１の拡張から活性化または遺伝子編集ステップへの移行は

、本明細書に記載の閉鎖系中で起こる。

【１８６５】

いくつかの実施形態では、活性化ステップは、ＴＩＬを、抗ＣＤ３及び／または抗ＣＤ３８ビーズを含む培地中で約１～７日間培養することを含む。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、ＴＩＬを、抗ＣＤ３ビーズを含む培地中で約１～７日間培養することを含む。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、ＴＩＬを、抗ＣＤ３８ビーズを含む培地中で約１～７日間培養することを含む。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、ＴＩＬを、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ３８ビーズを含む培地中で約１～７日間培養することを含む。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、約１～７日間行われる。いくつかの実施形態では、活性化するステップは、約１～７日、約１～６日、約２～６日、約３～６日、約４～６日、約５～６日、約１～５日、約２～５日、約３～５日、約４～５日、約１～４日、約２～４日、約３～４日、約１～３日、約２～３日、約１～２日間行われる。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、約１日間行われる。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、約２日間行われる。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、約７日間行われる。

【１８６６】

本明細書を考慮して、当業者に既知の任意の好適な抗ＣＤ３／抗ＣＤ３８ビーズが使用され得る。好適な抗ＣＤ３／抗ＣＤ３８ビーズには、Ｔ細胞拡大及び活性化のためのＤｙｎａｂｅａｄｓ（商標）ヒトＴ活性化剤ＣＤ３／ＣＤ２８（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎから市販されている）、ＩｍｍｕｎｏＣｕｌｔ（商標）ヒトＣＤ３／ＣＤ２８Ｔ細胞活性化剤（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから市販されている）、及びＴ　Ｃｅｌｌ　ＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃから市販されている）を含むが、これらに限定されない市販の製品が、含まれるがこれらに限定されない。

【１８６７】

いくつかの実施形態では、活性化ステップは、任意選択である。いくつかの実施形態では、活性化ステップは、第１の拡張がＯＫＴ－３を含む場合、任意選択である。

【１８６８】

いくつかの実施形態では、第１の拡張から（例えば、図４８Ｃ～Ｄに示されるステップＢから）または活性化ステップから（例えば、図４８Ａ～Ｂに示されるステップＣから）取得されたＴＩＬは、遺伝子編集ステップに移行される。

【１８６９】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集ステップは、ＴＩＬ集団に対して滅菌エレクトロポレーションステップを行うことを含む。いくつかの実施形態では、無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移入を媒介する。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、少なくとも１つのタンパク質の発現を調節するためのＴＡＬＥヌクレアーゼ系である。いくつかの実施形態によれば、ＴＡＬＥヌクレアーゼ系は、ＰＤ－１の発現を下方調節する。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、ＣＴＬＡ－４の発現を下方調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、ＬＡＧ－３の発現を下方調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、ＣＩＳＨの発現を下方調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、ＣＢＬ－Ｂの発現を下方調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、ＴＩＧＩＴの発現を下方調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１ノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４ノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＬＡＧ－３ノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれ

ば、得られるＴＩＬは、ＣＩＳＨノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＢＬ－Ｂノックアウト ＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＴＩＧＩＴノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１の下方調節された発現、ならびにＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂのうちの１つ以上の下方調節された発現を示す。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４の下方調節された発現、ならびにＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂのうちの１つ以上の下方調節された発現を示す。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＬＡＧ－３の下方調節された発現、ならびにＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂのうちの１つ以上の下方調節された発現を示す。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＩＳＨの下方調節された発現、ならびにＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂのうちの１つ以上の下方調節された発現を示す。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＢＬ－Ｂの下方調節された発現、ならびにＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＰＤ－１のうちの１つ以上の下方調節された発現を示す。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１／ＣＴＬＡ－４ダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１／ＬＡＧ－３ダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１／ＣＩＳＨダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１／ＣＢＬ－Ｂダブルノックアウト ＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１／ＴＩＧＩＴダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４／ＬＡＧ－３ダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４／ＣＩＳＨダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４／ＣＢＬ－Ｂダブルノックアウト ＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４／ＴＩＧＩＴダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＬＡＧ－３／ＣＩＳＨダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＬＡＧ－３／ＣＢＬ－Ｂダブルノックアウト ＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＬＡＧ－３／ＴＩＧＩＴダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＩＳＨ／ＣＢＬ－Ｂダブルノックアウト ＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＩＳＨ／ＴＩＧＩＴダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＢＬ－Ｂ／ＴＩＧＩＴダブルノックアウトＴＩＬである。

【１８７０】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集のステップは、休止ステップをさらに含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、第４のＴＩＬ集団を、約３０～４０℃、約５％のＣＯ２でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、約３０℃、約３０．５℃、約３１℃、約３１．５℃、約３２℃、約３２．５℃、約３３℃、約３３．５℃、約３４℃、約３４．５℃、約３５℃、約３５．５℃、約３６℃、約３６．５℃、約３７℃、約３７．５℃、約３８℃、約３８．５℃、約３９℃、約３９．５℃、約４０℃で実行される。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、約１時間、約２時間、約３時間、約４時間、約５時間、約６時間、約７時間、約８時間、約９時間、約１０時間、約１１時間、約１２時間、約１３時間、約１４時間、約１５時間、約１６時間、約１７時間、約１８時間、約１９時間、約２０時間、約２１時間、約２２時間、約２３時間、約２４時間実行される。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団または第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１５時間～約２３時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含

む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１５時間～約２３時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１５時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１６時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１７時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１８時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１９時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約２０時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約２１時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約２２時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第３または第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約２３時間、約３０℃でインキュベートすることを含む。

【１８７１】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集ステップまたは休止ステップから（例えば、図４８Ａ～Ｄに示されるステップＣから）取得されたＴＩＬは、第２の拡張ステップ（例えば、図４８Ａ～Ｄに示されるステップＤから）に移行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集ステップまたは休止ステップから第２の拡張ステップへの移行は、遺伝子編集ステップまたは休止ステップから約０．５日、１日、２日、３日、または４日で起こる。

【１８７２】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集ステップまたは休止ステップから第２の拡張ステップへの移行は、本明細書に記載の閉鎖系中で起こる。

【１８７３】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集ステップまたは休止ステップの後及び第２の拡張の前に保管されず、ＴＩＬは、第２の拡張に直接進む（例えば、いくつかの実施形態では、図４８Ａ～Ｄに示されるステップＣからステップＤへの移行中に保管されない）。

【１８７４】

いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行、例えば、図４８によるステップＣは、閉鎖系バイオリアクター中で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００バイオリアクターである。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【１８７５】

Ｄ．ステップＤ：急速な第２の拡張

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ細胞集団は、採取及びプライミングによる第１の拡張後、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４

８Ｄ））に示されるステップＡ及びステップＢ、ならびにステップＣと称される移行後、数がさらに拡張される。このさらなる拡張は、本明細書では急速な第２の拡張または急速拡張と称され、これは、当該技術分野で概して急速拡張プロセス（急速拡張プロトコルまたはＲＥＰ、及び図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄのステップ Ｄに示されるプロセス）と称される拡張プロセスを含み得る。急速な第２の拡張は、概して、フィーダー細胞、サイトカイン源、及び抗ＣＤ３抗体を含む、いくつかの成分を含む培養培地を使用して、ガス透過性容器内で達成される。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張開始の１日、２日、３日、または４日後（すなわち、Ｇｅｎ３プロセス全体の８、９、１０、または１１日目）に、ＴＩＬは、より大容量の容器に移される。

【１８７６】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの急速な第２の拡張（ＲＥＰと称されることもある拡張、及び図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）のステップＤに示されるプロセスを含み得る）は、当業者に既知の任意のＴＩＬフラスコまたは容器を使用して行われ得る。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、または１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約１日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約１日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ増殖は、急速な第２の増殖の開始後、約３日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ増殖は、急速な第２の増殖の開始後、約３日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第５のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第５のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第６のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第６のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第７のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第７のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第８のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第８のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第９のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約３日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約５日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約６日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始

後、約７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約１０日間続行することができる。

【１８７７】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、本開示の方法（例えば、ＲＥＰと称される拡張、ならびに図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８ＤのステップＤに示されるプロセスを含む）を使用して、ガス透過性容器内で行われ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）の存在下での急速な第２の拡張において拡張される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びフィーダー細胞の存在下での急速な第２の拡張において拡張され、フィーダー細胞は、プライミングによる第１の拡張において存在するフィーダー細胞の濃度の２倍、２．４倍、２．５倍、３倍、３．５倍、または４倍である最終濃度まで追加される。例えば、ＴＩＬは、インターロイキン－２（ＩＬ－２）またはインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）の存在下で非特異的Ｔ細胞受容体刺激を使用して、急速に拡張され得る。非特異的Ｔ細胞受容体刺激は、例えば、抗ＣＤ３抗体、例えば約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３、マウスモノクローナル抗ＣＤ３抗体（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ，Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪもしくはＭｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡから市販）またはＵＨＣＴ－１（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡから市販）を含み得る。ＴＩＬは、がんのエピトープ（複数可）などの抗原性部分を含む、第２の拡張中に１つ以上の抗原を含むことによって、インビトロでＴＩＬのさらなる刺激を誘導するように拡張することができ、これは、ベクター、例えば、ヒト白血球抗原Ａ２（ＨＬＡ－Ａ２）結合ペプチド、例えば、０．３μＭ ＭＡＲＴ－１：２６－３５（２７Ｌ）またはｇｐｌ００：２０９－２１７（２１０Ｍ）から、任意選択で３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２またはＩＬ－１５などのＴ細胞成長因子の存在下で任意で発現され得る。他の好適な抗原には、例えば、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、チロシナーゼがん抗原、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＳＳＸ－２、及びＶＥＧＦＲ２、またはそれらの抗原性部分が含まれ得る。ＴＩＬは、ＨＬＡ－Ａ２を発現する抗原提示細胞にパルスされたがんの同じ抗原（複数可）で再刺激することによっても急速に拡張され得る。あるいは、ＴＩＬは、例えば、例として放射線照射された自己リンパ球または放射線照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２でさらに再刺激され得る。いくつかの実施形態では、再刺激は、第２の拡張の一部として起こる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、放射線照射された自己リンパ球の存在下で、または放射線照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２を用いて起こる。

【１８７８】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、約４０００ＩＵ／ｍＬ、約４５００ＩＵ／ｍＬ、約５０００ＩＵ／ｍＬ、約５５００ＩＵ／ｍＬ、約６０００ＩＵ／ｍＬ、約６５００ＩＵ／ｍＬ、約７０００ＩＵ／ｍＬ、約７５００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬ、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬ、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ、または８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【１８７９】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、及び約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇの間、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、１５ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬ～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３抗体は、ムロモナブである。

【１８８０】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、容器当たり７．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培地中に、容器当たり５００ｍＬの培養培地及び３０μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培地中に、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び７．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０μｇのＯＫＴ－３、及び７．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【１８８１】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５×10^8～７．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地及び３０μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び５×10^8～７．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地、ならびに６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０μｇのＯＫＴ－３、及び５×10^8～７．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【１８８２】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、細胞培養培地中に１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは４－１ＢＢアゴニストであり、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、ＥＵ－１０１、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリアント、バイオシミラー、及び組み合

わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、０．１μｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。

【１８８３】

いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、細胞培養培地は、ＩＬ－２を約３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、及びＯＫＴ－３を約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【１８８４】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１の組み合わせは、第２の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）による、及び本明細書に記載のステップＤプロセス中を含む、第２の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の組み合わせは、第２の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）による、及び本明細書に記載のステップＤプロセス中に含まれ得る。

【１８８５】

いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、抗原提示フィーダー細胞、及び任意でＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む補充された細胞培養培地において実施され得る。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、補充された細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、補充された細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、第２の細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ、抗原提示フィーダー細胞とも称される）を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞（すなわち、抗原提示細胞）を含む細胞培養培地中で起こる。

【１８８６】

いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１６０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１４０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、または約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－１５をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。

【１８８７】

いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約４ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、または約０．

５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２１をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。

【１８８８】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣ及び／または抗原提示細胞に対する比は、約１：１０、約１：１５、約１：２０、約１：２５、約１：３０、約１：３５、約１：４０、約１：４５、約１：５０、約１：７５、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００、約１：３２５、約１：３５０、約１：３７５、約１：４００、または約１：５００である。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣに対する比は、１：５０～１：３００である。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣに対する比は、１：１００～１：２００である。

【１８８９】

いくつかの実施形態では、ＲＥＰ及び／または急速な第２の拡張は、バルクＴＩＬを１００倍または２００倍過剰の不活性化フィーダー細胞と混合してフラスコ内で行われ、フィーダー細胞濃度は、１５０ｍＬ培地中のプライミングによる第１の拡張、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗ＣＤ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２におけるフィーダー細胞濃度の少なくとも１．１倍（１．１×）、１．２倍、１．３倍、１．４倍、１．５倍、１．６倍、１．７倍、１．８倍、１．８倍、２倍、２．１倍、２．２倍、２．３倍、２．４倍、２．５倍、２．６倍、２．７倍、２．８倍、２．９倍、３．０倍、３．１倍、３．２倍、３．３倍、３．４倍、３．５倍、３．６倍、３．７倍、３．８倍、３．９倍または４．０倍である。培地交換（一般に、使用済み培地の３分の２の吸引及び等量の新鮮な培地との交換による、３分の２培地交換）は、細胞が代替の成長チャンバに移されるまで行われる。代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、Ｇ－ＲＥＸフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【１８９０】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張（ＲＥＰプロセスと称されるプロセスを含み得る）は、実施例及び図で考察されるように、７～９日間である。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、７日間である。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、８日間である。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、９日間である。

【１８９１】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張、ならびに図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）のステップＤで参照される拡張を含み得る）は、１００ｃｍのガス透過性シリコン底部を有する５００ｍＬ容量のガス透過性フラスコ（Ｇ－ＲＥＸ １００、Ｗｉｌｓｏｎ Ｗｏｌｆ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｎｅｗ Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ，ＵＳＡから市販されている）内で行われ得、５×１０^{6}または１０×１０^{6}のＴＩＬが、

５％ヒトＡＢ血清、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）を補充した４００ｍＬの５０／５０培地中でＰＢＭＣとともに培養され得る。Ｇ－ＲＥＸ　１００フラスコは、５％CO_2中３７℃でインキュベートされ得る。５日目に、２５０ｍＬの上清が除去され、遠心分離ボトルに入れられ、１５００ｒｐｍ（４９１×ｇ）で１０分間遠心分離される。ＴＩＬペレットが、５％ヒトＡＢ血清、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬの新鮮な培地で再懸濁され、元のＧＲＥＸ－１００フラスコに戻し追加され得る。ＴＩＬがＧＲＥＸ－１００フラスコで連続して拡張される場合、１０日目または１１日目に、ＴＩＬは、ＧＲＥＸ－５００などのより大きいフラスコに移され得る。培養１４日目に、細胞が採取され得る。培養１５日目に、細胞が採取され得る。培養１６日目に、細胞が採取され得る。いくつかの実施形態では、培地交換は、細胞が代替の成長チャンバに移されるまで行われる。いくつかの実施形態では、培地の３分の２は、使用済み培地の吸引及び等体積の新鮮な培地との交換によって交換される。いくつかの実施形態では、代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、ＧＲＥＸフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【１８９２】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される拡張プロセスで使用される培地は、無血清培地または合成培地である。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、血清含有培地のロット間の変動に部分的に起因する実験変動を防止及び／または減少させるために使用される。

【１８９３】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　Ｂａｓａｌ　Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ　Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ　ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ　Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ　１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。

【１８９４】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ　Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　Ｓｅｒｕｍ　Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ、ＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代用物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代用物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代用物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の抗生物質、及び１つ以上の微量元素のうちの１つ以上が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／または２－メルカプトエタノールをさらに含む。

【１８９５】

いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｉ

ｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔは、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＳＴ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ １６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。

【１８９６】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地中の総血清代替物濃度（ｖｏｌ％）は、総無血清または合成培地の約１体積％、２体積％、３体積％、４体積％、５体積％、６体積％、７体積％、８体積％、９体積％、１０体積％、１１体積％、１２体積％、１３体積％、１４体積％、１５体積％、１６体積％、１７体積％、１８体積％、１９体積％、または２０体積％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約３％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約５％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約１０％である。

【１８９７】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。

【１８９８】

いくつかの実施形態では、合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（Ｔｈ

ｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。

【１８９９】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約０．１ｍＭ～約１０ｍＭ、０．５ｍＭ～約９ｍＭ、１ｍＭ～約８ｍＭ、２ｍＭ～約７ｍＭ、３ｍＭ～約６ｍＭ、または４ｍＭ～約５ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約２ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。

【１９００】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５ｍＭ～約１５０ｍＭ、１０ｍＭ～約１４０ｍＭ、１５ｍＭ～約１３０ｍＭ、２０ｍＭ～約１２０ｍＭ、２５ｍＭ～約１１０ｍＭ、３０ｍＭ～約１００ｍＭ、３５ｍＭ～約９５ｍＭ、４０ｍＭ～約９０ｍＭ、４５ｍＭ～約８５ｍＭ、５０ｍＭ～約８０ｍＭ、５５ｍＭ～約７５ｍＭ、６０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約６５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。い

くつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。

【１９０１】

いくつかの実施形態では、国際特許出願公開第ＷＯ／１９９８／０３０６７９号及び米国特許出願公開第２００２／００７６７４７　Ａ１号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載される定義された媒体は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の微量元素、及び１つ以上の抗生物質からなる群から選択される１つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベーター－メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、及び１つ以上の微量元素からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ　１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

【１９０２】

いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌの範囲であり、Ｌ－ヒスチジンの濃度は、約５～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－イソロイシンの濃度は、約５～３００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－メチオニンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－フェニルアラニンの濃度は、約５～４００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－プロリンの濃度は、約１～１０００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－ヒドロキシプロリンの濃度は、約１～４５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－セリンの濃度は、約１～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－スレオニンの濃度は、約１０～５００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－トリプトファンの濃度は、約２～１１０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－チロシンの濃度は、約３～１７５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－バリンの濃度は、約５～５００ｍｇ／Ｌであり、チアミンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、還元型グルタチオンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩の濃度は、約１～２００ｍｇ／Ｌであり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約１～５０ｍｇ／Ｌであり、インスリンの濃度は、約１～１００ｍｇ／Ｌであり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約０．０００００１～０．０００１ｍｇ／Ｌであり、アルブミン（例えば、ＡｌｂｕＭＡＸ（登録商標）Ｉ）の濃度は、約５０００～５０，０００ｍｇ／Ｌである。

【１９０３】

いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地中の濃度範囲」という見出しの下の列にリストされた濃度範囲で存在する。他の実施形態では

、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされた最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかでは、無血清サプリメントは、表４の「サプリメント中の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。

【１９０４】

いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約２６０～３５０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約２８０～３１０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、合成培地には、最大約３．７ｇ／Ｌ、または約２．２ｇ／Ｌの重炭酸ナトリウムが補充されている。合成培地には、Ｌ－グルタミン（最終濃度約２ｍＭ）、１つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ、最終濃度約１００μＭ）、２－メルカプトエタノール（最終濃度約１００μＭ）がさらに補充されていてもよい。

【１９０５】

いくつかの実施形態では、Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｔｒａｎｓｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，４（１）２０１５（ｄｏｉ：１０．１０３８／ｃｔｉ．２０１４．３１）に記載の定義された培地が、本発明において有用である。簡潔には、ＲＰＭＩまたはＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）を基礎細胞培地として使用し、０、２％、５％、または１０％のいずれかのＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔを補充した。

【１９０６】

いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ベーター－メルカプトエタノール（ＢＭＥまたはβＭＥ、２－メルカプトエタノールとしても知られる、ＣＡＳ６０－２４－２）を欠いている。

【１９０７】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）が行われ、優れた腫瘍反応性のＴＩＬが選択されるステップをさらに含む。当該技術分野で知られている任意の選択方法が使用され得る。例えば、米国特許出願公開第２０１６／００１００５８Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている方法が、優れた腫瘍反応性のためのＴＩＬの選択に使用され得る。

【１９０８】

任意選択で、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で既知の標準のアッセイを使用して、急速な第２の拡張（ＲＥＰ拡張と称される拡張を含む）後に行われ得る。例えば、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンブルー排除アッセイが、バルクＴＩＬの試料上で行われ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ試料は、Ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ Ｋ２自動セルカウンター（Ｎｅｘｃｅｌｏｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｌａｗｒｅｎｃｅ，ＭＡ）を使用して計数され、生存率が決定され得る。いくつかの実施形態では、生存率は、標準のＣｅｌｌｏｍｅｔｅｒ Ｋ２ Ｉｍａｇｅ Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ Ａｕｔｏｍａｔｉｃ Ｃｅｌｌ Ｃｏｕｎｔｅｒプロトコルに従って決定される。

【１９０９】

Ｔリンパ球及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、及びＣ（一定）は、免疫グロブリン及びＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第２の拡張において取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グ

ロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加する。

【１９１０】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地とも称される）は、以下でさらに詳細に論じられるように、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、ならびに抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地とも称される）は、以下でさらに詳細に論じられるように、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｕｇ／フラスコのＯＫＴ－３、ならびに７．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地とも称される）は、以下でさらに詳細に論じられるように、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、ならびに抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地とも称される）は、以下でさらに詳細に論じられるように、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｕｇ／フラスコのＯＫＴ－３、ならびに５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。

【１９１１】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）によるステップＤは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが容器として用いられる。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００またはＧ－ＲＥＸ－５００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－５００である。

【１９１２】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分割されて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～７日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養でのＴＩＬを、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００－ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来のＴＩＬを、第２の容器内でのより大規模な培養で約４～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。

【１９１３】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～７日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴＩＬの一部が、第２の小規模培養で約４～７日間培養される。

【１９１４】

いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、ＴＩＬの複数の約２～５亜集

団に配分される。
【１９１５】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～７日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴＩＬの一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。
【１９１６】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約５日間培養することによって急速なまたは第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴＩＬの一部が、より大規模な培養で約６日間培養される。
【１９１７】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個のＴＩＬ、少なくとも10^9個のＴＩＬ、または少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。例示的な一実施形態では、各第２の容器は、少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。
【１９１８】
いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２～５亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２、３、４、または５亜集団に配分される。
【１９１９】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張の完了後、複数の亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の完了後、１つ以上のＴＩＬの亜集団を一緒にプールして、治療有効量のＴＩＬを産生する。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、各ＴＩＬ亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。
【１９２０】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、複数のステップに分割される前に、約３～７日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張の分裂は、急速または第２の拡張の開始後約３日目、４日目、５日目、６日目、または７日目に起こる。
【１９２１】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張の分裂は、第１の拡張（すなわち、ＲＥＰ前拡張）の開始後の約７日目、８日目、９日目、１０日目、１１日目、１２日目、１３日目、１４日目、１５日目、または１６日目、１７日目、または１８日目に起こる。例示的な一実施形態では、急速または第２の拡張の分裂は、第１の拡張の開始後約１６日目に起こる。
【１９２２】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、分裂後約７～１１日間、さらに行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、分裂後約５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日間、さらに行われる。
【１９２３】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地と同じ成分を含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地とは異なる成分を含む。

【１９２４】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む。

【１９２５】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な細胞培養培地で置き換えることによって生成される。

【１９２６】

いくつかの実施形態では、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。

【１９２７】

１．フィーダー細胞及び抗原提示細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の急速な第２の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）のステップＤに記載のもののような拡張、及びＲＥＰと称されるものを含む）は、ＲＥＰ　ＴＩＬ拡張中及び／または急速な第２の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な献血者由来の標準の全血単位から得られる末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。

【１９２８】

一般に、同種異系ＰＢＭＣは、放射線照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、実施例に記載されるように、ＲＥＰ手順で使用され、これは、放射線照射された同種異系ＰＢＭＣの複製無能力を評価するための例示的なプロトコルを提供する。

【１９２９】

いくつかの実施形態では、７日目または１４日目の生細胞の総数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数よりも少ない場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴ

ＩＬ拡張手順での使用が認められる。

【１９３０】

いくつかの実施形態では、７日目及び１４日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【１９３１】

いくつかの実施形態では、７日目及び１４日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び１０００～６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～５０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～４０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２５００～３５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【１９３２】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、約１：１０、約１：２５、約１：５０、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００、約１：３２５、約１：３５０、約１：３７５、約１：４００、または約１：５００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：５０～１：３００である。いくつかの実施形態では、第２の増殖におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：１００～１：２００である。

【１９３３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約５×１０^{8}個のフィーダー細胞：約１００×１０^{6}個のＴＩＬの比を必要とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の増殖手順は、約７．５×１０^{8}フィーダー細胞：約１００×１０^{6}ＴＩＬの比率を必要とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約５×１０^{8}フィーダー細胞：約５０×１０^{6}ＴＩＬの比を必要とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の増殖手順は、約７．５×１０^{8}フィーダー細胞：約５０×１０^{6}ＴＩＬの比率を必要とする。さらに別の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約５×１０^{8}フィーダー細胞：約２５×１０^{6}ＴＩＬを必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第２の増殖手順は、約７．５×１０^{8}個のフィーダー細胞：約２５×１０^{6}個のＴＩＬを必要とする。さらに別の実施形態では、急速な第２の拡張は、急速な第２の拡張の２倍の数のフィーダー細胞を必要とする。さらに別の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張が約２．５×１０^{8}フィーダー細胞を必要とする場合、急速な第２の拡張は、約５×１０^{8}フィーダー細胞を

必要とする。さらに別の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張が約２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞を必要とする場合、急速な第２の拡張は、約７．５×１０^{8}個のフィーダー細胞を必要とする。さらに別の実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張の２倍（２．０×）、２．５倍、３．０倍、３．５倍または４．０倍の数のフィーダー細胞を必要とする。

【１９３４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の急速な第２の拡張手順は、急速な第２の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者由来の標準の全血単位から取得される末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、人工抗原提示（ａＡＰＣ）細胞がＰＢＭＣの代わりに使用される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、プライミングによる第１の拡張に追加されたＰＢＭＣの２倍の濃度で、急速な第２の拡張に追加される。

【１９３５】

概して、同種異系ＰＢＭＣは、放射線照射または熱処理のいずれかを介して不活性化され、図及び実施例に記載の例示的な手順を含む、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順で使用される。

【１９３６】

いくつかの実施形態では、人工抗原提示細胞は、ＰＢＭＣの代替物として、またはＰＢＭＣと組み合わせて、急速な第２の拡張において使用される。

【１９３７】

２．サイトカイン

本明細書に記載の急速な第２の拡張方法は、概して、当該技術分野で既知の高用量のサイトカイン、特にＩＬ－２を含む培養培地を使用する。

【１９３８】

代替的に、ＷＯ２０１５／１８９３５６及びＷＯ２０１５／１８９３５７（参照によりそれらの全体が本明細書に明示的に組み込まれる）に一般に概説されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせで、ＴＩＬの急速な第２の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することもさらに可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２及びＩＬ－１５、ＩＬ－２及びＩＬ－２１、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１が含まれ、後者は多くの実施形態で特に有用である。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにＴ細胞の生成に特に有利に働く。

【１９３９】

いくつかの実施形態では、ステップＤ（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄから）はまた、本明細書の他の箇所に記載のＯＫＴ－３抗体またはムロモナブの培養培地への添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、４－１ＢＢアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＤ（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄから）はまた、本明細書の他の箇所に記載のＯＸ－４０アゴニストの培養培地への添加を含み得る。加えて、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（ＰＰＡＲ）－ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーターＩ－アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第２０１９／０３０７７９６　Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップＤ（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄから）中の培養培地で使用され得る。

【１９４０】
Ｅ．ステップＥ：ＴＩＬを採取する
急速な第２の拡張ステップ後、細胞が採取され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に提供される、１、２、３、４個またはそれ以上の拡張ステップ後に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に提供される、２つの拡張ステップ後に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に提供される、２つの拡張ステップ、１つのプライミングによる第１の拡張及び１つの急速な第２の拡張後に採取される。
【１９４１】
ＴＩＬは、任意の適切な滅菌様式で、例えば、遠心分離によって採取され得る。ＴＩＬを採取するための方法は、当該技術分野で周知であり、任意のかかる既知の方法が本プロセスとともに用いられ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、自動化システムを使用して採取される。
【１９４２】
細胞採取機及び／または細胞処理システムは、例えば、Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ Ｋａｂｉ、Ｔｏｍｔｅｃ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ、及びＩｎｏｔｅｃｈ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃを含む、様々な供給源から市販されている。任意の細胞ベースの採取機が本方法とともに用いられ得る。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理システムは、膜ベースの細胞採取機である。いくつかの実施形態では、細胞採取は、ＬＯＶＯシステム（Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ Ｋａｂｉによって製造されたもの）などの細胞処理システムによるものである。「ＬＯＶＯ細胞処理システム」という用語は、細胞を含む溶液を、滅菌及び／または閉鎖系環境で回転膜または回転フィルターなどの膜またはフィルターをとおしてポンプ輸送し、連続フローを可能にし、細胞を処理して、ペレット化せずに上清または細胞培養培地を除去する、任意のベンダーによって製造された任意の機器または装置も指す。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理システムは、閉鎖した滅菌系内で、細胞分離、洗浄、流体交換、濃縮、及び／または他の細胞処理ステップを行うことができる。
【１９４３】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）によるステップＤは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが容器として用いられる。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００またはＧ－ＲＥＸ－５００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－５００である。
【１９４４】
いくつかの実施形態では、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）によるステップＥは、本明細書に記載のプロセスに従って行われる。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、閉鎖系の無菌性及び閉鎖性を維持するために、滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、本明細

書に記載されるような閉鎖系が用いられる。
【１９４５】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の方法に従って採取される。いくつかの実施形態では、１４～１６日目のＴＩＬが本明細書に記載の方法を使用して採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の方法を使用して１４日目に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の方法を使用して１５日目に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の方法を使用して１６日目に採取される。
【１９４６】
Ｆ．ステップＦ：最終製剤及び輸液容器への移行
図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に例示的な順序で提供され、かつ上及び本明細書で詳細に概説されるステップＡ～Ｅが完了した後、細胞は、注入バッグまたは無菌バイアルなどの患者への投与に使用するために容器に移される。いくつかの実施形態では、治療的に十分な数のＴＩＬが上記の拡張方法を使用して得られると、それらは、患者への投与に使用するために容器に移される。
【１９４７】
いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して拡張されたＴＩＬは、薬学的組成物として患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌緩衝液中のＴＩＬ懸濁液である。本明細書に開示されるように拡張されたＴＩＬは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、単回の動脈内または静脈内注入として投与され、これは、好ましくは、およそ３０～６０分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内投与が含まれる。
【１９４８】
ＶＩＩ．さらなるＧｅｎ２、Ｇｅｎ３、及び他のＴＩＬ製造プロセスの実施形態
Ａ．ＰＢＭＣフィーダー細胞比
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用される培養培地（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）を参照されたい）は、抗ＣＤ３抗体、例えば、ＯＫＴ－３を含む。ＩＬ－２と組み合わせた抗ＣＤ３抗体は、ＴＩＬ集団におけるＴ細胞活性化及び細胞分裂を誘導する。この効果は、全長抗体、ならびにＦａｂ及びＦ（ａｂ’）２断片で見ることができ、前者が一般に好まれ、例えば、Ｔｓｏｕｋａｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９８５，１３５，１７１９（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。
【１９４９】
いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣフィーダー層の数は、以下のように計算される：
Ａ．Ｔ細胞の体積（１０μｍ直径）：Ｖ＝（４／３）πｒ^{3}＝５２３．６μｍ^{3}
Ｂ．４０μｍ（４細胞）の高さを有するＧ－ＲＥＸ１００（Ｍ）のカラム：Ｖ＝（４／３）πｒ^{3}＝４×１０^{12}μｍ^{3}
Ｃ．カラムＢを充填するために必要な細胞数：４×１０^{12}μｍ^{3}／５２３．６μｍ^{3}＝７．６×１０^{8}μｍ^{3}＊０．６４＝４．８６×１０^{8}
Ｄ．四次元空間で最適に活性化され得る細胞の数：４．８６×１０^{8}／２４＝２０．２５×１０^{6}
Ｅ．Ｇ－ＲＥＸ５００に外挿されるフィーダー及びＴＩＬの数：ＴＩＬ：１００×１０^{6}及びフィーダー：２．５×１０^{9}
この計算では、１００ｃｍ^{2}の底部を有するシリンジ中でのＴＩＬの活性化のために二十面体形状を提供するのに必要な単核細胞の数の近似値が使用される。この計算は、Ｊｉｎ，ｅｔ．ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１２，３５，２８３－２９２に記載のように、ＮＣＩ実験データを密接に反映するＴ細胞の閾値活性化について、約５×１０^{8}の実験結果を導き出す。（Ｃ）では、乗数（０．６４）は、Ｊａｅｇｅｒ　ａｎｄ　Ｎａ

ｇｅｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ，１９９２，２５５，１５２３－３によって計算された等価球のランダム充填密度である。（Ｄ）において、除数２４は、Ｍｕｓｉｎ，Ｒｕｓｓ．Ｍａｔｈ．Ｓｕｒｖ．，２００３，５８，７９４－７９５に記載の四次元空間内の同様の物体と接触する可能性のある等価球の数または「ニュートン数」である。

【１９５０】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞の数は、急速な第２の拡張中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞の数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、この方法は、急速な第２の拡張の細胞培養培地と比較しておよそ５０％少ない抗原提示細胞を含む細胞培養培地中でプライミングによる第１の拡張を行うことを含む。

【１９５１】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）の数は、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数よりも多い。

【１９５２】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２０：１の範囲から選択される。

【１９５３】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択される。

【１９５４】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約９：１の範囲から選択される。

【１９５５】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約８：１の範囲から選択される。

【１９５６】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約７：１の範囲から選択される。

【１９５７】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約６：１の範囲から選択される。

【１９５８】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択される。

【１９５９】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択される。

【１９６０】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比）は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択される。

【１９６１】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択される。
【１９６２】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択される。
【１９６３】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択される。
【１９６４】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択される。
【１９６５】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択される。
【１９６６】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択される。
【１９６７】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択される。
【１９６８】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択される。
【１９６９】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択される。
【１９７０】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２：１の範囲から選択される。
【１９７１】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択される。
【１９７２】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択される。
【１９７３】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミ

ングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択される。

【１９７４】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択される。

【１９７５】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択される。

【１９７６】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択される。

【１９７７】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択される。

【１９７８】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択される。

【１９７９】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択される。

【１９８０】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択される。

【１９８１】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択される。

【１９８２】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約約２：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択される。

【１９８３】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択される。

【１９８４】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１である。

【１９８５】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：

１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．１：１、２．２：１、２．３：１、２．４：１、２．５：１、２．６：１、２．７：１、２．８：１、２．９：１、３：１、３．１：１、３．２：１、３．３：１、３．４：１、３．５：１、３．６：１、３．７：１、３．８：１、３．９：１、４：１、４．１：１、４．２：１、４．３：１、４．４：１、４．５：１、４．６：１、４．７：１、４．８：１、４．９：１、または５：１である。

【１９８６】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約1×10^8、1.1×10^8、1.2×10^8、1.3×10^8、1.4×10^8、1.5×10^8、1.6×10^8、1.7×10^8、1.8×10^8、1.9×10^8、2×10^8、2.1×10^8、2.2×10^8、2.3×10^8、2.4×10^8、2.5×10^8、2.6×10^8、2.7×10^8、2.8×10^8、2.9×10^8、3×10^8、3.1×10^8、3.2×10^8、3.3×10^8、3.4×10^8、または3.5×10^8個のＡＰＣであり、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約3.5×10^8、3.6×10^8、3.7×10^8、3.8×10^8、3.9×10^8、4×10^8、4.1×10^8、4.2×10^8、4.3×10^8、4.4×10^8、4.5×10^8、4.6×10^8、4.7×10^8、4.8×10^8、4.9×10^8、5×10^8、5.1×10^8、5.2×10^8、5.3×10^8、5.4×10^8、5.5×10^8、5.6×10^8、5.7×10^8、5.8×10^8、5.9×10^8、6×10^8、6.1×10^8、6.2×10^8、6.3×10^8、6.4×10^8、6.5×10^8、6.6×10^8、6.7×10^8、6.8×10^8、6.9×10^8、7×10^8、7.1×10^8、7.2×10^8、7.3×10^8、7.4×10^8、7.5×10^8、7.6×10^8、7.7×10^8、7.8×10^8、7.9×10^8、8×10^8、8.1×10^8、8.2×10^8、8.3×10^8、8.4×10^8、8.5×10^8、8.6×10^8、8.7×10^8、8.8×10^8、8.9×10^8、9×10^8、9.1×10^8、9.2×10^8、9.3×10^8、9.4×10^8、9.5×10^8、9.6×10^8、9.7×10^8、9.8×10^8、9.9×10^8、または1×10^9個のＡＰＣである。

【１９８７】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約1.5×10^8個のＡＰＣ～正確にまたは約3×10^8個のＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約4×10^8個のＡＰＣ～正確にまたは約7.5×10^8個のＡＰＣの範囲から選択される。

【１９８８】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約2×10^8個のＡＰＣ～正確にまたは約2.5×10^8個のＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約4.5×10^8個のＡＰＣ～正確にまたは約5.5×10^8個のＡＰＣの範囲から選択される。

【１９８９】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約2.5×10^8個のＡＰＣであり、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約5×10^8個のＡＰＣである。

【１９９０】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に追加されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、プライミングによる第１の拡張の７日目（例えば、方法の７日目）に追加されるＰＢＭＣの数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、方法は、プライミングによる第１の拡張の０日目に抗原提示細胞を第１のＴＩＬ集団に追加することと、７日目に抗原提示細胞を第２のＴＩＬ集団に追加することとを含み、０日目に追加される抗原提示細胞の数は、プライミングによる第１の拡張の７日目（例えば、方法

の７日目）に追加される抗原提示細胞の数のおよそ５０％である。
【１９９１】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数よりも多い。
【１９９２】
他の実施形態では、プライミングによる第１の増殖において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約４．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【１９９３】
他の実施形態では、プライミングによる第１の増殖において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【１９９４】
他の実施形態では、プライミングによる第１の増殖において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【１９９５】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。
【１９９６】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．０×１０^{6}、１．１×１０^{6}、１．２×１０^{6}、１．３×１０^{6}、１．４×１０^{6}、１．５×１０^{6}、１．６×１０^{6}、１．７×１０^{6}、１．８×１０^{6}、１．９×１０^{6}、２×１０^{6}、２．１×１０^{6}、２．２×１０^{6}、２．３×１０^{6}、２．４×１０^{6}、２．５×１０^{6}、２．６×１０^{6}、２．７×１０^{6}、２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}、３×１０^{6}、３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}、４×１０^{6}、４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}、または４．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。
【１９９７】
他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約７．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【１９９８】
他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約３．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約６．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【１９９９】
他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約４．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約５．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【２０００】
他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約４．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【２００１】
他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．６×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．７×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}、３×１０^{6}、３．１×

１０^{6}、３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}、４×１０^{6}、４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}、４．５×１０^{6}、４．６×１０^{6}、４．７×１０^{6}、４．８×１０^{6}、４．９×１０^{6}、５×１０^{6}、５．１×１０^{6}、５．２×１０^{6}、５．３×１０^{6}、５．４×１０^{6}、５．５×１０^{6}、５．６×１０^{6}、５．７×１０^{6}、５．８×１０^{6}、５．９×１０^{6}、６×１０^{6}、６．１×１０^{6}、６．２×１０^{6}、６．３×１０^{6}、６．４×１０^{6}、６．５×１０^{6}、６．６×１０^{6}、６．７×１０^{6}、６．８×１０^{6}、６．９×１０^{6}、７×１０^{6}、７．１×１０^{6}、７．２×１０^{6}、７．３×１０^{6}、７．４×１０^{6}、または７．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【２００２】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．０×１０^{6}、１．１×１０^{6}、１．２×１０^{6}、１．３×１０^{6}、１．４×１０^{6}、１．５×１０^{6}、１．６×１０^{6}、１．７×１０^{6}、１．８×１０^{6}、１．９×１０^{6}、２×１０^{6}、２．１×１０^{6}、２．２×１０^{6}、２．３×１０^{6}、２．４×１０^{6}、２．５×１０^{6}、２．６×１０^{6}、２．７×１０^{6}、２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}、３×１０^{6}、３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}、４×１０^{6}、４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}、または４．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．６×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．７×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}、３×１０^{6}、３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}、４×１０^{6}、４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}、４．５×１０^{6}、４．６×１０^{6}、４．７×１０^{6}、４．８×１０^{6}、４．９×１０^{6}、５×１０^{6}、５．１×１０^{6}、５．２×１０^{6}、５．３×１０^{6}、５．４×１０^{6}、５．５×１０^{6}、５．６×１０^{6}、５．７×１０^{6}、５．８×１０^{6}、５．９×１０^{6}、６×１０^{6}、６．１×１０^{6}、６．２×１０^{6}、６．３×１０^{6}、６．４×１０^{6}、６．５×１０^{6}、６．６×１０^{6}、６．７×１０^{6}、６．８×１０^{6}、６．９×１０^{6}、７×１０^{6}、７．１×１０^{6}、７．２×１０^{6}、７．３×１０^{6}、７．４×１０^{6}、または７．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【２００３】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約４．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約７．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【２００４】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約３．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約６×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【２００５】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３×１０^{6}個のＡＰ

Ｃ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約４×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^2～正確にまたは約５．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【２００６】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約４×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。

【２００７】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数に対する比率は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２０：１の範囲から選択される。

【２００８】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数に対する比率は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択される。

【２００９】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数に対する比率は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約９：１の範囲から選択される。

【２０１０】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約８：１の範囲から選択される。

【２０１１】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約７：１の範囲から選択される。

【２０１２】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約６：１の範囲から選択される。

【２０１３】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択される。

【２０１４】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択される。

【２０１５】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択される。

【２０１６】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択される。

【２０１７】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択される。

【２０１８】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択される。

【２０１９】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択される。

【２０２０】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択される。

【２０２１】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択される。

【２０２２】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択される。

【２０２３】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択される。

【２０２４】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択される。

【２０２５】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２：１の範囲から選択される。

【２０２６】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択される。

【２０２７】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択される。

【２０２８】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択される。

【２０２９】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択される。

【２０３０】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択される。

【２０３１】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択される。

【２０３２】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択される。

【２０３３】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択される。

【２０３４】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択される。

【２０３５】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択される。

【２０３６】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択される。

【２０３７】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約約２：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択される。

【２０３８】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択される。

【２０３９】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１である。

【２０４０】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．１：１、２．２：１、２．３：１、２．４：１、２．５：１、２．６：１、２．７：１、２．８：１、２．９：１、３：１、３．１：１、３．２：１、３．３：１、３．４：１、３．５：１、３．６：１、３．７：１、３．８：１、３．９：１、４：１、４．１：１、４．２：１、４．３：１、４．４：１、４．５：１、４．６：１、４．７：１、４．８：１、４．９：１、または５：１である。

【２０４１】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約1×10^{8}、1.1×10^{8}、1.2×10^{8}、1.3×10^{8}、1.4×10^{8}、1.5×10^{8}、1.6×10^{8}、1.7×10^{8}、1.8×10^{8}、1.9×10^{8}、2×10^{8}、2.1×10^{8}、2.2×10^{8}、2.3×10^{8}、2.4×10^{8}、2.5×10^{8}、2.6×10^{8}、2.7×10^{8}、2.8×10^{8}、2.9×10^{8}、3×10^{8}、3.1×10^{8}、3.2×10^{8}、3.3×10^{8}、3.4×10^{8}、または3.5×10^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）であり、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約3.5×10^{8}、3.6×10^{8}、3.7×10^{8}、3.8×10^{8}、3.9×10^{8}、4×10^{8}、4.1×10^{8}、4.2×10^{8}、4.3×10^{8}、4.4×10^{8}、4.5×10^{8}、4.6×10^{8}、4.7×10^{8}、4.8×10^{8}、4.9×10^{8}、5×10^{8}、5.1×10^{8}、5.2×10^{8}、5.3×10^{8}、5.4×10^{8}、5.5×10^{8}、5.6×10^{8}、5.7×10^{8}、5.8×10^{8}、5.9×10^{8}、6×10^{8}、6.1×10^{8}、6.2×10^{8}、6.3×10^{8}、6.4×10^{8}、6.5×10^{8}、6.6×10^{8}、6.7×10^{8}、6.8×10^{8}、6.9×10^{8}、7×10^{8}、7.1×10^{8}、7.2×10^{8}、$7.3\times$

１０^{8}、７．４×１０^{8}、７．５×１０^{8}、７．６×１０^{8}、７．７×１０^{8}、７．８×１０^{8}、７．９×１０^{8}、８×１０^{8}、８．１×１０^{8}、８．２×１０^{8}、８．３×１０^{8}、８．４×１０^{8}、８．５×１０^{8}、８．６×１０^{8}、８．７×１０^{8}、８．８×１０^{8}、８．９×１０^{8}、９×１０^{8}、９．１×１０^{8}、９．２×１０^{8}、９．３×１０^{8}、９．４×１０^{8}、９．５×１０^{8}、９．６×１０^{8}、９．７×１０^{8}、９．８×１０^{8}、９．９×１０^{8}、または１ｘ１０^{9}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）である。

【２０４２】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約１×１０^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～正確にまたは約３．５×１０^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択され、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約３．５×１０^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～正確にまたは約１×１０^{9}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択される。

【２０４３】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約１．５×１０^{8}個のＡＰＣ～約３×１０^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択され、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、約４×１０^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～約７．５×１０^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択される。

【２０４４】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約２×１０^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～正確にまたは約２．５×１０^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択され、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約４．５×１０^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～正確にまたは約５．５×１０^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択される。

【２０４５】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約２．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）であり、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）である。

【２０４６】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に追加されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数は、急速な第２の拡張の７日目に追加されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、方法は、プライミングによる第１の拡張の０日目に抗原提示細胞層を第１のＴＩＬ集団に追加することと、７日目に抗原提示細胞を第２のＴＩＬ集団に追加することとを含み、０日目に追加される抗原提示細胞層の数は、７日目に追加される抗原提示細胞層の数のおよそ５０％である。

【２０４７】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数は、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数よりも多い。

【２０４８】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な

第２の拡張の７日目は、正確にまたは約４細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【２０４９】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【２０５０】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１．５細胞層～正確にまたは約２．５細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【２０５１】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【２０５２】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６、３．７、３．８、３．９、４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【２０５３】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１細胞層～正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３細胞層～正確にまたは約１０細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【２０５４】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約２細胞層～正確にまたは約３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【２０５５】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【２０５６】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１、２、または３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３、４、５、６、７、８、９、ま

たは１０細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【２０５７】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：１０の範囲から選択される。

【２０５８】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第１の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：８の範囲から選択される。

【２０５９】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第１の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：７の範囲から選択される。

【２０６０】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第１の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：６の範囲から選択される。

【２０６１】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第１の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：５の範囲から選択される。

【２０６２】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第１の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：４の範囲から選択される。

【２０６３】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第１の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：３の範囲から選択される。
【２０６４】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第１の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：２の範囲から選択される。
【２０６５】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第１の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．２～正確にまたは約１：８の範囲から選択される。
【２０６６】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第１の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．３～正確にまたは約１：７の範囲から選択される。
【２０６７】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第１の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．４～正確にまたは約１：６の範囲から選択される。
【２０６８】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第１の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．５～正確にまたは約１：５の範囲から選択される。
【２０６９】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢ

ＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第１の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．６～正確にまたは約１：４の範囲から選択される。

【２０７０】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第１の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．７～正確にまたは約１：３．５の範囲から選択される。

【２０７１】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第１の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．８～正確にまたは約１：３の範囲から選択される。

【２０７２】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第１の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．９～正確にまたは約１：２．５の範囲から選択される。

【２０７３】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：２．

【２０７４】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１、１：１．２、１：１．３、１：１．４、１：１．５、１：１．６、１：１．７、１：１．８、１：１．９、１：２、１：２．１、１：２．２、１：２．３、１：２．４、１：２．５、１：２．６、１：２．７、１：２．８、１：２．９、１：３、１：３．１、１：３．２、１：３．３、１：３．４、１：３．５、１：３．６、１：３．７、１：３．８、１：３．９、１：４、１：４．１、１：４．２、１：４．３、１：４．４、１：４．５、１：４．６、１：４．７、１：４．８、１：４．９、１：５、１：５．１、１：５．２、

１：５．３、１：５．４、１：５．５、１：５．６、１：５．７、１：５．８、１：５．９、１：６、１：６．１、１：６．２、１：６．３、１：６．４、１：６．５、１：６．６、１：６．７、１：６．８、１：６．９、１：７、１：７．１、１：７．２、１：７．３、１：７．４、１：７．５、１：７．６、１：７．７、１：７．８、１：７．９、１：８、１：８．１、１：８．２、１：８．３、１：８．４、１：８．５、１：８．６、１：８．７、１：８．８、１：８．９、１：９、１：９．１、１：９．２、１：９．３、１：９．４、１：９．５、１：９．６、１：９．７、１：９．８、１：９．９、または１：１０から選択される。

【２０７５】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張におけるＡＰＣの数は、約１．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約４．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択され、急速な第２の拡張におけるＡＰＣの数は、約２．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約７．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される。

【２０７６】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張におけるＡＰＣの数は、約１．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約３．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択され、急速な第２の拡張におけるＡＰＣの数は、約３．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約６．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される。

【２０７７】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張におけるＡＰＣの数は、約２．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約３．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択され、急速な第２の拡張におけるＡＰＣの数は、約４．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約５．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される。

【２０７８】

Ｂ．任意選択の細胞培地成分

１．抗ＣＤ３抗体

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用される培養培地（ＲＥＰと称されるものを含む、例えば、図１及び８（特に、例えば図８Ｂ）を参照）は、抗ＣＤ３抗体を含む。ＩＬ－２と組み合わせた抗ＣＤ３抗体は、ＴＩＬ集団におけるＴ細胞活性化及び細胞分裂を誘導する。この効果は、全長抗体、ならびにＦａｂ及びＦ（ａｂ’）２断片で見ることができ、前者が一般に好まれ、例えば、Ｔｓｏｕｋａｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９８５，１３５，１７１９（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【２０７９】

当業者によって理解されるように、マウス、ヒト、霊長類、ラット、及びイヌ抗体を含むが、これらに限定されない、様々な哺乳動物由来の抗ヒトＣＤ３ポリクローナル及びモノクローナル抗体を含む、本発明での使用が見出されるいくつかの好適な抗ヒトＣＤ３抗体が存在する。特定の実施形態では、抗ＣＤ３抗体ムロモナブであるＯＫＴ３が使用される（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ，Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪまたはＭｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡから市販されている）。表１を参照されたい。

【２０８０】

当業者によって理解されるように、マウス、ヒト、霊長類、ラット、及びイヌ抗体を含むが、これらに限定されない、様々な哺乳動物由来の抗ヒトＣＤ３ポリクローナル及びモノクローナル抗体を含む、本発明での使用が見出されるいくつかの好適な抗ヒトＣＤ３抗体が存在する。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体ムロモナブであるＯＫＴ３が使用される（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ，Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪまたはＭｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡから市販されている）。

【２０８１】

２．４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）アゴニスト

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張及び／または急速な第２の拡

張の細胞培養培地は、ＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）アゴニストである。４－１ＢＢアゴニストは、当該技術分野で知られている任意の４－１ＢＢ結合分子であり得る。４－１ＢＢ結合分子は、ヒトまたは哺乳動物４－１ＢＢに結合することができるモノクローナル抗体または融合タンパク質であり得る。４－１ＢＢアゴニストまたは４－１ＢＢ結合分子は、任意のアイソタイプ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、及びＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、及びＩｇＡ２）、またはサブクラスの免疫グロブリン分子の免疫グロブリン重鎖を含み得る。４－１ＢＢアゴニストまたは４－１ＢＢ結合分子は、重鎖及び軽鎖の両方を有し得る。本明細書で使用される場合、結合分子という用語は、抗体（全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、及び抗体断片、例えば、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）断片、Ｆａｂ発現ライブラリーによって産生された断片、上記のうちのいずれかのエピトープ結合断片、ならびに４－１ＢＢに結合する抗体の操作された形態、例えば、ｓｃＦｖ分子も含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、完全ヒト抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ヒト化抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法及び組成物に使用するための４－１ＢＢアゴニストには、抗４－１ＢＢ抗体、ヒト抗４－１ＢＢ抗体、マウス抗４－１ＢＢ抗体、哺乳動物抗４－１ＢＢ抗体、モノクローナル抗４－１ＢＢ抗体、ポリクローナル抗４－１ＢＢ抗体、キメラ抗４－１ＢＢ抗体、抗４－１ＢＢアドネクチン、抗４－１ＢＢドメイン抗体、一本鎖抗４－１ＢＢ断片、重鎖抗４－１ＢＢ断片、軽鎖抗４－１ＢＢ断片、抗４－１ＢＢ融合タンパク質、及びそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、またはバイオシミラーが含まれる。アゴニスト抗４－１ＢＢ抗体は、強力な免疫応答を誘導することが知られている。Ｌｅｅ，ｅｔ　ａｌ．，ＰＬＯＳ　Ｏｎｅ　２０１３，８，ｅ６９６７７。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、アゴニスト、抗４－１ＢＢヒト化、または完全ヒトモノクローナル抗体（すなわち、単一の細胞株に由来する抗体）である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＥＵ－１０１（Ｅｕｔｉｌｅｘ　Ｃｏ．Ｌｔｄ．）、ウトミルマブ、もしくはウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブもしくはウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。

【２０８２】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストまたは４－１ＢＢ結合分子は、融合タンパク質である場合もある。いくつかの実施形態では、三量体または六量体４－１ＢＢアゴニスト（３つまたは６つのリガンド結合ドメインを有する）などの多量体４－１ＢＢアゴニストは、典型的に２つのリガンド結合ドメインを有するアゴニストモノクローナル抗体と比較して、優れた受容体（４－１ＢＢＬ）クラスター化及び内部細胞シグナル伝達複合体形成を誘導し得る。３つのＴＮＦＲＳＦ結合ドメイン及びＩｇＧ１－Ｆｃを含み、かつ任意選択でこれらの融合タンパク質のうちの２つ以上をさらに結合する三量体（三価）または六量体（もしくは六価）またはそれ以上の融合タンパク質は、例えば、Ｇｉｅｆｆｅｒｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ　２０１３，１２，２７３５－４７に記載されている。

【２０８３】

アゴニスト４－１ＢＢ抗体及び融合タンパク質は、強い免疫応答を誘導することが知られている。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、毒性を低減するのに十分な様式で４－１ＢＢ抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、抗体依存性細胞毒性（ｃｅｌｌｕｌａｒ　ｔｏｘｉｃｉｔｙ）（ＡＤＣＣ）、例えば、ＮＫ細胞細胞傷害性（ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ）を抑制するアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タン

パク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）を抑制するアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）を抑制するアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、Ｆｃ領域機能性を抑制するアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。

【２０８４】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、高い親和性及びアゴニスト活性でヒト４－１ＢＢ（配列番号９）に結合することを特徴とする。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ヒト４－１ＢＢ（配列番号４０）に結合する結合分子である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、マウス４－１ＢＢ（配列番号４１）に結合する結合分子である。４－１ＢＢアゴニストまたは結合分子が結合する４－１ＢＢ抗原のアミノ酸配列を表５に要約する。

【２０８５】

【表６】

表５．４－１ＢＢ抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 40 ヒト 4-1BB、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー9(ホモサピエンス)	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRFPEEEE GGCEL 255
配列番号 41 マウス 4-1BB、 腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー9(ハツカネズミ)	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 60 CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG 180 GHSLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKTT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGGYEL 256

【２０８６】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス及び方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１００ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約７０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約６０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約５０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約４０ｐＭ以下のK_Dで結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約３０ｐＭ以下のK_Dで結合する４－１ＢＢアゴニストを含む。

【２０８７】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約７．５×10^5ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約７．５×10^5ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８×10^5ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８．５×10^5ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９×10^5ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９．５×10^5ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１×10^6ｌ／Ｍ・ｓ以上のｋ

ａｓｓｏｃで結合する４－１ＢＢアゴニストを含む。
【２０８８】
いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋ$_{ｄｉｓｓｏｃ}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．１×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋ$_{ｄｉｓｓｏｃ}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．２×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋ$_{ｄｉｓｓｏｃ}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．３×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋ$_{ｄｉｓｓｏｃ}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．４×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋ$_{ｄｉｓｓｏｃ}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．５×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋ$_{ｄｉｓｓｏｃ}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．６×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋ$_{ｄｉｓｓｏｃ}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．７×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋ$_{ｄｉｓｓｏｃ}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．８×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋ$_{ｄｉｓｓｏｃ}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．９×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋ$_{ｄｉｓｓｏｃ}$で結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約３×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋ$_{ｄｉｓｓｏｃ}$で結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。
【２０８９】
いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス及び方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１０ｎＭ以下のＩＣ$_{５０}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９ｎＭ以下のＩＣ$_{５０}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８ｎＭ以下のＩＣ$_{５０}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約７ｎＭ以下のＩＣ$_{５０}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約６ｎＭ以下のＩＣ$_{５０}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約５ｎＭ以下のＩＣ$_{５０}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約４ｎＭ以下のＩＣ$_{５０}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約３ｎＭ以下のＩＣ$_{５０}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２ｎＭ以下のＩＣ$_{５０}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１ｎＭ以下のＩＣ$_{５０}$で結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。
【２０９０】
いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＰＦ－０５０８２５６６もしくはＭＯＲ－７４８０としても知られるウトミルマブ、またはその断片、誘導体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。ウトミルマブは、Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．から入手可能である。ウトミルマブは、免疫グロブリンＧ２－ガンマ、抗［ホモサピエンスＴＮＦＲＳＦ９（腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーメンバー９、４－１ＢＢ、Ｔ細胞抗原ＩＬＡ、ＣＤ１３７）］、ホモサピエンス（完全ヒト）モノクローナル抗体である。ウトミルマブのアミノ酸配列を表６に示す。ウトミルマブは、Ａｓｎ５９及びＡｓｎ２９２にグリコシル化部位、２２－９６位（Ｖ$_{Ｈ}$－Ｖ$_{Ｌ}$）、１４３－１９９位（Ｃ$_{Ｈ}$１－Ｃ$_{Ｌ}$）、２５６－３１６位（Ｃ$_{Ｈ}$２）、及び３６２－４２０位（Ｃ$_{Ｈ}$３）に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、２２’－８７’位（Ｖ$_{Ｈ}$－Ｖ$_{Ｌ}$）及び１３６’－１９５’位（Ｃ$_{Ｈ}$１－Ｃ$_{Ｌ}$）に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、ＩｇＧ２Ａアイソフォーム２１８－２１８、２１９－２１９、２２２－２２２、及び２２５－２２５位、ＩｇＧ２Ａ／Ｂアイソフォーム２１８－１３０、２１９－２１９、２２２－２２２、及び２２５－２２５位、ならびにＩｇＧ２Ｂアイソフォーム２１９－１３０（２）、２２２－２２２、及び２２５－２２５位に鎖間重鎖－重鎖ジスルフィド架橋、ならびにＩｇＧ２Ａアイソフォーム１３０－２１３’（２）位、ＩｇＧ２Ａ／Ｂアイソフォーム２１８－２１３’位、及び１３０－２１３’位、ならびにＩｇＧ２Ｂアイソフォーム２１８－２１３’（２）位に鎖間重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウトミルマブならびにそのバリアント及び断片の調製及び特性は、米国特許第８，８２１，８６７号、同第８，３３７，８５０号、及び同第９，４６８，６７８号、ならびに国際特許出願公開第ＷＯ２０１２／０３２４３３Ａ１（これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。ウトミルマブの前臨床特徴は、Ｆｉｓｈｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇ．＆Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１２，６１，１７２１－３３に記載されている。様々な血液学的及び固形腫瘍適応

症におけるウトミルマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所のｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０２４４４７９３、ＮＣＴ０１３０７２６７、ＮＣＴ０２３１５０６６、及びＮＣＴ０２５５４８１２が含まれる。

【２０９１】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、配列番号４２によって示される重鎖及び配列番号４３によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２０９２】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号４４に示される配列を含み、４－１ＢＢアゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号４５に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖ抗体を含む。

【２０９３】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号４６、配列番号４７、及び配列番号４８に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号４９、配列番号５０、及び配列番号５１に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【２０９４】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブに関して薬物規制当局によって承認された４－１ＢＢアゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含む４－１ＢＢ抗体を含み、参照医

薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出された４－１ＢＢアゴニスト抗体であり、４－１ＢＢアゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。４－１ＢＢアゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。

【２０９５】

【表７】

表６．ウトミルマブに関連する４－１ＢＢアゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号42 ウトミルマブの 重鎖	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTNY	60
	SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK	120
	GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS	180
	LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP	240
	KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV	300
	LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL	360
	TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC	420
	SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G	441
配列番号43 ウトミルマブの 軽鎖	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER	60
	FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF	120
	PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL	180
	SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS	214
配列番号44 ウトミルマブの 重鎖可変領域	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN	60
	YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS	118
配列番号45 ウトミルマブの 軽鎖可変領域	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER	60
	FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL	108
配列番号46 ウトミルマブの 重鎖CDR1	STYWIS	6
配列番号47 ウトミルマブの 重鎖CDR2	KIYPGDSYTN YSPSFQG	17
配列番号48 ウトミルマブの 重鎖CDR3	RGYGIFDY	8
配列番号49 ウトミルマブの 軽鎖CDR1	SGDNIGDQYA H	11
配列番号50 ウトミルマブの 軽鎖CDR2	QDKNRPS	7
配列番号51 ウトミルマブの 軽鎖CDR3	ATYTGFGSLA V	11

【２０９６】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＢＭＳ－６６３５１３及び２０Ｈ４．９．ｈ４ａとしても知られるモノクローナル抗体ウレルマブ、またはそれらの断片、

誘導体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。ウレルマブは、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ，Ｉｎｃ．及びＣｒｅａｔｉｖｅ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｉｎｃ．から入手可能である。ウレルマブは、免疫グロブリンＧ４－カッパ、抗［ホモサピエンスＴＮＦＲＳＦ９（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー９、４－１ＢＢ、Ｔ細胞抗原ＩＬＡ、ＣＤ１３７）］、ホモサピエンス（完全ヒト）モノクローナル抗体である。ウレルマブのアミノ酸配列を表７に示す。ウレルマブは、２９８位（及び２９８’’）にＮ－グリコシル化部位、２２－９５位（V_H-V_L）、１４８－２０４位（C_H1-C_L）、２６２－３２２位（C_H2）、及び３６８－４２６位（C_H3）（２２’’－９５’’、１４８’’－２０４’’、２６２’’－３２２’’、及び３６８’’－４２６’’位）に重鎖鎖内ジフィド架橋、２３’－８８’位（V_H-V_L）及び１３６’－１９６’位（C_H1-C_L）（２３’’’－８８’’’及び１３６’’’－１９６’’’位）に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、２２７－２２７’’位及び２３０－２３０’’位に鎖間重鎖－重鎖ジスルフィド架橋ならびに１３５－２１６’及び１３５’’－２１６’’’に鎖間重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウレルマブならびにそのバリアント及び断片の調製及び特性は、米国特許第７，２８８，６３８号及び同第８，９６２，８０４号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ウレルマブの前臨床及び臨床特徴は、Ｓｅｇａｌ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１６に記載されており、ｈｔｔｐ：／ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１５８／１０７８－０４３２．ＣＣＲ－１６－１２７２で入手可能である。様々な血液学的及び固形腫瘍適応症におけるウレルマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所のｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０１７７５６３１、ＮＣＴ０２１１００８２、ＮＣＴ０２２５３９９２、及びＮＣＴ０１４７１２１０が含まれる。

【２０９７】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、配列番号５２によって示される重鎖及び配列番号５３によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２０９８】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号５４に示される配列を含み、４－１ＢＢアゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号５５に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列

番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶ$_H$領域及びＶ$_L$領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶ$_H$領域及びＶ$_L$領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶ$_H$領域及びＶ$_L$領域を含むｓｃＦｖ抗体を含む。

【２０９９】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号５６、配列番号５７、及び配列番号５８に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号５９、配列番号６０、及び配列番号６１に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【２１００】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブに関して薬物規制当局によって承認された４－１ＢＢアゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含む４－１ＢＢ抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出された４－１ＢＢアゴニスト抗体であり、４－１ＢＢアゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。４－１ＢＢアゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。

【２１０１】

【表８】

表７：ウレルマブに関連する４－１ＢＢアゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号52 ウレルマブの重鎖	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN PSLESRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 448
配列番号53 ウレルマブの軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC	60 120 180 216
配列番号54 ウレルマブの可変重鎖	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP	60 120
配列番号55 ウレルマブの可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ	60 110
配列番号56 ウレルマブの重鎖CDR1	GYYWS	5
配列番号57 ウレルマブの重鎖CDR2	EINHGGYVTY NPSLES	16
配列番号58 ウレルマブの重鎖CDR3	DYGPGNYDWY FDL	13
配列番号59 ウレルマブの軽鎖CDR1	RASQSVSSYL A	11
配列番号60 ウレルマブの軽鎖CDR2	DASNRAT	7
配列番号61 ウレルマブの軽鎖CDR3	QQRSDWPPAL T	11

【２１０２】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、１Ｄ８、３Ｅｌｏｒ、４Ｂ４（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　３０９８０９）、Ｈ４－１ＢＢ－Ｍ１２７（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ　５５２５３２）、ＢＢＫ２（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　ＭＳ６２１ＰＡＢＸ）、１４５５０１（Ｌｅｉｎｃｏ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｂ５９１）、ＡＴＣＣ番号ＨＢ－１１２４８として寄託された細胞株によって産生され、米国特許第６，９７４，８６３号に開示される抗体、５Ｆ４（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　３１　１５０３）、Ｃ６５－４８５（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ　５５９４４６）、米国特許出願公開第２００５／００９５２４４号に開示される抗体、米国特許第７，２８８，６３８号に開示される抗体（例えば、２０Ｈ４．９－ＩｇＧｌ（ＢＭＳ－６６３０３１））、米国特許第６，８８７，６７３号に開示される抗体（例えば、４Ｅ９もしくはＢＭＳ－５５４２７１）、米国特許第７，２１４，４９３号に開示される抗体、米国特許第６，３０３，１２１号に開示される抗体、米国特許第６，５６９，９９７号に開示される抗体、米国特許第６，９０５，６８５号に開示される抗体（例えば、４Ｅ９もしくはＢＭＳ－５５４２７１）、米国特許第６，３６２，３２５号に開示される抗体（例えば、１Ｄ８もしくはＢＭＳ－４６９４９２、３Ｈ３もしくはＢＭＳ－４６９４９７、または３Ｅｌ）、米国特許第６，９７４，８６３号に開示される抗体（例えば、５３Ａ２）、米国特許第６，２１０，６６９号に開示さ

れる抗体（例えば、１Ｄ８、３Ｂ８、もしくは３Ｅｌ）、米国特許第５，９２８，８９３号に開示される抗体、米国特許第６，３０３，１２１号に開示される抗体、米国特許第６，５６９，９９７号に開示される抗体、国際特許出願公開第ＷＯ２０１２／１７７７８８号、同第ＷＯ２０１５／１１９９２３号、及び同第ＷＯ２０１０／０４２４３３号に開示される抗体、ならびにそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、またはバイオシミラーからなる群から選択され、前述の特許または特許出願公開の各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【２１０３】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、国際特許出願公開第ＷＯ２００８／０２５５１６Ａ１号、同第ＷＯ２００９／００７１２０Ａ１号、同第ＷＯ２０１０／００３７６６Ａ１号、同第ＷＯ２０１０／０１００５１Ａ１号、及び同第ＷＯ２０１０／００７８９６６Ａ１号、米国特許出願公開第２０１１／００２７２１８Ａ１号、同第２０１５／０１２６７０９Ａ１号、同第２０１１／０１１１４９４Ａ１号、同第２０１５／０１１０７３４Ａ１号、及び同第２０１５／０１２６７１０Ａ１号、ならびに米国特許第９，３５９，４２０号、同第９，３４０，５９９号、同第８，９２１，５１９号、及び同第８，４５０，４６０号に記載される４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質であり、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【２１０４】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、構造Ｉ－Ａ（Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）もしくは構造Ｉ－Ｂ（Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）に示されるような４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質、またはそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、バリアント、もしくはバイオシミラーである（図１８を参照）。構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂにおいて、円筒は、個々のポリペプチド結合ドメインを指す。構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂは、例えば、４－１ＢＢＬ（４－１ＢＢリガンド、ＣＤ１３７リガンド（ＣＤ１３７Ｌ）、もしくは腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー９（ＴＮＦＳＦ９））または４－１ＢＢに結合する抗体に由来する３つの直線的に連結されたＴＮＦＲＳＦ結合ドメインを含み、これらが折り重なって三価タンパク質を形成し、その後、これがＩｇＧ１－Ｆｃ（C_H3及びC_H2ドメインを含む）によって第２の三価タンパク質に連結され、その後、これを使用して、三価タンパク質のうちの２つをジスルフィド結合（小さく長細い楕円）によって一緒に連結し、構造を安定化し、６つの受容体及びシグナル伝達タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを一緒にして、シグナル伝達複合体を形成することができるアゴニストを提供する。円筒として示されるＴＮＦＲＳＦ結合ドメインは、例えば、親水性残基及び柔軟性のためのＧｌｙ及びＳｅｒ配列、ならびに溶解性のためのＧｌｕ及びＬｙｓを含み得るリンカーによって結合されたV_H鎖及びV_L鎖を含む、ｓｃＦｖドメインであり得る。ｄｅ　Ｍａｒｃｏ，Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ　Ｃｅｌｌ　Ｆａｃｔｏｒｉｅｓ，２０１１，１０，４４、Ａｈｍａｄ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．＆Ｄｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２，９８０２５０、Ｍｏｎｎｉｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，２０１３，２，１９３－２０８、または本明細書の他の場所に組み込まれている参照文献に記載されるものなどの任意のｓｃＦｖドメイン設計が使用され得る。この形態の融合タンパク質構造は、米国特許第９，３５９，４２０号、同第９，３４０，５９９号、同第８，９２１，５１９号、及び同第８，４５０，４６０号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【２１０５】

図１８に示される構造Ｉ－Ａの他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表８に見出される。Ｆｃドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン（配列番号６２のアミノ酸１７～２３０）、完全なヒンジドメイン（配列番号６２のアミノ酸１～１６）、またはヒンジドメインの一部（例えば、配列番号６２のアミノ酸４～１６）を含む。Ｃ末端Ｆｃ抗体を結合するための好ましいリンカーは、追加のポリペプチドの融合に好適なリンカーを含む、配列番号６３～配列番号７２に示される実施形態から選択され得る。

【２１０６】

【表９】

表８：Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質設計（構造Ｉ－Ａ）を有する、４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質を含む、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号62 Fc ドメイン	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 230
配列番号63 リンカー	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
配列番号64 リンカー	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
配列番号65 リンカー	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
配列番号66 リンカー	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
配列番号67 リンカー	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
配列番号68 リンカー	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
配列番号69 リンカー	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE	24
配列番号70 リンカー	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE	23
配列番号71 リンカー	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E	21
配列番号72 リンカー	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE	25

【２１０７】

図１８に示される構造Ｉ－Ｂの他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表９に見出される。Ｆｃ抗体断片が構造Ｉ－ＢにあるようなＴＮＲＦＳＦ融合タンパク質のＮ末端に融合される場合、Ｆｃモジュールの配列は、好ましくは、配列番号７３に示されるものであり、リンカー配列は、好ましくは、配列番号７４～配列番号７６に示される実施形態から選択される。

【２１０８】

【表１０】

表９：Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質設計（構造Ｉ－Ｂ）を有する、４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質を含む、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号73 Fc ドメイン	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	60 120 180 240 246
配列番号74 リンカー	SGSGSGSGSG S	11
配列番号75 リンカー	SSSSSSGSGS GS	12
配列番号76 リンカー	SSSSSSGSGS GSGSGS	16

【２１０９】

いくつかの複合体実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト

融合タンパク質は、ウトミルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、ウレルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、ウトミルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、表５に記載の可変重鎖及び可変軽鎖から選択される可変重鎖及び可変軽鎖、前述の可変重鎖及び可変軽鎖の任意の組み合わせ、ならびにそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、及びバイオシミラーからなる群から選択される１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。

【２１１０】

いくつかの複合体実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、４－１ＢＢＬ配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、配列番号７７による配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、可溶性４－１ＢＢＬ配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、配列番号７８による配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。

【２１１１】

いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号４３及び配列番号４４に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインはリンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインはリンカーによって結合されている。いくつか実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、各々が、表１０に示されるV_H配列及びV_L配列と少なくとも９５％同一であるV_H配列及びV_L配列を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインはリンカーによって結合されている。

【２１１２】

【表１１】

表１０：融合タンパク質における４－１ＢＢ結合ドメインとしてまたはｓｃＦｖ　４－１ＢＢアゴニスト抗体として有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 77 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE	60 120 180 240 254
配列番号 78 4-1BBL 可溶性ドメイン	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE	60 120 168
配列番号 79 4B4-1-1 バージョン１の可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS	60 118
配列番号 80 4B4-1-1 バージョン１の可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号 81 4B4-1-1 バージョン２の可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA	60 119
配列番号 82 4B4-1-1 バージョン２の可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR	60 108
配列番号 83 H39E3-2 の可変重鎖	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT	60 120
配列番号 84 H39E3-2 の可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA	60 110

【２１１３】

いくつか実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、（ｉ）第１の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性４－１ＢＢ結合ドメインを含む４－１ＢＢアゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインである。いくつか実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、（ｉ）第１の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性４－１ＢＢ結合ドメインを含む４－１ＢＢアゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインであり、可溶性４－１ＢＢドメインは各々、茎領域（三量体化に寄与し、細胞膜までである特定の距離を提供するが、４－１ＢＢ結合ドメインの一部分ではない）を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは独立して、３～８アミノ酸長を有する。

【２１１４】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、（ｉ）第１の可溶性腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）スーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインを含む４－１ＢＢアゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、可溶性ＴＮＦスー

パーファミリーサイトカインドメインは各々、茎領域を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは独立して、３～８アミノ酸長であり、各ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインは、４－１ＢＢ結合ドメインである。

【２１１５】

いくつか実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、前述のV_Lドメインのうちのいずれかに連結された前述のV_Hドメインのうちのいずれかを含む４－１ＢＢアゴニストｓｃＦｖ抗体である。

【２１１６】

いくつか実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＢＰＳ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）から市販されているＢＰＳ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　４－１ＢＢアゴニスト抗体カタログ番号７９０９７－２である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、Ｃｒｅａｔｉｖｅ　Ｂｉｏｌａｂｓ（Ｓｈｉｒｌｅｙ，ＮＹ，ＵＳＡ）から市販されているＣｒｅａｔｉｖｅ　Ｂｉｏｌａｂｓ　４－１ＢＢアゴニスト抗体カタログ番号ＭＯＭ－１８１７９である。

【２１１７】

３．ＯＸ４０（ＣＤ１３４）アゴニスト

いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、ＯＸ４０（ＣＤ１３４）アゴニストである。ＯＸ４０アゴニストは、当該技術分野で知られている任意のＯＸ４０結合分子であり得る。ＯＸ４０結合分子は、ヒトまたは哺乳動物ＯＸ４０に結合することができるモノクローナル抗体または融合タンパク質であり得る。ＯＸ４０アゴニストまたはＯＸ４０結合分子は、任意のアイソタイプ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、及びＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、及びＩｇＡ２）、またはサブクラスの免疫グロブリン分子の免疫グロブリン重鎖を含み得る。ＯＸ４０アゴニストまたはＯＸ４０結合分子は、重鎖及び軽鎖の両方を有し得る。本明細書で使用される場合、結合分子という用語は、抗体（全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、及び抗体断片、例えば、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）断片、Ｆａｂ発現ライブラリーによって産生された断片、上記のうちのいずれかのエピトープ結合断片、ならびにＯＸ４０に結合する抗体の操作された形態、例えば、ｓｃＦｖ分子も含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、完全ヒト抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ヒト化抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法及び組成物に使用するためのＯＸ４０アゴニストには、抗ＯＸ４０抗体、ヒト抗ＯＸ４０抗体、マウス抗ＯＸ４０抗体、哺乳動物抗ＯＸ４０抗体、モノクローナル抗ＯＸ４０抗体、ポリクローナル抗ＯＸ４０抗体、キメラ抗ＯＸ４０抗体、抗ＯＸ４０アドネクチン、抗ＯＸ４０ドメイン抗体、一本鎖抗ＯＸ４０断片、重鎖抗ＯＸ４０断片、軽鎖抗ＯＸ４０断片、抗ＯＸ４０融合タンパク質、及びそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、またはバイオシミラーが含まれる。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、アゴニスト、抗ＯＸ４０ヒト化、または完全ヒトモノクローナル抗体（すなわち、単一の細胞株に由来する抗体）である。

【２１１８】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストまたはＯＸ４０結合分子は、融合タンパク質である場合もある。ＯＸ４０Ｌに融合されたＦｃドメインを含むＯＸ４０融合タンパク質は、例えば、Ｓａｄｕｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００９，１８２，１４８１－８９に記載されている。いくつかの実施形態では、三量体または六量体ＯＸ４０アゴニスト（３つまたは６つのリガンド結合ドメインを有する）などの多量体ＯＸ４０アゴニストは、典型的に２つのリガンド結合ドメインを有するアゴニストモノクローナル抗体と比較して、優れた受容体（ＯＸ４０Ｌ）クラスター化及び内部細胞シグナル伝達複合体形成を誘導し得る。３つのＴＮＦＲＳＦ結合ドメイン及びＩｇＧ１－Ｆｃを含み、かつ任意選択でこれらの融合タンパク質のうちの２つ以上をさらに結合する三量体（

三価）または六量体（もしくは六価）またはそれ以上の融合タンパク質は、例えば、Ｇｉｅｆｆｅｒｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ　２０１３，１２，２７３５－４７に記載されている。

【２１１９】

アゴニストＯＸ４０抗体及び融合タンパク質は、強い免疫応答を誘導することが知られている。Ｃｕｒｔｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１３，７３，７１８９－９８。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、毒性を低減するのに十分な様式でＯＸ４０抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体依存性細胞毒性（ｃｅｌｌｕｌａｒ　ｔｏｘｉｃｉｔｙ）（ＡＤＣＣ）、例えば、ＮＫ細胞細胞傷害性（ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ）を抑制するアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）を抑制するアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）を抑制するアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｆｃ領域機能性を抑制するアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。

【２１２０】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、高い親和性及びアゴニスト活性でヒトＯＸ４０（配列番号８５）に結合することを特徴とする。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ヒトＯＸ４０に結合する結合分子である（配列番号８５）。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、マウスＯＸ４０に結合する結合分子である（配列番号８６）。ＯＸ４０アゴニストまたは結合分子が結合するＯＸ４０抗原のアミノ酸配列を表１１に要約する。

【２１２１】

【表１２】

表１１：ＯＸ４０抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 85 ヒト OX40 (ホモサピエンス)	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI	60 120 180 240 277
配列番号 86 マウス OX40 (ハツカネズミ)	MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI	60 120 180 240 272

【２１２２】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１００ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約６０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約５０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約４０ｐＭ以下のK_Dで結合する、またはヒトもしくはマウスＯＸ４０に約３０ｐＭ以下のK_Dで結合するＯＸ４０アゴニストを含む。

【２１２３】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７．５×10^5ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしく

はマウスＯＸ４０に約７．５×１０^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８×１０^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８．５×１０^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９×１０^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９．５×１０^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、またはヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１×１０^{6}ｌ／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合するＯＸ４０アゴニストを含む。

【２１２４】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．１×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．２×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．３×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．４×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．５×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．６×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．７×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．８×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．９×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、またはヒトもしくはマウスＯＸ４０に約３×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【２１２５】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１０ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約６ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約５ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約４ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約３ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【２１２６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＭＥＤＩ０５６２またはＭＥＤＩ－０５６２としても知られるタボリキシズマブである。タボリキシズマブは、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ，Ｉｎｃ．の子会社であるＭｅｄＩｍｍｕｎｅから入手可能である。タボリキシズマブは、免疫グロブリンＧ１－カッパ、抗［ホモサピエンスＴＮＦＲＳＦ４（腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーメンバー４、ＯＸ４０、ＣＤ１３４）］、ヒト化及びキメラモノクローナル抗体である。タボリキシズマブのアミノ酸配列を表１２に示す。タボリキシズマブは、３０１及び３０１’’位にＮ－グリコシル化部位（フコシル化複合二分岐ＣＨＯ型グリカンを有する）、２２－９５位（Ｖ$_{H}$－Ｖ$_{L}$）、１４８－２０４位（Ｃ$_{H}$１－Ｃ$_{L}$）、２６５－３２５位（Ｃ$_{H}$２）、及び３７１－４２９位（Ｃ$_{H}$３）（及び２２’’－９５’’、１４８’’－２０４’’、２６５’’－３２５’’、及び３７１’’－’’位）に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、２３’－８８’位（Ｖ$_{H}$－Ｖ$_{L}$）及び１３４’－１９４’位（Ｃ$_{H}$１－Ｃ$_{L}$）（及び２３’’’－８８’’’及び１３４’’’－１９４’’’位）に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、２３０－２３０”及び２３３－２３３”位に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、ならびに２２４－２１４’及び２２４’’－２１４’’’に鎖間重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。様々な固形腫瘍適応症におけるタボリキシズマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所のｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０２３１８３９４及びＮＣＴ０２７０５４８２が含まれる。

【２１２７】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号８７によって示される重鎖及び配列番号８８によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２１２８】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、タボリキシズマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号８９に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号９０に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖ抗体を含む。

【２１２９】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号９１、配列番号９２、及び配列番号９３に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号９４、配列番号９５、及び配列番号９６に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【２１３０】

ある実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、タボリキシズマブに関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。ある実施形態ではいくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参

照バイオ製品は、タボリキシズマブである。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。

【２１３１】

【表１３】

表１２：タボリキシズマブに関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号87 タボリキシズマブの重鎖	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
配列番号88 タボリキシズマブの軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号89 タボリキシズマブの重鎖可変領域	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT 118
配列番号90 タボリキシズマブの軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR 108
配列番号91 タボリキシズマブの重鎖CDR1	GSFSSGYWN 9
配列番号92 タボリキシズマブの重鎖CDR2	YIGYISYNGI TYH 13
配列番号93 タボリキシズマブの重鎖CDR3	RYKYDYDGGH AMDY 14
配列番号94 タボリキシズマブの軽鎖CDR1	QDISNYLN 8
配列番号95 タボリキシズマブの軽鎖CDR2	LLIYYTSKLH S 11
配列番号96 タボリキシズマブの軽鎖CDR3	QQGSALPW 8

【２１３２】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．から入手可能な完全ヒト抗体である１１Ｄ４である。１１Ｄ４の調製及び特性は、米国特許第７，９６０，５１５号、同第８，２３６，９３０号、及び同第９，０２８，８２４号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。１１Ｄ４のアミノ酸配列を表１３に示す。

【２１３３】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号９７によって示される重鎖

及び配列番号９８によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２１３４】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１１Ｄ４の重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号９９に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１００に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【２１３５】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１０１、配列番号１０２、及び配列番号１０３に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１９４、配列番号１０５、及び配列番号１０６に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【２１３６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１１Ｄ４に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、１１Ｄ４である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、１１Ｄ４である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バ

イオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１１Ｄ４である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１１Ｄ４である。

【２１３７】

【表１４－１】

表１３：１１Ｄ４に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 97 11D4 の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPPCPAP PVAGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK	60 120 180 240 300 360 420 444
配列番号 9811D4 の軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
配列番号 99 11D4 の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
配列番号 100 11D4 の軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK	60 107
配列番号 101 11D4 の重鎖 CDR1	SYSMN	5
配列番号 102 11D4 の重鎖 CDR2	YISSSSSTID YADSVKG	17
配列番号 103 11D4 の重鎖 CDR3	ESGWYLFDY	9
配列番号 104 11D4 の軽鎖 CDR1	RASQGISSWL A	11

【表１４－２】

配列番号 105 11D4 の軽鎖 CDR2	AASSLQS	7
配列番号 106 11D4 の軽鎖 CDR3	QQYNSYPPT	9

【２１３８】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．から入手可能な完全ヒト抗体である１８Ｄ８である。１８Ｄ８の調製及び特性は、米国特許第７，９６０，５１５号、同第８，２３６，９３０号、及び同第９，０２８，８２４号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。１８Ｄ８のアミノ酸配列を表１４に示す。

【２１３９】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号１０７によって示される重鎖及び配列番号１０８によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２１４０】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１８Ｄ８の重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１０９に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１１０に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【２１４１】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１１１、配列番号１１２、及び配列番号１１３に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１１４、配列番号１１５、及び配列番号１１６に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【２１４２】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１８Ｄ８に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制

当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。

【２１４３】

【表１５】

表１４：１８Ｄ８に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 107 18D8 の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
配列番号 108 18D8 の軽鎖	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	60 120 180 213
配列番号 109 18D8 の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSS	60 120 124
配列番号 110 18D8 の軽鎖可変領域	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK	60 106
配列番号 111 18D8 の重鎖 CDR1	DYAMH	5
配列番号 112 18D8 の重鎖 CDR2	GISWNSGSIG YADSVKG	17
配列番号 113 18D8 の重鎖 CDR3	DQSTADYYFY YGMDV	15
配列番号 114 18D8 の軽鎖 CDR1	RASQSVSSYL A	11
配列番号 115 18D8 の軽鎖 CDR2	DASNRAT	7
配列番号 116 18D8 の軽鎖 CDR3	QQRSNWPT	8

【２１４４】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ ｐｌｃ．から入手可能なヒト化抗体であるＨｕ１１９－１２２である。Ｈｕ１１９－１２２の調製及び特性は、米国特許第９，００６，３９９号及び同第９，１６３，０８５号、ならびに国際特許公開第ＷＯ２０１２／０２７３２８号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。Ｈｕ１１９－１２２のアミノ酸配列を表１５に示す。

【２１４５】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１１９－１２２の重鎖及び軽鎖

ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１１７に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１１８に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【２１４６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１１９、配列番号１２０、及び配列番号１２１に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１２２、配列番号１２３、及び配列番号１２４に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【２１４７】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１１９－１２２に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１１９－１２２である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１１９－１２２である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１１９－１２２である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１１９－１２２である。

【２１４８】

【表１６】

表１５：Ｈｕ１１９－１２２に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 117 Hu119-122 の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
配列番号 118 Hu119-122 の軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号 119 Hu119-122 の重鎖 CDR1	SHDMS	5
配列番号 120 Hu119-122 の重鎖 CDR2	AINSDGGSTY YPDTMER	17
配列番号 121 Hu119-122 の重鎖 CDR3	HYDDYYAWFA Y	11
配列番号 122 Hu119-122 の軽鎖 CDR1	RASKSVSTSG YSYMH	15
配列番号 123 Hu119-122 の軽鎖 CDR2	LASNLES	7
配列番号 124 Hu119-122 の軽鎖 CDR3	QHSRELPLT	9

【２１４９】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ ｐｌｃ．から入手可能なヒト化抗体であるＨｕ１０６－２２２である。Ｈｕ１０６－２２２の調製及び特性は、米国特許第９，００６，３９９号及び同第９，１６３，０８５号、ならびに国際特許公開第ＷＯ２０１２／０２７３２８号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。Ｈｕ１０６－２２２のアミノ酸配列を表１６に示す。

【２１５０】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１０６－２２２の重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１２５に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１２６に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【２１５１】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１２７、配列番

号１２８、及び配列番号１２９に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１３０、配列番号１３１、及び配列番号１３２に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【２１５２】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１０６－２２２に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１０６－２２２である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１０６－２２２である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１０６－２２２である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１０６－２２２である。

【２１５３】

【表１７】

表１６：Ｈｕ１０６－２２２に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 125 Hu106-222 の重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	60 120 122
配列番号 126 Hu106-222 の軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK	60 107
配列番号 127 Hu106-222 の重鎖 CDR1	DYSMH	5
配列番号 128 Hu106-222 の重鎖 CDR2	WINTETGEPT YADDFKG	17
配列番号 129 Hu106-222 の重鎖 CDR3	PYYDYVSYYA MDY	13
配列番号 130 Hu106-222 の軽鎖 CDR1	KASQDVSTAV A	11
配列番号 131 Hu106-222 の軽鎖 CDR2	SASYLYT	7
配列番号 132 Hu106-222 の軽鎖 CDR3	QQHYSTPRT	9

【２１５４】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＭＥＤＩ６４６９（９Ｂ１２とも称される）である。ＭＥＤＩ６４６９は、マウスモノクローナル抗体である。Ｗｅｉｎｂｅｒｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００６，２９，５７５－５８５。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｗｅｉｎｂｅｒｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００６，２９，５７５－５８５に記載されているように、Ｂｉｏｖｅｓｔ　Ｉｎｃ．（Ｍａｌｖｅｒｎ，ＭＡ，ＵＳＡ）に寄託された９Ｂ１２ハイブリドーマによって産生された抗体であり、その開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗体は、ＭＥＤＩ６４６９のＣＤＲ配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＭＥＤＩ６４６９の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【２１５５】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｌ１０６　ＢＤ（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体Ｌ１０６（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）のＣＤＲを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体Ｌ１０６（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）のＣＤＲを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＩｎＶｉｖｏＭＡｂ、ＢｉｏＸｃｅｌｌ　Ｉｎｃ（Ｗｅｓｔ　Ｌｅｂａｎｏｎ，ＮＨ）から市販されているマウスモノクローナル抗体抗ｍＣＤ１３４／ｍＯＸ４０（クローンＯＸ８６）である。

【２１５６】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、国際特許出願公開第ＷＯ９５／１２６７３号、同第ＷＯ９５／２１９２５号、同第ＷＯ２００６／１２１８１０号、同第ＷＯ２０１２／０２７３２８号、同第ＷＯ２０１３／０２８２３１号、同第ＷＯ２０１３／０３８１９１号、及び同第ＷＯ２０１４／１４８８９５号、欧州特許出願第ＥＰ０６７２１４１号、米国特許出願公開第２０１０／１３６０３０号、同第２０１４／３７７２８４号、同第２０１５／１９０５０６号、及び同第２０１５／１３２２８８号（クローン２０Ｅ５及び１２Ｈ３を含む）、ならびに米国特許第７，５０４，１０１号、同第７，５５０，１４０号、同第７，６２２，４４４号、同第７，６９６，１７５号、同第７，９６０，５１５号、同第７，９６１，５１５号、同第８，１３３，９８３号、同第９，００６，３９９号、及び同第９，１６３，０８５号に記載されるＯＸ４０アゴニストから選択され、その各々の開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【２１５７】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、構造Ｉ－Ａ（Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）もしくは構造Ｉ－Ｂ（Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）に示されるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質、またはそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂの特性は、上記及び米国特許第９，３５９，４２０号、同第９，３４０，５９９号、同第８，９２１，５１９号、及び同第８，４５０，４６０号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。図１８に示される構造Ｉ－Ａのポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表９に見出される。Ｆｃドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン（配列番号６２のアミノ酸１７～２３０）、完全なヒンジドメイン（配列番号６２のアミノ酸１～１６）、またはヒンジドメインの一部（例えば、配列番号６２のアミノ酸４～１６）を含む。Ｃ末端Ｆｃ抗体を結合するための好ましいリンカーは、追加のポリペプチドの融合に好適なリンカーを

含む、配列番号６３～配列番号７２に示される実施形態から選択され得る。同様に、図１８に示される構造Ｉ－Ｂのポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表９に見出される。Ｆｃ抗体断片が構造Ｉ－ＢにあるようなＴＮＲＦＳＦ融合タンパク質のＮ末端に融合される場合、Ｆｃモジュールの配列は、好ましくは、配列番号７３に示されるものであり、リンカー配列は、好ましくは、配列番号７４～配列番号７６に示される実施形態から選択される。

【２１５８】

いくつかの複合体実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、タボリキシズマブの可変重鎖及び可変軽鎖、１１Ｄ４の可変重鎖及び可変軽鎖、１８Ｄ８の可変重鎖及び可変軽鎖、Ｈｕ１１９－１２２の可変重鎖及び可変軽鎖、Ｈｕ１０６－２２２の可変重鎖及び可変軽鎖、表１７に記載の可変重鎖及び可変軽鎖から選択される可変重鎖及び可変軽鎖、前述の可変重鎖及び可変軽鎖の任意の組み合わせ、ならびにそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、及びバイオシミラーからなる群から選択される１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。

【２１５９】

いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、ＯＸ４０Ｌ配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１３３による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、可溶性ＯＸ４０Ｌ配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１３４による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１３５による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。

【２１６０】

いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号１２７及び配列番号１２８に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつか実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、表１７に示されるV_H配列及びV_L配列と少なくとも９５％同一であるV_H配列及びV_L配列を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは

、リンカーによって結合されている。
【２１６１】
【表１８－１】

表１７：融合タンパク質（例えば、構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂ）におけるＯＸ４０結合ドメインとしてまたはｓｃＦｖ　ＯＸ４０アゴニスト抗体ドメインとして有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 133 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF CVL	60 120 180 183
配列番号 134 OX40L 可溶性ドメイン	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL IHQNPGEFCV L	60 120 131
配列番号 135 OX40L 可溶性ドメイン(代替)	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ NPGEFCVL	60 120 128
配列番号 136 008 の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS	60 120
配列番号 137 008 の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK	60 108
配列番号 138 011 の可変重鎖	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA	60 120
配列番号 139 011 の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK	60 108
配列番号 140 021 の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS	60 120
配列番号 141 021 の可変軽鎖	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK	60 108
配列番号 142 023 の可変重鎖	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS	60 120
配列番号 143 023 の可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT ISCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR	60 108
配列番号 144 重鎖可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS	60 119
配列番号 145 軽鎖可変領域	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR	60 108

【表１８－２】

配列番号 146 重鎖可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS P	60 120 121
配列番号 147 軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR	60 108
配列番号 148 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV 120 SS	 60 122
配列番号 149 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	60 120 122
配列番号 150 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号 151 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号 152 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA	60 120
配列番号 153 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
配列番号 154 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K	60 111
配列番号 155 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号 156 重鎖可変領域	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGCL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG EVFYFDYWGQ GTTLTVSS	60 120 138
配列番号 157 軽鎖可変領域	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG TKLELK	60 120 126

【２１６２】

いくつか実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、（ｉ）第１の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性ＯＸ４０結合ドメインを含むＯＸ４０アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインである。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、（ｉ）第１の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性ＯＸ４０結合ドメインを含むＯＸ４０アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインであり、可溶性ＯＸ４０ドメインは各々、茎領域（三量体化に寄与し、細胞膜まである特定の距離を提供するが、ＯＸ４０結合ドメインの一部分ではない）を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは独立して、３～８アミノ酸長を有する。

【２１６３】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、（ｉ）第１の可溶性腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）スーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｖ）第２

のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインを含むＯＸ４０アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインは各々、茎領域を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは独立して、３～８アミノ酸長であり、ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインは、ＯＸ４０結合ドメインである。

【２１６４】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＭＥＤＩ６３８３である。ＭＥＤＩ６３８３は、ＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質であり、米国特許第６，３１２，７００号に記載されているように調製することができ、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【２１６５】

いくつか実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、前述のV_Lドメインのうちのいずれかに連結された前述のV_Hドメインのうちのいずれかを含むＯＸ４０アゴニストｓｃＦｖ抗体である。

【２１６６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｃｒｅａｔｉｖｅ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｉｎｃ．，Ｓｈｉｒｌｅｙ，ＮＹ，ＵＳＡから市販されているＣｒｅａｔｉｖｅ　Ｂｉｏｌａｂｓ　ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体ＭＯＭ－１８４５５である。

【２１６７】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡから市販されているＯＸ４０アゴニスト抗体クローンＢｅｒ－ＡＣＴ３５である。

【２１６８】

Ｃ．任意選択の細胞生存率分析

任意選択で、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で既知の標準のアッセイを使用して、プライミングによる第１の拡張（初期バルク拡張と称されることもある）後に行われ得る。したがって、ある特定の実施形態では、方法は、プライミングによる第１の拡張後に細胞生存率アッセイを行うことを含む。例えば、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンブルー排除アッセイが、バルクＴＩＬの試料上で行われ得る。生存率の試験に使用する他のアッセイには、アラマーブルーアッセイ及びＭＴＴアッセイが含まれるが、これらに限定されない。

【２１６９】

１．細胞計数、生存率、フローサイトメトリー

いくつかの実施形態では、細胞数及び／または生存率が測定される。ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、及びＣＤ５６などであるが、これらに限定されないマーカー、ならびに本明細書に開示または記載される任意の他のマーカーの発現は、ＦＡＣＳＣａｎｔｏ（商標）フローサイトメーター（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して、例えば、ＢＤ　Ｂｉｏ－ｓｃｉｅｎｃｅｓ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）から市販されているものであるが、これに限定されない抗体を用いたフローサイトメトリーによって測定され得る。細胞は、使い捨てのｃチップ血球計数器（ＶＷＲ，Ｂａｔａｖｉａ，ＩＬ）を使用して手動で計数することができ、生存率は、トリパンブルー染色を含むが、これに限定されない、当該技術分野で知られている任意の方法を使用して評価することができる。細胞生存率は、米国特許出願公開第２０１８／０２８２６９４号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に基づいてアッセイされ得る。細胞生存率は、米国特許公開第２０１８／０２８０４３６号または国際特許公開第ＷＯ／２０１８／０８１４７３号（いずれもあらゆる目的のためにそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に基づいてアッセイすることもできる。

【２１７０】

いくつかの事例では、バルクＴＩＬ集団は、以下で考察されるプロトコルを使用して直ちに凍結保存され得る。あるいは、以下で論じられるように、バルクＴＩＬ集団がＲＥＰ

に供されて、凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾ＴＩＬが療法に使用される場合、バルクまたはＲＥＰ　ＴＩＬ集団が好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。

【２１７１】

２．細胞培養

いくつかの実施形態では、上記で論じられるもの、ならびに図１及び８、特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄに例示されるものを含む、ＴＩＬを拡張するための方法は、約５，０００ｍＬ～約２５，０００ｍＬの細胞培地、約５，０００ｍＬ～約１０，０００ｍＬの細胞培地、または約５，８００ｍＬ～約８，７００ｍＬの細胞培地を使用することを含み得る。いくつかの実施形態では、培地は、無血清培地である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、無血清である。いくつかの実施形態では、第２の拡張における培地は、無血清である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張及び第２の拡張（急速な第２の拡張とも称される）における培地は、両方とも無血清である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの数を拡張することは、わずか１種類の細胞培養培地を使用する。任意の好適な細胞培養培地、例えば、ＡＩＭ－Ｖ細胞培地（Ｌ－グルタミン、５０μＭの硫酸ストレプトマイシン、及び１０μＭの硫酸ゲンタマイシン）細胞培養培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ　ＣＡ）が使用され得る。これに関して、本発明の方法は、ＴＩＬの数を拡張するために必要な培地の量及び培地の種類の数を有利に減少させる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの数を拡張することは、３日または４日に１回以下の頻度で細胞にフィードすることを含み得る。ガス透過性容器内で細胞の数を拡張することは、細胞を拡張するために必要なフィード頻度を減少させることによって、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化する。

【２１７２】

いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培養培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ベータ－メルカプトエタノール（ＢＭＥ）を欠いている。

【２１７３】

いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、プライミングによる第１の拡張として約１～８日間、例えば約７日間、またはプライミングによる第１の拡張として約８日間にわたってＩＬ－２、１Ｘ抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第１のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を培養することと、ＴＩＬを第２のガス透過性容器に移し、ＩＬ－２、２Ｘ抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第２のガス透過性容器内でＴＩＬの数を約７～９日間、例えば約７日間、約８日間、または約９日間にわたって拡張することと、を含む。

【２１７４】

いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、プライミングによる第１の拡張として約１～８日間、例えば約７日間にわたってＩＬ－２、１Ｘ抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第１のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を培養することと、ＴＩＬを第２のガス透過性容器に移し、ＩＬ－２、２Ｘ抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第２のガス透過性容器内でＴＩＬの数を約７～１４日間、または約７～９日間、例えば約７日間、約８日間、約９日間、約１０日間約１１日間にわたって拡張することと、を含む。

【２１７５】

いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、プライミングによる第１の拡張として約１～７日間、例えば、約７日間にわたってＩＬ－２、１×抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を収容する第１のガ

ス透過性容器内で腫瘍組織試料を培養することと、ＴＩＬを第２のガス透過性容器に移し、ＩＬ－２、２×抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を収容する第２のガス透過性容器内でＴＩＬの数を約７～１１日間、例えば約７日間、約８日間、約９日間、約１０日間、または約１１日間にわたって拡張することと、を含む。

【２１７６】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ガス透過性容器内で拡張される。ガス透過性容器は、米国特許出願公開第２００５／０１０６７１７Ａ１号に記載されるものを含む、当該技術分野で知られている方法、組成物、及び装置を使用して、ＰＢＭＣを使用してＴＩＬを拡張するために使用されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ガス透過性バッグ内で拡張される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、Ｘｕｒｉ Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ Ｗ２５（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）などのガス透過性バッグ内のＴＩＬを拡張する細胞拡張システムを使用して拡張される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、Ｘｕｒｉ Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ Ｗ５（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）としても知られるＷＡＶＥ Ｂｉｏｒｅａｃｔｏｒ Ｓｙｓｔｅｍなどのガス透過性バッグ内でＴＩＬを拡張する細胞拡張システムを使用して拡張される。いくつかの実施形態では、細胞拡張システムは、約１００ｍＬ、約２００ｍＬ、約３００ｍＬ、約４００ｍＬ、約５００ｍＬ、約６００ｍＬ、約７００ｍＬ、約８００ｍＬ、約９００ｍＬ、約１Ｌ、約２Ｌ、約３Ｌ、約４Ｌ、約５Ｌ、約６Ｌ、約７Ｌ、約８Ｌ、約９Ｌ、及び約１０Ｌからなる群から選択される体積を有するガス透過性細胞バッグを含む。

【２１７７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、Ｇ－ＲＥＸフラスコ（Ｗｉｌｓｏｎ Ｗｏｌｆ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇから市販されている）内で拡張され得る。かかる実施形態は、細胞集団が約５×１０^{5}細胞／ｃｍ^{2}から１０×１０^{6}～３０×１０^{6}細胞／ｃｍ^{2}まで拡張するのを可能にする。いくつかの実施形態では、これは、フィードなしである。いくつかの実施形態では、これは、培地がＧ－ＲＥＸフラスコ内の約１０ｃｍの高さに存在する限り、フィードなしである。いくつかの実施形態では、これは、フィードなしであるが、１つ以上のサイトカインの追加を伴う。いくつかの実施形態では、サイトカインを培地と混合する必要なしに、サイトカインがボーラスとして追加され得る。かかる容器、装置、及び方法は、当該技術分野で知られており、ＴＩＬを拡張するために使用されており、米国特許出願公開第２０１４／０３７７７３９Ａ１号、国際公開第ＷＯ２０１４／２１００３６Ａ１号、米国特許出願公開第２０１３／０１１５６１７Ａ１号、国際公開第ＷＯ２０１３／１８８４２７Ａ１、米国特許出願公開第２０１１／０１３６２２８Ａ１、米国特許第８，８０９，０５０Ｂ２号、国際公開第ＷＯ２０１１／０７２０８８Ａ２号、米国特許出願公開第２０１６／０２０８２１６Ａ１号、米国特許出願公開第２０１２／０２４４１３３Ａ１号、国際公開第ＷＯ２０１２／１２９２０１Ａ１号、米国特許出願公開第２０１３／０１０２０７５Ａ１号、米国特許第８，９５６，８６０Ｂ２号、国際公開第ＷＯ２０１３／１７３８３５Ａ１号、米国特許出願公開第２０１５／０１７５９６６Ａ１号に記載されるものを含み、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。かかるプロセスはまた、Ｊｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，２０１２，３５：２８３－２９２に記載されている。

【２１７８】

Ｄ．ＴＩＬにおける遺伝子の任意選択のノックダウンまたはノックアウト

いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、タンパク質発現を一過的に変化させるために、各々本明細書で提供されるように、閉鎖滅菌製造プロセス中を含む、拡張ステップ前、拡張ステップ中、または拡張ステップ後にさらに操作される。いくつかの実施形態では、一過的に変化したタンパク質発現は、一過性の遺伝子編集によるものである。いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、ＴＩＬにおけるタンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子（ＴＦ）及び／または他の分子で処理される。いくつかの実施形態では、タンパク質発現を一過的に変化させることができるＴＦ及び／または

他の分子は、腫瘍抗原の発現の変化及び／またはＴＩＬ集団における腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の数の変化を提供する。

【２１７９】

ある特定の実施形態では、方法は、ＴＩＬ集団を遺伝子編集することを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、及び／または第３のＴＩＬ集団を遺伝子編集することを含む。

【２１８０】

いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のタンパク質の発現の促進または１つ以上のタンパク質の発現の阻害、ならびに一組のタンパク質の促進及び別の組のタンパク質の阻害の両方の組み合わせの同時発生のために、リボ核酸（ＲＮＡ）挿入、例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）または低分子（もしくは短）干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）のＴＩＬ集団への挿入などのヌクレオチド挿入を介する遺伝子編集を含む。

【２１８１】

いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、タンパク質発現の一過性の変化を受ける。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８（特に、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に示されるステップＡから取得されたＴＩＬ集団を含む、第１の拡張前のバルクＴＩＬ集団において起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８（例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に示される、例えば、ステップＢで拡張されたＴＩＬ集団におけるものを含む、第１の拡張中に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、ステップＢから取得され、ステップＣに含まれるＴＩＬ集団である、例えば、第１の拡張と第２の拡張との間の移行中のＴＩＬ集団（例えば、本明細書に記載の第２のＴＩＬ集団）を含む、第１の拡張後に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＣから取得され、ステップＤでのその拡張前のＴＩＬ集団を含む、第２の拡張前のバルクＴＩＬ集団において起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＤで拡張されたＴＩＬ集団（例えば、第３のＴＩＬ集団）を含む、第２の拡張中に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＤでの拡張から取得されたＴＩＬ集団を含む、第２の拡張後に起こる。

【２１８２】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、エレクトロポレーションステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｔｓｏｎｇ，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．１９９１，６０，２９７－３０６及び米国特許出願公開第２０１４／０２２７２３７Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法（リン酸カルシウムＤＮＡ沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス）は、当該技術分野で知られており、Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９７３，５２，４５６－４６７、Ｗｉｇｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１９７９，７６，１３７３－１３７６、及びＣｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｒｅａ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１９８７，７，２７４５－２７５２、ならびに米国特許第５，５９３，８７５号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リポソームトランスフェクションステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質Ｎ－［１－（２，３－ジオレイル

オキシ）プロピル］－ｎ，ｎ，ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）及びジオレオイルホスホチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム製剤を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Ｒｏｓｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１９９１，１０，５２０－５２５及びＦｅｌｇｎｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８７，８４，７４１３－７４１７、ならびに米国特許第５，２７９，８３３号、同第５，９０８，６３５号、同第６，０５６，９３８号、同第６，１１０，４９０号、同第６，５３４，４８４号、及び同第７，６８７，０７０号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、米国特許第５，７６６，９０２号、同第６，０２５，３３７号、同第６，４１０，５１７号、同第６，４７５，９９４号、及び同第７，１８９，７０５号に記載されている方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【２１８３】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、幹細胞メモリーＴ細胞（ＴＳＣＭ）の増加をもたらす。ＴＳＣＭは、抗原を経験したセントラルメモリーＴ細胞の初期前駆細胞である。ＴＳＣＭは、一般に、幹細胞を定義する長期生存、自己再生、及び多分化能を示し、一般に、効果的なＴＩＬ製品の生成に望ましいものである。ＴＳＣＭは、養子細胞移植のマウスモデルにおいて他のＴ細胞サブセットと比較して増強された抗腫瘍活性を示している。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、高い割合のＴＳＣＭを含む組成を有するＴＩＬ集団をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＳＣＭパーセンテージの少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＬ集団中のＴＳＣＭの少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、または１０倍の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％のＴＳＣＭを有するＴＩＬ集団をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％のＴＳＣＭを有する治療的ＴＩＬ集団をもたらす。

【２１８４】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、抗原を経験したＴ細胞の幼若化をもたらす。いくつかの実施形態では、幼若化には、例えば、増加した増殖、増加したＴ細胞活性化、及び／または増加した抗原認識が含まれる。

【２１８５】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のＴＣＲレパートリーを保存するために、Ｔ細胞の大部分における発現を変化させる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のＴＣＲレパートリーを変化させない。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のＴＣＲレパートリーを維持する。

【２１８６】
いくつかの実施形態では、タンパク質の一過性の変化は、特定の遺伝子の発現の変化をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１（ＰＤＣＤ１またはＣＣ２７９とも称される）、ＴＧＦＢＲ２、ＣＣＲ４／５、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）、ＣＩＳＨ、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ　１／２　ＩＣＤ、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβ、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＳＣＲ３、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、ＣＣＬ１７、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＶＨＬ、ＣＤ４４、ＰＩＫ３ＣＤ、ＳＯＣＳ１、胸腺細胞選択関連高移動度群（ＨＭＧ）ボックス（ＴＯＸ）、アンキリンリピートドメイン１１（ＡＮＫＲＤ１１）、ＢＣＬ６コリプレッサー（ＢＣＯＲ）、及び／またはｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）を含むが、これらに限定されない遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＴＧＦＢＲ２、ＣＣＲ４／５、ＣＴＬＡ－４、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）、ＣＩＳＨ、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ　１／２　ＩＣＤ、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβ、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＳＣＲ３、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、ＣＣＬ１７、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＶＨＬ、ＣＤ４４、ＰＩＫ３ＣＤ、ＳＯＣＳ１、胸腺細胞選択関連高移動度群（ＨＭＧ）ボックス（ＴＯＸ）、アンキリンリピートドメイン１１（ＡＮＫＲＤ１１）、ＢＣＬ６コリプレッサー（ＢＣＯＲ）、及び／またはｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）からなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦＢＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ４／５を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－１２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－１５を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＥＴ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦβを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ４を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ５を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＲ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＳＣＲ３を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）を標的とする。いくつかの実施形態では、タン

パク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＬ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＬ８を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ２２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ１７を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ＶＨＬを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ４４を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＩＫ３ＣＤを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＳＯＣＳ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、胸腺細胞選択関連高移動度群（ＨＭＧ）ボックス（ＴＯＸ）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、アンキリンリピートドメイン１１（ＡＮＫＲＤ１１）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ＢＣＬ６コリプレッサー（ＢＣＯＲ）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）を標的とする。

【２１８７】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、一過性タンパク質発現によって過剰発現されるケモカイン受容体は、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１、ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、及び／またはＣＣＬ１７を含むが、これらに限定されないリガンドを有する受容体を含む。

【２１８８】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＣＢＬＢ、ＣＩＳＨ、ＴＩＭ－３、ＬＡＧ－３、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、及び／またはＴＧＦβの発現の低下及び／または減少をもたらす（例えば、ＴＧＦβ経路の遮断をもたらすことを含む）。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ－３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ－３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＥＴ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦβＲ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦβの発現の低下及び／または減少をもたらす。

【２１８９】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、腫瘍部位へのＴＩＬの輸送または移動を改善するために、ケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ１、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、及び／またはＣＳＣＲ３からなる群から選択されるケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【２１９０】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、インターロイキンの発現

の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１からなる群から選択されるインターロイキンの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【２１９１】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＶＨＬの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ４４の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＩＫ３ＣＤの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＳＯＣＳ１の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【２１９２】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）の発現の減少及び／または低減をもたらす。

【２１９３】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される２つの分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ならびにＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される１つの分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２及びそれらの組み合わせの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ならびにＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、及びそれらの組み合わせのうちの１つの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＬＡＧ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＴＩＭ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＴＥＴ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＬＡＧ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＣＢＬＢの発現の減少及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＴＩＭ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タン

パク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＴＥＴ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＣＢＬＢの発現の減少及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＴＩＭ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＴＥＴ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨ及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨ及びＴＩＭ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨ及びＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨ及びＴＥＴ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＢＬＢ及びＴＩＭ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＢＬＢ及びＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＢＬＢ及びＴＥＴ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＰＤ－１の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＬＡＧ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＣＢＬＢの発現の減少及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＴＩＧＩＴの発現の減少及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＴＥＴ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。

【２１９４】

いくつかの実施形態では、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される接着分子は、ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法によって、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団に挿入される（例えば、接着分子の発現が増加する）。

【２１９５】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の低下及び／または減少、ならびにＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせの発現の増加及び／または増強をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の減少及び／または低減、ならびにＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせの発現の増加及び／または増強をもたらす。

【２１９６】

いくつかの実施形態では、発現が約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約

７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９５％減少する。いくつかの実施形態では、少なくとも約９９％の発現の低減がある。

【２１９７】

いくつかの実施形態では、発現が約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９０％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９５％増加する。いくつかの実施形態では、少なくとも約９９％の発現の増加がある。

【２１９８】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＬにおけるタンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子（ＴＦ）及び／または他の分子でのＴＩＬの処理によって誘導される。いくつかの実施形態では、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームが、タンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子（ＴＦ）及び／または他の分子の細胞内送達のために用いられる。かかる方法は、転写因子を含むタンパク質をＴ細胞を含む様々な初代ヒト細胞に送達する能力を示す（これらは、米国特許出願公開第２０１９／００９３０７３　Ａ１号、同第２０１８／０２０１８８９　Ａ１号、及び同第２０１９／００１７０７２　Ａ１号、ならびにＳｈａｒｅｉ　ｅｔ　ａｌ．ＰＮＡＳ　２０１３、及びＳｈａｒｅｉ　ｅｔ　ａｌ．ＰＬＯＳ　ＯＮＥ　２０１５、及びＧｒｅｉｓｂｅｃｋ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　ｖｏｌ．１９５，２０１５に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）。かかる方法は、ＴＩＬ集団を、転写因子（ＴＦ）及び／または一過性タンパク質発現を誘導することができる他の分子に曝露するために本発明で用いることができ、一過性タンパク質発現を誘導することができる当該ＴＦ及び／または他の分子は、腫瘍抗原の発現の増加及び／またはＴＩＬ集団における腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の数の増加をもたらし、それ故に、ＴＩＬ集団の再プログラミング及び再プログラミングされていないＴＩＬ集団と比較して再プログラミングされたＴＩＬ集団の治療的有効性の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、本明細書に記載されるように、ＴＩＬ開始集団またはＴＩＬ前集団（すなわち、再プログラミング前の）集団と比較して、エフェクターＴ細胞及び／またはセントラルメモリーＴ細胞の亜集団の増加をもたらす。

【２１９９】

いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）には、ＴＣＦ－１、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤ、及び／またはＭＹＢが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＴＣＦ－１である。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤである。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＭＹＢである。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、さらなるＴＩＬ再プログラミングを誘導するために、市販のＫＮＯＣＫＯＵＴ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（Ｇｉｂｃｏ／ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）などの誘導多能性幹細胞培養物（ｉＰＳＣ）とともに投与される。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、さらなるＴ

ＩＬ再プログラミングを誘導するために、ｉＰＳＣカクテルとともに投与される。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ｉＰＳＣカクテルなしで投与される。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、ＴＳＣＭのパーセンテージの増加をもたらす。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、ＴＳＣＭのパーセンテージの約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％のＴＳＣＭの増加をもたらす。

【２２００】

いくつかの実施形態では、上記のようにタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、ＴＩＬの集団を遺伝子修飾する方法と組み合わせられてもよく、１つ以上のタンパク質の産生のための遺伝子の安定した組み込みステップを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾するステップを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、及び／または第３のＴＩＬ集団を遺伝子修飾することを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レトロウイルス形質導入ステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レンチウイルス形質導入ステップを含む。レンチウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｌｅｖｉｎｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ‘ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．２００６，１０３，１７３７２－７７、Ｚｕｆｆｅｒｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９７，１５，８７１－７５、Ｄｕｌｌ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　１９９８，７２，８４６３－７１、及び米国特許第６，６２７，４４２号（それらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、ガンマレトロウイルス形質導入ステップを含む。ガンマレトロウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｃｅｐｋｏ　ａｎｄ　Ｐｅａｒ，Ｃｕｒ．Ｐｒｏｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９６，９．９．１－９．９．１６に記載されており、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入ステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入系は、当該技術分野で知られており、トランスポザーゼが、ＤＮＡ発現ベクターとしてまたは発現可能なＲＮＡもしくはタンパク質として提供される系を含み、これにより、トランスポザーゼ、例えば、ｍＲＮＡ（例えば、キャップ及びポリＡ尾部を含むｍＲＮＡ）として提供されるトランスポザーゼの長期発現がトランスジェニック細胞で起こらないようになる。ＳＢ１０、ＳＢ１１、及びＳＢ１００ｘなどのサケ科型Ｔｅｌ様トランスポザーゼ（ＳＢまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼ）を含む好適なトランスポゾン媒介遺伝子導入系、ならびに増加した酵素活性を有する操作された酵素は、例えば、Ｈａｃｋｅｔｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ　２０１０，１８，６７４－８３及び米国特許第６，４８９，４５８号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【２２０１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ中のタンパク質発現の一過性変化は、短干渉ＲＮＡまたはサイレンシングＲＮＡとして知られることもある、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）は、一般に１９～２５塩基対長の二本鎖ＲＮＡ分子である。ｓｉＲＮＡは、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）において使用され、相補的なヌクレオチド配列を有する特定の遺伝子の発現に干渉する。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、発現の低下である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬにおけるタンパク質発現の一過性の変化は、高パーセンテージの２’－ＯＨ置換（典型的にはフッ素または－ＯＣＨ３）を有する化学的に合成された非対称ｓｉＲＮＡ二重鎖である自己送達ＲＮＡ干渉（ｓｄＲＮＡ）によって誘導され、これはテトラエチレングリコール（ＴＥＧ）リンカーを使用してその３’末端でコレステロールに複合された、２０ヌクレオチドアンチセンス（ガイド）鎖及び１３～１５塩基センス（パッセンジャー）鎖を含む。短干渉ＲＮＡまたはサイレンシングＲＮＡとして知られることもある、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）は、一般に１９～２５塩基対長の

二本鎖ＲＮＡ分子である。ｓｉＲＮＡは、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）において使用され、相補的なヌクレオチド配列を有する特定の遺伝子の発現に干渉する。ｓｄＲＮＡは、共有結合及び疎水的に修飾されたＲＮＡｉ化合物であり、細胞に侵入するために送達媒体を必要としない。ｓｄＲＮＡは、一般に、最小限の二本鎖領域を有する非対称の化学修飾された核酸分子である。ｓｄＲＮＡ分子は、典型的に一本鎖領域及び二本鎖領域を含み、分子の一本鎖領域及び二本鎖領域の両方に様々な化学修飾を含み得る。加えて、ｓｄＲＮＡ分子は、本明細書に記載されているように、従来の高度なステロール型分子などの疎水性複合体に結合することができる。ｓｄＲＮＡ及びかかるｓｄＲＮＡを作製するための関連方法は、例えば、米国特許出願公開第２０１６／０３０４８７３　Ａ１号、同第２０１９／０２１１３３７　Ａ１号、同第２０１９／００４８３４１　Ａ１号、及び同第２０１９／００４８３４１　Ａ１号、ならびに米国特許第１０，６３３，６５４号及び同第１０，９１３，９４８　Ｂ２号（これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）にも広く記載されている。ｓｄＲＮＡ構造、化学、標的化位置、配列の好み等を最適化するために、ｓｄＲＮＡ力価予測用のアルゴリズムが開発及び利用されている。これらの分析に基づいて、機能的なｓｄＲＮＡ配列は、概して、１μＭの濃度で７０％を超える発現の低減を有すると定義されており、確率は４０％を超える。

【２２０２】

二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＲＮＡ）は、一般に、ＲＮＡの相補鎖の対、一般にセンス（パッセンジャー）鎖及びアンチセンス（ガイド）鎖を含む任意の分子を定義するために使用することができ、一本鎖オーバーハング領域を含み得る。ｓｉＲＮＡとは対照的に、ｄｓＲＮＡという用語は、一般に、ダイサーを含む切断酵素系の作用によりより大きいｄｓＲＮＡ分子から放出されるｓｉＲＮＡ分子の配列を含む前駆体分子を指す。

【２２０３】

いくつかの実施形態では、方法は、ＣＣＲを発現するように修飾されたＴＩＬを含むＴＩＬ集団におけるタンパク質発現の一過性変化を含み、例えば、テトラエチレングリコール（ＴＥＧ）リンカーを使用して２０ヌクレオチドアンチセンス（ガイド）鎖及び３’末端でコレステロールにコンジュゲートされた１３～１５塩基センス（パッセンジャー）鎖を含む、高いパーセンテージの２’－ＯＨ置換（典型的にはフッ素または－ＯＣＨ$_3$）を有する化学的に合成された非対称ｓｉＲＮＡ二本鎖である、自己送達ＲＮＡ干渉（ｓｄＲＮＡ）の使用を含む。ｓｉＲＮＡ及びｓｄＲＮＡを使用する方法は、Ｋｈｖｏｒｏｖａ ａｎｄ Ｗａｔｔｓ，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１７，３５，２３８－２４８、Ｂｙｒｎｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｏｃｕｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．２０１３，２９，８５５－８６４、及びＬｉｇｔｅｎｂｅｒｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１８，２６，１４８２－９３（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡの送達は、エレクトロポレーションまたは細胞膜破壊（スクイーズまたはＳＱＺ法など）を使用して達成される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡの送達は、エレクトロポレーション、ＳＱＺ、または他の方法を使用せず、代わりに、ＴＩＬ集団が培地中１μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。ある特定の実施形態では、方法は、ＴＩＬ集団を培地中１μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度のｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡに１～３日間曝露することを含む、ＴＩＬ集団への送達またはｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中１０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中５０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中０．１μＭ／１０，０００ＴＩＬ～５０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、ＴＩ

Ｌ集団へのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中０．１μＭ／１０，０００ＴＩＬ～５０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成され、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡへの曝露は、新鮮なｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡを培地に追加することによって、２回、３回、４回、または５回行われる。他の好適なプロセスは、例えば、米国特許出願公開第２０１１／００３９９１４Ａ１号、同第２０１３／０１３１１４１Ａ１号、及び同第２０１３／０１３１１４２Ａ１号、ならびに米国特許第９，０８０，１７１号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【２２０４】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、製造中にＴＩＬ集団に挿入される。いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡは、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤ、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４　ＴＩＭ－３、ＬＡＧ－３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβ、ＴＧＦＢＲ２、ｃＡＭＰプロテインキナーゼＡ（ＰＫＡ）、ＢＡＦＦ　ＢＲ３、ＣＩＳＨ、及び／またはＣＢＬＢに干渉するＲＮＡをコードする。いくつかの実施形態では、発現の減少は、例えば、フローサイトメトリー及び／またはｑＰＣＲによって評価される、遺伝子サイレンシングのパーセンテージに基づいて決定される。いくつかの実施形態では、発現が約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９５％減少する。いくつかの実施形態では、少なくとも約９９％の発現の低減がある。

【２２０５】

ｓｉＲＮＡの化学修飾に基づく自己送達可能なＲＮＡｉ技術を本発明の方法とともに用いて、本明細書に記載されるように、ｓｄＲＮＡをＴＩＬに首尾よく送達することができる。非対称ｓｉＲＮＡ構造及び疎水性リガンドとの骨格修飾の組み合わせ（例えば、Ｌｉｇｔｅｎｂｅｒｇ，ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１８，２６，１４８２－９３及び米国特許出願公開第２０１６／０３０４８７３　Ａ１（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）を参照）は、ｓｄＲＮＡのヌクレアーゼ安定性を利用して、培養培地に単純に添加することによって、追加の製剤及び方法なしに、ｓｄＲＮＡが培養された哺乳類細胞に浸透することを可能にする。この安定性により、単に培地中のｓｄＲＮＡの活性濃度を維持することによって、標的遺伝子活性の一定レベルのＲＮＡｉを介した減少を支援することができる。理論に拘束されないが、ｓｄＲＮＡの骨格安定化は、非分裂細胞で数か月間続く可能性のある遺伝子発現効果の延長された低減を提供する。

【２２０６】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの９５％を超えるトランスフェクション効率及び様々な特定のｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡによる標的の発現の減少が起こる。いくつかの実施形態では、いくつかの未修飾リボース残基を含むｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＲＮＡｉ効果の効力及び／または寿命を増加させるために、完全に修飾された配列で置き換えられた。いくつかの実施形態では、発現効果の減少は、１２時間、２４時間、３６時間、４８時間、５日間、６日間、７日間、または８日間以上維持される。いくつかの実施形態では、発現効果の減少は、ＴＩＬのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ処理後１０日以上で低下する。いくつかの実施形態では、標的発現の発現の７０％を超える減少が維持される。いくつかの実施形態では、標的発現の発現の７０％を超える減少が維持されるＴＩＬ。いくつ

かの実施形態では、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１経路における発現の減少により、ＴＩＬがより強力なインビボ効果を示すことが可能になり、これは、いくつかの実施形態では、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１経路の抑制効果の回避に起因する。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡによるＰＤ－１の発現の低減は、ＴＩＬ増殖の増加をもたらす。

【２２０７】

いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の７０％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の７５％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の８０％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の８５％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の９０％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の９５％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の９９％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．２５μＭ～約４μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約４．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低減を示す。

【２２０８】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチド剤は、治療剤の安定性及び／または有効性を増加させ、かつ治療される細胞または組織へのオリゴヌクレオチドの効率的な送達をもたらすための１つ以上の修飾を含む。かかる修飾には、２’－Ｏ－メチル修飾、２’－Ｏ－フルロ修飾、ジホスホロチオエート修飾、２’Ｆ修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－メチル修飾、及び／または２’デオキシヌクレオチドが含まれ得る。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、例えば、ステロール、コレステロール、ビタミンＤ、ナフチル、イソブチル、ベンジル、インドール、トリプトファン、及び／またはフェニルを含む１つ以上の疎水性修飾を含むように修飾される。いくつかの実施形

態では、化学修飾ヌクレオチドは、ホスホロチオエート、２’－Ｏ－メチル、２’デオキシ、疎水性修飾及びホスホロチオエートの組み合わせである。いくつかの実施形態では、糖が修飾され得、修飾された糖には、Ｄ－リボース、２’－Ｏ－アルキル（２’－Ｏ－メチル及び２’－０－エチルを含む）、すなわち、２’－アルコキシ、２’－アミノ、２’－Ｓ－アルキル、２’－ハロ（２’－フルオロを含む）、Ｔ－メトキシエトキシ、２’－アリルオキシ（－ＯＣＨ$_2$ＣＨ＝ＣＨ$_2$）、２’－プロパルギル、２’－プロピル、エチニル、エテニル、プロペニル、及びシアノなどが含まれ得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、糖部分は、ヘキソースであり得、Ａｕｇｕｓｔｙｎｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．１９９２，１８，４７１１（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているようにオリゴヌクレオチドに組み込まれ得る。

【２２０９】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖であり、すなわち、分子のいずれかの末端にも一本鎖配列が突出しておらず、すなわち、平滑末端である。いくつかの実施形態では、個々の核酸分子は、異なる長さであり得る。言い換えれば、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖ではない。例えば、２つの別個の核酸分子が使用される場合、アンチセンス配列を含むそれらの分子の一方、例えば、第１の分子は、それにハイブリダイズする（分子の一部分を一本鎖のままにする）第２の分子よりも長い可能性がある。いくつかの実施形態では、単一の核酸分子が使用される場合、いずれかの末端の分子の一部分は、一本鎖のままであり得る。

【２２１０】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、ミスマッチ及び／またはループもしくはバルジを含むが、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約７０％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約８０％にわたって二本鎖である。他の実施形態では、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約９０％～９５％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約９６％～９８％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、少なくともまたは最大１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５個のミスマッチを含む。

【２２１１】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、例えば、米国特許第５，８４９，９０２号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように３’または５’結合を修飾することによって、ヌクレアーゼから実質的に保護され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、「ブロッキング基」を含めることによって耐性にすることができる。本明細書で使用される場合、「ブロッキング基」という用語は、合成のための保護基またはカップリング基のいずれかとして（例えば、ＦＩＴＣ、プロピル（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_3$）、グリコール（－０－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ－）ホスフェート（ＰＯ$_3$^{2}’)’、リン酸水素、もしくはホスホロアミダイト）、オリゴヌクレオチドまたはヌクレオモノマーに結合され得る置換基（例えば、ＯＨ基以外）を指す。「ブロッキング基」は、修飾ヌクレオチド及び非ヌクレオチドエキソヌクレアーゼ耐性構造を含む、オリゴヌクレオチドの５’及び３’末端を保護する「末端ブロッキング基」または「エキソヌクレアーゼブロッキング基」も含み得る。

【２２１２】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ内の隣接するポリヌクレオチドの少なくとも一部分は、置換結合、例えば、ホスホロチオエート結合によって結合されている。

【２２１３】

いくつかの実施形態では、化学修飾は、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡの細胞取り込みの少なくとも１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、または５００パーセントの増強をもたらし得る。いくつかの実施形態では、Ｃ残基またはＵ残基の少なくとも一方が疎水性修飾を含む。いくつかの実施形態では、複数のＣ及びＵが疎水性修飾を含む。いくつかの実施形態では、Ｃ及びＵの少なくとも１０％、１５％、２０％、３０％、４０％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、または少なくとも９５％が疎水性修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、Ｃ及びＵのすべてが疎水性修飾を含有する。

【２２１４】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ分子は、プロトン化可能なアミンの組み込みにより増強されたエンドソーム放出を示す。いくつかの実施形態では、プロトン化可能なアミンは、センス鎖（ＲＩＳＣ負荷後に廃棄される分子の一部分）に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明のｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ化合物は、二重鎖領域（１０～１５塩基長の効率的なＲＩＳＣ侵入に必要）及び４～１２ヌクレオチド長の一本鎖領域を１３ヌクレオチド二重鎖とともに含む非対称化合物を含む。いくつかの実施形態では、６ヌクレオチドの一本鎖領域が用いられる。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡの一本鎖領域は、２～１２個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合（ホスホロチオエート修飾と称される）を含む。いくつかの実施形態では、６～８個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合が用いられる。いくつかの実施形態では、本発明のｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ化合物は、安定性を提供し、かつＲＩＳＣ侵入と互換性がある固有の化学修飾パターンを含む。

【２２１５】

ガイド鎖は、例えば、ＲＩＳＣ侵入に干渉することなく安定性を確証する任意の化学修飾によって修飾することもできる。いくつかの実施形態では、ガイド鎖における化学修飾パターンは、２’Ｆが修飾され、かつ５’末端がリン酸化されたＣ及びＵヌクレオチドの大部分を含む。

【２２１６】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡのヌクレオチドの少なくとも３０％が修飾されている。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡのヌクレオチドの少なくとも３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％が修飾されている。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡのヌクレオチドの１００％が修飾されている。

【２２１７】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ分子は、最小の二本鎖領域を有する。いくつかの実施形態では、二本鎖である分子の領域は、８～１５ヌクレオチド長の範囲である。いくつかの実施形態では、二本鎖である分子の領域は、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、二本鎖領域は、１３ヌクレオチド長である。ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に１００％の相補性が存在する場合もあれば、ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に１つ以上の不一致が存在する場合もある。いくつかの実施形態では、二本鎖分子の一端で、分子は、平滑末

端であるか、または１ヌクレオチドのオーバーハングを有するかのいずれかである。分子の一本鎖領域は、いくつかの実施形態では、４～１２ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２ヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、４ヌクレオチド長未満または１２ヌクレオチド長超であることもできる。ある特定の実施形態では、一本鎖領域は、６または７ヌクレオチド長である。

【２２１８】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ分子は、増加した安定性を有する。いくつかの事例では、化学修飾されたｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ分子は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４時間以上、または２４時間超（任意の中間値を含む）の培地中での半減期を有する。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、１２時間以上の培地中での半減期を有する。

【２２１９】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、効力の増加及び／または毒性の低減のために最適化されている。いくつかの実施形態では、ガイド鎖及び／またはパッセンジャー鎖のヌクレオチド長、及び／またはガイド鎖及び／またはパッセンジャー鎖におけるホスホロチオエート修飾の数が、いくつかの態様では、ＲＮＡ分子の効力に影響を与え得る一方で、２’－フルオロ（２’Ｆ）修飾の２’－０－メチル（２’ＯＭｅ）修飾での置き換えは、いくつかの態様では、分子の毒性に影響を与え得る。いくつかの実施形態では、分子の２’Ｆ含有量の減少は、分子の毒性を低減すると予測される。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ分子におけるホスホロチオエート修飾の数は、細胞への分子の取り込み、例えば、細胞への分子の受動的取り込みの効率に影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、２’Ｆ修飾を有しないが、それにもかかわらず、細胞取り込み及び組織浸透における同等の有効性を特徴とする。

【２２２０】

いくつかの実施形態では、ガイド鎖は、およそ１８～１９ヌクレオチド長であり、およそ２～１４個のリン酸修飾を有する。例えば、ガイド鎖は、リン酸修飾された２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４個、または１４個超のヌクレオチドを含み得る。ガイド鎖は、ＲＩＳＣの侵入に干渉することなく増加した安定性を付与する１つ以上の修飾を含み得る。ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドなどのリン酸修飾ヌクレオチドは、３’末端にあるか、５’末端にあるか、またはガイド鎖全体に広がっている可能性がある。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の３’末端１０ヌクレオチドは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを含む。ガイド鎖は、分子全体に位置し得る２’Ｆ及び／または２’ＯＭｅ修飾も含み得る。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の１位のヌクレオチド（ガイド鎖の最も５’側のヌクレオチド）は、２’ＯＭｅ修飾及び／またはリン酸化されている。ガイド鎖内のＣ及びＵヌクレオチドは、２’Ｆ修飾されていてもよい。例えば、１９ｎｔガイド鎖の２～１０位（または異なる長さのガイド鎖における対応する位置）のＣ及びＵヌクレオチドは、２’Ｆ修飾されていてもよい。ガイド鎖内のＣ及びＵヌクレオチドは、２’ＯＭｅ修飾されている場合もある。例えば、１９ｎｔガイド鎖の１１～１８位（または異なる長さのガイド鎖における対応する位置）のＣ及びＵヌクレオチドは、２’ＯＭｅ修飾されていてもよい。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の最も３’側の末端のヌクレオチドは修飾されていない。ある特定の実施形態では、ガイド鎖内のＣ及びＵの大部分は２’Ｆ修飾されており、ガイド鎖の５’末端はリン酸化されている。他の実施形態では、１位及び１１～１８位のＣまたはＵは２’ＯＭｅ修飾されており、ガイド鎖の５’末端はリン酸化されている。他の実施形態では、位置１及び位置１１～１８のＣｓまたはＵｓは２’ＯＭｅ修飾されており、ガイド鎖の５’末端はリン酸化されており、２～１０位のＣまたはＵは２’Ｆ修飾されている。

【２２２１】

自己送達可能なＲＮＡｉ技術は、追加の製剤または技法を必要とすることなくＲＮＡｉ剤（ｓｉＲＮＡ、ｓｄＲＮＡ、または他のＲＮＡｉ剤のいずれか）で細胞を直接トランスフェクトする方法を提供する。トランスフェクションが困難な細胞株をトランスフェクトする能力、高いインビボ活性、及び使用の単純さは、従来のｓｉＲＮＡベースの技法に優る重大な機能的利点を提示する組成物及び方法の特徴であり、したがって、ｓｄＲＮＡ法は、本発明のＴＩＬにおける標的遺伝子の発現を減少させる方法に関連するいくつかの実施形態で用いられる。ｓｄＲＮＡ法により、化学合成された化合物をエクスビボ及びインビボの両方で広範囲の一次細胞及び組織に直接送達することが可能になる。本明細書における本発明のいくつかの実施形態に記載のｓｄＲＮＡは、Ａｄｖｉｒｎａ　ＬＬＣ（Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ，ＭＡ，ＵＳＡ）から市販されている。

【２２２２】

ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、疎水的に修飾されたｓｉＲＮＡ－アンチセンスオリゴヌクレオチドハイブリッド構造として形成され得、例えば、Ｂｙｒｎｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｏｃｕｌａｒ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｅｕｔ．，２０１３，２９，８５５－８６４（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている。

【２２２３】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、滅菌エレクトロポレーションを使用して本明細書に記載のＴＩＬに送達され得る。ある特定の実施形態では、方法は、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドを送達するためにＴＩＬ集団の滅菌エレクトロポレーションを含む。

【２２２４】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、膜貫通送達システムと組み合わせて細胞に送達され得る。いくつかの実施形態では、この膜貫通送達システムは、脂質、ウイルスベクターなどを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド剤は、自己送達ＲＮＡｉ剤であり、いかなる送達剤も必要としない。特定の実施形態では、方法は、ＴＩＬの集団にｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドを送達するための膜貫通送達システムの使用を含む。

【２２２５】

オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド組成物は、本明細書に記載のＴＩＬと接触し（例えば、接触させられ、本明細書では投与または送達されるとも称される）、ＴＩＬによって取り込まれる（ＴＩＬによる受動的取り込みを含む）。ｓｄＲＮＡは、第１の拡張中（例えば、ステップＢ）、第１の拡張後（例えば、ステップＣ中）、第２の拡張前または拡張中（例えば、ステップＤの前またはステップＤ中）、ステップＤ後及びステップＥにおける採取前、ステップＦにおける採取中または採取後、ステップＦにおける最終製剤化及び／または注入バッグへの移行前または採取中、ならびにステップＦにおける任意選択の凍結保存ステップ前に、本明細書に記載のＴＩＬに添加され得る。さらに、ｓｄＲＮＡは、ステップＦにおける任意の凍結保存ステップから解凍した後に添加され得る。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の１つ以上のｓｄＲＮＡ標的遺伝子が、１００ｎＭ～２０ｍＭ、２００ｎＭ～１０ｍＭ、５００ｎｍ～１ｍＭ、１μＭ～１００μＭ、及び１μＭ～１００μＭからなる群から選択される濃度でＴＩＬ及び他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の１つ以上のｓｄＲＮＡ標的遺伝子は、０．１μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、０．５μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、０．７５μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、１μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、１．２５μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、１．５μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、２μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、５μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、または１０μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，００

０ＴＩＬ／１００μＬ培地からなる群から選択される量でＴＩＬ及び他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の１つ以上のｓｄＲＮＡ標的遺伝子は、ＲＥＰ前段階またはＲＥＰ段階中に１日２回、１日１回、２日毎、３日毎、４日毎、５日毎、６日毎、または７日毎にＴＩＬ培養物に添加され得る。

【２２２６】

ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡを含む本発明のオリゴヌクレオチド組成物は、例えば、細胞培養培地にｓｄＲＮＡを高濃度で溶解し、かつ受動的取り込みが起こるのに十分な時間を許容することによって、増殖プロセス中に本明細書に記載のＴＩＬと接触することができる。ある特定の実施形態では、本発明の方法は、ＴＩＬ集団を、本明細書に記載のオリゴヌクレオチド組成物と接触させることを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、オリゴヌクレオチド、例えば、ｓｄＲＮＡを細胞培養培地に溶解することと、細胞培養培地をＴＩＬ集団と接触させることとを含む。ＴＩＬは、本明細書に記載の第１の集団、第２の集団、及び／または第３の集団であり得る。

【２２２７】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの細胞への送達は、リン酸カルシウム、ＤＭＳＯ、グリセロールもしくはデキストラン、エレクトロポレーションを含む好適な技術分野で認識される方法によって、またはトランスフェクションによって、例えば、当該技術分野で知られている方法、例えば、米国特許第４，８９７，３５５号、同第５，４５９，１２７号、同第５，６３１，２３７号、同第５，９５５，３６５号、同第５，９７６，５６７号、同第１０，０８７，４６４号、及び同第１０，１５５，９４５号、ならびにＢｅｒｇａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１９９３，２１，３５６７（それらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載される方法を使用して、カチオン性、アニオン性、もしくは中性脂質組成物またはリポソームを使用して増強され得る。

【２２２８】

いくつかの実施形態では、１つを超えるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡが、標的遺伝子の発現を減少させるために使用されるいくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２及び／またはＣＩＳＨを標的とするｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡのうちの１つ以上が一緒に使用される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１　ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、１つを超える遺伝子標的の発現を減少させるために、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２及び／またはＣＩＳＨのうちの１つ以上とともに使用される。いくつかの実施形態では、ＬＡＧ３　ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、両方の標的の遺伝子発現を減少させるために、ＣＩＳＨを標的とするｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡと組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、ＴＩＧＩＴ　ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、両方の標的の遺伝子発現を低減させるために、ＰＤ－１を標的とするｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡと組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、ＣＩＳＨ　ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、両方の標的の遺伝子発現を低減させるために、ＰＤ－１を標的とするｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡと組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４　ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、両方の標的の遺伝子発現を低減させるために、ＰＤ－１を標的とするｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡと組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、ＬＡＧ－３　ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、両方の標的の遺伝子発現を低減させるために、ＰＤ－１を標的とするｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡと組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、ＣＢＬ－Ｂ　ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、両方の標的の遺伝子発現を低減させるために、ＰＤ－１を標的とするｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡと組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、本明細書におけるＰＤ－１、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２及び／またはＣＩＳＨのうちの１つ以上を標的とするｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、Ａｄｖｉｒｎａ　ＬＬＣ（Ｗｏ

ｒｃｅｓｔｅｒ，ＭＡ，ＵＳＡ）または複数の他のベンダーから市販されている。

【２２２９】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、別のｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、及びそれらの組み合わせから選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ならびにＬＡＧ３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２のうちの１つ、及びそれらの組み合わせから選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＥＴ２を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＥＴ２を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＥＴ２を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標

的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＥＴ２を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＥＴ２を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＥＴ２を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＥＴ２を標的とする。

【２２３０】

本明細書で考察されたように、本発明の実施形態は、それらの治療効果を増強するために遺伝子編集を介して遺伝子修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を提供する。本発明の実施形態は、１つ以上のタンパク質の発現の促進及び１つ以上のタンパク質の発現の阻害の両方、ならびにそれらの組み合わせのために、ＴＩＬ集団へのヌクレオチド挿入（ＲＮＡまたはＤＮＡ）による遺伝子編集を包含する。本発明の実施形態は、ＴＩＬを治療用集団に拡張するための方法も提供し、方法は、ＴＩＬを遺伝子編集することを含む。ＴＩＬ集団を遺伝子修飾するために使用され得るいくつかの遺伝子編集技術が存在し、それらは本発明による使用に好適である。かかる方法は、以下に記載の方法、ならびに本明細書の他の場所に記載のウイルス及びトランスポゾン方法を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを遺伝子修飾してＣＣＲを発現させる方法はまた、かかる遺伝子の安定したノックアウトまたはかかる遺伝子の一過性ノックダウンのいずれかを介して遺伝子の発現を抑制する修飾を含んでもよい。

【２２３１】

いくつかの実施形態では、この方法は、本明細書に記載の第１の集団、第２の集団、及び／または第３の集団におけるＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、１つ以上のタンパク質の産生または阻害（例えば、サイレンシング）のために遺伝子の安定した組み込みステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、エレクトロポレーションステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｔｓｏｎｇ，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．１９９１，６０，２９７－３０６及び米国特許出願公開第２０１４／０２２７２３７Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。米国特許第５，０１９，０３４号、同第５，１２８，２５７号、同第５，１３７，８１７号、同第５，１７３，１５８号、同第５，２３２，８５６号、同第５，２７３，５２５号、同第５，３０４，１２０号、同第５，３１８，５１４号、同第６，０１０，６１３号、及び同第６，０７８，４９０号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどの当該技術分野で知られている他のエレクトロ

ポレーション法が使用され得る。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、滅菌エレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルスエレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる、及び（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬにおける細孔形成を誘導するステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる、及び（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なり、これにより、誘導された細孔が比較的長期間にわたって持続され、ＴＩＬの生存率が維持される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法（リン酸カルシウムＤＮＡ沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス）は、当該技術分野で知られており、Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９７３，５２，４５６－４６７、Ｗｉｇｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１９７９，７６，１３７３－１３７６、及びＣｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｒｅａ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１９８７，７，２７４５－２７５２、ならびに米国特許第５，５９３，８７５号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、リポソームトランスフェクションステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質Ｎ－［１－（２，３

－ジオレイルオキシ）プロピル］－ｎ，ｎ，ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）及びジオレオイルホスホチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム製剤を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Ｒｏｓｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １９９１，１０，５２０－５２５及びＦｅｌｇｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８７，８４，７４１３－７４１７、ならびに米国特許第５，２７９，８３３号、同第５，９０８，６３５号、同第６，０５６，９３８号、同第６，１１０，４９０号、同第６，５３４，４８４号、及び同第７，６８７，０７０号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、米国特許第５，７６６，９０２号、同第６，０２５，３３７号、同第６，４１０，５１７号、同第６，４７５，９９４号、及び同第７，１８９，７０５号に記載の方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＴＩＬは、本明細書に記載のＴＩＬの第１の集団、第２の集団、及び／または第３の集団であり得る。

【２２３２】

ある実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。かかるプログラム可能なヌクレアーゼは、特定のゲノム遺伝子座に切断を導入することによって正確なゲノム編集を可能にし、すなわち、ゲノム内の特定のＤＮＡ配列の認識に依存して、ヌクレアーゼドメインをこの位置に標的し、標的配列での二本鎖切断の生成を媒介する。ＤＮＡの二本鎖切断は、その後、内因性修復機構を切断部位に動員して、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）または相同指向修復（ＨＤＲ）のいずれかによるゲノム編集を媒介する。したがって、切断の修復は、標的遺伝子産物を破壊する（例えば、サイレンス、抑制、または増強する）挿入／欠失変異の導入をもたらす可能性がある。

【２２３３】

部位特異的ゲノム編集を可能にするために開発されたヌクレアーゼの主要なクラスには、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写活性化因子様ヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、及びＣＲＩＳＰＲ関連ヌクレアーゼ（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９）が含まれる。これらのヌクレアーゼシステムは、ＤＮＡ認識のモードに基づいて大きく２つのカテゴリーに分類され得、ＺＦＮ及びＴＡＬＥＮは、タンパク質－ＤＮＡ相互作用を介して特定のＤＮＡ結合を達成するが、Ｃａｓ９などのＣＲＩＳＰＲシステムは、標的ＤＮＡと直接塩基対を形成する短いＲＮＡガイド分子によって、かつタンパク質－ＤＮＡ相互作用によって特定のＤＮＡ配列を標的とする。例えば、Ｃｏｘ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２０１５，Ｖｏｌ．２１，Ｎｏ．２を参照されたい。

【２２３４】

本発明のＴＩＬ拡張法に従って使用され得る遺伝子編集法の非限定的な例には、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、及びＺＦＮ法が含まれ、これらは以下でより詳細に説明される。ある実施形態によれば、ＴＩＬを治療用集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、Ｇｅｎ３）に従って、または米国特許出願公開第２０２０／０２９９６４４ Ａ１号及び同第２０２０／０１２１７１９ Ａ１号、ならびに米国特許第１０，９２５，９００号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように実行することができ、方法は、増強された治療効果を提供することができるＴＩＬを生成するために、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはＺＦＮ法のうちの１つ以上によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。ある実施形態によれば、遺伝子編集されたＴＩＬは、インビトロでそれらを修飾されていないＴＩＬと比較することによって、例えば、修飾されていないＴＩＬと比較してインビトロでのエフェクター機能、サイトカインプロファイルなどを評価することによって、治療効果の改善について評価され得る。ある特定の実施形態では、この方法は、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、及び／またはＺＦＮ法を使用してＴＩＬ集団を遺伝子編集することを含む。

【２２３５】
本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションは、ＣＲＩＳＰＲシステム、ＴＡＬＥＮシステム、及びＺＦＮシステムなどの遺伝子編集システムの送達のために使用される。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、フローエレクトロポレーションシステムである。本発明のいくつかの実施形態との使用に好適な、好適なフローエレクトロポレーションシステムの例は、市販のＭａｘＣｙｔｅ　ＳＴＸシステムである。本発明との使用に好適であり得る、ＢＴＸ－Ｈａｒｖａｒｄ　Ａｐｐａｒａｔｕｓから入手可能なＡｇｉｌｅＰｕｌｓｅシステムもしくはＥＣＭ８３０、Ｃｅｌｌａｘｅｓｓ　Ｅｌｅｋｔｒａ（Ｃｅｌｌｅｃｔｒｉｃｏｎ）、Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（Ｌｏｎｚａ／Ａｍａｘａ）、ＧｅｎｅＰｕｌｓｅｒ　ＭＸｃｅｌｌ（ＢＩＯＲＡＤ）、ｉＰｏｒａｔｏｒ－９６（Ｐｒｉｍａｘ）、またはｓｉＰＯＲＴｅｒ９６（Ａｍｂｉｏｎ）などのいくつかの代替の市販エレクトロポレーション機器が存在する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、ＴＩＬ拡張法の残りとともに、閉鎖した滅菌系を形成する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、本明細書に記載のパルスエレクトロポレーションシステムであり、ＴＩＬ拡張法の残りとともに、閉鎖した滅菌系を形成する。
【２２３６】
ＴＩＬを治療用集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、Ｇｅｎ２）に従って、または米国特許出願公開第２０２０／０２９９６４４　Ａ１号及び同第２０２０／０１２１７１９　Ａ１号、ならびに米国特許第１０，９２５，９００号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように実施することができ、方法は、ＣＲＩＳＰＲ法（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１）によってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣＲＩＳＰＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは減少させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣＲＩＳＰＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。
【２２３７】
ＣＲＩＳＰＲは、「ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ　ｒｅｇｕｌａｒｌｙ　ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ　ｓｈｏｒｔ　ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ　ｒｅｐｅａｔｓ（クラスター化された定期的に間隔をあけた短いパリンドロミックリピート）」の略語である。遺伝子編集のためにＣＲＩＳＰＲシステムを使用する方法は、本明細書ではＣＲＩＳＰＲ法とも称される。ＲＮＡ及びＣａｓタンパク質を組み込み、かつ本発明に従って使用され得るＣＲＩＳＰＲシステムには、３つの型：Ｉ型、ＩＩ型、及びＩＩＩ型がある。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ（Ｃａｓ９によって例示される）は、最もよく特徴付けられているシステムのうちの１つである。
【２２３８】
ＣＲＩＳＰＲ技術は、細菌及び古細菌（単細胞微生物のドメイン）の自然防御機構から適合された。これらの生物は、ＣＲＩＳＰＲ由来のＲＮＡ及びＣａｓ９を含む様々なＣａｓタンパク質を使用して、外来侵入物のＤＮＡを切り刻んで破壊することによって、ウイルス及び他の異物による攻撃を阻止する。ＣＲＩＳＰＲは、ヌクレオチド反復配列及びスペーサーの存在という２つの異なる特徴を有するＤＮＡの特殊な領域である。ヌクレオチドの反復配列は、ＣＲＩＳＰＲ領域全体に分布しており、外来ＤＮＡ（スペーサー）の短いセグメントが反復配列の間に散在している。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムでは、スペーサーは、ＣＲＩＳＰＲゲノム遺伝子座内に組み込まれ、転写され、短いＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）に処理される。これらのｃｒＲＮＡは、トランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）にアニーリングし、Ｃａｓタンパク質による病原性ＤＮＡの配列特異的切断及びサイレンシングを指示する。Ｃａｓ９タンパク質による標的認識には、ｃｒＲＮＡ内の「シード」配列、及びｃｒＲＮＡ結合領域の上流にある保存されたジヌクレオチドを含むプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列が必要である。これによ

り、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムが再標的されて、ｃｒＲＮＡを再設計することにより、実質的にいずれのＤＮＡ配列も切断することができる。天然システムにおけるｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、遺伝子操作で使用するために、およそ１００ヌクレオチドの単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）に簡略化され得る。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼを発現するプラスミドと必要なｃｒＲＮＡ成分を同時送達することにより、ヒト細胞に直接運搬可能である。Ｃａｓタンパク質の異なるバリアント（例えば、Ｃｐｆ１などのＣａｓ９のオルソログ）を使用して、標的の制限を低減することができる。

【２２３９】

ＣＲＩＳＰＲ法を介してＴＩＬを永久に遺伝子編集することによってサイレンシングまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例としては、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが挙げられる。

【２２４０】

ＣＲＩＳＰＲ法を介してＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例としは、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－２１が挙げられる。

【２２４１】

ＣＲＩＳＰＲ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第８，６９７，３５９号、同第８，９９３，２３３号、同第８，７９５，９６５号、同第８，７７１，９４５号、同第８，８８９，３５６号、同第８，８６５，４０６号、同第８，９９９，６４１号、同第８，９４５，８３９号、同第８，９３２，８１４号、同第８，８７１，４４５号、同第８，９０６，６１６号、及び同第８，８９５，３０８号に記載されており、各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１を発現するためのプラスミドなどのＣＲＩＳＰＲ法を行うための資源は、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔなどの企業から市販されている。

【２２４２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＴＩＬ集団の遺伝子修飾は、米国特許第９７９０４９０号に記載されているＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１システムを使用して行われ得、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【２２４３】

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、Ｇｅｎ２）に従って、または米国特許出願公開第２０２０／０２９９６４４　Ａ１号及び同第２０２０／０１２１７１９　Ａ１号、ならびに米国特許第１０，９２５，９００号に記載されているように実施することができ、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれ、方法は、ＴＡＬＥ法によってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部分においてサイレンスまたは減少させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の

少なくとも一部において増強させる。

【２２４４】

ＴＡＬＥは、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ「」）を含む、転写活性化因子様エフェクター「」タンパク質を表す。遺伝子編集のためにＴＡＬＥシステムを使用する方法は、本明細書ではＴＡＬＥ法とも称され得る。ＴＡＬＥは、植物病原菌Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ属由来の天然に存在するタンパク質であり、各々単一の塩基対を認識する一連の３３～３５アミノ酸反復ドメインで構成されるＤＮＡ結合ドメインを含む。ＴＡＬＥ特異性は、反復可変二残基（ＲＶＤ）として知られる２つの超可変アミノ酸によって決定される。モジュラーＴＡＬＥ反復配列は、隣接するＤＮＡ配列を認識するために一緒に結合される。ＤＮＡ結合ドメイン内の特定のＲＶＤは、標的遺伝子座内の塩基を認識し、予測可能なＤＮＡ結合ドメインを組み立てるための構造的特徴を提供する。ＴＡＬＥのＤＮＡ結合ドメインは、ＩＩＳ型ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼの触媒ドメインに融合して、標的可能なＴＡＬＥヌクレアーゼを作製する。部位特異的変異を誘導するために、１４～２０塩基対のスペーサー領域によって分離された２つの個々のＴＡＬＥＮアームがＦｏｋＩモノマーを密接に接近させて二量体化し、標的とされる二本鎖切断を産生する。

【２２４５】

様々な組み立て方法を利用したいくつかの大規模な系統的研究により、ＴＡＬＥ反復配列を組み合わせて、実質的にすべてのユーザ定義配列を認識することができることが示されている。カスタム設計されたＴＡＬＥアレイも、Ｃｅｌｌｅｃｔｉｓ Ｂｉｏｒｅｓｅａｒｃｈ（Ｐａｒｉｓ，Ｆｒａｎｃｅ）、Ｔｒａｎｓｐｏｓａｇｅｎ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ，ＫＹ，ＵＳＡ）、及びＬｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ，ＵＳＡ）から市販されている。本発明での使用に好適なＴＡＬＥ法及びＴＡＬＥＮ法は、米国特許公開第２０１１／０２０１１１８　Ａ１号、同第２０１３／０１１７８６９　Ａ１号、同第２０１３／０３１５８８４　Ａ１号、同第２０１５／０２０３８７１　Ａ１号、及び同第２０１６／０１２０９０６　Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【２２４６】

ＴＡＬＥ法を介してＴＩＬを永久に遺伝子編集することによってサイレンシングまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例としては、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが挙げられる。

【２２４７】

ＴＡＬＥ法を介してＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例としは、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－２１が挙げられる。

【２２４８】

ＴＡＬＥ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第８，５８６，５２６号に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【２２４９】

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態に従って、または米国特許出願公開第２０２０／０２９９６４４　Ａ１号及び同第２０２０／０１２１７１９　Ａ１号、ならびに米国特許第１０，９２５，９００号に記載されているように実施することができ、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれ、方法は、ジンクフィンガーまたはジンクフィンガーヌクレアーゼ法によってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは減少させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。

【２２５０】

個々のジンクフィンガーは、保存されたββα立体配置でおよそ３０個のアミノ酸を含む。αらせんの表面上のいくつかのアミノ酸は、典型的には、異なる選択性レベルでＤＮＡの主溝の３ｂｐと接触する。ジンクフィンガーは、２つのタンパク質ドメインを有する。第１のドメインは、ＤＮＡ結合ドメインであり、真核生物転写因子を含み、ジンクフィンガーを含む。第２のドメインは、ヌクレアーゼドメインであり、ＦｏｋＩ制限酵素を含み、ＤＮＡの触媒的切断を担っている。

【２２５１】

個々のＺＦＮのＤＮＡ結合ドメインは、典型的には、３～６個の個々のジンクフィンガー反復配列を含み、各々９～１８塩基対を認識することができる。ジンクフィンガードメインが目的の標的部位に特異的である場合、合計１８塩基対を認識する３フィンガーＺＦＮの対でさえ、理論的には、哺乳動物ゲノムの単一遺伝子座を標的とすることができる。新たなジンクフィンガーアレイを生成するための１つの方法は、既知の特異性を有するより小さいジンクフィンガー「モジュール」を組み合わせることである。最も一般的なモジュラーアセンブリプロセスは、各々３塩基対のＤＮＡ配列を認識することができる３つの別個のジンクフィンガーを組み合わせて、９塩基対の標的部位を認識することができる３フィンガーアレイを生成することを含む。あるいは、オリゴマー化プールエンジニアリング（ＯＰＥＮ）などの選択ベースのアプローチを使用して、隣接するフィンガー間のコンテキスト依存的相互作用を考慮したランダム化ライブラリーから新たなジンクフィンガーアレイを選択することができる。操作されたジンクフィンガーは、Ｓａｎｇａｍｏ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｒｉｃｈｍｏｎｄ，ＣＡ，ＵＳＡ）及びＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＵＳＡ）から市販されている。

【２２５２】

ジンクフィンガー法を介してＴＩＬを永久に遺伝子編集することによってサイレンシングまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例としては、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが挙げられる。

【２２５３】

ジンクフィンガー法を介してＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例としは、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－２１が挙げられる。

【２２５４】
ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第６，５３４，２６１号、同第６，６０７，８８２号、同第６，７４６，８３８号、同第６，７９４，１３６号、同第６，８２４，９７８号、同第６，８６６，９９７号、同第６，９３３，１１３号、同第６，９７９，５３９号、同第７，０１３，２１９号、同第７，０３０，２１５号、同第７，２２０，７１９号、同第７，２４１，５７３号、同第７，２４１，５７４号、同第７，５８５，８４９号、同第７，５９５，３７６号、同第６，９０３，１８５号、及び同第６，４７９，６２６号に記載されており、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。
【２２５５】
ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の他の例は、Ｂｅａｎｅ，ｅｔａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１５，２３　１３８０－１３９０に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。
【２２５６】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、高親和性ＴＣＲ、例えば、ＭＡＧＥ－１、ＨＥＲ２、もしくはＮＹ－ＥＳＯ－１などの腫瘍関連抗原で標的とされるＴＣＲ、または腫瘍関連細胞表面分子（例えば、メソセリン）もしくは系統制限細胞表面分子（例えば、ＣＤ１９）に結合するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含むが、これらに限定されない追加の機能を含むように任意選択で遺伝子操作される。いくつかの実施形態では、この方法は、高親和性ＴＣＲ、例えば、ＭＡＧＥ－１、ＨＥＲ２、もしくはＮＹ－ＥＳＯ－１などの腫瘍関連抗原で標的とされるＴＣＲ、または腫瘍関連細胞表面分子（例えば、メソセリン）もしくは系統制限細胞表面分子（例えば、ＣＤ１９）に結合するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含むようにＴＩＬ集団を遺伝子操作することを含む。適切には、ＴＩＬ集団は、本明細書に記載の第１の集団、第２の集団、及び／または第３の集団であり得る。
【２２５７】
Ｅ．ＴＩＬ製造のための閉鎖系
本発明は、ＴＩＬ培養プロセス中に閉鎖系の使用を提供する。かかる閉鎖系は、微生物汚染の防止及び／または低減を可能にし、より少数のフラスコの使用を可能にし、コスト削減を可能にする。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、２つの容器を使用する。
【２２５８】
かかる閉鎖系は当該技術分野でよく知られており、例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｆｄａ．ｇｏｖ／ｃｂｅｒ／ｇｕｉｄｅｌｉｎｅｓ．ｈｔｍ及びｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｆｄａ．ｇｏｖ／ＢｉｏｌｏｇｉｃｓＢｌｏｏｄＶａｃｃｉｎｅｓ／ＧｕｉｄａｎｃｅＣｏｍｐｌｉａｎｃｅＲｅｇｕｌａｔｏｒｙＩｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ／Ｇｕｉｄａｎｃｅｓ／Ｂｌｏｏｄ／ｕｃｍ０７６７７９．ｈｔｍで見つけることができる。
【２２５９】
滅菌接続装置（ＳＴＣＤ）は、互換性のある２本の管間の滅菌溶接をもたらす。この手順により、様々な容器と管径との滅菌接続が可能になる。いくつかの実施形態では、閉鎖系には、実施例に記載のルアーロック系及びヒートシール系が含まれる。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、閉鎖系の無菌性及び閉鎖性を維持するために、滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、実施例２１に記載の閉鎖系が用いられる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、実施例「」において本明細書に記載される方法に従って、最終製品製剤容器に製剤化される。
【２２６０】
いくつかの実施形態では、閉鎖系は、腫瘍断片が得られてから、ＴＩＬを患者に投与するかまたは凍結保存する準備が整うまで、１つの容器を使用する。いくつかの実施形態では、２つの容器が使用される場合、第１の容器は密閉Ｇ容器であり、ＴＩＬ集団が遠心分離され、第１の密閉Ｇ容器を開かずに注入バッグに移される。いくつかの実施形態では、

２つの容器が使用される場合、注入バッグは、ＨｙｐｏＴｈｅｒｍｏｓｏｌを含有する注入バッグである。閉鎖系または閉鎖ＴＩＬ細胞培養系は、腫瘍試料及び／または腫瘍断片が追加されると、系が外部からしっかりと密閉され、細菌、真菌、及び／またはいずれの他の微生物汚染も侵入しない閉鎖環境を形成することを特徴とする。

【２２６１】

いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％～約１００％である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％～約９５％である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％～約９０％である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約１０％～約９０％である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約１５％～約８５％である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％、約１０％、約１５％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、約９７％、約９８％、約９９％、または約１００％である。

【２２６２】

閉鎖系は、微生物汚染の不在下で及び／または微生物汚染が大幅に低減された状態で、ＴＩＬの成長を可能にする。

【２２６３】

さらに、ＴＩＬ細胞培養環境のｐＨ、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧は各々、細胞が培養されるにつれて変化する。したがって、細胞培養に適切な培地を循環させても、ＴＩＬ増殖に最適な環境として閉鎖環境を常に一定に維持する必要がある。この目的のために、閉鎖環境の培養液中のｐＨ、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧の物理的要因がセンサーによって監視されること、そのシグナルが培養環境の入口に設置されたガス交換器を制御するために使用されること、及び閉鎖環境のガス分圧が細胞培養環境を最適化するように培養液の変化に応じてリアルタイムで調整されることが望ましい。いくつかの実施形態では、本発明は、閉鎖環境のｐＨ、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧を測定する監視装置を備えたガス交換器を閉鎖環境の入口に組み込み、かつ監視装置からのシグナルに基づいてガス濃度を自動的に調整することによって細胞培養環境を最適化する閉鎖細胞培養系を提供する。

【２２６４】

いくつかの実施形態では、閉鎖環境内の圧力は、連続的または断続的に制御される。すなわち、閉鎖環境内の圧力を、例えば、圧力維持装置によって変化させることができ、それ故に、空間が正圧状態でＴＩＬの成長に好適であることを確実にするか、または負圧状態で流体の浸出を促進し、ひいては細胞増殖を促進する。さらに、負圧を断続的に加えることにより、閉鎖環境内の体積の一時的な収縮によって、閉鎖環境内の循環液体を均一かつ効率的に置き換えることが可能である。

【２２６５】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの増殖に最適な培養成分を置換または追加することができ、ＩＬ－２及び／またはＯＫＴ３などの因子、ならびに組み合わせを追加することができる。

【２２６６】

Ｆ．ＴＩＬの任意選択の凍結保存

バルクＴＩＬ集団（例えば、第２のＴＩＬ集団）または拡張されたＴＩＬ集団（例えば、第３のＴＩＬ集団）のいずれかを、任意選択で凍結保存することができる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、治療的ＴＩＬ集団に起こる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、第２の拡張後に採取されたＴＩＬに起こる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、図１及び／または８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）の例示的なステップＦにおいてＴＩＬに対して起こる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、注入バッグ内で凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、注入バッグに入れる前に凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、

凍結保存され、注入バッグに入っていない。いくつかの実施形態では、凍結保存は、凍結保存培地を使用して行われる。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含有する。これは、一般に、ＴＩＬ集団を凍結溶液、例えば、８５％補体不活性化ＡＢ血清及び１５％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に入れることによって達成される。溶液中の細胞が極低温バイアルに入れられ、－８０℃で２４時間保存され、任意選択で凍結保存のためにガス状窒素冷凍庫に移される。Ｓａｄｅｇｈｉ，ｅｔａｌ．，Ａｃｔａ　Ｏｎｃｏｌｏｇｉｃａ　２０１３，５２，９７８－９８６を参照されたい。

【２２６７】

適切な場合、細胞が冷凍庫から取り出され、溶液のおよそ５分の４が解凍されるまで３７℃の水浴中で解凍される。細胞は、一般に、完全培地中に再懸濁され、任意で１回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍されたＴＩＬは、当該技術分野で知られているように計数され、生存率について評価され得る。

【２２６８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、ＣＳ１０凍結保存培地（ＣｒｙｏＳｔｏｒ１０、ＢｉｏＬｉｆｅ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ）を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含有する凍結保存培地を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、１：１（体積：体積）比のＣＳ１０及び細胞培養培地を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、約１：１（体積：体積）比のＣＳ１０及び細胞培養培地を使用して凍結保存され、追加のＩＬ－２をさらに含む。

【２２６９】

上で考察されたように、図１及び／または８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に示されるステップＡ～Ｅで例示されるように、凍結保存は、ＴＩＬ拡張プロセス全体を通して様々な時点で起こり得る。いくつかの実施形態では、第１の拡張後の拡張されたＴＩＬ集団（例えば、ステップＢに従って提供される、または図１もしくは８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄのステップ Ｄによる１つ以上の第２の拡張後の拡張されたＴＩＬ集団）は、凍結保存され得る。凍結保存は、一般に、ＴＩＬ集団を凍結溶液、例えば、８５％補体不活性化ＡＢ血清及び１５％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に入れることによって達成され得る。溶液中の細胞が極低温バイアルに入れられ、－８０℃で２４時間保存され、任意選択で凍結保存のためにガス状窒素冷凍庫に移される。Ｓａｄｅｇｈｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｃｔａ　Ｏｎｃｏｌｏｇｉｃａ　２０１３，５２，９７８－９８６を参照されたい。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、５％　ＤＭＳＯ中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、５％　ＤＭＳＯを加えた細胞培養培地中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、実施例６に提供される方法に従って凍結保存される。

【２２７０】

適切な場合、細胞が冷凍庫から取り出され、溶液のおよそ５分の４が解凍されるまで３７℃の水浴中で解凍される。細胞は、一般に、完全培地中に再懸濁され、任意で１回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍されたＴＩＬは、当該技術分野で知られているように計数され、生存率について評価され得る。

【２２７１】

場合によっては、図１または８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）からのステップＢのＴＩＬ集団は、以下に論じられるプロトコルを使用して、直ちに凍結保存され得る。代替的に、バルクＴＩＬ集団は、図１または８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ

及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）からのステップＣ及びステップＤに供され、その後、図１または８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）からのステップＤの後に凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾されたＴＩＬが療法に使用される場合、図１または８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）からのステップＢまたはステップＤのＴＩＬ集団は、好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。

【２２７２】

Ｇ．拡張ＴＩＬの表現型特徴

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書及び実施例に記載されているものを含む、拡張後の多数の表現型マーカーの発現について分析される。いくつかの実施形態では、１つ以上の表現型マーカーの発現が調べられる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）からのステップＢにおける第１の拡張後に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）からのステップＣにおける移行中に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）からのステップＣによる移行中及び凍結保存後に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）からのステップＤによる第２の拡張後に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）からのステップＤによる２つ以上の拡張後に分析される。

【２２７３】

いくつかの実施形態では、マーカーは、ＣＤ８及びＣＤ２８からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＣＤ８の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、ＣＤ２８の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、ＣＤ８及び／またはＣＤ２８の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄに提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に提供される２Ａプロセスと比較して、本発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、ＣＤ８の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば図８Ｂに提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に提供される２Ａプロセスと比較して、本発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、ＣＤ２８の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に提供されるＧｅｎ３プロセス、例えば図８（特に、例えば、図８Ａ）に提供される２Ａプロ

セスと比較して）と比較して、本発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、高いＣＤ２８発現は、より若く、より持続的なＴＩＬ表現型を示す。いくつかの実施形態では、１つ以上の調節マーカーの発現が測定される。

【２２７４】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８及び／またはＣＤ２８に基づく第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、第３のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団の選択は、本明細書に記載の腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を拡張するための方法のいずれのステップ中にも行われない。

【２２７５】

いくつかの実施形態では、セントラルメモリー細胞のパーセンテージは、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に提供されるＧｅｎ３プロセス、例えば図８（特に、例えば、図８Ａ）に提供される２Ａプロセスと比較して）と比較して、本発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、セントラルメモリー細胞のメモリーマーカーは、ＣＣＲ７及びＣＤ６２Ｌからなる群から選択される。

【２２７６】

いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬメモリーサブセットは、異なるメモリーサブセットに分類され得る。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、ナイーブ（ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＤ６２Ｌ＋）ＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、セントラルメモリー（ＣＭ、ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ６２Ｌ＋）ＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、エフェクターメモリー（ＥＭ、ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ６２Ｌ－）ＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、ＲＡ＋エフェクターメモリー／エフェクター（ＴＥＭＲＡ／ＴＥＦＦ、ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＤ６２Ｌ＋）ＴＩＬを含む。

【２２７７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、グランザイムＢ、パーフォリン、及びグラニュライシンからなる群から選択されるもう１つのマーカーを発現する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、グランザイムＢを発現する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、パーフォリンを発現する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、グラニュライシンを発現する。

【２２７８】

いくつかの実施形態では、再刺激されたＴＩＬは、サイトカイン放出アッセイを使用して、サイトカイン放出についても評価され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、インターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）分泌について評価され得る。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、ＥＬＩＳＡアッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に提供されるステップＤの後の急速な第２の拡張ステップ後にＥＬＩＳＡアッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの健康は、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）分泌によって測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、活性なＴＩＬを示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ産生の効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能の別の尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、ＣＤ３、ＣＤ２８、及びＣＤ１３７／４－１ＢＢに対する抗体で刺激されたＴＩＬの培地中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することによって測定され得る。これらの刺激されたＴＩＬからの培地中のＩＦＮ－γレベルは、ＩＦＮ－γ放出を測定することによって決定され得る。いくつかの実施形態では、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ）に提供される２Ａプロセスのステップと比較した、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に提供される、

例えば、Ｇｅｎ３プロセスのステップ Ｄ のＴＩＬにおけるＩＦＮ－γ産生の増加は、ステップＤのＴＩＬの細胞傷害能の増加を示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、３倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、４倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、５倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＥＬＩＳＡキットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、エクスビボでのＴＩＬ中で測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば図８Ｂの方法を含む、本発明の方法によって産生されたＴＩＬを含む、ＴＩＬにおいてエクスビボで測定される。

【２２７９】

いくつかの実施形態では、少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【２２８０】

いくつかの実施形態では、少なくとも１００ｐｇ／ｍＬ～約１０００ｐｇ／ｍＬ以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも２５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも３００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも３５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも４００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも４５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも５５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも６００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも６５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも７００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも７５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも８００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも８５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも９００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも９５０ｐｇ／ｍＬ、または少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬ以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／ま

たは図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである

。いくつかの実施形態では、少なくとも６０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１５，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２５，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３５，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４５，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【２２８１】

いくつかの実施形態では、少なくとも１００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも２５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも３００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも３５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも４００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも４５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも５５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも６００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも６５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも７００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも７５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも８００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも８５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも９００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも９５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、または少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方

法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１５，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２５，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び

／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３５，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４５，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【２２８２】

Ｔリンパ球及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、及びＣ（一定）は、免疫グロブリン及びＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬ及び／または例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に具体化される方法以外の方法を含む、本明細書に提供される方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬ及び／または図８（特に、例えば図８Ａ）に例示されるようにＧｅｎ２と称される方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第１の拡張で取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、ＴＣＲαβ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセス（例えば、Ｇｅｎ３プロセス）は、他のプロセス、例えば、試料中の固有のペプチドＣＤＲの数に基づくＧｅｎ２と称されるプロセスと比較して、より高いクローン多様性を示す。

【２２８３】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬの活性化及び疲弊は、１つ以上のマーカーを調べることによって決定され得る。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊は、多色フローサイトメトリーを使用して決定され得る。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊のマーカーには、ＣＤ３、ＰＤ－１、２Ｂ４／ＣＤ２４４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＢＴＬＡ、ＫＬＲＧ、ＴＩＭ－３、ＣＤ１９４／ＣＣＲ４、ＣＤ４、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ１８３、ＣＤ６９、ＣＤ９５、ＣＤ１２７、ＣＤ１０３、及び／またはＬＡＧ－３）からなる群から選択される１つ以上のマーカーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊のマーカーには、ＢＴＬＡ、ＣＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、Ｋｉ６７、ＬＡＧ－３、ＰＤ－１、ＴＩＧＩＴ、及び／またはＴＩＭ－３からなる群から選択される１つ以上のマーカーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊のマーカーには、ＢＴＬＡ、ＣＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、Ｋｉ６７、ＬＡＧ－３、ＣＤ１０３＋／ＣＤ６９＋、ＣＤ１０３＋／ＣＤ６９－、ＰＤ－１、ＴＩＧＩＴ及び／またはＴＩＭ－３からなる群から選択される１つ以上のマーカーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞マーカー（活性化及び疲弊マーカーを含む）は、Ｔ細胞の活性化、阻害、または機能を調べるために決定及び／または分析され得る。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞マーカーには、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ３、ＦｏｘＰ３、Ｔｉｍ－３、ＰＤ－１、ＣＤ１０３、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＢＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、Ｋｉ６７、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ４５、ＣＤ４、及び／またはＣＤ５９からなる群から選択される１つ以上のマーカーが含まれ得るが、これらに限定されない。

【２２８４】
いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超～３０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ以上のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、５０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、７０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、９０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１１０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１５０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１７０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１９０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、４００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、６００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、８００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１２００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１４００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１６００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１８００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２２００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２４００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２６０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２８００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、３０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超またはそれ以上のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、５０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、７０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、９０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグ

ランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１１０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１５０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１７０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１９０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、４００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、６００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、８００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１２００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１４００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１６００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／また

は図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１８００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２２０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２４０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２６０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２８０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超～３０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ以上のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、５０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、７０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、９０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１１０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１５０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１７０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１９０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、４００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、６００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、８００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１２００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１４００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１６００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１８０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２２０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２４０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２６０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２８０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、３０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超またはそれ以上のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、５０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または

図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、７０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、９０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１１０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１５０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１７０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１９０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、４００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、６００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、８００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１２００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

いくつかの実施形態では、１４００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１６００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１８００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２２０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２４０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２６０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２８０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【２２８５】

いくつかの実施形態では、１０００ｐｇ／ｍＬ超～３０００００ｐｇ／ｍＬ以上のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００ｐｇ／ｍＬ超、２０００ｐｇ／ｍＬ超、３０００ｐｇ／ｍＬ超、４０００ｐｇ／ｍＬ超、５０００ｐｇ／ｍＬ超、６０００ｐｇ／ｍＬ超、７０００ｐｇ／ｍＬ超、８０００ｐｇ／ｍＬ超、９０００ｐｇ／ｍＬ超、１００００ｐｇ／ｍＬ超、２００００ｐｇ／ｍＬ超、３００００ｐｇ／ｍＬ超、４００００ｐｇ／ｍＬ超、５００００ｐｇ／ｍＬ超、６００００ｐｇ／ｍＬ超、７００００ｐｇ／ｍＬ超、８００００ｐｇ／ｍＬ超、９００００ｐｇ／ｍＬ超、１０００００ｐｇ／ｍＬ超またはそれ以上のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／

または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、４０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、５０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、６０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、７０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、８０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、９０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、４００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、５００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、６００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明

の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、７００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、８００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、９００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１００００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１２０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１４０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬであるＴＩＬグランザイムＢである。いくつかの実施形態では、１６０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１８０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２２０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２４０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２６０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２８０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３００００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及

び／または図４８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【２２８６】

いくつかの実施形態では、本発明の拡張方法は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄに提供されるＴＩＬを含む、インビトロで増加したグランザイムＢ分泌を示す拡張されたＴＩＬ集団を産生する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも１倍～５０倍以上増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、１倍、少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、少なくとも９倍、少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも３０倍、少なくとも４０倍、少なくとも５０倍以上増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも１倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも２倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも３倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも４倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも５倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも６倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも７倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも８倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも９倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも１０倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも２０倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも３０倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも４０倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも５０倍増加する。

【２２８７】

いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上低いレベルのＴＮＦ－α（すなわち、ＴＮＦ－アルファ）分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも１倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも２倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの

方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも３倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも４倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも５倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【２２８８】

いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α（すなわち、ＴＮＦ－アルファ）分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７０００ｐｇ／ｍＬ

／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【２２８９】

いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ及びグランザイムＢのレベルを測定して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬの表現型特性を決定する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ及びＴＮＦ－αのレベルを測定して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬの表現型特性を決定する。いくつかの実施形態では、グランザイムＢ及びＴＮＦ－αのレベルを測定して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬの表現型特性を決定する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ、グランザイムＢ、及びＴＮＦ－αのレベルを測定して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬの表現型特性を決定する。

【２２９０】

いくつかの実施形態では、表現型特徴付けは、凍結保存後に調べられる。

【２２９１】

Ｈ．追加のプロセスの実施形態

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、（ａ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行うことであって、プライミングによる第１の拡張を約１～７日間または約１～８日間行って第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、プライミングによる第１の拡張を行うことと、（ｃ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地と接触させて急速な第２の拡張を行って第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張を約１～１１日間または約１～１０日間行って第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間、または約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）小規模培養由来の第２の

ＴＩＬ集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ容器に移すこととによって、培養のスケールアップを達成し、第２の容器内で、小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団が、より大規模な培養で約４～７日間、または約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、第２の小規模培養で約４～７日間、または約約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間、または約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約４～７日間、または約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の増殖を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約５～７日間培養される。

【２２９２】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、（ａ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行うことであって、プライミングによる第１の拡張が約１～８日間行われて第２のＴＩＬ集団が取得され、第２のＴＩＬ集団は第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、プライミングによる第１の拡張を行うことと、（ｃ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が約１～８日間行われて第３のＴＩＬ集団が取得され、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移すこととによって、培養のスケールアップを達成し、第２の容器内で、小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団が、より大規模な培養で約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２

の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、第２の小規模培養で約４～６日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の増殖を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約４～６日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の増殖を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約４～５日間培養される。

【２２９３】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、（ａ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行うことであって、プライミングによる第１の拡張が約１～７日間行われ、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団は第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、プライミングによる第１の拡張を行うことと、（ｃ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が約１～１１日間行われ、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の増殖を行うことと、その後、（２）小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移すこととによって、培養のスケールアップを達成し、第２の容器内で、小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、第２の小規模培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡張ステップは、複数のステッ

プに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の増殖を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約４日間培養することによって急速な第２の増殖を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約５日間培養される。

【２２９４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団を、外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）をさらに含む培養培地と接触させることによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）における培養培地中のＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）における培養培地中のＡＰＣの数よりも多い、方法を提供する。

【２２９５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において培養培地に追加の外因性ＡＰＣが補充されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２９６】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２０：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２９７】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２９８】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約９：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２９９】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約８：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３００】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約７：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落の

うちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３０１】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約６：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３０２】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３０３】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３０４】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３０５】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３０６】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３０７】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３０８】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３０９】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３１０】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段

落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３１１】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３１２】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３１３】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３１４】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３１５】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３１６】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３１７】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３１８】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３１９】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３２０】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落の

うちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３２１】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３２２】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３２３】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３２４】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３２５】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３２６】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３２７】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３２８】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１になるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３２９】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．１：１、２．２：１、２．３：１、２．４：１、２．５：１、２．６：１、２．７：１、２．８：１、２．９：１、３：１、３．１：１、３．２：１、３．３：１、３．４：１、３．５：１、３．６：１、３．７：１、３．８：１、３．９：１、４：１、４．１：１、４．２：１、４．３：１、４．４：１、４．５：１、４．６：１、４．７：１、４．８：１、４．９：１、または５：１になるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３３０】
他の実施形態では、本発明は、一次の第１の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約1×10^8、1.1×10^8、1.2×10^8、1.3×10^8、1.4×10^8、1.5×10^8、1.6×10^8、1.7×10^8、1.8×10^8、1.9×10^8、2×10^8、2.1×10^8、2.2×10^8、2.3×10^8、2.4×10^8、2.5×10^8、2.6×10^8、2.7×10^8、2.8×10^8、2.9×10^8、3×10^8、3.1×10^8、3.2×10^8、3.3×10^8、3.4×10^8、または3.5×10^8個のＡＰＣになるように、かつ急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約3.5×10^8、3.6×10^8、3.7×10^8、3.8×10^8、3.9×10^8、4×10^8、4.1×10^8、4.2×10^8、4.3×10^8、4.4×10^8、4.5×10^8、4.6×10^8、4.7×10^8、4.8×10^8、4.9×10^8、5×10^8、5.1×10^8、5.2×10^8、5.3×10^8、5.4×10^8、5.5×10^8、5.6×10^8、5.7×10^8、5.8×10^8、5.9×10^8、6×10^8、6.1×10^8、6.2×10^8、6.3×10^8、6.4×10^8、6.5×10^8、6.6×10^8、6.7×10^8、6.8×10^8、6.9×10^8、7×10^8、7.1×10^8、7.2×10^8、7.3×10^8、7.4×10^8、7.5×10^8、7.6×10^8、7.7×10^8、7.8×10^8、7.9×10^8、8×10^8、8.1×10^8、8.2×10^8、8.3×10^8、8.4×10^8、8.5×10^8、8.6×10^8、8.7×10^8、8.8×10^8、8.9×10^8、9×10^8、9.1×10^8、9.2×10^8、9.3×10^8、9.4×10^8、9.5×10^8、9.6×10^8、9.7×10^8、9.8×10^8、9.9×10^8、または1×10^9個のＡＰＣになるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３３１】
他の実施形態では、本発明は、一次の第１の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約1×10^8個のＡＰＣ～正確にまたは約3.5×10^8個のＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約3.5×10^8個のＡＰＣ～正確にまたは約1×10^9個のＡＰＣの範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３３２】
他の実施形態では、本発明は、一次の第１の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約1.5×10^8個のＡＰＣ～正確にまたは約3×10^8個のＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約4×10^8個のＡＰＣ～正確にまたは約7.5×10^8個のＡＰＣの範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３３３】
他の実施形態では、本発明は、一次の第１の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約2×10^8個のＡＰＣ～正確にまたは約2.5×10^8個のＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約4.5×10^8個のＡＰＣ～正確にまたは約5.5×10^8個のＡＰＣの範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３３４】
他の実施形態では、本発明は、正確にまたは約2.5×10^8個のＡＰＣが一次の第１の拡張に追加され、かつ正確にまたは約5×10^8個のＡＰＣが急速な第２の拡張に追加されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３３５】
他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３３６】

他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍断片が複数の別個の容器に分配され、それらの別個の容器の各々内で、第１のＴＩＬ集団がステップ（ａ）において取得され、第２のＴＩＬ集団がステップ（ｂ）において取得され、第３のＴＩＬ集団がステップ（ｃ）において取得され、ステップ（ｃ）における複数の容器からの治療的ＴＩＬ集団が組み合わせられて、ステップ（ｄ）からの採取されたＴＩＬ集団を得るように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３３７】

他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍が複数の別個の容器に均一に分配されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３３８】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が少なくとも２個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３３９】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～２０個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３４０】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～１５個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３４１】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～１０個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３４２】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～５個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３４３】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３４４】

他の実施形態では、本発明は、プライミングによる第１の拡張がステップ（ｂ）において第１のＴＩＬ集団で行われる各容器の場合、ステップ（ｃ）における急速な第２の拡張が、同じ容器内でかかる第１のＴＩＬ集団から産生された第２のＴＩＬ集団で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３４５】

他の実施形態では、本発明は、別個の容器の各々が第１のガス透過性表面積を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３４６】

他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍断片が単一の容器に分配されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３４７】

他の実施形態では、本発明は、単一の容器が第１のガス透過性表面積を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３４８】

他の実施形態では、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１細胞層～正確にまたは約３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化される、方法を提供する。

【２３４９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１．５細胞層～正確にまたは約２．５細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３５０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約２細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３５１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３５２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３細胞層～正確にまたは約１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３５３】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３５４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３５５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３５６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む第１の容器内で行われ、ステップ（ｃ）において、急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む第２の容器内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３５７】
他の実施形態では、本発明は、第２の容器が第１の容器よりも大きいように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３５８】
他の実施形態では、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１細胞層～正確にまたは

約３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化される、方法を提供する。
【２３５９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１．５細胞層～正確にまたは約２．５細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３６０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約２細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３６１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３６２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３細胞層～正確にまたは約１０細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３６３】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３６４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３６５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３６６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む第１の容器内で行われ、ステップ（ｃ）において、急速な第２の拡張が、第１の容器内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３６７】
他の実施形態では、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１細胞層～正確にまたは約３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化される、方法を提供する。
【２３６８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１．５細胞層～正確にまたは約２．５細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３６９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約２細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３７０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３７１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３細胞層～正確にまたは約１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３７２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３７３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３７４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３７５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：１０の範囲から選択される、方法を提供する。

【２３７６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．

１～正確にまたは約１：９の範囲から選択される、方法を提供する。
【２３７７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：８の範囲から選択される、方法を提供する。
【２３７８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：７の範囲から選択される、方法を提供する。
【２３７９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：６の範囲から選択される、方法を提供する。
【２３８０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：５の範囲から選択される、方法を提供する。
【２３８１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：４の範囲から選択される、方法を提供する。
【２３８２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：３の範囲から選択される、方法を提供する。
【２３８３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：２の範囲から選択される、方法を提供する。

【２３８４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．２～正確にまたは約１：８の範囲から選択される、方法を提供する。

【２３８５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．３～正確にまたは約１：７の範囲から選択される、方法を提供する。

【２３８６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．４～正確にまたは約１：６の範囲から選択される、方法を提供する。

【２３８７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．５～正確にまたは約１：５の範囲から選択される、方法を提供する。

【２３８８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．６～正確にまたは約１：４の範囲から選択される、方法を提供する。

【２３８９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われる

ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．７～正確にまたは約１：３．５の範囲から選択される、方法を提供する。

【２３９０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．８～正確にまたは約１：３の範囲から選択される、方法を提供する。

【２３９１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．９～正確にまたは約１：２．５の範囲から選択される、方法を提供する。

【２３９２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：２の範囲から選択される、方法を提供する。

【２３９３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１、１：１．２、１：１．３、１：１．４、１：１．５、１：１．６、１：１．７、１：１．８、１：１．９、１：２、１：２．１、１：２．２、１：２．３、１：２．４、１：２．５、１：２．６、１：２．７、１：２．８、１：２．９、１：３、１：３．１、１：３．２、１：３．３、１：３．４、１：３．５、１：３．６、１：３．７、１：３．８、１：３．９、１：４、１：４．１、１：４．２、１：４．３、１：４．４、１：４．５、１：４．６、１：４．７、１：４．８、１：４．９、１：５、１：５．１、１：５．２、１：５．３、１：５．４、１：５．５、１：５．６、１：５．７、１：５．８、１：５．９、１：６、１：６．１、１：６．２、１：６．３、１：６．４、１：６．５、１：６．６、１：６．７、１：６．８、１：６．９、１：７、１：７．１、１：７．２、１：７．３、１：７．４、１：７．５、１：７．６、１：７．７、１：７．８、１：７．９、１：８、１：８．１、１：８．２、１：８．３、１：８．４、１：８．５、１：８．６、１：８．７、１：８．８、１：８．９、１：９、１：９．１、１：９．２、１：９．３、１：９．４、１：９．５、１：９．６、１：９．７、１：９．８、１：９．９、または１：１０から選択される、方法を提供する。

【２３９４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団におけるＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団におけるＴＩＬの数に対する比が、約１．５：１～約１００：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３９５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数に対する比率が、正確にまたは約５０：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３９６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数に対する比率が、正確にまたは約２５：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３９７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数に対する比率が、正確にまたは約２０：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３９８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数に対する比率が、正確にまたは約１０：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３９９】
他の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団の数が、第１のＴＩＬ集団よりも少なくとも正確にまたは約５０倍多いように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４００】
他の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団の数が、第１のＴＩＬ集団よりも少なくとも正確にまたは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、または５０倍多いように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４０１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第２の期間の開始の正確にまたは約２日または正確にまたは約３日後に、細胞培養培地に追加のＩＬ－２が補充されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４０２】
他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｄ）において採取されたＴＩＬ集団を凍結保存するステップをさらに含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４０３】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）の後に、（ｅ）ステップ（ｄ）から採取したＴＩＬ集団を、任意選択でＨｙｐｏＴｈｅｒｍｏｓｏｌを含有する注入バッグに移す追加のステップを行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４０４】
他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｅ）において採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４０５】
他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスが、採取されたＴＩＬ集団の凍結保存

培地に対する１：１の比を使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４０６】

他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４０７】

他の実施形態では、本発明は、ＰＢＭＣが放射線照射され、かつ同種異系であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４０８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において細胞培養に追加されるＡＰＣの総数が２．５×１０^{8}であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４０９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において細胞培養に追加されるＡＰＣの総数が５×１０^{8}であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４１０】

他の実施形態では、本発明は、ＡＰＣがＰＢＭＣであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４１１】

他の実施形態では、本発明は、ＰＢＭＣが放射線照射され、かつ同種異系であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４１２】

他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が人工抗原提示細胞であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４１３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）での採取が膜ベースの細胞処理システムを使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４１４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）での採取がＬＯＶＯ細胞処理システムを使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４１５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４１６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約１０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４１７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約１５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４１８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約２０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４１９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約２５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４２０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約３０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４２１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約３５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４２２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約４０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４２３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約４５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４２４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約５０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４２５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、または６０個の断片（複数可）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４２６】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２７mm^3の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４２７】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２０mm^3～正確にまたは約５０mm^3の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４２８】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２１mm^3～正確にまたは約３０mm^3の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４２９】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２２mm^3～正確にまたは約２９．５mm^3の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４３０】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２３mm^3～正確にまたは約２９mm^3の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４３１】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２４ｍｍ^3～正確にまたは約２８．５ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４３２】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２５ｍｍ^3～正確にまたは約２８ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４３３】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２６．５ｍｍ^3～正確にまたは約２７．５ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４３４】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、または５０ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４３５】
他の実施形態では、本発明は、複数の断片が正確にまたは約３０～正確にまたは約６０個の断片を含み、正確にまたは約１３００ｍｍ^3～正確にまたは約１５００ｍｍ^{3}の総体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４３６】
他の実施形態では、本発明は、複数の断片が正確にまたは約５０個の断片を含み、正確にまたは約１３５０ｍｍ^{3}の総体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４３７】
他の実施形態では、本発明は、複数の断片が正確にまたは約５０個の断片を含み、正確にまたは約１グラム～正確にまたは約１．５グラムの総質量を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４３８】
他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地がＧ容器またはＸｕｒｉセルバッグである容器内に提供されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４３９】
他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地中のＩＬ－２濃度が約１０，０００ＩＵ／ｍＬ～約５０００ＩＵ／ｍＬであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４４０】
他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地中のＩＬ－２濃度が約６，０００ＩＵ／ｍＬであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４４１】
他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地がジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４４２】
他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地が７％～１０％ＤＭＳＯを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４４３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）における第１の期間が正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日の期間内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４４４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第２の期間が正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４４５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）における第１の期間及びステップ（ｃ）における第２の期間が各々、正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日の期間内に個別に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４４６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）における第１の期間及びステップ（ｃ）における第２の期間が各々、正確にまたは約５日、６日、または７日の期間内に個別に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４４７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）における第１の期間及びステップ（ｃ）における第２の期間が各々、正確にまたは約７日の期間内に個別に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４４８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４４９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４５０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１６日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４５１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１７日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４５２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日～正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４５３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日～正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４５４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１６日～正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４５５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日～正確にまたは約１６日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４５６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日～正確にまたは約１６日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４５７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４５８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４５９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１６日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４６０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４６１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４６２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４６３】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４６４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１６日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４６５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１８日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４６６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）で採取された治療的ＴＩＬ集団が、ＴＩＬの治療上有効な投与量に十分なＴＩＬを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２４６７】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量に十分なＴＩＬの数が、正確にまた

は約２．３×１０^{10}～正確にまたは約１３．７×１０^{10}であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４６８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４６９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍～５倍以上のインターフェロンガンマ産生を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４７０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍～５倍以上のインターフェロンガンマ産生を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４７１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍～５倍以上のインターフェロンガンマ産生を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４７２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）の第３のＴＩＬ集団から取得されたエフェクターＴ細胞及び／またはセントラルメモリーＴ細胞が、ステップ（ｂ）の第２の細胞集団から取得されたエフェクターＴ細胞及び／またはセントラルメモリーＴ細胞と比較して増加したＣＤ８及びＣＤ２８発現を示すように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４７３】

他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器が密閉容器であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４７４】

他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧ容器であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４７５】

他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧＲＥＸ－１０であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４７６】

他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧＲＥＸ－１００であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４７７】

他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧＲＥＸ－５００であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２４７８】

他の実施形態では、本発明は、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法によって作製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供する。

【２４７９】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ拡張が抗原提示細胞（ＡＰＣ）またはＯＫＴ３を追加せずに行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比

較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。

【２４８０】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ拡張が抗原提示細胞（ＡＰＣ）を追加せずに行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。

【２４８１】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ拡張がＯＫＴ３を追加せずに行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。

【２４８２】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ拡張が抗原提示細胞（ＡＰＣ）及びＯＫＴ３を追加した。追加せずに行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。

【２４８３】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、１６日より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。

【２４８４】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、１７日より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。

【２４８５】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、１８日より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。

【２４８６】

他の実施形態では、本発明は、増加したインターフェロンガンマ産生を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【２４８７】

他の実施形態では、本発明は、増加したポリクローン性を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載された治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【２４８８】

他の実施形態では、本発明は、増加した有効性を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【２４８９】

他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治

療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載の、または上記のステップＡ～Ｆによる（また、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄに示される）拡張プロセスによる少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【２４９０】

他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載の、または上記のステップＡ～Ｆによる（また、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄに示される）拡張プロセスによる少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【２４９１】

他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載の、または上記のステップＡ～Ｆによる（また、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄに示される）拡張プロセスによる少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【２４９２】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ拡張が抗原提示細胞（ＡＰＣ）を追加せずに行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を提供する。他の実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載の、または上記のステップＡ～Ｆによる（また、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄに示される）拡張プロセスによる少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【２４９３】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ拡張がＯＫＴ３を追加せずに行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を提供する。他の実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載の、または上記のステップＡ～Ｆによる（また、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄに示される）拡張プロセスによる少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。
【２４９４】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ拡張がＡＰＣを追加せずに行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載の、または上記のステップＡ～Ｆによる（また、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄに示される）拡張プロセスによる少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。
【２４９５】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ拡張がＯＫＴ３を追加せずに行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載の、または上記のステップＡ～Ｆによる（また、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄに示される）拡張プロセスによる少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。
【２４９６】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ拡張がＡＰＣを追加せずに行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載の、または上記のステップＡ～Ｆによる（また、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄに示される）拡張プロセスによる少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。
【２４９７】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ拡張がＯＫＴ３を追加せずに行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載の、または上記のステップＡ～Ｆによる（また、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄに示される）拡張プロセスによる少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。
【２４９８】
他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が、小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物であるように修正された、上記の該当する前の段落のいずれかに記載の方法を提供する。
【２４９９】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片がコア生検であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５００】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が細針吸引物であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５０１】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が小生検（例えば、パンチ生検を含む）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５０２】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片がコア針生検であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５０３】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から第１のＴＩＬ集団を得ることを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、約８日間にわたってプライミングによる第１の拡張を行うことを含み、かつ（ｉｖ）方法が、約１１日間にわたって急速な第２の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【２５０４】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から第１のＴＩＬ集団を得ることを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、約８日間にわたってプライミングによる第１の拡張を行うことを含み、かつ（ｉｖ）方法が、第２のＴＩＬ集団の培養物を約５日間培養し、培養物を最大５つの継代培養物に分割し、かつ継代培養物を約６日間培養することによって、急速な第２の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、最大５つの継代培養物が各々、第２のＴＩＬ集団の培養が急速な第２の拡張で開始される容器と同じサイズのまたはそれよりも大きい容器内で培養される。前述の実施形態のうちのいくつかでは、第２のＴＩＬ集団の培養物は、最大５つの継代培養物間で均等に分けられる。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【２５０５】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５０６】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５０７】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、ま

たは細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５０８】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５０９】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア生検から第１のＴＩＬ集団を得ることを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む培養培地中で約８日間培養することによってプライミングによる第１の拡張ステップを行い、第２のＴＩＬ集団を得ることを含み、かつ（ｉｖ）方法が、第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む培養培地中で約１１日間培養することによって急速な第２の拡張ステップを行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【２５１０】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５１１】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５１２】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５１３】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５１４】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５１５】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５１６】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５１７】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５１８】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５１９】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５２０】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５２１】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５２２】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５２３】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５２４】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５２５】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５２６】

いくつかの実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア生検から第１のＴＩＬ集団を得ることを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む培養培地中で約８日間培養することによってプライミングによる第１の拡張ステップを行い、第２のＴＩＬ集団を得ることを含み、かつ（ｉｖ）方法が、第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む培養培地中で約１１日間培養することによって急速な第２の拡張ステップを行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【２５２７】
いくつかの実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア生検から第１のＴＩＬ集団を取得することを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む培養培地中で約８日間培養することによってプライミングによる第１の拡張ステップを行い、第２のＴＩＬ集団を取得することを含み、かつ（ｉｖ）方法が、第２のＴＩＬ集団の培養物を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む培養培地中で約５日間培養し、培養物を最大５つの継代培養物に分割し、かつ継代培養物の各々を、ＩＬ－２を含む培養培地中で約６日間培養することによって、急速な第２の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、最大５つの継代培養物が各々、第２のＴＩＬ集団の培養が急速な第２の拡張で開始される容器と同じサイズのまたはそれよりも大きい容器内で培養される。前述の実施形態のうちのいくつかでは、第２のＴＩＬ集団の培養物は、最大５つの継代培養物間で均等に分けられる。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【２５２８】
いくつかの実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア生検から第１のＴＩＬ集団を取得することを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、Ｇ－ＲＥＸ１００Ｍフラスコ内の０．５ＬのＣＭ１培養培地中６０００ＩＵ　ＩＬ－２／ｍＬを含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、６０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬ　ＯＫＴ－３、及び約10^8個のフィーダー細胞を含む０．５ＬのＣＭ１培養培地を添加し、約８日間培養することによって、プライミングによる第１の拡張を行うことを含み、かつ（ｉｖ）方法が、（ａ）第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬ　ＯＫＴ－３、及び５×10^9個のフィーダー細胞を有する５ＬのＣＭ２培養培地を含むＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコに移し、約５日間培養し、（ｂ）10^9個のＴＩＬを、３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２を有する５ＬのＡＩＭ－Ｖ培地を含む最大５つのＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコの各々に移すことによって培養物を最大５つの継代培養物に分割し、継代培養物を約６日間培養することによって、急速な第２の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【２５２９】
いくつかの実施形態では、本発明は、Ｔ細胞を拡張する方法であって、（ａ）第１のＴ細胞集団を培養することによってドナーから取得された第１のＴ細胞集団のプライミングによる第１の拡張を行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、（ｂ）ステップ（ａ）においてプライミングされた第１のＴ細胞集団の活性化が減衰し始めた後、第１のＴ細胞集団を培養することによって第１のＴ細胞集団の急速な第２の拡張を行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、（ｃ）第２のＴ細胞集団を採取することと、を含む、Ｔ細胞を拡張する方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養での第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第２の容器内でのより大規模な培養で約４～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。いくつかの実施形態では、急速な拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば

、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、第２の小規模培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約５日間培養される。

【２５３０】

いくつかの実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養での第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第２の容器内でのより大規模な培養で約５～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５３１】

いくつかの実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分割されて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、第２の小規模培養で約５～７日間培養される。

【２５３２】

いくつかの実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ

容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約５～７日間培養される。

【２５３３】

いくつかの実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約５～６日間培養される。

【２５３４】

いくつかの実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約５日間培養される。

【２５３５】

いくつかの実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約６日間培養される。

【２５３６】

いくつかの実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約７日間培養される。

【２５３７】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）のプライミングによる第１の拡張が最大７日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５３８】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大８日の

期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５３９】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５４０】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大１０日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５４１】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大１１日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５４２】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が７日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５４３】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が７日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大１０日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５４４】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が７日または８日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５４５】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が７日または８日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大１０日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５４６】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が８日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５４７】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が８日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大８日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５４８】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団がＯＫＴ－３及びＩＬ－２を含む第１の培養培地中で培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５４９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１の培養培地が４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ

－３及びＩＬ－２を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５５０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１の培養培地がＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５５１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１の培養培地が４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５５２】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団がＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の培養培地中で培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５５３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２の培養培地が４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５５４】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地中で培養され（ここで、第１の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団が、第１のＡＰＣ集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５５５】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地中で培養され（ここで、第１の培養培地が、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団が、第１のＡＰＣ集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５５６】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地中で培養され（ここで、第１の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地が、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団が、第１のＡＰＣ集団よりも多い）ように修正され

た、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５５７】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地中で培養され（ここで、第１の培養培地が、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地が、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団が、第１のＡＰＣ集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５５８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数の、第１のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数に対する比が約２：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５５９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数が約２．５×１０^{8}あり、第２のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数が約５×１０^{8}であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５６０】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が、２層のＡＰＣの平均厚さで第１のガス透過性表面上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５６１】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が、４～８層のＡＰＣから選択される平均厚さで第１のガス透過性表面上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５６２】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において第１のガス透過性表面上に層状化されたＡＰＣの平均層数の、ステップ（ａ）において第１のガス透過性表面上に層状化されたＡＰＣの平均層数に対する比が、２：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５６３】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が約１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５６４】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５６５】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約３．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５６６】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５６７】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５６８】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約６．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５６９】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５７０】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５７１】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５７２】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約６．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５７３】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５７４】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段

落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２５７５】
いくつかの実施形態では、本発明は、ＡＰＣが末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２５７６】
いくつかの実施形態では、本発明は、ＰＢＭＣが放射線照射され、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２５７７】
いくつかの実施形態では、本発明は、Ｔ細胞が腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２５７８】
いくつかの実施形態では、本発明は、Ｔ細胞が骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２５７９】
いくつかの実施形態では、本発明は、Ｔ細胞が末梢血リンパ球（ＰＢＬ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２５８０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団がドナーの全血からの分離によって取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２５８１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団がドナーのアフェレーシス産物からの分離によって取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２５８２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、Ｔ細胞表現型の正または負の選択によってドナーの全血またはアフェレーシス産物から分離されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２５８３】
いくつかの実施形態では、本発明は、Ｔ細胞表現型がＣＤ３＋及びＣＤ４５＋であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２５８４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団のプライミングによる第１の拡張を行う前に、Ｔ細胞がＮＫ細胞から分離されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、第１のＴ細胞集団からのＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞の除去によって、第１のＴ細胞集団中のＮＫ細胞から分離される。いくつかの実施形態では、ＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞は、ＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞画分を除去し、かつ陰性画分を回収するゲーティング戦略を使用して、第１のＴ細胞集団を細胞選別に供することによって、第１のＴ細胞集団から除去される。いくつかの実施形態では、前述の方法は、高いＮＫ細胞パーセンテージを特徴とする第１のＴ細胞集団におけるＴ細胞の拡張のために利用される。いくつかの実施形態では、前述の方法は、高いＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞パーセンテージを特徴とする第１のＴ細胞集団におけるＴ細胞の拡張のために利用される。いくつかの実施形態では、前述の方法は、多数のＮＫ細胞の存在を特徴とする腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。いくつかの実施形態では、前述の方法は、多数のＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞を特徴とする腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。いくつかの実施形態では、前述の方法は、多数のＮＫ細胞の存在を特徴とする腫瘍に罹患している患者から取得された腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。いくつかの実施形態では、前述の方法は、多数のＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞の存在を特徴とする腫瘍に罹患している患者から取得された腫瘍組織

におけるＴ細胞の拡張のために利用される。いくつかの実施形態では、前述の方法は、卵巣癌に罹患している患者から取得された腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。

【２５８５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団由来の正確にまたは約１×１０^{7}Ｔ細胞が容器内に播種されて、かかる容器内で一次の第１の拡張を開始するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５８６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が複数の容器に分配され、各容器内で、第１のＴ細胞集団由来の正確にまたは約１×１０^{7}Ｔ細胞が播種されて、かかる容器内で一次の第１の拡張を開始するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５８７】

いくつかの実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において採取された第２のＴ細胞集団が治療的ＴＩＬ集団であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５８８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５８９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５９０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５９１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５９２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５９３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５９４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２５９５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２５９６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２５９７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２５９８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２５９９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２６００】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２６０１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２６０２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２６０３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２６０４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２６０５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２６０６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるよう

に修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２６０７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２６０８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２６０９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２６１０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２６１１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２６１２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２６１３】
いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、ｉ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養倍地中で腫瘍試料を約３日間培養することによって対象における腫瘍の１つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、（ｉｉ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の細胞培養倍地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が約７日または８日の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団は第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、（ｉｉｉ）第２のＴＩＬ集団の第２の細胞培養倍地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを補充することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張において添加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｉｉ）において添加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、急速な第２の拡張が約１１日の第２の期間行われて、第３のＴＩＬ集団が取得され、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団であり、急速な第２の拡張が第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｉｖ）ステップ（ｉｉｉ）から取得され治療的ＴＩＬ集団を採取することと、（ｖ）ステップ（ｉｖ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことと、を含む、方法を提供する。
【２６１４】
いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、（ｉ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養倍地中で腫瘍試料

を約３日間培養することによって対象における腫瘍の１つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、（ｉｉ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の細胞培養倍地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が約７日または８日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団が取得され、第２のＴＩＬ集団は第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、（ｉｉｉ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第３の細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が約１１日間の第２の期間行われて、第３のＴＩＬ集団が取得され、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｉｖ）ステップ（ｉｉｉ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、方法を提供する。

【２６１５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２の期間の５日目の後に、培養物が２つ以上の継代培養物に分割され、各継代培養物に追加量の第３の培養培地が補充され、約６日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２６１６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２の期間の５日目の後に、培養物が２つ以上の継代培養物に分割され、各継代培養物にＩＬ－２を含む第４の培養培地が補充され、約６日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２６１７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２の期間の５日目の後に、培養物が最大５つの継代培養物に分割されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２６１８】

いくつかの実施形態では、本発明は、方法におけるすべてのステップが約２４日で完了するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、方法におけるすべてのステップが約２２日で完了するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２６１９】

いくつかの実施形態では、本発明は、Ｔ細胞を拡張する方法であって、（ｉ）第１のＴ細胞集団を培養することによって、ドナーにおける腫瘍の１つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍細胞由来の第１のＴ細胞集団のプライミングによる第１の拡張を行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、（ｉｉ）ステップ（ａ）においてプライミングされた第１のＴ細胞集団の活性化が減衰し始めた後に、第１のＴ細胞集団を培養することによって第１のＴ細胞集団の急速な第２の拡張を行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、（ｉｖ）第２のＴ細胞集団を採取することと、を含む、Ｔ細胞を拡張する方法を提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍試料は、複数のコア生検から得られる。いくつかの実施形態では、複数のコア生検は、２、３、４、５、６、７、８、９及び１０個のコア生検からなる群から選択される。

【２６２０】

いくつかの実施形態では、本発明は、Ｔ細胞またはＴＩＬが腫瘍消化物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載される方法。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、ＲＰＭＩ１６４０、２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコ

ラゲナーゼであるが、これらに限定されない酵素培地中で腫瘍をインキュベートすること、続いて、機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって生成される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはタイプのコラゲナーゼを含む）、Ａｃｃｕｔａｓｅ（商標）、Ａｃｃｕｍａｘ（商標）、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、キモトリプシン、キモパパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパイン、プロテアーゼタイプＸＩＶ（プロナーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）、トリプシン阻害剤、任意の他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びこれらの任意の組み合わせ等の１つ以上の解離（消化）酵素を含むが、これらに限定されない腫瘍解離酵素混合物の中に配置される。他の実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはタイプのコラゲナーゼを含む）、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）及びデオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）を含む腫瘍解離酵素混合物中に配置される。

【２６２１】

ＶＩＩＩ．免疫調節剤関連腫瘍浸潤リンパ球

本明細書で提供されるのは、ＴＩＬ細胞表面と会合する１つ以上の免疫調節剤を含む修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）である。いくつかの実施形態では、対象の修飾されたＴＩＬは、患者レシピエントにおけるインビボ生存、増殖及び／または抗腫瘍効果の向上を示す。

【２６２２】

免疫調節剤は、任意の好適な方法を使用して、本明細書に開示されるＴＩＬ（例えば、本明細書で提供される治療薬ＴＩＬ）に付着させることができる。いくつかの実施形態では、１種以上の免疫調節剤は、ＴＩＬ細胞表面に付着される免疫調節融合タンパク質の一部である。いくつかの実施形態では、１種以上の免疫調節剤は、ＴＩＬ細胞表面と会合するナノ粒子の一部として含まれる。免疫調節剤は、患者レシピエントにおけるＴＩＬ生存増殖、及び／または抗腫瘍効果を促進する任意の免疫調節剤であり得る。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、サイトカイン（例えば、インターロイキン）である。例示的な実施形態では、ＴＩＬは、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１を含む。

【２６２３】

任意の好適なＴＩＬ集団は、本明細書に記載の製造プロセスを使用して産生されるＴＩＬを含む、対象の組成物を産生するように修飾され得る。いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、本明細書のプロセス２Ａ方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されるＴＩＬに由来する（例えば、図２～６を参照）。例示的な実施形態では、修飾されたＴＩＬは、本明細書のＧＥＮ３方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されるＴＩＬに由来する（例えば、図７を参照）。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に開示される方法に由来するＰＤ－１陽性ＴＩＬである。

【２６２４】

対象の修飾されたＴＩＬの態様は、本明細書でさらに詳述される。

【２６２５】

Ａ．免疫調節融合タンパク質

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、ＴＩＬの表面への免疫調節剤のテザリングを容易にする部分に連結された免疫調節剤（例えば、サイトカイン）を含む免疫調節融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、細胞膜アンカー部分（膜貫通ドメイン）を含む。ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、ＴＩＬ表面抗原に結合するＴＩＬ表面抗原結合部分を含む。これらの融合タンパク質の態様は、以下でさらに詳細に考察される。

【２６２６】

１．膜アンカー免疫調節融合タンパク質

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含む。膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、細胞膜アンカー部分に連結された免疫調節剤（例えば、サイトカイン）のうちの１つ以上を含む。そのような

実施形態では、膜アンカー免疫調節剤は、細胞膜アンカー部分を介してＴＩＬ表面膜にテザリングされ、したがって、免疫調節剤がその効果を標的化された方法で発揮することを可能にする。

【２６２７】

免疫調節剤は、例えば、本明細書で提供される免疫調節剤のうちのいずれかを含む、任意の好適な免疫調節剤であり得る。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、抗腫瘍応答を促進するインターロイキンである。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、サイトカインである。特定の実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、またはＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌもしくはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０ｓｃＦｖ））またはその生体活性バリアントである。ある特定の実施形態では、２つ以上の異なる膜アンカー免疫調節融合タンパク質が、ＴＩＬ表面上で発現される。例示的な実施形態では、ＴＩＬは、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０の異なる膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含む。

【２６２８】

免疫調節剤は、免疫調節剤の、ＴＩＬ細胞表へのテザリングを可能にする細胞膜アンカー部分に連結される。好適な細胞膜アンカー部分には、例えば、内因性ＴＩＬ細胞表面タンパク質の膜貫通ドメイン及びそれらの断片が含まれる。対象の融合タンパク質で使用することができる例示的な膜貫通ドメインには、例えば、Ｂ７－１、Ｂ７－２、及びＣＤ８ａ膜貫通ドメイン及びそれらの断片が含まれる。いくつかの実施形態では、細胞膜アンカー部分は、内因性ＴＩＬ細胞表面タンパク質の膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインまたはその断片をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞膜アンカー部分は、Ｂ７－１、Ｂ７－２もしくはＣＤ８ａ膜貫通細胞内ドメインまたはその断片である。ある特定の実施形態では、細胞膜アンカー部分は、ＩＹＩＷＡＰＬＡＧＴＣＧＶＬＬＬＳＬＶＩＴ（配列番号２３８）のアミノ酸配列を有するＣＤ８ａ膜貫通ドメインである。ある特定の実施形態では、細胞膜アンカー部分は、ＬＬＰＳＷＡＩＴＬＩＳＶＮＧＩＦＶＩＣＣＬＴＹＣＦＡＰＲＣＲＥＲＲＲＮＥＲＬＲＲＥＳＶＲＰＶ（配列番号２３９）のアミノ酸配列を有するＢ７－１膜貫通細胞内ドメインである。ある特定の実施形態では、細胞膜アンカー部分は、非ペプチド細胞膜アンカー部分である。例示的な実施形態では、非ペプチド細胞膜アンカー部分は、グリコホスファチジルイノシトール（ＧＰＩ）アンカーである。ＧＰＩアンカーは、ホスホエタノールアミンリンカー、糖鎖コア、及びリン脂質尾部を含む構造を有する。いくつかの実施形態では、糖鎖コアは、１つ以上の側鎖で修飾される。いくつかの実施形態では、糖鎖コアは、以下の側鎖：ホスホエタノールアミン基、マンノース、ガラクトース、シアル酸、または他の糖のうちの１つ以上で修飾される。

【２６２９】

膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、膜アンカー免疫調節融合タンパク質（例えば、細胞膜アンカー部分に対する免疫調節剤）の成分の連結を可能にするリンカーを含む。好適なリンカーとしては、少なくとも約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、または３０アミノ酸残基の長さであるリンカーが挙げられる。いくつかの実施形態では、リンカーは、５～１０、１０～１５、１５～２０、２０～２５、２５～３０、３０～３５、３５～４０、４５～５０、５０～６０アミノ酸の長さである。好適なリンカーとしては、限定されないが、切断可能なリンカー、非切断可能なリンカー、ペプチドリンカー、可撓性リンカー、剛性リンカー、ヘリカルリンカー、または非ヘリカルリンカーが挙げられる。いくつかの実施形態では、リンカーは、Ｇｌｙ及びＳｅｒを任意選択で含むペプチドリンカーである。ある特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、例えば、（ＧＳ）ｎ（配列番号２４０）、（ＧＳＧＧＳ）ｎ（配列番号２４１）、（ＧＧＧＳ）ｎ（配列番号２４２）、（ＧＧＧＧＳ）ｎ（配列番号２４３）、（ＧＧＧＧＧＳ）ｎ（配列番号２４４）、及び（ＧＧＧＧＧＧＳ）ｎ（配列番号２４５）を含む、グリシン－セリンポリマーを利用し、ｎは、少なくとも１つの整数（及び一般に、３～１０）である。本組成物及び方法で使用することができる追加のリンカーは、米国特許公開第２００６／０

０７４００８号、同第２００５／０２３８６４９号、及び２００６／００２４３１７号に記載されており、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれ、特にリンカーに関連する関連部分に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、ＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＳＬＱ（配列番号２４６）である。

【２６３０】

いくつかの実施形態では、リンカーは、切断不可能なリンカーである。例示的な実施形態では、切断可能なリンカーは、免疫調節剤の、腫瘍微小環境への放出を可能にする。切断可能なリンカーは、２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質が同じＴＩＬで共発現される実施形態においても有用である（例えば、図５１ならびに以下の表５８及び５９を参照されたい）。

【２６３１】

【表１９】

表５８．膜アンカーＩＬ－１５及びＩＬ－２１融合タンパク質ＤＮＡ配列

構築物	DNA 配列
telL-15	atggactggacttggatactctttctggtcgctgccgccacacgggtgcactctaattgggtcaacgtgatcagcgacctgaagaagatc gaggacctgatccagagcatgcacatcgacgccacactgtacaccgagtccgatgtgcaccctagctgcaaagtgaccgccatgaag tgctttctgctggaactgcaagtgatcagcctggaaagcggcgacgccagcatccacgataccgtggaaaatctgatcatcctggccaa caacagcctgtccagcaacggcaatgtgaccgagagcggctgcaaagagtgcgaggaactggaagaaaagaacatcaaagagtttc tgcagagcttcgtccacatcgtgcagatgttcatcaacacctcatcaggtggcggtggaagcggaggtggcggtagtggcggcggag gctcaggcggcggaggttccggcggaggatctcttcagctcctgccatcttgggctatcaccctgattagtgtgaatgggatctttgtcat ctgttgtctcacgtactgtttcgctccccggtgcagagagagaaggcgcaacgaaagactgcggagagaaagcgtcagacccgtg(配列番号 296)
telL-21	atggattggacctggattctgttcctggtggccgctgccacaagagtgcatagccagggccaagaccggcacatgatccggatgagac agctgatcgacatcgtggaccagctgaagaactacgtgaacgacctggtgcctgagttcctgcctgctcctgaggacgtggaaacaaa ttgcgagtggtccgccttcagctgcttccagaaggcccagctgaaaagcgccaacaccggcaacaacgagcggatcatcaacgtgtc catcaagaagctgaagcggaagcctcctagcaccaatgccggaagaaggcagaagcacagactgacctgtcctagctgcgacagct acgagaagaagcctccaaaagagttcctggaacggttcaagagcctgctgcagaagatgatccaccagcacctgagcagcagaacc cacggctctgaagattctagcggaggcggaggaagtggtggcggaggttctggtggcggtggatcaggcggtggcggatctggcg gcggaggcagtggcggaggtggaagcggtggtggtggctctggcggaggcggtagcggcggaggcggatctcttcaattgctgcc tagctgggccatcacactgatctccgtgaacggcatcttcgtgatctgctgcctgacctactgcttcgccctagatgcagagagcggag aagaaacgagcggctgagaagagaatctgtgcggcctgtt(配列番号 297)
telL-15/IL21	atggattggacctggattctgttcctggtggccgctgccacaagagtgcatagccagggccaagaccggcacatgatccggatgagac agctgatcgacatcgtggaccagctgaagaactacgtgaacgacctggtgcctgagttcctgcctgctcctgaggacgtggaaacaaa ttgcgagtggtccgccttcagctgcttccagaaggcccagctgaaaagcgccaacaccggcaacaacgagcggatcatcaacgtgtc catcaagaagctgaagcggaagcctcctagcaccaatgccggaagaaggcagaagcacagactgacctgtcctagctgcgacagct acgagaagaagcctccaaaagagttcctggaacggttcaagagcctgctgcagaagatgatccaccagcacctgagcagcagaacc cacggctctgaagattctagcggaggcggaggaagtggtggcggaggttctggtggcggtggatcaggcggtggcggatctggcg gcggaggcagtggcggaggtggaagcggtggtggtggctctggcggaggcggtagcggcggaggcggatctcttcaattgctgcc tagctgggccatcacactgatctccgtgaacggcatcttcgtgatctgctgcctgacctactgcttcgccctagatgcagagagcggag aagaaacgagcggctgagaagagaatctgtgcggcctgttagagccaagagatctggaagcggcgccaccaactttagcctgctgaa acaggctggcgacgtggaagagaaccctggacctatggactggacttggatactctttctggtcgctgccgccacacgggtgcactct aattgggtcaacgtgatcagcgacctgaagaagatcgaggacctgatccagagcatgcacatcgacgccacactgtacaccgagtcc gatgtgcaccctagctgcaaagtgaccgccatgaagtgctttctgctggaactgcaagtgatcagcctggaaagcggcgacgccagc atccacgataccgtggaaaatctgatcatcctggccaacaacagcctgtccagcaacggcaatgtgaccgagagcggctgcaaagag tgcgaggaactggaagaaaagaacatcaaagagtttctgcagagcttcgtccacatcgtgcagatgttcatcaacacctcatcaggtgg cggtggaagcggaggtggcggtagtggcggcggaggctcaggcggcggaggttccggcggaggatctcttcagctcctgccatctt gggctatcaccctgattagtgtgaatgggatctttgtcatctgttgtctcacgtactgtttcgctccccggtgcagagagagaaggcgcaa cgaaagactgcggagagaaagcgtcagacccgtg(配列番号 298)

【２６３２】

【表２０－１】

表５９．膜アンカーＩＬ－１２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１　ＤＮＡ配列（ＮＦＡＴプロモーターを含む）

構築物	DNA 配列
NFAT-Te-IL12 DNA 配列	tcgaggtcgacggtatcgataagcttgatatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccgggacattttgacacccccataatatttttccagaattaacagtataaattgcatctcttgttcaagagttccctatcactctctttaatcactactcacagtaacctcaactcctggccaccATGGATTGGACCTGGATTCTGTTCCTCGTGGCCGCCGCTACCCGCGTGCACTCCATCTGGGAGCTGAAGAAAGACGTGTACGTGGTGGAATTGGATTGGTACCCCGACGCCCCAGGCGAGATGGTGGTTCTGACTTGCGACACGCCGGAGGAGGACGGCATCACCTGGACGCTGGACCAGAGCAGCGAAGTGCTGGGCTCTGGTAAGACCTTAACCATCCAGGTCAAGGAGTTCGGTGATGCAGGACAGTACACGTGTCACAAGGGCGGGGAGGTCTTGTCCCATAGCCTGCTGCTCCTGCACAAGAAGGAAGACGGCATCTGGTCTACGGATATCCTTAAAGACCAGAAGGAGCCCAAGAACAAAACCTTCCTGCGATGCGAGGCTAAGAATTACTCCGGGCGCTTTACCTGTTGGTGGCTCACAACCATCTCGACCGACCTGACCTTCTCCGTGAAGTCTTCCAGGGGATCTTCTGATCCGCAAGGCGTTACCTGCGGGGCCGCTACCCTGTCGGCTGAGCGCGTCCGTGGTGACAACAAGGAGTACGAGTACTCGGTGGAATGCCAGGAGGACAGCGCCTGCCCAGCGGCCGAAGAGTCCTTGCCCATCGAGGTGATGGTGGACGCTGTACACAAGCTCAAGTACGAGAACTACACCTCCTCCTTCTTTATACGCGACATCATCAAGCCTGACCCCCCTAAAAACCTGCAGCTGAAGCCCCTTAAAAACTCTCGACAGGTCGAGGTATCCTGGGAGTACCCCGACACCTGGTCTACTCCTCATTCGTATTTCAGCCTGACCTTCTGCGTGCAGGTGCAGGGCAAGTCCAAGCGCGAGAAGAAGGACCGCGTGTTCACCGACAAAACCAGCGCGACTGTCATTTGTCGGAAGAACGCGAGCATCTCCGTACGGGCACAGGATCGCTATTACTCCAGCAGTTGGTCAGAGTGGGCTTCGGTTCCGTGTTCTGGAGGAGGTGGCGGCGGCTCACGCAACCTGCCCGTGGCGACGCCGGACCCGGGTATGTTTCCTTGTCTGCACCACTCTCAGAACTTGCTCCGTGCCGTCTCGAATATGCTGCAGAAGGCCCGCCAGACTCTGGAGTTCTATCCATGCACTAGTGAGGAGATCGATCATGAGGACATCACCAAGGACAAGACATCCACCGTGGAGGCTTGTCTGCCGCTGGAGTTGACAAAGAACGAGAGCTGCCTCAATAGCCGCGAGACTTCCTTCATCACCAACGGCTCCTGCCTCGCGAGCCGTAAGACCTCCTTTATGATGGCGCTGTGCCTGTCAAGTATCTACGAAGATCTGAAAATGTATCAGGTGGAGTTCAAAACTATGAACGCAAAACTCCTGATGGATCCCAAGCGCCAAATTTTCTTGGACCAGAACATGCTTGCCGTGATCGACGAGCTG

【表２０－２】

	ATGCAGGCCCTGAACTTCAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAAGTCGTC TCTGGAGGAACCCGACTTTTACAAGACAAAGATCAAGCTGTGCATCC TGCTACACGCGTTCCGCATTCGGGCCGTGACCATTGACCGCGTGATG TCCTACCTGAATGCCTCGTCCGGCGGGGGGGGCTCCGGTGGGGGCGG CTCTGGCGGAGGCGGCTCAGGTGGCGGCGGCTCCGGCGGAGGTTCGC TTCAGCTTCTGCCCAGTTGGGCAATCACTCTGATTTCCGTCAACGGAA TCTTCGTCATCTGCTGCCTGACCTACTGCTTTGCTCCCAGATGTAGAG AGCGCCGCCGCAACGAGCGCCTGCGTCGTGAGAGCGTGAGGCCTGT GTGA(配列番号 299)
NFAT-Te-IL15 DNA 配列	tcgaggtcgacggtatcgataagcttgatatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattagga ggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccatc gaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaatt aggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccgggacattttgacacccccataatatttttccagaa ttaacagtataaattgcatctcttgttcaagagttccctatcactctctttaatcactactcacagtaacctcaactcctgg ccaccATGGACTGGACTTGGATACTCTTTCTGGTCGCTGCCGCCACACG GGTGCACTCTAATTGGGTCAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCG AGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACACTGTACACCGAG TCCGATGTGCACCCTAGCTGCAAAGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCT GCTGGAACTGCAAGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATC CACGATACCGTGGAAAATCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGTC CAGCAACGGCAATGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAA CTGGAAGAAAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTCCACAT CGTGCAGATGTTCATCAACACCTCATCAGGTGGCGGTGGAAGCGGAG GTGGCGGTAGTGGCGGCGGAGGCTCAGGCGGCGGAGGTTCCGGCGG AGGATCTCTTCAGCTCCTGCCATCTTGGGCTATCACCCTGATTAGTGT GAATGGGATCTTTGTCATCTGTTGTCTCACGTACTGTTTCGCTCCCCG GTGCAGAGAGAGAAGGCGCAACGAAAGACTGCGGAGAGAAAGCGT CAGACCCGTGTGA(配列番号 300)

【表２０－３】

NFAT-TeIL21 DNA 配列	tcgaggtcgacggtatcgataagcttgatatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattagga ggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccatc gaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaatt aggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccgggacattttgacacccccataatatttttccagaa ttaacagtataaattgcatctcttgttcaagagttccctatcactctctttaatcactactcacagtaacctcaactcctgg ccaccATGGATTGGACCTGGATTCTGTTCCTGGTGGCCGCTGCCACAAG AGTGCATAGCCAGGGCCAAGACCGGCACATGATCCGGATGAGACAG CTGATCGACATCGTGGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGT GCCTGAGTTCCTGCCTGCTCCTGAGGACGTGGAAACAAATTGCGAGT GGTCCGCCTTCAGCTGCTTCCAGAAGGCCCAGCTGAAAAGCGCCAAC ACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGTCCATCAAGAAGCTGA AGCGGAAGCCTCCTAGCACCAATGCCGGAAGAAGGCAGAAGCACAG ACTGACCTGTCCTAGCTGCGACAGCTACGAGAAGAAGCCTCCAAAAG AGTTCCTGGAACGGTTCAAGAGCCTGCTGCAGAAGATGATCCACCAG CACCTGAGCAGCAGAACCCACGGCTCTGAAGATTCTAGCGGAGGCG GAGGAAGTGGTGGCGGAGGTTCTGGTGGCGGTGGATCAGGCGGTGG CGGATCTGGCGGCGGAGGCAGTGGCGGAGGTGGAAGCGGTGGTGGT GGCTCTGGCGGAGGCGGTAGCGGCGGAGGCGGATCTCTTCAATTGCT GCCTAGCTGGGCCATCACACTGATCTCCGTGAACGGCATCTTCGTGA TCTGCTGCCTGACCTACTGCTTCGCCCCTAGATGCAGAGAGCGGAGA AGAAACGAGCGGCTGAGAAGAGAATCTGTGCGGCCTGTTTAA(配列番号 301)

【表２０－４】

NFAT-TeIL15-IL21 DNA 配列	tcgaggtcgacggtatcgataagcttgatatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattagga ggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccatc gaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaatt aggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccgggacattttgacacccccataatatttttccagaa ttaacagtataaattgcatctcttgttcaagagttccctatcactctctttaatcactactcacagtaacctcaactcctgg ccaccATGGATTGGACCTGGATTCTGTTCCTGGTGGCCGCTGCCACAAG AGTGCATAGCCAGGGCCAAGACCGGCACATGATCCGGATGAGACAG CTGATCGACATCGTGGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGT GCCTGAGTTCCTGCCTGCTCCTGAGGACGTGGAAACAAATTGCGAGT GGTCCGCCTTCAGCTGCTTCCAGAAGGCCCAGCTGAAAAGCGCCAAC ACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGTCCATCAAGAAGCTGA AGCGGAAGCCTCCTAGCACCAATGCCGGAAGAAGGCAGAAGCACAG ACTGACCTGTCCTAGCTGCGACAGCTACGAGAAGAAGCCTCCAAAAG AGTTCCTGGAACGGTTCAAGAGCCTGCTGCAGAAGATGATCCACCAG CACCTGAGCAGCAGAACCCACGGCTCTGAAGATTCTAGCGGAGGCG GAGGAAGTGGTGGCGGAGGTTCTGGTGGCGGTGGATCAGGCGGTGG CGGATCTGGCGGCGGAGGCAGTGGCGGAGGTGGAAGCGGTGGTGGT GGCTCTGGCGGAGGCGGTAGCGGCGGAGGCGGATCTCTTCAATTGCT GCCTAGCTGGGCCATCACACTGATCTCCGTGAACGGCATCTTCGTGA TCTGCTGCCTGACCTACTGCTTCGCCCCTAGATGCAGAGAGCGGAGA AGAAACGAGCGGCTGAGAAGAGAATCTGTGCGGCCTGTTAGAGCCA AGAGATCTGGAAGCGGCGCCACCAACTTTAGCCTGCTGAAACAGGCT GGCGACGTGGAAGAGAACCCTGGACCTATGGACTGGACTTGGATACT CTTTCTGGTCGCTGCCGCCACACGGGTGCACTCTAATTGGGTCAACGT GATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCAC ATCGACGCCACACTGTACACCGAGTCCGATGTGCACCCTAGCTGCAA AGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAACTGCAAGTGATCAGCC TGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGATACCGTGGAAAATCTGAT CATCCTGGCCAACAACAGCCTGTCCAGCAACGGCAATGTGACCGAGA GCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGAAGAAAAGAACATCAAAGA GTTTCTGCAGAGCTTCGTCCACATCGTGCAGATGTTCATCAACACCTC ATCAGGTGGCGGTGGAAGCGGAGGTGGCGGTAGTGGCGGCGGAGGC TCAGGCGGCGGAGGTTCCGGCGGAGGATCTCTTCAGCTCCTGCCATC TTGGGCTATCACCCTGATTAGTGTGAATGGGATCTTTGTCATCTGTTG TCTCACGTACTGTTTCGCTCCCCGGTGCAGAGAGAGAAGGCGCAACG AAAGACTGCGGAGAGAAAGCGTCAGACCCGTGTAA(配列番号 302)

【２６３３】

例示的な実施形態では、リンカーは、自己切断２Ａペプチドである。例えば、Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉ．Ｒｅｐ．７（１）：２１９３（２０１７）を参照されたく、これは、２Ａペプチドに関連する関連部分に参照により組み込まれる。２Ａペプチドは、真核細胞における翻訳中のポリペプチドの切断を媒介するウイルスオリゴペプチドである。いくつかの実施形態では、２Ａペプチドは、アミノ酸配列ＧＤＶＥＸｉＮＰＧＰ（配列番号２４７）を有するＣ末端を含み、Ｘｉは、任意の天然に存在するアミノ酸残基である。ある特定の実施形態では、２Ａペプチドは、ブタテシオウイルス－１　２Ａペプチド（ＧＳＧＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ、配列番号２４８）である。いくつかの実施形態では、２Ａペプチドは、ウマ鼻炎Ａウイルス２Ａペプチド（ＧＳＧＱＣＴＮＹＡＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ、配列番号２４９）である。ある特定の実施形態では、２Ａペプチドは、口蹄疫ウイルス２Ａペプチド：（ＧＳＧＥＧＲＧＳＬＬＴＣＧＤＶＥＥＮＰＧＰ、配列番号２５０）である。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、フリン切断可能な配列を含む。例示的なフリン切断可能配列は、例えば、Ｄｕｃｋｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｄｅｓｉｇｎ＆Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ １７（１）：１０７－１１２（２００４）、及び米国特許第８，８７１，９０６号に記載されており、これらの各々は参照により、特にフリン切断可能配列に関連する関連部分において本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、リンカーは、２Ａペプチド及

びフリン切断可能な配列を含む。例示的ない実施形態では、フリン切断可能な２Ａペプチドは、アミノ酸配列ＲＡＫＲＳＧＳＧＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ（配列番号２５１）を含む。

【２６３４】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、生理学的条件下で、リンカーが分解し、それによって免疫調節剤を放出するように、分解可能なリンカー（例えば、ジスルフィドリンカー）によって膜アンカー免疫調節融合タンパク質に付着される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、生理学的条件下で、リンカーが分解し、免疫調節剤を放出するように、分解可能なリンカーを介して官能基に可逆的に連結される。好適な分解可能なリンカーには、腫瘍微小環境または炎症組織中に存在するマトリックスメタロプロテアーゼ（例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ２（ＭＭＰ２）またはマトリックスメタロプロテアーゼ９（ＭＭＰ９））などの腫瘍微小環境中のプロテアーゼなどの生物学的培地中に存在する１つ以上の酵素に感受性であるプロテアーゼ感受性リンカーが含まれるが、これに限定されない。

【２６３５】

他の実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質の成分は、酵素感受性リンカーによって連結される。例示的な切断可能なリンカーとしては、以下の酵素：メタロプロテアーゼＭＭＰ－１、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－３、ＭＭＰ－８、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１４、プラスミン、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、カテプシンＤ、カテプシンＫ、カテプシンＳ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭＴＳ、カスパーゼ－１、カスパーゼ－２、カスパーゼ－３、カスパーゼ－４、カスパーゼ－５、カスパーゼ－６、カスパーゼ－７、カスパーゼ－８、カスパーゼ－９、カスパーゼ－１０、カスパーゼ－１１、カスパーゼ－１２、カスパーゼ－１３、カスパーゼ－１４、及びＴＡＣＥのうちの１つによって認識されるものが挙げられる。例えば、米国特許第８，５４１，２０３号及び同第８，５８０，２４４号（これらの各々は参照によりその全体が組み込まれ、切断可能なリンカーに関連する関連部分に組み込まれる）を参照されたい。

【２６３６】

ある特定の実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、融合タンパク質の、ＴＩＬ細胞膜への転座を容易にするシグナルペプチドを含む。融合タンパク質の、ＴＩＬ細胞膜への局在化を容易にする任意の好適なシグナルペプチドを使用することができる。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、免疫調節剤の生体活性を干渉しない。例示的なシグナルペプチド配列としては、ヒト顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）受容体シグナル配列、ヒトプロラクチンシグナル配列、及びヒトＩｇＥシグナル配列が挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、ヒトＩｇＥシグナル配列を含む。例示的な実施形態では、ヒトＩｇＥシグナル配列は、アミノ酸配列ＭＤＷＴＷＩＬＦＬＶＡＡＡＴＲＶＨＳ（配列番号２５２）を有する。いくつかの実施形態では、ヒトＩｇＥシグナル配列は、アミノ酸配列ＮＩＫＧＳＰＷＫＧＳＬＬＬＬＬＶＳＮＬＬＬＣＱＳＶＡＰ（配列番号２５３）を含む。いくつかの実施形態では、シグナルペプチド配列は、アミノ酸配列ＭＹＲＭＱＬＬＳＣＩＡＬＳＬＡＬＶＴＮＳ（配列番号２５４）を有するＩＬ－２シグナル配列である。

【２６３７】

いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、Ｎ末端からＣ末端へ、式：

Ｓ－ＩＡ－Ｌ－Ｃに従うものであり、

式中、Ｓは、シグナルペプチドであり、ＩＡは、免疫調節剤であり、Ｌは、リンカーであり、Ｃは、細胞膜アンカー部分である。

【２６３８】

いくつかの実施形態では、シグナルペプチドＳは、配列番号２５２～２５４のうちのいずれか１つである。いくつかの実施形態では、細胞膜アンカー部分は、配列番号２７７である。例示的な実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ

－１８、ＩＬ－２１、またはＣＤ４０アゴニスト（例えば、本明細書に記載のＣＤ４０Ｌもしくは抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。いくつかの実施形態では、Ｃは、Ｂ７－１膜貫通－細胞内ドメイン（例えば、配列番号２３９）である。上記式による例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質を図５１及び５２に示す。

【２６３９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、Ｎ末端からＣ末端へ、式：Ｓ－ＩＡ－Ｌ－Ｃに従う２つ以上の異なる膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、異なる膜アンカー免疫調節融合タンパク質の各々が、異なる免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、２つ以上の異なる免疫調節剤は、ＩＬ－１２及びＩＬ－１５、ＩＬ－１５及びＩＬ－１８、ＣＤ４０Ｌ及びＩＬ－１５、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２及びＩＬ－１２からなる群から選択される。

【２６４０】

２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含むいくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、Ｎ末端からＣ末端へ、式：

Ｓ１－ＩＡ１－Ｌ１－Ｃ１－Ｌ２－Ｓ２－ＩＡ２－Ｌ３－Ｃ２に従って配置され、

式中、Ｓ１及びＳ２は、各々シグナルペプチドであり、ＩＡ１及びＩＡ２は、各々免疫調節剤であり、Ｌ１－Ｌ３は、各々リンカーであり、Ｃ１及びＣ２は、各々細胞膜アンカー部分である。いくつかの実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、同じ免疫調節剤である。ある特定の実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、異なる免疫調節剤である。本明細書に記載されるもののうちのいずれかを含む、好適な免疫調節剤。いくつかの実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、独立して、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ））、またはそれらの生体活性バリアントから選択される。いくつかのさらなる実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、ＩＬ－１２及びＩＬ－１５、ＩＬ－１５及びＩＬ－１８、ＣＤ４０Ｌ及びＩＬ－１５、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２及びＩＬ－１２からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Ｌ１～Ｌ３のうちの１つ以上は、切断可能なリンカーである。いくつかの実施形態では、Ｌ１～Ｌ３のうちの２つ以上は、異なるリンカーである。例示的な実施形態では、Ｌ２は、切断可能なリンカーである。いくつかの実施形態では、Ｌ２は、フリン切断可能なＰ２Ａリンカーである（例えば、配列番号２５１）。いくつかの実施形態では、Ｃ１及びＣ２は、独立して、膜貫通ドメイン及び／または膜貫通－細胞内ドメインである。ある特定の実施形態では、Ｃ１及びＣ２は、同じである。例示的な実施形態では、Ｃ１及びＣ２は、各々Ｂ７－１膜貫通－細胞内ドメイン（例えば、配列番号２３９）である。例示的な実施形態では、Ｃ１とＣ２は異なる。上記式による２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含む例示的な構築物を、図５１、ならびに表５８及び５９に示す。

【２６４１】

それらの表面と会合する細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含む修飾されたＴＩＬは、融合タンパク質をコードする核酸を含むようにＴＩＬ集団を遺伝子修飾することによって作製することができる。任意の好適な遺伝子修飾方法を使用して、例えば、本明細書に記載のＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、及びジンクフィンガー法を含む、そのような修飾されたＴＩＬを産生することができる。

【２６４２】

任意の好適なＴＩＬ集団を遺伝子修飾して、対象の修飾されたＴＩＬ組成物を作製することができる。いくつかの実施形態では、本明細書のプロセス２Ａ方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されたＴＩＬ集団（例えば、図２～６を参照）は、対象の修飾されたＴＩＬを産生するように遺伝子修飾される。例示的な実施形態では、本明細書のＧＥＮ３方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されたＴＩＬ集団（例えば、図７を参照）は、対象の修飾されたＴＩＬを産生するように遺伝子修飾される。例示的な実施形態では、本明細書で提供されるプロセス２Ａ方法の第２のステップ及び／またはＧＥＮ３方法の急速拡張ステップから産生されるＴＩＬは、対象の修飾されたＴＩＬを産生する

ように遺伝子修飾される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法を使用して事前に選択されたＰＤ－１陽性ＴＩＬは、対象の修飾されたＴＩＬを産生するように遺伝子修飾される。

【２６４３】

任意の好適なＴＩＬ集団を一過的に遺伝子修飾して、対象の一過的に修飾されたＴＩＬ組成物を作製することができる。いくつかの実施形態では、本明細書のプロセス２Ａ方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されたＴＩＬ集団（例えば、図２～６を参照）を、細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトして、対象の一過的に修飾されたＴＩＬにおいて細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質を一過的に発現する。例示的な実施形態では、本明細書のＧＥＮ３方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されたＴＩＬ集団（例えば、図７を参照）を、細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトして、対象の一過的に修飾されたＴＩＬにおいて細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質を一過的に発現する。例示的な実施形態では、本明細書で提供されるプロセス２Ａ方法における第１の拡張ステップ及び／またはＧＥＮ３方法におけるプライミングによる拡張ステップから産生されるＴＩＬを、細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトして、対象の一過的に修飾されたＴＩＬにおいて細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質を一過的に発現させる。例示的な実施形態では、本明細書で提供されるプロセス２Ａ方法における第２の拡張ステップ及び／またはＧＥＮ３方法における急速拡張ステップから産生されるＴＩＬを、細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトして、対象の一過的に修飾されたＴＩＬにおいて細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法を使用して事前に選択されたＰＤ－１陽性ＴＩＬを、細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトして、対象の一過的に修飾されたＴＩＬにおいて細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質を一過的に発現させる。

【２６４４】

また、本明細書で提供されるのは、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸、そのような核酸を含む発現ベクター、及び核酸または発現ベクターを含む宿主細胞である。任意の好適なプロモーターを、膜アンカー免疫調節融合タンパク質の発現に使用することができる。例示的な実施形態では、プロモーターは、誘導性プロモーターである。例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質及びそのような融合タンパク質の成分をコードする例示的な核酸を、図５１及び５２、ならびに表５８及び５９に示す。

【２６４５】

いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸は、ｍＲＮＡである。例示的な実施形態では、ｍＲＮＡは、ｍＲＮＡの細胞内安定性及び／または翻訳効率を改善する１つ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、ｍＲＮＡの半減期を改善する５’キャップまたはキャップ類似体を含む。例示的なキャップ構造としては、ＡＲＣＡ、ｍＣＡＰ、ｍ^{7}ＧｐｐｐＮ（キャップ０）、ｍ^{7}ＧｐｐｐＮｍ（キャップ１）、及びｍ^{7}ＧｐｐｐＮｍｐＮｍ（キャップ２）キャップが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、５’キャップは、式：ｍ^{7}Ｇｐｐｐ［Ｎ２’ｏｍｅ］ｎ［Ｎ］ｍに従うものであり、式中、ｍ^{7}Ｇは、Ｎ７－メチル化グアノシンまたは任意のグアノシン類似体であり、Ｎは、任意の天然、修飾または非天然ヌクレオシドであり、「ｎ」は、０～４の任意の整数であり得、「ｍ」は、１～９の整数であり得る。例示的な５’キャップは、米国特許第１０，７０３，７８９号及びＷＯ２０１７／０５３２９７に開示されており、これらは参照によりそれら全体が組み込まれており、具体的には５’キャップ及びキャップ類似体に関する開示についてである。

【２６４６】

いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸は、ｍＲＮＡであり、３’非翻訳領域（ＵＴＲ）またはアデノシン及びウリジンのストレッチを有することが知られている修飾ＵＴＲをさらに含む。これらのＡＵリッチシグネチャーは

、高い転換率を有する遺伝子において特に一般的である。それらの配列特徴及び機能的特性に基づいて、ＡＵリッチエレメント（ＡＲＥ）は、３つのクラスに分けることができる（Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９５）：クラスＩ　ＡＲＥは、Ｕリッチ領域内にＡＵＵＵＡモチーフのいくつかの分散コピーを含有する。Ｃ－Ｍｙｃ及びＭｙｏＤは、クラスＩＡＲＥを含有する。クラスＩＩ　ＡＲＥは、２つ以上の重複するＵＵＡＵＵＵＡ（Ｕ／Ａ）（Ｕ／Ａ）ノナマーを有する。このタイプのＡＲＥを含有する分子としては、ＧＭ－ＣＳＦ及びＴＮＦ－ａが挙げられる。クラスＩＩＩ　ＡＲＥＳは、あまり明確に定義されていない。これらのＵリッチ領域は、ＡＵＵＵＡモチーフを含有しない。ｃ－Ｊｕｎ及びＭｙｏｇｅｎｉｎは、このクラスの２つのよく研究された例である。ＡＲＥに結合するほとんどのタンパク質は、メッセンジャーを不安定化することが知られているが、ＥＬＡＶファミリーのメンバー、特にＨｕＲは、ｍＲＮＡの安定性を増加させることが報告されている。ＨｕＲは、３つすべてのクラスのＡＲＥに結合する。ＨｕＲ特異的結合部位を核酸分子の３’ＵＴＲに操作すると、ＨｕＲ結合、したがってインビボでのメッセージの安定化につながる。

【２６４７】

３’ＵＴＲ　ＡＵリッチエレメント（ＡＲＥ）の導入、除去、または修飾を使用して、本明細書に記載の核酸の安定性を調節することができる。特定の核酸を操作する場合、ＡＲＥの１つ以上のコピーを導入して、本発明のポリヌクレオチドを不安定にし、それによって翻訳を抑制し、得られるタンパク質の産生を減少させることができる。同様に、ＡＲＥを同定し、除去または変異させて、細胞内安定性を増加させ、したがって、結果として生じるタンパク質の翻訳及び産生を増加させることができる。トランスフェクション実験は、関連する細胞株において、核酸を使用して実施することができ、タンパク質産生は、トランスフェクション後の様々な時点でアッセイすることができる。例えば、細胞は、異なるＡＲＥ操作分子で、かつＥＬＩＳＡキットを使用することによって関連するタンパク質にトランスフェクトすることができ、トランスフェクションの６時間、１２時間、２４時間、４８時間、及び７日後に産生されるタンパク質をアッセイする。

【２６４８】

いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸は、活性化Ｔ細胞（ＮＦＡＴ）プロモーターの核因子、またはその機能的部分もしくは機能的バリアントに作動可能に連結される。本明細書で使用される「ＮＦＡＴプロモーター」とは、Ｔ細胞によって発現される任意の遺伝子の最小プロモーターに連結された１つ以上のＮＦＡＴ応答性エレメントを意味する。好ましくは、Ｔ細胞によって発現される遺伝子の最小プロモーターは、最小ヒトＩＬ－２プロモーターである。ＮＦＡＴ応答性エレメントは、例えば、ＮＦＡＴ１、ＮＦＡＴ２、ＮＦＡＴ３、及び／またはＮＦＡＴ４応答性エレメントを含み得る。ＮＦＡＴプロモーター（またはその機能的部分もしくは機能的バリアント）は、任意の数の結合モチーフ、例えば、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、または少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１１個、または最大１２個の結合モチーフを含み得る。

【２６４９】

【表２１】

表４－ＮＦＡＴプロモーター関連配列。

説明	アミノ酸配列
6×NFAT IL-2 最小プロモーター	TCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGA TATCGAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCA TACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAA ACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAG GAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCG TCAATTGGTCCCATCGAATTAGGAGGAA AAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATT AGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAG GCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCA TACAGAAGGCGTCAATTGGTCCCGGGAC ATTTTGACACCCCCATAATATTTTTCCAG AATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTT CAAGAGTTCCCTATCACTCTCTTTAATCA CTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGGCC ACC(配列番号 255)
NFAT 応答性エレメント	GGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGC GT(配列番号 256)
ヒト IL-2 プロモーター	CATTTTGACACCCCCATAATATTTTTCCA GAATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTG TTCAAGAGTTCCCTATCACTCTCTTTAAT CACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTG(配列番号 257)

【２６５０】

好ましい実施形態では、ＮＦＡＴプロモーターは、６つのＮＦＡＴ結合モチーフを含む。例えば、米国特許第８，５５６，８８２号（参照によりその全体が、特にＮＦＡＴプロモーターに関連する関連部分について組み込まれる）を参照されたい。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーター系は、本明細書に記載の免疫調節剤のうちのいずれかを含む免疫調節融合タンパク質の発現を制御する。ある特定の実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌもしくはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０ｓｃＦｖ））またはその生体活性バリアントから選択される。ＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結された例示的な対象の膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする例示的な核酸を表５９に示す。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーター系は、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質の発現を制御する。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーター系は、ＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質の発現を制御する。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーター系は、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質の発現を制御する。

【２６５１】

いくつかの実施形態では、本発明は、ＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結された免疫調節融合タンパク質をコードするＤＮＡを含むように遺伝子修飾されたＴＩＬを提供する。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーターは、本明細書に記載の免疫調節剤のうちのいずれかを含む免疫調節融合タンパク質をコードするＤＮＡの発現を制御する。ある特定の実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌもしくはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０ｓｃＦｖ））またはその生体活性バリアントから選択される。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーターは、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質をコードするＤＮＡの発現を制御する。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーターは、ＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質をコードするＤＮＡの発現を制御する。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーターは、ＩＬ－１５及びＩ

Ｌ－２１を含む免疫調節融合タンパク質をコードするＤＮＡの発現を制御する。

【２６５２】

いくつかの実施形態では、本発明は、ＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結された免疫調節融合タンパク質をコードするＤＮＡを含むように遺伝子修飾されたＴＩＬを提供し、免疫調節融合タンパク質は、Ｎ末端からＣ末端へ、式：

Ｓ１－ＩＡ１－Ｌ１－Ｃ１－Ｌ２－Ｓ２－ＩＡ２－Ｌ３－Ｃ２に従って配置され、

式中、Ｓ１及びＳ２は、各々シグナルペプチドであり、ＩＡ１及びＩＡ２は、各々免疫調節剤であり、Ｌ１－Ｌ３は、各々リンカーであり、Ｃ１及びＣ２は、各々細胞膜アンカー部分である。いくつかの実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、同じ免疫調節剤である。ある特定の実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、異なる免疫調節剤である。本明細書に記載されるもののうちのいずれかを含む、好適な免疫調節剤。いくつかの実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、独立して、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ））、またはそれらの生体活性バリアントから選択される。いくつかのさらなる実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、ＩＬ－１２及びＩＬ－１５、ＩＬ－１５及びＩＬ－１８、ＣＤ４０Ｌ及びＩＬ－１５、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２及びＩＬ－１２からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、独立して、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１から選択される。いくつかの実施形態では、ＩＡ１は、ＩＬ－１５であり、ＩＡ２は、ＩＬ－２１である。いくつかの実施形態では、ＩＡ１は、ＩＬ－２１であり、ＩＡ２は、ＩＬ－１５である。いくつかの実施形態では、Ｌ１～Ｌ３のうちの１つ以上は、切断可能なリンカーである。いくつかの実施形態では、Ｌ１～Ｌ３のうちの２つ以上は、異なるリンカーである。例示的な実施形態では、Ｌ２は、切断可能なリンカーである。いくつかの実施形態では、Ｌ２は、フリン切断可能なＰ２Ａリンカーである（例えば、配列番号２５１）。いくつかの実施形態では、Ｃ１及びＣ２は、独立して、膜貫通ドメイン及び／または膜貫通－細胞内ドメインである。ある特定の実施形態では、Ｃ１及びＣ２は、同じである。例示的な実施形態では、Ｃ１及びＣ２は、各々Ｂ７－１膜貫通－細胞内ドメイン（例えば、配列番号２３９）である。例示的な実施形態では、Ｃ１とＣ２は異なる。上記式による２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含む例示的な構築物を図５１に示す。

【２６５３】

対象の膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸をＴＩＬ集団に導入して、任意の好適な方法を使用して、膜アンカー免疫調節融合タンパク質を発現する一過的に修飾されたまたは遺伝子修飾されたＴＩＬを産生してもよい。いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸は、マイクロ流体プラットフォームを使用してＴＩＬ集団に導入される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。例えば、国際特許出願公開第ＷＯ２０１３／０５９３４３Ａ１号、同第ＷＯ２０１７／００８０６３Ａ１号、もしくは同第ＷＯ２０１７／１２３６６３Ａ１号、または米国特許出願公開第２０１４／０２８７５０９Ａ１号、同第２０１８／０２０１８８９Ａ１、もしくは同第２０１８／０２４５０８９Ａ１号を参照されたい（これらのすべては、参照によりそれら全体が、特に核酸送達のためのマイクロ流体プラットフォームの開示について本明細書に組み込まれる）。ＳＱＺプラットフォームでは、修飾のための細胞（例えば、ＴＩＬ）の細胞膜は、マイクロ流体収縮によって一時的に破壊され、それによって、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を細胞内に送達することを可能にする。

【２６５４】

いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸は、ｍＲＮＡであり、マイクロ流体プラットフォーム（例えば、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォーム）を使用してｍＲＮＡをＴＩＬに送達し、一過的に修飾されたＴＩＬを産生する。いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸は、ＤＮＡであり、マイクロ流体プラットフォーム（例えば、ＳＱＺベクター

を含まないマイクロ流体プラットフォーム）を使用してＤＮＡをＴＩＬに送達し、安定した遺伝子修飾されたＴＩＬを産生する。マイクロ流体プラットフォーム（例えば、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォーム）を使用して、本明細書のプロセス２Ａ方法開示（例えば、図２～６を参照）または本明細書のＧＥＮ３方法開示（例えば、図７を参照）の任意のステップ中に産生される任意のＴＩＬ集団に核酸を送達して、修飾されたＴＩＬを産生してもよい。いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌもしくはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０ｓｃＦｖ））、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【２６５５】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１５である。いくつかの実施形態では、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。

【２６５６】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＣＤ４０Ｌである。いくつかの実施形態では、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、またはＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌもしくはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０ｓｃＦｖ））またはその生体活性バリアントである。

【２６５７】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１２である。いくつかの実施形態では、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。

【２６５８】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１８である。いくつかの実施形態では、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。

【２６５９】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２１である。いくつかの実施形態では、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。

【２６６０】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２である。いくつかの実施形態では、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。

【２６６１】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－１

２である。
【２６６２】
例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－１５である。
【２６６３】
例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－１８である。
【２６６４】
例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２１である。
【２６６５】
例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２であり、第２の免疫調節剤は、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。
【２６６６】
例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１２であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－１５である。
【２６６７】
例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１２であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－１８である。
【２６６８】
例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１２であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２１である。
【２６６９】
例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１２であり、第２の免疫調節剤は、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。
【２６７０】
例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１５であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－１８である。
【２６７１】
例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１５であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－

２１である。
【２６７２】
例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１５であり、第２の免疫調節剤は、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。
【２６７３】
例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１８であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２１である。
【２６７４】
例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１８であり、第２の免疫調節剤は、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。
【２６７５】
例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２１であり、第２の免疫調節剤は、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。
【２６７６】
本明細書で提供される修飾されたＴＩＬに含まれ得る追加の膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、ＷＯ２０１９／１５７１３０Ａ１（これは参照によりその全体が、特に膜アンカー免疫調節融合タンパク質に関連する関連部分に組み込まれる）に記載されている。
【２６７７】
本明細書で提供される修飾されたＴＩＬに含まれる例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質を図５１及び５２、ならびに表５８及び５９に示す。
【２６７８】
いくつかの実施形態では、上記の膜アンカー免疫調節融合タンパク質のうちのいずれかをコードする核酸は、ＮＦＡＴプロモーターまたはその機能的部分もしくは機能的バリアントに作動可能に連結される。
【２６７９】
２．免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質
いくつかの実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、免疫調節融合タンパク質を含み、そのような融合タンパク質は、ＴＩＬ抗原結合ドメイン（ＡＢＤ）に連結された１つ以上の免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、１種以上の免疫調節剤は、ＴＩＬ　ＡＢＤがＴＩＬ表面抗原に結合すると、ＴＩＬ表面膜にテザリングされる。
【２６８０】
ＴＩＬ抗原結合ドメインは、抗体可変重ドメイン（ＶＨ）及び可変軽ドメイン（ＶＬ）を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ抗原結合ドメインは、式：ＶＨ－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３による重鎖及び式：ＶＬ－ＣＬによる軽鎖（式中、ＶＨは可変重ドメインであり、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３は重鎖定常ドメインであり、ＶＬは可変軽ドメインであり、ＣＬは軽鎖定常ドメインである）を含む全長抗体である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ抗原結合ドメインは、抗体断片である。ある特定の実施形態では、ＴＩＬ抗原結合ドメインは、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆ（ａｂ）２、可変断片（Ｆｖ）、ドメイン抗体（ｄＡｂ）、または一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。
【２６８１】
ＴＩＬ抗原結合ドメインは、免疫調節剤－ＴＩＬ　ＡＢＤ融合タンパク質の、ＴＩＬの表面への付着を可能にする任意の好適なＴＩＬ抗原に結合することができる。例示的な実

施形態では、ＴＩＬ抗原結合ドメインは、ＴＩＬ表面抗原に結合することができる。ＴＩＬ表面抗原には、Ｄ１６、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ３、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１８、ＬＦＡ－１、ＣＤ２５、ＣＤ１２７、ＣＤ５６、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ１９７、ＣＤ３８、ＣＤ２７、ＣＤ１３７、ＯＸ４０、ＧＩＴＲ、ＣＤ５６、ＣＤ１９６、ＣＸＣＲ３、ＣＸＣＲ４、ＣＸＣＲ５、ＣＤ８４、ＣＤ２２９、ＣＣＲ１、ＣＣＲ５、ＣＣＲ４、ＣＣＲ６、ＣＣＲ８、及び／またはＣＣＲ１０が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＡＢＤは、ＣＤ４５に結合する。特定の実施形態では、ＡＢＤは、ＣＤ４５ＲＡ、ＣＤ４５ＲＢ、ＣＤ４５ＲＣまたはＣＤ４５Ｒβから選択されるＣＤ４５アイソフォームに結合する。特定の実施形態では、ＡＢＤは、Ｔ細胞上で一次的に発現されるＣＤ４５に結合する。

【２６８２】

ある特定の実施形態では、ＡＢＤは、チェックポイント阻害剤に結合する。例示的なチェックポイント阻害剤としては、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３及びＣＴＬＡ－４が挙げられるが、これらに限定されない（例えば、Ｑｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃａｎｃｅｒ　１８：１５５（２０１９）を参照）。いくつかの実施形態では、ＡＢＤは、免疫エフェクター細胞（例えば、Ｔ細胞またはＮＫ細胞）上に発現されるチェックポイント阻害剤に結合する。例示的な抗ＰＤ－１抗体は、例えば、米国特許第７，６９５，７１５号、同第７，３３２，５８２号、同第９，２０５，１４８号、同第８，６８６，１１９号、同第８，７３５，５５３号、同第７，４８８，８０２号、同第８，９２７，６９７号、同第８，９９３，７３１号、及び同第９，１０２，７２７号において開示されており、これらは参照によりそれら全体が、特に抗ＰＤ－１抗体に関連する関連部分が組み込まれる。例示的な抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、米国特許第８，２１７，１４９号、同第８，７７９，１０８号、同第８，１６８，１７９号、同第８，５５２，１５４号、同第８，４６０，９２７号、及び同第９，１７５，０８２号において開示されており、これらは参照によりそれら全体が、特に抗ＰＤ－Ｌ１抗体に関連する関連部分が組み込まれる。例示的な抗ＬＡＧ－３抗体は、米国特許第９，２４４，０５９号、同第９，２４４，０５９号、同第９，５０５，８３９号に開示されており、これらは参照によりそれら全体が、特に抗ＬＡＧ－３抗体に関連する関連部分が組み込まれる。例示的なＴＩＭ－３抗体は、ＷＯ２０１６／１６１２７０、ＵＳ８，８４１，４１８、及びＵＳ９，１６３，０８７において開示されており、これらは参照によりそれら全体が、特に抗ＴＩＭ－３抗体に関連する関連部分が組み込まれる。例示的なＣＴＬＡ－４抗体は、ＵＳ６，９８４，７２０及びＵＳ７，４１１，０５７において開示されており、これらは参照によりそれら全体が、特に抗ＣＴＬＡ－４抗体に関連する関連部分が組み込まれる。

【２６８３】

いくつかの実施形態では、ＡＢＤは、抗ＣＤ４５抗体またはその断片である。ある特定の実施形態では、抗ＣＤ４５抗体は、ヒト抗ＣＤ４５抗体、ヒト化抗ＣＤ４５抗体、またはキメラ抗ＣＤ４５抗体である。例示的な実施形態では、ＡＢＤは、抗ＣＤ４５抗体ＢＣ８のｖｈＣＤＲ１－３及びｖｌＣＤＲ１－３を含む（参照により本明細書に組み込まれる、ＵＳ２０１７／０３２６２５９、特に抗ＣＤ４５抗体配列に関連する関連する部分を参照）。いくつかの実施形態では、ＡＢＤは、抗ＣＤ４５抗体ＢＣ８の可変重ドメイン及び可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ＡＢＤは、以下の抗ＣＤ４５抗体：１０Ｇ１０、ＵＣＨＬ１、９．４、４Ｂ２、またはＧＡＰ８．３のうちの１つのｖｈＣＤＲ１－３及びｖｌＣＤＲ１－３またはＶＨ及びＶＬを含む（Ｓｐｅｒｔｉｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１１３（４）：４４１－４５２（２００４）、Ｂｕｚｚｉ　ｅｔ　ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　５２：４０２７－４０３５（１９９２）を参照）。

【２６８４】

免疫調節融合タンパク質は、例えば、本明細書で提供される免疫調節剤のうちのいずれかを含む、任意の好適な免疫調節剤であり得る。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、抗腫瘍応答を促進するインターロイキンである。いくつかの実施形態では、免疫調節剤

は、サイトカインである。特定の実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、またはそれらの生体活性バリアントである。ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、２つ以上の免疫調節剤を含む。例示的な実施形態では、融合タンパク質は、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０の異なる免疫調節剤を含む。

【２６８５】

ＴＩＬ抗原結合ドメインは、任意の好適なリンカーを使用して免疫調節剤に付着する。好適なリンカーとしては、限定されないが、切断可能なリンカー、非切断可能なリンカー、ペプチドリンカー、可撓性リンカー、剛性リンカー、ヘリカルリンカー、または非ヘリカルリンカーが挙げられる。いくつかの実施形態では、リンカーは、任意選択でＧｌｙ及びＳｅｒを含むペプチドリンカーである。好適なリンカーとしては、少なくとも約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、または３０アミノ酸残基の長さであるリンカーが挙げられる。いくつかの実施形態では、リンカーは、５～１０、１０～１５、１５～２０、２０～２５、２５～３０、３０～３５、３５～４０、４５～５０、または５０～６０アミノ酸の長さである。ある特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、$(GGGS)_n$または$(GGGGS)_n$リンカーであり、式中、ｎは、モチーフの反復の数を示し、１～１０から選択される整数である。いくつかの実施形態では、リンカーは、抗体ヒンジドメインまたはその断片である。ある特定の実施形態では、リンカーは、ヒト免疫グロブリン（Ｉｇ）ヒンジドメイン（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、もしくはＩｇＡヒンジ）またはその断片である。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、リンカーなしでＴＩＬに直接連結される。

【２６８６】

免疫調節剤は、融合タンパク質のＴＩＬへの結合を妨げない好適な位置でＴＩＬ抗原結合ドメインに付着することができる。抗原結合ドメインが全長抗体であるいくつかの実施形態では、免疫調節剤は、重鎖または軽鎖のいずれかのＣ末端またはＮ末端に付着される。抗原結合ドメインがｓｃＦｖであるいくつかの実施形態では、免疫調節剤は、可変重ドメインまたは可変軽ドメインのＣ末端またはＮ末端に付着される。抗原結合ドメインがＦａｂであるいくつかの実施形態では、免疫調節剤は、可変重ドメインまたは可変軽ドメインのＣ末端またはＮ末端に付着される。抗原結合ドメインがＦａｂ’であるいくつかの実施形態では、免疫調節剤は、可変重ドメインまたは可変軽ドメインのＣ末端またはＮ末端に付着される。抗原結合ドメインがFab'_2であるいくつかの実施形態では、免疫調節剤は、可変重ドメインまたは可変軽ドメインのＣ末端またはＮ末端に付着される。

【２６８７】

融合タンパク質が２つ以上の免疫調節剤を含むいくつかの実施形態では、免疫調節剤は、本明細書に記載のリンカーのうちのいずれかを使用して互いに付着する。いくつかの実施形態では、２つ以上の免疫調節剤が、抗原結合ドメインの異なる位置に付着する。例えば、ＴＩＬ抗原結合ドメインが全長抗体であるいくつかの実施形態では、２つ以上の免疫調節剤は、（ｉ）重鎖上の異なる位置、（ｉｉ）軽鎖上の異なる位置または（ｉｉｉ）重鎖及び／または軽鎖上の異なる位置に付着される。

【２６８８】

対象の免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質は、任意の好適な方法を使用して作製することができる。一態様では、本明細書で提供されるのは、対象の融合タンパク質をコードする核酸、かかる核酸を含む発現ベクター、及び発現ベクターを含む宿主細胞である。対象の融合タンパク質をコードする発現ベクターを含む宿主細胞を、融合タンパク質の発現のための条件下で培養し、その後、融合タンパク質を単離し、精製する。いくつかの実施形態では、次いで、精製された融合タンパク質を、融合タンパク質のＴＩＬへの結合を可能にする条件下で、ＴＩＬ集団とともにインキュベートする。

【２６８９】

いくつかの実施形態では、対象の免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質

は、本明細書のプロセス２Ａ方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されたＴＩＬに付着される（例えば、図２～６を参照）。例示的な実施形態では、融合タンパク質は、本明細書のＧＥＮ３方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されたＴＩＬに付着される（例えば、図７を参照）。例示的な実施形態では、融合タンパク質は、プロセス２Ａ方法における第１の拡張ステップ及び／または本明細書で提供されるＧＥＮ３方法におけるプライミングによる拡張ステップから産生されたＴＩＬに付着される。例示的な実施形態では、融合タンパク質は、プロセス２Ａ方法の第２の拡張ステップ及び／または本明細書で提供されるＧＥＮ３方法の急速拡張ステップから産生されたＴＩＬに付着される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載される方法を使用して事前選択されたＰＤ－１陽性ＴＩＬである。

【２６９０】

対象の免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質をコードする核酸をＴＩＬ集団に導入して、任意の好適な方法を使用して、対象の免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質を発現する一過的に修飾されたまたは遺伝子修飾されたＴＩＬを産生してもよい。いくつかの実施形態では、対象の免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質をコードする核酸は、マイクロ流体プラットフォームを使用して、ＴＩＬ集団に導入される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。例えば、国際特許出願公開第ＷＯ２０１３／０５９３４３Ａ１号、同第ＷＯ２０１７／００８０６３Ａ１号、もしくは同第ＷＯ２０１７／１２３６６３Ａ１号、または米国特許出願公開第２０１４／０２８７５０９Ａ１号、同第２０１８／０２０１８８９Ａ１、もしくは同第２０１８／０２４５０８９Ａ１号を参照されたい（これらのすべては、参照によりそれら全体が、特に核酸送達のためのマイクロ流体プラットフォームの開示について本明細書に組み込まれる）。ＳＱＺプラットフォームでは、修飾のための細胞（例えば、ＴＩＬ）の細胞膜は、マイクロ流体収縮によって一時的に破壊され、それによって免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質をコードする核酸を細胞に送達することを可能にする。

【２６９１】

いくつかの実施形態では、対象の免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質をコードする核酸は、ｍＲＮＡであり、マイクロ流体プラットフォーム（例えば、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォーム）を使用して、ｍＲＮＡをＴＩＬに送達し、一過的に修飾ＴＩＬを産生する。いくつかの実施形態では、対象の免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質をコードする核酸は、ＤＮＡであり、マイクロ流体プラットフォーム（例えば、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォーム）を使用して、核酸をＴＩＬに送達し、安定した遺伝子修飾ＴＩＬを産生する。マイクロ流体プラットフォーム（例えば、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォーム）を使用して、本明細書のプロセス２Ａ方法開示（例えば、図２～６を参照）または本明細書のＧＥＮ３方法開示（例えば、図７を参照）の任意のステップ中に産生される任意のＴＩＬ集団に核酸を送達して、修飾されたＴＩＬを産生してもよい。いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、またはそれらの組み合わせ（例えば、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１）を含む。

【２６９２】

本明細書で提供される組成物及び方法に有用な例示的な免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質は、例えば、米国特許出願公開第２０２０／０３３０５１４号（これは参照によりその全体が組み込まれる）、及び免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質に関連する関連部分にさらに記載されている。

【２６９３】

Ｉ．ナノ粒子組成物

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される対象の修飾されたＴＩＬは、１つ以上のナノ粒子を含み、それらのナノ粒子は、１種以上の免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるナノ粒子は、互いにカップリングされた複数の２つ以上

のタンパク質及び／または粒子の第２の成分（例えば、分解可能なリンカーを介して可逆的に連結された）を含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子のタンパク質は、ポリマーまたはシリカ中に存在する。ある特定の実施形態では、ナノ粒子は、ナノシェルを含む。本明細書で提供されるナノ粒子は、１つ以上の免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、またはＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌもしくはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ））またはその生体活性バリアントである。ナノ粒子は、本明細書に記載される任意の好適な技術を使用して、ＴＩＬの表面に付着される。

【２６９４】

本明細書で提供される対象の修飾されたＴＩＬにおける使用の例示的なナノ粒子としては、リポソーム、タンパク質ナノゲル、ヌクレオチドナノゲル、ポリマーナノ粒子、または固体ナノ粒子が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、リポソームを含む。例示的な実施形態では、ナノ粒子は、免疫調節剤ナノゲルを含む。特定の実施形態では、ナノ粒子は、互いに共有結合した複数の免疫調節剤（例えば、サイトカイン）を有する免疫調節剤ナノゲルである。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、ナノ粒子表面上に少なくとも１種のポリマー、カチオン性ポリマー、またはカチオン性ブロックコポリマーを含む。本明細書で提供される組成物に使用することができる例示的なナノ粒子は、例えば、米国特許第９，２８３，１８４号及び同第９，６０３，９４４号に開示されており、これらの各々は参照によりその全体が組み込まれ、ナノ粒子に関連する関連部分に組み込まれる。

【２６９５】

免疫調節剤は、例えば、本明細書で提供される免疫調節剤のうちのいずれかを含む、任意の好適な免疫調節剤であり得る。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、抗腫瘍応答を促進するインターロイキンである。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、サイトカインである。特定の実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、またはそれらの生体活性バリアントである。ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、２つ以上の免疫調節剤を含む。例示的な実施形態では、融合タンパク質は、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０の異なる免疫調節剤を含む。

【２６９６】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、互いに共有結合的に架橋されたタンパク質及び／または第２の成分（例えば、分解可能なリンカー）を含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、分解可能なリンカーを介して機能基もしくはポリマーに可逆的に連結されるか、または「可逆的に修飾される」免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、分解可能なリンカーを介して互いに架橋された複数の免疫調節剤を含むナノゲルである（米国特許第９，６０３，９４４号を参照）。例示的な実施形態では、ナノゲルのタンパク質は、ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ））に架橋される。いくつかの実施形態では、ポリマーは、ナノゲル表面に架橋される。

【２６９７】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子の免疫調節剤は、生理学的条件下でリンカーが分解し、それによって免疫調節剤を放出するように、分解可能なリンカー（例えば、ジスルフィドリンカー）を介して互いに可逆的に連結される。いくつかの実施形態では、ナノ粒子の免疫調節剤は、生理学的条件下で、リンカーが分解し、免疫調節剤を放出するように、分解可能なリンカーを介して官能基に可逆的に連結される。好適な分解可能なリンカーとしては、還元生理学的環境に感受性のある可撓性ジスルフィド含有リンカーによって一緒に接合された２つのＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）エステル基、酸性生理学的環境（ｐＨ＜７、例えば、ｐＨ４～５、５～６、または６～７未満、例えば、６．９）に感受性の加水分解可能なリンカー、あるいは腫瘍微小環境または炎症組織（例えば、マトリックスメタロプロテイナーゼ２（ＭＭＰ２）もしくはマトリックスメタロプロテイナーゼ９（ＭＭＰ９））に存在するマトリックスメタロプロテイナーゼなどの生物学的媒体中に存在する１つ以上の酵素に感受性のあるプロテアーゼ感受性リンカーが挙げられるが、

これらに限定されない。還元的な生理学的環境に感受性のある架橋剤は、例えば、タンパク質を高密度タンパク質ナノゲルに架橋するＮＨＳ基の存在によってタンパク質上のアミン基と反応するジスルフィド含有リンカーを有する架橋剤である。いくつかの実施形態では、分解可能な架橋剤は、ビス［２－（Ｎ－スクシンイミジル－オキシカルボニルオキシ）エチル］ジスルフィドを含む。

【２６９８】

いくつかの実施形態では、分解可能なリンカーは、少なくとも１種のＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステルを含む。いくつかの実施形態では、分解可能なリンカーは、酸化還元応答性リンカーである。いくつかの実施形態では、酸化還元応答性リンカーは、ジスルフィド結合を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される分解可能なリンカーには、タンパク質を実質的に変性させることなく、中性ｐＨ（例えば、約６～約８または約７）でタンパク質と反応することができる、少なくとも１つのＮヒドロキシスクシンイミドエステルが含まれる。いくつかの実施形態では、分解可能なリンカーは、「酸化還元応答性」リンカーであり、それらが生理学的条件下（例えば、２０～４０℃及び／またはｐＨ４～８）で還元剤（例えば、グルタチオン、ＧＳＨ）の存在下で分解され、それによって、それが可逆的に連結される化合物から無傷のタンパク質を放出することを意味する。いくつかの実施形態では、ナノ粒子のタンパク質は、末端または内部のNH_2官能基（例えば、リジンの側鎖）を介して分解可能なリンカーに連結されている。

【２６９９】

他の実施形態では、ナノ粒子のタンパク質は、酵素感受性リンカーによって連結される。例示的な切断可能なリンカーとしては、以下の酵素：メタロプロテアーゼＭＭＰ－１、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－３、ＭＭＰ－８、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１４、プラスミン、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、カテプシンＤ、カテプシンＫ、カテプシンＳ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭＴＳ、カスパーゼ－１、カスパーゼ－２、カスパーゼ－３、カスパーゼ－４、カスパーゼ－５、カスパーゼ－６、カスパーゼ－７、カスパーゼ－８、カスパーゼ－９、カスパーゼ－１０、カスパーゼ－１１、カスパーゼ－１２、カスパーゼ－１３、カスパーゼ－１４、及びＴＡＣＥのうちの１つによって認識されるものが挙げられる。例えば、米国特許第８，５４１，２０３号及び同第８，５８０，２４４号（これらの各々は参照によりその全体が組み込まれ、切断可能なリンカーに関連する関連部分に組み込まれる）を参照されたい。

【２７００】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、単分散複数の免疫調節剤（例えば、サイトカイン）を含むナノゲルである。いくつかの実施形態では、ナノゲルの免疫調節剤は、ポリマーに架橋される。ある特定の実施形態では、ポリマーは、ナノゲルの表面に架橋される。特定の実施形態では、ナノゲルは、ａ）分解可能なリンカーを介して互いに可逆的かつ共有結合的に架橋された１つ以上の免疫調節剤、及びｂ）ナノゲルの表面露出タンパク質に架橋されたポリマーを含む。そのようなナノゲルは、分解可能なリンカーを介して免疫調節剤を互いに可逆的に共有結合して複数の免疫調節剤ナノゲルを形成することを可能にする条件下で、１種以上の免疫調節剤を分解可能なリンカーと接触させることによって作製することができる。その後、免疫調節剤ナノゲルは、ポリマーの免疫調節剤ナノゲルへの架橋を可能にする条件下でポリマー（例えば、ポリエチレングリコール）と接触し、それによって複数の免疫調節剤ポリマーナノゲルを生成する。

【２７０１】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、１つ以上のポリマーを含む。例示的なポリマーとしては、脂肪族ポリエステル、ポリ（乳酸）（ＰＬＡ）、ポリ（グリコール酸）（ＰＧＡ）、乳酸及びグリコール酸のコポリマー（ＰＬＧＡ）、ポリカープロラクトン（ＰＣＬ）、ポリ無水物、ポリ（オルト）エステル、ポリウレタン、ポリ（酪酸）、ポリ（吉草酸）、及びポリ（ラクチド－コ－カプロラクトン）、ならびにアルギン酸塩及びデキストラン及びセルロースを含む他の多糖類、コラーゲン、それらの化学誘導体（例えば、アルキル、アルキレン、ヒドロキシル化、酸化、及び当業者によって日常的に行われる他の修飾

などの化学基の置換、付加を含む）、アルブミン及び他の親水性タンパク質、ゼイン及び他のプロラミン、ならびにそれらの親水性タンパク質、コポリマー及び混合物などの天然ポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ナノ粒子の免疫調節剤は、親水性ポリマーに連結されている。例示的な親水性ポリマーとしては、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリエチレングリコール－ｂ－ポリリジン（ＰＥＧ－ＰＬＬ）、及び／またはポリエチレングリコール－ｂ－ポリアルギニン（ＰＥＧ－ＰＡｒｇ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【２７０２】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子（例えば、ナノゲル）は、その表面に１つ以上のポリカチオンを含む。対象のナノ粒子で使用するための例示的なポリカチオンとしては、ポリリジン（ポリ－Ｌ－リジン及び／またはポリ－Ｄ－リジン）、ポリ（アルギニン酸グリセリルコハク酸塩）（ＰＡＧＳ、アルギニン系ポリマー）、ポリエチレンイミン、ポリヒスチジン、ポリアルギニン、プロタミン硫酸塩、ポリエチレングリコール－ｂ－ポリリジン（ＰＥＧ－ＰＬＬ）、及びポリエチレングリコール－ｇ－ポリリジンが挙げられるが、これらに限定されない。

【２７０３】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、ＴＩＬへの静電吸引によってＴＩＬ表面と会合する。ある特定の実施形態では、ナノ粒子は、ＴＩＬの表面分子（例えば、表面タンパク質、炭水化物及び／または脂質）に対して親和性を有するリガンドを含む。

【２７０４】

特定の実施形態では、ナノ粒子は、本明細書に記載のＴＩＬ表面抗原に結合する抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体またはその断片である。例示的な実施形態では、ＴＩＬ表面抗原は、ＣＤ４５、ＬＦＡ－１、ＣＤ１１ａ（インテグリンアルファ－Ｌ）、ＣＤ１８（インテグリンベーター２）、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ２５、ＣＤ８、またはＣＤ４である。例示的な実施形態では、抗原結合ドメイン（ＡＢＤ）は、抗ＣＤ４５抗体またはその断片である。ある特定の実施形態では、抗ＣＤ４５抗体は、ヒト抗ＣＤ４５抗体、ヒト化抗ＣＤ４５抗体、またはキメラ抗ＣＤ４５抗体である。例示的な実施形態では、ＡＢＤは、抗ＣＤ４５抗体ＢＣ８のｖｈＣＤＲ１－３及びｖｌＣＤＲ１－３を含む（参照により本明細書に組み込まれる、ＵＳ２０１７／０３２６２５９、特に抗ＣＤ４５抗体配列に関連する関連する部分を参照）。いくつかの実施形態では、ＡＢＤは、抗ＣＤ４５抗体ＢＣ８の可変重ドメイン及び可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ＡＢＤは、以下の抗ＣＤ４５抗体：１０Ｇ１０、ＵＣＨＬ１、９．４、４Ｂ２、またはＧＡＰ８．３のうちの１つのｖｈＣＤＲ１－３及びｖｌＣＤＲ１－３またはＶＨ及びＶＬを含む（Ｓｐｅｒｔｉｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １１３（４）：４４１－４５２（２００４）、Ｂｕｚｚｉ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５２：４０２７－４０３５（１９９２）を参照）。そのような実施形態では、ナノ粒子は、ナノ粒子がＴＩＬの表面に結合する条件下で、ナノ粒子の存在下でＴＩＬをインキュベートすることにより、ＴＩＬ集団の表面に付着される。

【２７０５】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、静電吸引によってＴＩＬ細胞表面と会合する。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、ＴＩＬと共有結合される。他の実施形態では、ナノ粒子は、ＴＩＬに共有結合されない。

【２７０６】

いくつかの実施形態では、対象のナノ粒子は、本明細書のプロセス２Ａ方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されたＴＩＬに付着される（例えば、図２～６を参照）。例示的な実施形態では、対象のナノ粒子は、本明細書のＧＥＮ３方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されたＴＩＬに付着される（例えば、図７を参照）。例示的な実施形態では、対象のナノ粒子は、プロセス２Ａ方法における第１の拡張ステップ及び／または本明細書で提供されるＧＥＮ３方法におけるプライミングによる拡張ステップから産生されたＴＩＬに付着される。例示的な実施形態では、対象のナノ粒子は、プロセス２

Ａ方法の第２の拡張ステップ及び／または本明細書で提供されるＧＥＮ３方法の急速拡張ステップから産生されたＴＩＬに付着される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載される方法を使用して事前選択されたＰＤ－１陽性ＴＩＬである。

【２７０７】

本明細書で提供される修飾されたＴＩＬで使用するための追加の適切なナノ粒子は、米国特許出願公開第２０２０／０１３１２３９号及びＷＯ２０２０／２０５８０８（これらの各々は参照によりその全体が組み込まれる）、及びナノ粒子に関連する関連部分において開示されている。

【２７０８】

Ｂ．免疫調節剤

本明細書で提供される修飾されたＴＩＬには、その表面に付着された１つ以上の免疫調節剤が含まれ得る。免疫調節剤は、例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含む、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質のうちのいずれかに組み込むことができる。任意の好適な免疫調節剤を、対象の修飾されたＴＩＬに含めることができる。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、一度患者に移されると、ＴＩＬ生存及び／または抗腫瘍活性を増強する。例示的な免疫調節剤としては、例えば、サイトカインが挙げられる。いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、以下のサイトカイン：ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、ＩＬ－４、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－５、ＩＦＮγ、ＴＮＦα（ＴＮＦａ）、ＩＦＮα、ＩＦＮβ、ＧＭ－ＣＳＦ、もしくはＧＣＳＦ、またはそれらの生物学的に活性なバリアントのうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、共刺激分子である。特定の実施形態では、共刺激分子は、以下：ＯＸ４０、ＣＤ２８、ＧＩＴＲ、ＶＩＳＴＡ、ＣＤ４０、ＣＤ３、またはＣＤ１３７のアゴニストのうちの１つである。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン）である。例示的な免疫調節剤は、以下でさらに詳細に論じられる。

【２７０９】

１．ＩＬ－１５

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、ＩＬ－１５を含む。例示的な実施形態では、ＩＬ－１５は、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質（例えば、膜アンカー免疫調節融合タンパク質）の一部として含まれる。

【２７１０】

本明細書で使用される場合、「インターロイキン１５」、「ＩＬ－１５」及び「ＩＬ１５」はすべて、ＩＬ－１５特異的受容体アルファ鎖（ＩＬ－１５Ｒα）、ＩＬ－２／ＩＬ－１５受容体ベータ鎖（ＣＤ１２２）及び共通のガンマ鎖（ガンマ－Ｃ、ＣＤ１３２）（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００００５８５、ＮＰ＿０００５７６及びＮＰ＿７５１９１５（ヒト）；ならびにＮＭ＿００１２５４７４７及びＮＰ＿００１２４１６７６（マウス））で構成された複合体に結合し、それを通じてシグナル伝達するインターロイキンを指す。ＩＬ－１５は、腫瘍内のＴ細胞増殖を刺激することが示されている。ＩＬ－１５はまた、エフェクターメモリーＣＤ８＋Ｔ細胞の生存可能性を拡張することができ、ＮＫ細胞の発達にとって重要である。したがって、いかなる特定の操作理論にも縛られることなく、本明細書に記載のＩＬ－１５と会合する修飾されたＴＩＬは、向上した生存及び／または抗腫瘍効果を示すと考えられる。

【２７１１】

ＩＬ－１５は、インビボで４０分未満の短い半減期を有する。ＩＬ－１５モノマーへの修飾は、がんの治療におけるそのインビボ薬物動態を改善することができる。これらの修飾は、概して、ＩＬ－１５受容体のアルファサブユニット、ＩＬ－１５ＲαによるＩＬ－１５のトランスプレゼンテーションの改善に焦点を当てている。そのような修正には、以下が含まれる：１）ＩＬ－１５とその可溶性受容体ａ－サブユニット－Ｆｃ融合体との事前会合により、ＩＬ－１５：ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ複合体の形成（例えば、Ｒｕｂｉｎｓ

ｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ．Ｓ．Ａ．１０３：９１６６－７１（２００６）を参照）、２）スーパーアゴニストＩＬ－１５－ｓＩＬ－１５Ｒα－ｓｕｓｈｉタンパク質の発現（例えば、Ｂｅｓｓａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃａｎｃｅｒ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ８：２７３６－４５（２００９）を参照）、及び３）ヒトＩＬ－１５変異体ＩＬ－１５Ｎ７２ＤとＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ ｓｕｓｈｉ－Ｆｃ融合複合体との事前会合（例えば、Ｚｈｕ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １８３：３５９８－６００７（２００９）を参照）。

【２７１２】

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬと会合するＩＬ－１５は、全長ＩＬ－１５、ＩＬ－１５の断片またはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、ヒトＩＬ－１５またはバリアントヒトＩＬ－１５である。例示的な実施形態では、ＩＬ－１５は、生物学的に活性なヒトＩＬ－１５バリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、野生型ＩＬ－１５と比較して、１、２、３、４、５、６ ７、８、９、または１０個の変異を含む。ある特定の実施形態では、ＩＬ－１５は、野生型ヒトＩＬ－１５に対してＮ７２Ｄ変異を含む。いくつかの実施形態では、バリアントＩＬ－１５は、ＩＬ－１５Ｒα結合活性を示す。

【２７１３】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１５及びＩＬ－１５Ｒαの細胞外ドメインを含む。ある特定の実施形態では、免疫調節剤は、Ｆｃドメインに融合したＩＬ－１５及びＩＬ－１５Ｒα（ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ）を含む。

【２７１４】

【表２２－１】

表５－ＩＬ－１５関連配列。

説明	アミノ酸配列
ヒトIL-15(N72D変異体)	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESD VHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIH DTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEE LEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(配列番号 258)
ヒトIL-15R-アルファ-Su/Fcドメイン	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICN SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTP SLKCIREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK(配列番号259)
ヒトIL-15R-アルファ-Su(65aa切断細胞外ドメイン)	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICN SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTP SLKCIR(配列番号260)
ヒトIL-15アイソフォーム2	MVLGTIDLCSCFSAGLPKTEANWVNVISD LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT AMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEF LQSFVHIVQMFINTS(配列番号261)
ヒトIL-15アイソフォーム1	MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGI HVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIE DLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKC FLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNS LSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSF VHIVQMFINTS(配列番号262)

【表２２－２】

ヒトIL-15(シグナルペプチドなし)	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESD VHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIH DTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEE LEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(配列番号 263)
ヒトIL-15R-アルファ(85aa 切断細胞外ドメイン)	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICN SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTP SLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGV(配列 番号 264)
ヒトIL-15R-アルファ(182aa 切断細胞外ドメイン)	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICN SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTP SLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQP ESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGS QLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAK NWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAIST ST(配列番号 265)
ヒトIL-15R-アルファ	MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATR GITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYIC NSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWT TPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTP QPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVP GSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTT AKNWELTA SASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCG LSAVSLLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEA LPVTWGTSSRDEDLENCSHHL(配列番号 266)

【２７１５】

いくつかの実施形態では、免疫刺激タンパク質は、ヒトＩＬ－１５と可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαとの複合体を含むスーパーアゴニストＩＬ－１５（ＩＬ－１５ＳＡ）である。ヒトＩＬ－１５と可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαとの組み合わせは、ヒトＩＬ－１５単独よりも高い生物活性を有するＩＬ－１５ＳＡ複合体を形成する。可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒα、ならびに細胞外ドメインの切断型は、当該技術分野において記載されている（Ｗｅｉ ｅｔａｌ．，２００１ Ｊ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６７：２７７－２８２）。ヒトＩＬ－１５Ｒαのアミノ酸配列は、配列番号２６６に示されている。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、ヒトＩＬ－１５と可溶性ヒトとの複合体を含む。膜貫通ドメインまたは細胞質ドメインなしで、細胞外ドメインの全部または一部を含むＩＬ－１５Ｒα。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、完全な細胞外ドメインまたはＩＬ－１５結合活性を保持する細胞外ドメインの切断形態を含む、ヒトＩＬ－１５と可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαとの複合体を含む。

【２７１６】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、ＩＬ－１５結合活性を保持する細胞外ドメインの切断形態を含む、ヒトＩＬ－１５と可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαとの複合体を含む。いくつかの実施形態では、可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαは、ヒトＩＬ－１５Ｒαのアミノ酸１－６０、１－６１、１－６２、１－６３、１－６４または１－６５を含む。いくつかの実施形態では、可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαは、ヒトＩＬ－１５Ｒαのアミノ酸１－８０、１－８１、１－８２、１－８３、１－８４または１－８５を含む。いくつかの実施形態では、可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαは、ヒトＩＬ－１５Ｒαのアミノ酸１－１８０、１－１８１、または１－１８２を含む。

【２７１７】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１５結合活性を保持し、Ｓｕｓｈｉドメインを含む細胞外ドメインの切断型を含む、ヒトＩＬ－１５と可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒ

αとの複合体を含むＩＬ－１５ＳＡである。ＩＬ－１５ＲαのＳｕｓｈｉドメインは、当該技術分野では、およそ６０アミノ酸長であり、４つのシステインを含むと説明されている。（Ｗｅｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００１）。ＩＬ－１５活性を保持し、Ｓｕｓｈｉドメインを含む可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαの切断形態は、本開示のＩＬ－１５ＳＡにおいて有用である。

【２７１８】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、本明細書に記載のＦｃ融合体（例えば、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ）などの融合タンパク質として発現される可溶性ヒトＩＬ－１５ＲαとＩＬ－１５とを含む複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、２つのヒトＩＬ－１５分子と複合体化された二量体ヒトＩＬ－１５ＲαＦｃ融合タンパク質（例えば、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ）を含む。

【２７１９】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、配列番号２５８、配列番号２６１、配列番号２６２、または配列番号２６３に示されるアミノ酸配列を含むＩＬ－１５分子を含む、ＩＬ－１５ＳＡサイトカイン複合体である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡサイトカイン複合体は、配列番号２６０、配列番号２６４または配列番号２６５の配列を含む、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子を含む。

【２７２０】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、２つのＩＬ－１５分子と複合体化された二量体ＩＬ－１５ＲαＦｃ融合タンパク質を含むＩＬ－１５ＳＡサイトカイン複合体である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５－ＳＡは、２０１４／０１３４１２８（参照により本明細書に組み込まれる）に記載の二量体ＩＬ－１５ＲαＳｕ（Ｓｕｓｈｉドメイン）／Ｆｃ（配列番号２５９）及び２つのＩＬ－１５Ｎ７２Ｄ（配列番号２５８）分子（ＡＬＴ－８０３としても知られる）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、二量体ＩＬ－１５ＲαＳｕ／Ｆｃ分子（配列番号２５９）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６１）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、二量体ＩＬ－１５ＲαＳｕ／Ｆｃ分子（配列番号２５９）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６２）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、二量体ＩＬ－１５ＲαＳｕ／Ｆｃ分子（配列番号２５９）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６３）を含む。

【２７２１】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、二量体ＩＬ－１５ＲαＳｕ／Ｆｃ分子（配列番号２５９）、及び配列番号２５８、２５８、２６２、及び２６３から選択されるアミノ酸配列を有する２つのＩＬ－１５分子を含む。

【２７２２】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６０）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２５８）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６０）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６１）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６０）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６２）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６０）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６３）を含む。

【２７２３】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６４）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２５８）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６４）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６１）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６４）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６２）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６４）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６１）を含む。

【２７２４】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６５）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２５８）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６５）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６１）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６５）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６２）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６５）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６３）を含む。

【２７２５】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、二量体ＩＬ－１５ＲαＳｕ／Ｆｃ（配列番号２６９）分子及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６２）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、二量体ＩＬ－１５ＲαＳｕ／Ｆｃ（配列番号２５９）分子及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６３）を含む。

【２７２６】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、配列番号２５９及び配列番号２６０を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、配列番号２６１または配列番号２６２を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、配列番号２６１及び配列番号２５９を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、配列番号２６２及び配列番号２５９を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、配列番号２６３及び配列番号２５９を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、配列番号２６１及び配列番号２６０を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、配列番号２６２及び配列番号２６０を含む。

【２７２７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、ＩＬ－１５またはその生体活性バリアントを含む免疫調節融合タンパク質またはナノ粒子組成物を含む。ＩＬ－１５を含む例示的な融合タンパク質を、図５１及び５２、ならびに表５８及び５９に示す。

【２７２８】

例示的な実施形態では、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物は、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、本明細書に記載のＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結される。ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質の発現のための例示的なＮＦＡＴプロモーター駆動型構築物を表５９に示す。

【２７２９】

２．ＩＬ－１２

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、ＩＬ－１２またはそのバリアントと会合する。例示的な実施形態では、ＩＬ－１２は、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質（例えば、膜アンカー免疫調節融合タンパク質）の一部として含まれる。

【２７３０】

本明細書で使用される場合、「インターロイキン１２」、「ＩＬ－１２」及び「ＩＬ１２」はすべて、ＩＬ－１２Ａ及びＩＬ－１２Ｂ遺伝子（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００８８２（ＩＬ－１２Ａ）及びＮＭ＿００２１８７（ＩＬ－１２Ｂ））によってコードされるヘテロ二量体サイトカインであるインターロイキンを指す。ＩＬ－１２は、４つのアルファヘリックスのバンドルで構成され、天然Ｔ細胞のＴＨ１細胞への分化に関与する。それは２つの別々の遺伝子、ＩＬ－１２Ａ（ｐ３５）及びＩＬ－１２Ｂ（ｐ４０）によってコードされる。活性ヘテロ二量体（「ｐ７０」と称される）、及びｐ４０のホモ二量体は、タンパク質合成の後に形成される。ＩＬ－１２は、ＩＬ－１２Ｒ－β１及びＩＬ－１２Ｒ－β２によって形成されるヘテロ二量体受容体である、ＩＬ－１２受容体に結合する。ＩＬ－１２は、Ｔ細胞の成長及び機能を刺激することができるＴ細胞刺激因子として知られている。特に、ＩＬ－１２は、Ｔ細胞及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞からのインターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）及び腫瘍壊死因子－アルファ（ＴＮＦ－α）の産生を刺激し、ＩＦＮ－γのＩＬ－４媒介抑制を低減することができる。ＩＬ－１２は、ＮＫ細胞及びＣＤ８＋細胞傷害性Ｔリンパ球の細胞傷害活性の増強をさらに媒介することが

できる。さらに、ＩＬ－１２はまた、インターフェロンガンマの産生を増加させることによって抗血管新生活性を有し得、これは順に、ケモカイン誘導性タンパク質－１０（ＩＰ－１０またはＣＸＣＬ１０）の産生を増加させる。次いで、ＩＰ－１０が、この抗血管新生効果を媒介する。したがって、いかなる特定の操作理論にも縛られることなく、ＩＬ－１２は、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物の生存可能性及び／または抗腫瘍効果を増加させることができると考えられる。

【２７３１】

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬと会合するＩＬ－１２は、全長ＩＬ－１２、ＩＬ－１２の断片またはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１２は、ヒトＩＬ－１２またはバリアントヒトＩＬ－１２である。例示的な実施形態では、ＩＬ－１２は、生物学的に活性なヒトＩＬ－１２バリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１２は、野生型ＩＬ－１２と比較して、１、２、３、４、５、６　７、８、９、または１０個の変異を含む。

【２７３２】

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬ組成物に含まれるＩＬ－１２は、ＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットまたはそのバリアントを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットは、ヒトＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットは、アミノ酸配列を有する。ある特定の実施形態では、修飾されたＴＩＬ組成物に含まれるＩＬ－１２は、ＩＬ－１２　ｐ４０サブユニットまたはそのバリアントを含む。ある特定の実施形態では、ＩＬ－１２は、ＩＬ－１２　ｐ４０サブユニットに付着したＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットを含む一本鎖ＩＬ－１２ポリペプチドである。そのようなＩＬ－１２一本鎖ポリペプチドは、野生型ＩＬ－１２の生物学的活性のうちの１つ以上を有利に保持する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の一本鎖ＩＬ－１２ポリペプチドは、Ｎ末端からＣ末端へ、式（ｐ４０）－（Ｌ）－（ｐ３５）に従うものであり、式中、「ｐ４０」は、ＩＬ－１２　ｐ４０サブユニットであり、「ｐ３５」は、ＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットであり、Ｌは、リンカーである。他の実施形態では、一本鎖ＩＬ－１２は、Ｎ末端からＣ末端へ、式（ｐ３５）－（Ｌ）－（ｐ４０）によるものである。任意の好適なリンカーは、本明細書に記載のものを含む、一本鎖ＩＬ－１２ポリペプチドで使用され得る。好適なリンカーには、例えば、アミノ酸配列（ＧＧＧＧＳ）$_x$を有するリンカーが含まれ得、ｘは、１～１０の整数である。他の好適なリンカーとしては、例えば、アミノ酸配列ＧＧＧＧＧＧＳが挙げられる。対象の一本鎖ＩＬ－１２ポリペプチドとともに使用することができる例示的な一本鎖ＩＬ－１２リンカーもまた、Ｌｉｅｓｃｈｋｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１５：３５～４０（１９９７）（これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）において、特にＩＬ－１２ポリペプチドリンカーの教示のために記載されている。例示的な実施形態では、一本鎖ＩＬ－１２ポリペプチドは、一本鎖ヒトＩＬ－１２ポリペプチドである（すなわち、それは、ヒトｐ３５及びｐ４０　ＩＬ－１２サブユニットを含む）。

【２７３３】

【表２３】

表６－ＩＬ－１２関連配列。

説明	アミノ酸配列
ヒトIL-12 p35サブユニット	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNM LQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTST VEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLA SRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTM NAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQA LNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLH AFRIRAVTIDRVMSYLNAS(配列番号267)
ヒトIL-12 p40サブユニット	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTC DTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVK EFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKED GIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSG RFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV TCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDS ACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSS FFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWE YPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYS SSWSEWASVPCS(配列番号268)

【２７３４】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、ＩＬ－１２またはその生体活性バリアントを含む免疫調節融合タンパク質またはナノ粒子組成物を含む。

【２７３５】

例示的な実施形態では、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物は、ＩＬ－１２を含む免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、本明細書に記載のＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結される。例えば、米国特許第８，５５６，８８２号（これは参照によりその全体が、特にＩＬ－１２発現のためのＮＦＡＴプロモーターに関連する関連部分について組み込まれる）を参照されたい。ＩＬ－１２を含む例示的な融合タンパク質を、図５１及び５２、ならびに表５８に示す。

【２７３６】

３．ＩＬ－１８

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、ＩＬ－１８またはそのバリアントと会合する。例示的な実施形態では、ＩＬ－１８は、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質（例えば、膜アンカー免疫調節融合タンパク質）の一部として含まれる。

【２７３７】

本明細書で使用される場合、「インターロイキン１８」、「ＩＬ－１８」、「ＩＬ１８」、「ＩＧＩＦ」、「ＩＬ－１ｇ」、「インターフェロン－ガンマ誘導因子」、及び「ＩＬ１Ｆ４」はすべて、ＩＬ－１８遺伝子（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００１２４３２１１、ＮＭ＿００１５６２及びＮＭ＿００１３８６４２０）によってコードされるヘテロ二量体サイトカインである、インターロイキンを指す。ＩＬ－１βと構造的に類似するＩＬ－１８は、サイトカインのＩＬ－１スーパーファミリーのメンバーである。多くのヒトリンパ球及び非リンパ球細胞によって発現されるこのサイトカインは、炎症プロセスにおいて重要な役割を果たす。ＩＬ－１２と組み合わせたＩＬ－１８は、細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）、ならびにナチュラルキラー（ＮＫ）細胞を活性化して、ＩＦＮ－γを産生することができ、したがって、腫瘍免疫に寄与する。したがって、いかなる特定の操作理論にも縛られることなく、ＩＬ－１８は、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物の抗腫瘍効果を増強することができると考えられる。

【２７３８】

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬと会合するＩＬ－１８は、全長ＩＬ－１８、ＩＬ－１８の断片またはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１８は、

ヒトＩＬ－１８またはバリアントヒトＩＬ－１８である。例示的な実施形態では、ＩＬ－１８は、生物学的に活性なヒトＩＬ－１８バリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１８は、野生型ＩＬ－１８と比較して、１、２、３、４、５、６　７、８、９、または１０個の変異を含む。いくつかの実施形態では、バリアントＩＬ－１８は、以下のアミノ酸配列を有する：

【２７３９】

【表２４】

表７－ＩＬ－１８関連配列。

説明	アミノ酸配列
ヒトIL-18	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLF EDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGM AVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNI KDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEG YFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFT VQNED(配列番号 269)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLF EDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSRARGL AVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNI KDTKSDIIFFARVPGHGRKTQFESSSYEGY FLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTV QNED(配列番号 270)

【２７４０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、ＩＬ－１８またはその生体活性バリアントを含む免疫調節融合タンパク質またはナノ粒子組成物を含む。ＩＬ－１８を含む例示的な融合タンパク質を図５１に示す。

【２７４１】

例示的な実施形態では、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物は、ＩＬ－１８を含む免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、本明細書に記載のＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結される。ＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質の発現のための例示的なＮＦＡＴプロモーター駆動型構築物を表５９に示す。

【２７４２】

４．ＩＬ－２１

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、ＩＬ－２１またはそのバリアントと会合する。例示的な実施形態では、ＩＬ－２１は、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質（例えば、膜アンカー免疫調節融合タンパク質）の一部として含まれる。

【２７４３】

ある特定の実施形態では、サイトカイン－ＡＢＤは、ＩＬ－２１分子またはその断片を含む。本明細書で使用される場合、「インターロイキン２１」、「ＩＬ－２１」、及び「ＩＬ２１」（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００１２０７００６及びＮＰ＿００１１９３９３５（ヒト）、ならびにＮＭ＿０００１２９１０４１及びＮＰ＿００１２７７９７０（マウス））はすべて、ＩＬ－２１受容体に結合し、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞及び細胞傷害性細胞を含む免疫系の細胞に対して強力な調節効果を有し、ウイルス感染またはがん細胞を破壊することができるＩＬ－２１受容体に結合するサイトカインのメンバーを指す。したがって、いかなる特定の操作理論にも縛られることなく、ＩＬ－２１は、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物の生存可能性及び／または抗腫瘍効果を増加させることができると考えられる。

【２７４４】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、ヒトＩＬ－２１である。いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬと会合するＩＬ－２１は、全長ＩＬ－２１、ＩＬ－２１の断片またはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、ヒトＩＬ－２１または

バリアントヒトＩＬ－２１である。例示的な実施形態では、ＩＬ－２１は、生物学的に活性なヒトＩＬ－２１バリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、野生型ＩＬ－２１と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の変異を含む。

【２７４５】

【表２５】

表８－ＩＬ－２１関連配列。

説明	アミノ酸配列
ヒトIL-21	QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVP EFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSA NTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQK HRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKM IHQHLSSRTHGSEDS(配列番号271)

【２７４６】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、ＩＬ－２１またはその生体活性バリアントを含む免疫調節融合タンパク質またはナノ粒子組成物を含む。ＩＬ－２１を含む例示的な融合タンパク質を、図５１及び５２、ならびに表５８及び５９に示す。

【２７４７】

例示的な実施形態では、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物は、ＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、本明細書に記載のＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結される。

【２７４８】

５．ＩＬ－２

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、ＩＬ－２またはそのバリアントと会合する。例示的な実施形態では、ＩＬ－２は、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質（例えば、膜アンカー免疫調節融合タンパク質）の一部として含まれる。

【２７４９】

ある特定の実施形態では、サイトカイン－ＡＢＤは、ＩＬ－２分子またはその断片を含む。本明細書で使用される場合、「インターロイキン２」、「ＩＬ－２」、「ＩＬ２」、及び「ＴＣＧＦ」（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００５８６及びＮＰ＿０００５７７（ヒト）はすべて、ＩＬ－２受容体に結合するサイトカインのメンバーを指す。ＩＬ－２は、活性化誘発性細胞死（ＡＩＣＤ）を増強する。ＩＬ－２はまた、初期Ｔ細胞が抗原によっても刺激されるときに、Ｔ細胞の、エフェクターＴ細胞への分化及びメモリーＴ細胞への分化を促進し、したがって、身体が感染症を撃退するのを助ける。他の分極サイトカインとともに、ＩＬ－２は、Ｔｈ１及びＴｈ２リンパ球へのナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞分化を刺激し、Ｔｈ１７及び濾胞性Ｔｈリンパ球への分化を阻害する。ＩＬ－２はまた、ナチュラルキラー細胞及び細胞傷害性Ｔ細胞の両方の細胞殺傷活性を増加させる。したがって、いかなる特定の操作理論にも縛られることなく、ＩＬ－２は、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物の生存可能性及び／または抗腫瘍効果を増加させることができると考えられる。

【２７５０】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、ヒトＩＬ－２である。いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬと会合するＩＬ－２は、全長ＩＬ－２、ＩＬ－２の断片またはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、ヒトＩＬ－２またはバリアントヒトＩＬ－２である。例示的な実施形態では、ＩＬ－２は、生物学的に活性なヒトＩＬ－２バリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、野生型ＩＬ－２と比較して、１、２、３、４、５、６　７、８、９、または１０個の変異を含む。

【２７５１】

【表２６】

表９－ＩＬ－２関連配列。

説明	アミノ酸配列
ヒトIL-2	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKT QLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKG SETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSII STLT(配列番号272)

【２７５２】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、ＩＬ－２またはその生体活性バリアントを含む免疫調節融合タンパク質またはナノ粒子組成物を含む。ＩＬ－２を含む例示的な融合タンパク質を図５１及び５２に示す。

【２７５３】

例示的な実施形態では、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物は、ＩＬ－２を含む免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、本明細書に記載のＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結される。

【２７５４】

６．ＣＤ４０アゴニスト

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、ＣＤ４０アゴニストと会合する。例示的な実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質（例えば、膜アンカー免疫調節融合タンパク質）の一部として含まれる。

【２７５５】

分化クラスター４０、ＣＤ４０は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）上に見出される共刺激タンパク質であり、ＡＰＣ活性化に必要である。Ｔヘルパー細胞上のＣＤ４０Ｌ（ＣＤ１５４）のＣＤ４０への結合は、抗原提示細胞（例えば、樹状細胞）を活性化し、様々な下流効果を誘導する。いかなる特定の操作理論によるものではないが、抗原提示細胞（すなわち、ＣＤ４０アゴニスト）上でＣＤ４０を活性化する１つ以上の免疫調節剤の添加は、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物の抗腫瘍効果を増強することができると考えられる。ＣＤ４０アゴニストとしては、例えば、ＣＤ４０Ｌ及びＣＤ４０にアゴニスト的に結合する抗体またはその抗体断片（例えば、ｓｃＦｖ）が挙げられる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、ＣＤ４０ＬまたはＣＤ４０Ｌの生体活性バリアントを含む免疫調節融合タンパク質またはナノ粒子組成物を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、アゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、ｓｃＦｖ）を含む免疫調節融合タンパク質を含む。例示的なＣＤ４０アゴニスト配列を以下の表に示す。

【２７５６】

ＣＤ４０アゴニスト活性は、当該技術分野で知られている任意の好適な方法を使用して測定することができる。例えば、ＤＣ上のＣＤ４０のライゲーションは、共刺激及びＭＨＣ分子の表面発現の増加、炎症誘発性サイトカインの産生、ならびにＴ細胞トリガーの増強を誘導する。安静Ｂ細胞上のＣＤ４０ライゲーションは、抗原提示機能及び増殖を増加させる。例示的な実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、ヒト樹状細胞を活性化することができる。

【２７５７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、表１０に示される抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖのＶＨ及びＶＬ配列を有するアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン、またはその生体活性バリアントを含む。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ４０結合ドメインは、表１０に示されるＶＨ配列と少なくとも約８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるＶＨ配列を含む。いくつかの実施形態では、アゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメインは、表１０に示されるＶＨ配列と比較して、１

、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のアミノ酸置換を含むＶＨ配列を含む。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ４０結合ドメインは、表１０に示されるＶＬ配列と少なくとも約８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるＶＬ配列を含む。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ４０結合ドメインは、表１０に示されるＶＬ配列と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のアミノ酸置換を含むＶＬ配列を含む。例示的な実施形態では、抗ＣＤ４０結合ドメインは、表１０の配列番号２７６、２７９、２８２、及び２８５から選択される抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖである。

【２７５８】

いくつかの実施形態では、抗ＣＤ４０結合ドメインは、ヒトＣＤ４０に結合することができる、表１０の抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖのバリアントである。例示的な実施形態では、バリアント抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖは、表１０の配列番号２７６、２７９、２８２、及び２８５から選択される抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖと少なくとも約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９９％同一である。

【２７５９】

ＣＤ４０結合ドメイン結合の評価は、Ｂｉａｃｏｒｅ、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）及び／またはＢＬＩ（バイオレイヤー干渉法、例えば、Ｏｃｔｅｔアッセイ）アッセイを含むがこれらに限定されない、当該技術分野で知られている任意の好適なアッセイを使用して測定することができる。

【２７６０】

免疫調節剤として有用な追加のＣＤ４０結合ドメイン（ＶＨ及びＶＬ）としては、米国特許第６，８３８，２６１号、同第６，８４３，９８９号、同第７，３３８，６６０号、同第８，７７７８，３４５号に記載されるものが挙げられ、これらは特に抗ＣＤ４０抗体ならびにＶＨ、ＶＬ及びＣＤＲ配列の教示に関して参照により本明細書に組み込まれる。

【２７６１】

いくつかの実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、ＣＤ４０リガンド（ＣＤ４０Ｌ）である。例示的な実施形態では、ＣＤ４０Ｌは、ヒトＣＤ４０Ｌ（配列番号２７０）である。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０Ｌは、配列番号２５３と少なくとも約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９９％同一であるヒトＣＤ４０Ｌのバリアントである。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０Ｌは、配列番号２７３と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のアミノ酸置換を含む、ヒトＣＤ４０Ｌのバリアントである。

【２７６２】

ＣＤ４０アゴニストを含む例示的な融合タンパク質を図５１及び５２に示す。

【２７６３】

例示的な実施形態では、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物は、ＣＤ４０アゴニストを含む免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、本明細書に記載されるように、ＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結される。

【２７６４】

【表２７－１】

表１０－ＣＤ４０アゴニスト関連配列。

説明	アミノ酸配列
ヒトCD40L	MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTV FLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLH EDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQ FEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQN PQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYTM SNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTF CSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRA ANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVF VNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL(配列番号273)
抗ヒトCD40 VH(ソチガリマブ)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSF SSTYVCWVRQAPGKGLEWIACIYTGDGTN YSASWAKGRFTISKDSSKNTVYLQMNSLR AEDTAVYFCARPDITYGFAINFWGPGTLV TVSS(配列番号274)
抗ヒトCD40 VL(ソチガリマブ)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIKCQASQSISS RLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQC TGYGISWPIGGGTKVEIK(配列番号275)
抗ヒトCD40 scFv(ソチガリマブ)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSF SSTYVCWVRQAPGKGLEWIACIYTGDGTN YSASWAKGRFTISKDSSKNTVYLQMNSLR AEDTAVYFCARPDITYGFAINFWGPGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVTIKCQASQSISSRLA WYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQCTGYG ISWPIGGGTKVEIK(配列番号276)
抗ヒトCD40 VH(ダセツズマブ)	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTG YYIHWVRQAPGKGLEWVARVIPNAGGTS YNQKFKGRFTLSVDNSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCAREGIYWWGQGTLVTVSS(配列番号277)

【表２７－２】

抗ヒトCD40 VL(ダセツズマブ)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLV HSNGNTFLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSNR FSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YFCSQTTHVPWTFGQGTKVEIK(配列番号 278)
抗ヒトCD40 scFv(ダセツズマブ)	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTG YYIHWVRQAPGKGLEWVARVIPNAGGTS YNQKFKGRFTLSVDNSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCAREGIYWWGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFLH WYQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCSQTTHV PWTFGQGTKVEIK(配列番号279)
抗CD40 VH(ルカツツズマブ)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF SSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYEESN RYHADSVKGRFTISRDNSKITLYLQMNSLR TEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTL VTVSS(配列番号280)
抗CD40 VL(ルカツツズマブ)	DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLY SNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLISLGSNRA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQARQTPFTFGPGTKVDIR(配列番号 281)
抗CD40 scFv(ルカツツズマブ)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF SSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYEESN RYHADSVKGRFTISRDNSKITLYLQMNSLR TEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIV MTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNG YNYLDWYLQKPGQSPQVLISLGSNRASGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQARQTPFTFGPGTKVDIR(配列番号282)

【表２７－３】

抗CD40 VH(セリクレルマブ)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDS GGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMEL NRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCS YFDYWGQGTLVTVSS(配列番号283)
抗CD40 VL(セリクレルマブ)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIY SWLAWYQQKPGKAPNLLIYTASTLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGTKVEIK(配列番号284)
抗CD40 scFv(セリクレルマブ)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDS GGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMEL NRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCS YFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC RASQGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQANIFPLTFGGGTKVEIK(配列番号285)

【２７６５】

ＩＸ．薬学的組成物、投与量、及び投薬レジメン

いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して拡張及び／または遺伝子修飾された

（ＣＣＲを発現するように遺伝子修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを含む）ＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬは、薬学的組成物として患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌緩衝液中のＴＩＬ懸濁液である。本開示のＰＢＭＣを使用して拡張されたＴＩＬは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、単回の動脈内または静脈内注入として投与され、これは、好ましくは、およそ３０～６０分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内投与が含まれる。

【２７６６】

任意の好適な用量のＴＩＬが投与され得る。いくつかの実施形態では、特にがんがＮＳＣＬＣまたは黒色腫である場合、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}のＴＩＬが投与され、平均約７．８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、特にがんがＮＳＣＬＣまたは黒色腫である場合、平均約７．８×１０１０個のＴＩＬで、約２．３×１０１０～約１３．７×１０１０個のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約１．２×１０^{10}～約４．３×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約３×１０^{10}～約１２×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約４×１０^{10}～約１０×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約５×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約６×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約７×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}である。いくつかの実施形態では、特にがんが黒色腫である場合、治療上有効な投与量は、約７．８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、特にがんが黒色腫である場合、治療上有効な投与量は、約７．８×１０１０個のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、特にがんがＮＳＣＬＣである場合、治療上有効な投与量は、約７．８×１０１０個のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、特にがんが転移性ＮＳＣＬＣである場合、治療上有効な投与量は、約７．８×１０１０個のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約１．２×１０^{10}～約４．３×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約３×１０^{10}～約１２×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約４×１０^{10}～約１０×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約５×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約６×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約７×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬである。

【２７６７】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供されるＴＩＬの数は、約１×１０^{6}、２×１０^{6}、３×１０^{6}、４×１０^{6}、５×１０^{6}、６×１０^{6}、７×１０^{6}、８×１０^{6}、９×１０^{6}、１×１０^{7}、２×１０^{7}、３×１０^{7}、４×１０^{7}、５×１０^{7}、６×１０^{7}、７×１０^{7}、８×１０^{7}、９×１０^{7}、１×１０^{8}、２×１０^{8}、３×１０^{8}、４×１０^{8}、５×１０^{8}、６×１０^{8}、７×１０^{8}、８×１０^{8}、９×１０^{8}、１×１０^{9}、２×１０^{9}、３×１０^{9}、４×１０^{9}、５×１０^{9}、６×１０^{9}、７×１０^{9}、８×１０^{9}、９×１０^{9}、１×１０^{10}、２×１０^{10}、３×１０^{10}、４×１０^{10}、５×１０^{10}、６×１０^{10}、７×１０^{10}、８×１０^{10}、９×１０^{10}、１×１０^{11}、２×１０^{11}、３×１０^{11}、４×１０^{11}、５×１０^{11}、６×１０^{11}、７×１０^{11}、８×１０^{11}、９×１０^{11}、１×１０^{12}、２×１０^{12}、３×１０^{12}、４×１０^{12}、５×１０^{12}、６×１０^{12}、７×１０^{12}、８×１０^{12}、９×１０^{12}、１×１０^{13}、２×１０^{13}、３×１０^{13}、４×１０^{13}、５×１０^{13}、６×１０^{13}、７×１０^{13}、８×１０^{13}、及び９×１０^{13}である。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供されるＴＩＬの数は、１×１０^{6}～５×１０^{6}、５×１０^{6}～１×１０^{7}、１×１０^{7}～５×１０^{7}、５×１０^{7}～１×１０^{8}、１×１０^{8}～５×１０^{8}、５×１０^{8}～１×１０^{9}、１×１０^{9}～５×１０^{9}、５×１０^{9}～１×１０^{10}、１×１０^{1}

０～５×１０^{10}、５×１０^{10}～１×１０^{11}、５×１０^{11}～１×１０^{12}、１×１０^{12}～５×１０^{12}、及び５×１０^{12}～１×１０^{13}の範囲内である。

【２７６８】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、例えば、薬学的組成物の１００％、９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖ未満である。

【２７６９】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９．７５％、１９．５０％、１９．２５％、１９％、１８．７５％、１８．５０％、１８．２５％、１８％、１７．７５％、１７．５０％、１７．２５％、１７％、１６．７５％、１６．５０％、１６．２５％、１６％、１５．７５％、１５．５０％、１５．２５％、１５％、１４．７５％、１４．５０％、１４．２５％、１４％、１３．７５％、１３．５０％、１３．２５％、１３％、１２．７５％、１２．５０％、１２．２５％、１２％、１１．７５％、１１．５０％、１１．２５％、１１％、１０．７５％、１０．５０％、１０．２５％、１０％、９．７５％、９．５０％、９．２５％、９％、８．７５％、８．５０％、８．２５％、８％、７．７５％、７．５０％、７．２５％、７％、６．７５％、６．５０％、６．２５％、６％、５．７５％、５．５０％、５．２５％、５％、４．７５％、４．５０％、４．２５％、４％、３．７５％、３．５０％、３．２５％、３％、２．７５％、２．５０％、２．２５％、２％、１．７５％、１．５０％、１２５％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖ超である。

【２７７０】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の約０．０００１％～約５０％、約０．００１％～約４０％、約０．０１％～約３０％、約０．０２％～約２９％、約０．０３％～約２８％、約０．０４％～約２７％、約０．０５％～約２６％、約０．０６％～約２５％、約０．０７％～約２４％、約０．０８％～約２３％、約０．０９％～約２２％、約０．１％～約２１％、約０．２％～約２０％、約０．３％～約１９％、約０．４％～約１８％、約０．５％～約１７％、約０．６％～約１６％、約０．７％～約１５％、約０．８％～約１４％、約０．９％～約１２％、または約１％～約１０％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの範囲内である。

【２７７１】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の約０．００１％～約１０％、約０．０１％～約５％、約０．０２％～約４．５％、約０．０３％～約４％、約０．０４％～約３．５％、約０．０５％～約３％、約０．０６％～約２．５％、約０．０７％～約２％、約０．０８％～約１．５％、約０．０９％～約１％、約０．１％～約０．９％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの範囲内である。

【２７７２】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの量は、１０ｇ

、９．５ｇ、９．０ｇ、８．５ｇ、８．０ｇ、７．５ｇ、７．０ｇ、６．５ｇ、６．０ｇ、５．５ｇ、５．０ｇ、４．５ｇ、４．０ｇ、３．５ｇ、３．０ｇ、２．５ｇ、２．０ｇ、１．５ｇ、１．０ｇ、０．９５ｇ、０．９ｇ、０．８５ｇ、０．８ｇ、０．７５ｇ、０．７ｇ、０．６５ｇ、０．６ｇ、０．５５ｇ、０．５ｇ、０．４５ｇ、０．４ｇ、０．３５ｇ、０．３ｇ、０．２５ｇ、０．２ｇ、０．１５ｇ、０．１ｇ、０．０９ｇ、０．０８ｇ、０．０７ｇ、０．０６ｇ、０．０５ｇ、０．０４ｇ、０．０３ｇ、０．０２ｇ、０．０１ｇ、０．００９ｇ、０．００８ｇ、０．００７ｇ、０．００６ｇ、０．００５ｇ、０．００４ｇ、０．００３ｇ、０．００２ｇ、０．００１ｇ、０．０００９ｇ、０．０００８ｇ、０．０００７ｇ、０．０００６ｇ、０．０００５ｇ、０．０００４ｇ、０．０００３ｇ、０．０００２ｇ、または０．０００１ｇ以下である。

【２７７３】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの量は、０．０００１ｇ、０．０００２ｇ、０．０００３ｇ、０．０００４ｇ、０．０００５ｇ、０．０００６ｇ、０．０００７ｇ、０．０００８ｇ、０．０００９ｇ、０．００１ｇ、０．００１５ｇ、０．００２ｇ、０．００２５ｇ、０．００３ｇ、０．００３５ｇ、０．００４ｇ、０．００４５ｇ、０．００５ｇ、０．００５５ｇ、０．００６ｇ、０．００６５ｇ、０．００７ｇ、０．００７５ｇ、０．００８ｇ、０．００８５ｇ、０．００９ｇ、０．００９５ｇ、０．０１ｇ、０．０１５ｇ、０．０２ｇ、０．０２５ｇ、０．０３ｇ、０．０３５ｇ、０．０４ｇ、０．０４５ｇ、０．０５ｇ、０．０５５ｇ、０．０６ｇ、０．０６５ｇ、０．０７ｇ、０．０７５ｇ、０．０８ｇ、０．０８５ｇ、０．０９ｇ、０．０９５ｇ、０．１ｇ、０．１５ｇ、０．２ｇ、０．２５ｇ、０．３ｇ、０．３５ｇ、０．４ｇ、０．４５ｇ、０．５ｇ、０．５５ｇ、０．６ｇ、０．６５ｇ、０．７ｇ、０．７５ｇ、０．８ｇ、０．８５ｇ、０．９ｇ、０．９５ｇ、１ｇ、１．５ｇ、２ｇ、２．５、３ｇ、３．５、４ｇ、４．５ｇ、５ｇ、５．５ｇ、６ｇ、６．５ｇ、７ｇ、７．５ｇ、８ｇ、８．５ｇ、９ｇ、９．５ｇ、または１０ｇ超である。

【２７７４】

本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬは、広い投与量範囲にわたって有効である。正確な投与量は、投与経路、化合物が投与される形態、治療される対象の性別及び年齢、治療される対象の体重、ならびに主治医の選好及び経験に依存するであろう。適切な場合、ＴＩＬの臨床的に確立された投与量が使用される場合もある。ＴＩＬの投与量などの本明細書の方法を使用して投与される薬学的組成物の量は、治療されるヒトまたは哺乳動物、障害または状態の重症度、投与速度、医薬品有効成分の性質、及び処方医師の裁量に依存するであろう。

【２７７５】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、単回用量で投与され得る。かかる投与は、注射、例えば、静脈内注射によるものであり得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、複数回用量で投与され得る。投薬は、１年に１回、２回、３回、４回、５回、６回、または６回超であり得る。投薬は、月１回、２週間に１回、週１回、または隔日に１回であり得る。ＴＩＬの投与は、必要な限り継続することができる。

【２７７６】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}、8×10^{7}、9×10^{7}、1×10^{8}、2×10^{8}、3×10^{8}、4×10^{8}、5×10^{8}、6×10^{8}、7×10^{8}、8×10^{8}、9×10^{8}、1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、$6\times$

10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}、及び9×10^{13}である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、1×10^{6}～5×10^{6}、5×10^{6}～1×10^{7}、1×10^{7}～5×10^{7}、5×10^{7}～1×10^{8}、1×10^{8}～5×10^{8}、5×10^{8}～1×10^{9}、1×10^{9}～5×10^{9}、5×10^{9}～1×10^{10}、1×10^{10}～5×10^{10}、5×10^{10}～1×10^{11}、5×10^{11}～1×10^{12}、1×10^{12}～5×10^{12}、及び5×10^{12}～1×10^{13}の範囲内である。

【２７７７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約４．３ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約３．２ｍｇ／ｋｇ、約０．３５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．３ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約１．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１ｍｇ／ｋｇ、約０．５５ｍｇ／ｋｇ～約０．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．６５ｍｇ／ｋｇ～約０．８ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約０．７５ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．８５ｍｇ／ｋｇ～約２ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約１．８５ｍｇ／ｋｇ、約１．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約１．３ｍｇ／ｋｇ～約１．６ｍｇ／ｋｇ、約１．３５ｍｇ／ｋｇ～約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約２．３ｍｇ／ｋｇ～約３．４ｍｇ／ｋｇ、約２．４ｍｇ／ｋｇ～約３．３ｍｇ／ｋｇ、約２．６ｍｇ／ｋｇ～約３．１５ｍｇ／ｋｇ、約２．７ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、約２．８ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、または約２．８５ｍｇ／ｋｇ～約２．９５ｍｇ／ｋｇの範囲内である。

【２７７８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約１ｍｇ～約５００ｍｇ、約１０ｍｇ～約３００ｍｇ、約２０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約２５ｍｇ～約２００ｍｇ、約１ｍｇ～約５０ｍｇ、約５ｍｇ～約４５ｍｇ、約１０ｍｇ～約４０ｍｇ、約１５ｍｇ～約３５ｍｇ、約２０ｍｇ～約３０ｍｇ、約２３ｍｇ～約２８ｍｇ、約５０ｍｇ～約１５０ｍｇ、約６０ｍｇ～約１４０ｍｇ、約７０ｍｇ～約１３０ｍｇ、約８０ｍｇ～約１２０ｍｇ、約９０ｍｇ～約１１０ｍｇ、または約９５ｍｇ～約１０５ｍｇ、約９８ｍｇ～約１０２ｍｇ、約１５０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約１６０ｍｇ～約２４０ｍｇ、約１７０ｍｇ～約２３０ｍｇ、約１８０ｍｇ～約２２０ｍｇ、約１９０ｍｇ～約２１０ｍｇ、約１９５ｍｇ～約２０５ｍｇ、または約１９８～約２０７ｍｇの範囲内である。

【２７７９】

ＴＩＬの有効量は、鼻腔内経路及び経皮経路を含む、同様の有用性を有する薬剤の認められた投与様式のうちのいずれかによって、動脈内注射によって、静脈内、腹腔内、非経口、筋肉内、皮下、局所、移植によって、または吸入によって、単回用量または複数回用量のいずれかで投与され得る。

【２７８０】

いくつかの実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を含む注入バッグを提供する。

【２７８１】

いくつかの実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団及び薬学的に許容される担体を含む腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）組成物を提供する。

【２７８２】

いくつかの実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を含む注入バッグを提供する。

【２７８３】

いくつかの実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団の凍結保存された調製物を提供する。

【２７８４】

いくつかの実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団及び凍結保存された培地を含む腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）組成物を提供する。

【２７８５】

いくつかの実施形態では、本発明は、凍結保存培地がＤＭＳＯを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。

【２７８６】

いくつかの実施形態では、本発明は、凍結保存培地が７～１０％のＤＭＳＯを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。

【２７８７】

いくつかの実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物の凍結保存された調製物を提供する。

【２７８８】

いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して拡張されたＴＩＬは、薬学的組成物として患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌緩衝液中のＴＩＬ懸濁液である。本開示のＰＢＭＣを使用して拡張されたＴＩＬは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、単回の動脈内または静脈内注入として投与され、これは、好ましくは、およそ３０～６０分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内投与が含まれる。

【２７８９】

任意の好適な用量のＴＩＬが投与され得る。いくつかの実施形態では、特にがんがＮＳＣＬＣである場合、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}のＴＩＬが投与され、平均は約７．８×10^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、約１．２×10^{10}～約４．３×10^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約３×10^{10}～約１２×10^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約４×10^{10}～約１０×10^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約５×10^{10}～約８×10^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約６×10^{10}～約８×10^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約７×10^{10}～約８×10^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}である。いくつかの実施形態では、特にがんがＮＳＣＬＣである場合、治療上有効な投与量は、約７．８×10^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約１．２×10^{10}～約４．３×10^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約３×10^{10}～約１２×10^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約４×10^{10}～約１０×10^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約５×10^{10}～約８×10^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約６×10^{10}～約８×10^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約７×10^{10}～約８×10^{10}ＴＩＬである。

【２７９０】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供されるＴＩＬの数は、約１×10^{6}、２×10^{6}、３×10^{6}、４×10^{6}、５×10^{6}、６×10^{6}、７×10^{6}、８×10^{6}、９×10^{6}、１×10^{7}、２×10^{7}、３×10^{7}、４×10^{7}、５×10^{7}、６×10^{7}、７×10^{7}、８×10^{7}、９×10^{7}、１×10^{8}、２×10^{8}、３×10^{8}、４×10^{8}、５×10^{8}、６×10^{8}、７×10^{8}、８×10^{8}、９×10^{8}、１×10^{9}、２×10^{9}、３×10^{9}、４×10^{9}、５×10^{9}、６×10^{9}、７×10^{9}、８×10^{9}、９×10^{9}、１×10^{10}、２×10^{10}、３×10^{10}、４×10^{10}、５×10^{10}、６×10^{10}、７×10^{10}、８×10^{10}、９×10^{10}、１×10^{11}、２×10^{11}、３×10^{11}、４×10^{11}、５×10^{11}、６×10^{11}、７×10^{1}

１、８×１０^{11}、９×１０^{11}、１×１０^{12}、２×１０^{12}、３×１０^{12}、４×１０^{12}、５×１０^{12}、６×１０^{12}、７×１０^{12}、８×１０^{12}、９×１０^{12}、１×１０^{13}、２×１０^{13}、３×１０^{13}、４×１０^{13}、５×１０^{13}、６×１０^{13}、７×１０^{13}、８×１０^{13}、及び９×１０^{13}である。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供されるＴＩＬの数は、１×１０^{6}～５×１０^{6}、５×１０^{6}～１×１０^{7}、１×１０^{7}～５×１０^{7}、５×１０^{7}～１×１０^{8}、１×１０^{8}～５×１０^{8}、５×１０^{8}～１×１０^{9}、１×１０^{9}～５×１０^{9}、５×１０^{9}～１×１０^{10}、１×１０^{10}～５×１０^{10}、５×１０^{10}～１×１０^{11}、５×１０^{11}～１×１０^{12}、１×１０^{12}～５×１０^{12}、及び５×１０^{12}～１×１０^{13}の範囲内である。

【２７９１】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、例えば、薬学的組成物の１００％、９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖ未満である。

【２７９２】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９．７５％、１９．５０％、１９．２５％、１９％、１８．７５％、１８．５０％、１８．２５％、１８％、１７．７５％、１７．５０％、１７．２５％、１７％、１６．７５％、１６．５０％、１６．２５％、１６％、１５．７５％、１５．５０％、１５．２５％、１５％、１４．７５％、１４．５０％、１４．２５％、１４％、１３．７５％、１３．５０％、１３．２５％、１３％、１２．７５％、１２．５０％、１２．２５％、１２％、１１．７５％、１１．５０％、１１．２５％、１１％、１０．７５％、１０．５０％、１０．２５％、１０％、９．７５％、９．５０％、９．２５％、９％、８．７５％、８．５０％、８．２５％、８％、７．７５％、７．５０％、７．２５％、７％、６．７５％、６．５０％、６．２５％、６％、５．７５％、５．５０％、５．２５％、５％、４．７５％、４．５０％、４．２５％、４％、３．７５％、３．５０％、３．２５％、３％、２．７５％、２．５０％、２．２５％、２％、１．７５％、１．５０％、１２５％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖ超である。

【２７９３】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の約０．０００１％～約５０％、約０．００１％～約４０％、約０．０１％～約３０％、約０．０２％～約２９％、約０．０３％～約２８％、約０．０４％～約２７％、約０．０５％～約２６％、約０．０６％～約２５％、約０．０７％～約２４％、約０．０８％～約２３％、約０．０９％～約２２％、約０．１％～約２１％、約０．２％～約２０％、約０．３％～約１９％、約０．４％～約１８％、約０．５％～約１７％、約０．６％～約１６％、約０．７％～約１５％、約０．８％～約１４％、約０．９％～約１２％、または約１％～約１０％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの範囲内である。

【２７９４】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の約０．００１％～約１０％、約０．０１％～約５％、約０．０２％～約４．５％、約０．０３％～約４％、約０．０４％～約３．５％、約０．０５％～約３％、約０．０６％～約２．５％、約０．０７％～約２％、約０．０８％～約１．５％、約０．０９％～約１％、約０．１％～約０．９％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの範囲内である。

【２７９５】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの量は、１０ｇ、９．５ｇ、９．０ｇ、８．５ｇ、８．０ｇ、７．５ｇ、７．０ｇ、６．５ｇ、６．０ｇ、５．５ｇ、５．０ｇ、４．５ｇ、４．０ｇ、３．５ｇ、３．０ｇ、２．５ｇ、２．０ｇ、１．５ｇ、１．０ｇ、０．９５ｇ、０．９ｇ、０．８５ｇ、０．８ｇ、０．７５ｇ、０．７ｇ、０．６５ｇ、０．６ｇ、０．５５ｇ、０．５ｇ、０．４５ｇ、０．４ｇ、０．３５ｇ、０．３ｇ、０．２５ｇ、０．２ｇ、０．１５ｇ、０．１ｇ、０．０９ｇ、０．０８ｇ、０．０７ｇ、０．０６ｇ、０．０５ｇ、０．０４ｇ、０．０３ｇ、０．０２ｇ、０．０１ｇ、０．００９ｇ、０．００８ｇ、０．００７ｇ、０．００６ｇ、０．００５ｇ、０．００４ｇ、０．００３ｇ、０．００２ｇ、０．００１ｇ、０．０００９ｇ、０．０００８ｇ、０．０００７ｇ、０．０００６ｇ、０．０００５ｇ、０．０００４ｇ、０．０００３ｇ、０．０００２ｇ、または０．０００１ｇ以下である。

【２７９６】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの量は、０．０００１ｇ、０．０００２ｇ、０．０００３ｇ、０．０００４ｇ、０．０００５ｇ、０．０００６ｇ、０．０００７ｇ、０．０００８ｇ、０．０００９ｇ、０．００１ｇ、０．００１５ｇ、０．００２ｇ、０．００２５ｇ、０．００３ｇ、０．００３５ｇ、０．００４ｇ、０．００４５ｇ、０．００５ｇ、０．００５５ｇ、０．００６ｇ、０．００６５ｇ、０．００７ｇ、０．００７５ｇ、０．００８ｇ、０．００８５ｇ、０．００９ｇ、０．００９５ｇ、０．０１ｇ、０．０１５ｇ、０．０２ｇ、０．０２５ｇ、０．０３ｇ、０．０３５ｇ、０．０４ｇ、０．０４５ｇ、０．０５ｇ、０．０５５ｇ、０．０６ｇ、０．０６５ｇ、０．０７ｇ、０．０７５ｇ、０．０８ｇ、０．０８５ｇ、０．０９ｇ、０．０９５ｇ、０．１ｇ、０．１５ｇ、０．２ｇ、０．２５ｇ、０．３ｇ、０．３５ｇ、０．４ｇ、０．４５ｇ、０．５ｇ、０．５５ｇ、０．６ｇ、０．６５ｇ、０．７ｇ、０．７５ｇ、０．８ｇ、０．８５ｇ、０．９ｇ、０．９５ｇ、１ｇ、１．５ｇ、２ｇ、２．５、３ｇ、３．５、４ｇ、４．５ｇ、５ｇ、５．５ｇ、６ｇ、６．５ｇ、７ｇ、７．５ｇ、８ｇ、８．５ｇ、９ｇ、９．５ｇ、または１０ｇ超である。

【２７９７】

本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬは、広い投与量範囲にわたって有効である。正確な投与量は、投与経路、化合物が投与される形態、治療される対象の性別及び年齢、治療される対象の体重、ならびに主治医の選好及び経験に依存するであろう。適切な場合、ＴＩＬの臨床的に確立された投与量が使用される場合もある。ＴＩＬの投与量などの本明細書の方法を使用して投与される薬学的組成物の量は、治療されるヒトまたは哺乳動物、障害または状態の重症度、投与速度、医薬品有効成分の性質、及び処方医師の裁量に依存するであろう。

【２７９８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、単回用量で投与され得る。かかる投与は、注射、例えば、静脈内注射によるものであり得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、複数回用量で投与され得る。投薬は、１年に１回、２回、３回、４回、５回、６回、または６回超であり得る。投薬は、月１回、２週間に１回、週１回、または隔日に１回であり得る。ＴＩＬの投与は、必要な限り継続することができる。

【２７９９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}

、８×１０^{7}、９×１０^{7}、１×１０^{8}、２×１０^{8}、３×１０^{8}、４×１０^{8}、５×１０^{8}、６×１０^{8}、７×１０^{8}、８×１０^{8}、９×１０^{8}、１×１０^{9}、２×１０^{9}、３×１０^{9}、４×１０^{9}、５×１０^{9}、６×１０^{9}、７×１０^{9}、８×１０^{9}、９×１０^{9}、１×１０^{10}、２×１０^{10}、３×１０^{10}、４×１０^{10}、５×１０^{10}、６×１０^{10}、７×１０^{10}、８×１０^{10}、９×１０^{10}、１×１０^{11}、２×１０^{11}、３×１０^{11}、４×１０^{11}、５×１０^{11}、６×１０^{11}、７×１０^{11}、８×１０^{11}、９×１０^{11}、１×１０^{12}、２×１０^{12}、３×１０^{12}、４×１０^{12}、５×１０^{12}、６×１０^{12}、７×１０^{12}、８×１０^{12}、９×１０^{12}、１×１０^{13}、２×１０^{13}、３×１０^{13}、４×１０^{13}、５×１０^{13}、６×１０^{13}、７×１０^{13}、８×１０^{13}、及び９×１０^{13}である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、１×１０^{6}～５×１０^{6}、５×１０^{6}～１×１０^{7}、１×１０^{7}～５×１０^{7}、５×１０^{7}～１×１０^{8}、１×１０^{8}～５×１０^{8}、５×１０^{8}～１×１０^{9}、１×１０^{9}～５×１０^{9}、５×１０^{9}～１×１０^{10}、１×１０^{10}～５×１０^{10}、５×１０^{10}～１×１０^{11}、５×１０^{11}～１×１０^{12}、１×１０^{12}～５×１０^{12}、及び５×１０^{12}～１×１０^{13}の範囲内である。

【２８００】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約４．３ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約３．２ｍｇ／ｋｇ、約０．３５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．３ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約１．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１ｍｇ／ｋｇ、約０．５５ｍｇ／ｋｇ～約０．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．６５ｍｇ／ｋｇ～約０．８ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約０．７５ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．８５ｍｇ／ｋｇ～約２ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約１．８５ｍｇ／ｋｇ、約１．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約１．３ｍｇ／ｋｇ～約１．６ｍｇ／ｋｇ、約１．３５ｍｇ／ｋｇ～約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約２．３ｍｇ／ｋｇ～約３．４ｍｇ／ｋｇ、約２．４ｍｇ／ｋｇ～約３．３ｍｇ／ｋｇ、約２．６ｍｇ／ｋｇ～約３．１５ｍｇ／ｋｇ、約２．７ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、約２．８ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、または約２．８５ｍｇ／ｋｇ～約２．９５ｍｇ／ｋｇの範囲内である。

【２８０１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約１ｍｇ～約５００ｍｇ、約１０ｍｇ～約３００ｍｇ、約２０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約２５ｍｇ～約２００ｍｇ、約１ｍｇ～約５０ｍｇ、約５ｍｇ～約４５ｍｇ、約１０ｍｇ～約４０ｍｇ、約１５ｍｇ～約３５ｍｇ、約２０ｍｇ～約３０ｍｇ、約２３ｍｇ～約２８ｍｇ、約５０ｍｇ～約１５０ｍｇ、約６０ｍｇ～約１４０ｍｇ、約７０ｍｇ～約１３０ｍｇ、約８０ｍｇ～約１２０ｍｇ、約９０ｍｇ～約１１０ｍｇ、または約９５ｍｇ～約１０５ｍｇ、約９８ｍｇ～約１０２ｍｇ、約１５０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約１６０ｍｇ～約２４０ｍｇ、約１７０ｍｇ～約２３０ｍｇ、約１８０ｍｇ～約２２０ｍｇ、約１９０ｍｇ～約２１０ｍｇ、約１９５ｍｇ～約２０５ｍｇ、または約１９８～約２０７ｍｇの範囲内である。

【２８０２】

ＴＩＬの有効量は、鼻腔内経路及び経皮経路を含む、同様の有用性を有する薬剤の認められた投与様式のうちのいずれかによって、動脈内注射によって、静脈内、腹腔内、非経口、筋肉内、皮下、局所、移植によって、または吸入によって、単回用量または複数回用量のいずれかで投与され得る。

【２８０３】

Ｘ．患者を治療する方法

治療方法は、最初のＴＩＬ収集及びＴＩＬの培養から始まる。かかる方法は両方とも、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｊｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉ

ｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，２０１２，３５（３）：２８３－２９２によって当該技術分野で説明されている。治療方法の実施形態は、実施例を含む以下の節全体に記載されている。

【２８０４】

本明細書に記載の方法に従って、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また例えば、図１及びまたは図８に示されるように）産生される拡張されたＴＩＬは、がんを有する患者の治療における特定の使用を見出す（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｇｏｆｆ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２０１６，３４（２０）：２３８９－２３９、及び補足内容に記載される）。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、以前に記載されたように、転移性黒色腫の切除された沈着物から増殖された（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００３，２６：３３２－３４２を参照されたい）。新鮮な腫瘍は、滅菌条件下で解剖され得る。代表的な試料は、正式な病理学的分析のために収集され得る。２ｍｍ^3～３ｍｍ^{3}の単一断片が使用され得る。いくつかの実施形態では、患者当たり５、１０、１５、２０、２５、または３０個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり２０、２５、または３０個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり２０、２２、２４、２６、または２８個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり２４個の試料が取得される。試料は、２４ウェルプレートの個々のウェル内に配置され、高用量ＩＬ－２（６，０００ＩＵ／ｍＬ）を含む成長培地中で維持され、腫瘍の破壊及び／またはＴＩＬの増殖について監視され得る。処理後に生細胞が残っている腫瘍は、本明細書に記載されるように、単一細胞懸濁液中に酵素的に消化され、凍結保存され得る。

【２８０５】

いくつかの実施形態では、成功裏に成長したＴＩＬは、表現型分析（ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、及びＣＤ５６）のために試料採取され、利用可能な場合、自己腫瘍に対して試験され得る。一晩の共培養によりインターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）レベルが２００ｐｇ／ｍＬを超え、バックグラウンドの２倍になった場合、ＴＩＬは反応性があるとみなされ得る。（Ｇｏｆｆ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２０１０，３３：８４０－８４７、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態では、自己反応性または十分な成長パターンの証拠を有する培養物は、急速拡張（ＲＥＰ）と称されることもある第２の拡張を含む、第２の拡張（例えば、図１及び／または図８のステップＤに従って提供される第２の拡張）のために選択され得る。いくつかの実施形態では、高い自己反応性（例えば、第２の拡張中の高い増殖）を有する拡張ＴＩＬが、追加の第２の拡張のために選択される。いくつかの実施形態では、高い自己反応性（例えば、図１及び／または図８のステップＤで提供されるような第２の拡張中の高い増殖）を有するＴＩＬが、図１及び／または図８のステップＤに従って、追加の第２の拡張のために選択される。

【２８０６】

注入バッグＴＩＬの凍結保存試料の細胞表現型は、表面マーカーＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＣＲ７、及びＣＤ４５ＲＡ（ＢＤ　ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ）のフローサイトメトリー（例えば、ＦｌｏｗＪｏ）、ならびに本明細書に記載の方法のうちのいずれかによって分析され得る。血清サイトカインは、標準的な酵素結合免疫吸着アッセイ技術を使用することにより測定された。血清ＩＦＮ－ｇの上昇は、１００ｐｇ／ｍＬ超及び４　３ベースラインレベルを超えると定義された。

【２８０７】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図１及び／または図８に例示される方法によって産生されるＴＩＬは、ＴＩＬの臨床効果の驚くべき改善を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図１及び／または図８に例示される方法によって産生されるＴＩＬは、例えば、図１及び／または図８に例示されるもの以外の方法を含む、本明細書に記載されるもの以外の方法によって産生されるＴ

ＩＬと比較して、増加した臨床効果を示す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるもの以外の方法は、プロセス１Ｃ及び／または第１世代（Ｇｅｎ１）と称される方法を含む。いくつかの実施形態では、増加した有効性は、ＤＣＲ、ＯＲＲ、及び／または他の臨床応答によって測定される。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図１に例示される方法によって産生されるＴＩＬは、例えば、図１及び／または図８に例示されるもの以外の方法を含む、本明細書に記載されるもの以外の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、同様の応答時間及び安全性プロファイルを示す。

【２８０８】

いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）は、治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。いくつかの実施形態では、ＴＩＬで治療された対象の血液中のＩＦＮ－γは、活性なＴＩＬを示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ産生の効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能の別の尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、例えば、図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のエクスビボでの血液、血清、またはＴＩＬ中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することによって測定することができる。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γの増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬで治療された患者における治療有効性を示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、ＩＦＮ－γが１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、３倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、４倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＥＬＩＳＡキットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば、図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のエクスビボでのＴＩＬにおいて測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象の血液において測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば、図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のＴＩＬ血清において測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）は、がんの治療における治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。

【２８０９】

いくつかの実施形態では、例えば図１及び／または図８のＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されるＴＩＬは、治療有効性及び／または臨床有効性の増加を示す。いくつかの実施形態では、ＴＩＬで治療された対象の血液中のＩＦＮ－γは、活性なＴＩＬを示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ産生

の効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能の別の尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、例えば、図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のエクスビボでの血液、血清、またはＴＩＬ中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することによって測定することができる。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γの増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬで治療された患者における治療有効性を示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、ＩＦＮ－γが１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上増加する。

【２８１０】

いくつかの実施形態では、例えば図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されるＴＩＬは、例えばプロセス１Ｃ法と称される方法を含む、図１及び／または図８に例示されていないものを含む他の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、増加したポリクローン性を示す。いくつかの実施形態では、有意に改善されたポリクローン性及び／または増加したポリクローン性は、治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、Ｔ細胞レパートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性の増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬの投与に関する治療有効性を示すことができる。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、１倍、２倍、１０倍、１００倍、５００倍、または１０００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０００倍増加する。

【２８１１】

有効性の尺度には、当該技術分野で知られており、本明細書にも記載されている、疾患制御率（ＤＣＲ）ならびに全応答率（ＯＲＲ）が含まれ得る。

【２８１２】

いくつかの実施形態では、本発明は、ＴＩＬ集団でＮＳＣＬＣを治療する方法を含み、患者は、本開示によるＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド６０ｍｇ／ｋｇ／日で２日間（ＴＩＬ注入の２７日前及び２６日前）、ならびにフルダラビン２５ｍｇ／ｍ２／日で５日間（ＴＩＬ注入の２７日前～２３日前）である。いくつかの実施形態では、骨髄非

破壊的化学療法は、シクロホスファミド６０ｍｇ／ｋｇ／日で２日間（ＴＩＬ注入の２７日前及び２６日前）、ならびにフルダラビン２５ｍｇ／ｍ２／日で３日間（ＴＩＬ注入の２７日前～２５日前）である。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド６０ｍｇ／ｋｇ／日で２日間（ＴＩＬ注入の２７日前及び２６日前）、続いてフルダラビン２５ｍｇ／ｍ２／日で３日間（ＴＩＬ注入の２５日前～２３日前）である。いくつかの実施形態では、本開示による骨髄非破壊的化学療法及びＴＩＬ注入（０日目）後、患者は、生理学的許容範囲まで８時間毎に７２０，０００ＩＵ／ｋｇでＩＬ－２の静脈内注入を受ける。

【２８１３】

示される疾患または障害の治療、予防、及び／または管理における本明細書に記載の化合物及び化合物の組み合わせの有効性は、ヒト疾患の治療のためのガイダンスを提供する当技術分野で知られている様々なモデルを使用して試験され得る。例えば、肺癌の治療の有効性を決定するためのモデルは、例えば、Ｍｅｕｗｉｓｓｅｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ＆Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ，２００５，１９，６４３－６６４に記載されている。肺癌の治療の有効性を決定するためのモデルは、例えば、Ｋｉｍ，Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｏｔｏｒｈｉｎｏｌａｒｙｎｇｏｌ．２００９，２，５５－６０、及びＳａｎｏ，Ｈｅａｄ　Ｎｅｃｋ　Ｏｎｃｏｌ．２００９，１，３２に記載されている。

【２８１４】

いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）は、ＮＳＣＬＣ治療の治療有効性を示す。いくつかの実施形態では、ＴＩＬで治療された対象の血液中のＩＦＮ－γは、活性なＴＩＬを示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ産生の効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能の別の尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に記載の方法を含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象の血液中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することによって測定され得る。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）及び本明細書全体を通して例示されるＧｅｎ３プロセスと称される方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された対象と比較して、本方法のＴＩＬで治療された対象の血液中のＩＦＮ－γの増加を提供する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γの増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬで治療された患者における治療有効性を示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／ま

たは図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、３倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、４倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＥＬＩＳＡキットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＥＬＩＳＡキットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、本発明の方法によって産生されたＴＩＬで治療された患者由来のエクスビボでのＴＩＬ中で測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、本発明の方法によって産生されたＴＩＬで治療された患者由来の血液中で測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、本発明の方法によって産生されたＴＩＬで治療された患者由来の血清中で測定される。

【２８１５】

いくつかの実施形態では、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ）に記載の方法を含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬは、例えば、プロセス１Ｃ法と称される方法などの、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に例示されていないものを含む他の方法によって産生されたＴＩＬと比較して、増加したポリクローン性を示す。いくつかの実施形態では、有意に改善されたポリクローン性及び／または増加したポリクローン性は、がん治療に対する治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、Ｔ細胞レパートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性の増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬの投与に関する治療有効性を示すことができる。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、１倍、２倍、１０倍、１００倍、５００倍、または１０００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に具体化される

もの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図４８Ａ及び／または図４８Ｂ及び／または図４８Ｃ及び／または図４８Ｄ）に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０００倍増加する。

【２８１６】

Ａ．がんを治療する方法

本明細書に記載の組成物及び方法は、疾患を治療するための方法で使用され得る。いくつかの実施形態では、それらは、成人患者または小児患者における、がんなどの過剰増殖性障害の治療に使用するためのものである。それらは、本明細書及び以下の段落に記載される他の障害の治療にも使用され得る。

【２８１７】

いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、がんである。いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、固形腫瘍がんである。いくつかの実施形態では、固形腫瘍がんは、肛門癌、膀胱癌、乳癌（トリプルネガティブ乳癌を含む）、骨癌、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）によって引き起こされるがん、中枢神経系関連癌（上衣腫、髄芽腫、神経芽腫、松果体芽腫、及び未分化神経外胚葉性腫瘍を含む）、子宮頸癌（扁平上皮癌、腺扁平上皮癌、及び子宮頸部腺癌）、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、食道胃接合癌、胃癌、消火器癌、消化管間質腫瘍、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、下咽頭癌、喉頭癌、鼻咽頭癌、中咽頭癌、及び咽頭癌）、腎臓癌、肝臓癌、肺癌（非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、転移性ＮＳＣＬＣ、及び小細胞肺癌を含む）、黒色腫（ブドウ膜黒色腫、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、虹彩黒色腫、または転移性黒色腫を含む）、中皮腫（悪性胸膜中皮腫を含む）、卵巣癌、膵臓癌（膵管腺癌を含む）、陰茎癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉腫（ユーイング肉腫、骨肉腫、横紋筋肉腫、ならびに他の骨及び軟部組織肉腫を含む）、甲状腺癌（未分化甲状腺癌を含む）、子宮癌、ならびに膣癌からなる群から選択される。

【２８１８】

いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、慢性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、及び多発性骨髄腫からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、本発明は、がん患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、本発明は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、及びＣＢＬ－Ｂのうちの１つ以上を下方調節するように修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、本発明は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、及びＣＢＬ－ＢＲのうちの１つ以上を下方調節するように修飾されたＭＩＬまたはＰＢＬを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪

性腫瘍である。

【２８１９】

いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、または免疫療法を含む少なくとも１つの前療法による治療に対して再発するか、または不応性である、固形腫瘍がん及び血液学的悪性腫瘍を含む、前述のがんのうちの１つである。いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、及び／または免疫療法を含む少なくとも２つの以前の療法による治療に対して再発するか、または不応性である、前述のがんのうちの１つである。いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、及び／または免疫療法を含む少なくとも３つの以前の療法による治療に対して再発するか、または不応性である前述のがんのうちの１つである。

【２８２０】

いくつかの実施形態では、がんは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）癌である。したがって、ＭＳＩ－Ｈ及びｄＭＭＲ癌ならびに試験は、Ｋａｗａｋａｍｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｔｒｅａｔ．Ｏｐｔｉｏｎｓ　Ｏｎｃｏｌ．２０１５，１６，３０に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【２８２１】

いくつかの実施形態では、本発明は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂのうちの１つ以上を下方調節するように修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを使用してがんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、ヒトである。いくつかの実施形態では、本発明は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂのうちの１つ以上を下方調節するように修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを使用してがんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、非ヒトである。いくつかの実施形態では、本発明は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂのうちの１つ以上を下方調節するように修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを使用してがんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、伴侶動物である。

【２８２２】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ＢＲＡＦ阻害剤及び／またはＭＥＫ阻害剤による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ベムラフェニブ、ダブラフェニブ、エンコラフェニブ、ソラフェニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるＢＲＡＦ阻害剤による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、トラメチニブ、コビメチニブ、ビニメチニブ、セルメチニブ、ピマセルチニブ、レファメチニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるＭＥＫ阻害剤による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ベムラフェニブ、ダブラフェニブ、エンコラフェニブ、ソラフェニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるＢＲＡＦ阻害剤、ならびにトラメチニブ、コビメチニブ、ビニメチニブ、セルメチニブ、ピマセルチニブ、レファメチニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるＭＥＫ阻害剤による治療に対して不応性である。

【２８２３】

いくつかの実施形態では、本発明は、がん患者を治療する方法を含み、がんは、小児癌である。

【２８２４】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ブドウ膜黒色腫である。

【２８２５】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、ブドウ膜黒色腫は、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫である。

【２８２６】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児癌は、神経芽腫である。

【２８２７】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児癌は、肉腫である。

【２８２８】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、肉腫は、骨肉腫である。

【２８２９】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、肉腫は、軟部組織肉腫である。

【２８３０】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、軟部組織肉腫は、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、または未分化神経外胚葉性腫瘍（ＰＮＥＴ）である。

【２８３１】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児癌は、中枢神経系（ＣＮＳ）関連癌である。いくつかの実施形態では、小児癌は、化学療法による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、小児癌は、放射線療法による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、小児癌は、ジヌツキシマブによる治療に対して不応性である。

【２８３２】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、ＣＮＳ関連癌は、髄芽腫、松果芽腫、神経膠腫、上衣腫、または神経膠芽細胞腫である。

【２８３３】

本明細書に記載の組成物及び方法は、がんを治療するための方法において使用することができ、がんは、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体による治療に対して不応性または耐性である。いくつかの実施形態では、患者は、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対する一次不応性患者である。いくつかの実施形態では、患者は、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対する事前の応答を示さない。いくつかの実施形態では、患者は、患者のがんの進行に続く、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対する事前の応答を示す。いくつかの実施形態では、がんは、少なくとも１つの化学療法剤と組み合わせた抗ＣＴＬＡ－４抗体及び／または抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対して不応性である。いくつかの実施形態では、以前の化学療法剤は、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、及び／またはシスプラチンである。いくつかの実施形態では、化学療法剤（複数可）は、白金ダブレット化学療法剤である。いくつかの実施形態では、白金ダブレット療法は、シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤と、ビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはナブ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療法剤と、を含む。いくつかの実施形態では、白金ダブレット化学療法剤は、ペメトレキセドと組み合わされている。

【２８３４】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ＰＤ－Ｌ１陰性であり、及び／または本明細書の他の場所に記載されるように、腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）が１％未満でＰＤ－Ｌ１を発現するがんを有する患者に由来する。

【２８３５】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体及び白金

ダブレット療法を含む併用療法に対して不応性であり、白金ダブレット療法は、
ｉ）シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤、
ｉｉ）及びビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはｎａｂ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療法剤を含む。

【２８３６】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体、ペメトレキセド、及び白金ダブレット療法を含む併用療法に対して不応性であり、白金ダブレット療法は、
ｉ）シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤、
ｉｉ）及びビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはｎａｂ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療法剤を含む。

【２８３７】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１抗体で治療されている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で処理されている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療未経験である。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、以前に化学療法剤で治療されている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、以前に化学療法剤で治療されているが、もはや化学療法剤で治療されていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療未経験のＮＳＣＬＣを有するか、または化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１未経験である。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療未経験または化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１未経験であり、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。いくつかの実施形態では、対象は、ベースラインで巨大腫瘤病変を有し、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、検出可能なＰＤ－Ｌ１の発現を有しない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療未経験または化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１未経験であり、検出可能なＰＤ－Ｌ１の発現を有しない。いくつかの実施形態では、患者は、ベースラインで巨大腫瘤病変を有し、検出可能なＰＤ－Ｌ１の発現を有しない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療未経験のＮＳＣＬＣまたは化学療法後（例えば、化学療法剤後）であるが、ＰＤ－Ｌ１の発現が低く、及び／またはベースラインで巨大腫瘤病変を有する抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１未経験である。いくつかの実施形態では、最大腫瘍直径が横方向または冠状面のいずれかで測定された７ｃｍより大きい場合、巨大腫瘤病変が示される。いくつかの実施形態では、巨大腫瘤病変は、２０ｍｍ以上の短軸直径を有する腫れたリンパ節がある場合に示される。いくつかの実施形態では、化学療法剤は、ＮＳＣＬＣの標準治療の治療薬を含む。

【２８３８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１発現は、腫瘍割合スコアによって決定される。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象は、＜１％の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）を有する。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象は、≧１％　ＴＰＳを有する。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣを有する対象は、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、該抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣを有する対象は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、該抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。

【２８３９】

いくつかの実施形態では、例えば、図１、図３６、または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されるＴＩＬは、例えば、プロセス１Ｃ法と称される方法などの、図１、図３６、または図８に例示されていないものを含む他の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、増加したポリクローン性を示す。いくつかの実施形態では、有意に改善されたポリクローン性及び／または増加したポリクローン性は、がん治療に対する治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、Ｔ細胞レパートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性の増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬの投与に関する治療有効性を示すことができる。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、例えば、図１、図３６、または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、１倍、２倍、１０倍、１００倍、５００倍、または１０００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１、図３６、または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１、図３６、または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１、図３６、または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１、図３６、または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１、図３６、または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１、図３６、または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０００倍増加する。

【２８４０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１発現は、本明細書に記載の１つのさらなる試験方法を使用して、腫瘍割合スコアによって決定される。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象または患者は、＜１％の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ腫瘍は、≧１％　ＴＰＳを有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象または患者は、＜１％の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）を有する。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象または患者は、≧１％ＴＰＳを有する。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。

【２８４１】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、１％未満（ＴＰＳ＜１％）のＰＤ－Ｌ１タン

パク質についての任意の強度での部分的または完全な膜染色を示す、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１療法の前に採取された患者からの腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）または生存腫瘍細胞のパーセンテージを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、＜５０％、＜４５％、＜４０％、＜３５％、＜３０％、＜２５％、＜２０％、＜１５％、＜１０％、＜９％、＜８％、＜７％、＜６％、＜５％、＜４％、＜３％、＜２％、＜１％、＜０．９％、＜０．８％、＜０．７％、＜０．６％、＜０．５％、＜０．４％、＜０．３％、＜０．２％、＜０．１％、＜０．０９％、＜０．０８％、＜０．０７％、＜０．０６％、＜０．０５％、＜０．０４％、＜０．０３％、＜０．０２％、及び＜０．０１％からなる群から選択されるＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、約５０％、約４５％、約４０％、約３５％、約３０％、約２５％、約２０％、約１５％、約１０％、約９％、約８％、約７％、約６％、約５％、約４％、約３％、約２％、約１％、約０．９％、約０．８％、約０．７％、約０．６％、約０．５％、約０．４％、約０．３％、約０．２％、約０．１％、約０．０９％、約０．０８％、約０．０７％、約０．０６％、約０．０５％、約０．０４％、約０．０３％、約０．０２％，及び約０．０１％からなる群から選択されるＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～１％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．９％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．８％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．７％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．６％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．５％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．４％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．３％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．２％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．１％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。ＴＰＳは、当該技術分野で知られている方法、例えば、Ｈｉｒｓｃｈ，ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｔｈｏｒａｃ．Ｏｎｃｏｌ．２０１７，１２，２０８－２２２に記載される方法、あるいはペムブロリズマブまたは他の抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１療法による治療前のＴＰＳの決定に使用される方法によって測定され得る。米国食品医薬品局（Ｕ．Ｓ．Ｆｏｏｄ　ａｎｄ　Ｄｒｕｇ　Ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）によって承認されたＴＰＳの測定のための方法を使用することもできる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、エクソソームＰＤ－Ｌ１である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、循環腫瘍細胞上に見出される。

【２８４２】

いくつかの実施形態では、部分的な膜染色は、１％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、またはそれ以上を含む。いくつかの実施形態では、完了した膜染色は、およそ１００％の膜染色を含む。

【２８４３】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１の試験は、患者の血清中のＰＤ－Ｌ１のレベルを測定することを伴い得る。これらの実施形態では、患者の血清中のＰＤ－Ｌ１の測定は、腫瘍の不均一性の不確実性及び連続生検の患者の不快感を除去する。

【２８４４】

いくつかの実施形態では、ベースラインまたは標準レベルと比較して、可溶性ＰＤ－Ｌ１の上昇は、ＮＳＣＬＣにおける予後の悪化と相関する。例えば、Ｏｋｕｍａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｌｕｎｇ　Ｃａｎｃｅｒ，２０１８，１９，４１０－４１７、Ｖｅｃｃｈｉａｒｅｌｌｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｏｎｃｏｔａｒｇｅｔ，２０１８，９，１７５５４－１７５６３を参照されたい。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、エクソソームＰＤ－Ｌ１である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、循環腫瘍細胞上に発現される。

【２８４５】
いくつかの実施形態では、対象または患者は、
ｉ．＜１％のＰＤ－Ｌ１所定の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）、
ｉｉ．１％～４９％のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコア、または
ｉｉｉ．１つ以上のドライバー変異の所定の非存在のうちの少なくとも１つを特徴とする非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を有し、
ドライバー変異は、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＥＧＦＲエクソン２０、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、ＲＥＴ融合、ＥＲＢＢ２変異、ＥＲＢＢ２増幅、ＢＲＣＡ変異、ＭＡＰ２Ｋ１変異、ＰＩＫ３ＣＡ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＰＴＥＮ変異、ＵＭＤ変異、ＮＲＡＳ変異、ＫＲＡＳ変異、ＮＦ１変異、ＭＥＴ変異、ＭＥＴスプライス及び／または変化したＭＥＴシグナル伝達、ＴＰ５３変異、ＣＲＥＢＢＰ変異、ＫＭＴ２Ｃ変異、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１変異、ＡＴＭ変異、ＳＥＴＤ２変異、ＦＬＴ３変異、ＰＴＰＮ１１変異、ＦＧＦＲ１変異、ＥＰ３００変異、ＭＹＣ変異、ＥＺＨ２変異、ＪＡＫ２変異、ＦＢＸＷ７変異、ＣＣＮＤ３変異、及びＧＮＡ１１変異からなる群から選択される。
【２８４６】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２８４７】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、本明細書に記載のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２８４８】
他の実施形態では、本発明は、それぞれ、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団及び本明細書に記載のＴＩＬ組成物を投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２８４９】
他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、６０ｍｇ／ｍ２／日の用量で２日間のシクロホスファミドの投与に続いて、２５ｍｇ／ｍ２／日の用量で５日間のフルダラビンを投与するステップを含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２８５０】
他の実施形態では、本発明は、対象にＴＩＬ細胞を投与した翌日に開始する、高用量のＩＬ－２レジメンで対象を治療するステップをさらに含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２８５１】
他の実施形態では、本発明は、高用量ＩＬ－２レジメンが、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される６００，０００または７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２８５２】
他の実施形態では、本発明は、がんが固形腫瘍であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２８５３】
他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、転移性黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、転移性ＮＳＣＬＣ、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭癌ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、または腎細胞癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２８５４】
他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、転移性黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌、ＮＳＣＬＣ、転移性ＮＳＣＬＣ、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、及び胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２８５５】
他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２８５６】
他の実施形態では、本発明は、がんが転移性黒色腫であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２８５７】
他の実施形態では、本発明は、がんがＨＮＳＣＣであるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２８５８】
他の実施形態では、本発明は、がんが子宮頸癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２８５９】
他の実施形態では、本発明は、がんがＮＳＣＬＣであるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２８６０】
他の実施形態では、本発明は、がんが転移性ＮＳＣＬＣであるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２８６１】
他の実施形態では、本発明は、がんが神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２８６２】
他の実施形態では、本発明は、がんが胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２８６３】
他の実施形態では、本発明は、がんが高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２８６４】
他の実施形態では、本発明は、がんが小児の高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２８６５】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法で使用するための、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。
【２８６６】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法で使用するための、本明細書に記載のＴＩＬ組成物を提供する。
【２８６７】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、本明細書に記載の治療用ＴＩＬ集団または本明細書に記載のＴＩＬ組成物を対象に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されるように修正された、本明細書に記載の治療用ＴＩＬ集団または本明細書に記載のＴＩＬ組成物を提供する。
【２８６８】
他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間のシクロホスファミドの投与に続いて、２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で

５日間のフルダラビンを投与するステップを含むように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【２８６９】

他の実施形態では、本発明は、ＴＩＬ細胞を患者に投与した翌日から開始する、高用量ＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含むように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【２８７０】

他の実施形態では、本発明は、高用量ＩＬ－２レジメンが、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される６００，０００または７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含むように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【２８７１】

他の実施形態では、本発明は、がんが固形腫瘍であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【２８７２】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、転移性黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、転移性ＮＳＣＬＣ、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭癌ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、または腎細胞癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【２８７３】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、転移性黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌、ＮＳＣＬＣ、転移性ＮＳＣＬＣ、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、及び胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【２８７４】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【２８７５】

他の実施形態では、本発明は、がんが転移性黒色腫であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【２８７６】

他の実施形態では、本発明は、がんがＨＮＳＣＣであるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【２８７７】

他の実施形態では、本発明は、がんが子宮頸癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【２８７８】

他の実施形態では、本発明は、がんがＮＳＣＬＣであるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【２８７９】

他の実施形態では、本発明は、がんが転移性ＮＳＣＬＣであるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【２８８０】

他の実施形態では、本発明は、がんが、神経膠芽細胞腫であるように修正された、本明細書に記載の治療用ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【２８８１】

他の実施形態では、本発明は、がんが胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【２８８２】

他の実施形態では、本発明は、がんが高頻度変異癌であるように修正された、本明細書

に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２８８３】
他の実施形態では、本発明は、がんが小児の高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２８８４】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法における本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団の使用を提供する。
【２８８５】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法における前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物の使用を提供する。
【２８８６】
他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンを対象に投与することと、次いで治療上有効な投与量の、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団または本明細書に記載のＴＩＬ組成物を対象に投与することと、を含む、患者におけるがんを治療する方法における、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団または本明細書に記載のＴＩＬ組成物の使用を提供する。
【２８８７】
１．ＮＳＣＬＣを治療する方法
本明細書に記載の組成物及び方法は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を治療するための方法で使用され得る。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、転移性ＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、転移性ステージＩＶのＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体には、例えば、ニボルマブ（ＢＭＳ－９３６５５８，Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ、Ｏｐｄｉｖｏ（登録商標））、ペムブロリズマブ（ラムブロリズマブ、ＭＫ０３４７５またはＭＫ－３４７５、Ｍｅｒｃｋ、Ｋｅｙｔｒｕｄａ（登録商標））、ヒト化抗ＰＤ－１抗体ＪＳ００１（ＳｈａｎｇＨａｉ　ＪｕｎＳｈｉ）、モノクローナル抗ＰＤ－１抗体ＴＳＲ－０４２（Ｔｅｓａｒｏ，Ｉｎｃ．）、ピジリズマブ（抗ＰＤ－１　ｍＡｂ　ＣＴ－０１１、Ｍｅｄｉｖａｔｉｏｎ）、抗ＰＤ－１モノクローナル抗体ＢＧＢ－Ａ３１７（ＢｅｉＧｅｎｅ）、及び／または抗ＰＤ－１抗体ＳＨＲ－１２１０（ＳｈａｎｇＨａｉ　ＨｅｎｇＲｕｉ）、ヒトモノクローナル抗体ＲＥＧＮ２８１０（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ）、ヒトモノクローナル抗体ＭＤＸ－１１０６（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ）、及び／またはヒト化抗ＰＤ－１　ＩｇＧ４抗体ＰＤＲ００１（Ｎｏｖａｒｔｉｓ）が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１抗体は、クローン：ＲＭＰ１－１４（ラットＡ）－ＢｉｏＸｃｅｌｌカタログ番号ＢＰ０１４６に由来する。本明細書に記載のステップＡ～Ｆに従って産生されたＴＩＬとの同時投与方法における使用に好適な他の好適な抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第８，００８，４４９号に開示される抗ＰＤ－１抗体である。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合部分は、ＰＤ－Ｌ１に特異的に結合し、ＰＤ－１との相互作用を阻害し、それにより、免疫活性を増加させる。ＰＤ－Ｌ１に結合し、ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１との間の相互作用を破壊し、抗腫瘍ｉｍｍｕ２７４０２７４ｎｅ応答を刺激する当該技術分野で知られている任意の抗体が含まれる。例えば、ＰＤ－Ｌ１を標的とし、かつ臨床試験中である抗体には、ＢＭＳ－９３６５５９（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ）及びＭＰＤＬ３２８０Ａ（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）が含まれる。ＰＤ－Ｌ１を標的とする他の好適な抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第７，９４３，７４３号に開示されている。ＰＤ－１またはＰＤ－Ｌ１に結合し、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１相互作用を破壊し、抗腫瘍免疫応答を刺激する任意の抗体が含まれることは、当業者には理解されるであろう。
【２８８８】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＣＴＬＡ－４及び／または抗ＰＤ－１ならびに化学療法剤に対して不応性である。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＣＴＬＡ－４及び／または抗ＰＤ－１ならびに化学療法に対して不応性であり、化学療法剤は、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、シスプラチンである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＳは、イピリムマブま（Ｙｅｒｖｏｙ（登録商標）などの抗ＣＴＬＡ－４抗体に対して不応性である。

【２８８９】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ＰＤ－１（例えば、ペムブロリズマブを含む）と化学療法剤との組み合わせによる治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、化学療法剤（複数可）は、白金ダブレット化学療法剤である。いくつかの実施形態では、白金ダブレット療法は、シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤と、ビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはナブ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療法剤と、を含む。いくつかの実施形態では、白金ダブレット化学療法剤は、ペメトレキセドと組み合わされている。

【２８９０】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１及び化学療法剤を含む併用治療または併用療法に対して不応性である。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ＪＳ００１、ＴＳＲ－０４２、ピジリズマブ、ＢＧＢ－Ａ３１７、ＳＨＲ－１２１０、ＲＥＧＮ２８１０、ＭＤＸ－１１０６、ＰＤＲ００１、クローン由来の抗ＰＤ－１：ＲＭＰ１－１４、米国特許第８，００８，４４９号に開示される抗ＰＤ－１抗体、デュルバルマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、ならびにそれらの断片、誘導体、バリアント、及びバイオシミラーからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１は、ペムブロリズマブである。いくつかの実施形態では、化学療法剤は、白金ダブレット化学療法剤である。いくつかの実施形態では、化学療法剤は、ペメトレキセドと組み合わされている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、及びシスプラチンを含む併用療法に対して不応性である。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、シスプラチン、ニボルマブ、及びイピリムマブを含む併用療法に対して不応性である。

【２８９１】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、前療法を受けていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ＩＣＩ治療に対してナイーブである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＶＥＧＦ（例えば、ａｖａｓｔｉｎ）治療に対してナイーブである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、化学療法治療に対してナイーブである。

【２８９２】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、維持療法を受けていない。

【２８９３】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ＰＤ－１陰性であり、及び／またはＰＤ－１である対象に由来する。

【２８９４】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１及び白金ダブレット療法を含む併用療法に対して不応性であり、白金ダブレット療法は、

ｉ）シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤、

ｉｉ）及びビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはｎａｂ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療法剤を含む。

【２８９５】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１、ペメトレキセド、及び白金ダブレット療法を含む併用療法に対して不応性であり、白金ダブレット療

法は、
ｉ）シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤、
ｉｉ）及びビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはｎａｂ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療法剤を含む。
【２８９６】
いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１抗体で治療されている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で処理されている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ対象は、治療ナイーブである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、以前に化学療法剤で治療されている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、以前に化学療法剤で治療されているが、もはや化学療法剤で治療されていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ対象は、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ対象は、治療ナイーブのＮＳＣＬＣを有するか、または化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ対象は、治療ナイーブのＮＳＣＬＣまたは化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブであり、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ対象は、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。いくつかの実施形態では、対象は、ベースラインで巨大腫瘤病変を有し、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ対象は、検出可能なＰＤ－Ｌ１の発現を有しない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ対象は、治療ナイーブのＮＳＣＬＣまたは化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブであり、検出可能なＰＤ－Ｌ１の発現を有しない。いくつかの実施形態では、対象は、ベースラインで巨大腫瘤病変を有し、検出可能なＰＤ－Ｌ１の発現を有しない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ対象は、治療ナイーブのＮＳＣＬＣまたは化学療法後（例えば、化学療法剤後）であるが、ＰＤ－Ｌ１の発現が低く、及び／またはベースラインで巨大腫瘤病変を有する抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブである。いくつかの実施形態では、最大腫瘍直径が横方向または冠状面のいずれかで測定された７ｃｍより大きい場合、巨大腫瘤病変が示される。いくつかの実施形態では、巨大腫瘤病変は、２０ｍｍ以上の短軸直径を有する腫れたリンパ節がある場合に示される。いくつかの実施形態では、化学療法剤は、ＮＳＣＬＣの標準治療の治療薬を含む。
【２８９７】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１発現は、腫瘍割合スコアによって決定される。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象は、＜１％の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）を有する。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象は、≧１％　ＴＰＳを有する。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣを有する対象は、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、該抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣを有する対象は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、該抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。
【２８９８】
いくつかの実施形態では、例えば図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されるＴＩＬは、例えばプロセス１Ｃ法と称される方法などの、図１及び／または図８に例示されていないものを含む他の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、増加したポリクローン性を示す。いくつかの実施形態では、有意に改善されたポリクローン性及び／または増加したポリクローン性は、がん治療に対する治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、Ｔ細胞レパートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性の増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬの投与に関する治療有効性を示すことができる

。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、１倍、２倍、１０倍、１００倍、５００倍、または１０００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０００倍増加する。

【２８９９】

ａ．例示的なＰＤ－Ｌ１試験方法

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１発現は、本明細書に記載の１つのさらなる試験方法を使用して、腫瘍割合スコアによって決定される。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象または患者は、＜１％の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ腫瘍は、≧１％　ＴＰＳを有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象または患者は、＜１％の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）を有する。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象または患者は、≧１％ＴＰＳを有する。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。

【２９００】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、１％未満（ＴＰＳ＜１％）のＰＤ－Ｌ１タンパク質についての任意の強度での部分的または完全な膜染色を示す、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１療法の前に採取された患者からの腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）または生存腫瘍細胞のパーセンテージを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、＜５０％、＜４５％、＜４０％、＜３５％、＜３０％、＜２５％、＜２０％、＜１５％、＜１０％、＜９％、＜８％、＜７％、＜６％、＜５％、＜４％、＜３％、＜２％、＜１％、＜０．９％、＜０．８％、＜０．７％、＜０．６％、＜０．５％、＜０．４％、＜０．３％、＜０．２％、＜０．１％、＜０．０９％、＜０．０８％、＜０．０７％、＜０．０６％、＜０．０５％、＜０．０４％、＜０．０３％、＜０．０２％、及び＜０．０１％からなる群から選択されるＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳ

ＣＬＣは、約５０％、約４５％、約４０％、約３５％、約３０％、約２５％、約２０％、約１５％、約１０％、約９％、約８％、約７％、約６％、約５％、約４％、約３％、約２％、約１％、約０．９％、約０．８％、約０．７％、約０．６％、約０．５％、約０．４％、約０．３％、約０．２％、約０．１％、約０．０９％、約０．０８％、約０．０７％、約０．０６％、約０．０５％、約０．０４％、約０．０３％、約０．０２％，及び約０．０１％からなる群から選択されるＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～１％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．９％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．８％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．７％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．６％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．５％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．４％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．３％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．２％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．１％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。ＴＰＳは、当該技術分野で知られている方法、例えば、Ｈｉｒｓｃｈ，ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｔｈｏｒａｃ．Ｏｎｃｏｌ．２０１７：１２，２０８－２２２に記載される方法、あるいはペムブロリズマブまたは他の抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１療法による治療前のＴＰＳの決定に使用される方法によって測定され得る。米国食品医薬品局（Ｕ．Ｓ．Ｆｏｏｄ　ａｎｄ　Ｄｒｕｇ　Ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）によって承認されたＴＰＳの測定のための方法を使用することもできる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、エクソソームＰＤ－Ｌ１である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、循環腫瘍細胞上に見出される。

【２９０１】

いくつかの実施形態では、部分的な膜染色は、１％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、またはそれ以上を含む。いくつかの実施形態では、完了した膜染色は、およそ１００％膜染色を含む。

【２９０２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１の試験は、患者の血清中のＰＤ－Ｌ１のレベルを測定することを伴い得る。これらの実施形態では、患者の血清中のＰＤ－Ｌ１の測定は、腫瘍の不均一性の不確実性及び連続生検の患者の不快感を除去する。

【２９０３】

いくつかの実施形態では、ベースラインまたは標準レベルと比較して、可溶性ＰＤ－Ｌ１の上昇は、ＮＳＣＬＣにおける予後の悪化と相関する。例えば、Ｏｋｕｍａ，Ｙ．ｅｔａｌ．，２０１８，Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｌｕｎｇ　Ｃａｎｃｅｒ，１９（５）：４１０－４１７、Ｖｅｃｃｈｉａｒｅｌｌｉ，Ｓ．，ｅｔ　ａｌ．，２０１８，Ｏｎｃｏｔａｒｇｅｔ，９（２５）：１７５５４－１７５６３を参照されたい。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、エクソソームＰＤ－Ｌ１である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、循環腫瘍細胞上に発現される。

【２９０４】

２．ドライバー変異

本明細書で使用される場合、「ドライバー変異」及び／または「アクショナブルな変異」及び／または「発がん性ドライバー変異」という語句は、典型的には、発がん性ドライバー（すなわち、がんドライバーまたはがん誘導物質）とみなされる変異を指す。これらの変異のうちの１つ以上の存在は、伝統的に、標的療法の標的として利用されてきた。多くの場合、ドライバー変異は、例えば、チロシンキナーゼ阻害剤（ＴＫＩ）を含む標的治療部分での治療のために検査及び／または分析される。かかるドライバー変異は、いくつかの実施形態では、第１選択の治療的処置に対する応答に影響を及ぼすか、または作用す

ることができる。本明細書に記載のＴＩＬ療法方法及び組成物は、かかるドライバー変異が患者または対象に存在するか否かにかかわらず、治療に有効である。かかるドライバー変異は、全エクソーム配列決定または特定のドライバー変異の検出を標的とする方法を含む、当該技術分野で知られている任意の方法によって試験及び決定することができる。

【２９０５】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、１つ以上のドライバー変異の存在または非存在を示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、１つ以上のドライバー変異の存在を示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、１つ以上のドライバー変異の非存在を示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、１つ以上のドライバー変異の非存在または存在について分析されている。いくつかの実施形態では、１つ以上のドライバー変異は存在しない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ治療は、１つ以上のドライバー変異の存在または非存在とは無関係である。いくつかの実施形態では、１つ以上のドライバー変異は、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＥＧＦＲエクソン２０、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＢＲＡＦ　Ｖ６００Ｅ変異、ＢＲＡＦ　Ｖ６００Ｋ変異、ＢＲＡＦ　Ｖ６００変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、ＲＥＴ融合、ＥＲＢＢ２変異、ＥＲＢＢ２増幅、ＢＲＣＡ変異、ＭＡＰ２Ｋ１変異、ＰＩＫ３ＣＡ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＰＴＥＮ変異、ＵＭＤ変異、ＮＲＡＳ変異、ＫＲＡＳ変異、ＮＦ１変異、ＭＥＴ変異、ＭＥＴスプライス及び／または変化したＭＥＴシグナル伝達、ＴＰ５３変異、ＣＲＥＢＢＰ変異、ＫＭＴ２Ｃ変異、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１変異、ＡＴＭ変異、ＳＥＴＤ２変異、ＦＬＴ３変異、ＰＴＰＮ１１変異、ＦＧＦＲ１変異、ＥＰ３００変異、ＭＹＣ変異、ＥＺＨ２変異、ＪＡＫ２変異、ＦＢＸＷ７変異、ＣＣＮＤ３変異、及びＧＮＡ１１変異からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、＜１％のＴＰＳを示し、１つ以上のドライバー変異の所定の非存在を有する。

【２９０６】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ＥＧＦＲ阻害剤、ＢＲＡＦ阻害剤、ＡＬＫ阻害剤、ｃ－Ｒｏｓ阻害剤、ＲＥＴ阻害剤、ＥＲＢＢ２阻害剤、ＢＲＣＡ阻害剤、ＭＡＰ２Ｋ１阻害剤、ＰＩＫ３ＣＡ阻害剤、ＣＤＫＮ２Ａ阻害剤、ＰＴＥＮ阻害剤、ＵＭＤ阻害剤、ＮＲＡＳ阻害剤、ＫＲＡＳ阻害剤、ＮＦ１阻害剤、ＭＥＴ阻害剤、ＴＰ５３阻害剤、ＣＲＥＢＢＰ阻害剤、ＫＭＴ２Ｃ阻害剤、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１阻害剤、ＡＴＭ阻害剤、ＳＥＴＤ２阻害剤、ＦＬＴ３阻害剤、ＰＴＰＮ１１阻害剤、ＦＧＦＲ１阻害剤、ＥＰ３００阻害剤、ＭＹＣ阻害剤、ＥＺＨ２阻害剤、ＪＡＫ２阻害剤、ＦＢＸＷ７阻害剤、ＣＣＮＤ３阻害剤、及びＧＮＡ１１阻害剤による治療のために適応されていないＮＳＣＬＣである。

【２９０７】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、＜１％のＴＰＳを有し、ＥＧＦＲ阻害剤、ＢＲＡＦ阻害剤、ＡＬＫ阻害剤、ｃ－Ｒｏｓ阻害剤、ＲＥＴ阻害剤、ＥＲＢＢ２阻害剤、ＢＲＣＡ阻害剤、ＭＡＰ２Ｋ１阻害剤、ＰＩＫ３ＣＡ阻害剤、ＣＤＫＮ２Ａ阻害剤、ＰＴＥＮ阻害剤、ＵＭＤ阻害剤、ＮＲＡＳ阻害剤、ＫＲＡＳ阻害剤、ＮＦ１阻害剤、ＭＥＴ阻害剤、ＴＰ５３阻害剤、ＣＲＥＢＢＰ阻害剤、ＫＭＴ２Ｃ阻害剤、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１阻害剤、ＡＴＭ阻害剤、ＳＥＴＤ２阻害剤、ＦＬＴ３阻害剤、ＰＴＰＮ１１阻害剤、ＦＧＦＲ１阻害剤、ＥＰ３００阻害剤、ＭＹＣ阻害剤、ＥＺＨ２阻害剤、ＪＡＫ２阻害剤、ＦＢＸＷ７阻害剤、ＣＣＮＤ３阻害剤、及びＧＮＡ１１阻害剤による治療のために適応されていないＮＳＣＬＣである。

【２９０８】

いくつかの実施形態では、ＥＧＦＲ変異は、ＮＳＣＬＣから小細胞肺癌（ＳＣＬＣ）への腫瘍形質転換をもたらす。

【２９０９】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ（またはその生検）は、高腫瘍変異負荷（高ＴＭＢ、＞１０ｍｕｔ／ｋｂ）及び／またはマイクロサテライト不安定性高（ＭＳＩ－高）を

示す。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ（またはその生検）は、高腫瘍変異負荷（高ＴＭＢ、＞１０ｍｕｔ／ｋｂ）を示す。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ（またはその生検）は、マイクロサテライト不安定性高（ＭＳＩ－高）を示す。腫瘍変異負荷を評価するための方法及びシステムは、当該技術分野で知られている。かかる方法及びシステムの例示的な開示は、米国特許第９，７９２，４０３号、米国出願公開第２０１８／０３６３０６６Ａ１号、国際出願公開第ＷＯ２０１３／０７０６３４号及びＷＯ２０１８／１０６８８４号、ならびに参照により本明細書に組み込まれる、Ｍｅｔｚｋｅｒ，Ｍ．（２０１０）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ １１：３１－４６（これらのすべては参照によりそれら全体が組み込まれる）に見出され得る。

【２９１０】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ（またはその生検）は、高腫瘍変異負荷（高ＴＭＢ、＞１０ｍｕｔ／ｋｂ）及び／またはマイクロサテライト不安定性高（ＭＳＩ－高）を示す。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ（またはその生検）は、高腫瘍変異負荷（高ＴＭＢ、＞１０ｍｕｔ／ｋｂ）を示す。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ（またはその生検）は、マイクロサテライト不安定性高（ＭＳＩ－高）を示す。腫瘍変異負荷を評価するための方法及びシステムは、当該技術分野で知られている。かかる方法及びシステムの例示的な開示は、米国特許第９，７９２，４０３号、米国出願公開第２０１８／０３６３０６６Ａ１号、国際出願公開第ＷＯ２０１３／０７０６３４号及びＷＯ２０１８／１０６８８４号、ならびに参照により本明細書に組み込まれる、Ｍｅｔｚｋｅｒ，Ｍ．（２０１０）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ １１：３１－４６（これらのすべては参照によりそれら全体が組み込まれる）に見出され得る。

【２９１１】

いくつかの実施形態では、ＥＧＦＲ変異には、例えば、Ｔ７９０Ｍ、Ｅｘ１９Ｄｅｌ、Ｌ８５８Ｒ、エクソン２０挿入、ｄｅｌＥ７０９－Ｔ７１０ｉｎｓＤ、Ｉ７４４＿Ｋ７４５ｉｎｓＫＩＰＶＡＩ、Ｋ７４５＿Ｅ７４６ｉｎｓＴＰＶＡＩＫ、Ｅ７０９Ｘ、Ｅ７０９Ｋ、Ｅ７０９Ａ、エクソン１８欠失、Ｇ７１９Ｘ、Ｇ７１９Ａ、Ｇ７１９Ｓ、Ｌ８６１Ｑ、Ｓ７６８Ｉ、Ｌ７４７Ｐ、Ａ７６３＿７６４ｉｎｓＦＱＥＡ、Ｄ７７０＿Ｎ７７１ｉｎｓＮＰＧ、Ａ７６３＿７６４ｉｎｓＦＱＥＡ、Ｐ７７２＿Ｈ７７３ｉｎｓＤＮＰエクソン２０挿入、Ｈ７７３＿Ｖ７７４ｉｎｓＮＰＨエクソン２０挿入、Ｓ７６８Ｉ、Ｄ７７０＿Ｎ７７１ｉｎｓＳＶＤ、Ｖ７６９＿Ｄ７７０ＩｎｓＡＳＶ、ｐ．Ｋ７４５＿Ｅ７４６ｉｎｓＩＰＶＡＩＫ、ｐ．Ｋ７４５＿Ｅ７４６ｉｎｓＴＰＶＡＩＫ、ｐ．Ｉ７４４＿Ｋ７４５ｉｎｓＫＩＰＶＡＩ、Ｄ７７０＿Ｎ７７１ｉｎｓＮＰＧ、Ｐ７７２＿Ｈ７７３ｉｎｓＰＮＰ、Ａ７６３＿Ｙ７６４ｉｎｓＦＱＥＡ、及び／またはＥＧＦＲキナーゼドメイン重複（ＥＧＦＲ－ＫＤＤ）が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＥＧＦＲ変異には、Ｔ７９０Ｍ、Ｅｘ１９Ｄｅｌ、Ｌ８５８Ｒ、エクソン２０挿入、ｄｅｌＥ７０９－Ｔ７１０ｉｎｓＤ、Ｉ７４４＿Ｋ７４５ｉｎｓＫＩＰＶＡＩ、Ｋ７４５＿Ｅ７４６ｉｎｓＴＰＶＡＩＫ、Ｅ７０９Ｘ、Ｅ７０９Ｋ、Ｅ７０９Ａ、エクソン１８欠失、Ｇ７１９Ｘ、Ｇ７１９Ａ、Ｇ７１９Ｓ、Ｌ８６１Ｑ、Ｓ７６８Ｉ、Ｌ７４７Ｐ、Ａ７６３＿７６４ｉｎｓＦＱＥＡ、Ｄ７７０＿Ｎ７７１ｉｎｓＮＰＧ、Ａ７６３＿７６４ｉｎｓＦＱＥＡ、Ｐ７７２＿Ｈ７７３ｉｎｓＤＮＰエクソン２０挿入、Ｈ７７３＿Ｖ７７４ｉｎｓＮＰＨエクソン２０挿入、Ｓ７６８Ｉ、Ｄ７７０＿Ｎ７７１ｉｎｓＳＶＤ、Ｖ７６９＿Ｄ７７０ＩｎｓＡＳＶ、ｐ．Ｋ７４５＿Ｅ７４６ｉｎｓＩＰＶＡＩＫ、ｐ．Ｋ７４５＿Ｅ７４６ｉｎｓＴＰＶＡＩＫ、ｐ．Ｉ７４４＿Ｋ７４５ｉｎｓＫＩＰＶＡＩ、Ｄ７７０＿Ｎ７７１ｉｎｓＮＰＧ、Ｐ７７２＿Ｈ７７３ｉｎｓＰＮＰ、Ａ７６３＿Ｙ７６４ｉｎｓＦＱＥＡ、及びＥＧＦＲキナーゼドメイン重複（ＥＧＦＲ－ＫＤＤ）からなる群から選択される。

【２９１２】

いくつかの実施形態では、ＥＧＦＲ変異は、例えば、Ｌ８５８Ｒ／Ｔ７９０Ｍ、Ｅｘ１９Ｄｅｌ／Ｔ７９０Ｍ、Ｇ７１９Ｘ／Ｌ８６１Ｑ、Ｇ７１９Ｘ／Ｓ７６８Ｉ（またはＳ７６８Ｉ／Ｇ７１９Ｘ）、Ｓ７６８Ｉ／Ｌ８５８Ｒ、Ｌ８５８Ｒ／Ｅ７０９Ａ、及び／またはＥ７４６＿Ｔ７５１ｄｅｌｉｎｓＡ＋Ｔ７９０Ｍを含むが、これらに限定されない二重

変異である。いくつかの実施形態では、ＥＧＦＲ変異は、Ｌ８５８Ｒ／Ｔ７９０Ｍ、Ｅｘ１９Ｄｅｌ／Ｔ７９０Ｍ、Ｇ７１９Ｘ／Ｌ８６１Ｑ、Ｇ７１９Ｘ／Ｓ７６８Ｉ（またはＳ７６８Ｉ／Ｇ７１９Ｘ）、Ｓ７６８Ｉ／Ｌ８５８Ｒ、Ｌ８５８Ｒ／Ｅ７０９Ａ、及びＥ７４６＿Ｔ７５１ｄｅｌｉｎｓＡ＋Ｔ７９０Ｍからなる群から選択される二重変異である。

【２９１３】

ＥＧＦＲ変異のさらなる開示は、国際出願公開第ＷＯ２０１０／０２０６１８号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に提供される。

【２９１４】

いくつかの実施形態では、ＡＬＫ変異には、ＥＭＬ４－ＡＬＫバリアント１（ＡＢ２７４７２２．１；ＢＡＦ７３６１１．１）、ＥＭＬ４－ＡＬＫバリアント２（ＡＢ２７５８８９．１；ＢＡＦ７３６１２．１）、ＥＭＬ４－ＡＬＫバリアント３ａ（ＡＢ３７４３６１．１；ＢＡＧ５５００３．１）、ＥＭＬ４－ＡＬＫバリアント３ｂ（ＡＢ３７４３６２．１；ＢＡＧ５５００４．１）、ＥＭＬ４－ＡＬＫバリアント４（ＡＢ３７４３６３．１；ＢＡＧ７５１４７．１）、ＥＭＬ４－ＡＬＫバリアント５ａ（ＡＢ３７４３６４．１；ＢＡＧ７５１４８．１）、ＥＭＬ４－ＡＬＫバリアント５ｂ（ＡＢ３７４３６５．１；ＢＡＧ７５１４９．１）、ＥＭＬ４－ＡＬＫバリアント６（ＡＢ４６２４１１．１；ＢＡＨ５７３３５．１）、ＥＭＬ４－ＡＬＫバリアント７（ＡＢ４６２４１２．１；ＢＡＨ５７３３６．１）、ＫＩＦ５Ｂ－ＡＬＫ（ＡＢ４６２４１３．１；ＢＡＨ５７３３７．１）、ＮＰＭ－ＡＬＫ、ＴＰＭ３－ＡＬＫ、ＴＦＧＸＬ－ＡＬＫ、ＴＥＧＬ－ＡＬＫ、ＴＦＧＳ－ＡＬＫ、Ａ１１Ｃ－ＡＬＫ、ＣＬＴＣ－ＡＬＫ、ＭＳＮ－ＡＬＫ、ＴＰＭ４－ＡＬＫ、ＭＹＨ９－ＡＬＫ、ＲＡＮＢＰ２－ＡＬＫ、ＡＬ０１７－ＡＬＫ、及びＣＡＲＳ－ＡＬＫが含まれるが、これらに限定されない（例えば、Ｐｕｌｆｏｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，（２００４）Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．１９９：３３０－３５８を参照）。さらに、熟練者は、ＡＬＫキナーゼとその融合パートナーとの間の特定の融合事象に応じて、ＡＬＫキナーゼバリアントが生じ得ることを理解するであろう（例えば、ＥＭＬ４は、例えば、Ｈｏｒｎ　ａｎｄ　Ｐａｏ，（２００９）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２７：４２４７－４２５３に記載されるように、少なくともエクソン２、６ａ、６ｂ、１３、１４、及び／または１５を融合することができる）（参照によりその全体が組み込まれる）。

【２９１５】

ＡＬＫ変異のさらなる例は、米国特許第９，０１８，２３０号及び第９，４５８，５０８号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【２９１６】

いくつかの実施形態では、本発明のＲＯＳ１変異は、ＲＯＳ１融合であり、ＲＯＳ１タンパク質のキナーゼドメインを含むＲＯＳ１ポリペプチドの一部（またはそれをコードするポリヌクレオチド）が別のポリペプチド（またはそれをコードするポリヌクレオチド）の全部または一部に融合し、その第２のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの名前が融合において命名される。いくつかの実施形態では、ＲＯＳ１変異は、ＲＯＳ１融合タンパク質（例えば、ＩＨＣによって）及び／またはＲＯＳ融合遺伝子（例えば、ＦＩＳＨによって）、及び／またはＲＯＳ１　ｍＲＮＡ（例えば、ｑＲＴ－ＰＣＲによって）として決定され、好ましくはＳＬＣ３４Ａ２－ＲＯＳ１（ＲＯＳ１エクソン３２及び３４に融合されたＳＬＣ３４Ａ２エクソン１３ｄｅｌ２０４６及び４）、ＣＤ７４－ＲＯＳ１（ＲＯＳ１エクソン３２及び３４に融合されたＣＤ７４エクソン６）、ＥＺＲ－ＲＯＳ１（ＲＯＳ１エクソン３４に融合されたＥＺＲエクソン１０）、ＴＰＭ３－ＲＯＳ１（ＲＯＳ１エクソン３５に融合されたＴＰＭ３エクソン８）、ＬＲＩＧ３－ＲＯＳ１（ＲＯＳ１エクソン３５に融合されたＬＲＩＧ３エクソン１６）、ＳＤＣ４－ＲＯＳ１（ＲＯＳ１エクソン３２に融合されたＳＤＣ４エクソン２及び４ならびにＲＯＳ１エクソン３４に融合されたＳＤＣ４エクソン４）、ＦＩＧ－ＲＯＳ１としても知られるＧＯＰＣ－ＲＯＳ１（ＲＯＳ１エクソン３５に融合されたＧＯＰＣエクソン８及びＲＯＳ１エクソン３６に融合されたＧＯＰＣエクソン４）、ならびにＧ２０３２Ｒ、すなわちＲＯＳ１　^{Ｇ２０３２Ｒ}からなる群から選択されるＲＯＳ１融合タンパク質を示す。

【２９１７】
ＲＯＳ１変異及びＲＯＳ融合の追加の開示は、米国特許公開第２０１０／０２２１７３７号、同第２０１５／００５６１９３号、及び同第２０１０／０１４３９１８号、ならびにＰＣＴ公開第ＷＯ２０１０／０９３９２８号に提供されており、これらのすべては、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＲＥＴ変異は、ＲＥＴ融合または点変異である。
【２９１８】
いくつかの実施形態では、ＲＥＴ点変異には、Ｈ６６５０、Ｋ６６６Ｅ、Ｋ６６６Ｍ、Ｓ６８６Ｎ、Ｇ６９１Ｓ、Ｒ６９４Ｑ、Ｍ７００Ｌ、Ｖ７０６Ｍ、Ｖ７０６Ａ、Ｅ７１３Ｋ、Ｇ７３６Ｒ、Ｇ７４８Ｃ、Ａ７５０Ｐ、Ｓ７６５Ｐ、Ｐ７６６Ｓ、Ｅ７６８Ｑ、Ｅ７６８Ｄ、Ｌ７６９Ｌ、Ｒ７７０Ｑ、Ｄ７７１Ｎ、Ｎ７７７Ｓ、Ｖ７７８１、Ｑ７８１Ｒ、Ｌ７９０Ｆ、Ｙ７９１Ｆ、Ｙ７９１Ｎ、Ｖ８０４Ｌ、Ｖ８０４Ｍ、Ｖ８０４Ｅ、Ｅ８０５Ｋ、Ｅ８０６Ｃ、Ｙ８０６Ｅ、Ｙ８０６Ｆ、Ｙ８０６Ｓ、Ｙ８０６Ｇ　Ｙ８０６Ｃ　Ｅ８１８Ｋ　Ｓ８１９Ｉ　Ｇ８２３Ｅ　Ｙ８２６Ｍ　Ｒ８３３Ｃ　Ｐ８４１Ｌ　Ｐ８４１Ｐ　Ｅ８４３Ｄ　Ｒ８４４Ｗ、Ｒ８４４Ｑ、Ｒ８４４Ｌ、Ｍ８４８Ｔ、１８５２Ｍ　Ａ８６６Ｗ　Ｒ８７３Ｗ　Ａ８７６Ｖ　Ｌ８８１Ｖ　Ａ８８３Ｆ　Ａ８８３Ｓ　Ａ８８３Ｔ　Ｅ８８４Ｋ　Ｒ８８６Ｗ、Ｓ８９１Ａ、Ｒ８９７０、Ｄ８９８Ｖ、Ｅ９０１Ｋ　５９０４Ｆ　Ｓ９０４Ｃ２　Ｋ９０７Ｅ　Ｋ９０７Ｍ　Ｒ９０８Ｋ　Ｇ９１１Ｄ　Ｒ９１２Ｐ　Ｒ９１２Ｑ　Ｍ９１８Ｔ、Ｍ９１８Ｖ、Ｍ９１８Ｌ６、Ａ９１９Ｖ、Ｅ９２１Ｋ、Ｓ９２２Ｐ　Ｓ９２２Ｙ　Ｔ９３０Ｍ　Ｆ９６１Ｌ　Ｒ９７２Ｇ　Ｒ９８２Ｃ　Ｍ１００９Ｖ　Ｄ１０１７Ｎ　Ｖ１０４１６、及びＭ１０６４Ｔが含まれるが、これらに限定されない。
【２９１９】
いくつかの実施形態では、ＲＥＴ融合は、ＲＥＴと、ＢＣＲ、ＢＣＲ、ＣＬＩＰ１、ＫＩＦＳＢ、ＣＣＤＣ６、ＰＴＣｌｅｘ９、ＮＣＯＡ４、ＴＲＩＭ３３、ＥＲＣ１、ＦＧＦＲＩＯＰ、ＭＢＤ１、ＲＡＢ６１Ｐ２、ＰＲＫＡＲＩＡ、ＴＲＩＭ２４、ＫＴＮ１、ＧＯＬＧＡ５、ＨＯＯＫ３、ＫＩＡＡ１４６８、ＴＲＩＭ２７、ＡＫＡＰ１３、ＦＫＢＰ１５、ＳＰＥＣＣＩＬ、ＴＢＬ１ＸＲ１、ＣＥＰ５５、ＣＵＸ１、ＡＣＢＤ５、ＭＹＨ１３、ＰＩＢＦ１、ＫＩＡＡ１２１７、及びＭＰＲＩＰからなる群から選択される融合パートナーとの間の融合である。
【２９２０】
ＲＥＴ変異の追加の開示は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる米国特許第１００３５７８９号に提供されている。
【２９２１】
いくつかの実施形態では、ＢＲＡＦ変異は、ＢＲＡＦ　Ｖ６００Ｅ／Ｋ変異である。他の実施形態では、ＢＲＡＦ変異は、非Ｖ６００Ｅ／Ｋ変異である。
【２９２２】
いくつかの実施形態では、非Ｖ６００Ｅ／Ｋ　ＢＲＡＦ変異は、キナーゼ活性化変異、キナーゼ障害変異、またはキナーゼ意義不明変異、及びそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、キナーゼ活性化変異は、Ｒ４６２１、１４６３Ｓ、Ｇ４６４Ｅ、Ｇ４６４Ｒ、Ｇ４６４Ｖ、Ｇ４６６Ａ、Ｇ４６９Ａ、Ｎ５８　ｉｓ、Ｅ５８６Ｋ、Ｆ５９５Ｌ、Ｌ５９７Ｑ、Ｌ５９７Ｒ、Ｌ５９７５、Ｌ５９７Ｖ、Ａ５９８Ｖ、Ｔ５９９Ｅ、Ｖ６００Ｒ、Ｋ６０１Ｅ、５６０２Ｄ、Ａ７２８Ｖ、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、キナーゼ障害変異は、Ｇ４６６Ｅ、Ｇ４６６Ｒ、Ｇ４６６Ｖ、Ｙ４７２Ｃ、Ｋ４８３Ｍ、Ｄ５９４Ａ、Ｄ５９４Ｅ、Ｄ５９４Ｇ、Ｄ５９４Ｈ、Ｄ５９４Ｎ、Ｄ５９４Ｖ、Ｇ５９６Ｒ、Ｔ５９９Ａ、５６０２Ａ、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、キナーゼ意義不明変異は、Ｔ４４０１、５４６７Ｌ、Ｇ４６９Ｅ、Ｇ４６９Ｒ、Ｇ４６９５、Ｇ４６９Ｖ、Ｌ５８４Ｆ、Ｌ５８８Ｆ、Ｖ６００　Ｋ６ＯｌｄｅｌｉｎｓＥ、５６０５１、Ｑ６０９Ｌ、Ｅ６１１Ｑ、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、非Ｖ６００Ｅ／Ｋ　ＢＲＡＦ変異は、Ｄ５９４、Ｇ４６９、Ｋ６０１Ｅ、Ｌ５９７、Ｔ５９

９重複、Ｌ４８５Ｗ、Ｆ２４７Ｌ、Ｇ４６６Ｖ、ＢＲＡＦ融合、ＢＲＡＦ－ＡＧＡＰ３再配列、ＢＲＡＦエクソン１５スライスバリアント、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【２９２３】

いくつかの実施形態では、Ｍｅｔ変異は、点変異、欠失変異、挿入変異、逆行、異常スプライシング、ミスセンス変異、またはｃ－Ｍｅｔタンパク質の少なくとも１つの生物活性の増加を引き起こす遺伝子拡大、チロシンキナーゼ活性、例えば、改善された受容体ホモログ二量体化、形成のリガンド結合、体及びヘテロ二量体の増強等を含む。Ｍｅｔ変異は、ｃ－Ｍｅｔ遺伝子の任意の部分に位置し得る。一実施形態では、変異は、ｃ－ＭＥＴ遺伝子によってコードされるｃ－Ｍｅｔタンパク質のキナーゼドメインにある。いくつかの実施形態では、ｃ－Ｍｅｔ変異は、Ｎ３７５、Ｖ１３、Ｖ９２３、Ｒ１７５、Ｖ１３６、Ｌ２２９、Ｓ３２３、Ｒ９８８、Ｓ１０５８／Ｔ１０１０及びＥ１６８における点変異である。

【２９２４】

いくつかの実施形態では、ＥＲＢＢ２変異は、ＥＲＢＢ２のアミノ酸配列における点変異である。いくつかの実施形態では、ＥＲＢＢ２の点変異は、アミノ酸置換を引き起こす点変異、ｍＲＮＡスプライシングを引き起こす点変異、または上流領域における点変異である。ここで、変異は、Ｑ５６８Ｅ、Ｐ６０１Ｒ、Ｉ６２８Ｍ、Ｐ８８５Ｓ、Ｒ１４３Ｑ、Ｒ４３４Ｑ、及びＥ８７４Ｋからなる群から選択される少なくとも１つのアミノ酸置換を引き起こすヌクレオチド変異を含む。

【２９２５】

いくつかの実施形態では、ＥＲＢＢ２変異は、ＥＲＢＢ２増幅である。いくつかの実施形態では、ＥＲＢＢ２増幅は、Ｖ６５９Ｅ、Ｇ３０９Ａ、Ｇ３０９Ｅ、Ｓ３１０Ｆ、Ｄ７６９Ｈ、Ｄ７６９Ｙ、Ｖ７７７Ｌ、Ｐ７８０ｉｎｓ、Ｐ７８０－Ｙ７８１ｉｎｓＧＳＰ、Ｖ８４２Ｉ、Ｒ８９６Ｃ、Ｋ７５３Ｅ、及びＬ７５５Ｓからなる群から選択される点変異を含み、ポリメラーゼ連鎖反応または任意の配列決定技法によって検出され得る（Ｂｏｓｅ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｄｉｓｃｏｖ．２０１３，３（２），２２４－２３７、Ｚｕｏ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２０１６，２２（１９），４８５９－４８６９）。

【２９２６】

いくつかの実施形態では、ＢＲＣＡ変異は、ＢＲＣＡ１及び／またはＢＲＣＡ２、好ましくはＢＲＣＡ１、及び／またはタンパク質生成物がＤＮＡ損傷部位においてＢＲＣＡ１及び／またはＢＲＣＡ２と会合する１つ以上の他の遺伝子（ＡＴＭ、ＡＴＲ、Ｃｈｋ２、Ｈ２ＡＸ、５３ＢＰ１、ＮＦＢＤ１、Ｍｒｅ１１、Ｒａｄ５０、ニブリン、ＢＲＣＡ１関連環ドメイン（ＢＡＲＤ１）、Ａｂｒａｘａｓ、及びＭＳＨ２を含む）における変異である。これらの遺伝子のうちの１つ以上の変異は、ＢＲＣＡ１及び／またはＢＲＣＡ２の変異を模倣する遺伝子発現パターンをもたらし得る。

【２９２７】

ある特定の実施形態では、ＢＲＣＡ変異は、非同義変異を含む。いくつかの実施形態では、ＢＲＣＡ変異は、ナンセンス変異を含む。いくつかの実施形態では、ＢＲＣＡ変異は、フレームシフト変異を含む。いくつかの実施形態では、ＢＲＣＡ変異は、スプライシング変異を含む。いくつかの実施形態では、ＢＲＣＡ変異は、変異体ｍＲＮＡとして、また最終的には変異体タンパク質として発現される。いくつかの実施形態では、ＢＲＣＡ１／２タンパク質は、機能的である。他の実施形態では、ＢＲＣＡ１／２タンパク質は、低下した活性を有する。他の実施形態では、ＢＲＣＡ１／２タンパク質は、非機能的である。

【２９２８】

置換に関して本明細書で使用される場合、変異に関しての「＝」記号は、一般に、同義置換、サイレントコドン、及び／またはサイレント置換を指す。特に、同義置換（サイレント置換またはサイレントコドンとも呼ばれる）は、タンパク質をコードする遺伝子のエクソンにおける、あるヌクレオチド塩基の別のヌクレオチド塩基の置換を指し、生成され

たアミノ酸配列は修飾されない。これは、遺伝子コードが「縮退」であるという事実、すなわち、いくつかのアミノ酸が２つ以上の３塩基対コドンによってコードされるという事実に起因する。所与のアミノ酸のコドンのうちのいくつかは、同じアミノ酸をコードする他のものとはわずか１塩基対だけ異なるため、野生型塩基を代替物のうちの１つに置き換える点変異は、遺伝子の翻訳中に同じアミノ酸を細長いポリペプチド鎖に組み込むことをもたらす。いくつかの実施形態では、非コードＤＮＡに影響を及ぼす同義の置換及び変異は、しばしばサイレント変異とみなされるが、変異がサイレントであり、いかなる影響もないとは限らない。例えば、同義変異は、転写、スプライシング、ｍＲＮＡ輸送、及び翻訳に影響を及ぼし得、それらのいずれも結果として生じる表現型を変化させることができ、同義変異を非サイレントにする。希少なコドンに対するｔＲＮＡの基質特異性は、翻訳のタイミングに影響を及ぼし、順番にタンパク質の共翻訳折り畳みに影響を及ぼす可能性がある。これは、多くの種で観察されているコドン使用バイアスに現れている。非同義の置換／変異は、保存的（類似の生理化学的特性を有するアミノ酸への変化）、半保存的（例えば、正に荷電したアミノ酸に対して陰性）、またはラジカル（大幅に異なるアミノ酸）として任意に分類され得るアミノ酸の変化をもたらす。いくつかの実施形態では、ＢＲＣＡ変異は、Ｐ８７１Ｌ、Ｋ１１８３Ｒ、Ｄ６９３Ｎ、Ｓ１６３４Ｇ、Ｅ１０３８Ｇ、Ｓ１０４０Ｎ、Ｓ６９４＝（＝：サイレンスコドン）、Ｍ１６７３Ｉ、Ｑ３５６Ｒ、Ｓ１４３６＝、Ｌ７７１＝、Ｋ６５４Ｓｆｓ＊４７、Ｓ１９８Ｎ、Ｒ４９６Ｈ、Ｒ８４１Ｗ、Ｒ１３４７Ｇ、Ｈ６１９Ｎ、Ｓ１５３３Ｉ、Ｌ３０＝、Ａ６２２Ｖ、Ｙ６５５Ｖｆｓ＊１８、Ｒ４９６Ｃ、Ｅ５９７Ｋ、Ｒ１４４３＊、Ｅ２３Ｖｆｓ＊１７、Ｌ３０Ｆ、Ｅ１１１Ｇｆｓ＊３、Ｋ３３９Ｒｆｓ＊２、Ｌ５１２Ｆ、Ｄ６９３Ｎ、Ｐ８７１Ｓ、Ｓ１１４０Ｇ、Ｑ１２４０＊、Ｐ１７７０Ｓ、Ｒ７＝、Ｌ５２Ｆ、Ｔ１７６Ｍ、Ａ２２４Ｓ、Ｌ３４７＝、Ｓ５６１Ｆ、Ｅ５９７＊、Ｋ８２０Ｅ、Ｋ８９３Ｒｆｓ＊１０７、Ｅ９６２Ｋ、Ｍ１０１４Ｉ、Ｒ１０２８Ｈ、Ｅ１２５８Ｄ、Ｅ１３４６Ｋ、Ｒ１３４７Ｔ、Ｌ１４３９Ｆ、Ｈ１４７２Ｒ、Ｑ１４８８＊、Ｓ１５７２Ｃ、Ｅ１６０２Ｋ、Ｒ１６１０Ｃ、Ｌ１６２１＝、Ｑ１６２５＊、Ｑ１６２５＝、Ｄ１７５４Ｎ、Ｒ１７７２Ｑ、Ｒ１８５６＊、及びそれらの任意の組み合わせを含むが、これらに限定されないＢＲＣＡ１変異である。

【２９２９】

いくつかの実施形態では、ＢＲＣＡ変異は、Ｖ２４６６Ａ、Ｎ２８９Ｈ、Ｎ９９１Ｄ、Ｓ４５５＝（＝；サイレンスコドン）、Ｎ３７２Ｈ、Ｈ７４３＝、Ｖ１２６９＝、Ｓ２４１４＝、Ｖ２１７１＝、Ｌ１５２１＝、Ｔ３０３３Ｎｆｓ＊１１、Ｋ１１３２＝、Ｔ３０３３Ｌｆｓ＊２９、Ｒ２８４２Ｃ、Ｎ１７８４Ｔｆｓ＊７、Ｋ３３２６＊、Ｋ３３２６＊、Ｄ１４２０Ｙ、Ｉ６０５Ｙｆｓ＊９、Ｉ３４１２Ｖ、Ａ２９５１Ｔ、Ｔ３０８５Ｎｆｓ＊２６、Ｒ２６４５Ｎｆｓ＊３、Ｓ１０１３＊、Ｔ１９１５Ｍ、Ｆ３０９０＝、Ｖ３２４４Ｉ、Ａ１３９３Ｖ、Ｒ２０３４Ｃ、Ｌ１３５６＝、Ｅ２９８１Ｒｆｓ＊３７、Ｎ１７８４Ｋｆｓ＊３、Ｋ３４１６Ｎｆｓ＊１１、Ｋ１６９１Ｎｆｓ＊１５、Ｓ１９８２Ｒｆｓ＊２２、及びそれらの任意の組み合わせを含むが、これらに限定されないＢＲＣＡ２変異である。

【２９３０】

いくつかの実施形態では、本発明のＮＲＡＳ変異には、Ｅ６３Ｋ、Ｑ６１Ｒ、Ｑ６１Ｋ、Ｇ１２Ｄ、Ｇ１３Ｄ、Ｑ６１Ｒ、Ｑ６１Ｌ、Ｑ６１Ｋ、Ｇ１２Ｓ、Ｇ１２Ｃ、Ｇ１３Ｒ、Ｑ６１Ｈ、Ｇ１２Ｖ、Ｇ１２Ａ、Ｑ６１Ｌ、Ｇ１３Ｖ、Ｑ６１Ｈ、Ｑ６１Ｈ、Ｇ１２Ｒ、Ｇ１３Ｃ、Ｑ６１Ｐ、Ｇ１３Ｓ、Ｇ１２Ｄ、Ｇ１３Ａ、Ｇ１３Ｄ、Ａ１８Ｔ、Ｑ６１Ｘ、Ｇ６０Ｅ、Ｇ１２Ｓ、Ｑ６１＝（＝：サイレンスコドン）、Ｑ６１Ｅ、Ｑ６１Ｒ、Ａ１４６Ｔ、Ａ５９Ｔ、Ａ５９Ｄ、Ｑ６１＝、Ｒ６８Ｔ、Ａ１４６Ｔ、Ｇ１２Ａ、Ｅ６２Ｑ、Ｇ７５＝、Ａ９１Ｖ、及びそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【２９３１】

Ｅ１３２Ｋいくつかの実施形態では、ＰＩＫ３ＣＡ変異は、置換変異、欠失変異、及び挿入変異を含む。いくつかの実施形態では、変異は、ＰＩＫ３ＣＡのヘリカルドメイン及

びそのキナーゼにおいて起こる。他の実施形態では、ＰＩＫ３ＣＡのＰ８５ＢＤドメインにおいて。いくつかの実施形態では、ＰＩＫ３ＣＡ変異は、エクソン１、２、４、５、７、９、１３、１８、及び２０にある。いくつかの実施形態では、ＰＩＫ３ＣＡ変異は、エクソン９及び２０にある。さらに他の実施形態では、ＰＩＫ３ＣＡ変異は、上記の任意の変異の組み合わせである。これらのエクソンの任意の組み合わせを、任意選択で、他のエクソンの試験と併せて試験することができる。変異の試験は、コード配列全体に沿って行うことができ、または変異がクラスター化することが見出された領域に焦点を当てることができる。変異の特定のホットスポットは、ＰＩＫ３ＣＡコード配列の１６２４、１６３３、１６３６、及び３１４０位のヌクレオチドで生じる。

【２９３２】

いくつかの実施形態では、ＰＩＫ３ＣＡ変異のサイズは、１～３ヌクレオチドの範囲で小さい。いくつかの実施形態では、ＰＩＫ３ＣＡ変異には、Ｇ１６２４Ａ、Ｇ１６３３Ａ、Ｃ１６３６Ａ、Ａ３１４０Ｇ、Ｇ１１３Ａ、Ｔ１２５８Ｃ、Ｇ３１２９Ｔ、Ｃ３１３９Ｔ、Ｅ５４２Ｋ、Ｅ５４５Ｋ、Ｑ５４６Ｒ、Ｈ１０４７Ｌ、Ｈ１０４７Ｒ、及びＧ２７０２Ｔが含まれるが、これらに限定されない。

【２９３３】

いくつかの実施形態では、ＭＡＰ２Ｋ１変異は、体細胞ＭＡＰ２Ｋ１変異、任意選択で、ＭＥＫ１レベルを上方制御するＭＡＰ２Ｋ１変異である。いくつかの実施形態では、ＭＡＰ２Ｋ１変異は、ＲＡＳ／ＭＡＰＫ経路に関連する１つ以上の遺伝子における変異であり、ＨＲＡＳ、ＫＲＡＳ、ＮＲＡＳ、ＡＲＡＦ、ＢＲＡＦ、ＲＡＦｌ、ＭＡＰ２Ｋ２、ＭＡＰＫｌ、ＭＡＰＫ３、ＭＡＰ３Ｋ３を含む。ある特定の実施形態では、ＭＡＰ２Ｋ１変異は、ＲＡＳＡ、ＰＴＥＮ、ＥＮＧ、ＡＣＶＲＬ１、ＳＭＡＤ４、ＧＤＦ２、またはそれらの組み合わせからなる群から選択される１つ以上の遺伝子にある。

【２９３４】

いくつかの実施形態では、ＭＡＰ２Ｋ１変異には、Ｐ１２４Ｓ、Ｑ５６Ｐ、Ｋ５７Ｎ、Ｅ２０３Ｋ、Ｇ２３７＊、Ｐ１２４Ｌ、Ｇ１２８Ｄ、Ｄ６７Ｎ、Ｋ５７Ｅ、Ｅ１０２＿Ｉ１０３ｄｅｌ、Ｃ１２１Ｓ、Ｋ５７Ｔ、Ｋ５７Ｎ、Ｑ５６Ｐ、Ｐ１２４Ｌ、Ｋ５７Ｎ、Ｇ１２８Ｖ、Ｑ５８＿Ｅ６２ｄｅｌ、Ｆ５３Ｌ、Ｉ１２６＝、Ｉ１０３＿Ｋ１０４ｄｅｌ、及びそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【２９３５】

ある特定の実施形態では、ＫＲＡＳ変異は、非同義変異を含む。いくつかの実施形態では、ＫＲＡＳ変異は、ナンセンス変異を含む。いくつかの実施形態では、ＫＲＡＳ変異は、フレームシフト変異を含む。いくつかの実施形態では、ＫＲＡＳ変異は、スプライシング変異を含む。いくつかの実施形態では、ＫＲＡＳ変異は、変異体ｍＲＮＡとして、また最終的には変異体タンパク質として発現される。いくつかの実施形態では、変異型ＫＲＡＳタンパク質は、機能的である。他の実施形態では、変異型ＫＲＡＳタンパク質は、低下した活性を有する。他の実施形態では、変異型ＫＲＡＳタンパク質は、非機能的である。

【２９３６】

いくつかの実施形態では、ＫＲＡＳ変異には、Ｇ１２Ｄ、Ｇ１２Ｖ、Ｇ１３Ｄ、Ｇ１２Ｃ、Ｇ１２Ａ、Ｇ１２Ｓ、Ｇ１２Ｒ、Ｇ１３Ｃ、Ｑ６１Ｈ、Ａ１４６Ｔ、Ｑ６１Ｒ、Ｑ６１Ｈ、Ｑ６１Ｌ、Ｇ１３Ｓ、Ａ１４６Ｖ、Ｑ６１Ｋ、Ｇ１３Ｒ、Ｇ１２Ｆ、Ｋ１１７Ｎ、Ｇ１３Ａ、Ｇ１３Ｖ、Ａ５９Ｔ、Ｖ１４Ｉ、Ｋ１１７Ｎ、Ｑ２２Ｋ、Ｑ６１Ｐ、Ａ１４６Ｐ、Ｇ１３Ｄ、Ｌ１９Ｆ、Ｌ１９Ｆ、Ｑ６１Ｋ、Ｇ１２Ｖ、Ｇ６０＝、Ｇ１２＝、Ｇ１３＝、Ａ１８Ｄ、Ｔ５８Ｉ、Ｑ６１Ｅ、Ｅ６３Ｋ、Ｇ１２Ｌ、Ｇ１３Ｖ、Ａ５９Ｇ、Ｇ６０Ｄ、Ｇ１０Ｒ、Ｇ１０ｄｕｐ、Ｄ５７Ｎ、Ａ５９Ｅ、、Ｖ１４Ｇ、Ｄ３３Ｅ、Ｇ１２Ｉ、Ｇ１３ｄｕｐ、及びそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない（＝は、サイレンスコーディングを示す）。

【２９３７】

いくつかの実施形態では、ＮＦ１変異は、置換変異、欠失変異、ミスセンス変異、異常なスプライシング変異、及び挿入変異を含む。いくつかの実施形態では、ＮＦ１変異は、

機能喪失（ＬＯＦ）変異である。いくつかの実施形態では、ＮＦ１変異は、Ｒ１９４７Ｘ（Ｃ５８３９Ｔ）、Ｒ３０４Ｘ、エクソン３７変異、エクソン４ｂ変異、エクソン７変異、エクソン１０ｂ変異、及びエクソン１０ｃ変異（例えば、１５７０Ｇ→Ｔ，Ｅ５２４Ｘ）からなる群から選択される。

【２９３８】

いくつかの実施形態では、ＣＤＫＮ２Ａ変異には、Ｒ２４Ｐ、Ｄ１０８Ｇ、Ｄ１０８Ｎ、Ｄ１０８Ｙ、Ｇ１２５Ｒ、Ｐ１１４Ｌ、Ｒ８０＊、Ｒ５８＊、Ｈ８３Ｙ、Ｗ１１０＊、Ｐ１１４Ｌ、Ｅ８８＊、Ｗ１１０＊、Ｅ１２０＊、Ｄ１０８Ｙ、Ｄ８４Ｙ、Ｄ８４Ｎ、Ｅ６９＊、Ｐ８１Ｌ、Ｑ５０＊、Ｌ７８Ｈｆｓ＊４１、Ｄ１０８Ｎ、Ｓ１２＊、Ｐ４８Ｌ、Ｅ６１＊、Ｙ４４＊、Ｅ８８Ｋ、Ｒ８０＊、Ｄ８４Ｇ、Ｌ１６Ｐｆｓ＊９、Ｙ１２９＊、Ｄ１０８Ｈ，Ａ１４８Ｔ、Ａ３６Ｇ、Ａ１０２Ｖ、Ｗ１５＊、Ｈ８３Ｒ、Ａ５７Ｖ、Ｅ３３＊、Ｄ７４Ｙ、Ａ７６Ｖ、Ｅ１５３Ｋ、Ｄ７４Ｎ、Ｈ８３Ｄ、Ｖ８２Ｍ、Ｒ５８＊、Ｙ１２９＊、Ｅ１１９＊、Ｙ４４＊、Ｄ７４Ａ、Ｔ１８＿Ａ１９ｄｕｐ、Ｙ４４Ｌｆｓ＊７６、Ｌ３２＿Ｌ３７ｄｅｌ、Ｖ２８＿Ｅ３３ｄｅｌ、Ｄ１４＿Ｌ１６ｄｅｌ、Ａ６８Ｔ、またはそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【２９３９】

ある特定の実施形態では、ＰＴＥＮ変異は、非同義変異を含む。いくつかの実施形態では、ＰＴＥＮ変異は、ナンセンス変異を含む。いくつかの実施形態では、ＰＴＥＮ変異は、フレームシフト変異を含む。いくつかの実施形態では、ＰＴＥＮ変異は、スプライシング変異を含む。いくつかの実施形態では、変異型ＰＴＥＮは、ｍＲＮＡ及び最終的にはタンパク質として発現される。いくつかの実施形態では、変異型ＰＴＥＮタンパク質は、機能的である。他の実施形態では、変異型ＰＴＥＮタンパク質は、低下した活性を有する。他の実施形態では、変異型ＰＴＥＮタンパク質は、非機能的である。いくつかの実施形態では、ＰＴＥＮ変異には、Ｒ１３０Ｑ、Ｒ１３０Ｇ、Ｔ３１９＊、Ｒ２３３＊、Ｒ１３０＊、Ｋ２６７Ｒｆｓ＊９、Ｎ３２３Ｍｆｓ＊２１、Ｎ３２３Ｋｆｓ＊２、Ｒ１７３Ｃ、Ｒ１７３Ｈ、Ｒ３３５＊、Ｑ１７１＊、Ｑ２４５＊、Ｅ７＊、Ｄ２６８Ｇｆｓ＊３０、Ｒ１３０Ｑ、Ｑ２１４＊、Ｒ１３０Ｌ、Ｃ１３６Ｒ、Ｑ２９８＊、Ｑ１７＊、Ｈ９３Ｒ、Ｐ２４８Ｔｆｓ＊５、Ｉ３３ｄｅｌ、Ｒ２３３＊、Ｅ２９９＊、Ｇ１３２Ｄ、Ｙ６８Ｈ、Ｔ３１９Ｋｆｓ＊２４、Ｎ３２９Ｋｆｓ＊１４、Ｖ１６６Ｓｆｓ＊１４、Ｖ２９０＊、Ｔ３１９Ｎｆｓ＊６、Ｒ１４２Ｗ、Ｐ３８Ｓ、Ａ１２６Ｔ、Ｈ６１Ｒ、Ｆ２７８Ｌ、Ｓ２２９＊、Ｒ１３０Ｐ、Ｇ１２９Ｒ、Ｒ１３０Ｑｆｓ＊４、Ｐ２４６Ｌ、Ｒ１３０＊、Ｇ１６５Ｒ、Ｃ１３６Ｙ、Ｒ１７３Ｃ、Ｉ１０１Ｔ、Ｙ１５５Ｃ、Ｄ９２Ｅ、Ｋ１６４Ｒｆｓ＊３、Ｎ１８４Ｅｆｓ＊６、Ｇ１２９Ｅ，Ｒ１３０Ｇ、Ｇ３６Ｒ、Ｆ３４１Ｖ、Ｈ１２３Ｙ、Ｃ１２４Ｓ、Ｍ３５ＶＧ１２７Ｅ、Ｇ１６５Ｅ、及びそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【２９４０】

いくつかの実施形態では、ＴＰ５３変異には、Ｒ１７５Ｈ、Ｇ２４５Ｓ、Ｒ２４８Ｑ、Ｒ２４８Ｗ、Ｒ２４９Ｓ、Ｒ２７３Ｃ、Ｒ２７３Ｈ、Ｒ２８２Ｗ、Ｃ１３５Ｙ、Ｃ１４１Ｙ、Ｐ１５１Ｓ、Ｖ１５７Ｆ、Ｒ１５８Ｌ、Ｙ１６３Ｃ、Ｖ１７３Ｌ、Ｖ１７３Ｍ、Ｃ１７６Ｆ、Ｈ１７９Ｒ、Ｈ１７９Ｙ、Ｈ１７９Ｑ、Ｙ２０５Ｃ、Ｙ２２０Ｃ、Ｙ２３４Ｃ、Ｍ２３７Ｉ、Ｃ２３８Ｙ、Ｓ２４１Ｆ、Ｇ２４５Ｄ、Ｇ２４５Ｃ、Ｒ２４８Ｌ、Ｒ２４９Ｍ、Ｖ２７２Ｍ、Ｒ２７３Ｌ、Ｐ２７８Ｌ、Ｒ２８０Ｔ、Ｅ２８５Ｋ、Ｅ２８６Ｋ、Ｒ１５８Ｈ、Ｃ１７６Ｙ、Ｉ１９５Ｔ、Ｇ２１４Ｒ、Ｇ２４５Ｖ、Ｇ２６６Ｒ、Ｇ２６６Ｅ、Ｐ２７８Ｓ、Ｒ２８０Ｋ、またはそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。いくつかのさらなる実施形態では、ＴＰ５３変異は、Ｇ２４５Ｓ；Ｒ２４９Ｓ；Ｒ２７３Ｃ；Ｒ２７３Ｈ；Ｃ１４１Ｙ、Ｖ１５７Ｆ、Ｒ１５８Ｌ、Ｙ１６３Ｃ、Ｖ１７３Ｌ、Ｖ１７３Ｍ、Ｙ２０５Ｃ、Ｙ２２０Ｃ、Ｇ２４５Ｃ、Ｒ２４９Ｍ、Ｖ２７２Ｍ、Ｒ２７３Ｌ、及びＥ２８６Ｋからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＰ５３変異は、上記の変異のうちの１つ以上を含む。

【２９４１】

いくつかの実施形態では、ＣＲＥＢＢＰ変異には、Ｒ１４４６Ｃ、Ｒ１４４６Ｈ、Ｓ１６８０ｄｅｌ、Ｉ１０８４Ｓｆｓ＊１５、Ｐ１９４８Ｌ、Ｉ１０８４Ｎｆｓ＊３、？Ｒ３８６＊、Ｓ８９３Ｌ、Ｒ１３４１＊、Ｐ１４２３Ｌｆｓ＊３６、Ｐ１４８８Ｌ、Ｙ１５０３Ｈ、Ｒ１６６４Ｃ、Ａ１８２４Ｔ、Ｒ１１７３＊、Ｒ１３６０＊、Ｙ１４５０Ｃ、Ｈ２２２８Ｄ、Ｓ７１Ｌ、Ｐ９２８＝、Ｄ１４３５Ｎ、Ｗ１５０２Ｃ、Ｙ１５０３Ｄ、Ｒ４８３＊、Ｒ６０１Ｑ、Ｓ９４５Ｌ、Ｒ１１０３＊、Ｒ１２８８Ｗ、Ｒ１３９２＊、Ｃ１４０８Ｙ、Ｄ１４３５Ｇ、Ｒ１４４６Ｌ、Ｈ１４８５Ｙ、Ｑ１４９１Ｋ、Ｑ９６＊、Ｌ３６１Ｍ、Ｌ５２４Ｗｆｓ＊６、Ｑ５４０＊、Ｑ１０７３＊、Ａ１１００Ｖ、Ｒ１１６９Ｃ、Ｃ１２３７Ｙ、Ｒ１３４７Ｗ、Ｇ１４１１Ｅ、Ｗ１４７２Ｃ、Ｉ１４８３Ｆ、Ｐ１４８８Ｔ、Ｒ１４９８＊、Ｙ１５０３Ｆ、Ｑ１８５６＊、Ｒ１９８５Ｃ、Ｒ２１０４Ｃ、Ｓ２３２８Ｌ、Ｖ２３４９＝、Ｓ２３７７Ｌ、及びそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【２９４２】

いくつかの実施形態では、ＫＭＴ２Ｃ変異には、Ｄ３４８Ｎ、Ｐ３５０＝、Ｒ３８０Ｌ、Ｃ３９１＊、Ｐ３０９Ｓ、Ｃ９８８Ｆ、Ｙ９８７Ｈ、Ｓ９９０Ｇ、Ｋ２７９７Ｒｆｓ＊２６、Ｖ３４６＝、Ｒ８９４Ｑ、Ｒ２８４Ｑ、Ｓ８０６＝、Ｒ１６９０＝、Ｐ９８６＝、Ａ１６８５Ｓ、Ｇ３１５Ｓ、Ｑ７５５＊、Ｒ９０９Ｋ、Ｔ３１６Ｓ、Ｓ７７２Ｌ、Ｇ８３８Ｓ、Ｌ２９１Ｆ、Ｐ３３５＝、Ｃ９８８Ｆ、Ｑ２６８０＝、Ｅ７６５Ｇ、Ｋ３３９Ｎ、Ｙ８１６＊、Ｒ５２６Ｐ、Ｎ７２９Ｄ、Ｇ８４５Ｅ、Ｉ８１７Ｎｆｓ＊１１、Ｇ８９２Ｒ、Ｃ１１０３＊、Ｓ３６６０Ｌ、Ｆ４４９６Ｌｆｓ＊２１、Ｇ３１５Ｃ、Ｒ８８６Ｃ、Ｄ３４８Ｎ、Ｓ７９３＝、Ｖ９１９Ｌ、Ｒ２４８１Ｓ、Ｒ２８８４＊、Ｒ４５４９Ｃ、Ｍ３０５Ｄｆｓ＊２８、Ｔ３１６Ｓ、Ｐ３７７＝、Ｉ４５５Ｍ、Ｔ８２０Ｉ、Ｓ９６５＝、Ｓ７３０Ｙ、Ｐ８６０Ｓ、Ｑ８７３Ｈｆｓ＊４０、Ｒ９０４＊、Ｒ２６１０Ｑ、Ｒ４４７８＊、及びそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【２９４３】

いくつかの実施形態では、ＫＭＴ２Ｄ変異には、Ｌ１４１９Ｐ、Ｅ６４０Ｄ、Ｅ５４１Ｄ、Ｅ４５５Ｄ、Ｔ２１３１Ｐ、Ｋ１４２０Ｒ、Ｐ２３５４Ｌｆｓ＊３０、Ｇ２４９３＝、Ｑ３６１２＝、Ｉ９４２＝、Ｔ１１９５Ｈｆｓ＊１７、Ｐ４１７０＝、Ｐ１１９４Ｈ、Ｇ１２３５Ｖｆｓ＊９５、Ｐ４５６３＝、Ｐ６４７Ｈｆｓ＊２８３、Ｌ４４９＿Ｐ４５７ｄｅｌ、Ｐ３５５７＝、Ｑ３６０３＝、Ｒ１７０２＊、Ｐ６４８Ｔｆｓ＊２、Ｒ５５０１＊、Ｒ４１９８＊、Ｒ４４８４＊、Ｒ８３Ｑ、Ｒ１９０３＊、、Ｒ２６８５＊、Ｒ４２８２＊、Ｌ５３２６＝、Ｒ５４３２Ｗ、Ｒ２７３４＊、Ｑ２８００＊、Ｒ２８３０＊、Ｑ３７４５ｄｕｐ、Ｓ４０１０Ｐ、Ｒ４９０４＊、Ｇ５１８２Ａｆｓ＊６１、Ｒ５２１４Ｈ、Ｒ１６１５＊、Ｑ２３８０＊、Ｒ２６８７＊、Ｒ２７７１＊、Ｖ３０８９Ｗｆｓ＊３０、Ｑ３７９９Ｇｆｓ＊２１２、Ｒ４５３６＊、Ｒ５０３０Ｃ、Ｒ５０４８Ｃ、Ｒ５４３２Ｑ、Ａ２２１Ｌｆｓ＊４０、Ａ４７６Ｔ、Ａ２１１９Ｌｆｓ＊２５，Ｐ２５５７Ｌ、Ｒ２８０１＊、Ｑ３９１３＊、Ｒ４４２０Ｗ、Ｇ４６４１＝、Ｒ５０９７＊、及びそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【２９４４】

いくつかの実施形態では、ＡＲＩＤ１Ａ変異には、が含まれるが、これらに限定されない。例えば、対象は、Ｃ８８４＊（＊：ナンセンス変異）、Ｅ９６６Ｋ、Ｑ１４１１＊、Ｆ１７２０ｆｓ（ｆｓ：フレームシフト）、Ｇ１８４７ｆｓ、Ｃ１８７４ｆｓ、Ｄ１９５７Ｅ、Ｑ１４３０、Ｒ１７２１ｆｓ、Ｇ１２５５Ｅ、Ｇ２８４ｆｓ、Ｒ１７２２＊、Ｍ２７４ｆｓ、Ｇ１８４７ｆｓ、Ｐ５５９ｆｓ、Ｒ１２７６＊、Ｑ２１７６ｆｓ、Ｈ２０３ｆｓ、Ａ５９１ｆｓ、Ｑ１３２２＊、Ｓ２２６４＊、Ｑ５８６＊、Ｑ５４８ｆｓ、及びＮ７５６ｆｓからなる群から選択されるＡＲＩＤ１Ａの変異を有する。

【２９４５】

いくつかの実施形態では、ＲＢ１変異には、Ｒ３２０Ｘ、Ｒ４６７Ｘ、Ｒ５７９Ｘ、Ｒ４５５Ｘ、Ｒ３５８Ｘ、Ｒ２５１Ｘ、Ｒ７８７Ｘ、Ｒ５５２Ｘ、Ｒ２５５Ｘ、Ｒ５５６Ｘ、Ｙ７９０Ｘ、Ｑ５７５Ｘ、Ｅ３２３Ｘ、Ｒ６６１Ｗ、Ｒ５７９＊、Ｒ４５５＊、Ｒ５５

６＊、Ｒ７８７＊、Ｒ６６１Ｗ、Ｒ４４５＊、Ｒ４６７＊、Ｑ２１７＊、Ｑ４７１＊、Ｗ１９５＊、Ｑ３９５＊、Ｉ６８０Ｔ、Ｅ１３７＊、Ｒ２５５＊、Ｑ３４４＊、Ｑ６２＊、Ｅ４４０Ｋ、Ａ４８８Ｖ、Ｐ７７７Ｌｆｓ＊３３、Ｅ３２２Ｋ、Ｒ６５６Ｗ、Ｇ６１７Ｒｆｓ＊３６、Ｃ２２１＊、Ｅ４４０＊、Ｑ９３＊、Ｑ５０４＊、Ｅ１２５＊、Ｓ８３４＊、Ｅ３２３＊、Ｑ６８５＊、Ｓ８２９＊、Ｗ５１６＊、Ｇ４３５＊、Ｑ２５７＊、Ｅ７９＊、Ｓ５６７Ｌ、Ｖ６５４Ｍ、Ｖ６５４Ｓｆｓ＊１４、Ｇ１００Ｅｆｓ＊１１、Ｋ７１５＊、及びそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【２９４６】

いくつかの実施形態では、ＡＴＭ変異は、１０７４４Ａ＞Ｇ；１０７４４Ａ＞Ｇ、１１４８２Ｇ＞Ａ、ＩＶＳ３－５５８Ａ＞Ｔ、１４６Ｃ＞Ｇ、３８１ｄｅｌＡ、ＩＶＳ８－３ｄｅｌＧＴ、１０２８ｄｅｌＡＡＡＡ、１１２０Ｃ＞Ｔ、１９３０ｉｎｓ１６、ＩＶＳ１６＋２Ｔ＞Ｃ、２５７２Ｔ＞Ｃ、ＩＶＳ２１＋１Ｇ＞Ａ、３０８５ｄｅｌＡ、３３８１ｄｅｌＴＧＡＣ、３６０２ｄｅｌＴＴ、４０５２ｄｅｌＴ、４３９６Ｃ＞Ｔ、５１８８Ｃ＞Ｔ、５２９０ｄｅｌＣ、５５４６ｄｅｌＴ、５７９１Ｇ＞ＣＣＴ、６０４７Ａ＞Ｇ、ＩＶＳ４４－１Ｇ＞Ｔ、６６７２ｄｅｌＧＣ／６６７７ｄｅｌＴＡＣＧ、６７３６ｄｅｌｌ１／６７４９ｄｅｌ７、７１５９ｉｎｓＡＧＣＣ、７６７１ｄｅｌＧＴＴＴ、７７０５ｄｅｌ１４、７８６５Ｃ＞Ｔ、７９７９ｄｅｌＴＧＴ、８１７７Ｃ＞Ｔ、８５４５Ｃ＞Ｔ、８５６５Ｔ＞Ａ、ＩＶＳ６４＋１Ｇ＞Ｔ、及び９０１０ｄｅｌ２８を含むが、これらに限定されない、ＡＴＭ遺伝子配列における変異である。

【２９４７】

本発明のいくつかの実施形態では、ＳＥＴＤ２変異は、ＮＣＢＩ受託番号ＮＭ＿０１４１５９のｍＲＮＡ配列の転写開始コドン位置が１に設定されたときの、ＳＥＴＤ２タンパク質をコードする遺伝子配列の変化である。いくつかの実施形態では、７５５８番目のＧ（グアニン）は、Ｔ（チミン）で置換され、４７７４番目のＣ（シトシン）は、Ｔによって置換され、１２１０番目のＡ（アデニン）は、Ｔによって置換され、４８８３番目は、Ｇによって置換され、５２９０番目のＣは、Ｔによって置換され、７０７２番目のＣは、Ｔによって置換され、４１４４番目のＧは、Ｔによって置換され、１２９７は、Ｔによって置換され、７５５は、Ｇによって置換され、７２６１は、Ｇによって置換され、６７００は、Ｔによって置換され、２５３６は、Ｔによって置換され、７４３８は、Ｔによって置換され、３８６６位での置換、Ａの挿入、６７１２位でのＴの挿入、７５７２位でのＴの挿入、９１３番目のＡの欠失、５６１９番目のＣの欠失、塩基４６０３～４６０４、８９４～８９７の欠失、第１の塩基の欠失、１９３６番目のＣの欠失、３０９４～３１１８塩基の欠失、５２８９位におけるＡの挿入、及び６３２３～６３３３塩基の欠失。含まれる真のルアーの群から選択される１つ以上の変異。

【２９４８】

本発明の一実施形態では、ＳＥＴＤ２タンパク質の変異は、２５２０グルタミン酸後に停止し、１５９２アルギニン後に停止し、４０４アルギニン後に停止し、１７６４グルタミン後に停止し、ＮＣＢＩ受託番号ＮＰ＿０５４８７８に対応するＳＥＴＤ２アミノ酸配列の１０３２は、第１のセリン後にフレームシフトし、６４６ヒスチジン後にフレームシフトし、２１０８番目のバリン後にフレームシフトし、１７６４グルタミン後にフレームシフトし、２９８番目のイソロイシン後にフレームシフトし、１２８９番目のアスパラギン後にフレームシフトし、２８９番目のセリン以降フレームシフトし、後にフレームシフトし、２５２５リジン後に停止し、３０５スレオニン後にフレームシフトし、１８７３プロリン後にフレームシフトし、１５３５アスパラギン後にフレームシフトし、２２３４グルタミン後後に停止し、２５３６アラニンをスレオニンで置換し、７４３８グルタミンを停止し、アスパラギンからなる１６２８基をセリンによって置換し、２３５８番目のプロリンをセリンによって置換し、１３８２アラニンをセリンによって置換し、４３３番目のアルギニンをシトシンによって置換し、２５２番目のアラニンをグリシンによって置換し、２４２１スレオニンをアラニンによって置換する。から選択される１つ以上の変異。

【２９４９】

いくつかの実施形態では、ＦＬＴ３変異には、（Ｑ５６９＿Ｅ６４８）ｉｎｓ、Ｄ８３５Ｘ、（Ｑ５６９＿Ｅ６４８）ｄｅｌｉｎｓ、（Ｄ８３５＿Ｉ８３６）、Ｄ８３５Ｙ、Ｄ８３５Ｖ、Ｄ８３５Ｙ、Ｄ８３５Ｈ、Ｔ２２７Ｍ、Ｉ８３６ｄｅｌ、Ｎ６７６Ｋ、Ｄ８３５Ｅ、Ｙ５９７＿Ｅ５９８ｉｎｓＤＹＶＤＦＲＥＹ、Ｄ８３５Ｅ、Ｄ８３５ｄｅｌ、Ｆ５９４＿Ｄ６００ｄｕｐ、Ａ６８０Ｖ、Ｄ８３９Ｇ、Ｄ９６＝、Ｄ８３５Ｈ、Ｖ４９１Ｌ、Ｄ８３５Ｅ、Ｑ９８９＊、Ｄ８３５Ｖ、Ｌ５６１＝、Ｉ８３６ｄｅｌ、Ｐ９８６Ａｆｓ＊２７、Ｄ７Ｇ、Ｄ３２４Ｎ、Ｓ４５１Ｆ、Ｄ８３５Ｎ、Ｌ５７６Ｐ、Ｙ５９７＿Ｅ５９８ｉｎｓＤＶＤＦＲＥＹ、Ｖ４９１Ｌ、Ｎ８４１Ｔ、Ｄ３２４Ｎ、Ｙ５７２Ｃ、Ｒ５９５＿Ｌ６０１ｄｕｐ、Ｋ６６３Ｒ、Ｎ６７６Ｋ、Ｆ６９１Ｌ、Ｄ８３５Ａ、Ｉ８３６Ｈ、Ｎ８４１Ｋ、Ｓ９９３Ｌ、Ｌ８３２Ｆ、Ｉ８３６Ｍ、Ａ６６Ｖ、及びそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【２９５０】

いくつかの実施形態では、ＰＴＰＮ１１変異には、ｃ　Ｅ７６Ｋ、Ａ７２Ｖ、Ａ７２Ｔ、Ｄ６１Ｙ、Ｄ６１Ｖ、Ｇ６０Ｖ、Ｅ６９Ｋ、Ｅ７６Ｇ、Ｇ５０７Ｖ、Ｓ５０６Ｌ、Ｇ５０７Ａ、Ｔ７３Ｉ、Ｅ７６Ａ、Ｅ７６Ｑ、Ｓ５０６Ｐ、Ｄ６１Ｎ、Ｆ７１Ｌ、Ｅ７６Ｖ、Ｆ７１Ｌ、Ａ７２Ｄ、Ｖ４３２Ｍ、Ｔ４７２Ｍ、Ｐ４９５Ｌ、Ｎ５８Ｙ、Ｆ２８５Ｓ、Ｓ５０６Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ａ４６５Ｔ、Ｒ５０２Ｗ、Ｇ５０７Ｒ、Ｔ５１１Ｋ、Ｄ６１Ｈ、Ｄ６１Ｇ、Ｇ５０７Ｅ、Ｇ６０Ｒ、Ｇ６０Ａ、Ｑ５１４Ｌ、Ｅ１３９Ｄ、Ｙ１９７＊、Ｎ３０８Ｄ、Ｑ５１４Ｈ、Ｑ５１４Ｈ、Ｎ５８Ｓ、Ｅ１２３Ｄ、Ｌ２０６＝、Ａ４６５Ｇ、Ｐ４９５Ｓ、Ｇ５０７Ｒ、及びそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【２９５１】

いくつかの実施形態では、ＦＧＦＲ１変異には、Ｎ５７７Ｋ、Ｋ６８７Ｅ、Ｎ５７７Ｋ、Ｄ１６６ｄｅｌ、Ｔ３７１Ｍ、Ｒ４７６Ｗ、Ｔ３５０＝、Ｅ４９８Ｋ、Ｎ５７７Ｄ、Ｄ６８３Ｇ、Ｒ８７Ｃ、Ａ１５４Ｄ、Ｎ３０３＝、Ａ３７４Ｖ、Ｄ５５０＝、Ｓ６３３＝、Ｖ６９５Ｌ、Ｇ７２８＝、Ｒ７６５Ｗ、Ｐ８０３Ｓ、Ｗ１９Ｃ、Ｐ５６＝、Ｒ１１３Ｃ、Ｖ１４９Ｉ、Ｓ１５８Ｌ、Ｄ１６６ｄｕｐＲ２２０Ｃ、Ｎ２２４Ｋｆｓ＊８、Ｄ２４９Ｎ、Ｒ２８１Ｗ、Ｒ２８１Ｑ、Ａ２９９Ｓ、Ｓ４２４Ｌ、Ｓ４６１Ｆ、Ｓ４６７Ｆ、Ｒ５０６Ｑ、及びそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【２９５２】

いくつかの実施形態では、ＥＰ３００変異には、Ｄ１３９９Ｎ、Ｙ１４１４Ｃ、Ｍ１４７０Ｃｆｓ＊２６、Ｙ１１１１＊、Ｈ２３２４Ｐｆｓ＊５５、Ｒ１６２７Ｗ、Ｎ２２０９＿Ｑ２２１３ｄｅｌｉｎｓＫ、Ｑ２２６８ｄｅｌ、Ｌ４１５Ｐ、Ｍ１４７０Ｎｆｓ＊３、Ｅ１５１４Ｋ、Ｃ１２０１Ｙ、Ｐ１４５２Ｌ、Ｓ９５２＊、Ｃ１１６４Ｙ、Ｄ１３９９Ｙ、Ｓ５０７Ｇ、Ｑ８２４＊、Ｄ１５０７Ｎ、Ｈ２３２４Ｔｆｓ＊２９、Ｐ９２５Ｔ、Ｐ１４４０Ｌ、Ｗ１４６６Ｃ、Ｐ１５０２Ｌ、Ａ１６２９Ｖ、Ｒ１６４５＊、Ｎ１７００Ｔｆｓ＊９、Ｐ１８６９Ｌ、Ｑ６５＊、Ａ１７１Ｖ、Ｒ２０２＊、Ｒ５８０Ｑ、Ａ６２７Ｖ、Ｑ１０８２＊、Ｎ１２３６Ｋｆｓ＊２、Ｎ１２８６Ｓ、Ｒ１３１２＊、Ｒ１３５６＊、Ｃ１３８５Ｆ、Ｈ１４５１Ｌ、Ｒ１４６２＊、Ｙ１４６７Ｎ、Ｙ１４６７Ｈ、Ｒ１４７８Ｈ、Ｒ１６２７Ｑ、Ｒ８６＊、Ｒ３７０Ｈ、Ｒ３９７＊、Ｒ７５４Ｃ、Ｐ８４２Ｓ、Ｉ９９７Ｖ、Ｅ１０１４＊、及びそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【２９５３】

いくつかの実施形態では、ＭＹＣ変異には、Ｅ６１Ｔ、Ｅ６８Ｉ、Ｒ７４Ｑ、Ｒ７５Ｎ、Ｗ１３５Ｅ、Ｗ１３６Ｅ、Ｖ３９４Ｄ、Ｌ４２０Ｐ、Ｗ９６Ｅ、Ｖ３２５Ｄ、Ｌ３５１Ｐ、４１アミノ酸がＮ末端で欠失したＭＹＣタンパク質（ｄＮ２ＭＹＣ）、Ｎ２６Ｓ、Ｓ１６１Ｌ、Ｐ７４Ｌ、Ｖ７Ｍ、Ｆ１５３Ｓ、Ｅ５４Ｄ、Ｐ２４６、Ｌ１６４Ｖ、Ｐ７４Ｓ、Ａ５９Ｖ、Ｔ７３Ｉ、Ｐ７２Ｔ、Ｔ７３Ａ、Ｈ３７４Ｒ、Ｐ１７Ｓ、Ｔ７３Ｎ、Ｓ２６４Ｎ、Ｐ７２Ｓ、Ｑ５２ｄｅｌ、Ｓ２１Ｔ、Ｐ７４Ａ、Ｓ１０７Ｎ、Ｐ７５Ｓ、Ｓ７７Ｐ、Ｐ２６１Ｓ、Ｐ７４Ｑ、Ｓ１９０Ｒ、Ａ５９Ｔ、Ｆ１５３Ｃ、Ｐ７５Ｈ、Ｔ７３Ｉ、Ｓ

７７Ｆ、Ｎ１１Ｓ、Ｓ２１Ｎ、Ｐ７８Ｌ、Ｐ７２Ｌ、Ｎ９Ｋ、Ｓ１９０Ｎ、Ｓ２６７Ｆ、Ｔ７３Ｐ、Ｐ７８Ｓ、Ｇ１０５Ｄ、Ｓ１８７Ｃ、Ｌ７１Ｍ、Ｑ１０Ｈ、Ｌ１９１ｘ、Ｑ５０ｘ、Ｌ１９１Ｆ、Ｒ２５Ｋ、Ｆ１３０Ｌ、Ｙ２７Ｓ、Ｄ１９５Ｎ、Ｄ２Ｇ、Ｖ２０Ａ、Ｖ６Ｇ、Ｖ２０Ｉ、Ｄ２Ｈ、Ｐ７５Ａ、Ｇ１５２Ｄ、Ｐ７４Ｔ、Ｃ４０Ｙ、Ｅ８Ｋ、Ｑ４８ｘ、及びそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【２９５４】

いくつかの実施形態では、ＥＺＨ２変異は、変化したヒストンメチル化パターンに関連付けられる。いくつかの実施形態では、ＥＺＨ２変異は、アミノ酸Ｙ６４１（Ｙ６４６、触媒ドメインに相当する）のＦ、Ｎ、Ｈ、ＳまたはＣのいずれかへの変換をもたらし、Ｈ３Ｋ２７の高トリメチル化をもたらし、リンパ誘発を駆動する。いくつかの実施形態では、ＥＺＨ２変異は、ＥＺＨ２　ＳＥＴドメイン変異、ＥＺＨ２の過剰発現、他のＰＲＣ２サブユニットの過剰発現、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ（ＨＡＴ）の機能変異の喪失、及びＭＬＬ２の機能の喪失を含む。ＥＺＨ２　Ｙ６４６変異に対してヘテロ接合である細胞は、ＥＺＨ２タンパク質に対してホモ接合野生型（ＷＴ）である細胞、またはＹ６４６変異に対してホモ接合である細胞と比較して、Ｈ３Ｋ２７の高トリメチル化をもたらす。

【２９５５】

いくつかの実施形態では、ＥＺＨ２変異には、Ｙ６４６Ｆ、Ｙ６４６Ｎ、Ｄ１８５Ｈ、Ｙ６４６Ｆ、Ｙ６４６Ｓ、Ｙ６４６Ｈ、Ｒ６９０Ｈ、Ｙ６４６Ｘ、Ｅ７４５Ｋ、Ｙ６４６Ｃ、Ｖ６２６Ｍ、Ｖ６７９Ｍ、Ｒ６９０Ｈ、Ｒ６８４Ｈ、Ａ６８２Ｇ、Ｅ２４９Ｋ、Ｇ１５９Ｒ、Ｒ２８８Ｑ、Ｎ３２２Ｓ、Ａ６９２Ｖ、Ｒ６９０Ｃ、Ｄ７３０＊（挿入フレームシフト）、Ｓ６９５Ｌ、Ｒ６８４Ｃ、Ｍ６６７Ｔ、Ｒ２８８＊、Ｓ６４４＊、Ｄ１９２Ｎ、Ｋ５５０Ｔ、Ｑ６５３Ｅ、Ｄ６６４Ｇ、Ｒ３４７Ｑ、Ｙ６４６Ｃ、Ｇ６６０Ｒ、Ｒ２１３Ｃ、Ａ２５５Ｔ、Ｓ５３８Ｌ、Ｎ６９３Ｋ、Ｉ５５Ｍ、Ｒ５６１Ｈ、Ａ６９２Ｖ、Ｋ５１５Ｒ、Ｙ７３３＊、Ｒ６３＊、Ｑ５７０＊、Ｑ３２８＊、Ｒ２５Ｑ、Ｔ４６７Ｐ、Ａ６５６Ｖ、Ｔ５７３Ｉ、Ｃ５７１Ｙ、Ｅ７２５Ｋ、Ｒ１６Ｗ、Ｐ５７７Ｌ、Ｆ１４５Ｓ、Ｖ６８０Ｍ、Ｇ６８６Ｄ、Ｇ１３５Ｒ、Ｋ６３４Ｅ、Ｓ６５２Ｆ、Ｒ２９８Ｃ、Ｇ６４８Ｅ、Ｒ５６６Ｈ、Ｌ１４９Ｒ、Ｒ５０２Ｑ、Ｙ７３１Ｄ、Ｒ３１３Ｗ、Ｎ６７５Ｋ、Ｓ６５２Ｃ、Ｔ３７４Ｈｆｓ＊３、Ｎ１５２Ｉｆｓ＊１５、Ｅ４０１Ｋｆｓ＊２２、Ｋ４０６Ｍｆｓ＊１７、Ｅ２４６＊、Ｓ６２４Ｃ、Ｉ１４６Ｔ、Ｖ６２６Ｍ、Ｌ６７４Ｓ、Ｈ６９４Ｒ、Ａ５８１Ｓ、及びそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【２９５６】

いくつかの実施形態では、ＪＡＫ２変異は、Ｇ１９２０Ｔ変異、Ｇ１９２０Ｔ／Ｃ１９２２Ｔ変異、またはＧ１９２０Ａ変異と組み合わせたＴ１９２３Ｃ変異を含むが、これらに限定されないＪＡＫ２遺伝子の変異である。いくつかの実施形態では、ＪＡＫ２変異は、Ｖ６１７Ｆ、Ｖ６１７Ｉ、Ｒ６８３Ｇ、Ｎ５４２＿Ｅ５４３ｄｅｌ、Ｅ５４３＿Ｄ５４４ｄｅｌ、Ｒ６８３Ｓ、Ｒ６８３Ｘ、Ｆ５３７＿Ｋ５３９ｄｅｌｉｎｓＬ（フレーム中の欠失）、Ｋ５３９Ｌ、Ｎ１１０８Ｓ、Ｒ１１１３Ｈ、Ｒ１０６３Ｈ、Ｒ４８７Ｃ、Ｉ５４０Ｍｆｓ＊３（欠失－フレームシフト）、Ｒ８６７Ｑ、Ｋ５３９Ｌ、Ｇ５７１Ｓ、Ｒ１１１３Ｃ、Ｒ９３８Ｑ、Ｒ２２８Ｑ、Ｌ８３０＊、Ｅ１０８０＊、Ｋ５３９Ｌ、Ｃ６１８Ｒ、Ｒ５６４Ｑ、Ｄ１０３６Ｈ、Ｌ１０８８Ｓ、Ｈ５３８Ｎｆｓ＊４、Ｄ８７３Ｎ、Ｖ３９２Ｍ、Ｉ６８２Ｆ、Ｌ３９３Ｖ、Ｍ５３５Ｉ、Ｃ６１８Ｒ、Ｔ８７５Ｎ、Ｌ６１１Ｖ、Ｄ３１９Ｎ、Ｌ６１１Ｓ、Ｇ９２１Ｓ、Ｈ５３８Ｙ、Ｓ１０３５Ｌ、及びそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない１つ以上の置換を含む、変異体ＪＡＫ２タンパク質である。

【２９５７】

いくつかの実施形態では、ＦＢＸＷ７変異は、Ｗ２４４＊（＊：停止コドン）Ｒ２２２＊、Ｒ２７８＊、Ｅ１９２Ａ、Ｓ２８２＊、Ｅ１１３Ｄ、Ｒ４６５Ｈ／Ｃ、７２６＋１Ｇ＞Ａスプライス、Ｒ５０５Ｃ、Ｒ４７９Ｑ、Ｒ４６５Ｃ、Ｒ３６７＊、Ｒ４９９Ｖｆｓ＊２５（ｆｓ＊：フレームシフト）、Ｒ６５８＊、Ｄ６００Ｙ、Ｄ５２０Ｎ、Ｄ５２０Ｙ

、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される点変異である。さらなる実施形態では、ＦＢＸＷ７変異は、Ｒ４７９Ｑ及びＳ５８２Ｌ、Ｒ４６５Ｈ及びＳ５８２Ｌ、Ｄ５２０Ｎ、Ｄ５２０Ｙ及びＲ１４Ｑ、ならびにＲ３６７＊及びＳ５８２Ｌを含むが、これらに限定されない二重または三重変異である。

【２９５８】

いくつかの実施形態では、ＣＣＮＤ３変異には、Ｓ２５９Ａ、Ｒ２７１Ｐｆｓ＊５３（挿入により引き起こされたフレームシフト）、Ｅ５１＊、Ｑ２６０＊、Ｐ１９９Ｓ、Ｔ２８３Ａ、Ｔ２８３Ｐ、Ｖ２８７Ｄ、Ｄ２８６＿Ｔ２８８ｄｅｌ、Ｒ２７１Ｇｆｓ＊３３、Ｑ２７６＊、Ｒ２４１Ｑ、Ｄ２３８Ｇ、Ｒ３３Ｐ、Ｉ２９０Ｋ、Ｉ２９０Ｔ、Ｉ２９０Ｒ、Ｐ２６７ｆｓ、Ｐ２８４Ｓ、Ｐ２８４Ｌ、Ｐ１００Ｓ、Ｅ２５３Ｄ、Ｓ２６２Ｉ、Ｒ１４Ｗ、Ｒ１１４Ｌ、Ｄ２３８Ｎ、Ａ２６６Ｅ、Ｒ１６７Ｗ、及びそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【２９５９】

いくつかの実施形態では、ＧＮＡ１１変異には、Ｑ２０９Ｌ、Ｒ１８３Ｃ、Ｔ２５７＝、Ｒ１８３Ｃ、Ｇ２０８Ａｆｓ＊１６、Ｑ２０９Ｈ、Ｒ１８３Ｃ、Ｑ２０９Ｐ、Ｑ２０９Ｒ、Ｑ２０９Ｈ、？Ｔ９６＝、Ｒ２１０Ｗ、Ｒ２５６Ｑ、Ｔ３３４＝、Ｇ４８Ｄ、Ｓ５３Ｇ、Ｑ２０９Ｐ、Ｒ２１３Ｑ、及びそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＧＮＡ１１変異は、エクソン４において２つの変異、例えば、Ｖ１８２における変異及びＴ１７５における変異、またはエクソン５における１つ以上の変異を有する。

【２９６０】

３．ＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１阻害剤との併用

プログラム死１（ＰＤ－１）は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）Ｔ細胞、活性化単球、及び樹状細胞によって発現される２８８アミノ酸の膜貫通免疫チェックポイント受容体タンパク質である。ＣＤ２７９としても知られるＰＤ－１は、ＣＤ２８ファミリーに属し、ヒトでは第２染色体上のＰｄｃｄ１遺伝子によってコードされる。ＰＤ－１は、１つの免疫グロブリン（Ｉｇ）スーパーファミリードメイン、膜貫通領域、ならびに免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ（ＩＴＩＭ）及び免疫受容体チロシンベースのスイッチモチーフ（ＩＴＳＭ）を含む細胞内ドメインからなる。ＰＤ－１とそのリガンド（ＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２）は、Ｋｅｉｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００８，２６，６７７－７０４に記載されるように、免疫寛容において重要な役割を果たすことが知られている。ＰＤ－１は、Ｔ細胞の免疫応答を負に調節する阻害シグナルを提供する。ＰＤ－Ｌ１（Ｂ７－Ｈ１またはＣＤ２７４としても知られる）及びＰＤ－Ｌ２（Ｂ７－ＤＣまたはＣＤ２７３としても知られる）は、腫瘍細胞及び間質細胞上に発現され、ＰＤ－１を発現する活性化Ｔ細胞が遭遇する可能性があり、Ｔ細胞の免疫抑制につながる。ＰＤ－Ｌ１は、ヒト第９染色体上のＣｄ２７４遺伝子によってコードされる２９０アミノ酸の膜貫通タンパク質である。例えば、Ｔｏｐａｌｉａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎ．Ｅｎｇ．Ｊ．Ｍｅｄ．２０１２，３６６，２４４３－５４に記載される最近の臨床研究で実証されているように、ＰＤ－１阻害剤、ＰＤ－Ｌ１阻害剤、及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤の使用による、ＰＤ－１とそのリガンドＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２との間の相互作用をブロックすることで、免疫抵抗を克服することができる。ＰＤ－Ｌ１は、多くの腫瘍細胞株上で発現されるが、ＰＤ－Ｌ２は、主に樹状細胞及びいくつかの腫瘍株上で発現される発現される。Ｔ細胞（活性化後にＰＤ－１を誘導的に発現する）に加えて、ＰＤ－１は、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、活性化単球、樹状細胞上でも発現される。

【２９６１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ及びＰＤ－１阻害剤は、ＮＳＣＬＣの治療のための併用療法または共療法として投与される。

【２９６２】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、前療法を受けていない。いくつかの実施形態

では、ＰＤ－１阻害剤は、フロントライン療法または初期療法として投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、本明細書に記載のＴＩＬと併用して、フロントライン療法または初期療法として投与される。

【２９６３】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、当該技術分野で知られている任意のＰＤ－１阻害剤またはＰＤ－１遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるＰＤ－１阻害剤または遮断剤のうちの１つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、ＰＤ－１阻害剤に関して互換的に使用される。誤解を避けるために、抗体であるＰＤ－１阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリアント、複合体、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、ＰＤ－１阻害剤への本明細書での言及はまた、小分子化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【２９６４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、抗体（すなわち、抗ＰＤ－１抗体）、Ｆａｂ断片を含むその断片、またはその一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ＰＤ－１との結合について競合し、及び／またはＰＤ－１上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、ＰＤ－１との結合について競合し、及び／またはＰＤ－１上のエピトープに結合する。

【２９６５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ヒトＰＤ－１に約１００ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－１に約９０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－１に約８０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－１に約７０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－１に約６０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－１に約５０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－１に約４０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－１に約３０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－１に約２０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－１に約１０ｐＭ以下のK_Dで結合する、またはヒトＰＤ－１に約１ｐＭ以下のK_Dで結合するものである。

【２９６６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ヒトＰＤ－１に約$7.5\times10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約$7.5\times10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約$8\times10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約$8.5\times10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約$9\times10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約$9.5\times10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、またはヒトＰＤ－１に約$1\times10^6$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合するものである。

【２９６７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ヒトＰＤ－１に約2×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.1×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.2×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.3×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.4×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.5×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.6×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、またはヒトＰＤ－１に約2.7×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.8×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.9×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、またはヒトＰＤ－１に約3×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合するものである。

【２９６８】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、約１０ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約９ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約８ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約７ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約６ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約５ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約４ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約３ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約２ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、または約１ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害するものである。
【２９６９】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブ（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ　Ｃｏ．からＯＰＤＩＶＯとして市販されている）、またはそれらのバイオシミラー、抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。ニボルマブは、ＰＤ－１受容体を遮断する完全ヒトＩｇＧ４抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、免疫グロブリンＧ４カッパ、抗（ヒトＣＤ２７４）抗体である。ニボルマブには、Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ａｂｓｔｒａｃｔｓ　Ｓｅｒｖｉｃｅ（ＣＡＳ）登録番号９４６４１４－９４－４が割り当てられており、５Ｃ４、ＢＭＳ－９３６５５８、ＭＤＸ－１１０６、及びＯＮＯ－４５３８としても知られている。ニボルマブの調製及び特性は、米国特許第８，００８，４４９号及び国際特許公開第ＷＯ２００６／１２１１６８号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。様々な形態の癌におけるニボルマブの臨床的安全性及び有効性は、Ｗａｎｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｒｅｓ．２０１４，２，８４６－５６；Ｐａｇｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．，２０１４，６５，１８５－２０２、及びＷｅｂｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２０１３，３１，４３１１－４３１８に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ニボルマブのアミノ酸配列を表１８に示す。ニボルマブは、２２－９６、１４０－１９６、２５４－３１４、３６０－４１８、２２’’－９６’’、１４０’’－１９６’’、２５４’’－３１４’’、及び３６０’’－’’での重鎖内ジスルフィド結合；２３’－８８’、１３４’－１９４’、２３’’’－８８’’’、及び１３４’’’－１９４’’’での軽鎖内ジスルフィド結合；１２７－２１４’、１２７’’－２１４’’’での重鎖－軽鎖間ジスルフィド結合；２１９－２１９’’及び２２２－２２２’’での重鎖－重鎖間ジスルフィド結合；ならびに２９０、２９０’’でのＮ－グリコシル化部位（ＨＣＨ$_2$８４．４）を有する。
【２９７０】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、配列番号１５８によって与えられる重鎖及び配列番号１５９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び

軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２９７１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１６０に示される配列を含み、ＰＤ－１阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１６１に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【２９７２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号１６２、配列番号１６３、及び配列番号１６４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１６５、配列番号１６６、及び配列番号１６７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－１上の同じエピトープに結合する。

【２９７３】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－１抗体であり、抗ＰＤ－１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。抗ＰＤ－１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。

【２９７４】

【表２８】

表１８．ニボルマブに関連するＰＤ－１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号158 ニボルマブ重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSSASTKGPS 120 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS 180 VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP 240 KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT 300 VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC 360 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV 420 MHEALHNHYT QKSLSLSLGK 440
配列番号159 は、軽鎖である。	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号160 ニボルマブ可変重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSS 113
配列番号161 は、軽鎖である。	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIK 107
配列番号162 ニボルマブ重鎖CDR1	NSGMH 5
配列番号163 ニボルマブ重鎖CDR2	VIWYDGSKRY YADSVKG 17
配列番号164 ニボルマブ重鎖CDR3	NDDY 4
配列番号165 ニボルマブ軽鎖CDR1	RASQSVSSYL A 11
配列番号166 ニボルマブ軽鎖CDR2	DASNRAT 7
配列番号167 ニボルマブ軽鎖CDR3	QQSSNWPRT 9

【２９７５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約３．５ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約４．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約５．５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約６．５ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約７．５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約８．５ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約９．５ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２９７６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約２００ｍｇ～約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約２００ｍｇ、約２２０ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２６０ｍｇ、約２８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３２０ｍｇ、約３４０ｍｇ、約３６０ｍｇ、約３８０ｍｇ、約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４４０ｍｇ、約４６０ｍｇ、約４８０ｍｇ、または約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２９７７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、または６週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２９７８】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、２週間毎に約３ｍｇ／ｋｇで、６週間毎に１ｍｇ／ｋｇのイピリムマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、３週間毎に約３６０ｍｇで、６週間毎に１ｍｇ／ｋｇのイピリムマブ及び２サイクルのプラチナダブレット化学療法とともに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇまたは４週間毎に４８０ｍｇ投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２９７９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブ（Ｍｅｒｃｋ＆Ｃｏ．，Ｉｎｃ（Ｋｅｎｉｌｗｏｒｔｈ，ＮＪ，ＵＳＡ）からＫＥＹＴＲＵＤＡとして市販されている）、またはそれらの抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントを含む。ペムブロリズマブには、ＣＡＳ登録番号１３７４８５３－９１－４が割り当てられており、ラムブロリズマブ、ＭＫ－３４７５、及びＳＣＨ－９００４７５としても知られている。ペムブロリズマブは、免疫グロブリンＧ４、抗（ヒトタンパク質ＰＤＣＤ１（プログラム細胞死１））（ヒト－ハツカネズミモノクローナル重鎖）、ヒト－ハツカネズミモノクローナル軽鎖、二量体構造を有するジスルフィドを有する。ペムブロリズマブの構造は、免疫グロブリンＧ４、抗（ヒトプログラム細胞死１）；ヒト化マウスモノクローナルκ軽鎖二量体（２２６－２２６’’：２２９－２２９’’）－ビスジスルフィドを有するヒト化マウスモノクローナル［２２８－Ｌ－プロリン（Ｈ１０－Ｓ＞Ｐ）］γ４重鎖（１３４－２１８’）

－ジスルフィドとしても記載され得る。ペムブロリズマブの特性、使用、及び調製は、国際特許公開第ＷＯ２００８／１５６７１２Ａ１号、米国特許第８，３５４，５０９号、ならびに米国特許出願公開第２０１０／０２６６６１７Ａ１号、同第２０１３／０１０８６５１Ａ１号、及び同第２０１３／０１０９８４３Ａ２に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。様々な形態のがんにおけるペムブロリズマブの臨床的安全性及び有効性は、Ｆｕｅｒｓｔ，Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　Ｔｉｍｅｓ，２０１４，３６，３５－３６、Ｒｏｂｅｒｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ，２０１４，３８４，１１０９－１７、及びＴｈｏｍａｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｅｘｐ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．，２０１４，１４，１０６１－１０６４に記載されている。ペムブロリズマブのアミノ酸配列を表１９に示す。ペムブロリズマブは、ジスルフィド架橋：２２－９６、２２’’－９６’’、２３’－９２’、２３’’’－９２’’’、１３４－２１８’、１３４’’－２１８’’’－１９８’、１３８’’’－１９８’’’、１４７－２０３、１４７’’－２０３’’、２２６－２６’’、２２９－２２９’’、２６１－３２１、２６１’’－３２１’’、３６７－４２５、及び３６７’’－４２５’’、ならびにグリコシル化部位（Ｎ）：Ａｓｎ－２９７及びＡｓｎ－２９７’’を含む。ペムブロリズマブは、Ｆｃ領域に安定化Ｓ２２８Ｐ変異を有するＩｇＧ４／カッパアイソタイプであり、この変異をＩｇＧ４ヒンジ領域に挿入すると、ＩｇＧ４抗体で典型的に観察される半分子の形成が防止される。ペムブロリズマブは、各重鎖のＦｃドメイン内のＡｓｎ２９７で不均一にグリコシル化されており、無傷の抗体の分子量はおよそ１４９ｋＤａになる。ペムブロリズマブの優性グリコフォームは、フコシル化アガラクト二分性グリカンフォーム（Ｇ０Ｆ）である。

【２９８０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、配列番号１６８によって与えられる重鎖及び配列番号１６９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２９８１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１７０に示される配列を含み、ＰＤ－１阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１７１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【２９８２】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号１７２、配列番号１７３、及び配列番号１７４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１７５、配列番号１７６、及び配列番号１７７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－１上の同じエピトープに結合する。
【２９８３】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－１抗体であり、抗ＰＤ－１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。抗ＰＤ－１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。
【２９８４】

【表２９－１】

表１９．ペムブロリズマブに関連するＰＤ－１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 168 ペムブロリズマブ重鎖	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 447
配列番号 169 ペムブロリズマブ軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC	60 120 180 218
配列番号 170 ペムブロリズマブ可変重鎖	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS	60 120
配列番号 171 ペムブロリズマブ可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号 172 ペムブロリズマブ重鎖 CDR1	NYYMY	5
配列番号 173 ペムブロリズマブ重鎖 CDR2	GINPSNGGTN FNEKFK	16
配列番号 174 ペムブロリズマブ重鎖 CDR3	RDYRFDMGFD Y	11
配列番号 175 ペムブロリズマブ軽鎖 CDR1	RASKGVSTSG YSYLH	15

【表２９－２】

配列番号 176 ペムブロリズマブ軽鎖 CDR2	LASYLES	7
配列番号 177 ペムブロリズマブ軽鎖 CDR3	QHSRDLPLT	9

【２９８５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約３．５ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約４．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約５．５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約６．５ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約７．５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／

ｋｇ、約８．５ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約９．５ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２９８６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約２００ｍｇ～約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約２００ｍｇ、約２２０ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２６０ｍｇ、約２８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３２０ｍｇ、約３４０ｍｇ、約３６０ｍｇ、約３８０ｍｇ、約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４４０ｍｇ、約４６０ｍｇ、約４８０ｍｇ、または約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２９８７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、または６週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２９８８】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＮＳＣＬＣを治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＮＳＣＬＣを治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＮＳＣＬＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２９８９】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、小細胞肺癌（ＳＣＬＣ）を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＳＣＬＣを治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＳＣＬＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開

始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２９９０】

いくつかの実施形態では、患者または対象が成人である場合、すなわち、成人適応症の治療、及び６週間毎の４００ｍｇの追加の投薬レジメンが用いられ得る。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２９９１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、抗ｍ－ＰＤ－１クローンＪ４３（カタログ番号ＢＥ００３３－２）及びＲＭＰ１－１４（カタログ番号ＢＥ０１４６）（ＢｉｏＸ　Ｃｅｌｌ，Ｉｎｃ．，Ｗｅｓｔ　Ｌｅｂａｎｏｎ，ＮＨ，ＵＳＡ）などの市販の抗ＰＤ－１モノクローナル抗体である。いくつかの市販の抗ＰＤ－１抗体が、当業者に知られている。

【２９９２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，３５４，５０９号または米国特許出願公開第２０１０／０２６６６１７　Ａ１号、同第２０１３／０１０８６５１Ａ１号、同第２０１３／０１０９８４３　Ａ２号に開示されている抗体であり、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，２８７，８５６号、同第８，５８０，２４７号、及び同第８，１６８，７５７号、ならびに米国特許出願公開第２００９／００２８８５７　Ａ１号、同第２０１０／０２８５０１３　Ａ１号、同第２０１３／００２２６００Ａ１号、及び同第２０１１／０００８３６９　Ａ１号に記載されている抗ＰＤ－１抗体であり、それらの教示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，７３５，５５３　Ｂ１号に開示されている抗ＰＤ－１抗体であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ＣＴ－０１１としても知られるピジリズマブであり、これは米国特許第８，６８６，１１９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【２９９３】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，９０７，０５３号、同第９，０９６，６４２号、及び同第９，０４４，４４２号、ならびに米国特許出願公開第２０１５／００８７５８１号に記載されるものなどの小分子またはペプチドもしくはペプチド誘導体；米国特許出願公開第２０１５／００７３０２４号に記載されるものなどの１，２，４－オキサジアゾール化合物及び誘導体；米国特許出願公開第２０１５／００７３０４２号に記載されるものなどの環状ペプチド模倣化合物及び誘導体；米国特許出願公開第２０１５／０１２５４９１号に記載されるものなどの環状化合物及び誘導体；国際特許出願公開第ＷＯ２０１５／０３３３０１号に記載されるものなどの１，３，４－オキサジアゾール及び１，３，４－チアジアゾール化合物ならびに誘導体；国際特許出願公開第ＷＯ２０１５／０３６９２７号及びＷＯ２０１５／０４４９０号に記載されるものなどのペプチド系化合物及び誘導体、または米国特許出願公開第２０１４／０２９４８９８号に記載されるものなどの大環状ペプチド系化合物及び誘導体であり得、各々の開示は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【２９９４】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬ及びＰＤ－Ｌ１阻害剤またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ＮＳＣＬＣの治療のための併用療法または共療法として投与される。
【２９９５】
いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、前療法を受けていない。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、フロントライン療法または初期療法として投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、本明細書に記載のＴＩＬと併用して、フロントライン療法または初期療法として投与される。
【２９９６】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、当該技術分野で知られている任意のＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２阻害剤、アンタゴニスト、または遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２阻害剤、アンタゴニスト、または遮断剤のうちの１つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、ＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２阻害剤に関して互換的に使用される。誤解を避けるために、抗体であるＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリアント、複合体、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。
【２９９７】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物、プロセス、及び方法は、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、小分子である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、抗体（すなわち、抗ＰＤ－１抗体）、Ｆａｂ断片を含むその断片、またはその一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２との結合について競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、ＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２との結合について競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２上のエピトープに結合する。
【２９９８】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＰＤ－Ｌ１阻害剤は、化合物が、ＰＤ－Ｌ２受容体を含む他の受容体と結合または相互作用するよりも実質的に低い濃度でＰＤ－Ｌ１と結合または相互作用するという点で、ＰＤ－Ｌ１に対して選択的である。ある特定の実施形態では、化合物は、ＰＤ－Ｌ２受容体に対するよりも少なくとも約２倍高い濃度、約３倍高い濃度、約５倍高い濃度、約１０倍高い濃度、約２０倍高い濃度、約３０倍高い濃度、約５０倍高い濃度、約１００倍高い濃度、約２００倍高い濃度、約３００倍高い濃度、または約５００倍高い濃度である結合定数でＰＤ－Ｌ１受容体に結合する。
【２９９９】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＰＤ－Ｌ２阻害剤は、化合物が、ＰＤ－Ｌ１受容体を含む他の受容体と結合または相互作用するよりも実質的に低い濃度でＰＤ－Ｌ２と結合または相互作用するという点で、ＰＤ－Ｌ２に対して選択的である。ある特定の実施形態では、化合物は、ＰＤ－Ｌ１受容体に対するよりも少なくとも約２倍高い濃度、約３倍高い濃度、約５倍高い濃度、約１０倍高い濃度、約２０倍高お濃度、約３０倍高い濃度、約５０倍高い濃度、約１００倍高い濃度、約２００倍高い濃度、約３００倍高い濃度、または約５００倍高い濃度である結合定数でＰＤ－Ｌ２受容体に結合する。
【３０００】
いかなる理論にも縛られることなく、腫瘍細胞はＰＤ－Ｌ１を発現し、Ｔ細胞はＰＤ－

１を発現すると考えられている。しかしながら、腫瘍細胞によるＰＤ－Ｌ１の発現は、ＰＤ－１またはＰＤ－Ｌ１の阻害剤または遮断剤の有効性には必要とされない。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、ＰＤ－Ｌ１を発現する。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、ＰＤ－Ｌ１を発現しない。いくつかの実施形態では、方法は、ＴＩＬと組み合わせて、本明細書に記載されるものなどのＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１抗体の組み合わせを含むことができる。ＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１抗体とＴＩＬとの組み合わせの投与は、同時または連続的であり得る。

【３００１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約１００ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約９０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約８０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約７０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約６０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約５０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約４０ｐＭ以下のK_Dで結合する、またはヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約３０ｐＭ以下のＫＤで結合するものである。

【３００２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約７．５×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約８×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約８．５×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約９×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約９．５×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、またはヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約１×$10^6$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合するものである。

【３００３】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ヒトＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２に約２×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．１×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．２×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．３×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．４×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．５×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．６×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ１に約２．７×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、またはヒトＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２に約３×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合するものである。

【３００４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、約１０ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約９ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約８ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約７ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約６ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約５ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約４ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約３ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約２ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＰＤ－１への

ヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、または約１ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断するものである。

【３００５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＭＥＤＩ４７３６としても知られるデュルバルマブ（これは、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ ｐｌｃ．の子会社であるＭｅｄｉｍｍｕｎｅ，ＬＬＣ（Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）から市販されている）、またはその抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許第８，７７９，１０８号または米国特許出願公開第２０１３／００３４５５９号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。デュルバルマブの臨床的有効性は、Ｐａｇｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．，２０１４，６５，１８５－２０２、Ｂｒａｈｍｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２０１４，３２，５ｓ（補足、要約８０２１）、及びＭｃＤｅｒｍｏｔｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ Ｒｅｖ．，２０１４，４０，１０５６－６４に記載されている。デュルバルマブの調製及び特性は、米国特許第８，７７９，１０８号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。デュルバルマブのアミノ酸配列を表２０に示す。デュルバルマブモノクローナル抗体は、２２－９６、２２’’－９６’’、２３’－８９’、２３’’’－８９’’’、１３５’－１９５’、１－１９５’’’、１４８－２０４、１４８’’－２０４’’、２１５’－２２４、２１５’’’－２４’’’、２３０－２３０’’、２３３－２３３’’、２６５－３２５、２６５’’－３２５’’、７１－４２９、及び３７１’’－４２９’におけるジスルフィド結合、ならびにＡｓｎ－３０１及びＡｓｎ－３０１’’におけるＮ－グリコシル化部位を含む。

【３００６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、配列番号１７８によって与えられる重鎖及び配列番号１７９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【３００７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、デュルバルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１８０に示される配列を含み、ＰＤ－Ｌ１阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１８１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列

番号１８１に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶ$_H$及びＶ$_L$領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶ$_H$及びＶ$_L$領域を含む。

【３００８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１８２、配列番号１８３、及び配列番号１８４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１８５、配列番号１８６、及び配列番号１８７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１上の同じエピトープに結合する。

【３００９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ペムブロリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－Ｌ１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－Ｌ１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－Ｌ１抗体であり、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。

【３０１０】

【表３０－１】

表２０．デュルバルマブに関連するＰＤ－Ｌ１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 178 デュルバルマブ重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEFEG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPASIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	60 120 180 240 300 360 420 451
配列番号 179 デュルバルマブ軽鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC	60 120 180 240 265
配列番号 180 デュルバルマブ可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS S	60 120 121
配列番号 181 デュルバルマブ可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIK	60 108
配列番号 182 デュルバルマブ重鎖 CDR1	RYWMS	5
配列番号 183 デュルバルマブ重鎖 CDR2	NIKQDGSEKY YVDSVKG	17
配列番号 184 デュルバルマブ重鎖 CDR3	EGGWFGELAF DY	12
配列番号 185 デュルバルマブ軽鎖 CDR1	RASQRVSSSY LA	12
配列番号 186 デュルバルマブ軽鎖 CDR2	DASSRAT	7

【表３０－２】

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 187 デュルバルマブ軽鎖 CDR3	QQYGSLPWT	9

【３０１１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＭＳＢ００１０７１８Ｃ（ＭｅｒｃｋＫＧａＡ／ＥＭＤ　Ｓｅｒｏｎｏから市販されている）としても知られるアベルマブ、またはその抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。アベルマブの調製及び特性は、米国特許出願公開第２０１４／０３４１９１７Ａ１号に記載されており、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。アベルマブのアミノ酸配列を表２１に示す。アベルマブは、２２－９６、１４７－２０３、２６４－３２４、３７０－４２８、２２’’－９６’’、１４７’’－２０３’’、２６４’’－３２４’’、及び３７０’’－４２８’’重鎖内ジスルフィド結合（Ｃ２３－Ｃ１０４）；２２’－９０’、１３８’－１９７’、２２’’’－９０’’’、及び１３８’’’－１９７’’’における軽鎖内ジスルフィド結合（Ｃ２３－Ｃ

０４）；２２３－２１５’及び２２３’’－２１５’’’における重鎖－軽鎖内ジスルフィド結合（ｈ５－ＣＬ１２６）；２２９－２２９’’及び２３２－２３２’’における重鎖－重鎖内ジスルフィド結合（ｈ１１、ｈ１４）；３００、３００’’におけるＮ－グリコシル化部位（Ｈ　ＣＨ$_2$　Ｎ８４．４）；フコシル化複合体二分性ＣＨＯ型グリカン；ならびに４５０及び４５０’におけるＨ　ＣＨＳ　Ｋ２　Ｃ末端リジンクリッピングを有する。

【３０１２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、配列番号１８８によって与えられる重鎖及び配列番号１８９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【３０１３】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アベルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤重鎖可変領域（ＶＨ）は、配列番号１９０に示される配列を含み、ＰＤ－Ｌ１阻害剤軽鎖可変領域（ＶＬ）は、配列番号１９１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【３０１４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１９２、配列番号１９３、及び配列番号１９４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１９５、配列番号１９６、及び配列番号１９７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１上の同じエピトープに結合する。

【３０１５】

いくつかの複合体実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アベルマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－Ｌ１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの複合体実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と

比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－Ｌ１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－Ｌ１抗体であり、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。

【３０１６】

【表３１】

表２１．アベルマブに関連するＰＤ－Ｌ１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 188 アベルマブ重鎖	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY	60
	ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS	120
	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS	180
	GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	240
	PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN	300
	STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE	360
	LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW	420
	QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	450
配列番号 189 アベルマブ軽鎖	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV	60
	SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL GQPKANPTVT	120
	LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNNKYAASS	180
	YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS	216
配列番号 190 アベルマブ可変重鎖	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY	60
	ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS	120
配列番号 191 アベルマブ可変軽鎖	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV	60
	SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL	110
配列番号 192 アベルマブ重鎖 CDR1	SYIMM	5
配列番号 193 アベルマブ重鎖 CDR2	SIYPSGGITF YADTVKG	17
配列番号 194 アベルマブ重鎖 CDR3	IKLGTVTTVD Y	11
配列番号 195 アベルマブ軽鎖 CDR1	TGTSSDVGGY NYVS	14
配列番号 196 アベルマブ軽鎖 CDR2	DVSNRPS	7
配列番号 197 アベルマブ軽鎖 CDR3	SSYTSSSTRV	10

【３０１７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＭＰＤＬ３２８０ＡまたはＲＧ７４４

６としても知られるアテゾリズマブ（Ｒｏｃｈｅ　Ｈｏｌｄｉｎｇ　ＡＧ（Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）の子会社であるＧｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．からＴＥＣＥＮＴＲＩＱとして市販されている）、またはその抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許第８，２１７，１４９号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許出願公開第２０１０／０２０３０５６Ａ１号、同第２０１３／００４５２００Ａ１号、同第２０１３／００４５２０１Ａ１号、同第２０１３／００４５２０２Ａ１号、または同第２０１４／００６５１３５Ａ１号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。アテゾリズマブの調製及び特性は、米国特許第８，２１７，１４９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。アテゾリズマブのアミノ酸配列を表２２に示す。アテゾリズマブは、２２－９６、１４５－２０１、２６２－３２２、３６８－４２６、２２’’－９６’’、１４５’’－２０１’’、２６２’’－３２２’’、及び３６８４２６’’における重鎖内ジスルフィド結合（Ｃ２３－Ｃ１０４）；２３’－８８’、１３４’－１９４’、２３’’’－８８’’’、及び１３４’’’－１９４’’’における軽鎖内ジスルフィ（Ｃ２３－Ｃ１０４）；２２１－２１４’及び２２１’’－２１４’’’における重鎖－軽鎖内ジスルフィド結合（ｈ５－ＣＬ１２６）；２２７－２２７’’及び２３０－２３０’’における重鎖－重鎖内ジスルフィド結合（ｈ１１、ｈ１４）；ならびに２９８及び２９８’におけるＮ－グリコシル化部位（Ｈ　ＣＨ$_2$　Ｎ８４．４＞Ａ）を有する。

【３０１８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、配列番号１９８によって与えられる重鎖及び配列番号１９９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【３０１９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アテゾリズマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号２００に示される配列を含み、ＰＤ－Ｌ１阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号２０１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【３０２０】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号２０２、配列番号２０３、及び配列番号２０４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２０５、配列番号２０６、及び配列番号２０７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１上の同じエピトープに結合する。
【３０２１】
いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、アテゾリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－Ｌ１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－Ｌ１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－Ｌ１抗体であり、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。
【３０２２】

【表３２】

表２２．アテゾリズマブに関連するＰＤ－Ｌ１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号198 アテゾリズマブ重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYAST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 448
配列番号199 アテゾリズマブ軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
配列番号200 アテゾリズマブ可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSA	60 118
配列番号201 アテゾリズマブ可変軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKR	60 108
配列番号202 アテゾリズマブ重鎖CDR1	GFTFSDSWIH	10
配列番号203 アテゾリズマブ重鎖CDR2	AWISPYGGST YYADSVKG	18
配列番号204 アテゾリズマブ重鎖CDR3	RHWPGGFDY	9
配列番号205 アテゾリズマブ軽鎖CDR1	RASQDVSTAV A	11
配列番号206 アテゾリズマブ軽鎖CDR2	SASFLYS	7
配列番号207 アテゾリズマブ軽鎖CDR3	QQYLYHPAT	9

【３０２３】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許出願公開第２０１４／０３４１９１７Ａ１号に記載されている抗体を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１への結合についてこれらの抗体のうちのいずれかと競合する抗体も含まれる。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、ＢＭＳ－９３５５５９としても知られるＭＤＸ－１１０５であり、これは米国特許第７，９４３，７４３号に開示されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第７，９４３，７４３号に開示されている抗ＰＤ－Ｌ１抗体から選択される。

【３０２４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＩＮＶＩＶＯＭＡＢ抗ｍ－ＰＤ－Ｌ１クローン１０Ｆ．９Ｇ２（カタログ番号ＢＥ０１０１、Ｂｉｏ　Ｘ　Ｃｅｌｌ，Ｉｎｃ．，Ｗｅｓｔ　Ｌｅｂａｎｏｎ，ＮＨ，ＵＳＡ）などの市販のモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、ＡＦＦＹＭＥＴＲＩＸ　ＥＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥ（ＭＩＨ１）などの市販のモノクローナル抗体である。いくつかの市販の抗ＰＤ－Ｌ１抗体が、当業者に知られている。

【３０２５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ＢＩＯＬＥＧＥＮＤ　２４Ｆ．１０Ｃ１２マウスＩｇＧ２ａ、κアイソタイプ（カタログ番号３２９６０２　Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、ＳＩＧＭＡ抗ＰＤ－Ｌ２抗体（カタログ番号ＳＡＢ３５００３９５，Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）、または当業者に知られている他の市販のＰＤ－Ｌ２抗体などの市販のモノクローナル抗体である。

【３０２６】

４．ＣＴＬＡ－４阻害剤との併用

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ及びＣＴＬＡ－４阻害剤は、ＮＳＣＬＣの治療のための併用療法または共療法として投与される。

【３０２７】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、前療法を受けていない。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、フロントライン療法または初期療法として投与される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、本明細書に記載のＴＩＬと併用して、フロントライン療法または初期療法として投与される。

【３０２８】

細胞傷害性Ｔリンパ球抗原４（ＣＴＬＡ－４）は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、ヘルパーＴ細胞の表面で発現する。ＣＴＬＡ－４は、ＣＤ２８依存性Ｔ細胞活性化の負の制御因子であり、適応免疫応答のチェックポイントとして機能する。Ｔ細胞共刺激タンパク質ＣＤ２８と同様に、ＣＴＬＡ－４結合抗原は、細胞上でＣＤ８０及びＣＤ８６を提示する。ＣＴＬＡ－４は抑制シグナルをＴ細胞に伝達し、ＣＤ２８は刺激シグナルを伝達する。ヒトＣＴＬＡ－４に対するヒト抗体は、ウイルス感染及び細菌感染を治療または予防すること、ならびにがんを治療するためのものなど、多くの疾患状態における免疫刺激調節因子として記載されている（ＷＯ０１／１４４２４及びＷＯ００／３７５０４）。様々な前臨床研究は、モノクローナル抗体などのＣＴＬＡ－４阻害剤によるＣＴＬＡ－４遮断が、免疫原性腫瘍に対する宿主免疫応答を増強し、確立された腫瘍を排除することさえ可能であることを示している。イピリムマブ（ＭＤＸ－０１０）及びトレメリムマブ（ＣＰ－６７５，２０６）を含むが、これらに限定されない、様々な種類の固形腫瘍の治療のためのいくつかの完全ヒト抗ヒトＣＴＬＡ－４モノクローナル抗体（ｍＡｂ）が、臨床試験で研究されている。

【３０２９】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、当技術分野で知られている任意のＣＴＬＡ－４阻害剤またはＣＴＬＡ－４遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるＣＴＬＡ－４阻害剤または遮断剤のうちの１つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、ＣＴＬＡ－４阻害剤に関して互換的に使用される。誤解を避けるために、抗体であるＣＴＬＡ－４阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリアント、複合体、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、ＣＴＬＡ－４阻害剤への本明細書での言及はまた、小分子化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【３０３０】

本発明の方法で使用するための好適なＣＴＬＡ－４阻害剤には、抗ＣＴＬＡ－４抗体、ヒト抗ＣＴＬＡ－４抗体、マウス抗ＣＴＬＡ－４抗体、哺乳動物抗ＣＴＬＡ－４抗体、ヒト化抗ＣＴＬＡ－４抗体、モノクローナル抗ＣＴＬＡ－４抗体、ポリクローナル抗ＣＴＬＡ－４抗体、キメラ抗ＣＴＬＡ－４抗体、ＭＤＸ－０１０（イピリムマブ）、トレメリムマブ、抗ＣＤ２８抗体、抗ＣＴＬＡ－４アドネクチン、抗ＣＴＬＡ－４ドメイン抗体、一本鎖抗ＣＴＬＡ－４断片、重鎖抗ＣＴＬＡ－４断片、軽鎖抗ＣＴＬＡ－４断片、共刺激経路を刺激するＣＴＬＡ－４の阻害剤、ＰＣＴ公開第ＷＯ２００１／０１４４２４号に開示される抗体、ＰＣＴ公開第ＷＯ２００４／０３５６０７号に開示される抗体、米国特許出願公開第２００５／０２０１９９４号に開示される抗体、ならびに付与された欧州特許第

ＥＰ　１２１２４２２　Ｂ１号に開示された抗体が含まれるが、これらに限定されず、各々の開示が参照により本明細書に組み込まれる。さらなるＣＴＬＡ－４抗体は、米国特許第５，８１１，０９７号、同第５，８５５，８８７号、同第６，０５１，２２７号、及び同第６，９８４，７２０号、ＰＣＴ公開第ＷＯ０１／１４４２４号及び同第ＷＯ００／３７５０４号、ならびに米国公開第２００２／００３９５８１号及び同第２００２／０８６０１４号に記載されており、各々の開示が参照により本明細書に組み込まれる。本発明の方法で使用することができる他の抗ＣＴＬＡ－４抗体には、例えば、ＷＯ９８／４２７５２、米国特許第６，６８２，７３６号及び同第６，２０７，１５６号、Ｈｕｒｗｉｔｚ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９５（１７）：１００６７－１００７１（１９９８）、Ｃａｍａｃｈｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２２（１４５）：Ａｂｓｔｒａｃｔ　Ｎｏ．２５０５（２００４）（抗体ＣＰ－６７５２０６）、Ｍｏｋｙｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，５８：５３０１－５３０４（１９９８）、ならびに米国特許第５，９７７，３１８号、同第６，６８２，７３６号、同第７，１０９，００３号、及び同第７，１３２，２８１号に開示されるものが含まれ、これらの各々の開示は、骨髄非破壊的リンパ枯渇レジメンを参照することにより本明細書に組み込まれる。

【３０３１】

さらなるＣＴＬＡ－４阻害剤には、ＣＤ２８抗原がその同族リガンドと結合する能力を妨害すること、ＣＴＬＡ－４がその同族リガンドと結合する能力を阻害すること、共刺激経路を介してＴ細胞応答を増強すること、Ｂ７がＣＤ２８及び／またはＣＴＬＡ－４と結合する能力を破壊すること、Ｂ７が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、ＣＤ８０がＣＤ２８及び／またはＣＴＬＡ－４と結合する能力を破壊すること、ＣＤ８０が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、ＣＤ８６がＣＤ２８及び／またはＣＴＬＡ－４と結合する能力を破壊すること、ＣＤ８６が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、及び共刺激経路を一般に活性化されることから破壊することが可能である任意の阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。これには、共刺激経路の他のメンバーのなかでもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４の小分子阻害剤、共刺激経路の他のメンバーのなかでもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４に対する抗体、共刺激経路の他のメンバーのなかでもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４に指向するアンチセンス分子、共刺激経路の他のメンバーのなかでもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４に指向するアドネクチン、他のＣＴＬＡ－４阻害剤のなかでも共刺激経路の他のメンバーのなかでもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４のＲＮＡｉ阻害剤（一本鎖及び二本鎖の両方）が必ず含まれる。

【３０３２】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、約10^{-6}Ｍ以下、約10^{-7}Ｍ以下、約10^{-8}Ｍ以下、約10^{-9}Ｍ以下、約10^{-10}Ｍ以下、約10^{-11}Ｍ以下、約10^{-12}Ｍ以下、例えば、約10^{-13}Ｍ～10^{-16}Ｍの間、またはエンドポイントとして前述の値のうちの任意の２つを有する任意の範囲内で、ＣＴＬＡ－４と結合する。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、同じアッセイを使用して比較した場合、イピリムマブのＫｄの１０倍以下のＫｄでＣＴＬＡ－４と結合する。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、同じアッセイを使用して比較した場合、イピリムマブとほぼ同じかまたはそれ以下（例えば、最大１０倍低いか、または最大１００倍低い）のＫｄでＣＴＬＡ－４と結合する。いくつかの実施形態では、ＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４結合のＣＴＬＡ－４阻害剤による阻害のＩＣ５０値は、同じアッセイを使用して比較した場合、それぞれＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４結合のイピリムマブ媒介阻害より１０倍以下で大きい。いくつかの実施形態では、ＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４結合のＣＴＬＡ－４阻害剤による阻害のＩＣ５０値は、同じアッセイを使用して比較した場合、それぞれＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４結合のイピリムマブ媒介性阻害とほぼ同じかまたはそれ以下（例えば、最大１０倍低い、または最大１００倍低い）である。

【３０３３】
いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、好適な対照と比較して、少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、または１００％、例えば、５０％～７５％、７５％～９０％、または９０％～１００％の間でＣＴＬＡ－４の発現を阻害する、及び／または生物学的活性を減少させるのに十分な量で使用される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４経路阻害剤は、好適な対照と比較して、少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、または１００％、例えば、５０％～７５％、７５％～９０％、または９０％～１００％の間でＣＴＬＡ－４のＣＤ８０、ＣＤ８６、またはその両方との結合を減少させることにより、ＣＴＬＡ－４の生物学的活性を減少させるのに十分な量で使用される。対象となる薬剤の効果を評価または定量化する状況下における好適な対照は、典型的には、対象となる薬剤、例えば、ＣＴＬＡ－４経路阻害剤に曝露されていないか、または治療されていない（または僅かな量に曝露されているか、または治療されている）同等の生物学的システム（例えば、細胞または対象）である。いくつかの実施形態では、生物学的システムは、それ自体の対照として機能し得る（例えば、生物学的システムは、薬剤への曝露または治療の前に評価され得、曝露または治療が開始または終了した後の状態と比較され得る。いくつかの実施形態では、歴史的対照が使用され得る。

【３０３４】
いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブ（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ　Ｃｏ．からＹｅｒｖｏｙとして市販されている）、またはそのバイオシミラー、抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。当該技術分野で知られているように、イピリムマブは、機能的ヒトレパートリーを生成するための重鎖及び軽鎖をコードするヒト遺伝子を有するトランスジェニックマウスに由来する完全ヒトＩｇＧ　１κ抗体である、抗ＣＴＬＡ－４抗体を指す。イピリムマブは、そのＣＡＳ登録番号４７７２０２－００－９及びＰＣＴ公開第ＷＯ０１／１４４２４号で参照することもでき、その全体がすべての目的で参照により本明細書に組み込まれる。それは抗体１０ＤＩとして開示されている。具体的には、イピリムマブは、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域（配列番号５１６を含む軽鎖可変領域を有し、配列番号５１５を含む重鎖可変領域を有する）を含む。ＣＴＬＡ－４と特異的に結合するヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部位を表す。イピリムマブの薬学的組成物は、イピリムマブ及び１つ以上の希釈剤、ビヒクル及び／または賦形剤を含有するすべての薬学的に許容される組成物を含む。イピリムマブを含有する薬学的組成物の例は、ＰＣＴ公開第ＷＯ２００７／６７９５９号に記載されている。イムピリムマブは、静脈内（ＩＶ）投与され得る。

【３０３５】
いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、配列番号２０８によって与えられる重鎖及び配列番号２０９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【３０３６】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブの重鎖及び軽鎖のＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号２１０に示される配列を含み、ＣＴＬＡ－４阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号２１１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【３０３７】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２１２、配列番号２１３、及び配列番号２１４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２１５、配列番号２１６、及び配列番号２１７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＣＴＬＡ－４上の同じエピトープに結合する。

【３０３８】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブに関して薬物規制当局によって承認されたＣＴＬＡ－４バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、抗ＣＴＬＡ－４抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。イピリムマブのアミノ酸配列を表２３に示す。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＣＴＬＡ－４抗体であり、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。抗ＣＴＬＡ－４抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。

【３０３９】

【表３３】

表２３．イピリムマブのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号208 イピリムマブ 重鎖	1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNNKYY 61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSSAS 121 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 181 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTH
配列番号209 イピリムマブ 軽鎖	1 EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 61 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP 121 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL 181 TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC
配列番号210 イピリムマブ 可変重鎖	1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNNKYY 61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSS
配列番号211 イピリムマブ 可変軽鎖	1 EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 61 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIK
配列番号212 イピリムマブ 重鎖 CDR1	GFTFSSYT 8
配列番号213 イピリムマブ 重鎖 CDR2	TFISYDGNNK 10
配列番号214 イピリムマブ 重鎖 CDR3	ARTGWLGPFD Y 11
配列番号215 イピリムマブ 軽鎖 CDR1	QSVGSSY 7
配列番号216 イピリムマブ 軽鎖 CDR2	GAF 3
配列番号217 イピリムマブ 軽鎖 CDR3	QQYGSSPWT 9

【３０４０】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約３．５ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約４．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約５．５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約６．５ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約７．５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約８．５ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約９．５ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【３０４１】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミ

ラーであり、イピリムマブは、約２００ｍｇ～約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約２００ｍｇ、約２２０ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２６０ｍｇ、約２８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３２０ｍｇ、約３４０ｍｇ、約３６０ｍｇ、約３８０ｍｇ、約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４４０ｍｇ、約４６０ｍｇ、約４８０ｍｇ、または約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【３０４２】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、または６週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【３０４３】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、６週間毎に約１ｍｇ／ｋｇで、２週間毎に３ｍｇ／ｋｇのニボルマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、６週間毎に約１ｍｇ／ｋｇで、３週間毎に３６０ｍｇのニボルマブ及び２サイクルのプラチナダブレット化学療法とともに投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【３０４４】

トレメリムマブ（ＣＰ－６７５，２０６としても知られる）は、完全ヒトＩｇＧ２モノクローナル抗体であり、ＣＡＳ番号７４５０１３－５９－６を有する。トレメリムマブは、米国特許第６，６８２，７３６号（参照により本明細書に組み込まれる）において、抗体１１．２．１として開示されている。トレメリムマブの重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を、それぞれ表２４に示す。トレメリムマブは、黒色腫及び乳癌を含む種々の腫瘍の治療のための臨床試験において研究されており、トレメリムマブは、０．０１及び１５ｍｇ／ｋｇの用量範囲で４週間または１２週間毎に単回用量または複数回用量として静脈内投与される。本発明によって提供されるレジメンでは、トレメリムマブは、局所的に、特に皮内または皮下に投与される。皮内または皮下投与されるトレメリムマブの有効量は、典型的には、人当たり５～２００ｍｇ／用量の範囲である。いくつかの実施形態では、トレメリムマブの有効量は、用量当たり人当たり１０～１５０ｍｇ／用量の範囲である。いくつかの特定の実施形態では、トレメリムマブの有効量は、人当たり約１０、２５、３７．５、４０、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５、または２００ｍｇ／用量である。

【３０４５】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、配列番号２１８によって与えられる重鎖及び配列番号２１９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【３０４６】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブの重鎖及び軽鎖のＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号２２０に示される配列を含み、ＣＴＬＡ－４阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号２２１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【３０４７】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２２２、配列番号２２３、及び配列番号２２４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２２５、配列番号２２６、及び配列番号２２７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＣＴＬＡ－４上の同じエピトープに結合する。

【３０４８】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＣＴＬＡ－４バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、抗ＣＴＬＡ－４抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。トレメリムマブのアミノ酸配列を表２４に示す。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＣＴＬＡ－４抗体であり、抗ＣＴＬＡ－

４抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。抗ＣＴＬＡ－４抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。

【３０４９】

【表３４】

表２４．トレメリムマブのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号218 トレメリムマブ重鎖	1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY 61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP RGATLYYYYY GMDVWGQGTT 121 VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA 181 VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVERKCCVE CPPCPAPPVA 241 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF 301 NSTFRVVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE 361 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 421 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K
配列番号219 トレメリムマブ軽鎖	1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIN SYLDWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS 61 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYSTPFTFGP GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 121 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 181 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
配列番号220 トレメリムマブ可変重鎖	1 GVVQPGRSLR LSCAASGFTF SSYGMHWVRQ APGKGLEWVA VIWYDGSNKY YADSVKGRFT 61 ISRDNSKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCARD PRGATLYYYY YGMDVWGQGT TVTVSSASTK 121 GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVH
配列番号221 トレメリムマブ可変軽鎖	1 PSSLSASVGD RVTITCRASQ SINSYLDWYQ QKPGKAPKLL IYAASSLQSG VPSRFSGSGS 61 GTDFTLTISS LQPEDFATYY CQQYYSTPFT FGPGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS 121 GTASVVCLLN NFYPREAKV
配列番号222 トレメリムマブ重鎖 CDR1	GFTFSSYGMH 10
配列番号223 トレメリムマブ重鎖 CDR2	VIWYDGSNKY YADSV 15
配列番号224 トレメリムマブ重鎖 CDR3	DPRGATLYYY YYGMDV 16
配列番号225 トレメリムマブ軽鎖 CDR1	RASQSINSYL D 11
配列番号226 トレメリムマブ軽鎖 CDR2	AASSLQS 7
配列番号227 トレメリムマブ軽鎖 CDR3	QQYYSTPFT 9

【３０５０】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約３．５ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約４．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約５．５ｍｇ／ｋｇ、約

６ｍｇ／ｋｇ、約６．５ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約７．５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約８．５ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約９．５ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。

【３０５１】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約２００ｍｇ～約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約２００ｍｇ、約２２０ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２６０ｍｇ、約２８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３２０ｍｇ、約３４０ｍｇ、約３６０ｍｇ、約３８０ｍｇ、約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４４０ｍｇ、約４６０ｍｇ、約４８０ｍｇ、または約５００ｍｇの用量で投与される。

【３０５２】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、または６週間毎に投与される。

【３０５３】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、Ａｇｅｎｕｓからのザリフレリマブ、またはそのバイオシミラー、抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。ザリフレリマブは、完全ヒトモノクローナル抗体である。ザリフレリマブには、Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ａｂｓｔｒａｃｔｓ Ｓｅｒｖｉｃｅ（ＣＡＳ）登録番号２１４８３２１－６９－９が割り当てられており、ＡＧＥＮ１８８４としても知られている。ザリフレリマブの調製及び特性は、米国特許第１０，１４４，７７９号及び米国特許出願公開第２０２０／００２４３５０　Ａ１号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【３０５４】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、配列番号２２８によって与えられる重鎖及び配列番号２２９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【３０５５】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ザリフレリマブの重鎖及び軽鎖のＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号２３０に示される配列を含み、ＣＴＬＡ－４阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号２３１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号

２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９７％同一であるＶ$_H$及びＶ$_L$領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶ$_H$及びＶ$_L$領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶ$_H$及びＶ$_L$領域を含む。

【３０５６】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２３１、配列番号２３３、及び配列番号２３４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２３５、配列番号２３６、及び配列番号２３７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＣＴＬＡ－４上の同じエピトープに結合する。

【３０５７】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ザリフレリマブに関して薬物規制当局によって承認されたＣＴＬＡ－４バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、抗ＣＴＬＡ－４抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。ザリフレリマブのアミノ酸配列を表２５に示す。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＣＴＬＡ－４抗体であり、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。抗ＣＴＬＡ－４抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。

【３０５８】

【表３５】

表２５．ザリフレリマブのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号228 ザリフレリマブ重鎖	1 EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 61 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSSAS 121 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 181 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS 241 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 301 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIERTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT 361 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 421 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
配列番号229 ザリフレリマブ軽鎖	1 EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKP GQAPRLLIYG ASTRATGIPD 61 RFSGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 121 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 181 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
配列番号230 ザリフレリマブ可変重鎖	1 EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 61 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSS
配列番号231 ザリフレリマブ可変軽鎖	1 EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKP GQAPRLLIYG ASTRATGIPD 61 RFSGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQ GTKVEIK
配列番号232 ザリフレリマブ重鎖CDR1	GFTFSSYS 8
配列番号233 ザリフレリマブ重鎖CDR2	ISSSSSYI 8
配列番号234 ザリフレリマブ重鎖CDR3	ARVGLMGPFD I 11
配列番号235 ザリフレリマブ軽鎖CDR1	QSVSRY 6
配列番号236 ザリフレリマブ軽鎖CDR2	GAS 3
配列番号237 ザリフレリマブ軽鎖CDR3	QQYGSSPWT 9

【３０５９】

さらなる抗ＣＴＬＡ－４抗体の例には、ＡＧＥＮ１１８１、ＢＭＳ－９８６２１８、ＢＣＤ－１４５、ＯＮＣ－３９２、ＣＳ１００２、ＲＥＧＮ４６５９、及びＡＤＧ１１６が含まれるが、これらに限定されず、これらは当業者に即知である。

【３０６０】

いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、以下の特許公開（参照により本明細書に組み込まれる）のうちのいずれかに開示される抗ＣＴＬＡ－４抗体である：ＵＳ２０１９／００４８０９６Ａ１、ＵＳ２０２０／０２２３９０７、ＵＳ２０１９／０２０１３３４、ＵＳ２０１９／０２０１３３４、ＵＳ２００５／０２０１９９４、ＥＰ１２１２４２２　Ｂ１、ＷＯ２０１８／２０４７６０、ＷＯ２０１８／２０４７６０、ＷＯ２００１０／１４４２４、ＷＯ２００４／０３５６０７、ＷＯ２００３／０８６４５９、ＷＯ２０１２／１２０１２５、ＷＯ２０００／０３７５０４、ＷＯ２００９／１００１４０、ＷＯ２００６／０９６４９、ＷＯ２００５／０９２３８０、ＷＯ２００７／１２３７３７、ＷＯ２００６／０２９２１９、ＷＯ２０１０／０９７９５９７、ＷＯ２００６／１２１６８、及びＷＯ１９９７／０２０５７４。さらなるＣＴＬＡ－４抗体は、米国特許第５，８１１，０９７号、同第５，８５５，８８７号、同第６，０５１，２２７号、及び同第６，９８４，７２０号、ＰＣＴ公開第ＷＯ０１／１４４２４号及び同第ＷＯ００／３７５０４号

、ならびに米国公開第２００２／００３９５８１号及び同第２００２／０８６０１４号、及び／または米国特許第５，９７７，３１８号、同第６，６８２，７３６号、同第７，１０９，００３号、及び同第７，１３２，２８１号に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、例えば、ＷＯ９８／４２７５２、米国特許第６，６８２，７３６号及び同第６，２０７，１５６号、Ｈｕｒｗｉｔｚ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９５（１７）：１００６７－１００７１（１９９８）、Ｃａｍａｃｈｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．，２２（１４５）：Ａｂｓｔｒａｃｔ Ｎｏ．２５０５（２００４）（抗体ＣＰ－６７５２０６）、Ｍｏｋｙｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，５８：５３０１－５３０４（１９９８）（参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるものである。

【３０６１】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ＷＯ１９９６／０４０９１５（参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるＣＴＬＡ－４リガンドである。

【３０６２】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ＣＴＬＡ－４発現の核酸阻害剤である。例えば、抗ＣＴＬＡ－４　ＲＮＡｉ分子は、ＰＣＴ公開第ＷＯ１９９９／０３２６１９及びＷＯ２００１／０２９０５８、米国公開第２００３／００５１２６３号、同第２００３／００５５０２０号、同第２００３／００５６２３５号、同第２００４／２６５８３９号、同第２００５／０１００９１３号、同第２００６／００２４７９８号、同第２００８／００５０３４２号、同第２００８／００８１３７３号、同第２００８／０２４８５７６号、同第２００８／０５５４４３号、及び／または米国特許第６，５０６，５５９号、同第７，２８２，５６４号、同第７，５３８，０９５号、及び同第７，５６０，４３８号（参照により本明細書に組み込まれる）においてＭｅｌｌｏ及びＦｉｒｅによって記載された分子の形態を取り得る。いくつかの事例では、抗ＣＴＬＡ－４　ＲＮＡｉ分子は、欧州特許第ＥＰ１３０９７２６号（参照により本明細書に組み込まれる）においてＴｕｓｃｈｌによって記載された二本鎖ＲＮＡｉ分子の形態を取る。いくつかの事例では、抗ＣＴＬＡ－４　ＲＮＡｉ分子は、米国特許第７，０５６，７０４号及び同第７，０７８，１９６号（参照により本明細書に組み込まれる）においてＴｕｓｃｈｌによって記載された二本鎖ＲＮＡｉ分子の形態を取る。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ＰＣＴ公開第ＷＯ２００４／０８１０２１号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されたアプタマーである。

【３０６３】

他の実施形態では、本発明の抗ＣＴＬＡ－４　ＲＮＡｉ分子は、米国特許第５，８９８，０３１号、同第６，１０７，０９４号、同第７，４３２，２４９号、及び同第７，４３２，２５０号、ならびに欧州出願第ＥＰ０９２８２９０号（参照により本明細書に組み込まれる）においてＣｒｏｏｋｅによって記載されたＲＮＡ分子である。

【３０６４】

５．ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤との組み合わせ

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ及びＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、ＮＳＣＬＣの治療のための併用療法または共療法として投与される。

【３０６５】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、前療法を受けていない。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、フロントライン療法または初期療法として投与される。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、本明細書に記載のＴＩＬと併用して、フロントライン療法または初期療法として投与される。

【３０６６】

ＶＥＧＦ－Ａ（それぞれ、配列番号１及び２に示されるポリヌクレオチド及びポリペプチド配列）は、ホルモン及び細胞外シグナル伝達分子のシスチンノットスーパーファミリーのＶＥＧＦ／ＰＤＧＦ（血小板由来成長因子）群に属する分泌されたジスルフィド結合

ホモ二量体糖タンパク質であり（Ｖｉｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．，１５：６８１－６９４，２００１を参照）を含み、これらはすべて、典型的なシスチンノット構造を形成する８つの保存されたシステイン残基（ジスルフィド結合によって連結される２つのシステインの二量体であるシスチンにちなんで名付けられる）の存在を特徴とする。異なるｍＲＮＡスプライスバリアントによってコードされる、１２１、１４５、１６５、１８９または２０６アミノ酸長の５つのヒトＶＥＧＦ－Ａアイソフォーム（ＶＥＧＦ－Ａ１２１～２０６）が記載されており、これらはすべて、内皮細胞における分裂形成を刺激することができる。これらのアイソフォームは、ＶＥＧＦ－Ａの低親和性受容体として振る舞う、細胞表面及び細胞外マトリックス関連ヘパラン－硫酸プロテオグリカンに対する生物学的活性、受容体特異性、及び親和性が異なる。ＶＥＧＦ－Ａ１２１は、ヘパリンまたはヘパラン－硫酸のいずれにも結合せず、ＶＥＧＦ－Ａ１４５及びＶＥＧＦ－Ａ１６５（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｍ３２９７７）の両方は、ヘパリンに結合することができ、ＶＥＧＦ－Ａ１８９及びＶＥＧＦ－Ａ２０６は、ヘパリン及びヘパラン－硫酸に対して最も強い親和性を示す。ＶＥＧＦ－Ａ１２１、ＶＥＧＦ－Ａ１４５、及びＶＥＧＦ－Ａ１６５は、可溶性形態で分泌されるが、ＶＥＧＦ－Ａ１６５の大部分は、細胞表面及び細胞外マトリックスプロテオグリカンに限定され、一方、ＶＥＧＦ－Ａ１８９及びＶＥＧＦ－Ａ２０６は、細胞外マトリックスと関連付けられたままである。ＶＥＧＦ－Ａ１８９及びＶＥＧＦ－Ａ２０６の両方は、ヘパリンまたはヘパリナーゼによる処理によって放出され得、これらのアイソフォームがプロテオグリカンを介して細胞外マトリックスに結合していることを示す。細胞結合型ＶＥＧＦ－Ａ１８０は、プラスミンなどのプロテアーゼによって切断することもでき、その結果、活性可溶性ＶＥＧＦ－Ａ１１０が放出される。

【３０６７】

ＶＥＧＦ－Ａ駆動型血管新生は、がん、眼疾患、及び関節リウマチを含む多様なヒト疾患の病因において主要な役割を有する。Ｃａｒｍｅｌｉｅｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　４０７：２４９－２５７，２０００を参照されたい。いくつかの重要なクラスのがんの発症に対するＶＥＧＦ－Ａの重要性の認識は、最近、転移性結腸直腸癌の治療のためのＶＥＧＦ－Ａに対するヒト化モノクローナル抗体であるＡＶＡＳＴＩＮ（商標）の承認に至った。Ｆｅｒｒａｒａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｄｒｕｇ　Ｄｉｓｃｏｖ．２００４，３：３９１－４００，２００４を参照されたい。同様に、新生血管性眼障害の病因におけるＶＥＧＦ－Ａの重要性は、新生血管（ｗｅｔ）加齢性黄斑変性症（ＡＭＤ）の治療のためのヒト化モノクローナル抗体断片であるＬＵＣＥＮＴＩＳ（商標）の最近の承認に反映される。

【３０６８】

本発明内で使用されるＶＥＧＦ－Ａ阻害剤には、ＶＥＧＦ－ＡまたはＶＥＧＦ－Ａ受容体に結合し、それによって、例えば、ＶＥＧＦＲ－１、ＶＥＧＦＲ－２、ニューロピリン－１、及び／またはニューロピリン－２などの受容体を発現する細胞上のＶＥＧＦ－Ａの活性を低下させる分子が含まれる。特に、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、抗ＶＥＧＦ－Ａ抗体を含む。他の好適なＶＥＧＦ－Ａ阻害剤としては、ＶＥＧＦＲ細胞外ドメインを含む可溶性ＶＥＧＦ－Ａ受容体、ならびにＶＥＧＦ－Ａとその受容体との相互作用を阻害することができるか、またはそうでなければ、ＶＥＧＦ－Ａ受容体を介したＶＥＧＦ－Ａ誘導細胞内シグナル伝達を阻害することができる小分子アンタゴニストが挙げられる。加えて、非抗体足場に基づく結合タンパク質を用いてもよい。（例えば、Ｋｏｉｄｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２８４：１１４１－１１５１，１９９８、Ｈｏｓｓｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉ．１５：１４－２７，２００６、及びそこでの参考文献を参照されたい）。本発明内で使用するための好ましいＶＥＧＦ－Ａ阻害剤としては、ＰＤＧＦＲβの結合部位も含む二重特異性抗体を含む、ＶＥＧＦ－Ａに特異的に結合する抗体が挙げられる。ＶＥＧＦ－Ａに特異的な抗体は、少なくとも可溶性分泌形態のＶＥＧＦ－Ａに結合し、好ましくは細胞表面関連形態にも結合する。

【３０６９】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、当該技術分野で知られている任意のＶＥＧＦ－Ａ阻害剤またはＶＥＧＦ－Ａ遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるＶＥＧＦ－Ａ阻害剤または遮断剤のうちの１つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤に関して互換的に使用される。誤解を避けるために、抗体であるＶＥＧＦ－Ａ阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリアント、複合体、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤への本明細書での言及はまた、小分子化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【３０７０】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、当該技術分野で知られている任意のＶＥＧＦ－Ａ阻害剤またはＶＥＧＦ－Ａ遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるＶＥＧＦ－Ａ阻害剤または遮断剤のうちの１つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤に関して互換的に使用される。誤解を避けるために、抗体であるＶＥＧＦ－Ａ阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリアント、複合体、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤への本明細書での言及はまた、小分子化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【３０７１】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、抗体（すなわち、抗ＶＥＧＦ－Ａ抗体）、Ｆａｂ断片を含むその断片、またはその一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、ポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、ＶＥＧＦ－Ａとの結合について競合する、及び／またはＶＥＧＦ－Ａ上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、ＶＥＧＦ－Ａとの結合について競合する、及び／またはＶＥＧＦ－Ａ上のエピトープに結合する。

【３０７２】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約１００ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約９０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約８０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約７０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約６０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約５０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約４０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約３０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約２０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約１０ｐＭ以下のK_Dで結合する、またはヒトＶＥＧＦ－Ａに約１ｐＭ以下のK_Dで結合するものである。

【３０７３】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約7.5×10^5ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約$7.5\times10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約$8\times10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約$8.5\times10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約$9\times10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約$9.5\times10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、またはヒトＶＥＧＦ－Ａに約$1\times10^6$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合するものである。

【３０７４】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約2×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約2.1×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約2.2×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約2.3×10^{-5}１／ｓ以下のk_{disso}

$_{c}$で結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約２．４×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約２．５×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約２．６×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、またはヒトＶＥＧＦ－Ａに約２．７×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約２．８×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＶＥＧＦ－Ａに約２．９×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、またはヒトＶＥＧＦ－Ａに約３×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合するものである。

【３０７５】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、約１０ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＶＥＧＦ－ＡへのヒトＶＥＧＦＲ－１受容体もしくはヒトＶＥＧＦＲ－２受容体の結合を遮断もしくは阻害し、約９ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＶＥＧＦ－ＡへのヒトＶＥＧＦＲ－１受容体もしくはヒトＶＥＧＦＲ－２受容体の結合を遮断もしくは阻害し、約８ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＶＥＧＦ－ＡへのヒトＶＥＧＦＲ－１受容体もしくはヒトＶＥＧＦＲ－２受容体の結合を遮断もしくは阻害し、約７ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＶＥＧＦ－ＡへのヒトＶＥＧＦＲ－１受容体もしくはヒトＶＥＧＦＲ－２受容体の結合を遮断もしくは阻害し、約６ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＶＥＧＦ－ＡへのヒトＶＥＧＦＲ－１受容体もしくはヒトＶＥＧＦＲ－２受容体の結合を遮断もしくは阻害し、約５ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトヒトＶＥＧＦ－ＡへのヒトＶＥＧＦＲ－１受容体もしくはヒトＶＥＧＦＲ－２受容体の結合を遮断もしくは阻害し、約４ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＶＥＧＦ－ＡへのヒトＶＥＧＦＲ－１受容体もしくはヒトＶＥＧＦＲ－２受容体の結合を遮断もしくは阻害し、約３ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＶＥＧＦ－ＡへのヒトＶＥＧＦＲ－１受容体もしくはヒトＶＥＧＦＲ－２受容体の結合を遮断もしくは阻害し、約２ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＶＥＧＦ－ＡへのヒトＶＥＧＦＲ－１受容体もしくはヒトＶＥＧＦＲ－２受容体の結合を遮断もしくは阻害し、または約１ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＶＥＧＦ－ＡへのヒトＶＥＧＦＲ－１受容体もしくはヒトＶＥＧＦＲ－２受容体の結合を遮断もしくは阻害するものである。

【３０７６】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、ベバシズマブ、またはそのバイオシミラー、抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。ベバシズマブ（ＣＡＳ登録番号２１６９７４－７５－３、ＡＶＡＳＴＩＮ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）は、がん治療に使用される血管内皮成長因子に対する抗ＶＥＧＦモノクローナル抗体（ＵＳ７２２７００４、ＵＳ６８８４８７９、ＵＳ７０６０２６９、ＵＳ７１６９９０１、ＵＳ７２９７３３４）であり、これは新生血管形成を遮断することによって腫瘍成長を阻害する。ベバシズマブは、米国で初の臨床的に入手可能な血管新生阻害剤である。転移性結腸癌及びほとんどの形態の転移性非小細胞肺癌の治療のための標準化学療法と組み合わせて、２００４年にＦＤＡによって承認された。以下の疾患：補助／非転移性結腸癌、転移性乳癌、転移性腎細胞癌、転移性多型神経膠芽腫新生物、転移性卵巣癌、転移性ホルモン不応性前立腺癌及び転移、転移性膵臓癌または切除不能な局所進行膵臓癌を有する患者におけるその安全性及び有効性を決定するために、いくつかの臨床後研究が進行中である。

【３０７７】

ベバシズマブは、ヒトＶＥＧＦのその受容体への結合を遮断する、マウス抗ｈＶＥＧＦモノクローナル抗体Ａ．４．６．１からの変異体ヒトＩｇＧ１フレームワーク領域及び抗原結合相補性決定領域を含む。ベバシズマブアミノ酸配列（ほとんどのフレームワーク領域を含む）の約９３％はヒトＩｇＧ１に由来し、配列の約７％はマウス抗体Ａ４．６．１に由来する。ベバシズマブは、約１４９，０００ダルトンの分子量を有し、グリコシル化される。ベバシズマブ及び他のヒト化抗ＶＥＧＦ抗体は、ＵＳ６８８４８７９にさらに記載されている。追加の抗ＶＥＧＦ抗体としては、国際特許公開第ＷＯ２００５／０１２３５９号の図２７～２９のいずれかに記載されるＧ６またはＢ２０シリーズ抗体（例えば、Ｇ６－３１、Ｂ２０－４．１）が挙げられる。一実施形態において、Ｂ２０シリーズ抗体は、残基Ｆ１７、Ｍ１８、Ｄ１９、Ｙ２１、Ｙ２５、Ｑ８９、Ｉ９１、Ｋ１０１、Ｅ１０

３、及びＣ１０４を含有するヒトＶＥＧＦ上の機能性エピトープに結合する。追加のＶＥＧＦ抗体は、国際特許公開第ＷＯ２０１０／１４８２２３号に記載されている。

【３０７８】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、配列番号２０７によって与えられる重鎖及び配列番号２０８によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、それぞれ、配列番号２０７及び配列番号２０８に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０７及び配列番号２０８に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０７及び配列番号２０８に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０７及び配列番号２０８に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０７及び配列番号２０８に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０７及び配列番号２０８に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【３０７９】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、ベバシズマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号２０９に示される配列を含み、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号２１０に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０９及び配列番号２１０に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０９及び配列番号２１０に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０９及び配列番号２１０に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０９及び配列番号２１０に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０９及び配列番号２１０に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【３０８０】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、それぞれ、配列番号２１１、配列番号２１２、及び配列番号２１３に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２１４、配列番号２１５、及び配列番号２１６に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＶＥＧＦ－Ａ上の同じエピトープに結合する。

【３０８１】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、ベバシズマブに関して薬物規制当局によって承認されたＶＥＧＦ－Ａバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、抗ＶＥＧＦ－Ａ抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ベバシズマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グ

リコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＶＥＧＦ－Ａ抗体であり、抗ＶＥＧＦ－Ａ抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ベバシズマブである。抗ＶＥＧＦ－Ａ抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ベバシズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ベバシズマブである。

【３０８２】

【表３６】

表２６．ベバシズマブのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号207 ベバシズマブ 重鎖	1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW INTYTGEPTY 61 AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP HYYGSSHWYF DVWGQGTLVT 121 VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL 181 QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL 241 LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE 301 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS 361 REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK 421 SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
配列番号208 ベバシズマブ 軽鎖	1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIYF TSSLHSGVPS 61 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 121 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 181 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
配列番号209 ベバシズマブ 可変重鎖	1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW INTYTGEPTY 61 AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP HYYGSSHWYF DVWGQGTLVT 121 VSS
配列番号210 ベバシズマブ 可変軽鎖	1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIYF TSSLHSGVPS 61 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKR
配列番号211 ベバシズマブ 重鎖CDR1	GYTFTNYGMN 10
配列番号212 ベバシズマブ 重鎖CDR2	WINTYTGEPT YAADFK 16
配列番号213 ベバシズマブ 重鎖CDR3	YPHYYGSSHW YFDV 14
配列番号214 ベバシズマブ 軽鎖CDR1	SASQDISNYL N 11
配列番号215 ベバシズマブ 軽鎖CDR2	FTSSLHS 7
配列番号216 ベバシズマブ 軽鎖CDR3	QQYSTVPWT 9

【３０８３】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、ラニビズマブ、またはそのバイオシミラー、抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。ラニビズマブ（ＣＡＳ登録番号３４７３９６－８２－１、Ｌｕｃｅｎｔｉｓ（登録商標））は、ベバシズマブと同じ

親マウス抗体から作製されるモノクローナル抗体断片（Ｆａｂ）である。加齢性黄斑変性症（ＡＭＤ、またＡＲＭＤ）、加齢性視力喪失の一般的な形態を治療するために承認されている抗血管新生剤である。その副作用の割合は、ベバシズマブのものと同様である。しかしながら、ラニビズマブは、典型的には１用量当たり２，０００ドルかかり、一方、同等用量のベバシズマブは、典型的には５０ドルかかる。

【３０８４】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、配列番号２１７によって与えられる重鎖及び配列番号２１８によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、それぞれ、配列番号２１７及び配列番号２１８に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１７及び配列番号２１８に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１７及び配列番号２１８に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１７及び配列番号２１８に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１７及び配列番号２１８に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１７及び配列番号２１８に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【３０８５】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、ラニビズマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号２１９に示される配列を含み、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号２２０に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１９及び配列番号２２０に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１９及び配列番号２２０に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１９及び配列番号２２０に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１９及び配列番号２２０に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１９及び配列番号２２０に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【３０８６】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、それぞれ、配列番号２２１、配列番号２２２、及び配列番号２２３に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２２４、配列番号２２５、及び配列番号２２６に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＶＥＧＦ－Ａ上の同じエピトープに結合する。

【３０８７】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、ラニビズマブに関して薬物規制当局によって承認されたＶＥＧＦ－Ａバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％

の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、抗ＶＥＧＦ－Ａ抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ラニビズマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＶＥＧＦ－Ａ抗体であり、抗ＶＥＧＦ－Ａ抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ラニビズマブである。抗ＶＥＧＦ－Ａ抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ラニビズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ラニビズマブである。

【３０８８】

【表３７】

表２７．ラニビズマブのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号217 ラニビズマブ 重鎖	1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYDFT HYGMNWVRQA PGKGLEWVGW INTYTGEPTY 61 AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP YYYGTSHWYF DVWGQGTLVT 121 VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL 181 QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH L
配列番号218 ラニビズマブ 軽鎖	1 DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIYF TSSLHSGVPS 61 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 121 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 181 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
配列番号219 ラニビズマブ 可変重鎖	1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYDFT HYGMNWVRQA PGKGLEWVGW INTYTGEPTY 61 AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP YYYGTSHWYF DVWGQGTLVT 121 VSS
配列番号220 ラニビズマブ 可変軽鎖	1 DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIYF TSSLHSGVPS 61 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKR
配列番号221 ラニビズマブ 重鎖 CDR1	GYDFTHYGMN 10
配列番号222 ラニビズマブ 重鎖 CDR2	WINTYTGEPT YAADFKR 17
配列番号223 ラニビズマブ 重鎖 CDR3	YPYYYGTSHW YFDV 14
配列番号224 ラニビズマブ 軽鎖 CDR1	SASQDISNYL N 11
配列番号225 ラニビズマブ 軽鎖 CDR2	FTSSLHS 7
配列番号226 ラニビズマブ 軽鎖 CDR3	QQYSTVPWT 9

【３０８９】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、イクルクマブ、またはそのバイオシミラー、抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。イクルクマブ（ＣＡＳ登録

番号１０２４６０３－９２－６、ＩＭＣ－１８Ｆ１としても知られる）は、固形腫瘍の治療のために設計されたヒトモノクローナル抗体である。潜在的な抗血管新生及び抗腫瘍活性を有するヒト血管内皮増殖因子受容体１（ＶＥＧＦＲ－１／ＦＬＴ－１）に対する完全ヒトＩｇＧ１モノクローナル抗体。イクルクマブは、下流のシグナル伝達経路の活性化を阻害し、腫瘍血管新生を阻害し得るＶＥＧＦＲ－１の活性に特異的に結合し、阻害し、腫瘍栄養供給のその後の低下は、腫瘍細胞の増殖を阻害し得る。ＶＥＧＦＲ－１の腫瘍細胞の過剰発現は、腫瘍血管新生及び腫瘍細胞の増殖及び浸潤と関連し得、ＶＥＧＦＲ－１は、ＶＥＧＦＲ－２シグナル伝達を調節し得る。

【３０９０】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、配列番号２２７によって与えられる重鎖及び配列番号２２８によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、それぞれ、配列番号２２７及び配列番号５６４に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２７及び配列番号２２８に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２７及び配列番号２２８に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２７及び配列番号２２８に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２７及び配列番号２２８に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２７及び配列番号２２８に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【３０９１】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、イクルクマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号２２９に示される配列を含み、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号２３０に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２９及び配列番号２３０に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２９及び配列番号２３０に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２９及び配列番号２３０に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２９及び配列番号２３０に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２９及び配列番号２３０に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【３０９２】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、それぞれ、配列番号２３１、配列番号２３２、及び配列番号２３３に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２３４、配列番号２３５、及び配列番号２３６に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＶＥＧＦ－Ａ上の同じエピトープに結合する。

【３０９３】

いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、イクルクマブに関して薬物規制当局

によって承認されたＶＥＧＦ－Ａバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、抗ＶＥＧＦ－Ａ抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、イクルクマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＶＥＧＦ－Ａ抗体であり、抗ＶＥＧＦ－Ａ抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、イクルクマブである。抗ＶＥＧＦ－Ａ抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、イクルクマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、イクルクマブである。

【３０９４】

【表３８】

表２８．イクルクマブのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 227 イクルクマブ重鎖	1 QAQVVESGGG VVQSGRSLRL SCAASGFAPS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY 61 ADSVRGRFTI SRDNSENTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDH YGSGVHHYFY YGLDVWGQGT 121 TVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP 181 AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK
配列番号 228 イクルクマブ軽鎖	1 EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP 61 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPLTFG GGTKVEIKRT VAAPSVFIFP 121 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL 181 TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC
配列番号 229 イクルクマブ可変重鎖	QAQWESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVRGRFTIS RDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHYGSGVHHYFYYGLDVWGQGTTVTVSS
配列番号 230 イクルクマブ可変軽鎖	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIK
配列番号 231 イクルクマブ重鎖 CDR1	VVQSGRS
配列番号 232 イクルクマブ重鎖 CDR2	SGFAFSSYG
配列番号 233 イクルクマブ重鎖 CDR3	WVAVIWYDGSNKYYADS
配列番号 234 イクルクマブ軽鎖 CDR1	LSPGERA
配列番号 235 イクルクマブ軽鎖 CDR2	QSV
配列番号 236 イクルクマブ軽鎖 CDR3	APRLLIYGAS

【３０９５】
いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、デコイＶＥＧＦ受容体（ＶＥＧＦトラップとしても知られる）、例えば、米国特許出願公開第２０１９／０２９８８０１号及び国際特許出願公開第ＷＯ２０１４／００６１１３Ａ１号（参照により本明細書に組み込まれる開示）に開示されるＡｆｌｉｂｅｒｃｅｐｔ（Ｅｙｌｅａ，Ｚａｌｔｒａｐ）または米国特許出願公開第２０１９／０００２５４６号及び同第２０１９／０３４３９１８号（参照により本明細書に組み込まれる開示）に開示されるＣｏｎｂｅｒｃｅｐｔである。デコイＶＥＧＦ受容体の追加の開示及び例は、米国特許第６，３８３，４８６号、同第６，３７５，９２９号、同第６，３４８，３３３号、同第６，１００，０７１号、及び同第９，７７７，２６１号に提供され、それらの開示は参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。
【３０９６】
いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、低分子チロシンキナーゼ阻害剤である。低分子チロシンキナーゼは、当業者に知られている。小分子チロシンキナーゼ阻害剤の例としては、ペガプタニブ、パゾパニブ、ラパチニブ、スニチニブ、ソラフェニブ、レゴラフェニブ、ポナチニブ、レンバチニブ、アキシチニブ（ＡＧ－０１３７３６）、セディラニブ（ＡＺＤ２１７１）、バタラニブ、及び／またはルシタニブが挙げられるが、これらに限定されない。
【３０９７】
いくつかの実施形態では、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤は、抗ＶＥＧＦＲリボザイム、抗ＶＥＧＦＲアンチセンス、ならびに米国特許第７，１４８，３４２号及び国際特許出願第ＷＯ２０１０／０５８４２６号（参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる開示）に開示されるＶＥＧＦＲを阻害するｓｉＲＮＡである。
【３０９８】
６．患者のリンパ球枯渇プレコンディショニング
いくつかの実施形態では、本発明は、ＴＩＬ集団でがんを治療する方法を含み、患者は、本開示によるＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的化学療法で前治療された患者のがんの治療に使用するためのＴＩＬ集団を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、注入による投与用である。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド６０ｍｇ／ｋｇ／日で２日間（ＴＩＬ注入の２７日前及び２６日前）、ならびにフルダラビン２５ｍｇ／ｍ^2／日で５日間（ＴＩＬ注入の２７日前～２３日前）である。いくつかの実施形態では、本開示による骨髄非破壊的化学療法及びＴＩＬ注入（０日目）後、患者は、生理学的許容範囲まで８時間毎に７２０，０００ＩＵ／ｋｇで静脈内的にＩＬ－２（ＰＲＯＬＥＵＫＩＮとして市販されている、アルデスロイキン）の静脈内注入を受ける。ある特定の実施形態では、ＴＩＬ集団は、ＩＬ－２と組み合わせてがんを治療する際に使用するためのものであり、ＩＬ－２は、ＴＩＬ集団の後に投与される。
【３０９９】
実験結果は、腫瘍特異的Ｔリンパ球の養子移入前のリンパ球枯渇が、制御性Ｔ細胞及び免疫系の競合要素（「サイトカインシンク」）を排除することによって治療有効性を増強する上で重要な役割を果たすことを示している。したがって、本発明のいくつかの実施形態は、本発明のＴＩＬを導入する前に、患者に対してリンパ球枯渇ステップ（「免疫抑制コンディショニング」と称されることもある）を利用する。
【３１００】
一般に、リンパ球枯渇は、フルダラビンまたはシクロホスファミド（マホスファミドと称される活性形態）及びそれらの組み合わせの投与を使用して達成される。かかる方法は、Ｇａｓｓｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１１，６０，７５－８５、Ｍｕｒａｎｓｋｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｌｉｎ．Ｐｒａｃｔ．Ｏｎｃｏｌ．，２００６，３，６６８－６８１、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００８，２６，５２３３－５２３９、及びＤｕｄｌ

ｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００５，２３，２３４６－２３５７に記載されており、これらはすべて、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【３１０１】

いくつかの実施形態では、フルダラビンは、０．５μｇ／ｍＬ～１０μｇ／ｍＬのフルダラビン濃度で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、１μｇ／ｍＬのフルダラビン濃度で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日以上投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、１０ｍｇ／ｋｇ／日、１５ｍｇ／ｋｇ／日、２０ｍｇ／ｋｇ／日、２５ｍｇ／ｋｇ／日、３０ｍｇ／ｋｇ／日、３５ｍｇ／ｋｇ／日、４０ｍｇ／ｋｇ／日、または４５ｍｇ／ｋｇ／日の投与量で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で２～７日間投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で４～５日間投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、２５ｍｇ／ｋｇ／日で４～５日間投与される。

【３１０２】

いくつかの実施形態では、シクロホスファミドの活性形態であるマホスファミドは、シクロホスファミドの投与により、０．５μｇ／ｍＬ～１０μｇ／ｍＬの濃度で取得される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドの活性形態であるマホスファミドは、シクロホスファミドの投与により、１μｇ／ｍＬの濃度で取得される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日以上投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、１００ｍｇ／ｍ^2／日、１５０ｍｇ／ｍ^2／日、１７５ｍｇ／ｍ^2／日、２００ｍｇ／ｍ^2／日、２２５ｍｇ／ｍ^2／日、２５０ｍｇ／ｍ^2／日、２７５ｍｇ／ｍ^2／日、または３００ｍｇ／ｍ^2／日の投与量で投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、静脈内（すなわち、ｉ．ｖ．）投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で２～７日間投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、２５０ｍｇ／ｍ^2／日で４～５日間ｉ．ｖ．投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、２５０ｍｇ／ｍ^2／日で４日間ｉ．ｖ．投与される。

【３１０３】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、患者にフルダラビンとシクロホスファミドを一緒に投与することによって行われる。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、２５ｍｇ／ｍ^2／日でｉ．ｖ．投与され、シクロホスファミドは、２５０ｍｇ／ｍ^2／日で４日間にわたってｉ．ｖ投与される。

【３１０４】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われる。

【３１０５】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【３１０６】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約５０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを約２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【３１０７】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約５０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを約２０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与する

ことによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【３１０８】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約４０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを約２０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【３１０９】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約４０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを約１５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【３１１０】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与することによって行われる。

【３１１１】

いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。いくつかの実施形態では、メスナは、１５ｍｇ／ｋｇで投与される。メスナが注入されるいくつかの実施形態では、連続的に注入される場合、メスナは、約２時間にわたってシクロホスファミドを注入することができ（－５日目及び／または－４日目）、次いで、各シクロホスファミド用量と同時に開始する２４時間にわたって残りの２２時間で３ｍｇ／ｋｇ／時間の速度で注入することができる。

【３１１２】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、第３のＴＩＬ集団を患者に投与した翌日から開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。

【３１１３】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、第３のＴＩＬ集団を患者に投与したのと同じ日に開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。

【３１１４】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、５日間のプレコンディショニング治療を含む。いくつかの実施形態では、該日は、－５日から－１日、または０日から４日として示される。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－４日目（すなわち、０日目及び１日目）にシクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－４日目（すなわち、０日目及び１日目）に静脈内シクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－４日目（すなわち、０日目及び１日目）に６０ｍｇ／ｋｇの静脈内シクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。いくつかの実施形態では、レジメンは、フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、静脈内フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、２５ｍｇ／ｍ^{2}の静脈内フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－１日目（すなわち、０～４日目）に２５ｍｇ／ｍ^{2}の静脈内フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－１日目（すなわち、０～４日目）に２５ｍｇ／ｍ^{2}の静脈内フルダラビンをさらに含む。

【３１１５】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与するステップを含む。

【３１１６】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミド

を６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与するステップを含む。

【３１１７】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む。

【３１１８】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む。

【３１１９】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で１日間投与するステップを含む。

【３１２０】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む。

【３１２１】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む。

【３１２２】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表２９に従って投与される。

【３１２３】

【表３９】

表２９．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 25mg/m^2/日	X	X	X	X	X					
TIL 注入						X				

【３１２４】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３０に従って投与される。

【３１２５】

【表４０】

表３０．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X							
メスナ(必要に応じて)	X	X							
フルダラビン 25mg/m^2/日	X	X	X	X					
TIL 注入					X				

【３１２６】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３１に従って投与

される。
【３１２７】
【表４１】

表３１．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X						
メスナ(必要に応じて)	X	X						
フルダラビン 25mg/m^2/日	X	X	X					
TIL 注入				X				

【３１２８】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３２に従って投与される。
【３１２９】
【表４２】

表３２．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 25mg/m^2/日			X	X	X					
TIL 注入						X				

【３１３０】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３３に従って投与される。
【３１３１】
【表４３】

表３３．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 30mg/m^2/日	X	X	X	X	X					
TIL 注入						X				

【３１３２】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３４に従って投与される。
【３１３３】
【表４４】

表３４．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X							
メスナ(必要に応じて)	X	X							
フルダラビン 30mg/m^2/日	X	X	X	X					
TIL 注入					X				

【３１３４】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３５に従って投与される。
【３１３５】
【表４５】

表３５．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X						
メスナ(必要に応じて)	X	X						
フルダラビン 30mg/m^2/日	X	X	X					
TIL 注入				X				

【３１３６】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３６に従って投与される。
【３１３７】
【表４６】

表３６．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 30mg/m^2/日			X	X	X					
TIL 注入						X				

【３１３８】
いくつかの実施形態では、骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンの前述の実施形態で使用されるＴＩＬ注入は、本明細書に記載の任意のＴＩＬ組成物であり得、また本明細書に記載されるようなＩＬ－２レジメンの追加及び併用療法（ＰＤ－１及び／またはＰＤ－Ｌ１阻害剤など）の投与であり得る。
【３１３９】
７．ＩＬ－２レジメン
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、高用量ＩＬ－２レジメンを含み、高用量ＩＬ－２レジメンは、治療的ＴＩＬ集団の治療有効分量を投与した翌日から静脈内投与されるアルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリアントを含み、アルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリアントは、許容範囲まで８時間毎に最大１４用量にわたって、０．０３７ｍｇ／ｋｇまたは０．０４４ｍｇ／ｋｇ　ＩＵ／ｋｇ（患者の体重）の用量で１５分のボーラス静脈内注入を使用して投与される。９日間の休止後、このスケジュールは、さらに１４用量、合計最大２８用量にわたって繰り返され得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、１、２、３、４、５、または６用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、最大６用量の最大投与量で投与される。
【３１４０】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、デクレッシェンドＩＬ－２レジメンを含む。デクレッシェンドＩＬ－２レジメンは、Ｏ’Ｄａｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．１９９９，１７，２７５２－６１、及びＥｔｏｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　２０００，８８，１７０３－９に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、デクレッシェンドＩＬ－２レジメンは、６時間にわたって静脈内投与される１８×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}アルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアント、続いて１２時間にわたって静脈内投与される１

８×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}、続いて２４時間にわたって静脈内投与される１８×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}、続いて７２時間かけて静脈内投与される４．５×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}を含む。この治療サイクルは、２８日毎に最大４サイクル繰り返され得る。いくつかの実施形態では、デクレッシェンドＩＬ－２レジメンは、１日目の１８，０００，０００ＩＵ／ｍ^{2}、２日目の９，０００，０００ＩＵ／ｍ^{2}、３日目及び４日目の４，５００，０００ＩＵ／ｍ^{2}を含む。

【３１４１】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、低用量ＩＬ－２レジメンを含む。Ｄｏｍｉｎｇｕｅｚ－Ｖｉｌｌａｒ ａｎｄ Ｈａｆｌｅｒ，Ｎａｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２０００，１９，６６５－６７３、Ｈａｒｔｅｍａｎｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．２０１３，１，２９５－３０５、及びＲｏｓｅｎｚｗａｉｇ，ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｈｅｕｍ．Ｄｉｓ．２０１９，７８，２０９－２１７（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている低用量ＩＬ－２レジメンを含む、当該技術分野で知られている任意の低用量ＩＬ－２レジメンを使用することができる。いくつかの実施形態では、低用量ＩＬ－２レジメンは、５日間の連続的注入として投与された、２４時間当たりｍ^{2}当たり１８×１０^{6}ＩＵのアルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリアント、その後ＩＬ－２療法なしで２～６日間、その後任意選択でアルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリアントを静脈内にさらに５日間、２４時間当たりｍ^{2}当たり１８×１０^{6}ＩＵの連続的注入として、その後任意選択でＩＬ－２療法なしで３週間を含み、その後、追加のサイクルが投与され得る。

【３１４２】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、最大６用量の最大投与量で投与される。いくつかの実施形態では、高用量ＩＬ－２レジメンは、小児の使用に適合される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に６００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に５００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に４００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に５００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に３００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に２００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に１００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。

【３１４３】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４、または２１日毎にペグ化ＩＬ－２を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４、または２１日毎に、ベンペガルデスロイキン、またはその断片、バリアント、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

【３１４４】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４、または２１日毎に、ＴＨＯＲ－７０７、またはその断片、バリアント、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

【３１４５】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、ＴＩＬの投与後に、ネムバロイキンアルファ、またはその断片、バリアント、もしくはバイオシミラーの投与を含む。ある特定の実施形態では、患者にネムバロイキンを１日、２日、４日、６日、７日、１４日または

２１日毎に、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で投与される。
【３１４６】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、抗体骨格に移植されたＩＬ－２断片の投与を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、ＩＬ－２低親和性受容体と結合する抗体－サイトカイン移植タンパク質の投与を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（V_H）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（V_L）と、V_HまたはV_LのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含み、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（V_H）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（V_L）と、V_HまたはV_LのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含み、ＩＬ－２分子は、ムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４または２１日毎に、配列番号２９及び配列番号３８からなる群から選択される重鎖と、配列番号３７及び配列番号３９からなる群から選択される軽鎖と、を含む抗体、またはその断片、バリアント、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。.
【３１４７】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質は、アルデスロイキン（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ（登録商標））または同等の分子などであるがこれらに限定されない野生型ＩＬ－２分子よりも長い血清半減期を有する。
【３１４８】
いくつかの実施形態では、骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンの前述の実施形態で使用されるＴＩＬ注入は、本明細書に記載の任意のＴＩＬ組成物であり得、また、ＴＩＬ注入の代わりにＭＩＬ及びＰＢＬの注入、ならびに本明細書に記載のＩＬ－２レジメンの追加及び併用療法（ＰＤ－１及び／またはＰＤ－Ｌ１阻害剤及び／またはＣＴＬＡ－４阻害剤など）の投与を含み得る。
【３１４９】
８．追加の治療方法
いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を投与することによって、ＮＳＣＬＣを治療する方法を提供し、対象または患者は、
ｉ．ＰＤ－Ｌ１＜１％の所定の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）、
ｉｉ．１％～４９％のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコア、または
ｉｉｉ．１つ以上のドライバー変異の所定の非存在のうちの少なくとも１つを有し、ドライバー変異は、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＥＧＦＲエクソン２０、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、ＲＥＴ融合、ＥＲＢＢ２変異、ＥＲＢＢ２増幅、ＢＲＣＡ変異、ＭＡＰ２Ｋ１変異、ＰＩＫ３ＣＡ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＰＴＥＮ変異、ＵＭＤ変異、ＮＲＡＳ変異、ＫＲＡＳ変異、ＮＦ１変異、ＭＥＴ変異、ＭＥＴスプライス及び／または変化したＭＥＴシグナル伝達、ＴＰ５３変異、ＣＲＥＢＢＰ変異、ＫＭＴ２Ｃ変異、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１変異、ＡＴＭ変異、ＳＥＴＤ２変異、ＦＬＴ３変異、ＰＴＰＮ１１変異、ＦＧＦＲ１変異、ＥＰ３００変異、ＭＹＣ変異、ＥＺＨ２変異、ＪＡＫ２変異、ＦＢＸＷ７変異、ＣＣＮＤ３変異、及びＧＮＡ１１変異からなる群から選択され、この方法は、
（ａ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１

の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生すること
と、
（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｆ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｇ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、
（ｈ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｇ）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。
【３１５０】
いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を投与することによって、ＮＳＣＬＣを治療する方法を提供し、この方法は、
（ａ）ＰＤ－Ｌ１のＰＤ－Ｌ１発現及び腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）について患者の腫瘍を試験することと、
（ｂ）１つ以上のドライバー変異の所定の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＥＧＦＲエクソン２０、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、ＲＥＴ融合、ＥＲＢＢ２変異、ＥＲＢＢ２増幅、ＢＲＣＡ変異、ＭＡＰ２Ｋ１変異、ＰＩＫ３ＣＡ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＰＴＥＮ変異、ＵＭＤ変異、ＮＲＡＳ変異、ＫＲＡＳ変異、ＮＦ１変異、ＭＥＴ変異、ＭＥＴスプライス及び／または変化したＭＥＴシグナル伝達、ＴＰ５３変異、ＣＲＥＢＢＰ変異、ＫＭＴ２Ｃ変異、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１変異、ＡＴＭ変異、ＳＥＴＤ２変異、ＦＬＴ３変異、ＰＴＰＮ１１変異、ＦＧＦＲ１変異、ＥＰ３００変異、ＭＹＣ変異、ＥＺＨ２変異、ＪＡＫ２変異、ＦＢＸＷ７変異、ＣＣＮＤ３変異、及びＧＮＡ１１変異からなる群から選択される、試験することと、
（ｃ）患者が、約１％～約４９％のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、
（ｄ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｅ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加することと、
（ｆ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を

提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｉ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、
（ｋ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｇ）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【３１５１】
いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を投与することによって、ＮＳＣＬＣを治療する方法を提供し、この方法は、
（ａ）ＰＤ－Ｌ１のＰＤ－Ｌ１発現及び腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）について患者の腫瘍を試験することと、
（ｂ）１つ以上のドライバー変異の所定の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＥＧＦＲエクソン２０、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、ＲＥＴ融合、ＥＲＢＢ２変異、ＥＲＢＢ２増幅、ＢＲＣＡ変異、ＭＡＰ２Ｋ１変異、ＰＩＫ３ＣＡ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＰＴＥＮ変異、ＵＭＤ変異、ＮＲＡＳ変異、ＫＲＡＳ変異、ＮＦ１変異、ＭＥＴ変異、ＭＥＴスプライス及び／または変化したＭＥＴシグナル伝達、ＴＰ５３変異、ＣＲＥＢＢＰ変異、ＫＭＴ２Ｃ変異、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１変異、ＡＴＭ変異、ＳＥＴＤ２変異、ＦＬＴ３変異、ＰＴＰＮ１１変異、ＦＧＦＲ１変異、ＥＰ３００変異、ＭＹＣ変異、ＥＺＨ２変異、ＪＡＫ２変異、ＦＢＸＷ７変異、ＣＣＮＤ３変異、及びＧＮＡ１１変異からなる群から選択される、試験することと、
（ｃ）患者が、約１％未満のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、
（ｄ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｅ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加することと、
（ｆ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｉ）ステップ（ｅ）から採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、
（ｋ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｇ）の注入バッグから対

象または患者に投与することと、を含む。
【３１５２】
いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を投与することによって、ＮＳＣＬＣを治療する方法を提供し、この方法は、
（ａ）ＰＤ－Ｌ１のＰＤ－Ｌ１発現及び腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）について患者の腫瘍を試験することと、
（ｂ）１つ以上のドライバー変異の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、またはＲＥＴ融合からなる群から選択される、試験することと、
（ｃ）患者が、約１％～約４９％のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、
（ｄ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｅ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加することと、
（ｆ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｉ）ステップ（ｅ）から採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、
（ｋ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｇ）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。
【３１５３】
いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を投与することによって、ＮＳＣＬＣを治療する方法を提供し、この方法は、
（ａ）ＰＤ－Ｌ１のＰＤ－Ｌ１発現及び腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）について患者の腫瘍を試験することと、
（ｂ）１つ以上のドライバー変異の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、またはＲＥＴ融合からなる群から選択される、試験することと、
（ｃ）患者が、約１％未満のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、
（ｄ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｅ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加することと、

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

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

（ｈ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、

（ｉ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

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

（ｋ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｇ）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【３１５４】

いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数が少なくとも５０倍多い。

【３１５５】

いくつかの実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【３１５６】

いくつかの実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【３１５７】

いくつかの実施形態では、本発明は、それぞれ、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団及び上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【３１５８】

いくつかの実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間のシクロホスファミドの投与に続いて、２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間のフルダラビンを投与するステップを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【３１５９】

いくつかの実施形態では、本発明は、対象にＴＩＬ細胞を投与した翌日に開始する、高用量のＩＬ－２レジメンで対象を治療するステップをさらに含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【３１６０】

いくつかの実施形態では、本発明は、高用量ＩＬ－２レジメンが、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される６００，０００または７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【３１６１】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんが固形腫瘍であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【３１６２】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭癌ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、または腎細胞癌であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【３１６３】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌、ＮＳＣＬＣ、膠芽腫（ＧＢＭを含む）、及び胃腸癌であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【３１６４】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんが黒色腫であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【３１６５】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんがＨＮＳＣＣであるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【３１６６】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんが子宮頸癌であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【３１６７】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんがＮＳＣＬＣであるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【３１６８】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんが膠芽腫（ＧＢＭを含む）であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【３１６９】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんが胃腸癌であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【３１７０】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんが高頻度変異癌であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【３１７１】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんが小児の高頻度変異癌であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【３１７２】

いくつかの実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法で使用するための、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【３１７３】

いくつかの実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法で使用するための、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。

【３１７４】

いくつかの実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団または上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組

成物を対象に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団または上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。

【３１７５】

いくつかの実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間のシクロホスファミドの投与に続いて、２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間のフルダラビンを投与するステップを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【３１７６】

いくつかの実施形態では、本発明は、ＴＩＬ細胞を患者に投与した翌日から開始する、高用量ＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【３１７７】

いくつかの実施形態では、本発明は、高用量ＩＬ－２レジメンが、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される６００，０００または７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【３１７８】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんが固形腫瘍であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【３１７９】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭癌ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、または腎細胞癌であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【３１８０】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌、ＮＳＣＬＣ、神経膠芽腫（ＧＢＭを含む）、及び胃腸癌であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【３１８１】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんが黒色腫であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【３１８２】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんがＨＮＳＣＣであるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【３１８３】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんが子宮頸癌であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【３１８４】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんがＮＳＣＬＣであるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【３１８５】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんが膠芽腫（ＧＢＭを含む）であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【３１８６】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんが胃腸癌であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【３１８７】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんが高頻度変異癌であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【３１８８】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんが小児の高頻度変異癌であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【３１８９】

いくつかの実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法における上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団の使用を提供する。

【３１９０】

いくつかの実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法における上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【３１９１】

いくつかの実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンを対象に投与すること、次いで治療上有効な投与量の、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団または上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を対象に投与することと、を含む、対象におけるがんを治療する方法における、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団または上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【実施例】

【３１９２】

本明細書に包含される実施形態は、これから以下の実施例を参照して説明される。これらの実施例は、例示のみを目的として提供されており、本明細書に包含される本開示は、決してこれらの実施例に限定されると解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書で提供される教示の結果として明らかになるありとあらゆる変形を包含すると解釈されるべきである。

【３１９３】

実施例１：ＲＥＰ前プロセス及びＲＥＰプロセス用の培地の調製

この実施例は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を含む様々な腫瘍タイプに由来する腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の培養を含むプロトコルで使用するための組織培養培地の調製手順を説明する。この培地を、本出願及び実施例に記載のＴＩＬのうちのいずれかの調製に使用することができる。

【３１９４】

ＣＭ１の調製

以下の試薬を冷蔵から取り出し、３７℃の水浴中で温めた。（ＲＰＭＩ１６４０、ヒトＡＢ血清、２００ｍＭ　Ｌ－グルタミン）。濾過される体積に適した０．２ｕｍフィルターユニットの上部に成分の各々を追加することによって、以下の表３７に従ってＣＭ１培地を調製した。４℃で保存する。

【３１９５】

【表４７】

表３７：ＣＭ１の調製

成分	最終濃度	最終体積 500ml	最終体積 IL
RPMI1640	NA	450ml	900m1
ヒト AB 血清、熱不活性化 10%	50ml	100ml	
200mM L-グルタミン	2mM	5ml	10m1
55mM BME	55μM	0.5ml	1ml
50mg/mL 硫酸ゲンタマイシン	50μg/mL	0.5ml	1ml

【３１９６】
使用日に、３７℃の水浴中で必要量のＣＭ１を事前に温め、６０００ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２を追加した。
【３１９７】
表３８に従って必要に応じた追加の補充。
【３１９８】
【表４８】

表３８：必要に応じたＣＭ１の追加の補充。

サプリメント	ストック濃度	希釈	最終濃度
GlutaMAX(商標)	200mM	1:100	2mM
ペニシリン/ストレプトマイシン	10,000U/mL ペニシリン 10,000μg/mL ストレプトマイシン	1:100	100U/mL ペニシリン 100μg/mL ストレプトマイシン
アンホテリシン B	250μg/mL	1:100	2.5μg/mL

【３１９９】
ＣＭ２の調製
調製したＣＭ１を冷蔵庫から取り出すか、または上記のセクション７．３に従って新鮮なＣＭ１を調製する。ＡＩＭ－Ｖ（登録商標）を冷蔵庫から取り出し、調製したＣＭ１を滅菌培地ボトル内で同等体積のＡＩＭ－Ｖ（登録商標）と混合することによって、必要な量のＣＭ２を調製した。使用日に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をＣＭ２培地に追加した。使用日に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む十分な量のＣＭ２を作製した。ＣＭ２培地ボトルにその名前、調製者のイニシャル、濾過／調製日、２週間の有効期限をラベル付けし、組織培養に必要になるまで４℃で保存した。
【３２００】
ＣＭ３の調製
使用が必要になった日にＣＭ３を調製した。ＣＭ３は、ＡＩＭ－Ｖ（登録商標）培地と同じであり、使用日に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した。ＩＬ－２ストック溶液をＡＩＭ－Ｖのボトルまたはバッグに直接追加することによって、実験のニーズに十分な量のＣＭ３を調製した。穏やかに振盪することによって十分に混合した。ボトルに、ＡＩＭ－Ｖに追加した直後に「３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２」とラベル付けする。過剰なＣＭ３が存在する場合は、培地名、調製者のイニシャル、培地を調製した日、及びその有効期限（調製後７日）でラベル付けしたボトル内で４℃で保管した。４℃で７日間保管した後、ＩＬ－２を補充した培地を廃棄した。
【３２０１】
ＣＭ４の調製
ＣＭ４は、ＣＭ３と同じであり、２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）（最終濃度）を追加で補充した。１ＬのＣＭ３毎に、１０ｍｌの２００ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）を追加した。ＩＬ－２ストック溶液及びＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）ストック溶液をＡＩＭ－

Ｖのボトルまたはバッグに直接追加することによって、実験のニーズに十分な量のＣＭ４を調製した。穏やかに振盪することによって十分に混合した。ボトルに、ＡＩＭ－Ｖに追加した直後に「３０００ＩＵ／ｎｉｌ　ＩＬ－２及びＧｌｕｔａＭＡＸ」とラベル付けした。過剰なＣＭ４が存在する場合、培地名、「ＧｌｕｔａＭＡＸ」、及びその有効期限（調製後７日）でラベル付けしたボトル内で４°Ｃで保管した。４℃で７日間保管した後、ＩＬ－２を補充した培地を廃棄した。

【３２０２】

実施例２：ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１サイトカインカクテルの使用

この実施例は、実施例Ａ～ＧのＴＩＬプロセスと組み合わせた、追加のＴ細胞成長因子として機能するＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１サイトカインの使用を説明する。

【３２０３】

本明細書に記載のプロセスを使用して、ＴＩＬは、培養の開始時に、実験の一方のアームにおいてＩＬ－２の存在下で非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）腫瘍から、及びもう一方のアームではＩＬ－２の代わりにＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の組み合わせから成長させることができる。ＲＥＰ前の完了時に、培養物を、拡張、表現型、機能（ＣＤ１０７ａ＋及びＩＦＮ－γ）、及びにＴＣＲ　Ｖβレパートリーについて評価した。ＩＬ－１５及びＩＬ－２１は、本明細書の他の場所に記載されており、Ｇｒｕｉｊｌらにおいて、ＩＬ－２１は、ＣＤ２７＋ＣＤ２８＋腫瘍浸潤リンパ球の拡張を促進し、細胞傷害能が高く、調節性Ｔ細胞の側副拡張が少ない、Ｓａｎｔｅｇｏｅｔｓ，Ｓ．Ｊ．，Ｊ　Ｔｒａｎｓｌ　Ｍｅｄ．，２０１３，１１：３７（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｐｍｃ／ａｒｔｉｃｌｅｓ／ＰＭＣ３６２６７９７／）。

【３２０４】

結果は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１処理条件での$CD4^+$及び$CD8^+$細胞の両方で、ＩＬ－２のみの条件と比較して増強したＴＩＬ拡張（＞２０％）が観察できることを示し得る。ＩＬ－２単独培養物と比較して、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１で処理した培養物から取得されたＴＩＬには、歪んだＴＣＲ　Ｖβレパートリーを伴う主に$CD8^+$集団への歪みがあった。ＩＦＮ－γ及びＣＤ１０７ａは、ＩＬ－２単独で処理したＴＩＬと比較して、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１で処理したＴＩＬで上昇した。

【３２０５】

実施例３：ガンマ線照射末梢単核細胞の個々のロットを適格性確認する

この実施例は、本明細書に記載の例示的な方法において同種異系フィーダー細胞として使用するためのガンマ線照射末梢単核細胞（ＰＢＭＣ、単核細胞またはＭＮＣとしても知られる）の個々のロットを適格性確認するための簡略化された手順を説明する。

【３２０６】

照射された各ＭＮＣフィーダーロットは、個々のドナーから調製した。各ロットまたはドナーは、精製された抗ＣＤ３（クローンＯＫＴ３）抗体及びインターロイキン－２（ＩＬ－２）の存在下でＲＥＰ内のＴＩＬを拡張する能力について個々にスクリーニングした。さらに、フィーダー細胞の各ロットを、ＴＩＬを添加せずに試験し、受けたガンマ線の線量がそれらを複製不全にするのに十分であることを確認した。

【３２０７】

ＴＩＬのＲＥＰには、ガンマ線を照射し、成長を停止させたＭＮＣフィーダー細胞が必要である。フィーダーＭＮＣの膜受容体は、抗ＣＤ３（クローンＯＫＴ３）抗体に結合し、ＲＥＰフラスコ内のＴＩＬに架橋し、ＴＩＬを刺激して拡張させる。フィーダーロットは、個々のドナーから採取した全血の白血球アフェレーシスから調製した。白血球アフェレーシス産物を、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ上で遠心分離し、洗浄し、照射し、ＧＭＰ条件下で凍結保存した。

【３２０８】

ＴＩＬ療法を受けた患者には、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）を引き起こす可能性があるため、生存可能なフィーダー細胞を注入しないことが重要である。したがって、フィーダ

ー細胞は、細胞にガンマ線を照射することによって成長を停止させ、再培養時に二本鎖ＤＮＡ切断が起こり、ＭＮＣ細胞の細胞生存性が喪失する。

【３２０９】

フィーダーロットを、２つの基準：１）共培養でＴＩＬを１００倍超拡張する能力、及び２）複製不全で評価した。

【３２１０】

フィーダーロットを、直立したＴ２５組織培養フラスコ内で培養された２つの主要なＲＥＰ前ＴＩＬ株を利用して、ｍｉｎｉ－ＲＥＰ形式で試験した。各ＴＩＬ株は、ＲＥＰでの活性化に応答して増殖する能力が独特であるため、フィーダーロットを、２つの異なるＴＩＬ株に対して試験した。対照として、上記の基準を満たすことが歴史的に示されている多くの照射されたＭＮＣフィーダー細胞を、試験ロットと並行して実行した。

【３２１１】

１回の実験で試験されたすべてのロットが同等の試験を受けることを保証するために、同じＲＥＰ前ＴＩＬ株の十分なストックがすべての条件及びすべてのフィーダーロットを試験するのに利用可能であった。

【３２１２】

試験したフィーダー細胞の各ロットに、合計６つのＴ２５フラスコがあった：ＲＥＰ前ＴＩＬ株＃１（２フラスコ）、ＲＥＰ前ＴＩＬ株＃２（２フラスコ）、及びフィーダー対照（２フラスコ）。ＴＩＬ株番号１及び番号２を含むフラスコは、フィーダーロットがＴＩＬを拡張する能力を評価した。フィーダー対照フラスコは、フィーダーロットの複製不全を評価した。

【３２１３】

Ａ．実験プロトコル

－２／３日目、ＴＩＬ株の解凍ＣＭ２培地を調製し、３７℃の水浴中で温める。３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した４０ｍＬのＣＭ２を調製する。使用まで保温する。ＩＬ－２を含まない２０ｍＬの予熱したＣＭ２を、使用したＴＩＬ株の名前がラベル付けされた２本の５０ｍＬコニカルチューブの各々に入れる。ＬＮ２ストレージから２つの指定されたＲＥＰ前ＴＩＬ株を取り出し、バイアルを組織培養室に移した。少量の氷が残るまで、３７℃の水浴内の密封されたジッパーストレージバッグ内にバイアルを入れて解凍した。

【３２１４】

無菌トランスファーピペットを使用して、各バイアルの内容物を、調製した、ラベル付けされた５０ｍＬのコニカルチューブ中の２０ｍＬのＣＭ２に直ちに移した。細胞を洗浄し、４００×ＣＦで５分間遠心分離するために、ＩＬ－２なしのＣＭ２を使用して４０ｍＬにＱＳ。上清を吸引し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補充された５ｍＬの温かいＣＭ２に再懸濁した。

【３２１５】

自動セルカウンターを使用して細胞を計数するために、少量のアリコート（２０μＬ）を重複して取り出した。計数を記録した。計数しながら、ＴＩＬ細胞を含む５０ｍＬのコニカルチューブを、加湿した３７℃、５％　CO_2インキュベーターに入れ、ガス交換を可能にするためにキャップを緩めた。細胞濃度を決定し、ＴＩＬを、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充したＣＭ２中で１×１０^{6}細胞／ｍＬに希釈した。

【３２１６】

ｍｉｎｉ－ＲＥＰの０日目まで、加湿した３７℃のインキュベーターで必要な数のウェルにおいて、２４ウェル組織培養プレートの１ウェル当たり２ｍＬで培養した。混乱及び潜在的な相互汚染を避けるために、別々の２４ウェル組織培養プレートで異なるＴＩＬ株を培養した。

【３２１７】

０日目、Ｍｉｎｉ－ＲＥＰを開始する試験されるフィーダーロットの数に十分なＣＭ２培地を調製した。（例えば、一度に４つのフィーダーロットを試験するために、８００ｍ

ＬのＣＭ２培地を調製した）。上記で調製されたＣＭ２の一部を分注し、それを細胞の培養のために３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した。（例えば、一度に４つのフィーダーロットを試験するために、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む５００ｍＬのＣＭ２培地を調製する）。

【３２１８】

相互汚染を防ぐために各ＴＩＬ株を別々に操作し、ＴＩＬ培養物を入れた２４ウェルプレートをインキュベーターから取り出し、ＢＳＣに移した。

【３２１９】

無菌トランスファーピペットまたは１００～１０００μＬピペッター及びチップを使用して、約１ｍＬの培地を、使用されるＴＩＬの各ウェルから取り出し、２４ウェル組織培養プレートの未使用のウェルに入れる。

【３２２０】

新鮮な無菌トランスファーピペットまたは１００～１０００μＬピペッター及びチップを使用して、残りの培地をウェル内のＴＩＬと混合して細胞を再懸濁し、次いで細胞懸濁液を、ＴＩＬロット名のラベルが付いた５０ｍＬコニカルチューブに移し、容量を記録した。

【３２２１】

予備の培地でウェルを洗浄し、その容量を同じ５０ｍＬコニカルチューブに移した。細胞を４００×ＣＦで回転させて、細胞ペレットを収集する。培地上清を吸引除去し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含有する２～５ｍＬのＣＭ２培地に細胞ペレットを再懸濁し（採取したウェルの数及びペレットのサイズに基づいて使用される容量）、容量は、1.3×10^{6}細胞／ｍＬを超える濃度を保証するのに十分である必要がある。

【３２２２】

血清学的ピペットを使用して、細胞懸濁液を十分に混合し、容量を記録した。自動セルカウンターを使用して細胞を計数するために、２００μＬを取り出した。計数しながら、ＴＩＬ細胞を含む５０ｍＬのコニカルチューブを、加湿した５％ CO_2、３７℃インキュベーターに入れ、ガス交換を可能にするためにキャップを緩めた。計数を記録した。

【３２２３】

ＴＩＬ細胞を含有する５０ｍＬのコニカルチューブをインキュベーターから取り出し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補充された温かいＣＭ２中、1.3×10^{6}細胞／ｍＬの濃度でそれらの細胞を再懸濁した。キャップを緩めた状態で、５０ｍＬのコニカルチューブをインキュベーターに戻した。

【３２２４】

第２のＴＩＬ株について、上記のステップを繰り返した。

【３２２５】

ＴＩＬを実験用のＴ２５フラスコに入れる直前に、ＴＩＬを、以下の通り１：１０に希釈して1.3×10^{5}細胞／ｍＬの最終濃度にした。

【３２２６】

ＭＡＣＳ　ＧＭＰ　ＣＤ３ピュア（ＯＫＴ３）作用溶液を調製するＯＫＴ３のストック溶液（１ｍｇ／ｍＬ）を４℃の冷蔵庫から取り出し、ＢＳＣに入れた。ｍｉｎｉ－ＲＥＰの培地では、最終濃度３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３を使用した。

【３２２７】

実験の各Ｔ２５フラスコ内の２０ｍＬに対して６００ｎｇのＯＫＴ３が必要であり、これは、２０ｍＬ毎に６０μＬの１０μｇ／ｍＬ溶液、または各フィーダーロットについて試験した６つのフラスコすべてで３６０μＬに相当する。

【３２２８】

試験した各フィーダーロットについて、４００μＬの１：１００希釈の１ｍｇ／ｍＬ　ＯＫＴ３を、１０μｇ／ｍＬの作業濃度で作製した（例えば、４つのフィーダーロットを一度に試験する場合、１６００μＬの１：１００希釈の１ｍｇ／ｍＬ　ＯＫＴ３：１６μＬの１ｍｇ／ｍＬ　ＯＫＴ３＋３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１．５８４ｍＬのＣ

Ｍ２培地を作製する）。
【３２２９】
Ｔ２５フラスコを調製するフィーダー細胞を調製する前に、各フラスコにラベルを付け、フラスコにＣＭ２培地を充填した。フラスコを３７℃の加湿した５％　CO_2インキュベーターに入れ、残りの成分を添加するのを待つ間、培地を保温した。一旦フィーダー細胞が調製されると、各フラスコ内のＣＭ２に成分が添加される。
【３２３０】
さらなる情報を表３９に提供する。
【３２３１】
【表４９】

表３９．溶液情報。

構成要素	共培養フラスコ内の容量	対照(フィーダーのみ)フラスコ内の容量
CM2+3000IU/mL IL-2	18mL	19mL
MNC:CM2+3000IU IL-2 中 1.3×10^7/mL (最終濃度 1.3×10^7/フラスコ)	1mL	1mL
OKT3: CM2 中 10μL/mL=3000IU IL-2	60μL	60μL
TIL:3000IU の IL-2 を含む CM2 中の 1.3×10^5/mL (最終濃度 1.3×10^5/フラスコ)	1mL	0

【３２３２】
フィーダー細胞を調製する。このプロトコルについて試験されたロット当たり７８×１０^{6}フィーダー細胞の最小値が必要であった。ＳＤＢＢによって凍結された各１ｍＬバイアルは、凍結時に１００×１０^{6}個の生細胞を有していた。液体N_2ストレージからの解凍時の５０％の回収率を仮定すると、ロット当たり少なくとも２つの１ｍＬバイアルのフィーダー細胞を解凍して、各ＲＥＰに推定１００×１０^{6}個の生細胞を与えることが推奨された。あるいは、１．８ｍＬバイアルで供給された場合、１つのバイアルだけで十分なフィーダー細胞が提供された。
【３２３３】
フィーダー細胞を解凍する前に、試験される各フィーダーロットにＩＬ－２を含まないおよそ５０ｍＬのＣＭ２を予熱した。指定されたフィーダーロットバイアルをＬＮ２ストレージから取り出し、ジッパーストレージバッグに入れ、氷上に置いた。３７℃の水浴に浸すことによって、閉じたジッパーストレージバッグ内のバイアルを解凍した。バイアルをジッパーバッグから取り出し、７０％　ＥｔＯＨでスプレーまたはワイプし、ＢＳＣに移した。
【３２３４】
トランスファーピペットを使用して、フィーダーバイアルの内容物を、５０ｍＬのコニカルチューブ中の３０ｍＬの温かいＣＭ２に直ちに移した。バイアルを少量のＣＭ２で洗浄して、バイアル内の残留細胞を除去し、４００×ＣＦで５分間遠心分離した。上清を吸引し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を加えた４ｍＬの温かいＣＭ２に再懸濁した。自動セルカウンターを使用して細胞を計数するために、２００μＬを取り出した。計数を記録した。
【３２３５】
３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を加えた温かいＣＭ２中、１．３×１０^{7}細胞／ｍＬで細胞を再懸濁した。ＴＩＬ細胞を１．３×１０^{6}細胞／ｍＬから１．３×１０^{5}細胞／ｍＬに希釈した。
【３２３６】

共培養物を準備する。ＴＩＬ細胞を１．３×１０^{6}細胞／ｍＬから１．３×１０^{5}細胞／ｍＬに希釈した。４．５ｍＬのＣＭ２培地を１５ｍＬのコニカルチューブに添加した。インキュベーターからＴＩＬ細胞を取り出し、１０ｍＬの血清ピペットを使用して十分に再懸濁した。１．３×１０^{6}細胞／ｍＬのＴＩＬ懸濁液から０．５ｍＬの細胞を取り出し、１５ｍＬのコニカルチューブ中の４．５ｍＬの培地に添加した。ＴＩＬストックバイアルをインキュベーターに戻した。よく混ぜた。第２のＴＩＬ株に対して繰り返した。

【３２３７】

単一フィーダーロット用に予熱した培地を入れたフラスコを、インキュベーターからＢＳＣに移した。１ｍＬのピペットチップで数回上下にピペッティングすることによってフィーダー細胞を混合し、そのフィーダーロットの各フラスコに１ｍＬ（１．３×１０^{7}細胞）を移した。６０μＬのＯＫＴ３作用ストック（１０μｇ／ｍＬ）を各フラスコに追加した。２つの対照フラスコをインキュベーターに戻した。

【３２３８】

各ＴＩＬロットの１ｍＬ（１．３×１０^{5}）を、対応するラベルの付いたＴ２５フラスコに移した。フラスコをインキュベーターに戻し、直立させてインキュベートした。５日目まで乱さなかった。試験したすべてのフィーダーロットについて、この手順を繰り返した。

【３２３９】

５日目、培地変更３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含むＣＭ２を調製した。各フラスコに１０ｍＬが必要である。１０ｍＬピペットを使用して、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１０ｍＬの温かいＣＭ２を各フラスコに移した。フラスコをインキュベーターに戻し、７日目まで直立させてインキュベートした。試験したすべてのフィーダーロットについて繰り返した。

【３２４０】

７日目、採取インキュベーターからフラスコを取り出し、ＢＳＣに移し、フラスコの底部の細胞層を乱さないように注意する。フラスコの底部で成長する細胞を乱すことなく、各試験フラスコから１０ｍＬの培地を取り出し、対照フラスコの各々から１５ｍＬの培地を取り出した。

【３２４１】

１０ｍＬの血清ピペットを使用して、残りの培地に細胞を再懸濁し、よく混合して細胞の塊をすべて破壊した。ピペッティングすることによって細胞懸濁液を完全に混合した後、細胞計数のために２００μＬを取り出した。自動セルカウンター装置とともに適切な標準操作手順を使用して、ＴＩＬを計数した。７日目に計数を記録した。試験したすべてのフィーダーロットについて、この手順を繰り返した。

【３２４２】

フィーダー対照フラスコは、複製不全について評価し、ＴＩＬを含むフラスコは、０日目からの倍率拡張について評価した。

【３２４３】

７日目、フィーダー対照フラスコの１４日目までの継続フィーダー対照フラスコの７日目の計数を完了した後、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５ｍＬの新鮮なＣＭ２培地を対照フラスコの各々に追加した。対照フラスコをインキュベーターに戻し、１４日目まで直立位置でインキュベートした。

【３２４４】

１４日目、フィーダー対照フラスコの長期非増殖インキュベーターからフラスコを取り出し、ＢＳＣに移し、フラスコの底部の細胞層を乱さないように注意した。フラスコの底部で成長する細胞を乱すことなく、各対照フラスコからおよそ１７ｍＬの培地を取り出した。５ｍＬの血清ピペットを使用して、残りの培地に細胞を再懸濁し、よく混合して細胞の塊をすべて破壊した。各フラスコについて、容量を記録した。

【３２４５】

ピペッティングすることによって細胞懸濁液を完全に混合した後、細胞計数のために２

００μＬを取り出した。ＴＩＬは、自動セルカウンター装置と併せて適切な標準操作手順を使用して計数し、計数を記録した。試験したすべてのフィーダーロットについて、この手順を繰り返した。

【３２４６】

Ｂ．結果及び承認基準プロトコル

結果ガンマ線照射の線量は、フィーダー細胞を複製不全にするのに十分であった。すべてのロットは、評価基準を満たすことが予想され、また０日目と比較して、ＲＥＰ培養の７日目に残っているフィーダー細胞の総有効数の低減を示した。すべてのフィーダーロットは、ＲＥＰ培養の７日目までのＴＩＬ成長の１００倍拡張の評価基準を満たすことが予想された。フィーダー対照フラスコの１４日目の計数は、７日目に見られた非増殖傾向を継続すると予想された。

【３２４７】

承認基準フィーダー細胞の各ロットについて試験された各複製ＴＩＬ株について、以下の承認基準が満たされた。承認基準は、以下の表４０に示すように、２倍であった。

【３２４８】

【表５０】

表４０．承認基準の実施形態。

試験	承認基準
MNC の照射及び複製不全	7 日目及び 14 日目に成長は観察されなかった
TIL 拡張	各 TIL の少なくとも 100 倍の拡張(最低 1.3×10^7 個の生細胞)

【３２４９】

３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養した場合に、ＭＮＣフィーダー細胞の複製を不全にするのに十分な放射線量を評価した。複製不全は、ＲＥＰの７日目及び１４日目の自動細胞計数によって決定された総生細胞数（ＴＶＣ）によって評価した。

【３２５０】

承認基準は、「成長なし」であり、これは、ＲＥＰの０日目に培養された最初の生細胞数から７日目及び１４日目に総生細胞数が増加していないことを意味する。

【３２５１】

フィーダー細胞がＴＩＬ拡張をサポートする能力を評価した。ＴＩＬ成長は、ＲＥＰの０日目の培養開始からＲＥＰの７日目までの生細胞の倍率拡張の観点から測定された。自動細胞計数によって評価されるように、７日目に、ＴＩＬ培養物は最低１００倍の拡張を達成した（すなわち、ＲＥＰの０日目に培養された生ＴＩＬ細胞の総数の１００倍超）。

【３２５２】

承認基準を満たさないＭＮＣフィーダーロットの偶発性試験ＭＮＣフィーダーロットが上で概説された承認基準のうちのいずれかを満たさなかった場合は、以下のステップを実行してロットを再試験し、単純な実験者エラーを原因として除外する。

【３２５３】

ロットの衛星試験バイアルが２つ以上残っている場合は、ロットを再試験した。ロットの衛星試験バイアルが１つ残っているか、まったく残っていない場合、上記の承認基準に従ってロットは失敗であった。

【３２５４】

適格となるには、問題のロット及び対照ロットが、上記の承認基準を達成する必要があった。これらの基準を満たすと、ロットは使用のために放出される。

【３２５５】

実施例４：ＩＬ－２ストック溶液（ＣＥＬＬＧＥＮＩＸ）の調製

この実施例は、精製されて凍結乾燥された組換えヒトインターロイキン－２を、ｒｈＩＬ－２の使用を含むものを含む、本出願及び実施例に記載されるものすべてを含む、さらなる組織培養プロトコルでの使用に好適なストック試料に溶解するプロセスを説明する。

【３２５６】

手順

０．２％酢酸溶液（ＨＡｃ）を調製した。２９ｍＬの滅菌水を、５０ｍＬのコニカルチューブに移した。５０ｍＬのコニカルチューブに１ｍＬの１Ｎ酢酸を追加した。チューブを２～３回反転させながら十分に混合した。Ｓｔｅｒｉｆｌｉｐフィルターを使用した濾過によってＨＡｃ溶液を滅菌した。

【３２５７】

ＰＢＳ中の１％　ＨＳＡを調製する。４ｍＬの２５％ＨＳＡストック溶液を、１５０ｍＬの滅菌フィルターユニット内の９６ｍＬのＰＢＳに追加した。溶液を濾過した。４℃で保管した。調製したｒｈＩＬ－２の各バイアルについて、フォームに記入する。

【３２５８】

ｒｈＩＬ－２ストック溶液を調製した（最終濃度６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）。ｒｈＩＬ－２の各ロットは異なり、必要な情報は、以下のような製造業者の分析証明書（ＣＯＡ）に見出された：１）バイアル当たりのｒｈＩＬ－２の質量（ｍｇ）、２）ｒｈＩＬ－２の比活性（ＩＵ／ｍｇ）、及び３）推奨０．２％　ＨＡｃ再構成体積（ｍＬ）。

【３２５９】

以下の等式を使用して、ｒｈＩＬ－２ロットに必要な１％ＨＳＡの体積を計算した。

【３２６０】

【数１】

$$\left(\frac{\text{バイアル質量（mg）}\times\text{生物活性}\left(\frac{IU}{mg}\right)}{6x10^{6}\,\frac{IU}{mL}}\right)-\text{HAc体積（mL）}=1\%\ \ \text{HSA体積（mL）}$$

【３２６１】

例えば、ＣｅｌｌＧｅｎｉｘのｒｈＩＬ－２ロット１０２００１２１　ＣＯＡによると、１ｍｇバイアルの比活性は、２５×１０^{6}ＩＵ／ｍｇである。ｒｈＩＬ－２を２ｍＬの０．２％ＨＡｃ中で再構成することが推奨される。

【３２６２】

【数２】

$$\left(\frac{1mg\ x\ 25x10^{6}\,\frac{IU}{mg}}{6x10^{6}\,\frac{IU}{mL}}\right)-2mL=2.167mL\ HSA$$

【３２６３】

ＩＬ－２バイアルのゴム栓をアルコールワイプで拭いた。３ｍＬシリンジに取り付けた１６Ｇ針を使用して、推奨体積の０．２％ＨＡｃをバイアルに注入した。針を抜くときに栓が外れないように注意した。バイアルを３回反転させ、すべての粉末が溶解するまで回転させた。栓を慎重に取り外し、アルコールワイプ上に置いた。計算された容量の１％ＨＳＡをバイアルに添加した。

【３２６４】

ｒｈＩＬ－２溶液の保管。短期保管（７２時間未満）の場合、４℃でバイアルを保管した。長期保管（７２時間超）の場合、バイアルをより小さい体積に等分し、使用の準備が整うまで－２０℃でクライオバイアル内で保管した。凍結／解凍サイクルを回避した。調

製日から６ヶ月後に有効期限が切れた。Ｒｈ－ＩＬ－２ラベルに、ベンダー及びカタログ番号、ロット番号、有効期限、オペレーターのイニシャル、濃度、ならびにアリコート体積を含めた。

【３２６５】

実施例５：凍結保存プロセス

この実施例では、ＣｒｙｏＭｅｄ制御速度冷凍庫、モデル７４５４（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、本明細書に記載の手順で調製したＴＩＬの凍結保存プロセス方法について説明する。

【３２６６】

使用した機器は以下の通りであった：アルミニウムカセットホルダーラック（ＣＳ７５０フリーザーバッグに対応）、７５０ｍＬバッグ用凍結保存カセット、低圧（２２ｐｓｉ）液体窒素タンク、冷蔵庫、熱電対センサー（バッグ用リボンタイプ）、及びＣｒｙｏＳｔｏｒｅ ＣＳ７５０冷凍バッグ（ＯｒｉＧｅｎ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。

【３２６７】

凍結プロセスは、核形成から－２０℃まで０．５℃の速度、及び－８０℃の終了温度まで毎分１℃の冷却速度を提供する。プログラムパラメータは、以下の通りである：ステップ１－４℃で待つ、ステップ２：－４℃まで１．０℃／分（試料温度）、ステップ３：－４５℃まで２０．０℃／分（チャンバ温度）、ステップ４：－１０．０℃まで１０．０℃／分（チャンバー温度）、ステップ５：－２０℃まで０．５℃／分（チャンバー温度）、及びステップ６：－８０℃まで１．０℃／分（試料温度）。

【３２６８】

実施例６：合成培地を用いた腫瘍拡張プロセス

上記で開示されるプロセスは、ＣＭ１培地及びＣＭ２培地を、合成培地（例えば、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、例えば、ＤＭ１及びＤＭ２を含む）で置き換えることによって行われ得る。

【３２６９】

実施例７：抗ＰＤ－１抗体によるＮＳＣＬＣ治療

患者集団：

治療ナイーブのＮＳＣＬＣまたは化学療法後であるが抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブ

【３２７０】

治療スケジュール：

腫瘍断片は、最大４用量の抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１で治療し、原発性不応性の患者を、凍結保存され、即時進行の際に使用する準備ができているＴＩＬ製品で治療する。原発性不応性の患者は、２用量後に進行した可能性がある。

【３２７１】

再発患者はまた、進行時に治療することもできる（タイミングは、数ヶ月から数年後まで異なる場合がある）。

【３２７２】

最大６用量の全強ＩＬ－２。

【３２７３】

前述の同じ製造順列でさらに検討する患者集団：

●治療ナイーブのＮＳＣＬＣ、または化学療法後であるが抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブ

●治療ナイーブのＮＳＣＬＣ、または化学療法後であるが、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブ

●治療ナイーブのＮＳＣＬＣ、または化学療法後であるが、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する、及び／またはベースラインで巨大腫瘤病変を有する抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブ。（例えば、横断面または冠状面のいずれかで測定された最大腫瘍径が７ｃｍを超えるか、またはＣＴで短軸径が２０ｍｍ以上の膨れたリンパ節が巨大腫瘤として定義された場

合、巨大腫瘤病変が示される。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Ｓａｍｅｊｉｍａ，Ｊ．，Ｊａｐａｎｅｓｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，４５（１１）：１０５０－１０５４１ ２０１５を参照）。

【３２７４】

実施例８：凍結保存ＴＩＬ細胞療法の例示的ＧＥＮ２産生

この実施例は、Ｉｏｖａｎｃｅ Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．のｃＧＭＰ製造を説明する。現在の適正組織基準及び現在の適正製造基準に従った、Ｇ－ＲＥＸフラスコ内のＴＩＬ細胞療法プロセス。この実施例は、現在の適正組織基準及び現在の適正製造基準に従った、Ｇ－ＲＥＸフラスコ内のＴＩＬ細胞療法プロセスの例示的なｃＧＭＰ製造を説明する。

【３２７５】

【表５１】

表４１．プロセス拡張の例示的な計画

推定日(播種後)	活性	標的基準	予想される容器	推定総体積(mL)
0	腫瘍解剖	G-REX-100MCS 当たり≦50 個の望ましい腫瘍断片	G-REX-100MCS 1 フラスコ	≦1000
11	REP 播種	G-REX-500MCS 当たり 5~200×10^6 個の生細胞	G-REX-500MCS 1 フラスコ	≦5000
16	REP 分割	G-REX-500MCS 当たり 1×10^9 個の生細胞	G-REX-500MCS≦5 フラスコ	≦25000
22	採取	全利用可能な細胞	3~4 つの CS-750 バッグ	≦530

【３２７６】

【表５２】

表４２．フラスコ容積。

フラスコタイプ	作業体積/フラスコ(mL)
G-REX-100MCS	1000
G-REX-500MCS	5000

【３２７７】

０日目のＣＭ１培地の調製ＢＳＣ内で、試薬をＲＰＭＩ １６４０培地ボトルに追加した。ボトル当たり追加された以下の試薬を追加した：不活化ヒトＡＢ血清（１００．０ｍＬ）、ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）（１０．０ｍＬ）、硫酸ゲンタマイシン、５０ｍｇ／ｍＬ（１．０ｍＬ）、２－メルカプトエタノール（１．０ｍＬ）を加熱する

【３２７８】

ＢＳＣから不要な材料を取り出した。ＢＳＣから培地試薬を抜き取り、配合された洗浄培地の調製のために硫酸ゲンタマイシン及びＨＢＳＳをＢＳＣの中に残した。

【３２７９】

ＩＬ－２アリコートを解凍した。すべての氷が融解するまで、１つの１．１ｍＬのＩＬ－２アリコート（６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）（ＢＲ７１４２４）を解凍した。ＩＬ－２：ロット番号及び有効期限を記録した。

【３２８０】

ＩＬ－２ストック溶液を培地に移した。ＢＳＣ内で、１．０ｍＬのＩＬ－２ストック溶液を、調製されたＣＭ１の０日目培地ボトルに移した。ＣＭ１の０日目培地１ボトル及びＩＬ－２（６×１０６ＩＵ／ｍＬ）１．０ｍＬを追加した。

【３２８１】

Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳをＢＳＣの中に通過させた。無菌的にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ（Ｗ３０１３１３０）をＢＳＣの中に通過させた。

【３２８２】
すべての完全なＣＭ１の０日目培地をＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコにポンプで注入した。組織断片円錐形またはＧＲｅｘ１００ＭＣＳ。
【３２８３】
０日目の腫瘍洗浄培地の調製ＢＳＣ内で、５．０ｍＬのゲンタマイシン（Ｗ３００９８３２またはＷ３０１２７３５）を１本の５００ｍＬのＨＢＳＳ培地（Ｗ３０１３１２８）ボトルに追加した。ボトル当たりの追加：ＨＢＳＳ（５００．０ｍＬ）、硫酸ゲンタマイシン、５０ｍｇ／ｍＬ（５．０ｍＬ）。１Ｌの０．２２ミクロンフィルターユニット（Ｗ１２１８８１０）をとおして調製されたゲンタマイシンを含有するＨＢＳＳを濾過した。
【３２８４】
０日目の腫瘍処理腫瘍検体を取得し、即時に処理のために２～８℃における部屋に移した。腫瘍洗浄培地を等分した。腫瘍洗浄１は、８インチ鉗子（Ｗ３００９７７１）を使用して行う。腫瘍を検体ボトルから取り出し、調製した「洗浄１」皿に移す。この後、腫瘍洗浄２及び腫瘍洗浄３が続く。腫瘍を測定し、評価した。腫瘍領域全体の３０％未満が壊死及び／または脂肪組織であることが観察されたかどうかを評価した。該当する場合、クリーンアップ解剖を行う。腫瘍が大きく、外部の組織の３０％未満が壊死／脂肪性であることが観察された場合、メス及び／または鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍の内側構造を温存しながら壊死／脂肪組織を除去することによって、「クリーンアップ解剖」を行った。腫瘍を切除した。メス及び／または鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍検体を均等で適切なサイズの断片（最大６つの中間断片）に切断した。中間腫瘍断片を移した。腫瘍断片を、およそ３×３×３ｍｍのサイズの小片に切除した。乾燥を防止するために中間断片を保存した。中間断片の解剖を繰り返した。収集された切片の数を決定した。望ましい組織が残っている場合、「好ましい中間断片」６ウェルプレートから追加の好ましい腫瘍片を選択し、最大５０片のために液滴を充填した。
【３２８５】
コニカルチューブを準備した。腫瘍片を５０ｍＬのコニカルチューブに移した。Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳのためのＢＳＣを準備した。インキュベーターからＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳを取り出した。無菌的にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコをＢＳＣの中に通過させた。腫瘍断片をＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコに追加した。切片を均等に分配した。
【３２８６】
以下のパラメータにおいてＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳをインキュベートした：Ｇ－ＲＥＸフラスコをインキュベートした：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５％CO_2。計算：培養の時間、下限＝培養の時間＋２５２時間、上限＝培養の時間＋２７６時間。
【３２８７】
プロセスが完了した後、いずれの残りの温められた培地も廃棄し、ＩＬ－２のアリコートを解凍した。
【３２８８】
１１日目－培地の調製インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、ＣＯ２パーセンテージ：５．０±１．５％ＣＯ２。
【３２８９】
３本の１０００ｍＬのＲＰＭＩ　１６４０培地（Ｗ３０１３１１２）ボトル及び３本の１０００ｍＬのＡＩＭ－Ｖ（Ｗ３００９５０１）ボトルを、インキュベーター内で３０分間以上温めた。インキュベーターからＲＰＭＩ　１６４０培地を取り出した。ＲＰＭＩ　１６４０培地を調製した。培地を濾過した。３つのＩＬ－２の１．１ｍＬのアリコート（６×１０６ＩＵ／ｍＬ）（ＢＲ７１４２４）を解凍した。インキュベーターからＡＩＭ－Ｖ培地を取り出した。ＩＬ－２をＡＩＭ－Ｖに追加した。１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグ及びリピータポンプ移送セットを、ＢＳＣの中に無菌的に移した。
【３２９０】

１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒ培地バッグを準備した。Ｂａｘａポンプを準備した。１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒ培地バッグを準備した。培地を１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒにポンプで注入した。Ｌａｂｔａｉｎｅｒバッグからポンプマティックを取り出した。

【３２９１】

培地を混合した。バッグを穏やかにマッサージして混合した。試料計画に従って培地を試料採取した。２０．０ｍＬの培地を取り出し、５０ｍＬのコニカルチューブに入れた。細胞計数希釈管を準備した。ＢＳＣに、「細胞計数希釈液用」及びロット番号でラベル付けされた４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地を、４本の１５ｍＬコニカルチューブに追加した。試薬をＢＳＣから２～８℃に移した。１Ｌ移送パックを準備した。（プロセス注記５．１１に従って）ＢＳＣ溶接の外側で、「完全なＣＭ２の１１日目培地」バッグに取り付けられた移送セットへの１Ｌ移送パックを準備した。フィーダー細胞移送パックを準備した。完全なＣＭ２の１１日目培地をインキュベートした。

【３２９２】

１１日目－ＴＩＬ採取前処理表。インキュベーターパラメータ：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５％CO_2。インキュベーターからＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳを取り出した。３００ｍＬ移送パックを準備した。移送パックをＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳに溶接した。

【３２９３】

ＴＩＬ採取及びＴＩＬ採取の開始のためにフラスコを準備する。ＴＩＬが採取された。ＧａｔｈｅＲｅｘを使用して、血液フィルターを介して細胞懸濁液を３００ｍＬの移送パックに移した。付着した細胞について膜を点検した。

【３２９４】

フラスコ膜をすすいだ。Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ上のクランプを閉じた。すべてのクランプが閉じられていることを確実にした。ＴＩＬ及び「上清」移送パックを熱融着した。ＴＩＬ懸濁液の体積を計算した。試料採取のために上清移送パックを準備した。

【３２９５】

Ｂａｃ－Ｔ試料を引き出した。ＢＳＣ内で、１Ｌ「上清」移送パックからおよそ２０．０ｍＬの上清を引き上げ、無菌５０ｍＬコニカルチューブに分注する。

【３２９６】

試料計画に従ってＢａｃＴを接種した。適切なサイズのシリンジを使用して調製されたＢａｃＴとラベル付けされた５０ｍＬコニカルから１．０ｍＬの試料を取り出し、嫌気性ボトルに接種した。

【３２９７】

ＴＩＬをインキュベートした。必要とされるまで、ＴＩＬ移送パックをインキュベーターに入れた。細胞計数及び計算を行った。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。生存率÷２。生細胞濃度÷２。計数の上限及び下限を決定した。下限：生細胞濃度の平均×０．９。上限：生細胞濃度の平均×１．１。許容限界内の両方の計数を確認した。行われた４つすべての計数から平均生細胞濃度を決定した。

【３２９８】

ＴＩＬ懸濁液の調整された体積：細胞計数試料を取り出した後のＴＩＬ懸濁液の調整された体積を計算する。総ＴＩＬ細胞体積（Ａ）。取り出された細胞計数試料の体積（４．０ｍＬ）（Ｂ）調整された総ＴＩＬ細胞体積Ｃ＝Ａ－Ｂ。

【３２９９】

総生ＴＩＬ細胞を計算した。平均生細胞濃度＊：総体積、総生細胞：Ｃ＝ＡｘＢ。

【３３００】

フローサイトメトリーのための計算：総生ＴＩＬ細胞数が、$４．０\times１０^{7}$個以上であった場合、フローサイトメトリー試料のために$１．０\times１０^{7}$個の細胞を取得するための体積を計算した。

【３３０１】

フローサイトメトリーに必要とされる総生細胞：$１．０\times１０^{7}$個の細胞。フローサイ

トメトリーに必要とされる細胞の体積：生細胞濃度を１．０×１０^{7}個の細胞Ａで割ったもの。

【３３０２】

２．０×１０^{8}個の生細胞に等しいＴＩＬ懸濁液の体積を計算した。必要に応じて、取り出すＴＩＬ細胞の過剰体積を計算し、過剰なＴＩＬを取り出し、必要に応じてＴＩＬをインキュベーターに入れた。必要に応じて、取り出された全過剰ＴＩＬを計算した。

【３３０３】

凍結のための標的細胞濃度が１．０×１０^{8}細胞／ｍＬである過剰なＴＩＬ細胞に追加するＣＳ－１０培地の量を計算した。必要に応じて、過剰なＴＩＬを遠心分離した。コニカルチューブを観察し、ＣＳ－１０を追加した。

【３３０４】

バイアルを充填した。１．０ｍＬの細胞懸濁液を、適切なサイズの凍結バイアルに等分した。残留体積を適切なサイズのクライオバイアルに等分した。体積が≦０．５ｍＬである場合、体積が０．５ｍＬになるまでＣＳ１０をバイアルに追加する。

【３３０５】

凍結保存のための１×１０^{7}個の細胞を取得するために必要とされる細胞の体積を計算した。凍結保存のために試料を取り出した。ＴＩＬをインキュベーターに入れた。

【３３０６】

試料の凍結保存。コニカルチューブを観察し、ＣＳ－１０をゆっくりと追加し、追加された０．５ｍＬのＣＳ１０の体積を記録した。

【３３０７】

１１日目－フィーダー細胞フィーダー細胞を取得した。ＬＮ２冷凍庫から少なくとも２つの異なるロット番号を伴うフィーダー細胞の３つのバッグを取得した。解凍する準備が整うまで、細胞をドライアイス上で保管した。水浴またはｃｒｙｏｔｈｅｒｍを準備した。３７．０±２．０℃の水浴またはｃｙｔｏｔｈｅｒｍにおいて約３～５分間、または氷が消滅するまで、フィーダー細胞を解凍した。インキュベーターから培地を取り出した。解凍されたフィーダー細胞をプールした。フィーダー細胞を移送パックに追加した。シリンジから移送パックにフィーダー細胞を分注した。プールされたフィーダー細胞を混合し、移送パックをラベル付けした。

【３３０８】

移送パック内のフィーダー細胞懸濁液の総体積を計算した。細胞計数試料を取り出した。各試料に別個の３ｍＬシリンジを使用して、不要注入ポートを使用してフィーダー細胞懸濁液移送パックから４×１．０ｍＬの細胞計数試料を引き出した。各試料をラベル付けされたクライオバイアルに等分した。細胞計数を行い、増倍率を決定し、プロトコルを選択し、増倍率を入力した。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定し、限界内で確認した。

【３３０９】

フィーダー細胞懸濁液の調整された体積。細胞計数試料を取り出した後のフィーダー細胞懸濁液の調整された体積を計算した。総生フィーダー細胞を計算した。必要に応じて追加のフィーダー細胞を取得した。必要に応じて追加のフィーダー細胞を解凍した。第４のフィーダー細胞バッグをジップトップバッグに入れ、３７．０±２．０℃の水浴またはｃｙｔｏｔｈｅｒｍ内で約３～５分間解凍し、追加のフィーダー細胞をプールした。体積を測定した。シリンジ内のフィーダー細胞の体積を測定し、以下に記録した（Ｂ）。フィーダー細胞の新しい総体積を計算した。フィーダー細胞を移送パックに追加した。

【３３１０】

必要に応じて希釈液を調製し、４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地を４本の１５ｍＬコニカルチューブに追加した。細胞計数を準備した。各試料に対して別個の３ｍＬシリンジを使用して、不要注入ポートを使用して、フィーダー細胞懸濁液移送パックから４×１．０ｍＬの細胞計数試料を取り出した。細胞計数及び計算を行った。行われた４つすべての計数から平均生細胞濃度を決定した。フィーダー細胞懸濁液の体積を調整し、細胞計数試料を取

り出した後のフィーダー細胞懸濁液の調整された体積を計算した。４．０ｍＬを差し引いた総フィーダー細胞体積が取り出された。５×１０^{9}個の生フィーダー細胞を取得するために必要とされたフィーダー細胞懸濁液の体積を計算した。過剰なフィーダー細胞体積を計算した。取り出す過剰なフィーダー細胞の体積を計算した。過剰なフィーダー細胞を取り出した。

【３３１１】

１．０ｍＬシリンジ及び１６Ｇ針を使用して、０．１５ｍＬのＯＫＴ３を引き上げ、ＯＫＴ３を追加した。フィーダー細胞懸濁液移送パックを熱融着した。

【３３１２】

１１日目　Ｇ－ＲＥＸ充填及びシード設定Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ。「完全なＣＭ２の１１日目培地」をインキュベーターから取り出し、培地をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳにポンプで注入した。４．５Ｌの培地をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳにポンプで注入し、フラスコ上にマークされたラインまで充填した。必要に応じてフラスコを熱融着し、インキュベートした。フィーダー細胞の懸濁液移送パックを、Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳに溶接した。フィーダー細胞をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳに追加した。熱融着した。ＴＩＬ懸濁液移送パックをフラスコに溶接した。ＴＩＬをＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳに追加した。熱融着した。Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを３７．０±２．０℃でインキュベートした。ＣＯ２パーセンテージ：５．０±１．５％ＣＯ２。

【３３１３】

インキュベーション時間帯を計算した。１６日目にインキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを取り出すための適切な時間を決定するための計算を行った。下限：インキュベーションの時間＋１０８時間。上限：インキュベーションの時間１３２時間。

【３３１４】

１１日目　過剰ＴＩＬの凍結保存。該当：過剰ＴＩＬバイアルを凍結させた。凍結前にＣＲＦが設定されていることを検証した。凍結保存を行った。バイアルを速度制御された冷凍庫から適切な保管場所に移した。凍結の完了時に、バイアルをＣＲＦから適切な保管容器に移した。バイアルを適切な保管場所に移した。ＬＮ２における保管場所を記録した。

【３３１５】

１６日目　培地の調製。ＡＩＭ－Ｖ培地を事前に温めた。培地バッグ１、２、及び３について培地が温められた時間を計算した。すべてのバッグが１２～２４時間の持続時間にわたって温められていることを確実にした。上清用の１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを設定した。ルアーコネクタを使用して、流体ポンプ移送セットのより大きな直径の端部を１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグのメス型ポートのうちの１つに取り付けた。上清用の１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを設定し、ラベル付けした。上清用の１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを設定した。ＢＳＣから取り出す前に、すべてのクランプが閉じられていることを確実にした。注記：上清バッグは、培地調製と同時に行われ得るＴＩＬ採取中に使用された。

【３３１６】

ＩＬ－２を解凍した。すべての氷が融解するまで、ＣＴＳ　ＡＩＭ　Ｖ培地の１バッグ当たりＩＬ－２（６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）（ＢＲ７１４２４）の５×１．１ｍＬアリコートを解凍した。１００．０ｍＬのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を等分した。ＩＬ－２をＧｌｕｔａＭａｘ（商標）に追加した。配合用のＣＴＳ　ＡＩＭ　Ｖ培地バッグを準備した。配合用のＣＴＳ　ＡＩＭ　Ｖ培地バッグを準備した。ステージＢａｘａポンプ。培地を配合することを準備した。ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）＋ＩＬ－２をバッグにポンプで注入した。パラメータを監視した：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５％　CO_2。完全なＣＭ４の１６日目培地を温めた。希釈液を調製した。

【３３１７】

１６日目　ＲＥＰ分割。インキュベーターパラメータを監視した：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５％CO_2。インキュ

ベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを取り出した。１Ｌの移送パックを準備し、ＴＩＬ懸濁液としてラベル付けし、１Ｌの重量を量った。

【３３１８】

Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳの減容。約４．５Ｌの培養上清をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳから１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒに移した。

【３３１９】

ＴＩＬ採取用のフラスコを準備した。上清を取り出した後に、赤色ラインへのすべてのクランプを閉じた。

【３３２０】

ＴＩＬ採取の開始。フラスコを激しく叩き、培地を旋回させて細胞を解放し、すべての細胞が引き離されていることを確実にする。

【３３２１】

ＴＩＬ採取。ＴＩＬ懸濁液移送パックにつながるすべてのクランプを解放した。ＧａｔｈｅＲｅｘを使用して、細胞懸濁液をＴＩＬ懸濁液移送パックの中に移した。注記：すべての細胞及び培地が収集されるまで、傾斜した縁を必ず維持すること。付着した細胞について膜を点検した。フラスコ膜をすすいだ。Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ上のクランプを閉じた。ＴＩＬを含む移送パックを熱融着した。上清を含む１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを熱融着した。細胞懸濁液を伴う移送パックの重量を記録し、細胞懸濁液を計算した。試料を取り出すための移送パックを準備した。細胞上清から試験試料を取り出した。

【３３２２】

無菌性及びＢａｃＴ試験試料採取。調製したＢａｃＴラベル付けされた１５ｍＬのコニカルから１．０ｍＬの試料を取り出した。細胞計数試料を取り出した。ＢＳＣ内で、各試料に別個の３ｍＬシリンジを使用して、「ＴＩＬ懸濁液」移送パックから４×１．０ｍＬの細胞計数試料を取り出した。

【３３２３】

マイコプラズマ試料を取り出した。３ｍＬシリンジを使用して、ＴＩＬ懸濁液移送パックから１．０ｍＬを取り出し、調製された「マイコプラズマ希釈液」とラベル付けされた１５ｍＬコニカルチューブに入れた。

【３３２４】

播種用の移送パックを準備した。ＴＩＬをインキュベーターに入れた。細胞懸濁液をＢＳＣから取り出し、必要とされるまでインキュベーターに入れた。細胞計数及び計算を行った。最初に、０．５ｍＬの細胞懸濁液を調製された４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地に追加することによって、細胞計数試料を希釈し、１：１０希釈液を生じた。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。注記：希釈は、細胞の期待濃度に基づいて調整され得る。行われた４つすべての計数から平均生細胞濃度を決定した。ＴＩＬ懸濁液の調整された体積。細胞計数試料を取り出した後のＴＩＬ懸濁液の調整された体積を計算した。５．０ｍＬを差し引いた総ＴＩＬ細胞体積が試験のために取り出された。

【３３２５】

総生ＴＩＬ細胞を計算した。播種するフラスコの総数を計算した。注記：播種するＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコの最大数は５であった。播種するフラスコの計算された数が５つを超えた場合、５つのみが利用可能な細胞懸濁液の体積全体を使用して播種された。

【３３２６】

二次培養用のフラスコの数を計算した。準備されたバッグに加えて必要とされる培地バッグの数を計算した。計算されたように必要とされる２つのＧ－ＲＥＸ－５００Ｍフラスコ毎に「ＣＭ４の１６日目培地」の１つの１０Ｌバッグを準備した。追加の培地が調製され、温められている間に、続けて第１のＧＲＥＸ－５００Ｍフラスコ（複数可）を播種した。計算された数の決定された追加の培地バッグを調製し、温めた。Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを充填した。培地をポンプで注入するように準備し、４．５Ｌの培地をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳにポンプで注入した。熱融着した。充填を繰り返した。フラスコをインキュベ

ートした。新しいＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコに追加するＴＩＬ懸濁液の標的体積を計算した。フラスコの計算された数が５つを超える場合、５つのみが細胞懸濁液の体積全体を使用して播種されるであろう。播種用のフラスコを準備した。インキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを取り出した。ポンプで注入するためのＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを準備した。大型フィルターラインを除くすべてのクランプを閉じた。インキュベーターからＴＩＬを取り出した。播種用の細胞懸濁液を調製した。（プロセス注記５．１１に従って）「ＴＩＬ懸濁液」移送パックをポンプ入口ラインに滅菌溶接した。ＴＩＬ懸濁液バッグを秤の上に置いた。

【３３２７】

フラスコにＴＩＬ懸濁液を播種した。計算されたＴＩＬ懸濁液の体積をフラスコにポンプで注入した。熱融着した。残りのフラスコを充填した。

【３３２８】

インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５％CO_2。フラスコをインキュベートした。

【３３２９】

２２日目にインキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを取り出す時間範囲を決定した。

【３３３０】

２２日目　洗浄緩衝液の調製。１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグを準備した。ＢＳＣ内で、ルアー接続を介して４インチ血漿移送セットを１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグに取り付けた。１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグを準備した。ＢＳＣから外に移す前に、すべてのクランプを閉じた。注記：採取される２つのＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコ毎に、１つの１０Ｌ　Ｌａｂｔａｉｎｅｒバッグを準備した。Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅを３０００ｍＬバッグにポンプで注入し、ポンプを反転させてバッグの位置を操作することによって、３０００ｍＬのＯｒｉｇｅｎバッグから空気を除去した。ヒトアルブミン２５％を３０００ｍＬのバッグに追加した。１２０．０ｍＬの最終体積のヒトアルブミン２５％を取得する。

【３３３１】

ＩＬ－２希釈液を調製した。１０ｍＬシリンジを使用して、ＬＯＶＯ洗浄緩衝液バッグ上の無針注入ポートを使用して、５．０ｍＬのＬＯＶＯ洗浄緩衝液を取り出した。ＬＯＶＯ洗浄緩衝液を５０ｍＬのコニカルチューブに分注した。

【３３３２】

等分されたＣＲＦブランクバッグＬＯＶＯ洗浄緩衝液。１００ｍＬのシリンジを使用して、無針注入ポートから７０．０ｍＬのＬＯＶＯ洗浄緩衝液を引き上げた。

【３３３３】

すべての氷が融解するまで、１つの１．１ｍＬのＩＬ－２（６×１０６ＩＵ／ｍＬ））を解凍した。５０μＬのＩＬ－２ストック（６×10^6ＩＵ／ｍＬ）を「ＩＬ－２希釈液」とラベル付けされた５０ｍＬのコニカルチューブに追加した。

【３３３４】

凍結保存調製。５つのクライオカセットを２～８℃に置き、最終製品の凍結保存のためにそれらを前調整した。

【３３３５】

細胞計数希釈液を調製した。ＢＳＣ内で、ロット番号及び「細胞計数希釈液用」でラベル付けされた４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地を、４本の別個の１５ｍＬコニカルチューブに追加した。細胞計数を準備した。４つのクライオバイアルをバイアル番号（１～４）でラベル付けした。使用されるＢＳＣの下でバイアルを保存した。

【３３３６】

２２日目　ＴＩＬ採取インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ温度ＬＥＤディスプレイ：３７±２．０°Ｃ、ＣＯ２パーセンテージ：５％±１．５％．イン

キュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコを取り外した。ＴＩＬ収集バッグを準備し、ラベル付けした。余分な接続を密封した。減容：約４．５Ｌの上清をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳから上清バッグに移した。

【３３３７】

ＴＩＬ採取用のフラスコを準備した。ＴＩＬの収集を開始した。フラスコを激しく叩き、培地旋回させて細胞を解放した。すべての細胞が引き離されていることを確実にした。ＴＩＬの収集を開始した。ＴＩＬ懸濁液収集バッグにつながるすべてのクランプを解放した。ＴＩＬ採取。ＧａｔｈｅＲｅｘを使用して、ＴＩＬ懸濁液を３０００ｍＬの収集バッグに移した。付着した細胞について膜を点検した。フラスコ膜をすすいだ。Ｇ－Ｒｅｘ５００ＭＣＳ上のクランプを閉鎖し、すべてのクランプが閉鎖していることを確実にした。細胞懸濁液をＬＯＶＯソースバッグの中に移した。すべてのクランプを閉じた。熱融着した。４×１．０ｍＬの細胞計数試料を取り出した。

【３３３８】

細胞計数を行った。ＮＣ－２００及びプロセス注記５．１４を利用して、細胞計数及び計算を行った。最初に、０．５ｍＬの細胞懸濁液を調製された４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地に追加することによって、細胞計数試料を希釈した。これは、１：１０希釈液を生じた。行われた細胞計数の平均生存率、生細胞濃度、及び総有核細胞濃度を決定した。計数の上限及び下限を決定した。行われた細胞計数の平均生存率、生細胞濃度、及び総有核細胞濃度を決定した。ＬＯＶＯソースバッグの重量を量った。総生ＴＩＬ細胞を計算した。総有核細胞を計算した。

【３３３９】

マイコプラズマ希釈液を調製した。ルアー試料ポートを介して１つの上清バッグから１０．０ｍＬを取り出し、１５ｍＬコニカルに入れた。

【３３４０】

「ＴＩＬ　Ｇ－ＲＥＸ採取」プロトコルを行い、最終製品の標的体積を決定した。使い捨てキットを装填した。濾液バッグを取り出した。濾液容量を入力した。濾液容器をベンチトップの上に置いた。ＰｌａｓｍａＬｙｔｅを取り付けた。ＰｌａｓｍａＬｙｔｅが取り付けられていることを検証し、ＰｌａｓｍａＬｙｔｅが動いていることを観察した。ソース容器をチューブに取り付け、ソース容器が取り付けられていることを検証した。ＰｌａｓｍａＬｙｔｅが動いていることを確認した。

【３３４１】

最終製剤及び充填。標的体積／バッグの計算。ブランクバッグを配合するためのＣＳ－１０及びＬＯＶＯ洗浄緩衝液の体積を計算した。ＣＲＦブランクを調製した。

【３３４２】

最終製品に追加するＩＬ－２の体積を計算した。所望される最終ＩＬ－２濃度（ＩＵ／ｍＬ）－３００ＩＵ／ｍＬ。ＩＬ－２作業ストック：6×10^{4}ＩＵ／ｍＬ．接続装置を組み立てた。４Ｓ－４Ｍ６０をＣＣ２細胞接続に滅菌溶接した。ＣＳ７５０クライオバッグを準備したハーネスに滅菌溶接した。ＣＳ－１０バッグを４Ｓ－４Ｍ６０のスパイクに溶接した。ＩＬ－２とともにＴＩＬ調製した。適切なサイズのシリンジを使用して、「ＩＬ－２　6×10^{4}」アリコートから決定されたＩＬ－２の量を取り出した。配合されたＴＩＬバッグをラベル付けした。配合されたＴＩＬバッグを装置に追加した。ＣＳ１０を追加した。シリンジを交換した。約１０ｍＬの空気を１００ｍＬのシリンジに引き込み、装置上の６０ｍＬシリンジを交換した。ＣＳ１０を追加した。ＣＳ－７５０バッグを準備した。細胞を分注した。

【３３４３】

最終製品バッグから空気を除去し、保持液を得た。最後の最終製品バッグが充填されると、すべてのクランプを閉じた。１０ｍＬの空気を新しい１００ｍＬシリンジに引き込み、装置のシリンジを交換する。保持液を５０ｍＬコニカルチューブに分注し、管を「保持液」及びロット番号としてラベル付けした。各バッグについて空気除去ステップを繰り返した。

【３３４４】
目視検査を含み、凍結保存のための最終製品を調製した。凍結保存までクライオバッグを低温パック上で、または２～８℃で保持した。
【３３４５】
細胞計数試料を取り出した。適切なサイズのピペットを使用して、２．０ｍＬの保持液を取り出し、細胞計数に使用されるように１５ｍＬコニカルチューブに入れる。細胞計数及び計算を行った。注記：１つだけの試料を適切な希釈に希釈し、希釈が十分であることを検証した。追加の試料を適切な希釈倍率に希釈し、計数を進めた。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。注記：希釈は、細胞の期待濃度に基づいて調整され得る。生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。ＩＦＮ－γを計算した。最終製品バッグを熱融着した。
【３３４６】
以下の例示的試料計画に従って試料をラベル付けし、収集した。
【３３４７】
【表５３】

表４３．試料計画。

試料	容器の数	各々に追加する試料体積	容器タイプ
*マイコプラズマ	1	1.0mL	15mL コニカル
内毒素	2	1.0mL	2mL クライオバイアル
グラム染色	1	1.0mL	2mL クライオバイアル
IFN-γ	1	1.0mL	2mL クライオバイアル
フローサイトメトリー	1	1.0mL	2mL クライオバイアル
**Bac-T 無菌性	2	1.0mL	Bac-T ボトル
QC 保持	4	1.0mL	2mL クライオバイアル
サテライトバイアル	10	0.5mL	2mL クライオバイアル

【３３４８】
無菌性及びＢａｃＴ試験。試験試料採取。ＢＳＣ内で、適切なサイズのシリンジを使用して収集された保持細胞懸濁液から１．０ｍＬの試料を取り出し、嫌気性ボトルに接種する。好気性ボトルについて上記を繰り返す。
【３３４９】
最終産物の凍結保存。制御速度冷凍庫（ＣＲＦ）を準備した。ＣＲＦが設定されていることを検証した。ＣＲＦプローブを設定した。最終製品及び試料をＣＲＦに入れた。４℃±１．５℃に達し、ＣＲＦ実行を進めるために必要な時間を決定した。ＣＲＦが完了し、保管された。実行の完了後にＣＲＦを停止させた。カセット及びバイアルをＣＲＦから取り出した。保存のためにカセット及びバイアルを蒸気相ＬＮ２に移した。保管場所を記録した。
【３３５０】
最終医薬品の後処理及び分析には、以下の試験が含まれた：（２２日目）フローサイトメトリーによる２２日目ＲＥＰのＣＤ３＋細胞の決定、（２２日目）グラム染色法（ＧＭＰ）、（２２日目）ゲルクロットＬＡＬアッセイ（ＧＭＰ）による細菌内毒素試験、（１６日目）ＢａｃＴ滅菌アッセイ（ＧＭＰ）、（１６日目）ＴＤ－ＰＣＲによるマイコプラズマＤＮＡ検出（ＧＭＰ）、許容される外観属性、（２２日目）ＢａｃＴ滅菌アッセイ（ＧＭＰ）（２２日目）、（２２日目）ＩＦＮ－ガンマアッセイ。本明細書に記載の他の効力アッセイもまた、ＴＩＬ製品を分析するために用いられる。
【３３５１】
実施例９：ＧＥＮ３拡張プラットフォームの例示的な実施形態
０日目

腫瘍洗浄培地を調製した。培地を開始前に温めた。５ｍＬのゲンタマイシン（５０ｍｇ／ｍＬ）を５００ｍＬボトルのＨＢＳＳに添加した。５ｍＬの腫瘍洗浄培地を、ＯＫＴ３希釈に使用する１５ｍＬのコニカルチューブに添加した。フィーダー細胞バッグを調製した。フィーダー細胞をフィーダー細胞バッグに無菌で移し、使用するまで３７℃で保管するか、または凍結させた。３７℃の場合、フィーダー細胞をカウントした。凍結した場合は、解凍した後、フィーダー細胞をカウントした。

【３３５２】

フィーダー細胞濃度の最適範囲は、5×10^{4}～5×10^{6}細胞／ｍＬである。４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖを含む４つのコニカルチューブを準備した。各細胞計数について０．５ｍＬの細胞画分を追加した。総生フィーダー細胞数が1×10^{9}細胞以上であった場合、進んでフィーダー細胞濃度を調整した。フィーダー細胞の体積を計算し、第１のフィーダー細胞バッグから取り出して、1×10^{9}細胞を第２のフィーダー細胞バッグに添加した。

【３３５３】

ｐ１０００マイクロピペットを使用して、９００μＬの腫瘍洗浄培地をＯＫＴ３アリコート（１００μＬ）に移した。シリンジ及び滅菌技法を使用して、０．６ｍＬのＯＫＴ３を吸引し、第２のフィーダー細胞バッグに添加した。培地体積を全体積２Ｌに調整した。第２のフィーダー細胞バッグをインキュベーターに移した。

【３３５４】

ＯＫＴ３製剤の詳細：ＯＫＴ３は、１００μＬアリコート中のバイアル（１ｍｇ／ｍＬ）からの元のストック濃度でアリコートされ、凍結されてもよい。１ｍＬバイアル当たり約１０×アリコート。－８０℃で保管した。０日目：１５μｇ／フラスコ、すなわち５００ｍＬ中３０ｎｇ／ｍＬ～６０μＬ最大約１アリコート。

【３３５５】

５ｍＬの腫瘍洗浄培地を、過剰腫瘍片とラベル付けした６ウェルプレートのすべてのウェルに添加した。解剖中に腫瘍を水和状態に保持する際に、腫瘍洗浄培地をさらなる使用のために利用可能にした。５０ｍＬの腫瘍洗浄培地を、各１００ｍｍペトリ皿に追加した。

【３３５６】

解剖皿のふたの下の定規を参照として使用して、腫瘍を２７mm^{3}断片（３×３×３ｍｍ）に解剖した。６０個の断片に達するまで中間断片を解剖した。生成した最終断片の数に応じて、最終断片の総数を計数し、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコを調製した（一般に、１フラスコ当たり６０個の断片）。

【３３５７】

断片チューブ１～断片チューブ４とラベル付けしたコニカルチューブ内に好ましい組織断片を保持した。起源とする断片チューブの数に応じて、フィーダー細胞懸濁液を播種するＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコの数を計算した。

【３３５８】

フィーダー細胞バッグをインキュベーターから取り出し、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳを播種する。Ｄ０（０日目）とラベル付けする。

【３３５９】

Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ中の培養物への腫瘍断片の追加。滅菌条件下で、腫瘍断片培養物（Ｄ０）１とラベル付けしたＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ及び断片チューブとラベル付けした５０ｍＬのコニカルチューブのキャップを緩めた。開いた断片チューブ１を回転させ、同時にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳのキャップをわずかに持ち上げた。断片を含む培地を、回転している間にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳに追加した。Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳに移送された断片の数を記録した。

【３３６０】

断片がＧＲＥＸフラスコの底に配置された時点で、７ｍＬの培地を吸引し、７つの１ｍＬアリコートを作製した（拡張された特徴付け用に５ｍＬ、滅菌試料用に２ｍＬ）。拡張

された特徴付け用の５つのアリコート（最終断片培養上清）を、必要になるまで－２０℃で保管した。

【３３６１】

１本の嫌気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトル及び１本の好気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトルに各々１ｍＬの最終断片培養上清を接種した。試料採取したフラスコ毎に繰り返す。

【３３６２】

７日目～８日目

フィーダー細胞バッグを調製した。凍結時に３７℃の水浴中で３～５分間フィーダーバッグを解凍した。凍結している場合、フィーダー細胞を計数した。フィーダー細胞濃度の最適範囲は、５×１０^{4}～５×１０^{6}細胞／ｍＬである。４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖを含む４つのコニカルチューブを準備した。各細胞計数について０．５ｍＬの細胞画分を新しいクライオバイアル管に追加した。試料を十分に混合し、細胞計数を続けた。

【３３６３】

総生フィーダー細胞数が２×１０^{9}細胞以上であった場合、次のステップに進んでフィーダー細胞濃度を調整した。フィーダー細胞の体積を計算し、第１のフィーダー細胞バッグから取り出して、２×１０^{9}細胞を第２のフィーダー細胞バッグに追加した。

【３３６４】

ｐ１０００マイクロピペットを使用して、９００μＬのＨＢＳＳを１００μＬのＯＫＴ３アリコートに移す。上下に３回ピペッティングして混合する。２つのアリコートを調製した。

【３３６５】

ＯＫＴ３製剤の詳細：ＯＫＴ３は、１００μＬアリコート中のバイアル（１ｍｇ／ｍＬ）からの元のストック濃度でアリコートされ、凍結されてもよい。１ｍＬバイアル当たり約１０×アリコート。－８０℃で保管した。７日目／８日目：３０μｇ／フラスコ、すなわち５００ｍＬ中６０ｎｇ／ｍＬ～１２０μｌ最大約２アリコート。

【３３６６】

シリンジ及び滅菌技法を使用して、０．６ｍＬのＯＫＴ３を吸引し、フィーダー細胞バッグに添加して、すべて添加されたことを確認した。培地量を合計２Ｌに調整した。第２のＯＫＴ３アリコートで繰り返し、フィーダー細胞バッグに追加した。第２のフィーダー細胞バッグをインキュベーターに移した。

【３３６７】

フィーダー細胞懸濁液を含むＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコの準備。０日目に生成されたＧ－ＲＥＸフラスコの数に従って処理するためにＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコの数を記録した。Ｇ－ＲＥＸフラスコをインキュベーターから取り出し、第２のフィーダー細胞バッグをインキュベーターから取り出した。

【３３６８】

フィーダー細胞懸濁液を添加する前の上清の除去：１本の１０ｍＬシリンジをＧ－ＲＥＸ１００フラスコに接続し、５ｍＬの培地を引き上げた。５つの１ｍＬアリコート（拡張された特徴付け用に５ｍＬ）を作製し、治験依頼者からの要求があるまで、拡張された特徴付け用に５つのアリコート（最終断片培養上清）を－２０℃で保管した。各Ｇ－ＲＥＸ１００フラスコにラベル付けし、繰り返した。

【３３６９】

フラスコの数に応じた、特徴付け用の５～２０×１ｍＬ試料：

- ５ｍＬ＝１フラスコ
- １０ｍＬ＝２フラスコ
- １５ｍＬ＝３フラスコ
- ２０ｍＬ＝４フラスコ

【３３７０】

フィーダー細胞をＧ－ＲＥＸ１００　ＭＣＳに播種し続け、Ｇ－ＲＥＸ１００　ＭＣＳフラスコ毎に繰り返した。無菌移送法を使用して、各Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコ

に重量で５００ｍＬの第２のフィーダー細胞バッグを重力移送し（１ｇ＝１ｍＬと想定）、量を記録した。７日目培養とラベル付けし、Ｇ－ＲＥＸ１００フラスコ毎に繰り返した。Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコをインキュベーターに移した。

【３３７１】

１０～１１日目

第１のＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコを取り出し、滅菌条件を使用して、１０ｍＬシリンジを使用して７ｍＬの前処理培養上清を取り出した。７つの１ｍＬアリコートを作製した拡張された特徴付け用に５ｍＬ、滅菌試料用に２ｍＬ。

【３３７２】

フラスコを注意深く混合し、新たな１０ｍＬシリンジを使用して１０ｍＬの上清を取り出し、Ｄ１０／１１マイコプラズマ上清とラベル付けした１５ｍＬのチューブに移す。

【３３７３】

フラスコを注意深く混合し、新しい注射器を使用して、処理されるフラスコの数に応じて以下の量を除去した。

●１フラスコ＝４０ｍＬ
●２フラスコ＝２０ｍＬ／フラスコ
●３フラスコ＝１３．３ｍＬ／フラスコ
●４フラスコ＝１０ｍＬ／フラスコ

【３３７４】

合計４０ｍＬをすべてのフラスコから取り出し、「１０／１１日目ＱＣ試料」とラベル付けした５０ｍＬのコニカルチューブにプールし、必要になるまでインキュベーター内で保管すべきである。細胞計数を行い、細胞を割り当てた。

【３３７５】

必要になるまで－２０℃以下で拡張された特徴付けのために５つのアリコート（前処理培養上清）を保管した。１本の嫌気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトル及び１本の好気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトルに各々１ｍＬの前処理培養上清を接種した。

【３３７６】

細胞懸濁液をＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳに移し、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ毎に繰り返した。滅菌条件を使用して、各Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳの内容物をＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳに移し、一度に約１００ｍＬの液体移送を監視した。Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳの容量が５００ｍＬに低減したとき、移送を停止した。

【３３７７】

移送ステップ中、１０ｍＬシリンジを使用し、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳからシリンジに１０ｍＬの細胞懸濁液を引き上げた。培養中のフラスコの数に従って指示に従った。１つのフラスコのみの場合：２つのシリンジを使用して合計２０ｍＬを取り出した。フラスコが２つの場合：１フラスコ当たり１０ｍＬを取り出した。フラスコが３つの場合：１フラスコ当たり７ｍＬを取り出した。フラスコが４つの場合：１フラスコ当たり５ｍＬを取り出した。細胞懸濁液を１本の一般的な５０ｍＬのコニカルチューブに移した。細胞計数ステップ及びＱＣ試料までインキュベーター内で保管する。ＱＣに必要な細胞の総数は、約２０ｅ６細胞であった：４×０．５ｍＬの細胞数（細胞数を最初に希釈しなかった）。

【３３７８】

アッセイに必要な細胞の量は、以下の通りである。

１．本明細書に記載されるものなどの効力アッセイ、またはＩＦＮ－γもしくはグランザイムＢアッセイのための最小10×10^{6}細胞

２．マイコプラズマのための1×10^{6}細胞

３．ＣＤ３＋／ＣＤ４５＋のためのフローサイトメトリーのための5×10^{6}細胞

【３３７９】

Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコをインキュベーターに移した。

【３３８０】

ＱＣ試料を調製した。この実施形態のアッセイには少なくとも15×10^{8}細胞が必要

であった。アッセイは、細胞数及び生存率、マイコプラズマ（１×１０^{6}細胞／平均生存濃度）、フロー（５×１０^{6}細胞／平均生存濃度）及びＩＦＮ－ｇアッセイ（５×１０^{6}細胞～１×１０^{6}細胞を含み、８～１０×１０^{6}細胞が、ＩＦＮ－γアッセイに必要である。

【３３８１】

１０×１０^{6}細胞／ｍＬで凍結保存のための細胞画分の体積を計算し、調製するバイアルの数を計算した。

【３３８２】

１６～１７日目

洗浄緩衝液の調製（１％　ＨＳＡ　Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅ　Ａ）。ＨＳＡ及びＰｌａｓｍａｌｙｔｅを５Ｌバッグに移して、ＬＯＶＯ洗浄緩衝液を作製した。滅菌条件を使用して、総体積１２５ｍＬの２５％ＨＳＡを５Ｌバッグに移した。１０ｍＬまたは４０ｍＬの洗浄緩衝液を取り出し、「ＩＬ－２　６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ」チューブに移した（ＩＬ－２を事前に調製した場合は１０ｍＬ、ＩＬ－２を新たに調製した場合は４０ｍＬ）。

【３３８３】

Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅ＋１％　ＨＳＡに添加する再構成ＩＬ－２の量を計算した：再構成ＩＬ－２の量＝（ＩＬ－２の最終濃度×最終量）／ＩＬ－２の比活性（標準アッセイに基づく）。ＩＬ－２の最終濃度は、６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬであった。最終体積は、４０ｍＬであった。

【３３８４】

再構成ＩＬ－２に必要なＩＬ－２の計算された初期体積を取り出し、「ＩＬ－２　６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ」チューブに移した。事前に調製したアリコートから１００μＬのＩＬ－２　６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬを、１０ｍＬのＬＯＶＯ洗浄緩衝液を含有する「ＩＬ－２　６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ」とラベル付けしたチューブに追加した。

【３３８５】

約４５００ｍＬの上清をＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコから取り出した。残りの上清を回転させ、細胞を細胞収集プールバッグに移した。すべてのＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコで繰り返した。

【３３８６】

６０ｍＬの上清を除去し、マイコプラズマ検出を含む品質管理アッセイのために上清チューブに添加した。＋２～８℃で保管した。

【３３８７】

細胞収集細胞を計数した。４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖを含む４つの１５ｍＬコニカルチューブを準備する。これらは、事前に準備してもよい。最適な範囲は、５×１０^{4}～５×１０^{6}細胞／ｍＬである。（１：１０希釈が推奨された）。１：１０希釈の場合、事前に調製した４５００μＬのＡＩＭ Ｖに、５００μＬのＣＦを追加する。希釈倍率を記録した。

【３３８８】

ＴＣ（総細胞）ＬＯＶＯ前（生＋死）を計算した＝

平均総細胞
濃度（ＴＣ濃度ＬＯＶＯ前）
（生＋死）
X
ソースバッグの体積

【３３８９】

ＴＶＣ（総生細胞）ＬＯＶＯ前（生）を計算した＝

平均総生細胞
濃度（ＴＶＣ　ＬＯＶＯ前）
（生）
X
ＬＯＶＯソースバッグの体積

【３３９０】
総細胞（ＴＣ）数が５×１０^{9}超であった場合、５×１０^{8}細胞を取り出して、ＭＤＡ保持試料として凍結保存する。５×１０^{8}÷平均ＴＣ濃度（ステップ１４．４４）＝取り出す体積
【３３９１】
総細胞（ＴＣ）数が≦５×１０^{9}以下であった場合、４×１０^{6}細胞を取り出して、ＭＤＡ保持試料として凍結保存する。４×１０^{6}÷平均ＴＣ濃度＝取り出す体積。
【３３９２】
総細胞数が決定された場合、取り出す細胞の数は、１５０×１０^{9}生細胞の保持を可能にすべきである。ＴＶＣ　ＬＯＶＯ前５×１０^{8}もしくは４×１０^{6}を確認するか、または該当なしである。取り出す細胞の体積量を計算した。
【３３９３】
バッグに残っている残りの総細胞を計算した。ＴＣ（総細胞）ＬＯＶＯ前を計算した。［平均総細胞濃度×残りの体積＝残りのＴＣ　ＬＯＶＯ前］を計算した。
【３３９４】
残存する細胞の総数に従って、表４４の対応するプロセスを選択する。
【３３９５】
【表５４】

表４４．セルの総数。

総細胞:	保持液(mL)
0<総細胞≦31×10^{9}	115
31×10^{9}<総細胞≦71×10^{9}	165
71×10^{9}<総細胞≦110×10^{9}	215
110×10^{9}<総細胞≦115×10^{9}	265

【３３９６】
使用したプロセスに対応して添加するＩＬ－２の量を選択する。次のように計算された体積：保持量×２×３００ＩＵ／ｍＬ＝必要とされるＩＬ－２のＩＵ。必要なＩＬ－２のＩＵ／６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ＝ＬＯＶＯ後バッグに追加するＩＬ－２の体積。添加したすべての体積を記録した。さらなる分析のために試料をクライオバイアル内に得た。
【３３９７】
細胞製品を十分に混合した。該当する場合、凍結保存を含むさらなる処理のためにすべてのバッグを密封した。
【３３９８】
取得されたクライオバイアル試料に対して、内毒素、ＩＦＮ－γ、無菌性、及び必要に応じて他のアッセイを行った。
【３３９９】
実施例１０：ＧＥＮ２及びＧＥＮ３の例示的なプロセス
この実施例は、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３のプロセスを示す。Ｇｅｎ２プロセス及びＧｅｎ３プロセスのＴＩＬは、一般に腫瘍の外科的切除によって個々の患者から得られ、その後、エクスビボで拡張された自己ＴＩＬで構成されている。Ｇｅｎ３プロセスのプライミングによる第１の拡張ステップは、インターロイキン－２（ＩＬ－２）及びモノクローナル抗体ＯＫＴ３の存在下での細胞培養であり、放射線照射された末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）の足場上のＴ細胞共受容体ＣＤ３を標的とする。
【３４００】
Ｇｅｎ２　ＴＩＬ製品の製造は、２つの相からなる：１）急速拡張前（ＲＥＰ前）及び

２）急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）。ＲＥＰ前中に、切除腫瘍を、各寸法２～３ｍｍの５０個以下の断片に切断し、血清含有培養培地（１０％ＨｕＳＡＢを補充したＲＰＭＩ１６４０培地）及び６，０００ＩＵ／ｍＬのインターロイキン－２（ＩＬ－２）で１１日間培養した。１１日目にＴＩＬを採取し、大規模二次ＲＥＰ拡張に導入した。ＲＥＰは、５日間の３０００ＩＵ／ｍＬのｒｈＩＬ－２を補充した５Ｌ体積のＣＭ２中の１５０μｇのモノクローナル抗ＣＤ３抗体（ＯＫＴ３）を装填した５×１０^{9}個の放射線照射された同種異系ＰＢＭＣフィーダー細胞の共培養におけるＲＥＰ前由来の２００×１０^{6}個以下の生細胞の活性化からなる。１６日目に、培養物の体積を９０％減少させ、細胞画分を１フラスコ当たり１×１０^{9}個以上の生リンパ球で複数のＧ－ＲＥＸ－５００フラスコに分割し、ＣＭ４で５ＬにＱＳする。ＴＩＬをさらに６日間インキュベートする。ＲＥＰを２２日目に採取し、洗浄し、製剤化し、凍結保存した後に、注入のために臨床現場に－１５０℃で発送する。

【３４０１】

Ｇｅｎ３　ＴＩＬ製品の製造は、３つの相からなる：１）プライミングによる第１の拡張プロトコル、２）急速な第２の拡張プロトコル（急速拡張相またはＲＥＰとも称される）、及び３）継代培養分割。プライミングによる第１の拡張ＴＩＬ増殖を行うために、切除した腫瘍を各寸法２～３ｍｍ以下の１２０個以下の断片に切断した。プライミングによる第１の拡張の０日目に、ＯＫＴ－３を装填したおよそ２．５×１０^{8}個の放射線照射された同種異系ＰＢＭＣフィーダー細胞のフィーダー層を、３つの１００ＭＣＳ容器の各々内のおよそ１００ｃｍ^{2}の表面積上に確立した。腫瘍断片を、各々が５００ｍＬの血清含有ＣＭ１培養培地及び６，０００ＩＵ／ｍＬのインターロイキン－２（ＩＬ－２）及び１５ｕｇのＯＫＴ－３を含む３つの１００ＭＣＳ容器に分布し、その中で７日間培養した。７日目に、ＯＫＴ－３を負荷したおよそ５×１０^{8}個の同種異系の照射されたＰＢＭＣフィーダー細胞の追加のフィーダー細胞層を、３つの１００ＭＣＳ容器の各々において腫瘍断片化培養相に組み込み、５００ｍＬのＣＭ２培養培地及び６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０μｇのＯＫＴ－３で培養することによってＲＥＰを開始した。ＲＥＰの開始を、１００ＭＣＳ容器へのＯＫＴ３を装填したフィーダー細胞の閉鎖系流体移送を使用して、同じ容器内のプライミングによる第１の拡張培養物全体を活性化することによって増強した。Ｇｅｎ３の場合、ＴＩＬのスケールアップまたは分割に、細胞培養物全体を閉鎖系流体移送によってより大きい容器にスケーリングし、移し（１００Ｍフラスコから５００Ｍフラスコに）、追加の４ＬのＣＭ４培地を添加するプロセスステップを含めた。１６日目にＲＥＰ細胞を採取し、洗浄し、製剤化し、凍結保存した後に、注入のために臨床現場に－１５０℃で発送する。

【３４０２】

全体として、Ｇｅｎ３プロセスは、より短く、よりスケーラブルであり、かつ簡単に修正可能な拡張プラットフォームであり、堅牢な製造及びプロセス比較可能性に適するように適応する。

【３４０３】

【表５５】

表４５．例示的なＧｅｎ２及び例示的なＧｅｎ３製造プロセスの比較

ステップ	プロセス(Gen2)	プロセス(Gen3)
REP 前- 0 日目	最大 50 個の断片、1 つの G-REX-100MCS 11 日 1L の CM1 培地 +IL-2(6000IU/mL)	全腫瘍最大 120 個の断片を最大 3 つのフラスコに均等に分割した。1 つのフラスコ:1~60 個の断片 2 つのフラスコ 61~89 個の断片 3 つのフラスコ:90~120 個の断片 7 日間、500mL の CM1 培地 +IL-2(6000IU/mL) 2.5×10^8 個のフィーダー細胞/フラスコ 15ug OKT-3/フラスコ
REP 開始	REP に誘導する、11 日目、 <200×10^6 TIL (1)5L CM2 培地中の G-REX-500MCS IL-2(3000IU/mL) 5×10^9 フィーダー細胞 150ug OKT-3	REP に誘導する、7 日目、すべての細胞、同じ G-REX-100MCS 500CM2 培地を添加する IL-2(6000IU/mL) 5×10^8 フィーダー細胞/フラスコ 30ug の OKT-3/フラスコ
TIL の増殖またはスケールアップ	減容し、細胞画分を最大 5 つの G-REX-500MCS に分割する 4.5L CM4 培地+IL-2(3000IU/mL) $\geqq1\times10^9$ TVC/フラスコ 16 日目に分割する	各 G-REX-100MCS(1L)が 1 つの G-REX-500MCS に移行する 4L の CM4 培地+IL-2(3000IU/mL)を添加する 9~11 日目にスケールアップする
採取	22 日目に採取する LOVO-自動細胞洗浄機	16 日目に採取する LOVO-自動細胞洗浄機
最終製剤	凍結保存した製品 LN_2 中の 300IU/mL の IL2-CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品 LN_2 中 300IU/mL の IL-2-CS10 複数のアリコート
プロセス時間	22 日	16 日

【３４０４】

０日目に、両方のプロセスについて、腫瘍を３回洗浄し、断片をランダム化し、２つのプールに分けた（プロセス毎に１つのプール）。Ｇｅｎ２プロセスの場合、断片を、６，０００ＩＵ／ｍＬのｒｈＩＬ－２を含有する１ＬのＣＭ１培地を含む１つのＧＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコに移した。Ｇｅｎ３プロセスでは、断片を、６，０００ＩＵ／ｍＬのｒｈＩＬ－２、１５ｕｇのＯＫＴ－３及び２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞を含有する５００ｍＬのＣＭ１を含む１つのＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコに移した。Ｒｅｐ開始日のＴＩＬの播種は、各プロセスに従って異なる日に起こった。Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコを９０％減容させたＧｅｎ２プロセスの場合、収集した細胞懸濁液を新たなＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳに移して、ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）＋５×１０^{9}フィーダー細胞及びＯＫＴ－３（３０ｎｇ／ｍＬ）を含有するＣＭ２培地中で１１日目にＲＥＰを開始した。細胞が拡張し、プロトコルに従って１６日目にＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）を有するＣＭ４培地を含む複数のＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコに分割した。その後、培養物を採取し、プロトコルに従って２２日目に凍結保存した。Ｇｅｎ３プロセスの場合、ＲＥＰの開始は７日目に起こり、同じＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳをＲＥＰの開始に使用した。簡潔には、ＩＬ－２（６０００ＩＵ／ｍＬ）及び５×１０^{8}個のフィーダー細胞を３０ｕｇのＯＫＴ－３とともに含有する５００ｍＬのＣＭ２培地を各フラスコに添加した。９～１１日目に、培養をスケールアップした。Ｇ－ＲＥＸ１００Ｍの全体積（１Ｌ）をＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳに移し、ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）を含有する４ＬのＣＭ４を添加した。フラスコを５日間インキュベートした。培養物を採取し、１６日目に凍結保存した。

【３４０５】
比較には、２つの肺腫瘍（Ｌ４０５４及びＬ４０５５）及び１つの黒色腫腫瘍（Ｍ１０８５Ｔ）の３つの異なる腫瘍を含めた。
【３４０６】
Ｌ４０５４及びＬ４０５５の場合、ＣＭ１培地（培養培地１）、ＣＭ２培地（培養培地２）、及びＣＭ４培地（培養培地４）を事前に調製し、４℃で保持した。ＣＭ１培地及びＣＭ２培地を、培地を濾過した場合の細胞増殖と培地を濾過しなかった場合の細胞増殖を比較するために、濾過せずに調製した。
【３４０７】
Ｌ４０５５腫瘍の場合、ＲＥＰの開始及びスケールアップ時に、培地を事前に３７℃で最大２４時間温めた。
【３４０８】
結果達成された生細胞の総数について、Ｇｅｎ３の結果はＧｅｎ２の３０％以内であった。Ｇｅｎ３最終製品は、再刺激後により高いＩＮＦ－γ産生を示した。Ｇｅｎ３最終製品は、存在する固有の全ＣＤＲ３配列によって測定される、増加したクローンの多様性を示した。Ｇｅｎ３最終製品は、より長い平均テロメア長を示した。
【３４０９】
Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスでのＲＥＰ前及びＲＥＰ拡張は、上記の手順に従った。各腫瘍について、２つのプールに同数の断片を含めた。腫瘍のサイズが小さいため、１フラスコ当たりの最大断片数は達成されなかった。総ＲＥＰ前細胞（ＴＶＣ）を採取し、Ｇｅｎ２プロセスの場合は１１日目に、Ｇｅｎ３プロセスの場合は７日目に計数した。２つのＲＥＰ前群を比較するために、細胞計数を培養物中に提供された断片の数で割り、１断片当たりの平均生細胞を計算した。以下の表４６に示されるように、Ｇｅｎ２プロセスは、Ｇｅｎ３プロセスと比較して、１断片当たりより多くの細胞を一貫して成長させた。ＲＥＰ前ＴＶＣを７で割り、その後、１１を掛けて計算した、１１日目にＧｅｎ３プロセスで予想されるＴＶＣ数の外挿計算。
【３４１０】
【表５６】

表４６．ＲＥＰ前の細胞数

腫瘍 ID	L4054		L4055*		M1085T	
プロセス	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
REP 前 TVC	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
断片数	21	21	24	24	16	16
REP 前における断片当たりの平均 TVC	6.65E+06	2.06E+06	1.12E+06	5.75E+05	7.66E+05	2.18E+05
11 日目の pre REP における Gen3 外挿値	N/A	6.79E+07	N/A	2.17E+07	N/A	5.49E+06

＊Ｌ４０５５、濾過されていない培地。

【３４１１】
Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスの場合、ＴＶＣをプロセス条件毎に計数し、生細胞パーセントをプロセス日毎に生成した。採取時に、２２日目（Ｇｅｎ２）及び１６日目（Ｇｅｎ３）の細胞を収集し、ＴＶＣ数を確立した。その後、ＴＶＣを０日目に提供された断片の数で割り、１断片当たりの平均生細胞を計算した。倍率拡張を、採取したＴＶＣをＲＥＰ開始ＴＶＣで割ることによって計算した。表４７に示されるように、Ｇｅｎ２とＧｅｎ３を比較すると、倍率拡張はＬ４０５４の場合では同様であり、Ｌ４０５５の場合、倍率拡張はＧｅｎ２プロセスの方が高かった。具体的には、この場合、培地をＲＥＰ開始日の前に２４温めた。Ｍ１０８５Ｔの場合のＧｅｎ３でもより高い倍率拡張が観察された。ＲＥＰ　ＴＶＣを１６で割り、その後、２２を掛けて計算した、２２日目にＧｅｎ３プロセ

スで予想されるＴＶＣ数の外挿計算。
【３４１２】
【表５７】

表４７．ＴＩＬ最終産物の総生細胞数及び倍率拡張。

腫瘍 ID	L4054		L4055		M1085T	
プロセス	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
断片数	21	21	24	24	16	16
TVC/断片(採取時)	3.18E+09	8.77E+08	2.30E+09	3.65E+08	7.09E+08	4.80E+08
REP 開始	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
スケールアップ	3.36E+09	9.35E+08	3.49E+09	8.44E+08	1.99E+09	3.25E+08
採取	6.67E+10	1.84E+10	5.52E+10	8.76E+09	1.13E+10	7.68E+09
倍率拡張 採取/ REP 開始	468.4	425.9	2056.8	634.6	925.0	2197.2
22 日目の REP 採取における Gen3 外挿値	N/A	2.53E+10	N/A	1.20E+10	N/A	1.06E+10

＊Ｌ４０５５、濾過されていない培地。

【３４１３】
表４８：ＴＩＬ最終産物の生存率％：採取時に、最終ＴＩＬ　ＲＥＰ製品を生存率％の放出基準と比較した。Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスのすべての条件は、７０％の生存率基準を超えており、プロセス及び腫瘍間で同等であった。
【３４１４】
採取時に、最終ＴＩＬ　ＲＥＰ製品を生存率％の放出基準と比較した。Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスのすべての条件は、７０％の生存率基準を超えており、プロセス及び腫瘍間で同等であった。
【３４１５】
【表５８】

表４８．ＲＥＰの生存率（ＴＩＬ最終製品）

腫瘍 ID	L4054		L4055		M1085T	
プロセス	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
REP 開始	98.23%	97.97%	97.43%	92.03%	81.85%	68.27%
スケールアップ	94.00%	93.57%	90.50%	95.93%	78.55%	71.15%
採取	87.95%	89.85%	87.50%	86.70%	86.10%	87.45%

【３４１６】
１フラスコ当たりの断片の数が最大必要数未満であったため、採取日の推定細胞数を腫瘍毎に計算した。推定は、臨床腫瘍が０日目に２つまたは３つのフラスコに播種するのに十分な大きさであるという予想に基づいた。
【３４１７】

【表５９】

表４９．Ｇｅｎ３プロセスでのフルスケール２及び３フラスコへの外挿推定細胞数計算。

腫瘍ID	L4054		L4055		M1085T	
Gen3 プロセス	２フラスコ	３フラスコ	２フラスコ	３フラスコ	２フラスコ	３フラスコ
推定採取	3.68E+10	5.52E+10	1.75E+10	2.63E+10	1.54E+10	2.30E+10

【３４１８】

免疫表現型決定－ＴＩＬ最終製品の表現型マーカー比較。３つの腫瘍Ｌ４０５４、Ｌ４０５５、及びＭ１０８５Ｔは、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスの両方でＴＩＬ拡張を受けた。採取時に、ＲＥＰ　ＴＩＬ最終製品をフローサイトメトリー分析にかけ、純度、分化、及びメモリーマーカーを試験した。すべての条件で、ＴＣＲ　ａ／ｂ＋細胞パーセンテージは９０％超であった。

【３４１９】

Ｇｅｎ３プロセスから採取されたＴＩＬは、Ｇｅｎ２プロセスから採取されたＴＩＬと比較して、より高いＣＤ８及びＣＤ２８発現を示した。Ｇｅｎ２プロセスは、より高いＣＤ４＋パーセンテージを示した。

【３４２０】

Ｇｅｎ３プロセスから採取したＴＩＬは、Ｇｅｎ２プロセス由来のＴＩＬと比較して、セントラルメモリー区画でより高い発現を示した。

【３４２１】

活性化及び疲弊マーカーを２つの腫瘍Ｌ４０５４及びＬ４０５５由来のＴＩＬで分析して、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３　ＴＩＬ拡張プロセス由来の最終ＴＩＬ製品を比較した。活性化及び疲弊マーカーは、Ｇｅｎ２プロセスとｇｅｎ３プロセスとの間で同等であった。

【３４２２】

再刺激時のインターフェロンガンマ分泌。採取日、Ｇｅｎ２の場合は２２日目、Ｇｅｎ３の場合は１６日目に、ＴＩＬは、Ｌ４０５４及びＬ４０５５の場合、コーティングした抗ＣＤ３プレートで一晩再刺激を受けた。Ｍ１０８５Ｔでの再刺激は、抗ＣＤ３、ＣＤ２８、及びＣＤ１３７ビーズを使用して行った。すべての条件で再刺激の２４時間後に上清を収集し、上清を凍結させた。ＥＬＩＳＡによるＩＦＮγ分析を、同じＥＬＩＳＡプレートを使用して両方のプロセス由来の上清で同時に評価した。分析した３つの腫瘍で、Ｇｅｎ３プロセス由来のＩＦＮγのより高い産生が観察された。

【３４２３】

培養培地中のＩＬ－２レベルの測定。Ｇｅｎ２プロセスとｇｅｎ３プロセスとの間のＩＬ－２消費量を比較するために、腫瘍Ｌ４０５４及びＬ４０５５で、ＲＥＰの開始時、スケールアップ時、及び採取日に細胞上清を収集した。細胞培養上清中のＩＬ－２の量を、Ｒ＆Ｄ製の定量化ＥＬＩＳＡキットによって測定した。一般的な傾向は、Ｇｅｎ２プロセスと比較して、Ｇｅｎ３プロセスではＩＬ－２濃度が高いままであることを示す。これは、プロセス全体を通して培地のキャリーオーバーと相まってＧｅｎ３のＲＥＰ開始時のＩＬ－２濃度がより高い（６０００ＩＵ／ｍＬ）ことに起因する可能性がある。

【３４２４】

代謝基質及び代謝物分析。Ｄ－グルコース及びＬ－グルタミンなどの代謝基質のレベルを、全培地消費量の代わりに測定した。乳酸及びアンモニアなどのそれらの相互代謝物を測定した。グルコースは、ＡＴＰの形態でエネルギーを産生するためにミトコンドリアによって利用される培地中の単糖である。グルコースが酸化されると、乳酸が産生される（乳酸塩は乳酸のエステルである）。乳酸塩は、細胞の指数関数的成長期中に強く産生される。高レベルの乳酸塩は、細胞培養プロセスに悪影響を及ぼす。

【３４２５】

Ｌ４０５４及びＬ４０５５の使用済み培地を、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスの両方で

、ＲＥＰ開始時、スケールアップ時、及び採取日に収集した。使用済み培地の収集は、Ｇｅｎ２の場合は１１日目、１６日目、及び２２日目、Ｇｅｎ３の場合は７日目、１１日目、及び１６日目であった。上清を、グルコース、乳酸、グルタミン、ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）、及びアンモニアの濃度についてＣＥＤＥＸバイオアナライザーで分析した。

【３４２６】

Ｌ－グルタミンは、細胞培養培地製剤に必要な不安定な必須アミノ酸である。グルタミンにはアミンが含まれており、このアミド構造基は、窒素を細胞に輸送して送達することができる。Ｌ－グルタミンが酸化すると、細胞によって有毒なアンモニア副産物が産生される。Ｌ－グルタミンの分解に対抗するために、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスの培地に、水溶液中でより安定しており、かつ自発的に分解しないＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を補充した。２つの腫瘍株では、Ｇｅｎ３アームは、プロセス中のＬ－グルタミン及びＧｌｕｔａＭａｘ（商標）の減少、ならびにＲＥＰ全体でアンモニアの増加を示した。Ｇｅｎ２アームでは、Ｌ－グルタミン及びＧｌｕｔａＭａｘ（商標）の濃度が一定であり、アンモニア産生のわずかな増加が観察された。Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３のプロセスは、アンモニアについて採取日に同等であり、Ｌ－グルタミン分解にわずかな違いが見られた。

【３４２７】

テロメアは、Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨによって繰り返される。Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨ技術を使用して、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスでのＬ４０５４及びＬ４０５５のテロメア反復の平均長を測定した。相対テロメア長（ＲＴＬ）の決定を、ＤＡＫＯ製のフローサイトメトリー分析用Ｔｅｌｏｍｅｒｅ　ＰＮＡキット／ＦＩＴＣを使用して計算した。Ｇｅｎ３は、Ｇｅｎ２と同等のテロメア長を示した。

【３４２８】

ＣＤ３分析各プロセスで生成された細胞製品のクローン多様性を決定するために、Ｌ４０５４及びＬ４０５５の採取したＴＩＬ最終製品を試料採取し、Ｔ細胞受容体のＣＤＲ３部分の配列決定によるクローン多様性分析についてアッセイした。

【３４２９】

表５０は、採取したＴＩＬ細胞製品のＬ４０５４における共有される固有のＣＤＲ３配列パーセンテージに関するＧｅｎ２とＧｅｎ３との比較を示す。１９９個の配列がＧｅｎ３最終製品とＧｅｎ２最終製品との間で共有され、Ｇｅｎ３最終製品と共有されるＧｅｎ２由来の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の９７．０７％に相当する。

【３４３０】

【表６０】

表５０．Ｌ４０５４のＧｅｎ２プロセスとＧｅｎ３プロセスとの間で共有されるｕＣＤＲ３配列の比較。

	すべての uCDR3		uCDR3 の上位 80%	
uCDR3 数(重複率%)	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
Gen2-L4054	8915	4355(48.85%)	205	199(97.07%)
Gen3-L4054	-	18130	-	223

【３４３１】

表５１は、採取したＴＩＬ細胞製品のＬ４０５５における共有される固有のＣＤＲ３配列パーセンテージに関するＧｅｎ２とＧｅｎ３との比較を示す。１８３３個の配列がＧｅｎ３最終製品とＧｅｎ２最終製品との間で共有され、Ｇｅｎ３最終製品と共有されるＧｅｎ２由来の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の９９．４５％に相当する。

【３４３２】

【表６１】

表５１．Ｌ４０５５のＧｅｎ２プロセスとＧｅｎ３プロセスとの間で共有されるｕＣＤＲ３配列の比較。

uCDR3 数 (重複率%)	すべての uCDR3		uCDR3 の上位 80%	
	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
Gen2-L4055	12996	6599(50.77%)	1843	1833(99.45%)
Gen3-L4055	-	27246	-	2616

【３４３３】
ＣＭ１及びＣＭ２培地は、濾過せずに事前に調製し、腫瘍Ｌ４０５５の場合、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスで使用のために使用するまで４℃で保持した。
【３４３４】
Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスのＲＥＰ開始日に、腫瘍Ｌ４０５５の場合、培地を３７℃で事前に２４時間温めた。
【３４３５】
これらのプロセスで収集した上清中にＬＤＨは測定されなかった。
【３４３６】
Ｍ１０８５Ｔ　ＴＩＬ細胞計数を、Ｋ２　ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ細胞カウンターを使用して実行した。
【３４３７】
腫瘍Ｍ１０８５Ｔでは、代謝分析用の上清、活性化及び疲弊マーカー分析用のＴＩＬ産物、テロメア長、及びＣＤ３－ＴＣＲ　ｖｂ分析などの試料は入手できなかった。
【３４３８】
結論この実施例では、３つの独立したドナー腫瘍組織を、機能的品質属性に加えて、拡張された表現型特徴付け、ならびにＧｅｎ２プロセス及びＧｅｎ３プロセス間の培地消費に関して比較する。
【３４３９】
Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３のＲＥＰ前及びＲＥＰ拡張の比較を、生成された全生細胞及び全有核細胞集団の生存率に関して評価した。採取日のＴＶＣ細胞用量は、Ｇｅｎ２（２２日）とＧｅｎ３（１６日）との間で同等ではなかった。Ｇｅｎ３細胞用量は、採取時に収集した全生細胞の約４０％であり、Ｇｅｎ２よりも低かった。
【３４４０】
ＲＥＰ前採取は、７日目ではなく１１日目に起こり、ＲＥＰ採取は、１６日目ではなく２２日目に起こると仮定して、Ｇｅｎ３プロセスの外挿細胞数を計算した。どちらの場合も、Ｇｅｎ３は、Ｇｅｎ２プロセスと比較してＴＶＣの数値が近いことを示し、初期活性化により、ＴＩＬの成長が増強したことを示す。
【３４４１】
Ｇｅｎ３プロセスでの追加フラスコ（２つまたは３つ）の外挿値の場合、処理される腫瘍サイズがより大きいと仮定し、記載されるようにプロセス毎に必要な最大断片数に到達する。２２日目のＧｅｎ２プロセスと比較して、Ｇｅｎ３プロセスの１６日目の採取時にＴＶＣで同様の用量に到達可能であり得ることが観察された。この観察は重要であり、培養物の早期活性化がＴＩＬ処理時間を短縮したことを示す。
【３４４２】
Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３のＲＥＰ前及びＲＥＰ拡張の比較を、生成された全生細胞及び全有核細胞集団の生存率に関して評価した。採取日のＴＶＣ細胞用量は、Ｇｅｎ２（２２日）とＧｅｎ３（１６日）との間で同等ではなかった。Ｇｅｎ３細胞用量は、採取時に収集した全生細胞の約４０％であり、Ｇｅｎ２よりも低かった。
【３４４３】

表現型特徴付けに関して、Ｇｅｎ２プロセスと比較してＧｅｎ３プロセスでの３つの腫瘍でより高いＣＤ８＋及びＣＤ２８＋発現が観察された。

【３４４４】

Ｇｅｎ３プロセスは、Ｇｅｎ２プロセスと比較してわずかに高いセントラルメモリー区画を示した。

【３４４５】

Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスは、Ｇｅｎ３プロセスの期間がより短いにもかかわらず、同等の活性化及び疲弊マーカーを示した。

【３４４６】

ＩＦＮガンマ（ＩＦＮγ）産生は、分析した３つの腫瘍において、Ｇｅｎ２と比較してＧｅｎ３最終製品において３倍高かった。このデータは、Ｇｅｎ３プロセスがｇｅｎ２プロセスと比較して高機能でより強力なＴＩＬ製品を生成したことを示し、Ｇｅｎ３でのＣＤ８及びＣＤ２８発現がより高いことに起因する可能性がある。表現型特徴付けは、Ｇｅｎ２プロセスと比較して３つの腫瘍でＣＤ８＋、ＣＤ２８＋発現へのＧｅｎ３の肯定的な傾向を示唆した。

【３４４７】

Ｇｅｎ２とＧｅｎ３との間のＴＩＬ最終製品のテロメア長は同等であった。

【３４４８】

グルコース及び乳酸塩レベルは、Ｇｅｎ２最終産物とＧｅｎ３最終産物との間で同等であり、プロセス日毎に減容除去が実行されなかったこと、及びＧｅｎ２と比較してプロセスにおける培地全体の体積が少ないことに起因して、Ｇｅｎ３プロセスの培地の栄養素レベルが影響されなかったことを示唆する。

【３４４９】

全体として、Ｇｅｎ３プロセスは、Ｇｅｎ２プロセスと比較してほぼ２倍の処理時間の短縮を示し、これにより、Ｇｅｎ３プロセスによって拡張されたＴＩＬ製品の売上原価（ＣＯＧ）の有意な削減がもたらされるであろう。

【３４５０】

ＩＬ－２消費は、Ｇｅｎ２プロセスでのＩＬ－２消費の一般的な傾向を示しており、Ｇｅｎ３プロセスでは、古い培地が除去されなかったため、ＩＬ－２が高かった。

【３４５１】

Ｇｅｎ３プロセスは、ＣＤＲ３　ＴＣＲａｂ配列分析によって測定されたより高いクローン多様性を示した。

【３４５２】

Ｇｅｎ３プロセスを使用して、ＲＥＰ前の０日目のフィーダー及びＯＫＴ－３の追加により、ＴＩＬの初期活性化が可能になり、ＴＩＬ成長が可能になった。

【３４５３】

表５２は、現在のＧｅｎ２プロセスと比較したＧｅｎ３プロセスの様々な実施形態及び成果を説明する。

【３４５４】

【表６２】

表５２．例示的なＧｅｎ３プロセス特徴。

ステップ	プロセス Gen2 の実施形態	プロセス Gen3 の実施形態
REP 前- 0 日目	50 個以下の断片 1X G-REX-100MCS 1L 培地 IL-2(6000IU/mL) 11 日	240 個以下の断片 60 個以下の断片/フラスコ 4 つ以下のフラスコ ≦2L 培地(500mL/フラスコ) IL-2(6000IU/mL) 2.5×10^8 個のフィーダー細胞/フラスコ 15ug の OKT3/フラスコ
REP 開始	REP に指向した新鮮な TIL 11 日目 $200e^6$ 個以下の生細胞 5×10^9 フィーダー細胞 G-REX-500MCS 5L CM2 培地+IL-2(3000IU/mL) 150μg OKT3	REP に指向した新鮮な TIL 7 日目 培養物全体を活性化する 5×10^8 フィーダー細胞 30μg の OKT3/フラスコ G-REX-100MCS 500mL 培地+IL-2(6000IU/mL)
TIL 継代培養またはスケールアップ	≦5G-REX-500MCS 1×10 個以下の生細胞/フラスコ 5L/フラスコ 16 日目	≦4G-REX-500MCS 培養物全体をスケールアップする 4L/フラスコ 10~11 日目
採取	22 日目に採取 LOVO-自動細胞洗浄機 2 回の洗浄サイクル	16 日目に採取する LOVO-自動細胞洗浄機 5 回の洗浄サイクル
最終製剤	凍結保存した製品 LN_2 中の 300IU/mL の IL2-CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品 LN_2 中 300IU/mL の IL-2-CS10 複数のアリコート
プロセス時間	22 日	16 日

【３４５５】

実施例１１：例示的なＧＥＮ３プロセス（ＧＥＮ３．１とも称される）

この実施例は、「ＴＩＬ拡張のためのＧｅｎ２プロセスとＧｅｎ３プロセスとの間の比較可能性」に関するさらなる研究について説明する。Ｇｅｎ３プロセスを、表現型及び機能プロファイルを維持しながら、最終総生細胞（ＴＶＣ）出力を増やすことを目的として、プロセスの初期に活性化ステップを含むように修正した。以下に記載されるように、Ｇｅｎ３実施形態をさらなる実施形態として修正し、本明細書におけるこの実施例ではＧｅｎ３．１と称する。

【３４５６】

いくつかの実施形態では、Ｇｅｎ３．１　ＴＩＬ製造プロセスは、以下の４つのオペレーター介入を有する。

１．腫瘍断片の単離及び活性化：プロセスの０日目に腫瘍を解剖し、最終断片を各々約３×３ｍｍ（合計で最大２４０個の断片）を生成し、１～４つのＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコ内で培養した。各フラスコは、最大６０個の断片、６，０００ＩＵのｒｈＩＬ－２、１５μｇのＯＫＴ３、及び２．５×１０^{8}個の放射線照射した同種異系単核細胞を補充した５００ｍＬのＣＭ１またはＤＭ１培地を含んだ。培養物を３７℃で６～８日間インキュベートした。

２．ＴＩＬ培養再活性化：７～８日目に、いずれの場合も６，０００ＩＵのｒｈＩＬ－２、３０μｇのＯＫＴ３、及び５×１０^{8}個の放射線照射した同種異系単核細胞を補充したＣＭ２またはＤＭ１培地をゆっくり添加することによって、培養物を補充した。フラスコの底にある既存の細胞を乱さないように注意した。培養物を３７℃で３～４日間インキ

ュベートした。
３．培養のスケールアップ：１０～１１日目に生じる。培養のスケールアップ中に、Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳの全内容物を、いずれの場合も３，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した４ＬのＣＭ４またはＤＭ２を含むＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコに移した。採取するまでフラスコを３７℃で５～６日間インキュベートした。
４．採取／洗浄／製剤化：１６～１７日目に、フラスコを減容させ、プールする。細胞を濃縮し、１％ＨＳＡを含有するＰｌａｓｍａＬｙｔｅ Ａ ｐＨ７．４で洗浄した。洗浄した細胞懸濁液を、ＣｒｙｏＳｔｏｒ１０と１：１の比で配合し、３００ＩＵ／ｍＬの最終濃度までｒｈＩＬ－２を補充した。

【３４５７】
ＤＰを制御された速度の凍結で凍結保存し、気相液体窒素中で保管した。＊完全標準ＴＩＬ培地１、２、または４（ＣＭ１、ＣＭ２、ＣＭ４）は、上記のように、合成培地（ＤＭ１またはＤＭ２）と称されるＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞無血清拡張培地の代用となり得た。

【３４５８】
プロセスの説明０日目に、腫瘍を３回洗浄し、その後、３×３×３の最終断片に断片化した。全腫瘍を断片化した時点で、最終断片を均等にランダム化し、３つのプールに分割した。１つのランダム化断片プールを各群に導入し、３つの実験マトリックス毎に同じ数の断片を添加した。

【３４５９】
全ＴＩＬ拡張プロセスにわたって、腫瘍Ｌ４０６３拡張を標準培地で行い、腫瘍Ｌ４０６４拡張を合成培地（ＣＴＳ ＯｐＴｍｉｚｅｒ）で行った。培地の成分を本明細書に記載する。

【３４６０】
ＣＭ１完全培地１：２ｍＭ ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）、１０％ヒトＡＢ血清、ゲンタマイシン（５０ｕｇ／ｍＬ）、２－メルカプトエタノール（５５ｕＭ）を補充したＲＰＭＩ＋グルタミン。６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終培地製剤

【３４６１】
ＣＭ２完全培地２：５０％ ＣＭ１培地＋５０％ ＡＩＭ－Ｖ培地。６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終培地製剤

【３４６２】
ＣＭ４完全培地４：ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）（２ｍＭ）を補充したＡＩＭ－Ｖ。３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終培地製剤

【３４６３】
ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（２６ｍＬ／Ｌ）を補充したＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ。

【３４６４】
ＤＭ１：ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（２６ｍＬ／Ｌ）、及びＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ ＳＲ（３％）をＧｌｕｔａＭａｘ（２ｍＭ）とともに補充したＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ。６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終製剤。

【３４６５】
ＤＭ２：ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（２６ｍＬ／Ｌ）、及びＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ ＳＲ（３％）をＧｌｕｔａＭａｘ（２ｍＭ）とともに補充したＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ。３，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終製剤。

【３４６６】

使用したすべてのタイプの培地、すなわち、完全培地（ＣＭ）及び合成培地（ＤＭ）を事前に調製し、使用前日まで４℃で保持し、プロセス日前に事前に最長２４時間にわたってインキュベーター内で３７℃で温めた。

【３４６７】

ＴＩＬ培養再活性化は、両方の腫瘍で７日目に起こった。スケールアップは、Ｌ４０６３では１０日目、Ｌ４０６４では１１日目に起こった。両方の培養物を採取し、１６日目に凍結保存した。

【３４６８】

達成した結果Ｇｅｎ３．０プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスの細胞計数及び生存率％を決定した。すべての条件下での拡張は、この実施例に説明される詳細に従った。

【３４６９】

腫瘍毎に、断片を同数の３つのプールに分割した。腫瘍のサイズが小さいため、１フラスコ当たりの断片の最大数は達成されなかった。３つの異なるプロセスについて、総生細胞及び細胞生存率を条件毎に評価した。細胞数を、７日目の再活性化のＴＶＣ、１０日目（Ｌ４０６４）または１１日目（Ｌ４０６３）のスケールアップのＴＶＣ、及び１６／１７日目の採取時のＴＶＣとして決定した。

【３４７０】

７日目及び１０／１１日目の細胞数をＦＩＯ測定した。倍率拡張を、１６／１７日目の採取時のＴＶＣを７日目の再活性化日のＴＶＣで割ることによって計算した。３つの群を比較するために、採取日のＴＶＣを、０日目の培養物中に添加した断片の数で割って、１断片当たりの生細胞の平均を計算した。

【３４７１】

Ｌ４０６３及びＬ４０６４について、細胞数及び生存率アッセイを行った。Ｇｅｎ３．１－試験プロセスは、両方の腫瘍でＧｅｎ３．０プロセスよりも多くの１断片当たりの細胞数をもたらした。

【３４７２】

総生細胞数及び倍率拡張、プロセス中の生存率％再活性化時に、スケールアップして採取し、すべての条件で生存率％を行った。１６／１７日目の採取日に、最終ＴＶＣを生存率％の放出基準と比較した。評価したすべての条件は、７０％の生存率基準を超え、プロセス及び腫瘍全体で同等であった。

【３４７３】

免疫表現型決定－ＴＩＬ最終製品の表現型特徴付け。最終製品をフローサイトメトリー分析にかけ、純度、分化、及びメモリーマーカーを試験した。集団の割合は、すべての条件で、ＴＣＲα／β細胞、ＣＤ４＋細胞、及びＣＤ８＋細胞で一貫していた。

【３４７４】

ＲＥＰ　ＴＩＬの拡張表現型分析を行った。ＴＩＬ製品は、両方の腫瘍でＧｅｎ３．０と比較してＧｅｎ３．１条件でより高いＣＤ４＋細胞パーセンテージを示し、両方の条件でＧｅｎ３．１条件と比較してＧｅｎ３．０でより高いＣＤ８＋集団由来のＣＤ２８＋細胞パーセンテージを示した。

【３４７５】

Ｇｅｎ３．０プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスから採取されたＴＩＬは、ＣＤ４＋細胞及びＣＤ８＋細胞でのＣＤ２７及びＣＤ５６発現と同等の表現型マーカー、ならびにＣＤ４＋ゲート細胞集団での同等のＣＤ２８発現を示した。ＴＩＬ最終製品のメモリーマーカーの比較：

【３４７６】

１６日目に採取したＴＩＬの凍結試料を分析のために染色した。ＴＩＬメモリーステータスは、Ｇｅｎ３．０プロセスとＧｅｎ３．１プロセスとの間で同等であった。ＴＩＬ最終製品の活性化及び疲弊マーカーの比較：

【３４７７】

活性化及び疲弊マーカーは、ＣＤ４＋細胞及びＣＤ８＋細胞上でゲートされたＧｅｎ３

．０プロセスとＧｅｎ３．１プロセスとの間で同等であった。
【３４７８】
再刺激時のインターフェロンガンマ分泌。採取したＴＩＬは、Ｌ４０６３及びＬ４０６４用のコーティングされた抗ＣＤ３プレートで一晩再刺激を受けた。Ｇｅｎ３．０プロセスと比較して、分析した２つの腫瘍で、より高いＧｅｎ３．１プロセスからのＩＦＮγ産生が観察された。
【３４７９】
培養培地中のＩＬ－２レベルの測定。すべての条件及びプロセス間のＩＬ－２消費レベルを比較するために、細胞上清を、７日目の再活性化の開始時、１０日目（Ｌ４０６４）／１１日目（Ｌ４０６３）のスケールアップ時、及び１６／１７日目の採取及び凍結時に収集した。その後、上清を解凍し、分析した。細胞培養上清中のＩＬ－２の量を、製造業者のプロトコルによって測定した。
【３４８０】
全体的なＧｅｎ３プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスは、同じ培地条件で評価した全プロセス中のＩＬ－２消費に関して同等であった。Ｌ４０６３及びＬ４０６４用に収集した使用済み培地のＩＬ－２濃度（ｐｇ／ｍＬ）分析。
【３４８１】
代謝物分析使用済み培地の上清を、Ｌ４０６３及びＬ４０６４について、すべての条件で、７日目の再活性化の開始時、１０日目（Ｌ４０６４）または１１日目（Ｌ４０６３）のスケールアップ時、及び１６／１７日目の採取時に、Ｌ４０６３及びＬ４０６４から収集した。上清をＣＥＤＥＸバイオアナライザーでグルコース、乳酸塩、グルタミン、ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）、及びアンモニアの濃度について分析した。
【３４８２】
合成培地は、完全培地（２ｇ／Ｌ）と比較してより高いグルコース濃度４．５ｇ／Ｌを有する。全体として、グルコースの濃度及び消費量は、各培地タイプ内でＧｅｎ３．０プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスにおいて同等であった。
【３４８３】
乳酸塩の増加が観察され、乳酸塩の増加は、Ｇｅｎ３．０条件とＧｅｎ３．１条件との間、及び再活性化拡張に使用した２つの培地（完全培地と合成培地）間で同等であった。
【３４８４】
いくつかの場合において、標準基礎培地は、２ｍＭのＬ－グルタミンを含有し、培養条件下でＬ－グルタミンのＬ－グルタミン酸塩及びアンモニアへの自然分解を補うために、２ｍＭのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）で補充された。
【３４８５】
いくつかの場合において、使用した合成（無血清）培地は、基礎培地にＬ－グルタミンを含有せず、最終濃度が２ｍＭになるまでＧｌｕｔａＭａｘ（商標）のみで補充された。ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）は、Ｌ－アラニンとＬ－グルタミンのジペプチドであり、水溶液中でＬ－グルタミンよりも安定しており、グルタミン酸塩及びアンモニアに自発的に分解しない。代わりに、ジペプチドは、個々のアミノ酸に徐々に解離し、それにより、より低いが十分な濃度のＬ－グルタミンを維持して、強力な細胞成長を維持する。
【３４８６】
いくつかの場合において、グルタミン濃度及びＧｌｕｔａＭａｘ（商標）濃度は、スケールアップ日にわずかに減少したが、採取日には再活性化日と比較して同様またはより近いレベルへの増加を示した。Ｌ４０６４の場合、グルタミン濃度及びＧｌｕｔａＭａｘ（商標）濃度は、全プロセス中、異なる条件間で同様の速度でわずかな分解を示した。
【３４８７】
アンモニア濃度は、２ｍＭのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を含有する合成培地中で成長させた試料よりも、２ｍＭのグルタミン＋２ｍＭのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を含有する標準培地中で成長させた試料で高かった。さらに、予想通り、培養の過程にわたってアンモニアの段階的増加または蓄積があった。３つの異なる試験条件間でアンモニア濃度に差は

なかった。

【３４８８】

Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨによるテロメア反復：Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨ技術を使用して、Ｇｅｎ３プロセス及びＧｅｎ３．１プロセス下でのＬ４０６３及びＬ４０６４のテロメア反復の平均長を測定した。相対テロメア長（ＲＴＬ）の決定を、ＤＡＫＯ製のフローサイトメトリー分析用Ｔｅｌｏｍｅｒｅ　ＰＮＡキット／ＦＩＴＣを使用して計算した。テロメアアッセイを行った。試料のテロメア長を、対照細胞株（１３０１白血病）と比較した。対照細胞株は、長くて安定したテロメアを有する四倍体細胞株であり、相対テロメア長の計算を可能にする。両方の腫瘍で評価したＧｅｎ３プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスは、同等のテロメア長を示した。

【３４８９】

ＴＣＲ　Ｖβレパートリー分析

各プロセスで生成された細胞製品のクローン多様性を決定するために、ＴＩＬ最終製品をＴ細胞受容体のＣＤＲ３部分の配列決定によるクローン多様性分析のためにアッセイした。

【３４９０】

３つのパラメータを３つの条件間で比較した。

●固有のＣＤＲ３（ｕＣＤＲ３）の多様性指数

●ｕＣＤＲ３共有％

●ｕＣＤＲ３の上位８０％の場合：

○共有されるｕＣＤＲ３コピーの％を比較する

○固有のクロノタイプの頻度を比較する

【３４９１】

対照及びＧｅｎ３．１試験、ＴＩＬで採取した細胞製品で共有される固有のＣＤＲ３配列パーセンテージ：９７５個の配列がＧｅｎ３試験最終産物とＧｅｎ２試験最終産物との間で共有され、Ｇｅｎ３．１と共有されるＧｅｎ３由来の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の８８％に相当する。

【３４９２】

対照及びＧｅｎ３．１試験、ＴＩＬで採取した細胞製品で共有される固有のＣＤＲ３配列パーセンテージ：２１６３個の配列がＧｅｎ３試験最終製品とＧｅｎ２試験最終製品との間で共有され、Ｇｅｎ３．１と共有されるＧｅｎ３由来の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の８７％に相当する。

【３４９３】

異なるプロセスについて、１６日目の採取時に収集した1×10^{6}個の細胞から特定された固有のＣＤ３配列の数。Ｇｅｎ３．１試験条件は、試料内の固有のペプチドＣＤＲの数に基づいて、Ｇｅｎ３．０と比較してわずかに高いクローン多様性を示した。

【３４９４】

シャノンエントロピー多様性指数は、比較のための信頼性の高い一般的なメトリックであり、両方の腫瘍に対するＧｅｎ３．１条件は、Ｇｅｎ３．０プロセスよりもわずかに高い多様性を示し、Ｇｅｎ３．１試験条件のＴＣＲ　ＶβレパートリーがＧｅｎ３．０プロセスよりもポリクローナルであることを示唆する。

【３４９５】

加えて、Ｇｅｎ３．１試験条件のＴＣＲ　Ｖβレパートリーは、腫瘍Ｌ４０６３及びＬ４０６４の両方でＧｅｎ３．０プロセスの対応するレパートリーと８７％を超える重複を示した。

【３４９６】

再活性化日のＧｅｎ３．１試験Ｌ４０６４の使用済み培地のＩＬ－２濃度の値は、期待値を下回った（Ｇｅｎ３．１対照及びＧｅｎ３．０条件と同様であった）。

【３４９７】

低い値はピペッティングエラーに起因した可能性があったが、最小限の試料しか採取で

きなかったため、アッセイを繰り返すことができなかった。
【３４９８】
結論０日目のフィーダー及びＯＫＴ－３を含むＧｅｎ３．１試験条件は、Ｇｅｎ３．０及びＧｅｎ３．１対照と比較して、１６日目の採取時の細胞用量のＴＶＣがより高いことを示した。Ｇｅｎ３．１試験条件のＴＶＣ最終製品は、Ｇｅｎ３．０よりも約２．５倍高かった。
【３４９９】
試験した腫瘍試料の両方について、０日目にＯＫＴ－３及びフィーダーを添加したＧｅｎ３．１試験条件は、採取時にフラスコの最大容量に達した。これらの条件下で、０日目に最大４つのフラスコを開始した場合、最終細胞用量は、８０～１００×10^9ＴＩＬである可能性があった。
【３５００】
最終ＴＩＬ製品の純度、疲弊、活性化、及びメモリーマーカーを含む表現型特徴付けなどのすべての品質属性が、Ｇｅｎ３．１試験とＧｅｎ３．０プロセスとの間で維持された。
【３５０１】
最終ＴＩＬ製品のＩＦＮ－γ産生は、分析した２つの腫瘍において、Ｇｅｎ３．０と比較して、０日目にフィーダー及びＯＫＴ－３を添加したＧｅｎ３．１で３倍高く、Ｇｅｎ３．１プロセスが強力なＴＩＬ製品を生成したことを示唆する。
【３５０２】
試験条件にわたって、グルコースまたは乳酸塩レベルに差異は観察されなかった。培地条件にわたって、Ｇｅｎ３．０プロセスとＧｅｎ３．１プロセスとの間でグルタミン及びアンモニアに差異は観察されなかった。培地上の低レベルのグルタミンは、細胞増殖を制限しておらず、培地へのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）のみの添加が、細胞を増殖させるのに必要な栄養素を与えるのに十分であることを示唆する。
【３５０３】
１１日目及び１０日目のスケールアップは、それぞれ、プロセスの採取日に到達した細胞数に関して大きな差異を示さず、代謝物の消費量は、全プロセスにわたって両方の場合で同等であった。この観察結果は、Ｇｅｎ３．０最適化プロセスが処理日に柔軟性を有し、それにより、製造スケジュールの柔軟性を促進することができることを示唆している。
【３５０４】
０日目にフィーダー及びＯＫＴ－３を添加したＧｅｎ３．１プロセスは、Ｇｅｎ３．０と比較して、ＣＤＲ３　ＴＣＲａｂ配列分析によって測定されたより高いクローン多様性を示した。
【３５０５】
図３２は、Ｇｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３最適化プロセス）の実施形態を説明する。標準培地及びＣＴＳ　Ｏｐｔｉｍｉｚｅｒ無血清培地を、Ｇｅｎ３最適化プロセスＴＩＬ拡張に使用することができる。ＣＴＳ　Ｏｐｔｉｍｉｚｅｒの場合、培地のＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を最終濃度４ｍＭに増加させるために無血清培地が推奨される。
【３５０６】
実施例１２：ＣＬＬ患者におけるＰＢＭＣ由来のＰＢＬを選択及び拡張する例示的な実施形態。
ＰＢＭＣを患者から収集し、後に使用するために凍結させるか、または新鮮な状態で使用するかのいずれかを行う。十分な量の末梢血を収集して、本発明の方法における出発材料用に少なくとも約４００，０００，０００（４００×10^6）個のＰＢＭＣを産生する。方法の０日目に、６×10^6ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を新たに調製するかまたは解凍し、使用する準備ができるまで４℃または氷上で保存する。２００ｍＬのＣＭ２培地を、１００ｍＬのＣＭ１培地（ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標）を含有する）を１００ｍＬのＡＩＭ－Ｖと合わせ、その後、それをＡＩＭ－Ｖと１：１で希釈してＣＭ２を作製することによって調製する。ＣＭ２を光から保護し、使用しないときはしっかりと密閉する。

【３５０７】
以下のステップをすべて、滅菌細胞培養条件下で行う。ＣＭ２のアリコートを、凍結したＰＢＭＣ試料の解凍及び／または洗浄に使用するために、３７℃の水浴内の５０ｍＬコニカルチューブ中で温める。凍結ＰＢＭＣ試料を使用する場合、試料を冷凍庫から取り出し、解凍する準備が整うまでドライアイス上で保管する。ＰＢＭＣクライオバイアルを解凍する準備が整った時点で、５ｍＬのＣＭ２培地を５０ｍＬの滅菌コニカルチューブに入れる。ＰＢＭＣ試料クライオバイアルを、数個の氷晶しか残らなくなるまで３７℃の水浴中に配置する。温めたＣＭ２培地を、１：１の試料：培地体積比（約１ｍＬ）で試料バイアルに滴加する。全内容物をクライオバイアルから取り出し、５０ｍＬのコニカルチューブ内の残りのＣＭ２培地に移す。追加の１～２ｍＬのＣＭ２培地を使用してクライオバイアルをすすぎ、クライオバイアルの全内容物を取り出し、５０ｍＬのコニカルチューブに移す。その後、コニカルチューブ内の体積を追加のＣＭ２培地で１５ｍＬに調整し、穏やかに回転させて、細胞をすすぐ。その後、コニカルチューブを４００ｇで５分間、室温で遠心分離して、細胞ペレットを収集する。
【３５０８】
上清をペレットから除去し、コニカルチューブにキャップをし、その後、細胞ペレットを、例えば、粗面に沿ってチューブをこすることによって破砕する。約１ｍＬのＣＭ２培地を細胞ペレットに添加し、ペレット及び培地をピペットで５～１０回上下に吸引して、細胞ペレットを破砕する。さらに３～５ｍＬのＣＭ２培地をチューブに添加し、ピペットで混合して、細胞を懸濁する。この時点で、細胞懸濁液の体積を記録する。自動セルカウンター、例えばＮｅｘｃｅｌｏｍ　Ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２で細胞を計数するために、１００ｕＬの細胞懸濁液をチューブから取り出す。試料中の生細胞の数を決定し、記録する。
【３５０９】
表現型決定及び他の特徴付け実験のために、最低５×１０^{6}個の細胞を保存する。保管した細胞を室温で５分間、４００ｇで回転させて、細胞ペレットを収集する。細胞ペレットを凍結培地（２０％ＤＭＳＯを含有する滅菌熱不活性化ＦＢＳ）に再懸濁する。保存した細胞の１つまたは２つのアリコートを凍結培地中で凍結し、－８０℃の冷凍庫内のセルフリーザー（Ｍｒ．Ｆｒｏｓｔｙ）でアリコートをゆっくりと凍結させる。－８０℃で最低２４時間後、液体窒素ストレージに移す。
【３５１０】
以下のステップでは、予冷した溶液を使用し、素早く作業し、細胞を冷たく保つ。次のステップは、ＰＢＭＣ試料のＴ細胞画分を精製することである。これは、Ｐａｎ　Ｔ細胞単離キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ番号１３０－０９６－５３５）を使用して完了する。ＰＢＳ、０．５％　ＢＳＡ、及び２ｍＭ　ＥＤＴＡを含有するｐＨ７．２の無菌ろ過洗浄バッファーで細胞を洗浄することによって、精製用の細胞を調製する。ＰＢＭＣ試料を４００ｇで５分間遠心分離して、細胞ペレットを収集する。上清を吸引除去し、細胞ペレットを１０^{7}個の細胞毎に４０ｕＬの洗浄緩衝液中に再懸濁する。１０^{7}個の細胞毎に１０ｕＬのＰａｎ　Ｔ細胞ビオチン抗体カクテルを添加する。十分に混合し、冷蔵庫内または氷上で５分間インキュベートする。１０^{7}個の細胞毎に３０ｕＬの洗浄緩衝液を添加する。１０^{7}個の細胞毎に２０ｕＬのＰａｎ　Ｔ細胞マイクロビーズカクテルを添加する。十分に混合し、冷蔵庫内または氷上で１０分間インキュベートする。ＬＳカラムを調製し、細胞をマイクロビーズから磁気的に分離する。ＬＳカラムをＱｕａｄｒｏＭＡＣＳ磁場に配置する。ＬＳカラムを、３ｍＬの冷たい洗浄緩衝液で洗浄し、洗浄液を収集して廃棄する。細胞懸濁液をカラムに適用し、フロースルー（非標識細胞）を収集する。このフロースルーは、濃縮されたＴ細胞画分（ＰＢＬ）である。カラムを３ｍＬの洗浄緩衝液で洗浄し、最初のフロースルーと同じチューブ内にフロースルーを収集する。チューブにキャップをし、氷上に置く。これは、Ｔ細胞画分またはＰＢＬである。ＬＳカラムを磁場から取り除き、カラムを５ｍＬの洗浄緩衝液で洗浄し、非Ｔ細胞画分（磁気標識細胞）を別のチューブ内に収集する。両方の画分を４００ｇで５分間遠心分離し、細胞ペレットを

収集する。上清を両方の試料から吸引し、ペレットを破砕し、各ペレットに対して３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した１ｍＬのＣＭ２培地中で細胞を再懸濁し、上下に５～１０回ピペットしてペレットを破砕する。１～２ｍＬのＣＭ２を各試料に添加し、各試料を十分に混合し、次のステップのために組織培養インキュベーター内で保管する。各試料から約５０ｕＬのアリコートを取り出し、細胞を計数し、数及び生存率を記録する。

【３５１１】

その後、Ｔ細胞（ＰＢＬ）をＤｕｎａｂｅａｄｓ（商標）Ｈｕｍａｎ　Ｔ－Ｅｘｐａｎｄｅｒ　ＣＤ３／ＣＤ２８で培養する。Ｄｙｎａｂｅａｄｓのストックバイアルを、中速で３０秒間ボルテックスする。ビーズの必要なアリコートを、ストックバイアルから１．５ｍＬの滅菌マイクロチューブに取り出す。ビーズを含有する１．５ｍＬのマイクロチューブに１ｍＬのビーズ洗浄液を添加することによって、ビーズをビーズ洗浄液で洗浄する。穏やかに混合する。チューブをＤｙｎａＭａｇ（商標）－２磁石上に置き、ビーズが磁石に向かって引き寄せられるまで３０分間放置する。洗浄液をビーズから吸引し、チューブを磁石から取り外す。３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した１ｍＬのＣＭ２培地をビーズに添加する。マイクロチューブの全内容物を、１５ｍＬまたは５０ｍＬのコニカルチューブに移す。ＩＬ－２を含むＣＭ２培地を使用して、ビーズを約５００，０００／ｍＬの最終濃度にする。

【３５１２】

Ｔ細胞（ＰＢＬ）とビーズを以下のように一緒に培養する。０日目：Ｇ－Ｒｅｘ－ＲＥＸ２４ウェルプレート中、合計７ｍＬ／ウェルで、５００，０００Ｔ細胞、５００，０００　ＣＤ３／ＣＤ２８　Ｄｙｎａｂｅａｄｓ、及びＩＬ－２を補充したＣＭ２を添加する。プロセスの次のステップまで、Ｇ－Ｒｅｘ－ＲＥＸプレートを加湿した３７℃、５％CO_2インキュベーターに配置する（４日目）。残りの細胞を、Ｍｒ．Ｆｒｏｓｔｙセルフリーザーを使用してＣＳ１０凍結保存培地中で凍結させる。細胞の非Ｔ細胞画分を、Ｍｒ．Ｆｒｏｓｔｙセルフリーザーを使用してＣＳ１０凍結保存培地中で凍結させる。４日目に、培地を交換する。培地の半分（約３．５ｍＬ）を、Ｇ－ｒｅｘプレートの各ウェルから取り出す。３７℃に温めた３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した十分な量（約３．５ｍＬ）のＣＭ４培地を添加して、各試料ウェルから取り出した培地を交換する。Ｇ－ｒｅｘプレートをインキュベーターに戻す。

【３５１３】

７日目に、細胞をＲＥＰによる拡張のために調製する。Ｇ－ｒｅｘプレートをインキュベーターから取り出し、培地の半分を各ウェルから取り出し、廃棄する。細胞を残りの培地に再懸濁し、１５ｍＬのコニカルチューブに移す。ウェルを、３７℃に温めた３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した各１ｍＬのＣＭ４で洗浄し、洗浄培地を細胞とともに同じ１５ｍＬのチューブに移す。細胞の代表的な試料を取り出し、自動セルカウンターを使用して計数する。1×10^6個未満の生細胞が存在する場合、０日目にＤｙｎａｂｅａｄ拡張プロセスを繰り返す。残りの細胞を、バックアップ拡張のために、または表現型決定及び他の特徴付け研究のために凍結させる。1×10^6個以上の生細胞が存在する場合、ＲＥＰ拡張は０日目からのプロトコルに従って複製で設定される。代替的に、十分な細胞を用いて、１フラスコ当たり$10\sim15\times10^6$個のＰＢＬ、及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終量１００ｍＬ／ウェルのＣＭ４培地中の１：１比のＤｙｎａｂｅａｄｓ：ＰＢＬを使用して、Ｇ－ｒｅｘ　１０Ｍ培養フラスコ内での拡張を設定することができる。プレート及び／またはフラスコをインキュベーターに戻す。過剰なＰＢＬを等分し、－８０℃の冷凍庫内のＭｒ．Ｆｒｏｓｔｙセルフリーザーでゆっくりと凍結させ、－８０℃で最低２４時間後に液体窒素ストレージに移すことができる。これらのＰＢＬを、拡張のため、または表現型決定もしくは他の特徴付け研究のためのバックアップ試料として使用することができる。

【３５１４】

１１日目に、培地を交換する。培地の半分をＧ－ｒｅｘプレートの各ウェルまたはフラスコのいずれかから取り出し、３７℃で３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した同量の

新鮮なＣＭ４培地と交換する。

【３５１５】

１４日目に、ＰＢＬを採取する。Ｇ－ｒｅｘプレートを使用する場合、培地の約半分をプレートの各ウェルから取り出し、廃棄する。ＰＢＬ及びビーズを残りの培地に懸濁し、１５ｍＬの滅菌コニカルチューブ（チューブ１）に移す。ウェルを３７℃に温めた１～２ｍＬの新鮮なＡＩＭ－Ｖ培地で洗浄し、洗浄液をチューブ１に移す。チューブ１にキャップをし、ＤｙｎａＭａｇ（商標）－１５磁石中に１分間置き、ビーズが磁石に引き寄せられるようにする。細胞懸濁液を新しい１５ｍＬチューブ（チューブ２）に移し、ビーズを２ｍＬの新鮮なＡＩＭ－Ｖで３７℃で洗浄する。チューブ１をさらに１分間磁石中に戻して置き、その後、洗浄培地をチューブ２に移す。最終洗浄ステップ後、必要に応じてウェルを組み合わせてもよい。細胞の代表的な試料を取り出し、計数し、数及び生存率を記録する。計数中、チューブをインキュベーターに入れてもよい。細胞が非常に密に見える場合、追加のＡＩＭ－Ｖ培地をチューブ２に添加してもよい。フラスコを使用する場合、フラスコ内の体積を約１０ｍＬに低減する必要がある。フラスコの内容物を混合し、１５ｍＬのコニカルチューブ（チューブＡ）に移す。フラスコを上記のように２ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地で洗浄し、洗浄培地も管Ａに移す。管Ａにキャップをして、ＤｙｎａＭａｇ（商標）－１５　Ｍａｇｎｅｔに１分間入れ、ビーズが磁石に引き寄せられるようにする。細胞懸濁液を新しい１５ｍＬチューブ（チューブＢ）に移し、ビーズを２ｍＬの新鮮なＡＩＭ－Ｖで３７℃で洗浄する。チューブＡをさらに１分間磁石中に戻して置き、その後、洗浄培地をチューブＢに移す。最終洗浄ステップ後、必要に応じてウェルを組み合わせてもよい。細胞の代表的な試料を取り出し、計数し、数及び生存率を記録する。計数中、チューブをインキュベーターに入れてもよい。細胞が非常に密に見える場合、追加のＡＩＭ－Ｖ培地をチューブＢに添加してもよい。細胞を、新鮮な状態で使用しても、所望の濃度でＣＳ１０保存培地中で凍結させてもよい。

【３５１６】

実施例１３：固形腫瘍を有する患者における自己腫瘍浸潤リンパ球の第２相多施設研究

研究設計

概要

この実施例では、本出願ならびにこの実施例に記載されるように調製されたＴＩＬを使用して、ＴＩＬをペムブロリズマブと組み合わせて、またはＴＩＬを単剤療法として使用してＡＣＴを評価する、前向き、非盲検、マルチコホート、非ランダム化、多施設第２相試験について説明する。

【３５１７】

目的：

一次：

治験責任医師が評価した固形腫瘍の奏効評価基準（ＲＥＣＩＳＴ　１．１）を使用して、客観的奏効率（ＯＲＲ）によって決定されるように、ＭＭ、ＨＮＳＣＣ、もしくはＮＳＣＬＣ患者におけるペムブロリズマブと組み合わせた自己ＴＩＬの有効性、またはＣＰＩによる治療中もしくは治療後に以前に進行した再発もしくは不応性（ｒ／ｒ）ＮＳＣＬＣ患者における単剤療法としてのＴＩＬの有効性を評価すること。

【３５１８】

グレード３以上の治療に起因する有害事象（ＴＥＡＥ）の発生率によって測定される、ＭＭ、ＨＮＳＣＣ、及びＮＳＣＬＣ患者におけるペムブロリズマブと組み合わせたＴＩＬの安全性プロファイル、またはｒ／ｒ　ＮＳＣＬＣ患者における単剤療法としてのＴＩＬの安全性プロファイルを特徴付けること。

【３５１９】

二次：

完全奏効（ＣＲ）率、奏効期間（ＤＯＲ）、疾患制御率（ＤＣＲ）、治験責任医師によって評価されたＲＥＣＩＳＴ　１．１を使用した無増悪生存期間（ＰＦＳ）、及び全生存期間（ＯＳ）を使用して、ＭＭ、ＨＮＳＣＣ、及びＮＳＣＬＣ患者におけるペムブロリズ

マブと組み合わせた自己ＴＩＬの有効性、またはｒ／ｒ　ＮＳＣＬＣ患者における単剤療法としてのＴＩＬの有効性をさらに評価すること。

【３５２０】

コホート：

コホート１Ａ：免疫療法を除く３つ以下の以前の全身療法を伴う、切除不能なステージＩＩＩＣもしくはステージＩＶ、またはＭＭの患者におけるペムブロリズマブと組み合わせたＴＩＬ療法。以前に治療を受けた場合、患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が記録されていなければならない。

【３５２１】

コホート２Ａ：免疫療法を除く３つ以下の以前の全身療法を伴う、進行性、再発性、または転移性のＨＮＳＣＣ（例えば、ステージＴ１Ｎ１－Ｎ２Ｂ、Ｔ２－４Ｎ０－Ｎ２ｂ）の患者におけるペムブロリズマブと組み合わせたＴＩＬ療法。以前に治療を受けた場合、患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が記録されていなければならない。

【３５２２】

コホート３Ａ：免疫療法を除く３つ以下の以前の全身療法を伴う、局所進行性または転移性（ステージＩＩＩ～ＩＶ）ＮＳＣＬＣ患者におけるペムブロリズマブと組み合わせたＴＩＬ療法。以前に治療を受けた場合、患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が記録されていなければならない。

【３５２３】

コホート３Ｂ：３つ以下の以前の全身療法の一部として、ＣＰＩ（例えば、抗ＰＤ－１／抗ＰＤ－Ｌ１）による全身療法を以前に受けたことがあるステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ患者における単剤としてのＴＩＬ療法。以前に治療を受けた場合、患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が記録されていなければならない。

【３５２４】

有効な標的療法が利用可能な癌遺伝子駆動腫瘍を有するコホート３Ａ及び３Ｂ（ＮＳＣＬＣ）の患者は、少なくとも１つの標的療法を受けていなければならない。

【３５２５】

すべての患者は、シクロホスファミド及びフルダラビンからなる骨髄非破壊的リンパ球枯渇（ＮＭＡ－ＬＤ）プレコンディショニングレジメンの前に、自己凍結保存ＴＩＬ療法（コホートの割り当てに応じて、ペムブロリズマブの有無にかかわらず）を受けた。ＴＩＬ注入後、最大６回のＩＶインターロイキン－２（ＩＬ－２）の最大用量が投与された。

【３５２６】

以下の一般的な研究期間は、特に明記されていない限り、４つのコホートすべてで行われた。

【３５２７】

スクリーニング及び腫瘍切除：研究登録から最大４週間（２８日）、ＴＩＬ製品の製造：腫瘍切除からおよそ２２日以内、及び以下で考察される治療期間。

【３５２８】

治療期間（コホート１Ａ、２Ａ、及び３Ａ）：ＮＭＡ－ＬＤ（７日）、ＴＩＬ注入（１日）、続いてＩＬ－２投与（１～４日）を含む最大２年。患者は、ＴＩＬ産生のための腫瘍切除及びベースライン走査の完了後であるが、ＮＭＡ－ＬＤレジメンの開始前にペムブロリズマブの単回注入を受ける。ペムブロリズマブの次の用量は、ＩＬ－２の完了後以降であり、その後２年（２４ヶ月）以内または疾患の進行もしくは許容できない毒性のいずれか早い方までＱ３Ｗ±３日間継続する。治療終了（ＥＯＴ）来院は、ペムブロリズマブの最後の用量後３０日以内に起こった。該当する場合、この来院は評価終了（ＥＯＡ）来院と組み合わされ得る（例えば、ペムブロリズマブの中止は、疾患の進行時または新しい抗癌療法の開始時に起こった）。

【３５２９】

治療期間（コホート３Ｂ）：ＮＭＡ－ＬＤ（７日）、ＴＩＬ、注入（１日）、続いてＩＬ－２投与（１～４日）を含む最大１２日。ＥＯＴ来院は、患者がＩＬ－２の最後の用量

を受けたときに起こった。ＥＯＴ来院は、治療中止後３０日以内に行われ、評価期間中にこの間隔内に起こる予定の任意の来院と組み合わせることができる。

【３５３０】

評価期間：０日目のＴＩＬ注入後に開始し、疾患の進行、新しい抗がん療法の開始、研究評価への同意の部分的撤回、または５年（６０か月）のいずれか早い時点で終了する。患者が疾患の進行に達するか、または新しい抗癌療法を開始すると、評価終了（ＥＯＡ）来院が起こった。

【３５３１】

本明細書に記載されるように調製されたＴＩＬを用いたＴＩＬ自己療法は、以下のステップから構成されていた。

１．ＴＩＬ細胞製品の供給源として機能する自己組織を提供するための腫瘍切除。

２．中央の適正製造基準（ＧＭＰ）施設で産生されたＴＩＬ製品。

３．７日間のＮＭＡ－ＬＤプレコンディショニングレジメン。

４．コホート１Ａ、２Ａ、及び３Ａ：患者は、ＴＩＬ産生のための腫瘍切除及びベースライン走査の完了後であるが、ＮＭＡ－ＬＤレジメンの開始前にペムブロリズマブの単回注入を受ける。ペムブロリズマブの次の用量は、ＩＬ－２の完了後以降であり、その後Ｑ３Ｗ±３日継続する。

５．自己ＴＩＬ製品の注入（０日目）、ならびに

６．最大６用量までのＩＶ　ＩＬ－２投与。

【３５３２】

コホート１Ａ、２Ａ、及び３Ａでは、ペムブロリズマブの次の用量は、ＩＬ－２の完了後以降であり、その後２年（２４ヶ月）以内または疾患の進行もしくは許容できない毒性のいずれか早い方までＱ３Ｗ±３日間継続する。

【３５３３】

コホート１Ａ、２Ａ、及び３Ａのフローチャートは、図７に見出すことができる。コホート３Ｂのフローチャートは、図８に見出すことができる。患者は、腫瘍の適応によって適切なコホートに割り当てられた。

【３５３４】

ＴＩＬ療法＋ペムブロリズマブ（コホート１Ａ、２Ａ、及び３Ａ）

患者はスクリーニングされ、腫瘍切除のための手術が予定された。その後、患者は１つ以上の腫瘍病変を切除し、ＴＩＬ産生のために中央製造施設に送られた。

【３５３５】

次に、ＮＭＡ－ＬＤレジメンは模倣され、－７日目及び－６日目にメスナ（部位当たりの標準治療またはＵＳＰＩ／ＳｍＰＣ）を含む２日間のＩＶシクロホスファミド（６０ｍｇ／ｋｇ）、ならびにその後５日間のＩＶフルダラビン（２５ｍｇ／ｍ２：－５日目～－１日目）で構成された。

【３５３６】

コホート１Ａ、２Ａ、及び３Ａの患者は、ＴＩＬ産生のために腫瘍切除の完了後にペムブロリズマブの単回注入を受け、ＮＭＡ－ＬＤレジメンの開始前にベースライン走査を受けた。６００，０００ＩＵ／ｋｇの用量でＩＶでのＩＬ－２投与は、０日目のＴＩＬ注入の完了の３時間後、ただし２４時間後までに開始された。追加のＩＬ－２投与は、最大６用量まで、およそ８～１２時間毎に行われる。ペムブロリズマブの第２の用量は、ＩＬ－２の完了後以降であった。患者は、第２のペムブロリズマブ投与前に、すべてのＩＬ－２関連毒性（グレード≦２）から回復している必要がある。ペムブロリズマブは、その後２年以内（２４ヶ月）または疾患の進行もしくは許容できない毒性のいずれか早い方まで、Ｑ３Ｗ±３日間継続する。

【３５３７】

単剤としてのＴＩＬ療法（コホート３Ｂ）

患者はスクリーニングされ、腫瘍切除のための手術が予定された。その後、患者は１つ以上の腫瘍病変を切除し、ＴＩＬ産生のために中央製造施設に送られた。

【３５３８】
次に、ＮＭＡ－ＬＤレジメンは、－７日目及び－６日目にメスナ（部位当たりの標準治療またはＵＳＰＩ／ＳｍＰＣ）を含む２日間のＩＶシクロホスファミド（６０ｍｇ／ｋｇ）、ならびにその後５日間のＩＶフルダラビン（２５ｍｇ／ｍ２：－５日目～－１日目）で構成された。
【３５３９】
腫瘍由来の自己ＴＩＬ製品の注入は、フルダラビンの最後の用量から２４時間以内に起こった。６００，０００ＩＵ／ｋｇの用量でＩＶでのＩＬ－２投与は、ＴＩＬ注入の完了後３時間後、ただし２４時間後までに開始された可能性がある。
【３５４０】
追加のＩＬ－２投与は、最大６用量、およそ８～１２時間毎に行われた。
【３５４１】
腫瘍浸潤リンパ球の産生及び拡張
ＴＩＬ自己細胞製品は、患者の腫瘍／病変に由来する生存可能な細胞傷害性Ｔリンパ球で構成されており、中央のＧＭＰ施設でエクスビボで製造される。例えば、ＴＩＬ産生プロセスを示す例示的なフロー図を図９に示す。
【３５４２】
ＴＩＬ製造プロセスは、個々の患者ごとに直径１．５ｃｍ以上の原発性または続発性転移性腫瘍病変（複数可）を外科的に切除した後に臨床現場で開始された。様々な解剖学的位置からの複数の腫瘍病変を切除して、腫瘍組織の全凝集体をまとめることができるが、輸送ボトルに存在する生体保存培地の量が限られているため、凝集体は、直径４．０ｃｍ、または重量１０ｇを超えてはならない。
【３５４３】
腫瘍病変（複数可）が生体保存輸送ボトルに入れられると、それは中央のＧＭＰ製造施設への速達宅配便を使用して２℃～８℃で出荷される。到着時に、腫瘍標本（複数可）を断片に解剖し、その後、ヒト組換えＩＬ－２を用いたプレ急速拡張プロトコル（ＲＥＰ前）において約１１日間培養した。
【３５４４】
次いで、これらのＲＥＰ前細胞を、ＩＬ－２、ＯＫＴ３（［ムロモナブ－ＣＤ３］としても知られるヒトＣＤ３に対するマウスモノクローナル抗体）、及びフィーダー細胞としての放射線照射された同種異系末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）の存在下で１１日間、急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）を使用してさらに拡張した。
【３５４５】
次いで、拡張した細胞を採取し、洗浄し、配合し、凍結保存し、速達宅配便で臨床現場に出荷した。ＴＩＬ細胞製品の剤形は、ＴＩＬが由来する患者への注入の準備ができている凍結保存された自己の「生細胞懸濁液」であった。患者は、製品仕様当たり1×10^{9}～150×10^{9}生細胞の間に含まれる、製造及び放出された製品の全用量を受容することとした。臨床経験は、客観的な腫瘍応答がこの用量範囲全体で達成されたことを示し、これも安全であることが示されている（Ｒａｄｖａｎｙｉ Ｌ．Ｇ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１２；１８（２４）：６７５８－７０）。製品の全用量は、最大４つの注入バッグで提供された。
【３５４６】
ＴＩＬ細胞製品を受容する患者の準備
この研究で使用されたＮＭＡ－ＬＤプレコンディショニングレジメン（すなわち、２日間のシクロホスファミド＋メスナ、続いて５日間のフルダラビン）は、国立がん研究所によって開発及び試験された方法に基づいていた（Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ Ｓ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１１；１７（１３）：４５５０－７、Ｒａｄｖａｎｙｉ Ｌ．Ｇ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１２；１８（２４）：６７５８－７０、Ｄｕｄｌｅｙ Ｍ．Ｅ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ．２００８；２６（３２）：５２３３－９、Ｐｉｌｏｎ－Ｔｈｏｍａｓ

Ｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１２；３５（８）：６１５－２０、Ｄｕｄｌｅｙ　Ｍ．Ｅ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｏｎｃｏｌ．２００５；２３（１０）：２３４６－５７、及びＤｕｄｌｅｙ　Ｍ．Ｅ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２００２；２９８（５５９４）：８５０－４）。７日間のプレコンディショニングレジメンに続いて、患者にＴＩＬ細胞製品を注入した。

【３５４７】

ＴＩＬ注入後、８～１２時間毎にＩＶ　ＩＬ－２（６００，０００ＩＵ／ｋｇ）を投与し、最初の用量は、ＴＩＬ注入の完了の３～２４時間後に投与され、最大６用量まで継続した。施設の基準に従って、ＩＬ－２の用量は、実際の体重に基づいて計算することができる。

【３５４８】

患者集団の選択

コホート１Ａ：

患者は、切除不能なＭＭの確定診断を受けた（ステージＩＩＩＣまたはステージＩＶ、米国癌合同委員会［ＡＪＣＣ］病期分類システムに従って組織学的に確認された）。眼内黒色腫患者は除外された。患者は、以前に免疫腫瘍学を標的とした薬剤を受けていてはならない。ＢＲＡＦ変異が陽性の場合、患者は、以前にＢＲＡＦ／ＭＥＫ標的療法を受けていた可能性があった。

【３５４９】

コホート２Ａ：

患者は、進行性、再発性、及び／または転移性のＨＮＳＣＣを有しており、治療ナイーブであり得、病理学レポートを介した原発腫瘍の組織学的診断が必要である。患者は、以前に免疫療法レジメンを受けていてはならない。

【３５５０】

コホート３Ａ：

患者は、ステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ（扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌）の確定診断を受けた。有効な標的療法が利用可能ながん遺伝子駆動腫瘍を有する患者は、少なくとも１つの標的療法を受けていた。

【３５５１】

コホート３Ｂ：

患者は、ステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ（扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌）の確定診断を受けており、以前にＣＰＩ（例えば、抗ＰＤ－１／抗ＰＤ－Ｌ１）による全身療法を受けていた。有効な標的療法が利用可能ながん遺伝子駆動腫瘍を有する患者は、少なくとも１つの標的療法を受けていた。

【３５５２】

コホート１Ａ、２Ａ、及び３Ａの免疫療法を除き、すべての患者は、最大３つの全身抗癌療法を受けていた（以下の包含基準を参照）。以前に治療を受けた場合、患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が確認されていた。

【３５５３】

包含基準

患者は、研究に参加するために以下の包含基準をすべて満たしている必要がある。

１．すべての患者は、組織学的または病理学的にそれぞれの組織学的悪性腫瘍の確定診断を受けた。

○切除不能または転移性黒色腫（コホート１Ａ）

○頭頸部の進行性、再発性、または転移性扁平上皮癌（コホート２Ａ）

○ステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ（扁平上皮癌、非扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌）（コホート３Ａ及び３Ｂ）。

２．コホート１Ａ、２Ａ、及び３Ａのみ：患者は、免疫療法ナイーブであった。以前に治療された場合、患者は、最近の治療中または治療後に進行していた。コホート１Ａ、２Ａ、及び３Ａは、最大３つの全身性抗癌療法を以前に受けている可能性があり、具体的に

は以下の通りである。
○コホート１Ａ：切除不能または転移性黒色腫（ステージＩＩＩＣまたはステージＩＶ）を有する患者。ＢＲＡＦ変異陽性の場合、患者は、ＢＲＡＦ阻害剤を投与されている可能性がある。
○コホート２Ａ：切除不能または転移性ＨＮＳＣＣの患者。最初の化学放射線療法を受けていた患者は許可された。
○コホート３Ａ：ステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ（扁平上皮癌、非扁平上皮癌、腺癌、または大細胞癌）を有し、免疫療法ナイーブであり、局所進行または転移の状況で３選択以下の前の全身療法後に進行した患者。アジュバントもしくはネオアジュバントの設定で、または根治的化学放射線療法の一部として全身療法を受けた患者は適格であり、以前の全身療法の完了から１２ヶ月以内に疾患が進行した場合、１つの治療を受けたとみなされた。標的療法に感受性のある変異を有する既知のがん遺伝子ドライバー（例えば、ＥＧＦＲ、ＡＬＫ、ＲＯＳ）を有する患者は、少なくとも１つの標的療法の後に進行したに違いない。
３．コホート３Ｂのみ：ステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ（扁平上皮癌、非扁平上皮癌、腺癌、または大細胞癌）を有し、３つ以下の以前の全身療法の一部として、ＣＰＩ（例えば、抗ＰＤ－１／抗ＰＤ－Ｌ１）による全身療法を以前に受けていた患者。
○患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が確認されていた。
○アジュバントもしくはネオアジュバントの設定で、または根治的化学放射線療法の一部として全身療法を受けた患者は適格であり、以前の全身療法の完了から１２ヶ月以内に疾患が進行していた場合、１つの治療を受けたとみなされた。
○標的療法に感受性のある変異を有する既知のがん遺伝子ドライバー（例えば、ＥＧＦＲ、ＡＬＫ、ＲＯＳ）を有する患者は、少なくとも１つの標的療法の後に進行したに違いない。
４．患者は、ＴＩＬ治験薬産生のために、切除後に最少直径１．５ｃｍの切除可能な病変（または凝集病変）を少なくとも１つ有していた。外科的切除が患者に追加のリスクをもたらさない限り、腫瘍組織を、複数の多様な転移性病変から得ることが奨励された。
○ＴＩＬ生成のために切除が検討されている病変が、以前に照射された領域内にある場合、その病変は、切除前にＸ線写真で進行を示している必要がある。
○患者は、プロトコルが必要とする検査に適正な組織病理標本を有していなければならない。
５．患者は、ＴＩＬ製造の腫瘍切除の後に、標準かつ周知のＲＥＣＩＳＴ　１．１ガイドラインによって定義されているように、残留する測定可能な疾患を有していた（例えば、Ｅｉｓｅｎｈａｕｅｒ，Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃａｎｃｅｒ　４５：２２８－２４７（２００９）を参照、ｗｗｗ．ｐｒｏｊｅｃｔ．ｅｏｒｔｃ．ｏｒｇ／ｒｅｃｉｓｔ／ｗｐ－ｃｏｎｔｅｎｔ／ｕｐｌｏａｄｓ／ｓｉｔｅｓ／４／２０１５／０３／ＲＥＣＩＳＴＧｕｉｄｅｌｉｎｅｓ．ｐｄｆでも入手可能）：
○以前に照射された領域内の病変は、それらの病変で疾患の進行が示されていない限り、標的病変として選択されなかった。
○ＲＥＣＩＳＴ毎に依然として測定可能なＴＩＬ生成のために部分的に切除された病変を、非標的病変として選択することができるが、応答評価の標的病変としては機能することができなかった。
６．患者は、同意時に１８歳以上であった。
７．患者の米国東海岸癌臨床試験グループ（Ｅａｓｔｅｒｎ　Ｃｏｏｐｅｒａｔｉｖｅ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　Ｇｒｏｕｐ、ＥＣＯＧ）のパフォーマンスステータスは０または１であり、推定平均余命は３ヶ月以上であった。
８．妊娠可能性のある患者または妊娠可能性のあるパートナーがいる患者は、治療中に承認された非常に効果的な避妊方法を実践し、すべてのプロトコル関連療法を受けてから１２ヶ月間継続しなければならなかった（注記：生殖可能性のある女性は、治療中及びＩ

Ｌ－２の最後の投与後１２ヶ月間、またはペムブロリズマブの最後の投与後４ヶ月間のいずれか遅い時期に有効な避妊法を使用することとした）。男性は、研究中または治療中止後１２ヶ月のいずれか遅い方で、精子を提供することができなかった。

９．患者は、以下の血液学的パラメータを有していた：

○絶対好中球数（ＡＮＣ）≧１０００／ｍｍ３、

○ヘモグロビン≧９．０ｇ／ｄＬ、

○血小板数≧１００，０００／ｍｍ３。

１０．患者は、適正な臓器機能を有していた：

○血清アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）／血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ（ＳＧＰＴ）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）／ＳＧＯＴが、正常上限（ＵＬＮ）の３倍以下、肝転移がＵＬＮの５倍以下の患者。

○スクリーニング時にコッククロフト・ゴールト式を使用して推定されたクレアチニンクリアランス≧４０ｍＬ／分。

○総ビリルビン≦２ｍｇ／ｄＬ。

○ジルベール症候群の患者は、総ビリルビン≦３ｍｇ／ｄＬでなければならない。

１１．患者は、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ１及びＨＩＶ２）に対して血清陰性であった。Ｂ型肝炎ウイルス表面抗原（ＨＢｓＡｇ）、Ｂ型肝炎コア抗体（抗ＨＢｃ）、または急性もしくは慢性感染を示すＣ型肝炎ウイルス（抗ＨＣＶ）の血清学が陽性の患者は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）に基づくウイルス量及び特定のウイルス曝露の局所有病率に応じて登録した。

１２．患者は、最初の研究治療（すなわち、ＮＭＡ－ＬＤまたはペムブロリズマブの開始）の前に、以下に詳述されるように、最小期間の前の抗がん療法（複数可）からのウォッシュアウト期間を有していた。

○標的療法：ウォッシュアウトが治療の開始の最低１４日前であれば、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）、ＭＥＫ、ＢＲＡＦ、ＡＬＫ、ＲＯＳ１または他の標的薬剤（例えば、エルロチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、オシメルチニブ、クリゾチニブ、セリチニブ、ロラチニブ）による以前の標的療法が許可された。

○化学療法：ウォッシュアウトが治療開始の最低２１日前という条件で、アジュバント、ネオアジュバント、または根治的化学療法／化学放射線療法が許可された。

○コホート３Ｂのみの免疫療法、抗ＰＤ－１、他のｍＡｂ、またはワクチンによる以前のチェックポイント標的療法は、ＮＭＡ－ＬＤの開始前２１日以上のウォッシュアウト期間で許可された。

○緩和的放射線療法：脱毛症、皮膚色素沈着の変化、または他の臨床的に重要でない事象、例えば小領域放射線皮膚炎または直腸もしくは尿意切迫感を除いて、すべての放射線関連毒性がグレード１またはベースラインに解決された場合、以前の外部ビーム放射線療法が許可された

○ＲＥＣＩＳＴ　１．１を介して応答のターゲットとして評価されている腫瘍病変（複数可）は、放射線ポータルの外側にあったが、ポータル内の場合は、進行が実証されていなければならない（上記の包含基準を参照）。

○手術／事前に計画された手順：創傷治癒が起こり、すべての合併症が解消され、腫瘍切除の前に少なくとも１４日が経過している場合（主要な手術手順の場合）、以前の外科的手順（複数可）が許可された。

１３．患者は、コホートの割り当て前に、脱毛症または白斑を除いて、以前のすべての抗癌治療関連有害事象（ＴＲＡＥ）からグレード１以下（有害事象の一般用語基準［ＣＴＣＡＥ］による）に回復していた。

１４．以前の抗癌療法から安定したグレード２以上の毒性を有する患者は、医療モニターと相談した後、ケースバイケースで検討された。

１５．ペムブロリズマブによる治療によって悪化すると合理的に予想されない不可逆的毒性を有するコホート１Ａ、２Ａ、及び３Ａの患者は、医療モニターとの協議後にのみ含まれた。コホート３Ｂの患者のみ、免疫チェックポイント阻害剤ＣＰＩ（複数可）による

以前の治療の結果として、グレード２以上の下痢または大腸炎が記録されている患者は、少なくとも６ヶ月間無症候性であったか、または治療後腫瘍切除前の目視評価による結腸内視鏡検査で正常でなければならない。

１６．患者は、保護された健康情報の使用及び開示について、書面による承認を提供していなければならない。

【３５５４】

除外基準

以下の基準のうちのいずれかを満たす患者は、研究から除外した。

１．ブドウ膜／眼起源の黒色腫を有する患者

２．過去２０年以内に骨髄非破壊的または骨髄破壊的化学療法レジメンを含む、臓器同種移植または以前の細胞移植療法を受けていた患者。（注記：この基準は、以前のＴＩＬ治療で以前のＮＭＡ－ＬＤレジメンがあったことを除いて、ＴＩＬによる再治療を受けている患者に適用可能であった。）

３．症候性及び／または未治療の脳転移を有する患者。

○●脳転移が根治的に治療された患者は、治療開始前に患者が２週間以上にわたって臨床的に安定し、治療後の磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）による新たな脳病変がなく、患者が継続的なコルチコステロイド治療を必要としない場合、医療モニターと相談した後に登録が検討される。

４．登録から２１日以内に全身ステロイド療法を受けている患者。

５．妊娠中または授乳中の患者。

６．治験責任医師の意見では、研究参加のリスクが高い、活動性の医学的疾患（複数可）、例えば全身性感染症（例えば、梅毒もしくは抗生物質を必要とする他の感染症）、凝固障害、または心臓血管系、呼吸器系、もしくは免疫系の他の活動性の主要な医学的疾患を有していた患者。

７．患者は、活動性または以前に記録された自己免疫または炎症性障害（肺炎、炎症性腸疾患［例えば、大腸炎もしくはクローン病］、憩室炎［憩室症を除く］、全身性紅斑性狼瘡、サルコイドーシス症候群、またはウェゲナー症候群［多発血管炎を伴う肉芽腫症、グレイブス病、関節リウマチ、下垂体炎、ブドウ膜炎等］）を有しない場合がある。以下は、この基準の例外であった。

○白斑または脱毛症を有する患者。

○甲状腺機能低下症（例えば、橋本症候群に続く）が安定している患者

○ホルモン補充療法。

○全身療法を必要としない任意の慢性皮膚疾患。

○食事療法だけで制御されるセリアック病の患者。

８．治療開始前２８日以内に生ワクチン接種または弱毒化ワクチン接種を受けていた患者。

９．何らかの形態の原発性免疫不全症（重症複合免疫不全症［ＳＣＩＤ］及び後天性免疫不全症候群［ＡＩＤＳ］など）を有していた患者。

１０．治験薬のいずれかの成分に対する過敏症の病歴を有する患者。ＴＩＬは、以下のうちのいずれかを含むがこれらに限定されない、ＴＩＬ製品製剤のいずれかの成分に対する既知の過敏症を有する患者には投与されなかった。

○●ＮＭＡ－ＬＤ（シクロホスファミド、メスナ、及びフルダラビン）

○●Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ（登録商標）、アルデスロイキン、ＩＬ－２

○●アミノグリコシド系抗生物質（すなわち、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン［ゲンタマイシン過敏症の皮膚検査陰性者を除く］）

○●ジメチルスルホキシドを含むＴＩＬ産物製剤の任意の成分

○［ＤＭＳＯ］、ＨＳＡ、ＩＬ－２、及びデキストラン－４０

○●ペムブロリズマブ

１１．左心室駆出率（ＬＶＥＦ）が４５％未満の患者、またはニューヨーク心臓協会クラスＩＩ以上の患者。６０歳以上の患者、あるいは虚血性心疾患、胸痛、または臨床的に

重大な心房性及び／または心室性不整脈の病歴のある患者において、不可逆的な壁運動異常を示す心臓ストレス試験。
○治験依頼者のメディカルモニターの承認を得て、駆出率及び心臓病クリアランスが十分であれば、心臓ストレス試験に異常がある患者を登録することができた。
１２．閉塞性または拘束性肺疾患があり、予測正常値の６０％以下のＦＥＶ１（１秒の強制呼気量）が記録されている患者。
○●患者が上気道の解剖学的構造の異常（すなわち、気管切開）のために信頼できる肺活量測定を行うことができなかった場合は、６分間の歩行試験を使用して呼吸機能を評価した。年齢及び性別に対して予測される少なくとも８０％の距離を歩くことができなかった患者、または試験中の任意の時点で低酸素症の証拠を示した患者（ＳｐＯ２＜９０％）は除外される。
１３．過去３年以内に別の原発性悪性腫瘍があった患者（治療を必要としなかった、または１年以上前に治癒的に治療された患者を除き、治験責任医師の判断では、非黒色腫皮膚癌、ＤＣＩＳ、ＬＣＩＳ、前立腺癌グリーソンスコア≦６または膀胱癌を含むが、これらに限定されない重大な再発リスクをもたらさなかった）。
１４．治療開始から２１日以内に治験薬を用いた別の臨床試験への参加。
【３５５５】
研究エンドポイント及び計画された分析
一次エンドポイント及び二次エンドポイントは、コホートによって別々に分析した。
【３５５６】
一次エンドポイント：
ＯＲＲは、有効性分析セットの中でＲＥＣＩＳＴ１．１に従って治験責任医師が評価した最良の応答として確認されたＰＲまたはＣＲのいずれかを達成した患者の割合として定義された。
【３５５７】
客観的反応を各疾患評価ごとに評価し、ＯＲＲは、対応する両側９０％　ＣＩを用いて二項比率として表された。各コホートの一次分析は、評価期間の早期に進行／期限切れまたは中止されない限り、コホート毎に治療を受けたすべての患者が１２ヶ月間追跡される機会があるときに行った。
【３５５８】
安全性一次エンドポイントは、各コホート内のグレード３以上のＴＥＡＥ発生率によって測定され、対応する両側９０％　ＣＩの二項比率として表された。
【３５５９】
二次エンドポイント：
有効性：
二次有効性エンドポイントは、次のように定義された。
【３５６０】
治験責任医師によって評価された確認済みＣＲを達成した応答者に基づくＣＲ率。ＤＣＲは、確認されたＰＲ／ＣＲまたは持続的なＳＤ（少なくとも６週間）を達成した患者数の合計を、有効性分析セットの患者数で割り、１００％を掛けたものとして導き出された。ＣＲ率及びＤＣＲは、点推定及びその両側９０％　ＣＩを使用して要約した。
【３５６１】
ＤＯＲは、客観的な応答を達成した患者の間で定義された。再発性もしくは進行性疾患が客観的に記録された最初の日付、またはその後の抗癌療法の受容もしくは患者の死亡（最初に記録された方）まで、初回応答（ＰＲ／ＣＲ）基準が満たされていることから測定した。ＰＤを経験していない、またはデータカットもしくは最終データベースロックの時点より前に死亡していない患者は、腫瘍状態の適切な評価が行われた最終日に事象時間が打ち切られる。
【３５６２】
ＰＦＳは、リンパ球枯渇からＰＤまでの時間（月単位）、または何らかの原因による死

亡のいずれか早い方の事象として定義された。ＰＤを経験していない、またはデータカットもしくは最終データベースロックの時点で死亡していない患者は、腫瘍状態の適切な評価が行われた最終日に事象時間が打ち切られた。

【３５６３】

ＯＳは、リンパ球枯渇の時点から何らかの原因による死亡までの時間（月単位）として定義された。データカットまたは最終的なデータベースロックの時点までに死亡していない患者は、既知の生存状態の最終日に事象時間が打ち切られた。

【３５６４】

ＤＯＲ、ＰＦＳ、及びＯＳは、右側打ち切りを受けた。カプラン・マイヤー法を使用して、事象までの時間の有効性エンドポイントを要約する。腫瘍評価のベースラインデータは、すべてのコホートのリンパ球枯渇前の最後の走査であった。

【３５６５】

上記の有効性パラメーターは、ベースラインの疾患特徴：ＢＲＡＦステータス（コホート１Ａのみ）、ＨＰＶステータス（コホート２Ａのみ）、扁平上皮または非扁平上皮肺疾患（コホート３Ａ及び３Ｂのみ）、ならびに抗ＰＤ－Ｌ１ステータスによって定義されたサブセットに適用可能なコホートについて推定される。

【３５６６】

実施例１４：固形腫瘍を有する患者における自己腫瘍浸潤リンパ球の第２相多施設研究

研究設計

概要

この実施例では、本出願ならびにこの実施例に記載されるように調製されたＴＩＬを使用して、ＴＩＬをペムブロリズマブと組み合わせて、またはＴＩＬを単剤療法として使用してＡＣＴを評価する、前向き、非盲検、マルチコホート、非ランダム化、多施設第２相試験について説明する。

【３５６７】

目的：

一次：

治験責任医師が評価した固形腫瘍の奏効評価基準（ＲＥＣＩＳＴ　１．１）を使用して、客観的奏効率（ＯＲＲ）によって決定されるように、ＭＭ、ＨＮＳＣＣ、もしくはＮＳＣＬＣ患者におけるペムブロリズマブと組み合わせた自己ＴＩＬの有効性、またはＣＰＩによる治療中もしくは治療後に以前に進行した再発もしくは不応性（ｒ／ｒ）ＮＳＣＬＣ患者における単剤療法としてのＴＩＬの有効性を評価すること。

【３５６８】

グレード３以上の治療に起因する有害事象（ＴＥＡＥ）の発生率によって測定される、ＭＭ、ＨＮＳＣＣ、及びＮＳＣＬＣ患者におけるペムブロリズマブと組み合わせたＴＩＬの安全性プロファイル、またはｒ／ｒ　ＮＳＣＬＣ患者における単剤療法としてのＴＩＬの安全性プロファイルを特徴付けること。

【３５６９】

二次：

完全奏効（ＣＲ）率、奏効期間（ＤＯＲ）、疾患制御率（ＤＣＲ）、治験責任医師によって評価されたＲＥＣＩＳＴ　１．１を使用した無増悪生存期間（ＰＦＳ）、及び全生存期間（ＯＳ）を使用して、ＭＭ、ＨＮＳＣＣ、及びＮＳＣＬＣ患者におけるペムブロリズマブと組み合わせた自己ＴＩＬの有効性、またはｒ／ｒ　ＮＳＣＬＣ患者における単剤療法としてのＴＩＬの有効性をさらに評価すること。

【３５７０】

コホート：

コホート１Ａ：免疫療法を除く３つ以下の以前の全身療法を伴う、切除不能なステージＩＩＩＣもしくはステージＩＶ、またはＭＭの患者におけるペムブロリズマブと組み合わせたＴＩＬ療法。以前に治療を受けた場合、患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が記録されていなければならない。

【３５７１】
コホート２Ａ：免疫療法を除く３つ以下の以前の全身療法を伴う、進行性、再発性、または転移性のＨＮＳＣＣ（例えば、ステージＴ１Ｎ１－Ｎ２Ｂ、Ｔ２－４Ｎ０－Ｎ２ｂ）の患者におけるペムブロリズマブと組み合わせたＴＩＬ療法。以前に治療を受けた場合、患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が記録されていなければならない。
【３５７２】
コホート３Ａ：免疫療法を除く３つ以下の以前の全身療法を伴う、局所進行性または転移性（ステージＩＩＩ～ＩＶ）ＮＳＣＬＣ患者におけるペムブロリズマブと組み合わせたＴＩＬ療法。以前に治療を受けた場合、患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が記録されていなければならない。
【３５７３】
コホート３Ｂ：３つ以下の以前の全身療法の一部として、ＣＰＩ（例えば、抗ＰＤ－１／抗ＰＤ－Ｌ１）による全身療法を以前に受けたことがあるステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ患者における単剤としてのＴＩＬ療法。以前に治療を受けた場合、患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が記録されていなければならない。
【３５７４】
有効な標的療法が利用可能な癌遺伝子駆動腫瘍を有するコホート３Ａ及び３Ｂ（ＮＳＣＬＣ）の患者は、少なくとも１つの標的療法を受けていなければならない。
【３５７５】
すべての患者は、シクロホスファミド及びフルダラビンからなる骨髄非破壊的リンパ球枯渇（ＮＭＡ－ＬＤ）プレコンディショニングレジメンの前に、自己凍結保存ＴＩＬ療法（コホートの割り当てに応じて、ペムブロリズマブの有無にかかわらず）を受けた。ＴＩＬ注入後、最大６回のＩＶインターロイキン－２（ＩＬ－２）の最大用量が投与された。
【３５７６】
以下の一般的な研究期間は、特に明記されていない限り、４つのコホートすべてで行われた。
【３５７７】
スクリーニング及び腫瘍切除：研究登録から最大４週間（２８日）、ＴＩＬ製品の製造：腫瘍切除からおよそ２２日以内、及び以下で考察される治療期間。
【３５７８】
治療期間（コホート１Ａ、２Ａ、及び３Ａ）：ＮＭＡ－ＬＤ（７日）、ＴＩＬ注入（１日）、続いてＩＬ－２投与（１～４日）を含む最大２年。患者は、ＴＩＬ産生のための腫瘍切除及びベースライン走査の完了後であるが、ＮＭＡ－ＬＤレジメンの開始前にペムブロリズマブの単回注入を受ける。ペムブロリズマブの次の用量は、ＩＬ－２の完了後以降であり、その後２年（２４ヶ月）以内または疾患の進行もしくは許容できない毒性のいずれか早い方までＱ３Ｗ±３日間継続する。治療終了（ＥＯＴ）来院は、ペムブロリズマブの最後の用量後３０日以内に起こった。該当する場合、この来院は評価終了（ＥＯＡ）来院と組み合わされ得る（例えば、ペムブロリズマブの中止は、疾患の進行時または新しい抗癌療法の開始時に起こった）。
【３５７９】
治療期間（コホート３Ｂ）：ＮＭＡ－ＬＤ（７日）、ＴＩＬ、注入（１日）、続いてＩＬ－２投与（１～４日）を含む最大１２日。ＥＯＴ来院は、患者がＩＬ－２の最後の用量を受けたときに起こった。ＥＯＴ来院は、治療中止後３０日以内に行われ、評価期間中にこの間隔内に起こる予定の任意の来院と組み合わせることができる。
【３５８０】
評価期間：０日目のＴＩＬ注入後に開始し、疾患の進行、新しい抗がん療法の開始、研究評価への同意の部分的撤回、または５年（６０か月）のいずれか早い時点で終了する。患者が疾患の進行に達するか、または新しい抗癌療法を開始すると、評価終了（ＥＯＡ）来院が起こった。
【３５８１】

本明細書に記載されるように調製されたＴＩＬを用いたＴＩＬ自己療法は、以下のステップから構成されていた。
１．ＴＩＬ細胞製品の供給源として機能する自己組織を提供するための腫瘍切除。
２．中央の適正製造基準（ＧＭＰ）施設で産生されたＴＩＬ製品。
３．７日間のＮＭＡ－ＬＤプレコンディショニングレジメン。
４．コホート１Ａ、２Ａ、及び３Ａ：患者は、ＴＩＬ産生のための腫瘍切除及びベースライン走査の完了後であるが、ＮＭＡ－ＬＤレジメンの開始前にペムブロリズマブの単回注入を受ける。ペムブロリズマブの次の用量は、ＩＬ－２の完了後以降であり、その後Ｑ３Ｗ±３日継続する。
５．自己ＴＩＬ製品の注入（０日目）、ならびに
６．最大６用量までのＩＶ　ＩＬ－２投与。
【３５８２】
コホート１Ａ、２Ａ、及び３Ａでは、ペムブロリズマブの次の用量は、ＩＬ－２の完了後以降であり、その後２年（２４ヶ月）以内または疾患の進行もしくは許容できない毒性のいずれか早い方までＱ３Ｗ±３日間継続する。
【３５８３】
コホート１Ａ、２Ａ、及び３Ａのフローチャートは、図７に見出すことができる。コホート３Ｂのフローチャートは、図８に見出すことができる。患者は、腫瘍の適応によって適切なコホートに割り当てられた。
【３５８４】
ＴＩＬ療法＋ペムブロリズマブ（コホート１Ａ、２Ａ、及び３Ａ）
患者はスクリーニングされ、腫瘍切除のための手術が予定された。その後、患者は１つ以上の腫瘍病変を切除し、ＴＩＬ産生のために中央製造施設に送られた。
【３５８５】
次に、ＮＭＡ－ＬＤレジメンは模倣され、－７日目及び－６日目にメスナ（部位当たりの標準治療またはＵＳＰＩ／ＳｍＰＣ）を含む２日間のＩＶシクロホスファミド（６０ｍｇ／ｋｇ）、ならびにその後５日間のＩＶフルダラビン（２５ｍｇ／ｍ２：－５日目～－１日目）で構成された。
【３５８６】
コホート１Ａ、２Ａ、及び３Ａの患者は、ＴＩＬ産生のために腫瘍切除の完了後にペムブロリズマブの単回注入を受け、ＮＭＡ－ＬＤレジメンの開始前にベースライン走査を受けた。６００，０００ＩＵ／ｋｇの用量でＩＶでのＩＬ－２投与は、０日目のＴＩＬ注入の完了の３時間後、ただし２４時間後までに開始された。追加のＩＬ－２投与は、最大６用量まで、およそ８～１２時間毎に行われる。ペムブロリズマブの第２の用量は、ＩＬ－２の完了後以降であった。患者は、第２のペムブロリズマブ投与前に、すべてのＩＬ－２関連毒性（グレード≦２）から回復している必要がある。ペムブロリズマブは、その後２年以内（２４ヶ月）または疾患の進行もしくは許容できない毒性のいずれか早い方まで、Ｑ３Ｗ±３日間継続する。
【３５８７】
単剤としてのＴＩＬ療法（コホート３Ｂ）
患者はスクリーニングされ、腫瘍切除のための手術が予定された。その後、患者は１つ以上の腫瘍病変を切除し、ＴＩＬ産生のために中央製造施設に送られた。
【３５８８】
次に、ＮＭＡ－ＬＤレジメンは、－７日目及び－６日目にメスナ（部位当たりの標準治療またはＵＳＰＩ／ＳｍＰＣ）を含む２日間のＩＶシクロホスファミド（６０ｍｇ／ｋｇ）、ならびにその後５日間のＩＶフルダラビン（２５ｍｇ／ｍ２：－５日目～－１日目）で構成された。
【３５８９】
腫瘍由来の自己ＴＩＬ製品の注入は、フルダラビンの最後の用量から２４時間以内に起こった。６００，０００ＩＵ／ｋｇの用量でＩＶでのＩＬ－２投与は、ＴＩＬ注入の完了

後３時間後、ただし２４時間後までに開始された可能性がある。
【３５９０】
追加のＩＬ－２投与は、最大６用量、およそ８～１２時間毎に行われた。
【３５９１】
腫瘍浸潤リンパ球の産生及び拡張
ＴＩＬ自己細胞製品は、患者の腫瘍／病変に由来する生存可能な細胞傷害性Ｔリンパ球で構成されており、中央のＧＭＰ施設でエクスビボで製造される。例えば、ＴＩＬ産生プロセスを示す例示的なフロー図を図９に示す。
【３５９２】
ＴＩＬ製造プロセスは、個々の患者ごとに直径１．５ｃｍ以上の原発性または続発性転移性腫瘍病変（複数可）を外科的に切除した後に臨床現場で開始された。様々な解剖学的位置からの複数の腫瘍病変を切除して、腫瘍組織の全凝集体をまとめることができるが、輸送ボトルに存在する生体保存培地の量が限られているため、凝集体は、直径４．０ｃｍ、または重量１０ｇを超えてはならない。
【３５９３】
腫瘍病変（複数可）が生体保存輸送ボトルに入れられると、それは中央のＧＭＰ製造施設への速達宅配便を使用して２℃～８℃で出荷される。到着時に、腫瘍標本（複数可）を断片に解剖し、その後、ヒト組換えＩＬ－２を用いたプレ急速拡張プロトコル（ＲＥＰ前）において約１１日間培養した。
【３５９４】
次いで、これらのＲＥＰ前細胞を、ＩＬ－２、ＯＫＴ３（［ムロモナブ－ＣＤ３］としても知られるヒトＣＤ３に対するマウスモノクローナル抗体）、及びフィーダー細胞としての放射線照射された同種異系末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）の存在下で１１日間、急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）を使用してさらに拡張した。
【３５９５】
次いで、拡張した細胞を採取し、洗浄し、配合し、凍結保存し、速達宅配便で臨床現場に出荷した。ＴＩＬ細胞製品の剤形は、ＴＩＬが由来する患者への注入の準備ができている凍結保存された自己の「生細胞懸濁液」であった。患者は、製品仕様当たり1×10^{9}～150×10^{9}生細胞の間に含まれる、製造及び放出された製品の全用量を受容することとした。臨床経験は、客観的な腫瘍応答がこの用量範囲全体で達成されたことを示し、これも安全であることが示されている（Ｒａｄｖａｎｙｉ Ｌ．Ｇ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１２；１８（２４）：６７５８－７０）。製品の全用量は、最大４つの注入バッグで提供された。
【３５９６】
ＴＩＬ細胞製品を受容する患者の準備
この研究で使用されたＮＭＡ－ＬＤプレコンディショニングレジメン（すなわち、２日間のシクロホスファミド＋メスナ、続いて5日間のフルダラビン）は、国立がん研究所によって開発及び試験された方法に基づいていた（Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ Ｓ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１１；１７（１３）：４５５０－７、Ｒａｄｖａｎｙｉ Ｌ．Ｇ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１２；１８（２４）：６７５８－７０、Ｄｕｄｌｅｙ Ｍ．Ｅ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ．２００８；２６（３２）：５２３３－９、Ｐｉｌｏｎ－Ｔｈｏｍａｓ Ｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１２；３５（８）：６１５－２０、Ｄｕｄｌｅｙ Ｍ．Ｅ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ．２００５；２３（１０）：２３４６－５７、及びＤｕｄｌｅｙ Ｍ．Ｅ．，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２００２；２９８（５５９４）：８５０－４）。７日間のプレコンディショニングレジメンに続いて、患者にＴＩＬ細胞製品を注入した。
【３５９７】
ＴＩＬ注入後、８～１２時間毎にＩＶ ＩＬ－２（６００，０００ＩＵ／ｋｇ）を投与し、最初の用量は、ＴＩＬ注入の完了の３～２４時間後に投与され、最大６用量まで継続

した。施設の基準に従って、ＩＬ－２の用量は、実際の体重に基づいて計算することができる。

【３５９８】

患者集団の選択

コホート１Ａ：

患者は、切除不能なＭＭの確定診断を受けた（ステージＩＩＩＣまたはステージＩＶ、米国癌合同委員会［ＡＪＣＣ］病期分類システムに従って組織学的に確認された）。眼内黒色腫患者は除外された。患者は、以前に免疫腫瘍学を標的とした薬剤を受けていてはならない。ＢＲＡＦ変異が陽性の場合、患者は、以前にＢＲＡＦ／ＭＥＫ標的療法を受けていた可能性があった。

【３５９９】

コホート２Ａ：

患者は、進行性、再発性、及び／または転移性のＨＮＳＣＣを有しており、治療ナイーブであり得、病理学レポートを介した原発腫瘍の組織学的診断が必要である。患者は、以前に免疫療法レジメンを受けていてはならない。

【３６００】

コホート３Ａ：

患者は、ステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ（扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌）の確定診断を受けた。有効な標的療法が利用可能ながん遺伝子駆動腫瘍を有する患者は、少なくとも１つの標的療法を受けていた。

【３６０１】

コホート３Ｂ：

患者は、ステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ（扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌）の確定診断を受けており、以前にＣＰＩ（例えば、抗ＰＤ－１／抗ＰＤ－Ｌ１）による全身療法を受けていた。有効な標的療法が利用可能ながん遺伝子駆動腫瘍を有する患者は、少なくとも１つの標的療法を受けていた。

【３６０２】

コホート１Ａ、２Ａ、及び３Ａの免疫療法を除き、すべての患者は、最大３つの全身抗癌療法を受けていた（以下の包含基準を参照）。以前に治療を受けた場合、患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が確認されていた。

【３６０３】

包含基準

患者は、研究に参加するために以下の包含基準をすべて満たしている必要がある。

１．すべての患者は、組織学的または病理学的にそれぞれの組織学的悪性腫瘍の確定診断を受けた。

○切除不能または転移性黒色腫（コホート１Ａ）

○頭頸部の進行性、再発性、または転移性扁平上皮癌（コホート２Ａ）

○ステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ（扁平上皮癌、非扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌）（コホート３Ａ及び３Ｂ）。

２．コホート１Ａ、２Ａ、及び３Ａのみ：患者は、免疫療法ナイーブであった。以前に治療された場合、患者は、最近の治療中または治療後に進行していた。コホート１Ａ、２Ａ、及び３Ａは、最大３つの全身性抗癌療法を以前に受けている可能性があり、具体的には以下の通りである。

○コホート１Ａ：切除不能または転移性黒色腫（ステージＩＩＩＣまたはステージＩＶ）を有する患者。ＢＲＡＦ変異陽性の場合、患者は、ＢＲＡＦ阻害剤を投与されている可能性がある。

○コホート２Ａ：切除不能または転移性ＨＮＳＣＣの患者。最初の化学放射線療法を受けていた患者は許可された。

○コホート３Ａ：ステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ（扁平上皮癌、非扁平上皮癌、腺癌、または大細胞癌）を有し、免疫療法ナイーブであり、局所進行または転

移の状況で３選択以下の前の全身療法後に進行した患者。アジュバントもしくはネオアジュバントの設定で、または根治的化学放射線療法の一部として全身療法を受けた患者は適格であり、以前の全身療法の完了から１２ヶ月以内に疾患が進行した場合、１つの治療を受けたとみなされた。標的療法に感受性のある変異を有する既知のがん遺伝子ドライバー（例えば、ＥＧＦＲ、ＡＬＫ、ＲＯＳ）を有する患者は、少なくとも１つの標的療法の後に進行したに違いない。

３．コホート３Ｂのみ：ステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ（扁平上皮癌、非扁平上皮癌、腺癌、または大細胞癌）を有し、３つ以下の以前の全身療法の一部として、ＣＰＩ（例えば、抗ＰＤ－１／抗ＰＤ－Ｌ１）による全身療法を以前に受けていた患者。

○患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が確認されていた。

○アジュバントもしくはネオアジュバントの設定で、または根治的化学放射線療法の一部として全身療法を受けた患者は適格であり、以前の全身療法の完了から１２ヶ月以内に疾患が進行していた場合、１つの治療を受けたとみなされた。

○標的療法に感受性のある変異を有する既知のがん遺伝子ドライバー（例えば、ＥＧＦＲ、ＡＬＫ、ＲＯＳ）を有する患者は、少なくとも１つの標的療法の後に進行したに違いない。

４．患者は、ＴＩＬ治験薬産生のために、切除後に最少直径１．５ｃｍの切除可能な病変（または凝集病変）を少なくとも１つ有していた。外科的切除が患者に追加のリスクをもたらさない限り、腫瘍組織を、複数の多様な転移性病変から得ることが奨励された。

○ＴＩＬ生成のために切除が検討されている病変が、以前に照射された領域内にある場合、その病変は、切除前にＸ線写真で進行を示している必要がある。

○患者は、プロトコルが必要とする検査に適正な組織病理標本を有していなければならない。

５．患者は、ＴＩＬ製造の腫瘍切除の後に、標準かつ周知のＲＥＣＩＳＴ　１．１ガイドラインによって定義されているように、残留する測定可能な疾患を有していた（例えば、Ｅｉｓｅｎｈａｕｅｒ，Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃａｎｃｅｒ　４５：２２８－２４７（２００９）を参照、ｗｗｗ．ｐｒｏｊｅｃｔ．ｅｏｒｔｃ．ｏｒｇ／ｒｅｃｉｓｔ／ｗｐ－ｃｏｎｔｅｎｔ／ｕｐｌｏａｄｓ／ｓｉｔｅｓ／４／２０１５／０３／ＲＥＣＩＳＴＧｕｉｄｅｌｉｎｅｓ．ｐｄｆでも入手可能）：

○以前に照射された領域内の病変は、それらの病変で疾患の進行が示されていない限り、標的病変として選択されなかった。

○ＲＥＣＩＳＴ毎に依然として測定可能なＴＩＬ生成のために部分的に切除された病変を、非標的病変として選択することができるが、応答評価の標的病変としては機能することができなかった。

６．患者は、同意時に１８歳以上であった。

７．患者の米国東海岸癌臨床試験グループ（Ｅａｓｔｅｒｎ　Ｃｏｏｐｅｒａｔｉｖｅ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　Ｇｒｏｕｐ、ＥＣＯＧ）のパフォーマンスステータスは０または１であり、推定平均余命は３ヶ月以上であった。

８．妊娠可能性のある患者または妊娠可能性のあるパートナーがいる患者は、治療中に承認された非常に効果的な避妊方法を実践し、すべてのプロトコル関連療法を受けてから１２ヶ月間継続しなければならなかった（注記：生殖可能性のある女性は、治療中及びＩＬ－２の最後の投与後１２ヶ月間、またはペムブロリズマブの最後の投与後４ヶ月間のいずれか遅い時期に有効な避妊法を使用することとした）。男性は、研究中または治療中止後１２ヶ月のいずれか遅い方で、精子を提供することができなかった。

９．患者は、以下の血液学的パラメータを有していた：

○絶対好中球数（ＡＮＣ）≧１０００／ｍｍ３、

○ヘモグロビン≧９．０ｇ／ｄＬ、

○血小板数≧１００，０００／ｍｍ３。

１０．患者は、適正な臓器機能を有していた：

○血清アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）／血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ（ＳＧＰＴ）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）／ＳＧＯＴが、正常上限（ＵＬＮ）の３倍以下、肝転移がＵＬＮの５倍以下の患者。

○スクリーニング時にコッククロフト・ゴールト式を使用して推定されたクレアチニンクリアランス≧４０ｍＬ／分。

○総ビリルビン≦２ｍｇ／ｄＬ。

○ジルベール症候群の患者は、総ビリルビン≦３ｍｇ／ｄＬでなければならない。

１１．患者は、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ１及びＨＩＶ２）に対して血清陰性であった。Ｂ型肝炎ウイルス表面抗原（ＨＢｓＡｇ）、Ｂ型肝炎コア抗体（抗ＨＢｃ）、または急性もしくは慢性感染を示すＣ型肝炎ウイルス（抗ＨＣＶ）の血清学が陽性の患者は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）に基づくウイルス量及び特定のウイルス曝露の局所有病率に応じて登録した。

１２．患者は、最初の研究治療（すなわち、ＮＭＡ－ＬＤまたはペムブロリズマブの開始）の前に、以下に詳述されるように、最小期間の前の抗がん療法（複数可）からのウォッシュアウト期間を有していた。

○標的療法：ウォッシュアウトが治療の開始の最低１４日前であれば、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）、ＭＥＫ、ＢＲＡＦ、ＡＬＫ、ＲＯＳ１または他の標的薬剤（例えば、エルロチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、オシメルチニブ、クリゾチニブ、セリチニブ、ロラチニブ）による以前の標的療法が許可された。

○化学療法：ウォッシュアウトが治療開始の最低２１日前という条件で、アジュバント、ネオアジュバント、または根治的化学療法／化学放射線療法が許可された。

○コホート３Ｂのみの免疫療法、抗ＰＤ－１、他のｍＡｂ、またはワクチンによる以前のチェックポイント標的療法は、ＮＭＡ－ＬＤの開始前２１日以上のウォッシュアウト期間で許可された。

○緩和的放射線療法：脱毛症、皮膚色素沈着の変化、または他の臨床的に重要でない事象、例えば小領域放射線皮膚炎または直腸もしくは尿意切迫感を除いて、すべての放射線関連毒性がグレード１またはベースラインに解決された場合、以前の外部ビーム放射線療法が許可された

○ＲＥＣＩＳＴ　１．１を介して応答のターゲットとして評価されている腫瘍病変（複数可）は、放射線ポータルの外側にあったが、ポータル内の場合は、進行が実証されていなければならない（上記の包含基準を参照）。

○手術／事前に計画された手順：創傷治癒が起こり、すべての合併症が解消され、腫瘍切除の前に少なくとも１４日が経過している場合（主要な手術手順の場合）、以前の外科的手順（複数可）が許可された。

１３．患者は、コホートの割り当て前に、脱毛症または白斑を除いて、以前のすべての抗癌治療関連有害事象（ＴＲＡＥ）からグレード１以下（有害事象の一般用語基準［ＣＴＣＡＥ］による）に回復していた。

１４．以前の抗癌療法から安定したグレード２以上の毒性を有する患者は、医療モニターと相談した後、ケースバイケースで検討された。

１５．ペムブロリズマブによる治療によって悪化すると合理的に予想されない不可逆的毒性を有するコホート１Ａ、２Ａ、及び３Ａの患者は、医療モニターとの協議後にのみ含まれた。コホート３Ｂの患者のみ、免疫チェックポイント阻害剤ＣＰＩ（複数可）による以前の治療の結果として、グレード２以上の下痢または大腸炎が記録されている患者は、少なくとも６ヶ月間無症候性であったか、または治療後腫瘍切除前の目視評価による結腸内視鏡検査で正常でなければならない。

１６．患者は、保護された健康情報の使用及び開示について、書面による承認を提供していなければならない。

【３６０４】

除外基準

以下の基準のうちのいずれかを満たす患者は、研究から除外した。

１．ブドウ膜／眼起源の黒色腫を有する患者
２．過去２０年以内に骨髄非破壊的または骨髄破壊的化学療法レジメンを含む、臓器同種移植または以前の細胞移植療法を受けていた患者。（注記：この基準は、以前のＴＩＬ治療で以前のＮＭＡ－ＬＤレジメンがあったことを除いて、ＴＩＬによる再治療を受けている患者に適用可能であった。）
３．症候性及び／または未治療の脳転移を有する患者。
○●脳転移が根治的に治療された患者は、治療開始前に患者が２週間以上にわたって臨床的に安定し、治療後の磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）による新たな脳病変がなく、患者が継続的なコルチコステロイド治療を必要としない場合、医療モニターと相談した後に登録が検討される。
４．登録から２１日以内に全身ステロイド療法を受けている患者。
５．妊娠中または授乳中の患者。
６．治験責任医師の意見では、研究参加のリスクが高い、活動性の医学的疾患（複数可）、例えば全身性感染症（例えば、梅毒もしくは抗生物質を必要とする他の感染症）、凝固障害、または心臓血管系、呼吸器系、もしくは免疫系の他の活動性の主要な医学的疾患を有していた患者。
７．患者は、活動性または以前に記録された自己免疫または炎症性障害（肺炎、炎症性腸疾患［例えば、大腸炎もしくはクローン病］、憩室炎［憩室症を除く］、全身性紅斑性狼瘡、サルコイドーシス症候群、またはウェゲナー症候群［多発血管炎を伴う肉芽腫症、グレイブス病、関節リウマチ、下垂体炎、ブドウ膜炎等］）を有しない場合がある。以下は、この基準の例外であった。
○白斑または脱毛症を有する患者。
○甲状腺機能低下症（例えば、橋本症候群に続く）が安定している患者
○ホルモン補充療法。
○全身療法を必要としない任意の慢性皮膚疾患。
○食事療法だけで制御されるセリアック病の患者。
８．治療開始前２８日以内に生ワクチン接種または弱毒化ワクチン接種を受けていた患者。
９．何らかの形態の原発性免疫不全症（重症複合免疫不全症［ＳＣＩＤ］及び後天性免疫不全症候群［ＡＩＤＳ］など）を有していた患者。
１０．治験薬のいずれかの成分に対する過敏症の病歴を有する患者。ＴＩＬは、以下のうちのいずれかを含むがこれらに限定されない、ＴＩＬ製品製剤のいずれかの成分に対する既知の過敏症を有する患者には投与されなかった。
○●ＮＭＡ－ＬＤ（シクロホスファミド、メスナ、及びフルダラビン）
○●Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ（登録商標）、アルデスロイキン、ＩＬ－２
○●アミノグリコシド系抗生物質（すなわち、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン［ゲンタマイシン過敏症の皮膚検査陰性者を除く］）
○●ジメチルスルホキシドを含むＴＩＬ産物製剤の任意の成分
○［ＤＭＳＯ］、ＨＳＡ、ＩＬ－２、及びデキストラン－４０
○●ペムブロリズマブ
１１．左心室駆出率（ＬＶＥＦ）が４５％未満の患者、またはニューヨーク心臓協会クラスＩＩ以上の患者。６０歳以上の患者、あるいは虚血性心疾患、胸痛、または臨床的に重大な心房性及び／または心室性不整脈の病歴のある患者において、不可逆的な壁運動異常を示す心臓ストレス試験。
○治験依頼者のメディカルモニターの承認を得て、駆出率及び心臓病クリアランスが十分であれば、心臓ストレス試験に異常がある患者を登録することができた。
１２．閉塞性または拘束性肺疾患があり、予測正常値の６０％以下のＦＥＶ１（１秒の強制呼気量）が記録されている患者。
○●患者が上気道の解剖学的構造の異常（すなわち、気管切開）のために信頼できる肺活量測定を行うことができなかった場合は、６分間の歩行試験を使用して呼吸機能を評価

した。年齢及び性別に対して予測される少なくとも８０％の距離を歩くことができなかった患者、または試験中の任意の時点で低酸素症の証拠を示した患者（ＳｐＯ２＜９０％）は除外される。

１３．過去３年以内に別の原発性悪性腫瘍があった患者（治療を必要としなかった、または１年以上前に治癒的に治療された患者を除き、治験責任医師の判断では、非黒色腫皮膚癌、ＤＣＩＳ、ＬＣＩＳ、前立腺癌グリーソンスコア≦６または膀胱癌を含むが、これらに限定されない重大な再発リスクをもたらさなかった）。

１４．治療開始から２１日以内に治験薬を用いた別の臨床試験への参加。

【３６０５】

研究エンドポイント及び計画された分析

一次エンドポイント及び二次エンドポイントは、コホートによって別々に分析した。

【３６０６】

一次エンドポイント：

ＯＲＲは、有効性分析セットの中でＲＥＣＩＳＴ１．１に従って治験責任医師が評価した最良の応答として確認されたＰＲまたはＣＲのいずれかを達成した患者の割合として定義された。

【３６０７】

客観的反応を各疾患評価ごとに評価し、ＯＲＲは、対応する両側９０％　ＣＩを用いて二項比率として表された。各コホートの一次分析は、評価期間の早期に進行／期限切れまたは中止されない限り、コホート毎に治療を受けたすべての患者が１２ヶ月間追跡される機会があるときに行った。

【３６０８】

安全性一次エンドポイントは、各コホート内のグレード３以上のＴＥＡＥ発生率によって測定され、対応する両側９０％　ＣＩの二項比率として表された。

【３６０９】

二次エンドポイント：

有効性：

二次有効性エンドポイントは、次のように定義された。

【３６１０】

治験責任医師によって評価された確認済みＣＲを達成した応答者に基づくＣＲ率。ＤＣＲは、確認されたＰＲ／ＣＲまたは持続的なＳＤ（少なくとも６週間）を達成した患者数の合計を、有効性分析セットの患者数で割り、１００％を掛けたものとして導き出された。ＣＲ率及びＤＣＲは、点推定及びその両側９０％　ＣＩを使用して要約した。

【３６１１】

ＤＯＲは、客観的な応答を達成した患者の間で定義された。再発性もしくは進行性疾患が客観的に記録された最初の日付、またはその後の抗癌療法の受容もしくは患者の死亡（最初に記録された方）まで、初回応答（ＰＲ／ＣＲ）基準が満たされていることから測定した。ＰＤを経験していない、またはデータカットもしくは最終データベースロックの時点より前に死亡していない患者は、腫瘍状態の適切な評価が行われた最終日に事象時間が打ち切られる。

【３６１２】

ＰＦＳは、リンパ球枯渇からＰＤまでの時間（月単位）、または何らかの原因による死亡のいずれか早い方の事象として定義された。ＰＤを経験していない、またはデータカットもしくは最終データベースロックの時点で死亡していない患者は、腫瘍状態の適切な評価が行われた最終日に事象時間が打ち切られた。

【３６１３】

ＯＳは、リンパ球枯渇の時点から何らかの原因による死亡までの時間（月単位）として定義された。データカットまたは最終的なデータベースロックの時点までに死亡していない患者は、既知の生存状態の最終日に事象時間が打ち切られた。

【３６１４】

ＤＯＲ、ＰＦＳ、及びＯＳは、右側打ち切りを受けた。カプラン・マイヤー法を使用して、事象までの時間の有効性エンドポイントを要約する。腫瘍評価のベースラインデータは、すべてのコホートのリンパ球枯渇前の最後の走査であった。

【３６１５】

上記の有効性パラメーターは、ベースラインの疾患特徴：ＢＲＡＦステータス（コホート１Ａのみ）、ＨＰＶステータス（コホート２Ａのみ）、扁平上皮または非扁平上皮肺疾患（コホート３Ａ及び３Ｂのみ）、ならびに抗ＰＤ－Ｌ１ステータスによって定義されたサブセットに適用可能なコホートについて推定される。

【３６１６】

実施例１５：固形腫瘍を有する患者における自己腫瘍浸潤リンパ球の第２相多施設研究

この実施例の研究は、選択された固形腫瘍（転移性黒色腫、頭頸部扁平上皮癌、及び非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ））の患者における自己腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の第２相多施設グローバル非盲検研究である。この実施例は、実施例１０～１７を含む本明細書の実施例に従って製造され、本出願全体を通して説明され、凍結保存されるＴＩＬ製品を使用し、２２日間の製造プロセスを有する。患者がシクロホスファミド（６０ｍｇ／ｋｇ×２日）及びフルダラビン（２５ｍｇ^{2}／ｍ×５日）による骨髄非破壊的リンパ球枯渇の調製レジメンを完了した後、ＴＩＬ製品の単回注入を行った。以下に説明されるように、４つの患者コホートが存在する。

●コホート１Ａ（併用コホート）：免疫療法ナイーブであり、３選択以下の前の全身療法が３つ以下である、ＩＩＩＣ期またはＩＶ期の切除不能または転移性黒色腫の患者。これらの患者は、ペムブロリズマブと合わせてＴＩＬ製品を受容する。

●コホート２Ａ（併用コホート）：免疫療法ナイーブであり、３選択以下の前の全身療法がある、進行性、再発性、または転移性の頭頸部扁平上皮癌患者。これらの患者は、ペムブロリズマブと合わせてＴＩＬ製品を受容する。

●コホート３Ａ（併用コホート）：免疫療法ナイーブであり、３選択以下の前の全身療法がある、局所進行性または転移性（ステージＩＩＩ－ＩＶ）のＮＳＣＬＣ患者。これらの患者は、ペムブロリズマブと合わせてＴＩＬ製品を受容する。

●コホート３Ｂ（単剤コホート）：３つ以下の全身療法の一部として、チェックポイント阻害剤（抗ＰＤ－１／抗ＰＤ－Ｌ１）による全身療法を以前に受けたことがある、ステージＩＩＩ－ＩＶのＮＳＣＬＣ患者。これらの患者は、単剤としてＴＩＬ製品を受容する。

【３６１７】

２人のＮＳＣＬＣ患者がコホート３Ｂ（免疫チェックポイント阻害剤後のＴＩＬ単独）に登録され、４２日目に最初の反応評価訪問を完了した）を以下に説明する。

【３６１８】

患者Ａは、ステージＩＶＡ肺腺癌と診断された６３歳の女性である。彼女は、ペムブロリズマブ、カルボプラチン／ベバシズマブ、及びビノレルビンを含む３選択以下の以前の全身療法を受けていた。以前のペムブロリズマブ療法に対する彼女の最良の応答は、進行性疾患であり、カルボプラチン／ベバシズマブに対する応答は、部分応答であり、彼女のビノレルビン応答は、評価できなかった（彼女は応答評価の前に中止した）。彼女は、ＴＩＬの生成のために下葉肺切除術を受け、ＴＩＬ製品の３．７５×１０^{9}個の細胞を注入した。患者は、最初の応答評価（４２日目）のために訪問し、そこでのコンピューター断層撮影（ＣＴ）走査は、ベースライン走査と比較して腫瘍量の４％低減を示し、これはＲＥＣＩＳＴ１．１による安定した疾患応答である。

【３６１９】

患者Ｂは、ステージＩＶＢの基底細胞扁平上皮癌と診断された７０歳の女性である。彼女は、カルボプラチン／アブラキサン、ニボルマブ、及びシスプラチン／ゲムシタビンを含む３選択以下の前の治療を受けていた。以前のカルボ／アブラキサンに対する彼女の最良の応答は評価できなかった（毒性のために治療が中止された）、ニボルマブに対する応答は、進行性疾患であり、シスプラチン／ゲムシタビンは部分応答であった。彼女は、Ｔ

ＩＬの生成のために脾臓病変切除を受け、ＴＩＬ製品の３９×１０^{9}個の細胞を注入した。患者は、最初の応答評価（４２日目）のために訪問し、そこでのＣＴ走査は、ベースライン走査と比較して腫瘍量の４４％低減を示し、これはＲＥＣＩＳＴ１．１による部分応答である。

【３６２０】

実施例１６：局所進行性または転移性非小細胞肺癌患者における自己腫瘍浸潤リンパ球の第２相多施設研究

この実施例は、局所進行性、切除不能または転移性の非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）で、アクショナブルなドライバー変異がなく、チェックポイント阻害剤（ＣＰＩ）＋化学療法±ベバシズマブ（ベバシズマブ（ＡＶＡＳＴＩＮ）、ＶＥＧＦＡ阻害剤を含む）からなる承認された単一の全身療法中の疾患進行またはそれに続く疾患進行を有する患者の治療に関するものであり、治療のためのコホートを以下に要約する。

●コホート１：ＣＰＩ治療前に腫瘍がプログラム細胞死－リガンド１（ＰＤ－Ｌ１）を発現しなかった患者（腫瘍割合スコア［ＴＰＳ］＜１％）。

●コホート２：ＣＰＩ治療前に腫瘍がＰＤ－Ｌ１（ＴＰＳ≧１％）を発現した患者。コホート３：ＣＰＩ治療前に腫瘍がＰＤ－Ｌ１（ＴＰＳ＜１％）を発現しなかった患者で、以下のうちの少なくとも１つが原因でＴＩＬ生成のための外科的採取を安全に受けられない患者：

〇許容できない外科的リスク、または

〇固形腫瘍における奏効評価基準（ＲＥＣＩＳＴ）ｖ１．１評価には、外科的にアプローチ可能な病変が必要であった。

●コホート４：再治療コホート：この研究のコホート１、２または３でＴＩＬベースの免疫療法で以前に治療されたことのある患者。

【３６２１】

治療は、患者指向の療法のための個々の患者の腫瘍由来の自己ＴＩＬベースの免疫療法を使用して行われる。

【３６２２】

研究の詳細

自己ＴＩＬ療法レジメン

ＴＩＬベースの免疫療法治療レジメンは、ＴＩＬベースの免疫療法注入の前に合計５日間のシクロホスファミド及びフルダラビンを使用したＮＭＡ－ＬＤ調製レジメンのコースを含み、ＴＩＬベースの免疫療法注入後のＩＬ－２投与（最大６回の用量）の限られたコースを含んでいた。移送されたＴＩＬの移植、拡張、及び活性化をサポートするために、ＮＭＡ－ＬＤ調製レジメン及びＩＬ－２をレジメンに含めた。

【３６２３】

いくつかの調製レジメンがＴＩＬ療法と併せて使用されていた。ＮＭＡ－ＬＤの調製レジメンには、シクロホスファミド／フルダラビン、全身照射（ＴＢＩ）、または両方の組み合わせが含まれた。本例示的な研究は、ｃｙ－ｆｌｕレジメンを利用した。現在の研究で使用されているＮＭＡ－ＬＤ調製レジメンは、国立がん研究所（ＮＣＩ）によって開発及び試験された方法に基づいており、患者の入院期間を短縮するために、２日間のシクロホスファミドと５日間のフルダラビンを併用した。各患者は、ＴＩＬベースの免疫療法の注入前にＮＭＡ－ＬＤ調製レジメンを受ける。

【３６２４】

治療の簡単な説明

治療は、すぐに注入可能な自己ＴＩＬベースの免疫療法であった。ＴＩＬベースの免疫療法は、個々の患者の腫瘍から取得され、サイトカインＩＬ－２及びマウスモノクローナル抗体（ｍＡｂ）からヒトＣＤ３（ＯＫＴ３）の存在下での細胞培養を介してエクスビボで拡張した自己ＴＩＬから構成された。

【３６２５】

最終医薬品は、ＩＶ注入のために製剤化された凍結保存された生細胞懸濁液であった。

エクスビボで拡張された自己ＴＩＬは、ＣｒｙｏＳｔｏｒ（登録商標）ＣＳ１０凍結保存培地／ＰｌａｓｍａＬｙｔｅ（最終ジメチルスルホキシド［ＤＭＳＯ］濃度：５％）中で、０．５％ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）及び３００ＩＵ／ｍＬ（１２ｎｇ／ｍＬ）のＩＬ－２とともに製剤化された。製剤化された製品を、気相液体窒素中で－１５０℃未満に制御された速度で凍結し、クライオシッパーで適切な臨床現場に発送し、患者に注入するために使用する前に解凍した。

【３６２６】

ＴＩＬの産生及び拡張

製造プロセスは、生存可能な腫瘍材料を含有する腫瘍病変の外科的切除またはコア生検によって臨床現場で開始された。複数の別個の病変生検の集合体を患者から切除することもでき、患者の安全性が認められる場合は奨励された。腫瘍検体を輸送培地に置き、速達便で２～８℃で適正製造基準（ＧＭＰ）製造施設に発送した。ＧＭＰ製造施設に到着すると、腫瘍検体を断片に解剖し、次いで活性化し（初期拡張ステップ）、急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）段階に必要な生細胞の最小数を生成した。腫瘍はまた、酵素的に解離することもでき、ＴＩＬは、ＲＥＰに進む前にバイオマーカーの発現のために選択することができる。ＲＥＰステージ（第２の拡張ステップ）は、ＩＬ－２、ＯＫＴ３、及び照射された同種異系末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）の存在下で細胞をさらに拡張させる。次いで、ＲＥＰ拡張細胞を採取し、洗浄し、血液輸送／注入バッグ中に製剤化して、宅配便によって臨床現場に発送する。ＴＩＬベースの免疫療法の製造プロセスの図は、図３４及び３５に提供される。

【３６２７】

ＴＩＬベースの免疫療法最終製品の各凍結保存バッグを、患者特有のラベルでラベル付けした。ＴＩＬベースの免疫療法は、患者に投与するために製造施設から臨床現場に発送された。

【３６２８】

この実施例は、局所的に進行した切除不能または転移性ＮＳＣＬＣを有する患者におけるＴＩＬベースの免疫療法を評価する前向き、非盲検、マルチコホート、非ランダム化、多施設第２相研究に関連していた。

【３６２９】

以下のコホートを研究した。

コホート１：既知のアクショナブルなドライバー変異がなく、ＣＰＩ治療の前に腫瘍がＰＤ－Ｌ１（腫瘍割合スコア［ＴＰＳ］＜１％）を発現しなかったステージＩＶのＮＳＣＬＣ患者、ＣＰＩ＋化学療法±ベバシズマブの併用からなる単一の承認された全身療法中またはその後に疾患進行が認められた患者、ＴＩＬ産生のために直径が最小１．５ｃｍの少なくとも１つの切除可能な病変（または凝集した病変）を有し、切除後にＲＥＣＩＳＴ１．１によって定義されるように少なくとも１つの残りの測定可能な病変を有していた患者における、単剤療法としてのＴＩＬベースの免疫療法。

コホート２：既知のアクショナブルなドライバー変異がなく、ＣＰＩ治療の前に腫瘍がＰＤ－Ｌ１（ＴＰＳ＞１％）を発現したステージＩＶのＮＳＣＬＣ患者、ＣＰＩ＋化学療法±ベバシズマブの併用からなる単一の承認された全身療法中またはその後に疾患進行が認められた患者、及びＴＩＬ産生のために直径が最小１．５ｃｍの少なくとも１つの切除可能な病変（または凝集した病変）を有し、切除後にＲＥＣＩＳＴ１．１によって定義されるように少なくとも１つの残りの測定可能な病変を有していた患者における、単剤療法としてのＴＩＬベースの免疫療法。

コホート３：任意の既知のアクショナブルなドライバー変異がなく、腫瘍がＣＰＩ治療の前にＰＤ－Ｌ１（ＴＰＳ＜１％）を発現しなかったステージＩＶのＮＳＣＬＣ患者、ＣＰＩ＋化学療法±ベバシズマブの併用からなる単一の承認された全身療法中またはその後に疾患進行が認められた患者、及び以下：１）許容できない外科的リスク、または２）外科的にアプローチ可能な病変が、ＲＥＣＩＳＴ評価のために必要である、のうちの少なくとも１つが原因でＴＩＬ生成のための外科的採取を安全に受けることができなかった患者

における、単剤療法としてのＴＩＬベースの免疫療法。
　コホート４：コホート１、２または３への参加の一環として以前にＴＩＬベースの免疫療法を受けた患者における、再治療としてのＴＩＬベースの免疫療法単剤療法。
【３６３０】
　コホート１、２、３、及び４について、すべての患者は、シクロホスファミド及びフルダラビンからなる骨髄非破壊的リンパ球枯渇（ＮＭＡ－ＬＤ）前処置レジメンが先行して、自己凍結保存ＴＩＬベースの免疫療法を受けた。ＴＩＬベースの免疫療法注入後、最大６用量のＩＶ　ＩＬ－２（アルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリアントなど）を投与した。あるいは、デクレッシェンドＩＬ－２または低用量ＩＬ－２を、本明細書に記載されるように使用してもよい。
【３６３１】
　ＴＩＬベースの免疫療法による自己ＴＩＬ療法には、以下の一般的なステップが含まれていた。
　●自己ＴＩＬ細胞製品のソースとして機能した自己組織を提供するための腫瘍採取、
　●中央適正製造基準（ＧＭＰ）施設における自己ＴＩＬベースの免疫療法治験薬（ＩＰ）の製造、
　●５日間の骨髄非破壊的リンパ球枯渇（ＮＭＡ－ＬＤ）前処置レジメン、
　●ＴＩＬベースの免疫療法製品の注入（０日目）、及び
　●６用量以下のＩＶ　ＩＬ－２の投与。
【３６３２】
主な目的：
　独立審査委員会（ＩＲＣ）（コホート１及び２）または治験責任医師コホート３及びコホート４によって評価された、固形腫瘍の奏効評価基準（ＲＥＣＩＳＴ１．１）を使用して、客観的奏効率（ＯＲＲ）によって決定されたチェックポイント阻害剤（複数可）（ＣＰＩ［ｓ］）＋化学療法±ベバシズマブからなる単一の承認された全身療法中またはその後に疾患進行が認められた、アクショナブルなドライバー変異がない、局所的に進行した切除不能または転移性のＮＳＣＬＣ患者におけるＴＩＬベースの免疫療法の有効性を評価した。
【３６３３】
副次的目的：
　ＲＥＣＩＳＴ１．１を使用してＯＲＲによって決定され、治験責任医師によって評価される（コホート１及び２）、ＴＩＬベースの免疫療法の有効性を評価した。
【３６３４】
　完全奏効率（ＣＲ）；奏効期間（ＤＯＲ）；疾患制御率（ＤＣＲ）；ＲＥＣＩＳＴ１．１を使用して、ＩＲＣ（コホート１及び２）ならびに治験責任医師（すべてのコホート）によって評価される無増悪生存期間（ＰＦＳ）；ならびに全生存期間（ＯＳ）を使用して、ＴＩＬベースの免疫療法の有効性をさらに評価した。
【３６３５】
　グレード≧３の治療下で発現した有害事象（ＴＥＡＥ）の発生率によって測定した、ＮＳＣＬＣ患者におけるＴＩＬベースの免疫療法の安全性プロファイルを特徴付けた。
【３６３６】
　コホート３のみ：コア生検からＴＩＬベースの免疫療法を生成する効率を評価した。
【３６３７】
探索的目的：
　ＴＩＬベースの免疫療法の持続性を評価し、反応、転帰、及び毒性変数に影響を与える可能性のある免疫相関を特定した。
【３６３８】
　それぞれの適応症固有の健康関連生活の質（ＨＲＱｏＬ）パラメータを評価した。
【３６３９】
エンドポイント－主要エンドポイント：

ＯＲＲは、ＩＲＣ（コホート１及び２）または治験責任医師（コホート３及び４）によってＲＥＣＩＳＴ１．１に従って評価された。

【３６４０】

エンドポイント－副次的エンドポイント：

重症度、重篤度、研究治療との関係、ならびに重篤な有害事象（ＳＡＥ）、治療関連有害事象、及び早期治療中止または評価期間からの離脱または死亡につながる有害事象を含む、治療下で発現した有害事象（ＴＥＡＥ）の特徴。

【３６４１】

ＲＥＣＩＳＴ１．１（コホート１及び２）に従ってＩＲＣによって評価された、ＣＲ（完全奏効）率、ＤＯＲ（奏効期間）、ＤＣＲ（疾患制御率）、及びＰＦＳ（無増悪生存期間）。

【３６４２】

ＲＥＣＩＳＴ１．１（すべてのコホート）に従って治験責任医師によって評価された、ＯＲＲ（客観的奏効率）、ＣＲ率、ＤＯＲ、ＤＣＲ、及びＰＦＳ。

【３６４３】

ＯＳ（全生存）。

【３６４４】

コア生検から生成されたＴＩＬ製品の成功率（コホート３）。

【３６４５】

エンドポイント－探索的エンドポイント：

ＴＩＬ製品を含むＴ細胞のインビボ持続性を、経時的に患者の血液中のＴＩＬ製品特異的Ｔ細胞受容体－ベータ相補性決定領域３（ＣＤＲ３）配列の存在を監視することによって評価した。製品及び末梢血試料中に存在するＣＤＲ３配列を、ディープシーケンシングを使用して同定した。

【３６４６】

ＴＩＬベースの免疫療法の活性の予測及び薬力学的臨床バイオマーカーの同定を目的とした探索的エンドポイント：

●ＴＩＬベースの免疫療法の表現型及び機能的特徴、

●腫瘍組織の免疫プロファイル、

●ＴＩＬ製品、腫瘍組織、及び／またはＰＢＭＣの遺伝子発現プロファイル、

●腫瘍の変異ランドスケープ、

●循環免疫因子、ならびに

●ＰＢＭＣの免疫組成物。

【３６４７】

欧州がん研究治療機関（ＥＯＲＴＣ）の生活の質質問票（ＱＬＱ）Ｃ３０及びＱＬＱ ＬＣ１３によって評価されたＨＲＱｏＬ（健康関連の生活の質）。

【３６４８】

研究デザインの詳細：

前向き、非盲検、マルチコホート、非ランダム化、多施設第２相研究では、ＴＩＬベースの免疫療法による養子細胞療法（ＡＣＴ）が評価された。

【３６４９】

すべての患者は、以下のステップからなるＴＩＬベースの免疫療法を受けた。

●腫瘍採取は自己ＴＩＬ細胞製品のソースとして機能する自己組織を提供した、

●中央適正製造基準（ＧＭＰ）施設における自己ＴＩＬベースの免疫療法治験薬（ＩＰ）の製造、

●５日間の骨髄非破壊的リンパ球枯渇（ＮＭＡ－ＬＤ）前処置レジメン、

●ＴＩＬベースの免疫療法製品の注入（０日目）、及び

●６用量以下のＩＶ　ＩＬ－２の投与。

【３６５０】

別段の指定がない限り、以下の一般的な連続期間が４つのコホートすべてで発生する。

１．スクリーニング期間：インフォームドコンセントフォーム（ＩＣＦ）の署名から登録まで
２．前治療期間：登録から調製ＮＭＡ－ＬＤレジメンの開始まで。
３．治療期間：調製ＮＭＡ－ＬＤの開始から治療終了（ＥＯＴ）来院まで。これは、ＮＭＡ－ＬＤ（－５日目～－１日目）、ＴＩＬベースの免疫療法注入（０日目）、続いてＩＬ－２投与（０日目または１～３日目または４日目）を含む、８～９日間の治療で構成された。ＥＯＴは、０日目のおよそ３０日後に起こった。
４．治療後のフォローアップ期間。これは以下で構成されている。
ａ．治療後有効性フォローアップ期間（ＴＥＦＵ）：疾患の進行または新しい抗がん療法の開始のいずれか早い方によって促される、ＥＯＴ来院から研究完了（治療後５年［６０ヶ月］）または有効性評価終了（ＥＯＥＡ）来院まで。
ｂ．長期フォローアップ期間（ＬＴＦＵ）：上記のようなＥＯＥＡから研究完了まで（治療後５年［６０ヶ月］）。

【３６５１】
研究参加者（登録患者）は、早期にＬＴＦＵに移行する（例えば、同意の部分的撤回、または何らかの理由でＴＩＬベースの免疫療法を受けないと判断された場合）。研究の早期中止は、治験依頼者による同意撤回、死亡、フォローアップ不能、または研究終了のいずれかによって促された。研究デザインのフローチャートを図３６に提示する。
【３６５２】
詳細な用量及び治療スケジュール：
ＴＩＬベースの免疫療法
患者は、０日目（すなわち、－５日目～－１日目）に予定されているＴＩＬベースの免疫療法注入の前に開始された５日間の前処置ＮＭＡ－ＬＤレジメンを受ける。ＮＭＡ　ＬＤレジメンは、－５日目及び－４日目のメスナ（現場の標準治療またはＵＳＰＩ／ＳｍＰＣ毎）を伴う２日間の静脈内（ＩＶ）シクロホスファミド（６０ｍｇ／ｋｇ）、及び５日間のフルダラビンＩＶ（２５ｍｇ／ｍ２、－５日目～－１日目）で構成された。
【３６５３】
６００，０００ＩＵ／ｋｇの用量でＩＶでのＩＬ－２　ＩＶ投与は、０日目のＴＩＬベースの免疫療法注入の完了の３時間後、ただし２４時間後までに開始された。追加のＩＬ－２用量は、およそ８～１２時間毎に、最大６回の合計用量で与えた。
【３６５４】
【表６３】

表５３：治療投与レジメン

治療投与										
	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X								
メスナ	X	X								
フルダラビン 25mg/m^2/日	X	X	X	X	X					
TIL ベースの免疫療法注入						X				
IL-2 600,000IU/kg						(X)[a]	X	X	X	(X)[a]

[a] () ＝該当する場合。

【３６５５】
メスナの調製
メスナは、シクロホスファミド投与に関連する出血性膀胱炎のリスクを低減するために投与された。メスナは、局所標準に従って連続的または断続的な注入として投与された。
【３６５６】
シクロホスファミドの量が減少した場合、メスナの総用量は調整されなかった。施設標準に従ってメスナ注入または注入の量を希釈する。
【３６５７】
シクロホスファミド及びメスナの注入

２５０ｍＬまたは５００ｍＬの総体積中のシクロホスファミド（６０ｍｇ／ｋｇ）（例えば、水中５％のデキストロース［Ｄ５Ｗ］または０．９％の塩化ナトリウム［ＮａＣｌ］）。

【３６５８】

メスナ（１５ｍｇ／ｋｇ）を、連続的に注入した場合、シクロホスファミドをおよそ２時間にわたって（－５日目及び－４日目に）注入し、次いで、各シクロホスファミド用量と同時に開始して２４時間にわたって、好適な希釈剤中で残りの２２時間、３ｍｇ／ｋｇ／時間の速度で注入した。

【３６５９】

投与された総用量は、シクロホスファミドの用量の少なくとも１．３倍であった。出血性膀胱炎の予防のために、高用量または継続用量のメスナを投与することができる。

【３６６０】

フルダラビンの注入

フルダラビン（２５ｍｇ／ｍ２）は、－５日目～－１日目の５日間連続して１日１回、およそ３０分間にわたってＩＶ投与されるものとした。

【３６６１】

参加期間：

全体として、研究参加期間は、治療から完了まで最大５年となる。

【３６６２】

選択された包含基準：

ＮＳＣＬＣ（扁平上皮、非扁平上皮、腺癌、大細胞、または混合組織型）の組織学的または病理学的に確定された診断を受けており、受けたＣＰＩ治療（すなわち、最初の治療選択を通知した歴史的ＴＰＳ）の前に腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）によって決定されたＰＤ－Ｌ１発現状態が文書化されていなければならない（コホート１及び３の場合、ＴＰＳ＜１％、ならびにコホート２の場合、ＴＰＳ≧１％）。

【３６６３】

ＣＰＩ及び化学療法を同時に含む単一の全身療法を受けており、この単一の全身療法では放射線疾患の進行が記録されている。

【３６６４】

アジュバントまたはネオアジュバント設定における、または決定的な化学放射線療法の一部としての以前の全身療法は、疾患がそのような療法の完了の間または１２ヶ月以内に進行しなかった場合、治療選択として計数されなかった。このプロトコルのＴＩＬ治療前は、コホート４（再治療）患者の治療選択として計数されなかった。

【３６６５】

運動耐性が予想される年齢の正常範囲の８５％以上であり、虚血または臨床的に重大な不整脈の徴候または症状はなかった。

【３６６６】

米国東海岸がん臨床試験グループ（Ｅａｓｔｅｒｎ　Ｃｏｏｐｅｒａｔｉｖｅ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　Ｇｒｏｕｐ、ＥＣＯＧ）のパフォーマンスステータスは０または１であり、治験責任医師の意見において、推定平均余命は６ヶ月超であった。

【３６６７】

コホート１及び２：ＴＩＬ産生のために、直径が最小１．５ｃｍの切除可能な病変（または凝集病変）を少なくとも１つ有していなければならない。

【３６６８】

コホート３のみ：患者は、単一のＲＥＣＩＳＴ１．１測定可能な病変を有し、外科的採取のために利用可能な追加の病変がないか、またはＴＩＬ生成のために安全に外科的採取を受けることができないが、ＴＩＬ生成のために十分な放射線学的ガイド付きコア生検を介して安全に腫瘍採取を有することができる。

【３６６９】

コホート４：いずれかのパラダイムに従った。

【３６７０】
すべてのコホート：採取を検討した病変が以前に照射された領域内にあった場合、病変は、採取前にＸ線画像による進行を示し、照射は登録の少なくとも３ヶ月前に完了していなければならない。患者は、プロトコルが必要とする検査に適正な組織病理標本を有していなければならない。
【３６７１】
ＴＩＬ製造のための腫瘍採取後、すべての患者は、以下の事項を考慮して、ＲＥＣＩＳＴ１．１によって定義されるように、少なくとも１つの残りの測定可能な病変を有していなければならない。
●以前に照射された領域内の病変は、それらの病変に進行が示され、照射が登録の少なくとも３ヶ月前に完了していない限り、標的病変として選択されなかった。
●コホート１及び２のみ：ＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１毎に依然として測定可能なＴＩＬ生成のために外科的に部分切除された病変を、非標的病変として選択することができるが、応答評価の標的病変としては機能することができなかった。
●コホート３のみ：ＴＩＬ生成のコア生検に他の病変が利用できなかった場合、単一のＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１測定可能病変が、コア生検の採取部位及び応答モニタリングの病変の両方として機能していた可能性がある。
●コホート４：いずれかのパラダイムに従ってもよいが、応答には少なくとも１つのＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１測定可能な病変がある必要がある。
【３６７２】
有効性評価：
ＮＳＣＬＣ患者における単一療法としてのＴＩＬベースの免疫療法の以下の有効性パラメータを各コホートで調査した：ＯＲＲ、ＣＲ率、ＤＯＲ、ＤＣＲ、ＰＦＳ、及びＯＳ。
【３６７３】
統計上の考慮事項：
統計解析は、有効性及び安全性パラメータの推定に基づいており、コホート別に行われる。正式な統計学的比較は、コホート間で適用されなかった。
【３６７４】
主要有効性エンドポイントは、ＩＲＣ（コホート１及び２）または治験責任医師（コホート３及び４）によってＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１に従って評価されたＯＲＲであった。
【３６７５】
ＯＲＲ、ＣＲ率、及びＤＣＲを、Ｃｌｏｐｐｅｒ－Ｐｅａｒｓｏｎ正確法に基づく点推定及び両側９５％信頼限界を使用して要約した。ＤＯＲ、ＰＦＳ、及びＯＳなどの事象までの時間有効性エンドポイントを要約するために、Ｋａｐｌａｎ－Ｍｅｉｅｒ法を使用した。ＤＯＲ分析は、客観的奏効を達成した患者に対して行った。
【３６７６】
安全性解析は記述的であり、研究の中止、バイタルサイン、及び臨床検査につながるＴＥＡＥ、ＳＡＥ、及びＡＥの要約に基づいていた。
【３６７７】
試料サイズの決定：
コホート１、２及び３において、ＴＩＬベースの免疫療法を注入された計画患者の総数は、およそ９５人であった。
【３６７８】
コホート１及び２：各コホートでおよそ４０人の患者。各コホートについて、ミニマックスを用いたサイモンの２段階デザイン（Ｓｉｍｏｎ，１９８９）を使用して、ＯＲＲ＞１０％の代替仮説に対する≦１０％　ＯＲＲの帰無仮説を検証した。第１段階では、２５人の患者が集められた。これらの２５人の患者で治療に応答する患者が２人以下であれば、コホートを終了することができた。それ以外の場合、ステージ１の解析と同時に、合計４０人の患者に対してステージ２への拡張が起こった。第２段階の終わりに、合計４０人の患者のうち少なくとも７人の患者が治療に反応した場合、帰無仮説は却下された。この

２段階デザインは、０．１の片側アルファレベルでのＴＩＬベースの免疫療法のための２０％　ＯＲＲの仮定に基づいて、１０％　ＯＲＲの帰無仮説を却下するために７０％のパワーを提供した。

【３６７９】

コホート３：およそ１５人の患者が計画され、これにより、Ｃｌｏｐｐｅｒ－Ｐｅａｒｓｏｎ正確法による半幅９０％信頼区間（ＣＩ）＜０．２３の推定ＯＲＲが得られた。

【３６８０】

コホート４：再治療コホート：この研究のコホート１、２または３でＴＩＬベースの免疫療法で以前に治療されたことのある患者。

【３６８１】

実施例１７：再発性非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）患者に単独で投与されるＩＯＶＡＮＣＥ腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）に対する完全奏効（ＣＲ）：症例報告

序文

ＮＳＣＬＣは最も一般的で致命的ながんであり、世界的な有病率は年間２００万人以上、１７０万人以上が死亡している。治療の選択肢は限られており、白金ダブレット化学療法及びチェックポイント阻害剤（ＣＰＩ）を含む標準治療に失敗した後の再発転移性ＮＳＣＬＣ（ｍＮＳＣＬＣ）を有する患者の予後は依然として不良である。ＣＰＩ後に進行した患者にとって、ＮＳＣＬＣには満たされていない重要な医療ニーズが残っている。

【３６８２】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）による養子細胞療法は、黒色腫、子宮頸癌、ＮＳＣＬＣ及びＨＮＳＣＣを単独でまたはチェックポイント阻害剤（ＣＰＩ）と組み合わせて含む様々な悪性腫瘍において応答を示している。

【３６８３】

ＰＤ－Ｌ１発現レベルが１％未満の重度に前治療された患者の症例研究において、ＴＩＬ療法の安全性及び有効性が提示される。

【３６８４】

方法

我々は、咳及び風邪の症状を呈した後に診断された転移性ＮＳＣＬＣを有する７２歳の女性、非喫煙者について報告している。検査には、１３５ｍｍの肺腫瘤を示す胸部コンピューター断層撮影（ＣＴ）が含まれていた。病期分類では、肺、脾臓及び結節性リンパ病変が同定された（Ｔ４Ｎ１Ｍ１ｂ、ステージＩＶＢ）、ＰＤ－Ｌ１＜１％）。生検により基底様扁平上皮細胞癌が確認された。治療法は、カルボプラチン及び＋Ｎａｂパクリタキセルで開始したが、アレルギー反応及び耐容性の低さにより３サイクル後に中止した。第二選択の治療法は、ニボルマブからなり、疾患の進行により４サイクル後に中止した。患者のＰＤ－Ｌ１レベルは、１％未満であった。次いで、ゲムシタビン及びシスプラチンダブレット療法の第三選択レジメンを投与した。４サイクル後にシスプラチンを中止し、６サイクル後にゲムシタビンを完了した。初期反応の後、疾患の進行が観察された。

【３６８５】

ゲムシタビンを完了してからおよそ４ヶ月後、疾患が横隔膜の下で急速に進行し、患者は（ＮＣＴ０３６４５９２８）、ＴＩＬによるＡＣＴを評価する前向き、非盲検、マルチコホート、非ランダム化、多施設第２相研究に登録した。患者のＥＣＯＧパフォーマンスステータスは１であり、ベースライン標的病変の直径和ＳＯＤは５０ｍｍであり、ＴＩＬを受ける前の研究では、スクリーニングからベースラインまでＳＯＤが１２７％増加した。患者は、ＴＩＬ生成のために腫瘍切除を受け、単回療法及び１回治療としてＴＩＬを受けた。前処置化学療法は、シクロホスファミド／フルダラビン、次いでＴＩＬ、続いて３用量の６００，０００ＩＵ／ｋｇ　ＩＬ－２（すなわち、アルデスロイキン）からなった。ＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１を使用して、治験責任医師による有効性評価とともに、治療の耐容性及び安全性を継続的に評価した。

【３６８６】

結果

有害事象は、リンパ破壊及びＩＬ－２の既知の毒性と一致していた。治療中に発生した有害事象は、急性、自己制限、管理可能であり、かつ持続期間が短かった。有害事象≧Ｇ３は、Ｇ４汎血球減少症、Ｇ３低血圧症及び菌血症に限定された。患者は、重篤な有害事象を経験しなかった。

【３６８７】

６週目に、標的病変におけるＰＲの部分奏効（４４％減少）が患者の最初の評価で観察された。ＴＩＬの投与後７ヶ月で、直径和（ＳＯＤ）の低減が４８％減少したとき、陽電子放射断層撮影（ＰＥＴ）ＣＴを実施し、残留ＣＴ病変内で代謝活性を示さなかった。患者は、ＰＥＴ－ＣＴによって完全奏効（ＣＲ）とみなされる。試験は、ＴＩＬ投与後１５ヶ月で継続し、総ＳＯＤ低減率は６０％に達した。患者は、ＴＩＬ投与以来、他の抗がん療法を投与する必要がなかった。

【３６８８】

結論

この症例提示は、本出願に記載のＴＩＬによる治療が、ＣＰＩを含む複数の標準的なケア療法の後にｍＮＳＣＬＣで疾患進行を有する転移性ＮＳＣＬＣ患者に治療選択肢を提供することができることを実証する。登録は進行中であり、ＮＳＣＬＣ患者におけるＴＩＬの影響を監視及び評価するための研究が続けられている。

【３６８９】

実施例１８：凍結保存ＴＩＬ細胞療法の例示的生産

この実施例は、現在の適正組織基準及び現在の適正製造基準に従った、Ｇ－ＲＥＸフラスコ内のＴＩＬ細胞療法プロセスの例示的なｃＧＭＰ製造を説明する。

【３６９０】

【表６４】

表５４－プロセス拡張例示的計画

推定日(播種後)	活性	標的基準	予想される容器	推定総体積(mL)
0	腫瘍解剖	G-REX100MCS 当たり≦50 個の望ましい腫瘍断片	G-REX100MCS 1 フラスコ	≦1000
11	REP 播種	G-REX500MCS 当たり 5~200×10^6 個の生細胞	G-REX500MCS 1 フラスコ	≦5000
16	REP 分割	G-REX500MCS 当たり 1×10^9 個の生細胞	G-REX500MCS≦5 フラスコ	≦25000
22	採取	全利用可能な細胞	3~4 つの CS-750 バッグ	≦530

【３６９１】

【表６５】

表５５－フラスコ容積

フラスコタイプ	作業体積/フラスコ(mL)
G-REX100MCS	1000
G-REX500MCS	5000

【３６９２】

主要なプロセス情報

０日目のＣＭ１培地の調製

ＢＳＣ内で、試薬をＲＰＭＩ　１６４０培地ボトルに追加した。ボトル当たり追加された以下の試薬を追加した：不活化ヒトＡＢ血清（１００．０ｍＬ）、ＧｌｕｔａＭａｘ（１０．０ｍＬ）、硫酸ゲンタマイシン、５０ｍｇ／ｍＬ（１．０ｍＬ）、２－メルカプトエタノール（１．０ｍＬ）を加熱した。

【３６９３】

ＢＳＣから不要な材料を取り出した。ＢＳＣから培地試薬を抜き取り、配合された洗浄培地の調製のために硫酸ゲンタマイシン及びＨＢＳＳをＢＳＣの中に残した。

【３６９４】

ＩＬ－２アリコートを解凍した。すべての氷が融解するまで、１つの１．１ｍＬのＩＬ－２アリコート（６×１０６ＩＵ／ｍＬ）（ＢＲ７１４２４）を解凍した。ＩＬ－２：ロット番号及び有効期限を記録した。

【３６９５】

ＩＬ－２ストック溶液を培地に移した。ＢＳＣ内で、１．０ｍＬのＩＬ－２ストック溶液を、調製されたＣＭ１の０日目培地ボトルに移した。ＣＭ１の０日目培地１ボトル及びＩＬ－２（６×１０６ＩＵ／ｍＬ）１．０ｍＬを追加した。

【３６９６】

Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳをＢＳＣの中に通過させた。無菌的にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ（Ｗ３０１３１３０）をＢＳＣの中に通過させた。

【３６９７】

すべての完全なＣＭ１の０日目培地をＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコにポンプで注入した。組織断片円錐形またはＧＲｅｘ１００ＭＣＳ。

【３６９８】

０日目の腫瘍洗浄培地の調製

ＢＳＣ内で、５．０ｍＬのゲンタマイシン（Ｗ３００９８３２またはＷ３０１２７３５）を１本の５００ｍＬのＨＢＳＳ培地（Ｗ３０１３１２８）ボトルに追加した。ボトル当たりの追加：ＨＢＳＳ（５００．０ｍＬ）、硫酸ゲンタマイシン、５０ｍｇ／ｍＬ（５．０ｍＬ）。１Ｌの０．２２ミクロンフィルターユニット（Ｗ１２１８８１０）をとおして調製されたゲンタマイシンを含有するＨＢＳＳを濾過した。

【３６９９】

０日目の腫瘍処理

腫瘍を取得した。ＱＡＲから腫瘍検体を取得し、即時に処理のために２～８℃における部屋に移した。

【３７００】

腫瘍洗浄培地を等分した。

【３７０１】

８インチ鉗子（Ｗ３００９７７１）を使用した腫瘍洗浄１、検体ボトルから腫瘍を取り出し、調製された「洗浄１」皿に移した。腫瘍洗浄２及び腫瘍洗浄３が続いた。

【３７０２】

腫瘍を測定した。腫瘍を評価した。腫瘍領域全体の３０％未満が壊死及び／または脂肪組織であることが観察されたかどうかを評価した。該当する場合：クリーンアップ解剖。腫瘍が大きく、外部の組織の３０％未満が壊死／脂肪性であることが観察された場合、メス及び／または鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍の内側構造を温存しながら壊死／脂肪組織を除去することによって、「クリーンアップ解剖」を行った。

【３７０３】

メス及び／または鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍を解剖し、腫瘍検体を均等で適切なサイズの断片（最大６つの中間断片）に切断した。中間腫瘍断片を移した。腫瘍断片をサイズが約３×３×３ｍｍの切片に解剖した。乾燥を防止するために中間断片を保存した。

【３７０４】

中間断片解剖を繰り返した。収集された切片の数を決定した。望ましい組織が残っている場合、「好ましい中間断片」６ウェルプレートから追加の好ましい腫瘍片を選択し、最大５０片のために液滴を充填した。

【３７０５】

コニカルチューブを準備した。腫瘍片を５０ｍＬコニカルチューブに移した。Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳのためにＢＳＣを準備した。インキュベーターからＧ－ＲＥＸ１００ＭＣ

Ｓを取り出した。無菌的にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコをＢＳＣの中に通過させた。腫瘍断片をＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコに追加した。切片を均等に分配した。

【３７０６】

以下のパラメータにおいてＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳをインキュベートした：Ｇ－ＲＥＸフラスコをインキュベートした：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、ＣＯ２パーセンテージ：５．０±１．５％ＣＯ２。計算：培養の時間、下限＝培養の時間＋２５２時間、上限＝培養の時間＋２７６時間。

【３７０７】

プロセスが完了した後、いずれの残りの温められた培地も廃棄し、ＩＬ－２のアリコートを解凍した。

【３７０８】

１１日目－培地の調製

インキュベーターを監視した。インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、ＣＯ２パーセンテージ：５．０±１．５％ＣＯ２。

【３７０９】

３本の１０００ｍＬのＲＰＭＩ　１６４０培地（Ｗ３０１３１１２）ボトル及び３本の１０００ｍＬのＡＩＭ－Ｖ（Ｗ３００９５０１）をインキュベーター内で３０分間以上温めた。インキュベーターからＲＰＭＩ　１６４０培地を取り出した。ＲＰＭＩ　１６４０培地を調製した。培地を濾過した。３つのＩＬ－２の１．１ｍＬのアリコート（６×１０６ＩＵ／ｍＬ）（ＢＲ７１４２４）を解凍した。インキュベーターからＡＩＭ－Ｖ培地を取り出した。ＩＬ－２をＡＩＭ－Ｖに追加した。１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグ及びリピータポンプ移送セットをＢＳＣの中に無菌的に移した。

【３７１０】

１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒ培地バッグを準備した。Ｂａｘａポンプを準備した。１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒ培地バッグを準備した。培地を１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒにポンプで注入した。Ｌａｂｔａｉｎｅｒバッグからポンプマティックを取り出した。

【３７１１】

培地を混合した。バッグを穏やかにマッサージして混合した。試料計画に従って培地を試料採取した。２０．０ｍＬの培地を取り出し、５０ｍＬコニカルチューブに入れた。

【３７１２】

ＢＳＣ内で細胞計数希釈チューブを準備し、「細胞計数希釈液用」及びロット番号でラベル付けされた４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地を４本の１５ｍＬコニカルチューブに追加した。試薬をＢＳＣから２～８℃に移した。１Ｌ移送パックを準備した。（プロセス注記５．１１に従って）ＢＳＣ溶接の外側で、「完全なＣＭ２の１１日目培地」バッグに取り付けられた移送セットへの１Ｌ移送パックを準備した。フィーダー細胞移送パックを準備した。完全なＣＭ２の１１日目培地をインキュベートした。

【３７１３】

１１日目－ＴＩＬ採取

前処理表。インキュベーターパラメータ：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、ＣＯ２パーセンテージ：５．０±１．５％ＣＯ２。インキュベーターからＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳを取り出した。３００ｍＬ移送パックを準備した。移送パックをＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳに溶接した。

【３７１４】

ＴＩＬ採取及びＴＩＬ採取の開始のためにフラスコを準備した。ＴＩＬが採取された。ＧａｔｈｅＲｅｘを使用して、血液フィルターをとおして３００ｍＬ移送パックの中に細胞懸濁液を移した。付着した細胞について膜を点検した。

【３７１５】

フラスコ膜をすすいだ。Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ上のクランプを閉じた。すべてのクランプが閉じられていることを確実にした。ＴＩＬ及び「上清」移送パックを熱融着した。

ＴＩＬ懸濁液の体積を計算した。試料採取のために上清移送パックを準備した。
【３７１６】
Ｂａｃ－Ｔ試料を引き出した。ＢＳＣ内で、１Ｌ「上清」移送パックから約２０．０ｍＬの上清を引き上げ、滅菌５０ｍＬコニカルチューブに分注する。
【３７１７】
試料計画に従ってＢａｃＴを接種した。適切なサイズのシリンジを使用して調製されたＢａｃＴとラベル付けされた５０ｍＬコニカルから１．０ｍＬの試料を取り出し、嫌気性ボトルに接種した。
【３７１８】
ＴＩＬをインキュベートした。必要とされるまでＴＩＬ移送パックをインキュベーターに入れた。細胞計数及び計算を行った。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。生存率÷２。生細胞濃度÷２。計数の上限及び下限を決定した。下限：生細胞濃度の平均×０．９。上限：生細胞濃度の平均×１．１。許容限界内の両方の計数を確認した。行われた４つすべての計数から平均生細胞濃度を決定した。
【３７１９】
ＴＩＬ懸濁液の体積を調整した。細胞計数試料を取り出した後のＴＩＬ懸濁液の調整された体積を計算する。総ＴＩＬ細胞体積（Ａ）。除去された細胞計数試料の体積（４．０ｍｌ）（Ｂ）調整された総ＴＩＬ細胞体積Ｃ＝Ａ－Ｂ。
【３７２０】
総生ＴＩＬ細胞を計算した。平均総細胞濃度＊：総体積、総生細胞：Ｃ＝Ａ×Ｂ。
【３７２１】
フローサイトメトリーのための計算：総生ＴＩＬ細胞数が４．０×１０^{7}個以上であった場合、フローサイトメトリー試料のために１．０×１０^{7}個の細胞を取得するための体積を計算した。
【３７２２】
フローサイトメトリーに必要とされる総生細胞：１．０×１０^{7}個の細胞。フローサイトメトリーに必要とされる細胞の体積：１．０×１０^{7}個の細胞Ａで除算された生細胞濃度。
【３７２３】
２．０×１０^{8}個の生細胞に等しいＴＩＬ懸濁液の体積を計算した。必要に応じて、取り出すＴＩＬ細胞の過剰体積を計算し、過剰なＴＩＬを取り出し、必要に応じてＴＩＬをインキュベーターに入れた。必要に応じて、取り出された全過剰ＴＩＬを計算した。
【３７２４】
凍結のための標的細胞濃度が１．０×１０^{8}細胞／ｍＬである過剰なＴＩＬ細胞に追加するＣＳ－１０培地の量を計算した。必要に応じて、過剰なＴＩＬを遠心分離した。コニカルチューブを観察し、ＣＳ－１０を追加した。
【３７２５】
バイアルを充填した。適当なサイズのクライオバイアルに等分された１．０ｍＬ細胞懸濁液。ＳＯＰ－００２４２毎の適切なサイズのクライオバイアルに等分された残余の体積。体積が≦０．５ｍＬである場合、容量が０．５ｍＬになるまでＣＳ１０をバイアルに追加する。
【３７２６】
試料のＴＩＬ凍結保存
凍結保存のための１×１０^{7}個の細胞を取得するために必要とされる細胞の体積を計算した。凍結保存のために試料を取り出した。ＴＩＬをインキュベーターに入れた。
【３７２７】
試料の凍結保存。
コニカルチューブを観察し、ＣＳ－１０をゆっくりと追加し、追加された０．５ｍＬのＣＳ１０を記録した。
【３７２８】

１１日目－フィーダー細胞
フィーダー細胞を取得した。ＬＮ２冷凍庫から少なくとも２つの異なるロット番号を伴うフィーダー細胞の３つのバッグを取得した。解凍する準備が整うまで、細胞をドライアイス上で保管した。水浴またはＣｒｙｏｔｈｅｒｍを準備した。３７．０±２．０℃の水浴またはｃｙｔｏｔｈｅｒｍにおいて約３～５分間、または氷が消滅するまで、フィーダー細胞を解凍した。インキュベーターから培地を取り出した。解凍されたフィーダー細胞をプールした。フィーダー細胞を移送パックに追加した。シリンジから移送パックにフィーダー細胞を分注した。プールされたフィーダー細胞を混合し、移送パックをラベル付けした。

【３７２９】
移送パック内のフィーダー細胞懸濁液の総体積を計算した。
細胞計数試料を取り出した。各試料に別個の３ｍＬシリンジを使用して、不要注入ポートを使用してフィーダー細胞懸濁液移送パックから４×１．０ｍＬの細胞計数試料を引き出した。各試料をラベル付けされたクライオバイアルに等分した。細胞計数を行い、増倍率を決定し、プロトコルを選択し、増倍率を入力した。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定し、限界内で確認した。

【３７３０】
フィーダー細胞懸濁液の体積を調整した。細胞計数試料を取り出した後のフィーダー細胞懸濁液の調整された体積を計算した。全生存フィーダー細胞を計算した。必要に応じて追加のフィーダー細胞を取得した。必要に応じて追加のフィーダー細胞を解凍した。第４のフィーダー細胞バッグをジップトップバッグに入れ、３７．０±２．０℃の水浴またはｃｙｔｏｔｈｅｒｍ内で約３～５分間解凍し、追加のフィーダー細胞をプールした。体積を測定した。シリンジ内のフィーダー細胞の体積を測定し、以下に記録した（Ｂ）。フィーダー細胞の新しい総体積を計算した。フィーダー細胞を移送パックに追加した。

【３７３１】
必要に応じて希釈液を調製し、４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地を４本の１５ｍＬコニカルチューブに追加した。細胞計数を準備した。各試料に別個の３ｍＬシリンジを使用して、不要注入ポートを使用して、フィーダー細胞懸濁液移送パックから４×１．０ｍＬの細胞計数試料を取り出した。細胞計数及び計算を行った。行われた４つすべての計数から平均生細胞濃度を決定した。フィーダー細胞懸濁液の体積を調整し、細胞計数試料を除去した後のフィーダー細胞懸濁液の調整された体積を計算した。４．０ｍＬを差し引いた総フィーダー細胞体積が取り出された。５×10^9個の生存フィーダー細胞を取得するために必要とされたフィーダー細胞懸濁液の体積を計算した。過剰なフィーダー細胞体積を計算した。取り出す過剰なフィーダー細胞の体積を計算した。過剰なフィーダー細胞を取り出した。

【３７３２】
１．０ｍＬシリンジ及び１６Ｇ針を使用して、０．１５ｍＬのＯＫＴ３を引き上げ、ＯＫＴ３を追加した。フィーダー細胞懸濁液移送パックを熱融着した。

【３７３３】
１１日目のＧ－ＲＥＸ充填及び播種
Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを設定した。「完全なＣＭ２の１１日目培地」をインキュベーターから取り出し、培地をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳにポンプで注入した。４．５Ｌの培地をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳにポンプで注入し、フラスコ上にマークされたラインまで充填した。必要に応じてフラスコを熱融着し、インキュベートした。フィーダー細胞の懸濁液移送パックを、Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳに溶接した。フィーダー細胞をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳに追加した。熱融着した。ＴＩＬ懸濁液移送パックをフラスコに溶接した。ＴＩＬをＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳに追加した。熱融着した。Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを３７．０±２．０℃でインキュベートした。ＣＯ２パーセンテージ：５．０±１．５％ＣＯ２。

【３７３４】
インキュベーション時間帯を計算した。１６日目にインキュベーターからＧ－ＲＥＸ５

００ＭＣＳを取り出すための適切な時間を決定するための計算を行った。下限：インキュベーションの時間＋１０８時間。上限：インキュベーションの時間１３２時間。

【３７３５】

１１日目の過剰ＴＩＬ凍結保存

該当：過剰ＴＩＬバイアルを凍結させた。凍結前にＣＲＦが設定されていることを検証した。凍結保存を行った。バイアルを速度制御された冷凍庫から適切な保管場所に移した。凍結の完了時に、バイアルをＣＲＦから適切な保管容器に移した。バイアルを適切な保管場所に移した。ＬＮ２における保管場所を記録した。

【３７３６】

１６日目の培地の調製

ＡＩＭ－Ｖ培地を事前に温めた。培地バッグ１、２、及び３について培地が温められた時間を計算した。すべてのバッグが１２～２４時間の持続時間にわたって温められていることを確実にした。上清用の１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを設定した。ルアーコネクタを使用して、流体ポンプ移送セットのより大きな直径の端部を１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグのメス型ポートのうちの１つに取り付けた。上清用の１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを設定し、ラベル付けした。上清用の１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを設定した。ＢＳＣから取り出す前に、すべてのクランプが閉じられていることを確実にした。注記：上清バッグは、培地調製と同時に行われ得るＴＩＬ採取中に使用された。

【３７３７】

ＩＬ－２を解凍した。すべての氷が融解するまで、ＣＴＳ　ＡＩＭ　Ｖ培地の１つのバッグ当たりＩＬ－２（６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）（ＢＲ７１４２４）の５×１．１ｍＬアリコートを解凍した。１００．０ｍＬのＧｌｕｔａＭａｘを等分した。ＩＬ－２をＧｌｕｔａＭａｘに追加した。配合用のＣＴＳ　ＡＩＭ　Ｖ培地バッグを準備した。配合用のＣＴＳ　ＡＩＭ　Ｖ培地バッグを準備した。ステージＢａｘａポンプ。培地を配合することを準備した。ＧｌｕｔａＭａｘ＋ＩＬ－２をバッグにポンプで注入した。パラメータを監視した：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、ＣＯ２パーセンテージ：５．０±１．５％のＣＯ２。完全なＣＭ４の１６日目培地を温めた。希釈液を調製した。

【３７３８】

１６日目のＲＥＰ分割

インキュベーターパラメータを監視した：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、ＣＯ２パーセンテージ：５．０±１．５％ＣＯ２。インキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを取り出した。１Ｌの移送パックを準備し、ＴＩＬ懸濁液としてラベル付けし、１Ｌの重量を量った。

【３７３９】

Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳの減容。約４．５Ｌの培養上清をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳからＳＯＰ－０１７７７当たり１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒに移した。

【３７４０】

ＴＩＬ採取用のフラスコを準備した。上清を取り出した後に、赤色ラインへのすべてのクランプを閉じた。

【３７４１】

ＴＩＬ採取の開始。フラスコを激しく叩き、培地を旋回させて細胞を解放し、すべての細胞が引き離されていることを確実にする。

【３７４２】

ＴＩＬ採取。ＴＩＬ懸濁液移送パックにつながるすべてのクランプを解放した。ＧａｔｈｅＲｅｘを使用して、細胞懸濁液をＴＩＬ懸濁液移送パックの中に移した。注記：すべての細胞及び培地が収集されるまで、傾斜した縁を必ず維持すること。付着した細胞について膜を点検した。フラスコ膜をすすいだ。Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ上のクランプを閉じた。ＴＩＬを含む移送パックを熱融着した。上清を含む１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを熱融着した。細胞懸濁液を伴う移送パックの重量を記録し、細胞懸濁液を計算した。試料を取り出すための移送パックを準備した。細胞上清から試験試料を取り出した。

【３７４３】
無菌性及びＢａｃＴ試験試料採取：調製されたＢａｃＴとラベル付けされた１５ｍＬのコニカルから１．０ｍＬの試料を取り出した。細胞計数試料を取り出した。ＢＳＣ内で、各試料に別個の３ｍＬシリンジを使用して、「ＴＩＬ懸濁液」移送パックから４×１．０ｍＬの細胞計数試料を取り出した。
【３７４４】
マイコプラズマ試料を取り出した。３ｍＬシリンジを使用して、ＴＩＬ懸濁液移送パックから１．０ｍＬを取り出し、調製された「マイコプラズマ希釈液」とラベル付けされた１５ｍＬコニカルに入れた。
【３７４５】
播種用の移送パックを準備した。ＴＩＬをインキュベーターに入れた。細胞懸濁液をＢＳＣから取り出し、必要とされるまでインキュベーターに入れた。細胞計数及び計算を行った。最初に、０．５ｍＬの細胞懸濁液を調製された４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地に追加することによって、細胞計数試料を希釈し、１：１０希釈液を生じた。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。注記：希釈は、細胞の期待濃度に基づいて調整され得る。行われた４つすべての計数から平均生細胞濃度を決定した。ＴＩＬ懸濁液の体積を調整した。細胞計数試料を取り出した後のＴＩＬ懸濁液の調整された体積を計算した。５．０ｍＬを差し引いた総ＴＩＬ細胞体積が試験のために取り出された。
【３７４６】
総生ＴＩＬ細胞を計算した。播種するフラスコの総数を計算した。注記：播種するＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコの最大数は５であった。播種するフラスコの計算された数が５つを超えた場合、５つのみが利用可能な細胞懸濁液の体積全体を使用して播種された。
【３７４７】
二次培養用のフラスコの数を計算した。準備されたバッグに加えて必要とされる培地バッグの数を計算した。計算されたように必要とされる２つのＧ－ＲＥＸ－５００Ｍフラスコ毎に「ＣＭ４の１６日目培地」の１つの１０Ｌバッグを準備した。追加の培地が調製され、温められている間に、続けて第１のＧＲＥＸ－５００Ｍフラスコ（複数可）を播種した。計算された数の決定された追加の培地バッグを調製し、温めた。Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを充填した。培地をポンプで注入するように準備し、４．５Ｌの培地をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳにポンプで注入した。熱融着した。充填を繰り返した。フラスコをインキュベートした。新しいＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコに追加するＴＩＬ懸濁液の標的体積を計算した。フラスコの計算された数が５つを超える場合、５つのみが細胞懸濁液の体積全体を使用して播種されるであろう。播種用のフラスコを準備した。インキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを取り出した。ポンプで注入するためのＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを準備した。大型フィルターラインを除くすべてのクランプを閉じた。インキュベーターからＴＩＬを取り出した。播種用の細胞懸濁液を調製した。（プロセス注記５．１１に従って）「ＴＩＬ懸濁液」移送パックをポンプ入口ラインに滅菌溶接した。ＴＩＬ懸濁液バッグを秤の上に置いた。
【３７４８】
フラスコにＴＩＬ懸濁液を播種した。計算されたＴＩＬ懸濁液の体積をフラスコにポンプで注入した。熱融着した。残りのフラスコを充填した。
【３７４９】
インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、ＣＯ２パーセンテージ：５．０±１．５％ＣＯ２。フラスコをインキュベートした。
【３７５０】
２２日目にインキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを取り出す時間範囲を決定した。
【３７５１】

２２日目の洗浄緩衝液の調製
１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグを準備した。ＢＳＣ内で、ルアー接続を介して４インチ血漿移送セットを１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグに取り付けた。１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグを準備した。ＢＳＣから外に移す前に、すべてのクランプを閉じた。注記：採取される２つのＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコ毎に、１つの１０Ｌ　Ｌａｂｔａｉｎｅｒバッグを準備した。Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅを３０００ｍＬバッグにポンプで注入し、ポンプを反転させてバッグの位置を操作することによって、３０００ｍＬのＯｒｉｇｅｎバッグから空気を除去した。ヒトアルブミン２５％を３０００ｍＬバッグに追加した。１２０．０ｍＬの最終体積のヒトアルブミン２５％を取得した。

【３７５２】
ＩＬ－２希釈液を調製した。１０ｍＬシリンジを使用して、ＬＯＶＯ洗浄緩衝液バッグ上の無針注入ポートを使用して、５．０ｍＬのＬＯＶＯ洗浄緩衝液を取り出した。ＬＯＶＯ洗浄緩衝液を５０ｍＬコニカルチューブに分注した。

【３７５３】
ＣＲＦブランクバッグＬＯＶＯ洗浄緩衝液が等分された。１００ｍＬシリンジを使用して、無針注入ポートから７０．０ｍＬのＬＯＶＯ洗浄緩衝液を引き上げた。

【３７５４】
ＩＬ－２を解凍した。すべての氷が融解するまで、１つの１．１ｍＬのＩＬ－２（６×１０６ＩＵ／ｍＬ））を解凍した。ＩＬ－２の調製。５０μＬのＩＬ－２ストック（６×１０６ＩＵ／ｍＬ）を、「ＩＬ－２希釈液」とラベル付けされた５０ｍＬのコニカルチューブに添加した。

【３７５５】
凍結保存調製。５つのクライオカセットを２～８℃に置き、最終製品の凍結保存のためにそれらを前調整した。

【３７５６】
細胞計数希釈液を調製した。ＢＳＣ内で、ロット番号及び「細胞計数希釈液用」でラベル付けされた４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地を４本の別個の１５ｍＬコニカルチューブに追加した。細胞計数を準備した。４つのクライオバイアルをバイアル番号（１～４）でラベル付けした。使用されるＢＳＣの下でバイアルを保存した。

【３７５７】
２２日目のＴＩＬ採取
インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ温度ＬＥＤディスプレイ：３７±２．０°Ｃ、ＣＯ２パーセンテージ：５％±１．５％．インキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコを取り外した。ＴＩＬ収集バッグを準備し、ラベル付けした。余分な接続を密封した。減容：約４．５Ｌの上清をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳから上清バッグに移した。

【３７５８】
ＴＩＬ採取用のフラスコを準備した。ＴＩＬの収集を開始した。フラスコを激しく叩き、培地旋回させて細胞を解放した。すべての細胞が引き離されていることを確実にした。ＴＩＬの収集を開始した。ＴＩＬ懸濁液収集バッグにつながるすべてのクランプを解放した。ＴＩＬ採取。ＧａｔｈｅＲｅｘを使用して、ＴＩＬ懸濁液を３０００ｍＬ収集バッグの中に移した。付着した細胞について膜を点検した。フラスコ膜をすすいだ。Ｇ－Ｒｅｘ５００ＭＣＳ上のクランプを閉鎖し、すべてのクランプが閉鎖していることを確実にした。細胞懸濁液をＬＯＶＯソースバッグの中に移した。すべてのクランプを閉じた。熱融着した。４×１．０ｍＬの細胞計数試料を取り出した。

【３７５９】
細胞計数を行った。ＮＣ－２００及びプロセス注記５．１４を利用して、細胞計数及び計算を行った。最初に、０．５ｍＬの細胞懸濁液を調製された４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地の中に追加することによって、細胞計数試料を希釈した。これは、１：１０希釈液を生じた。行われた細胞計数の平均生存率、生細胞濃度、及び総有核細胞濃度を決定した。計

数の上限及び下限を決定した。行われた細胞計数の平均生存率、生細胞濃度、及び総有核細胞濃度を決定した。ＬＯＶＯソースバッグの重量を量った。総生ＴＩＬ細胞を計算した。総有核細胞を計算した。

【３７６０】

マイコプラズマ希釈液を調製した。ルアー試料ポートを介して１つの上清バッグから１０．０ｍＬを取り出し、１５ｍＬコニカルに入れた。

【３７６１】

ＬＯＶＯ

「ＴＩＬ　Ｇ－ＲＥＸ採取」プロトコルを行い、最終製品の標的体積を決定した。使い捨てキットを装填した。濾液バッグを取り出した。濾液容量を入力した。濾液容器をベンチトップの上に置いた。ＰｌａｓｍａＬｙｔｅを取り付けた。ＰｌａｓｍａＬｙｔｅが取り付けられていることを検証し、ＰｌａｓｍａＬｙｔｅが動いていることを観察した。ソース容器をチューブに取り付け、ソース容器が取り付けられていることを検証した。ＰｌａｓｍａＬｙｔｅが動いていることを確認した。

【３７６２】

最終製剤及び充填

標的体積／バッグの計算。ブランクバッグを配合するためのＣＳ－１０及びＬＯＶＯ洗浄緩衝液の体積を計算した。ＣＲＦブランクを調製した。

【３７６３】

最終製品に追加するＩＬ－２の体積を計算した。所望される最終ＩＬ－２濃度（ＩＵ／ｍＬ）－３００ＩＵ／ｍＬ。ＩＬ－２作業ストック：6×10^{4}ＩＵ／ｍＬ．接続装置を組み立てた。４Ｓ－４Ｍ６０をＣＣ２細胞接続に滅菌溶接した。（プロセス注記５．１１に従って）ＣＳ７５０クライオバッグを準備されたハーネスに滅菌溶接した。ＣＳ－１０バッグを４Ｓ－４Ｍ６０のスパイクに溶接した。ＩＬ－２を用いてＴＩＬを調製した。適切なサイズのシリンジを使用して、「ＩＬ－２　6×10^{4}」アリコートから決定されたＩＬ－２の量を取り出した。配合されたＴＩＬバッグをラベル付けした。配合されたＴＩＬバッグを装置に追加した。ＣＳ１０を追加した。シリンジを交換した。約１０ｍＬの空気を１００ｍＬシリンジに引き込み、装置上の６０ｍＬシリンジを交換した。ＣＳ１０を追加した。ＣＳ－７５０バッグを準備した。細胞を分注した。

【３７６４】

最終製品バッグから空気を除去し、保持液を得た。最後の最終製品バッグが充填されると、すべてのクランプを閉じた。１０ｍＬの空気を新しい１００ｍＬのシリンジに引き込み、装置上のシリンジを交換した。保持液を５０ｍＬコニカルチューブに分注し、チューブを「保持液」及びロット番号としてラベル付けした。各バッグについて空気除去ステップを繰り返した。

【３７６５】

目視検査を含み、凍結保存のための最終製品を調製した。凍結保存までクライオバッグを低温パック上で、または２～８℃で保持した。

【３７６６】

細胞計数試料を取り出した。適切なサイズのピペットを使用して、２．０ｍＬの保持液を取り出し、細胞計数に使用されるために１５ｍＬコニカルチューブに入れた。細胞計数及び計算を行った。注記：１つだけの試料を適切な希釈に希釈し、希釈が十分であることを検証した。追加の試料を適切な希釈倍率に希釈し、計数を進めた。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。注記：希釈は、細胞の期待濃度に基づいて調整され得る。生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。ＩＦＮ－γを計算した。最終製品バッグを熱融着した。

【３７６７】

以下の例示的試料計画に従って試料をラベル付けし、収集した。

【３７６８】

【表６６】

表５６：試料計画

試料	容器の数	各々に追加する試料体積	容器タイプ
*マイコプラズマ	1	1.0mL	15mL コニカル
内毒素	2	1.0mL	2mL クライオバイアル
グラム染色	1	1.0mL	2mL クライオバイアル
IFN-g	1	1.0mL	2mL クライオバイアル
フローサイトメトリー	1	1.0mL	2mL クライオバイアル
**Bac-T 無菌性	2	1.0mL	Bac-T ボトル
QC 保持	4	1.0mL	2mL クライオバイアル
サテライトバイアル	10	0.5mL	2mL クライオバイアル

【３７６９】
無菌性及びＢａｃＴ。試験試料採取。ＢＳＣ内で、適切なサイズのシリンジを使用して収集された保持細胞懸濁液から１．０ｍＬの試料を取り出し、嫌気性ボトルに接種する。好気性ボトルについて上記を繰り返す。
【３７７０】
最終製品の凍結保存
速度制御された冷凍庫を準備した。ＣＲＦが設定されていることを検証した。ＣＲＦプローブを設定した。最終製品及び試料をＣＲＦに入れた。４℃±１．５℃に達し、ＣＲＦ実行を進めるために必要な時間を決定した。ＣＲＦが完了し、保管された。実行の完了後にＣＲＦを停止させた。カセット及びバイアルをＣＲＦから取り出した。保存のためにカセット及びバイアルを蒸気相ＬＮ２に移した。保管場所を記録した。
【３７７１】
後処理の概要
後処理：最終医薬品
（２２日目）フローサイトメトリーによる２２日目のＲＥＰでのＣＤ３＋細胞の決定
【３７７２】
（２２日目）グラム染色方法（ＧＭＰ）
【３７７３】
（２２日目）ゲルクロットＬＡＬアッセイ（ＧＭＰ）による細菌内毒素試験
【３７７４】
（１６日目）ＢａｃＴ無菌性アッセイ（ＧＭＰ）
【３７７５】
（１６日目）ＴＤ－ＰＣＲ（ＧＭＰ）によるマイコプラズマＤＮＡ検出
【３７７６】
許容される外観属性
【３７７７】
（２２日目）ＢａｃＴ無菌性アッセイ（ＧＭＰ）（２２日目）
【３７７８】
（２２日目）ＩＦＮ－ガンマアッセイ
【３７７９】
実施例１９：進行した免疫チェックポイント阻害剤で治療された非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）患者における自己腫瘍浸潤リンパ球単剤療法の第１相２結果
序文
背景
進行性ＮＳＣＬＣを有する患者の大部分は、第１選択ＩＣＩ±化学療法で疾患の進行を発達させる[1]。

【３７８０】
ＩＣＩ耐性の設定では、深く、持続的な対応を提供するための効果的な戦略が緊急に必要とされている。
【３７８１】
Ｇｅｎ２プロセスＴＩＬは、進行性黒色腫、子宮頸癌、及び頭頸部癌において活性を示した、中央で製造された自己ＴＩＬ細胞産物である[2～5]。
【３７８２】
ＴＩＬ＋ニボルマブは、第１相治験において、進行性ＮＳＣＬＣを有するＩＣＩナイーブ患者における安全性及び有効性を実証している[6]。
【３７８３】
この実施例は、多施設第２相研究からの進行性ＮＳＣＬＣを有する患者における単剤Ｇｅｎ２プロセスＴＩＬ細胞療法の最初の安全性及び有効性データを実証する。
【３７８４】
方法
研究設計
報告は、複数の設定及び適応症における自己ＴＩＬ細胞療法を評価する前向き、第２相、多施設、多コホート、非盲検研究である。
【３７８５】
本明細書では、進行性または転移性ＮＳＣＬＣを有する患者におけるＴＩＬ単剤療法を調査するコホート３Ｂのデータが提供される。
【３７８６】
コホート３Ｂ患者
適格性には、１８歳以上、ＩＣＩまたはがん遺伝子指向型療法を含む１～３つの以前の全身療法、ＥＣＯＧパフォーマンスステータス０～１、ＴＩＬ製造時に１つ以上の切除可能な病変（直径約１．５ｃｍ）、奏効評価のための切除後の１つ以上の測定可能な病変が必要であった。
【３７８７】
エンドポイント
一次
有効性、ＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１に従って治験責任医師が評価したＯＲＲとして定義される。
【３７８８】
安全性、グレード≧３のＴＥＡＥ（ＴＩＬ注入時からＴＩＬ注入の３０日後までまたは新しい抗がん療法の開始までに発生するＡＥとして定義）の発生率によって測定される。
【３７８９】
探索的
バイオマーカー分析、ＲＮＡ配列決定を使用したＴＩＬ製品のＴＣＲレパートリー（ＨＴＢｌｖｃアッセイ、ｉＲｅｐｅｒｔｏｉｒｅ，Ｉｎｃ．，Ｈｕｎｔｓｖｉｌｌｅ，ＡＬ）を含む。各個々の患者のＴＩＬ製品ロットにおける検出限界を超えて存在するクローンをカウントし、ＴＩＬクローン性及び多様性を評価するためにそれらの割合を推定した。
【３７９０】
ＴＩＬ産物の患者の遍歴及び中央Ｇｅｎ２　ＧＭＰ製造を図３７に示す。
【３７９１】
コホート３Ｂの患者治療スキーマを図３８に示す。
【３７９２】
結果
患者の性質を図３９に提示する。
【３７９３】
完全分析セットには、仕様内でＴＩＬ療法の注入を受けたすべての患者が含まれる。
【３７９４】

有効性評価対象セットには、仕様内でＴＩＬ療法を受け、有効性評価が１以上であったすべての患者が含まれる。

【３７９５】

トランスレーショナルセットには、ＴＩＬ療法の注入を受け、トランスレーショナル分析のための最終医薬品から利用可能なＴＩＬを有していたすべての患者が含まれる。

【３７９６】

【表６７】

表５７．ベースライン患者特性（ＦＡＳ）

特徴	COM-202 コホート 3B(N=28)
性別、n(%)	
男性	14(50.0)
女性	14(50.0)
中央値(最小、最大)年齢、y	61.0(40，74)
喫煙者(現役または元)、n(%)	24(85.7)
組織学的細胞型、n(%)	
腺癌	22(78.6)
扁平上皮	5(17.9)
その他	1(3.6)
腫瘍 PD-L1 発現、n(%)*	
TPS<1%	4(14.3)
TPS 1%-49%	10(35.7)
TPS≧≧50%	8(28.6)
標的病変及び非標的病変の中央値(最小、最大)	4.5(2，11)
標的病変直径和の中央値(最小、最大)、mm	79.0(22，179)
以前の脳転移、n(%)	10(35.7)
以前の全身療法数の中央値(最小、最大)	2.0(1，6)
以前の全身療法、n(%)	
抗 PD-1 及び/または抗 PD-L1	28(100)
化学療法	27(96.4)
抗 PD-1	23(82.1)
抗 PD-L1	7(25.0)
抗 VEGF	6(21.4)
抗 CTLA-4	6(21.4)
EGFR 阻害剤	1(3.6)
チロシンキナーゼ阻害剤	1(3.6)
その他	3(10.7)

【３７９７】

腫瘍採取検体からの中央検査室当たり、６人の患者の腫瘍ＰＤ－Ｌ１発現データが欠損していた。

【３７９８】

すべての患者が、以前のＩＣＩを受けた。

【３７９９】

ＴＩＬは、肺転移から最も一般的に採取された（６０．７％）。

【３８００】

【表６８】

表５８．治療下で発現した有害事象＊（≧３０％、ＦＡＳ）

	COM-202 コホート 3B(N=28)		
TEAE、n(%)	任意のグレード	グレード3/4	グレード5
任意の事象	28(100)	27(96.4)	2(7.1)[‡]
血小板減少症	20(71.4)	19(67.9)	0
貧血	19(67.9)	14(50.0)	0
低血圧	17(60.7)	7(25.0)	0
悪寒	16(57.1)	1(3.6)	0
発熱	16(57.1)	1(3.6)	0
低酸素症	13(46.4)	5(17.9)	0
下痢	10(35.7)	3(10.7)	0
好中球減少症[†]	10(35.7)	6(21.4)	0
末梢浮腫	10(35.7)	0	0
脱毛症	9(32.1)	0	0
食欲減退	9(32.1)	3(10.7)	0
呼吸困難	9(32.1)	3(10.7)	0
疲労	9(32.1)	4(14.3)	0

【３８０１】
ＴＥＡＥは、ＴＩＬ注入時からＴＩＬ注入の３０日後までまたは新しい抗がん療法の開始までに発生するＡＥを含む。
【３８０２】
臨床的に有意と考えられる検査室の異常のみが、ＡＥとして報告された。
【３８０３】
１つのグレード５の事象は、各々慢性心不全及び多臓器機能障害症候群について報告された。
【３８０４】
安全性は、ＮＭＡ－ＬＤ及びＩＬ－２の基礎となる進行疾患及び既知の安全性プロファイルと一致していた。
【３８０５】
任意のグレードの腫瘍採取関連ＡＥが、１６人（４１．０％）の患者で報告され、最も一般的な処置痛はｎ＝７（１７．９％）であり、低酸素症はｎ＝４（１０．３％）であった。
【３８０６】
腫瘍採取関連ＡＥの大部分は、グレード１または２であった。
【３８０７】
経時的有害事象（ＦＡＳ）を図４０に示す。
【３８０８】
大部分のＡＥは、ＴＩＬ注入前またはＴＩＬ注入後の最初の２週間以内に発生した。
【３８０９】
ＩＬ－２用量数の中央値：５．５．
【３８１０】

【表６９】

表５９ａ．有効性

	COM-202 コホート 3B(N=28)	
奏効	n/N	%(95% CI)
完全分析セット(FAS)		
ORR	6/28	21.4(8.3，41.0)
CR	1/28	3.6
PR	5/28	17.9
SD	12/28	42.9
PD	6/28	21.4
DCR	18/28	64.3(44.1，81.4)
NE*	4/28	14.3
有効性評価対象セット		
ORR	6/24	25.0(9.8，46.7)
DCR	18/24	75.0(53.3，90.2)

＊最初の評価前の死亡による有効性評価対象セットから除外される。

【３８１１】
【表７０】

表５９ｂ．有効性

	中央値	
期間、月	(95%CI)	最小、最大
研究フォローアップ (FAS)	9.8(5.8，14.5)	0.1+，22.1

【３８１２】
ＯＲＲ：ＦＡＳで２１．４％、有効性評価対象セットで２５．０％。
【３８１３】
すべての応答者は、２つ以上の以前の全身療法を受けた。
【３８１４】
注入されたＴＩＬ数の中央値は、２０．９×１０^{9}であった。切除から注入までの期間の中央値は、３５．０日であった。注入からＢＯＲまでの期間の中央値は、２．２ヶ月であった。
【３８１５】
標的病変の直径和におけるベースラインからの最良の変化率（有効性評価対象セット）データを図４１に示す。患者２について、ＣＲの全奏効は、陰性ＦＤＧ－ＰＥＴ走査を介した完全代謝奏効の研究者評価に基づいていた。
【３８１６】
ＰＲ以上を達成した確認された応答者に対する最初の奏効までの時間、奏効期間、及び有効性評価の時間を図４２に示す。アーカイブ腫瘍試料を使用して局所的にＴＰＳを評価した患者２を除いて、腫瘍採取検体から中央検査室ごと。患者２５は、新たな病変によるＰＤを有し、患者２６及び２２は、非標的疾患の明確なＰＤを有した。
【３８１７】
１人の患者は、完全代謝奏効を有し、２０．７ヶ月で継続していた。
【３８１８】
ＣＲを含む２つの奏効は、ＴＰＳ＜１％の患者で発生した。
【３８１９】
標的病変の直径和（ＦＡＳ）データにおけるベースラインからの変化パーセンテージを

図４３に示す。
【３８２０】
ＣＲの全奏効は、陰性ＦＤＧ－ＰＥＴ走査に基づく。
【３８２１】
【表７１】

表６０．ＴＩＬ　ＴＣＲレパートリー分析

	COM-202 コホート3B、トランスレーショナルセット(N=27)	
TIL 製品パラメータ	中央値*	最小、最大
固有の TCR クローン	4396	865，17,317
シャノンエントロピー指数(TCR クローン多様性)†	7.18	3.55，11.66
シンプソンクローン性指数(TCR クローン性)‡	0.20	0.02，0.60

【３８２２】
このデータセットに適用される検出限界を使用して、以前に公開されたデータセット[7]，[8]との比較。固有のＴＣＲクローン：黒色腫の場合は５５９６、子宮頸癌の場合は６８７４。シャノンエントロピー指数：黒色腫の場合は７．６０、子宮頸癌の場合は７．１１。シンプソンクローン性指数：黒色腫の場合は０．１８、子宮頸癌の場合は０．２０。
【３８２３】
より大きなシャノンエントロピー指数は、より多様なＣＤＲ３集団を示す。値は、０（モノクローナル試料）からｌｏｇ２（Ｒ）（Ｒ固有のクローンを有する均等に分布するポリクローナル試料）までの範囲であり得る。
【３８２４】
シンプソンクローン性指数は、試料のモノクローン性またはポリクローン性を反映し、多様性（シャノンエントロピー指数）に反比例する。値は、０（均等に分布したポリクローナル試料）から１（モノクローナル試料）までの範囲であり得る。
【３８２５】
２７人の患者は、ＴＣＲレパートリー分析のための最終医薬品から入手可能なＴＩＬを有していた。臨床転帰との相関性の分析は進行中である。
【３８２６】
結論
このシグナル検出研究は、進行性ＮＳＣＬＣを有する患者における腫瘍採取、ＴＩＬ製造、及びＴＩＬ治療の実現可能性を実証した。
【３８２７】
患者は、肺病変を含む外科的切除を忍容した。ＴＩＬ製造は、大部分の患者にとって可能であった。コンディショニングレジメンによる１回のＴＩＬ治療は、十分に忍容された。
【３８２８】
ＮＳＣＬＣ腫瘍から生成されたＴＩＬのＴＣＲレパートリーは、黒色腫[7]のリフィリューセル及び子宮頸癌[8]のＴＩＬ療法について既に公表されているように、同様の数の固有のＴＣＲクローンならびに多様性及びクローン性の測定値を実証した。
【３８２９】
複数の以前の治療にもかかわらず、６人の患者が奏効を経験し、そのうち２人は持続的奏効を示し、１年を超えて延長する持続的ＣＲを含む公表された経験と一致していた[6]。
【３８３０】
略語：
ＡＥ、有害事象；ＢＯＲ、最良の全奏効；ＣＲ、完全奏効；ＣＴＬＡ－４、細胞傷害性Ｔリンパ球抗原－４；ＣＹ、シクロホスファミド；ＥＣＯＧ、Ｅａｓｔｅｒｎ　Ｃｏｏｐｅｒａｔｉｖｅ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　Ｇｒｏｕｐ；ＥＧＦＲ、上皮成長因子受容体；ＥＯ

Ａ、評価の終了；ＥＯＳ、研究の終了；ＥＯＴ、治療の終了；ＦＡＳ、完全分析セット；ＦＤＧ－ＰＥＴ、フルオロデオキシグルコース－陽電子放出断層撮影；ＦＬＵ、フルダラビン；ＧＭＰ、適正製造基準；ＩＣＩ、免疫チェックポイント阻害剤；ＩＬ－２、インターロイキン－２；ＮＡ、評価なし；ＮＤ、検出なし；ＮＭＡ－ＬＤ、骨髄非破壊的リンパ球枯渇；ＮＳＣＬＣ、非小細胞肺癌；ＯＲＲ、客観的奏効率；ＰＤ、進行性疾患；ＰＲ、部分奏効；Ｐｔ、患者；ＰＤ－１、プログラム細胞死タンパク質１；ＰＤ－Ｌ１、プログラム死リガンド－１；ＲＥＣＩＳＴ、固形腫瘍の奏効評価基準；ＳＤ、安定な疾患；ＴＣＲ、Ｔ細胞受容体；ＴＥＡＥ、治療下で出現した有害事象、ＴＩＬ、腫瘍浸潤リンパ球；ＴＰＳ、腫瘍割合スコア。

【３８３１】

参考文献

１．Ｈｏｒｖａｔｈ Ｌ，ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃａｎｃｅｒ（２０２０）１９：１４１．
２．Ｓａｒｎａｉｋ ＡＡ，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ（２０２１）；ｄｏｉ：１０．１２００／ＪＣＯ．２１．００６１２．
３．Ｔｈｏｍａｓ ＳＳ，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ（２０２１）；３９（ｓｕｐｐｌ；ａｂｓｔｒａｃｔ ９５３７）．
４．Ｊａｚａｅｒｉ Ａ，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ（２０１９）；３７（ｓｕｐｐｌ；ａｂｓｔｒａｃｔ ２５３８）．
５．Ｊｉｍｅｎｏ Ａ，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ Ｃａｎｃｅｒ（２０２０）；８ （ｓｕｐｐｌ；ａｂｓｔｒａｃｔ Ａ３７８）．
６．Ｃｒｅｅｌａｎ ＢＣ，ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄ（２０２１）：ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓ４１５９１－０２１－０１４６２－ｙ．
７．Ｇｏｎｔｃｈａｒｏｖａ Ｖ，ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ（２０１９）；７９：１３（ｓｕｐｐｌ；ａｂｓｔｒａｃｔ １４）．
８．Ｊａｚａｅｒｉ Ａ，ｅｔ ａｌ．Ａｎｎａｌｓ Ｏｎｃｏｌ（２０２０）；３１：Ｓ６４２（ｓｕｐｐｌ；ａｂｓｔｒａｃｔ ３６８８）．

【３８３２】

実施例２０：転移性非小細胞肺癌（ｍＮＳＣＬＣ）を有する患者における自己腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）細胞療法の第２相多施設研究

背景

アクショナブルなドライバー変異を有しない転移性非小細胞肺癌（ｍＮＳＣＬＣ）を有する患者は、同時または連続の最前線の免疫チェックポイント阻害剤（ＩＣＩ）＋化学療法±ベバシズマブで進行した後、第２選択（２Ｌ）が限られている。

【３８３３】

自己腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）細胞療法は、切除不能及び転移性黒色腫、再発性、難治性または持続性子宮頸癌、転移性頭頸部扁平上皮癌、ならびにｍＮＳＣＬＣ[3～5]を含む満たされていない医療ニーズを有するいくつかの患者集団において、有効性、及び安全性を同時に有する第一選択治療の進行後の第二選択治療（２Ｌ）選択肢[1]を実証している。

【３８３４】

ｍＮＳＣＬＣの重度の前治療患者におけるＴＩＬでの初期臨床経験は、ＰＤ－Ｌ１陰性腫瘍を有する６人の応答者のうちの２人を含む、実行可能性、安全性、及び２１．４％の客観的応答率（ＯＲＲ）を実証している（Ｓｃｈｏｅｎｆｅｌｄ ＡＪ，ＳＩＴＣ ２０２１［ａｂｓ ４５８］）[6]。

【３８３５】

ＴＩＬ細胞療法はまた、ニボルマブと組み合わせた第１相研究において、ｍＮＳＣＬＣにおける有効性の証拠を示した[7]。

【３８３６】

より良い２Ｌの治療選択肢のための緊急のニーズに対処するために、現在進行中の臨床

試験は、許可されている前の治療を明確にし、疾患進行前の腫瘍採取及びＴＩＬ生成のための患者登録を可能にし、前の治療とＴＩＬ治療の開始との間の時間、及びＴＩＬ産生のコストを最小限に抑えるように修正されている。

【３８３７】

研究の概要

この研究は、同時または連続的なＩＣＩ＋白金ベースの化学療法±ベバシズマブ、または標的療法を含む、前の療法時またはその後に進行した、ＥＧＦＲ、ＡＬＫ、またはＲＯＳゲノム変化を伴わない転移性ステージＩＶのＮＳＣＬＣを有する患者における自己ＴＩＬによる養子細胞療法を評価する非盲検、多コホート、多施設第２相研究である。

【３８３８】

患者は、進行時にＴＩＬ治療を進めることを意図して疾患の進行前に腫瘍採取及び生成のために登録され得る。

【３８３９】

図４５に示されるように、ＩＣＩ＋化学療法±ベバシズマブまたは標的療法時またはその後に疾患進行を有し、ＥＧＦＲ、ＡＬＫ、またはＲＯＳゲノム変化を伴わない転移性ＮＳＣＬＣを有する患者は、以下のように４つのコホートに分けられる：

コホート１－ＩＣＩ前のＴＰＳ＜１％、または歴史的ＴＰＳなし（ｎ＝４０）。

コホート２－ＩＣＩ前のＴＰＳ≧１％（ｎ＝４０）。

コホート３－外科的腫瘍切除（任意のＴＰＳ）を受けることができない患者のための画像誘導コア腫瘍生検を使用した１６日間のＧｅｎ３製造（ｎ＝１５）。

コホート４－再治療（ＴＩＬへの以前の応答者またはコホート１～３からの未確認のＰＤを有する患者）（ｎは特定されていない）。

【３８４０】

コホート１、２、及び３において、およそ９５人の患者にＴＩＬを注入することが計画されている。

【３８４１】

本研究の一次エンドポイントは、ＩＲＣ（コホート１及び２）または治験責任医師（コホート３及び４）によって評価されるＲＥＣＩＳＴ１．１に従ってＯＲＲを評価することを目的とする。

【３８４２】

二次エンドポイントには、安全性及び追加の有効性パラメータ、ならびにコア生検から生成された成功裏のＴＩＬのパーセンテージを評価することが含まれる（コホート３）。

【３８４３】

本研究の探索的エンドポイントには、ＴＩＬの臨床活性の予測的及び薬力学的バイオマーカーの分析が含まれる。

【３８４４】

主要な適格基準には、アクショナブルな変異（例えば、ＭＥＴ、ＨＥＲ２、ＲＥＴ、ＢＲＡＦ、ＫＲＡＳ）を有するものにおける標的療法を含む、２選択以下の前の治療（同時ＩＣＩ＋化学療法の場合；連続する場合以前の３選択以下）の後に進行する、ＥＧＦＲ、ＡＬＫ、またはＲＯＳ１ゲノム変化を伴わないｍＮＳＣＬＣ；アクショナブルな変異を伴わないものでは、１つの以前の同時ＩＣＩ＋化学療法（連続する場合以前の２つ以下）の後の進行；ＴＩＬ生成のための１．５ｃｍ以上の病変（複数可）；腫瘍採取後の１つ以上の残りのＲＥＣＩＳＴ測定可能な病変（複数可）；及び０または１のＥＣＯＧ　ＰＳが含まれる。腫瘍採取及びＴＩＬ製造は、確認された進行の前または後に生じ得る。ＴＩＬは集中型ＧＭＰ施設で生成され、最終的な凍結保存された輸液産物が各施設に出荷される。進行時に、患者は、２用量のシクロホスファミド（６０ｍｇ／ｋｇ）及び５用量のフルダラビン（２５ｍｇ／ｍ２）、続いてＴＩＬ（１～１５０×10^9個の細胞）の１回の注入、ならびに≦６用量のＩＬ－２（６００，０００ＩＵ／ｋｇ）による骨髄非破壊的リンパ枯渇の調節レジメンを受ける。

【３８４５】

登録のための主要な包含基準
●患者は、ＮＳＣＬＣの組織学的または病理学的診断が確認されている必要がある。
●ＩＣＩ及びプラチナベースの化学療法±ベバシズマブ、または標的療法を含む第一選択療法時またはその後の放射線疾患進行が確認された、ＥＧＦＲ、ＡＬＫ、またはＲＯＳゲノム変化のない転移性ステージＩＶのＮＳＣＬＣ
●アクショナブルな変異のない患者の場合：ＩＣＩ及びプラチナベースの化学療法を併用する場合は１選択以下の以前の療法、連続する場合は以前の２選択以下
●アクショナブルな変異を有する患者（ＥＧＦＲ、ＡＬＫまたはＲＯＳを除く）の場合：適切な標的療法を１選択追加が許可される
●進行前腫瘍採取及びＴＩＬ生成を有する患者の場合：同時または連続的なＩＣＩ及びプラチナベースの化学療法のいずれかのプラチナベースの化学療法成分後の残存切除可能な疾患の存在
●コホート１及び２：１つ以上の切除可能な病変及び１つ以上の測定可能な病変；コホート３：画像誘導コア生検を介したＴＩＬ生成のための腫瘍採取を受けることができ、標的病変（複数可）として機能するのに十分な残存病変（複数可）を有することができる。
●０または１のＥＣＯＧのパフォーマンスステータス、及び６か月以上の推定平均余命
●ＬＶＥＦ＞４５％、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ Ｈｅａｒｔ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ Ｃｌａｓｓ１
●FEV_1＞５０％またはFEV_1／ＦＶＣ＞７０％

【３８４６】
登録ための主要な除外基準
●既知のアクショナブルなＥＧＦＲ、ＡＬＫ、またはＲＯＳドライバーの変異
●症候性及び／または未治療の脳転移
●過去２０年以内の臓器同種移植または以前の細胞移植
●プレドニゾンまたは他のステロイド同等物の全身ステロイド療法≧１０ｍｇ／日
●任意の形態の原発性免疫不全症
●治療開始前２８日以内に生ワクチン接種または弱毒化ワクチン接種
●リスクが増大した活動性の医学的疾患（複数可）
●治療開始から２１日以内に別の介入臨床研究への参加

【３８４７】
略語：
２Ｌ、第２選択；ＣＹ、シクロホスファミド；ＦＬＵ、フルダラビン；ＥＣＯＧ、Ｅａｓｔｅｒｎ Ｃｏｏｐｅｒａｔｉｖｅ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ Ｇｒｏｕｐ；ＥＯＡ、評価の終了；ＥＯＳ、研究の終了；ＥＯＴ、治療の終了；ＦＥＶ１、１秒間の強制呼気量；ＦＶＣ、強制肺活量；ＧＭＰ、適正製造基準；ＩＣＩ、免疫チェックポイント阻害剤；ＩＬ－２、インターロイキン－２；ＩＲＣ、独立審査委員会；ＬＶＥＦ、左室駆出分画；ＮＭＡ－ＬＤ、骨髄非破壊的リンパ枯渇；ｍＮＳＣＬＣ、転移性非小細胞肺癌；ＯＲＲ、客観的奏効率；ＰＤ、進行性疾患；ＲＥＣＩＳＴ、固形腫瘍の奏効評価基準；ＴＩＬ、腫瘍浸潤リンパ球；ＴＰＳ、腫瘍割合スコア（腫瘍ＰＤ－Ｌ１発現の尺度）

【３８４８】
参考文献
１．Ｈｏｒｖａｔｈ Ｌ，ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｃａｎｃｅｒ．２０２０；１９：１４１．
２．Ｓｏｃｉｎｓｋｉ Ｍ ｅｔ ａｌ．Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ．２０１８；３７８：２２８８－２３０１．
３．Ｓａｒｎａｉｋ Ａ，ｅｔ ａｌ．ＪＣＯ．２０２１；３９（２４）：２６５６－２６６６．
４．Ｊａｚａｅｒｉ Ａ，ｅｔ ａｌ．ＪＣＯ．２０１９；３７（ｓｕｐｐｌ；ａｂｓｔｒａｃｔ ２５３８）．
５．Ｊｉｍｅｎｏ Ａ，ｅｔ ａｌ．ＪＩＴＣ．２０２０；８（ｓｕｐｐｌ；ａｂｓｔｒａｃｔ Ａ３７８）．

６．Ｓｃｈｏｅｎｆｅｌｄ Ａ，ｅｔ ａｌ．ＪＩＴＣ．２０２１；９（ｓｕｐｐｌ ２；ａｂｓｔｒａｃｔ ４５８）．
７．Ｃｒｅｅｌａｎ Ｂ，ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｍｅｄ．２０２１；２７：１４１０－１４８１．

【３８４９】
上記の実施例は、当業者に対して、本発明の組成物、システム及び方法の実施形態の作製方法及び使用方法の完全な開示及び説明を提供するために提示されており、本発明者らが自身の発明とみなすものの範囲を限定することを意図しない。当業者に明らかな、本発明を実施するための上記のモードの修正は、添付の特許請求の範囲内にあることを意図している。本明細書で言及するすべての特許及び刊行物は、本発明が属する分野の当業者のレベルを示す。
【３８５０】
すべての見出し及びセクションの指定は、明確化及び参照の目的のみのために使用されており、いかなる方法でも限定するものとしてみなされない。例えば、当業者は、本明細書に記載の本発明の趣旨及び範囲に従って異なる見出し及びセクションから様々な態様を適宜組み合わせることの有用性を理解する。
【３８５１】
本明細書で引用されたすべての参考文献は、各個々の刊行物または特許もしくは特許出願がすべての目的のためにその全体が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されているのと同じ程度にすべての目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【３８５２】
当業者に明らかであるように、本出願の趣旨及び範囲から逸脱することなく、本出願の多くの修正及び変形が加えられてもよい。本明細書に記載の特定の実施形態及び実施例はほんの一例として提供されており、本出願は、特許請求の範囲が権利を与えられる等価物の全範囲に加えて、添付の特許請求の範囲の用語によってのみ限定されるべきである。
【誤訳訂正２】
【訂正対象書類名】特許請求の範囲
【訂正対象項目名】全文
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＮＳＣＬＣ患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであり、前記方法が、
（ａ）前記患者ががん治療を受ける前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または前記患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容すること、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することを含み、
その後、前記患者が、ＩＣＩ治療及び／または標準治療の治療を受け、
任意選択で、前記患者が前記ＩＣＩ及び／または標準治療の治療時またはその後に進行性疾患を示す場合、前記第１のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団にさらに拡張される、前記方法。
【請求項２】
ＮＳＣＬＣ患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、中断されている維持療法を受けており、前記方法が、
（ａ）前記維持療法を再開する前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または前記患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容すること、

（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することを含み、
その後、前記患者が、前記維持療法を再開し、
任意選択で、前記患者が前記維持療法の前記再開の時またはその後に進行性疾患を示す場合、前記第１のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団にさらに拡張される、前記方法。
【請求項３】
ＮＳＣＬＣ患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであり、
（ａ）前記患者ががん治療を受ける前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または前記患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）前記凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された前記治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記移すことと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存することと、を含む、前記方法。
【請求項４】
ＮＳＣＬＣ患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであり、
（ａ）前記患者ががん治療を受ける前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または前記患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）前記凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、
（ｄ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第１の拡張が、約１～７／８日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団が、前記第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣで補充することにより、急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、前記急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、前記急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された前記治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取することと、

（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記移すことと、

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

【請求項５】

急速拡張が、前記急速拡張の開始後、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、または１０日間続行することができる、請求項４に記載の方法。

【請求項６】

ＮＳＣＬＣ患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、中断されている維持療法を受けており、

（ａ）前記維持療法を再開する前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または前記患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）前記凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、

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

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

（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された前記治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取することと、

（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記移すことと、

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

【請求項７】

ＮＳＣＬＣ患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、中断されている維持療法を受けており、

（ａ）前記維持療法を再開する前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または前記患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）前記凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、
（ｄ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第１の拡張が、約１～７／８日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団が、前記第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣで補充することにより、急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、前記急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、前記急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された前記治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記移すことと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存することと、を含む、前記方法。
【請求項８】
がん患者が、任意のがん治療に対してナイーブである、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
前記患者が、ＩＣＩ治療、抗ＶＥＧＦ治療、または化学療法治療に対してナイーブである、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
前記患者が、ステップ（ａ）の時点で中断されている維持療法を受けており、前記維持療法が、ステップ（ａ）の後に再開される、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１】
前記患者が、ステップ（ａ）の開始時にウォッシュアウト期間にある、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記患者が、前記がん治療を受けるか、または前記維持療法を再開し、前記患者が進行性疾患を示した後に、解凍のステップ及び後続のステップが行われる、請求項１０に記載の方法。
【請求項１３】
前記患者が、凍結保存のステップ（ｂ）の少なくとも約１週間、２週間、３週間、１か月、２か月、３か月、４か月、５か月、６か月、７か月、８か月、９か月、１０か月、１１か月、１２か月、１３か月、１４か月、１５か月、１６か月、１７か月、１８か月、１９か月、２０か月、２１か月、２２か月、２３か月、２４か月、２５か月、２６か月、２７か月、２８か月、２９か月、３０か月、３１か月、３２か月、３３か月、３４か月、３

５か月、３６か月後、進行性疾患を示す、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
前記患者が、第１選択ＩＣＩ治療及び／または標準治療を受けるか、または受けることになる、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５】
前記患者が、第２選択ＩＣＩ治療及び／または標準治療を受けるか、または受けることになる、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
前記患者が、ＮＳＣＬＣと診断される、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７】
前記患者が、転移性ステージＩＶのＮＳＣＬＣと診断される、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８】
前記対象または前記患者が、
ｉ）＜１％のＰＤ－Ｌ１の所定の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）、
ｉｉ）１％～４９％のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコア、または
ｉｉｉ）１つ以上のドライバー変異の所定の非存在のうちの少なくとも１つを有する、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
前記患者または前記対象が、１％～４９％のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳを有する、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２０】
前記患者または前記対象が、＜１％のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳを有し、１つ以上のドライバー変異の所定の非存在を有する、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２１】
前記１つ以上のドライバーが、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＥＧＦＲエクソン２０、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＢＲＡＦ　Ｖ６００変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、ＲＥＴ融合、ＥＲＢＢ２変異、ＥＲＢＢ２増幅、ＢＲＣＡ変異、ＭＡＰ２Ｋ１変異、ＰＩＫ３ＣＡ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＰＴＥＮ変異、ＵＭＤ変異、ＮＲＡＳ変異、ＫＲＡＳ変異、ＮＦ１変異、ＭＥＴ変異、ＭＥＴスプライス及び／または変化したＭＥＴシグナル伝達、ＴＰ５３変異、ＣＲＥＢＢＰ変異、ＫＭＴ２Ｃ変異、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１変異、ＡＴＭ変異、ＳＥＴＤ２変異、ＦＬＴ３変異、ＰＴＰＮ１１変異、ＦＧＦＲ１変異、ＥＰ３００変異、ＭＹＣ変異、ＥＺＨ２変異、ＪＡＫ２変異、ＦＢＸＷ７変異、ＣＣＮＤ３変異、及びＧＮＡ１１変異からなる群から選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２２】
前記患者または前記対象が、＜１％のＴＰＳを有し、ＥＧＦＲ阻害剤、ＢＲＡＦ阻害剤、ＡＬＫ阻害剤、ｃ－Ｒｏｓ阻害剤、ＲＥＴ阻害剤、ＥＲＢＢ２阻害剤、ＢＲＣＡ阻害剤、ＭＡＰ２Ｋ１阻害剤、ＰＩＫ３ＣＡ阻害剤、ＣＤＫＮ２Ａ阻害剤、ＰＴＥＮ阻害剤、ＵＭＤ阻害剤、ＮＲＡＳ阻害剤、ＫＲＡＳ阻害剤、ＮＦ１阻害剤、ＭＥＴ阻害剤ＴＰ５３阻害剤、ＣＲＥＢＢＰ阻害剤、ＫＭＴ２Ｃ阻害剤、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１阻害剤、ＡＴＭ阻害剤、ＳＥＴＤ２阻害剤、ＦＬＴ３阻害剤、ＰＴＰＮ１１阻害剤、ＦＧＦＲ１阻害剤、ＥＰ３００阻害剤、ＭＹＣ阻害剤、ＥＺＨ２阻害剤、ＪＡＫ２阻害剤、ＦＢＸＷ７阻害剤、ＣＣＮＤ３阻害剤、及びＧＮＡ１１阻害剤による治療のために適応されていないＮＳＣＬＣを有する、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２３】
前記１つ以上のドライバー変異が、ＥＧＦＲ、ＡＬＫ、またはＲＯＳのゲノム変化を含む、請求項２０に記載の方法。
【請求項２４】
前記１つ以上のドライバー変異が、ＥＧＦＲ、ＡＬＫ、またはＲＯＳのゲノム変化から

なる、請求項２０に記載の方法。
【請求項２５】
前記ＮＳＣＬＣが、ＰＤ－Ｌ１の発現が低いか、または全くない、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２６】
前記患者が、１つ以上のドライバー変異の所定の非存在を有する、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２７】
前記ＮＳＣＬＣが、化学療法剤による治療に対して不応性または耐性である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２８】
前記ＮＳＣＬＣが、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤による治療に対して不応性または耐性である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２９】
前記ＮＳＣＬＣが、化学療法剤で治療されているが、現在は化学療法剤で治療されていない、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３０】
前記ＮＳＣＬＣが、化学療法剤で治療されているが、現在は化学療法剤で治療されておらず、＜１％のＴＰＳを有する、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３１】
前記ＮＳＣＬＣが、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されているが、現在はＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されていない、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３２】
前記ＮＳＣＬＣが、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されているが、現在はＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されておらず、＜１％のＴＰＳを有する、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３３】
前記ＮＳＣＬＣが、化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されているが、現在は化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されていない、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３４】
前記ＮＳＣＬＣが、化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されているが、現在は化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されておらず、＜１％のＴＰＳを有する、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３５】
前記ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されていない、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３６】
前記ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で以前に治療されている、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３７】
前記ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で以前に治療されているが、現在は化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されていない、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３８】
前記ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で以前に治療されているが、現在はＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されていない、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３９】

前記ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で以前に治療されているが、現在は化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されていない、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項４０】

前記ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、ＰＤ－Ｌ１の発現が低いか、または全くない、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項４１】

前記ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で以前に治療されているが、現在は化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されておらず、＜１％のＴＰＳを有する、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項４２】

前記ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１及び／または抗ＰＤ－Ｌ２抗体で以前に治療されている、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項４３】

前記ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で以前に治療されている、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項４４】

前記ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体による治療に対して不応性または耐性である、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項４５】

前記ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、前記腫瘍割合スコアが、前記抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項４６】

前記ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、前記腫瘍割合スコアが、前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定されたか、または前記ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１抗体で以前に治療されており、前記腫瘍割合スコアが、前記抗ＰＤ－１抗体治療の前に決定された、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項４７】

前記ＮＳＣＬＣが、化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されている、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項４８】

前記ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項４９】

前記ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項５０】

前記ＮＳＣＬＣが、化学療法剤で治療されており、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項５１】

前記ＮＳＣＬＣが、化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されているが、現在は化学療法剤及び／またはＶＥＧＦ－Ａ阻害剤で治療されておらず、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項５２】

最大腫瘍直径が、横断面もしくは冠状面のいずれかで測定して７ｃｍより大きいか、または腫れたリンパ節が２０ｍｍ以上の短軸直径を有する場合、巨大腫瘤病変が示される、

先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項５３】
前記ＮＳＣＬＣが、ネオアジュバントまたはアジュバント療法を含まない、少なくとも２つの以前の全身治療過程に対して不応性または耐性である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項５４】
前記ＮＳＣＬＣが、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ＪＳ００１、ＴＳＲ－０４２、ピジリズマブ、ＢＧＢ－Ａ３１７、ＳＨＲ－１２１０、ＲＥＧＮ２８１０、ＭＤＸ－１１０６、ＰＤＲ００１、クローン由来の抗ＰＤ－１：ＲＭＰ１－１４、米国特許第８，００８，４４９号に開示される抗ＰＤ－１抗体、デュルバルマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、ならびにそれらの断片、誘導体、バリアント、及びバイオシミラーからなる群から選択される抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対して不応性または耐性である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項５５】
前記ＮＳＣＬＣが、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性または耐性である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項５６】
前記ＮＳＣＬＣが、ニボルマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性または耐性である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項５７】
前記ＮＳＣＬＣが、抗ＣＴＬＡ－４抗体に対して不応性または耐性である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項５８】
前記ＮＳＣＬＣが、抗ＣＴＬＡ－４抗体、及びペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性または耐性である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項５９】
前記ＮＳＣＬＣが、抗ＣＴＬＡ－４抗体、及びニボルマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性または耐性である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項６０】
前記抗ＣＴＬＡ－４抗体が、イピリムマブまたはそのバイオシミラーである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項６１】
前記ＮＳＣＬＣが、デュルバルマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性または耐性である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項６２】
前記ＮＳＣＬＣが、アテゾリズマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性または耐性である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項６３】
前記ＮＳＣＬＣが、アベルマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性または耐性である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項６４】
前記化学療法剤が、白金ダブレット化学療法剤（複数可）である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項６５】
前記白金ダブレット化学療法剤の療法が、
ｉ）シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤、
ｉｉ）及びビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはｎａｂ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療法剤を含む、請求項６４に記載の方法。
【請求項６６】

前記第１の化学療法剤及び／または前記第２の化学療法剤を含む前記化学療法剤が、ペメトレキセドとの組み合わせである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項６７】
前記ＮＳＣＬＣが、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、及びシスプラチンを含む併用療法に対して不応性または耐性である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項６８】
前記ＮＳＣＬＣが、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、シスプラチン、ニボルマブ、及びイピリムマブを含む併用療法に対して不応性または耐性である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項６９】
前記ＮＳＣＬＣが、ＶＥＧＦ－Ａ阻害剤に対して不応性または耐性である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項７０】
前記ＮＳＣＬＣが、ベバシズマブ、ラニビズマブ、及びイクルクマブからなる群から選択されるＶＥＧＦ－Ａ阻害剤に対して不応性または耐性である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項７１】
前記ＮＳＣＬＣが、ベバシズマブに対して不応性または耐性である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項７２】
前記ＮＳＣＬＣが、１つ以上のドライバー変異の非存在または存在について分析されている、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項７３】
１つ以上のドライバー変異が存在しない、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項７４】
前記ＮＳＣＬＣ治療が、１つ以上のドライバー変異の存在または非存在とは無関係である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項７５】
前記１つ以上のドライバー変異が、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異、ｃ－ＲＯＳ変異、ＥＭＬ４－ＡＬＫ、及びＭＥＴ変異からなる群から選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項７６】
前記ＥＧＦＲ変異が、ＮＳＣＬＣから小細胞肺癌（ＳＣＬＣ）への腫瘍形質転換をもたらす、請求項７５に記載の方法。
【請求項７７】
前記ＮＳＣＬＣ治療が、高腫瘍変異負荷（高－ＴＭＢ）及び／またはマイクロサテライト不安定性－高（ＭＳＩ－高）状態の存在または非存在とは無関係である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項７８】
前記ＮＳＣＬＣが、高－ＴＭＢ及び／またはＭＳＩ－高状態を示す、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項７９】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、
（ａ）前記患者ががん治療を受ける前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または前記患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）前記がん治療時またはその後に前記患者が進行性疾患を示すのを待つことと、

（ｄ）前記凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、
（ｅ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）前記第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）から取得された前記治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取することと、
（ｈ）ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｇ）から（ｈ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記移すことと、
（ｉ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存することと、を含む、前記方法。
【請求項８０】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、中断されている維持療法を受けており、
（ａ）前記維持療法を再開する前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または前記患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）がん治療時またはその後に前記患者が進行性疾患を示すのを待つことと、
（ｄ）前記凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、
（ｅ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）前記第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）から取得された前記治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取することと、
（ｈ）ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｇ）から（ｈ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記移すことと、
（ｉ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの前記採取されたＴＩＬ集

団を含む前記注入バッグを凍結保存することと、を含む、前記方法。
【請求項８１】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、
（ａ）前記患者ががん治療を受ける前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または前記患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）前記がん治療時またはその後に前記患者が進行性疾患を示すのを待つことと、
（ｄ）前記凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、
（ｅ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第１の拡張が、約１～７／８日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団が、前記第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）前記第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣで補充することにより、急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、前記急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、前記急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）から取得された前記治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取することと、
（ｈ）ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｇ）から（ｈ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記移すことと、
（ｉ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存することと、を含む、前記方法。
【請求項８２】
急速拡張が、前記急速拡張の開始後、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、または１０日間続行することができる、請求項８１に記載の方法。
【請求項８３】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、
（ａ）前記患者ががん治療を受ける前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または前記患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）前記がん治療時またはその後に前記患者が進行性疾患を示すのを待つことと、
（ｄ）前記凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、
（ｅ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第１の拡張が、約１～７／８日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集

団が、前記第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）前記第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣで補充することにより、急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、前記急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、前記急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）から取得された前記治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取することと、
（ｈ）ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｇ）から（ｈ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記移すことと、
（ｉ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存することと、を含む、前記方法。
【請求項８４】
前記患者が、任意のがん治療に対してナイーブである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項８５】
前記患者が、第１選択ＩＣＩ治療及び／または標準治療を受ける、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項８６】
前記患者が、第２選択ＩＣＩ治療及び／または標準治療を受ける、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項８７】
ステップ（ｂ）が、前記腫瘍断片または前記腫瘍消化物のフラッシュ凍結を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項８８】
前記フラッシュ凍結が、
ｉ）前記腫瘍断片または前記腫瘍消化物を凍結保存培地中でインキュベートすることと、任意選択で、約３０分～約６０分間、約２℃～約８℃で、１０％ｖ／ｖのＤＭＳＯを含む凍結保存培地中でインキュベートすることと、
ｉｉ）前記腫瘍を凍結することであって、前記凍結が、液体窒素の気相を使用したフラッシュ凍結である、前記凍結することと、を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項８９】
ステップ（ｂ）が、前記腫瘍断片または前記腫瘍消化物の制御された速度の凍結を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項９０】
前記制御された速度の凍結が、
ｉ）閉鎖可能な容器に凍結保存培地を添加することと、
ｉｉ）制御された速度の凍結装置で前記閉鎖可能な容器を予め冷却することと、
ｉｉｉ）前記腫瘍を、凍結保存培地を含む前記閉鎖可能な容器に入れ、前記容器を閉じることと、
ｉｖ）前記腫瘍及び凍結保存培地を含む前記閉鎖容器を、約３０～６０分間の時間、約２～８℃の温度でインキュベートすることと、
ｖ）制御された速度の凍結装置中で前記容器をゆっくり凍結することと、を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項９１】
前記がん患者が、任意のがん治療に対してナイーブである、先行請求項のいずれかに記

載の方法。
【請求項９２】
前記患者が、ＩＣＩ治療、抗ＶＥＧＦ治療、または化学療法治療に対してナイーブである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項９３】
前記患者が、ステップ（ａ）の時点で中断されている維持療法を受けており、前記維持療法が、ステップ（ａ）の後に再開される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項９４】
前記患者が、第１選択ＩＣＩ治療及び／または標準治療を受ける、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項９５】
前記患者が、第２選択ＩＣＩ治療及び／または標準治療を受ける、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項９６】
前記患者が、ＮＳＣＬＣと診断される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項９７】
前記患者が、転移性ステージＩＶのＮＳＣＬＣと診断される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項９８】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、
（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、前記対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得すること、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生すること、
（ｃ）前記凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加すること、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第２のＴＩＬ集団を産生すること、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生すること、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取すること、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの前記採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記移すこと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存することを含む、前記方法。
【請求項９９】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治

療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、

（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または前記患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）前記凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、

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

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

（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された前記治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取することと、

（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記移すことと、

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

【請求項１００】

がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、

（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、前記対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）前記凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、

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

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

（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの前記採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記移すことと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存することと、を含む、前記方法。
【請求項１０１】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、
（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは前記患者の腫瘍からの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記試料を凍結保存して、凍結保存された試料を産生することと、
（ｃ）前記凍結保存された試料を解凍し、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの前記採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記移すことと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存することと、を含む、前記方法。
【請求項１０２】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、
（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、対象または前記患者から腫瘍を切除することであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍からの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、前記切除することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記試料を凍結保存して、凍結保存された試料を産生することと、
（ｃ）前記凍結保存された試料を解凍し、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加するこ

と、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取することと、
（ｇ）ステップ（ｅ）からの前記採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記移すことと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存することと、を含む、前記方法。
【請求項１０３】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、
（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、対象から取得された腫瘍試料を、複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または前記患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）前記凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加することと、
（ｄ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第１の拡張が、約１～７／８日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団が、前記第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣで補充することにより、急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、前記急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、前記急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された前記治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記移すことと、

（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存することと、を含む、前記方法。
【請求項１０４】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、
（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは前記患者からの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記試料を凍結保存して、凍結保存された試料を産生することと、
（ｃ）前記凍結保存された試料を解凍し、閉鎖系内で前記第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地と接触させることと、
（ｄ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第１の拡張が、約１～７／８日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団が、前記第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣで補充することにより、急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、前記急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、前記急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）ステップ（ｆ）から取得された前記治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取することと、
（ｇ）ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記移すことと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存することと、を含む、前記方法。
【請求項１０５】
急速拡張が、前記急速拡張の開始後、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、または１０日間続行することができる、請求項１０４に記載の方法。
【請求項１０６】
前記ＩＬ－２が、存在する場合、前記第１の細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１０７】
前記ＩＬ－２が、１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在し、前記ＯＫＴ－３抗体が、第２中に約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在し、初期拡張が、存在する場合、ガス透過性容器を使用して行われる、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１０８】
前記急速拡張が、存在する場合、ガス透過性容器を使用して行われる、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１０９】
前記第１の細胞培養培地が、存在する場合、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む、先

行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１１０】
第２の細胞培養培地が、存在する場合、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１１１】
前記採取されたＴＩＬ集団が、治療上有効なＴＩＬ集団を含み、治療上有効なＴＩＬ集団が、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}個のＴＩＬを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１１２】
前記初期拡張が、２１日以内の期間にわたって行われる、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１１３】
前記初期拡張が、７日以内の期間にわたって行われる、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１１４】
前記急速拡張が、７日以内の期間にわたって行われる、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１１５】
前記第１の拡張及び前記第２の拡張が、各々１１日の期間内に個別に行われる、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１１６】
前記第１の拡張を行うステップから前記採取のステップが、約１０日～約２４日で行われる、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１１７】
前記第１の拡張を行うステップから前記採取のステップが、約１０日～約２２日で行われる、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１１８】
修飾されたＴＩＬの各々が、その表面膜と会合する免疫調節組成物を含むように、前記採取の前の任意の時点で、前記ＴＩＬの一部分を修飾するステップをさらに含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１１９】
前記修飾のステップが、前記ＴＩＬを遺伝子編集して、ＴＡＬＥＮ系、ＣＲＩＳＰＲ系、及びジンクフィンガー系からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子編集系の前記修飾されたＴＩＬへの移入を達成することを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１２０】
前記修飾のステップ中に、前記修飾されたＴＩＬの細胞膜が、前記少なくとも１つの遺伝子編集系の移入を達成するために、マイクロ流体プラットフォームまたは無菌エレクトロポレーションを使用することによって、一時的に破壊される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１２１】
前記マイクロ流体プラットフォームが、ＳＱＺプラットフォームである、請求項１２０に記載の方法。
【請求項１２２】
免疫調節組成物が、各々が１つ以上の免疫調節剤及び細胞膜アンカー部分を含む１つ以上の膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１２３】
前記免疫調節組成物が、２つ以上の異なる膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、前記異なる膜アンカー免疫調節融合タンパク質の各々が、各々異なる免疫調節剤を含む、

先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１２４】
免疫調節組成物が、ＴＩＬ表面抗原結合ドメインに連結された１つ以上の免疫調節剤を含む融合タンパク質を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１２５】
免疫調節組成物が、複数の免疫調節剤を含むナノ粒子を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１２６】
前記免疫調節剤が、１つ以上のサイトカインを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１２７】
前記１つ以上のサイトカインが、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、ＩＦＮガンマ、ＴＮＦａ、ＩＦＮアルファ、ＩＦＮベータ、ＧＭ－ＣＳＦ、もしくはＧＣＳＦ、またはそれらのバリアントを含む、請求項１２６に記載の方法。
【請求項１２８】
前記免疫調節剤が、ＣＤ４０アゴニストを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１２９】
前記膜アンカー免疫調節融合タンパク質が、Ｎ末端からＣ末端へ、式：Ｓ－ＩＡ－Ｌ－Ｃに従うものであり、式中、Ｓがシグナルペプチドであり、ＩＡが免疫調節剤であり、Ｌがリンカーであり、Ｃが細胞膜アンカー部分である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１３０】
前記細胞膜アンカー部分が、ＣＤ８ａ膜貫通細胞内ドメイン、Ｂ７－１膜貫通ドメイン、Ｂ７－２膜貫通ドメイン、またはＣＤ８ａ膜貫通ドメインを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１３１】
前記１つ以上の免疫調節剤が、１つ以上のサイトカインを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１３２】
前記１つ以上のサイトカインが、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、ＩＦＮガンマ、ＴＮＦａ、ＩＦＮアルファ、ＩＦＮベータ、ＧＭ－ＣＳＦ、もしくはＧＣＳＦ、またはそれらのバリアントを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１３３】
前記ＴＩＬ表面抗原結合ドメインが、抗体可変重ドメイン及び可変軽ドメインを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１３４】
前記ＴＩＬ表面抗原結合ドメインが、抗体またはその断片を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１３５】
前記ＴＩＬ表面抗原結合ドメインが、以下のＴＩＬ表面抗原：ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ３、ＣＤｌｌａ、ＣＤｌｌｂ、ＣＤｌｌｃ、ＣＤ１８、ＣＤ２５、ＣＤ１２７、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ１９７、ＣＤ３８、ＣＤ２７、ＣＤ１９６、ＣＸＣＲ３、ＣＸＣＲ４、ＣＸＣＲ５、ＣＤ８４、ＣＤ２２９、ＣＣＲ１、ＣＣＲ５、ＣＣＲ４、ＣＣＲ６、ＣＣＲ８、ＣＣＲ１０、ＣＤ１６、ＣＤ５６、ＣＤ１３７、ＯＸ４０、またはＧＩＴＲのうちの１つ以上に対する親和性を示す、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１３６】
前記ナノ粒子が、リポソーム、タンパク質ナノゲル、ヌクレオチドナノゲル、ポリマー

ナノ粒子、または固体ナノ粒子である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１３７】
前記ナノ粒子が、ナノゲルである、請求項１３６に記載の方法。
【請求項１３８】
前記ナノ粒子が、以下の抗原：ＣＤ４５、ＣＤ１ｌａ（インテグリンアルファ－Ｌ）、ＣＤ１８（インテグリンベーター２）、ＣＤ１ｌｂ、ＣＤ１ｌｃ、ＣＤ２５、ＣＤ８、またはＣＤ４のうちの１つ以上に結合する抗原結合ドメインをさらに含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１３９】
前記修飾が、前記融合タンパク質をコードする異種核酸をＴＩＬの一部に導入し、前記融合タンパク質を前記修飾されたＴＩＬの表面上に発現させることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１４０】
前記異種核酸が、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、ジンクフィンガー法、及びそれらの組み合わせから選択される１つ以上の方法を使用して、前記修飾されたＴＩＬのゲノムに導入される、請求項１３９に記載の方法。
【請求項１４１】
前記修飾が、前記融合タンパク質の、前記ＴＩＬの一部への結合を可能にする条件下で、前記融合タンパク質を前記ＴＩＬの一部とインキュベートすることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１４２】
前記修飾が、前記免疫調節組成物を前記ＴＩＬの一部の表面に付着させることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１４３】
前記修飾が、前記第１の拡張からのＴＩＬ、または前記第２の拡張からのＴＩＬ、またはその両方で実行される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１４４】
前記修飾が、前記プライミングによる第１の拡張からのＴＩＬ、または前記急速な第２の拡張からのＴＩＬ、またはその両方で実行される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１４５】
前記修飾が、前記第１の拡張の後、及び前記第２の拡張の前に実行される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１４６】
前記修飾が、前記プライミングによる第１の拡張の後、及び前記急速な第２の拡張の前、またはその両方で実行される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１４７】
前記修飾が、前記第２の拡張の後に実行される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１４８】
前記修飾が、前記急速な第２の拡張の後に実行される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１４９】
前記修飾が、前記採取の後に実行される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１５０】
前記修飾されたＴＩＬが、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、前記治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは低減させる遺伝子修飾をさらに含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１５１】
前記１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子が、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２Ｃ

Ａ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲを含む群から選択される、請求項１５０に記載の方法。

【請求項１５２】

前記１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子が、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、及びＰＫＡを含む群から選択される、請求項１５０に記載の方法。

【請求項１５３】

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

【請求項１５４】

前記遺伝子修飾が、前記１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼを使用して産生される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項１５５】

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

【請求項１５６】

前記修飾されたＴＩＬが、前記細胞表面上で前記免疫調節組成物を一過的に発現するように修飾される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項１５７】

前記免疫調節組成物が、１つ以上の膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、各融合タンパク質が、１つ以上の免疫調節剤及び細胞膜アンカー部分を含む、請求項１５６に記載の方法。

【請求項１５８】

前記修飾されたＴＩＬが、前記融合タンパク質をコードする核酸で前記ＴＩＬをトランスフェクトすることによって修飾される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項１５９】

前記核酸が、ＲＮＡである、請求項１５８に記載の方法。

【請求項１６０】

前記ＲＮＡが、ｍＲＮＡである、請求項１５９に記載の方法。

【請求項１６１】

前記ＴＩＬが、ＳＱＺプラットフォームまたはエレクトロポレーションによって前記ｍＲＮＡでトランスフェクトされる、請求項１６０に記載の方法。

【請求項１６２】

前記ＴＩＬが、前記第１の拡張の後及び前記第２の拡張の前にＳＱＺプラットフォームまたはエレクトロポレーションによって前記ｍＲＮＡでトランスフェクトされる、請求項１６１に記載の方法。

【請求項１６３】

前記ＴＩＬが、前記第１の拡張の前に、ＳＱＺプラットフォームまたはエレクトロポレーションによって前記ｍＲＮＡでトランスフェクトされる、請求項１６１に記載の方法。
【請求項１６４】
前記修飾されたＴＩＬが、マイクロ流体装置を使用して前記融合タンパク質をコードする前記核酸でトランスフェクトされ、前記ＴＩＬの前記細胞膜を一時的に破壊し、それによって前記核酸のトランスフェクションを可能にする、請求項１６０に記載の方法。
【請求項１６５】
前記方法が、前記ＴＩＬを前記ｍＲＮＡでトランスフェクトする前に、抗ＣＤ３アゴニストでのインキュベーションによって前記ＴＩＬを活性化することをさらに含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１６６】
前記抗ＣＤ３アゴニストが、ＯＫＴ－３である、請求項１６５に記載の方法。
【請求項１６７】
前記ＴＩＬを前記ｍＲＮＡでトランスフェクトする前に、前記ＴＩＬを前記抗ＣＤ３アゴニストで約１～３日間インキュベートすることによって前記ＴＩＬが活性化される、請求項１６５または１６６に記載の方法。
【請求項１６８】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、
（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記腫瘍組織を凍結保存して、凍結保存された腫瘍組織を産生することと、
（ｃ）前記凍結保存された腫瘍組織を解凍し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗ＣＤ３アゴニストビーズもしくは抗体、または抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストビーズもしくは抗体を使用して、前記第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で前記第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む、前記方法。
【請求項１６９】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、
（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）前記腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、
（ｄ）前記凍結保存された腫瘍消化物を解凍し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗ＣＤ３アゴニストビーズもしくは抗体、または抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストビーズもしくは抗体を使用して、前記第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｇ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で前記第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む、前記方法。

【請求項１７０】

前記酵素培地が、ＤＮａｓｅを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項１７１】

前記酵素培地が、コラゲナーゼを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項１７２】

前記酵素培地が、中性プロテアーゼを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項１７３】

前記酵素培地が、ヒアルロニダーゼを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項１７４】

がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、

（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記腫瘍組織を凍結保存して、凍結保存された腫瘍組織を産生することと、

（ｃ）前記凍結保存された腫瘍組織を解凍し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）抗ＣＤ３アゴニストビーズもしくは抗体、または抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストビーズもしくは抗体を使用して、前記第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で前記第４のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第５のＴＩＬ集団の培養物を産生することと、

（ｇ）前記第５のＴＩＬ集団の前記培養物を複数のサブ培養物に分割し、前記複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～６日間培養し、前記複数のサブ培養物を組み合わせて、増加した数のＴＩＬを提供することと、を含む、前記方法。

【請求項１７５】

がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、

（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）前記腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、

（ｄ）前記凍結保存された腫瘍消化物を解凍し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗ＣＤ３アゴニストビーズもしくは抗体、または抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストビーズもしくは抗体を使用して、前記第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｇ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地

中で前記第４のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第５のＴＩＬ集団の培養物を産生することと、
（ｈ）前記第５のＴＩＬ集団の前記培養物を複数のサブ培養物に分割し、前記複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～６日間培養し、前記複数のサブ培養物を組み合わせて、増加した数のＴＩＬを提供することと、を含む、前記方法。
【請求項１７６】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、
（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記腫瘍組織を凍結保存して、凍結保存された腫瘍組織を産生することと、
（ｃ）前記凍結保存された腫瘍組織を解凍し、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）前記第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で前記第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む、前記方法。
【請求項１７７】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、
（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）前記腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、
（ｄ）前記凍結保存された腫瘍消化物を解凍し、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で前記第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む、前記方法。
【請求項１７８】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、
（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記腫瘍組織を凍結保存して、凍結保存された腫瘍組織を産生することと、
（ｃ）前記凍結保存された腫瘍組織を解凍し、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）前記第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で前記第３のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第４のＴＩＬ集団の培養物を産生することと、
（ｆ）前記第４のＴＩＬ集団の前記培養物を複数のサブ培養物に分割し、前記複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～７日間培養し、前記複数のサブ培養物を組み合わせて、増加した数のＴＩＬを含む第５のＴＩＬ集団を提供することと、を含む、前記方法。
【請求項１７９】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、
（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）前記腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、
（ｄ）前記凍結保存された腫瘍消化物を解凍し、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で前記第３のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第４のＴＩＬ集団の培養物を産生することと、
（ｇ）前記第４のＴＩＬ集団の前記培養物を複数のサブ培養物に分割し、前記複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～７日間培養し、前記複数のサブ培養物を組み合わせて、増加した数のＴＩＬを含む第５のＴＩＬ集団を提供することと、を含む、前記方法。
【請求項１８０】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、
（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記腫瘍組織を凍結保存して、凍結保存された腫瘍組織を産生することと、
（ｃ）前記凍結保存された腫瘍組織を解凍し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で前記第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む、前記方法。
【請求項１８１】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が

、
（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）前記腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、
（ｄ）前記凍結保存された腫瘍消化物を解凍し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で前記第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む、前記方法。
【請求項１８２】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、
（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記腫瘍組織を凍結保存して、凍結保存された腫瘍組織を産生することと、
（ｃ）前記凍結保存された腫瘍組織を解凍し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で前記第３のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第４のＴＩＬ集団の培養物を産生することと、
（ｇ）前記第４のＴＩＬ集団の前記培養物を複数のサブ培養物に分割し、前記複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～７日間培養し、前記複数のサブ培養物を組み合わせて、増加した数のＴＩＬを含む第５のＴＩＬ集団を提供することと、を含む、前記方法。
【請求項１８３】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、
（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）前記腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、
（ｄ）前記凍結保存された腫瘍消化物を解凍し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を

産生することと、
（ｇ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で前記第４のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第５のＴＩＬ集団の培養物を産生することと、
（ｈ）前記第５のＴＩＬ集団の前記培養物を複数のサブ培養物に分割し、前記複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～６日間培養し、前記複数のサブ培養物を組み合わせて、増加した数のＴＩＬを含む第５のＴＩＬ集団を提供することと、を含む、前記方法。
【請求項１８４】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、
（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容すること、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記腫瘍組織を凍結保存して、凍結保存された腫瘍組織を産生すること、
（ｃ）前記凍結保存された腫瘍組織を解凍し、第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、前記プライミングによる第１の拡張が、約３～８日の期間にわたって起こる、前記第２のＴＩＬ集団を取得すること、
（ｄ）抗ＣＤ３アゴニストビーズもしくは抗体、または抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストビーズもしくは抗体を使用して、前記第２のＴＩＬ集団を１～６日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生すること、
（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生すること、
（ｆ）第２の細胞培養培地中で前記第４のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、増加した数のＴＩＬ集団を取得することであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第２の拡張が、前記急速な第２の拡張の開始後約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日間進行することができる、前記増加した数のＴＩＬ集団を取得することを含む、前記方法。
【請求項１８５】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、
（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記腫瘍組織を凍結保存して、凍結保存された腫瘍組織を産生することと、
（ｃ）前記がんの進行後に、第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、前記プライミングによる第１の拡張が、約３～８日の期間にわたって起こる、前記第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｄ）前記第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第２の細胞培養培地中で前記第３のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、増加した数のＴＩＬ集団を取得することであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選

択で、前記急速な第２の拡張が、前記急速な第２の拡張の開始後約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日間進行することができる、前記増加した数のＴＩＬ集団を取得することと、を含む、前記方法。

【請求項１８６】

がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、

（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容すること、

（ｂ）腫瘍断片を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生すること、

（ｃ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生すること、

（ｄ）前記凍結保存された腫瘍消化物を解凍し、第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、前記プライミングによる第１の拡張が、約１～８日の期間にわたって起こる、前記第２のＴＩＬ集団を取得すること、

（ｅ）抗ＣＤ３アゴニストビーズもしくは抗体、または抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストビーズもしくは抗体を使用して、前記第２のＴＩＬ集団を１～６日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生すること、

（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生すること、

（ｇ）第２の細胞培養培地中で前記第４のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、増加した数のＴＩＬ集団を取得することであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第２の拡張が、前記急速な第２の拡張の開始後約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日間進行することができる、前記増加した数のＴＩＬ集団を取得することを含む、前記方法。

【請求項１８７】

がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、

（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍断片を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、

（ｄ）前記凍結保存された腫瘍消化物を解凍し、第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、前記プライミングによる第１の拡張が、約１～８日の期間にわたって起こる、前記第２のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）第２の細胞培養培地中で前記第３のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、増加した数のＴＩＬ集団を取得することであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第２の拡張が、前記急速な第２の拡張の開始後約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日間進行することができる、前記増加した数のＴＩＬ集団を取得することと、を含む、前記方法。

【請求項１８８】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、
（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象から腫瘍組織を取得するための他の手段によって産生される腫瘍組織の試料から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記腫瘍組織を凍結保存して、凍結保存された腫瘍組織を産生することと、
（ｃ）前記凍結保存された腫瘍組織を解凍し、前記腫瘍組織を閉鎖系に添加し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～９日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗ＣＤ３アゴニストビーズもしくは抗体、またはＣＤ３アゴニスト及びＣＤ２８アゴニストビーズもしくは抗体を使用して、前記第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の細胞培養培地中で前記第４のＴＩＬ集団を培養することによって第２の拡張を行い、第５のＴＩＬ集団を産生することであって、前記第２の拡張が、約５～１５日間行われて、前記第５のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第５のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、前記第５のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）から取得された前記治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｃ）～（ｇ）の各々が、閉鎖した滅菌系で行われ、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行、及び／またはステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取することと、を含む、前記方法。
【請求項１８９】
がん患者から凍結保存されたＴＩＬ集団を作製する方法であって、前記患者が、がん治療に対してナイーブであるか、または中断されている維持療法を受けており、前記方法が、
（ａ）前記がん治療または前記維持療法の再開の前に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象から腫瘍組織を取得するための他の手段によって産生される腫瘍組織の試料から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）前記腫瘍組織の試料を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）前記第１のＴＩＬ集団を含む前記腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、
（ｄ）前記凍結保存された腫瘍消化物を解凍し、前記腫瘍消化物を閉鎖系に添加し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～９日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗ＣＤ３アゴニストビーズもしくは抗体、またはＣＤ３アゴニスト及びＣＤ２８アゴニストビーズもしくは抗体を使用して、前記第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の細胞培養培地中で前記第４のＴＩＬ集団を培養することによって第２の拡張を行い、第５のＴＩＬ集団を産生することであって、前記第２の拡張が、約５～１５日間行われて、前記第５のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第５のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、前記第５のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｇ）ステップ（ｆ）から取得された前記治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）～（ｇ）の各々が、閉鎖した滅菌系で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行、及び／またはステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取することと、を含む、前記方法。

【請求項１９０】

前記急速な第２の拡張が、前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を前記第２の細胞培養培地中で約１～７日の第１の期間培養することによって行われ、前記第１の期間の終了時に、培養物が、複数のサブ培養物に分割され、前記複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３～６日の第２の期間培養され、前記第２の期間の終了時に、前記複数のサブ培養物が組み合わされて、前記増加した数のＴＩＬが提供される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項１９１】

前記第２のＴＩＬ集団または前記第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集する前記ステップが、前記第２のＴＩＬ集団または前記第３のＴＩＬ集団に対して滅菌エレクトロポレーションステップまたはＳＱＺマイクロ流体膜破壊ステップを行うことを含み、前記滅菌エレクトロポレーションステップまたは前記ＳＱＺマイクロ流体膜破壊ステップが、少なくとも２つの遺伝子エディターの移入を媒介する、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項１９２】

前記エレクトロポレーションステップまたは前記ＳＱＺマイクロ流体膜破壊ステップが、前記少なくとも２つの遺伝子エディターの前記移入を媒介する単一の事象からなる、請求項１９１に記載の方法。

【請求項１９３】

前記エレクトロポレーションステップまたは前記ＳＱＺマイクロ流体膜破壊ステップにおいて、前記少なくとも２つの遺伝子エディターの各々が、任意の他の遺伝子エディターの移入とは独立した事象によって個別に移入される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項１９４】

前記エレクトロポレーションステップが、各事象の後の休止期間をさらに含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項１９５】

前記エレクトロポレーションステップまたは前記ＳＱＺマイクロ流体膜破壊ステップが、第１のタンパク質の発現を調節するための第１の遺伝子エディターの移入を媒介する第１の事象、第１の休止期間、第２のタンパク質の発現を調節するための第２の遺伝子エディターの移入を媒介する第２の事象、及び第２の休止期期間を含み、前記第１の休止期間及び前記第２の休止期間が、同じか、または異なる、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項１９６】

前記第１の休止期間及び前記第２の休止期間が、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項１９７】

前記第１の休止期間及び前記第２の休止期間が、前記第３のＴＩＬ集団または前記第４

のＴＩＬ集団を、約３０～４０℃、約５％のＣＯ２でインキュベートすることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１９８】
前記第１の休止期間及び前記第２の休止期間が、独立して、約１０時間～５日である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１９９】
前記第１の休止期間及び前記第２の休止期間が、独立して、約１０時間～３日である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２００】
前記第１の休止期間が、約１～３日である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２０１】
前記第１の休止期間が、約３日である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２０２】
前記第２の休止期間が、約１０時間～１日である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２０３】
前記第２の休止期間が、約１２時間～２４時間である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２０４】
前記第２の休止期間が、約１５時間～約１８時間である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２０５】
前記第２の休止期間が、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を、約１５時間～２３時間、約３０℃でインキュベートすることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２０６】
前記第２の休止期間が、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を、約約１時間、３７℃で、続いて約１５時間～２３時間、約３０℃でインキュベートすることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２０７】
前記第２の休止期間が、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を、約約１時間、３７℃で、続いて約１５時間～２２時間、約３０℃でインキュベートすることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２０８】
前記第１の休止期間が、約３日であり、前記第２の休止期間が、約１０～１６時間である、請求項２０７に記載の方法。
【請求項２０９】
前記少なくとも２つの遺伝子エディターが、第１のタンパク質の発現を調節するための第１のＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む第１の遺伝子エディターと、第２のタンパク質の発現を調節するための第２のＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む第２の遺伝子エディターと、を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２１０】
前記エレクトロポレーションステップまたは前記ＳＱＺマイクロ流体膜破壊ステップが、前記第１のＴＡＬＥヌクレアーゼ系の移入を媒介する第１の事象、第１の休止期間、前記第２のＴＡＬＥヌクレアーゼ系の移入を媒介する第２の事象、及び第２の休止期期間を含み、前記第１の休止期間及び前記第２の休止期間が、同じか、または異なる、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２１１】
前記第１の休止期間及び前記第２の休止期間が、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることを含む、先行請

求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２１２】
前記第１の休止期間及び前記第２の休止期間が、前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を、約３０～４０℃、約５％のＣＯ２でインキュベートすることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２１３】
前記第１の休止期間及び前記第２の休止期間が、独立して、約１０時間～５日である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２１４】
前記第１の休止期間及び前記第２の休止期間が、独立して、約１０時間～３日である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２１５】
前記第１の休止期間が、約１～３日である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２１６】
前記第１の休止期間が、約３日である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２１７】
前記第２の休止期間が、約１０時間～１日である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２１８】
前記第２の休止期間が、約１２時間～２４時間である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２１９】
前記第２の休止期間が、約１５時間～約１８時間である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２２０】
前記第２の休止期間が、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を、約１５時間～２３時間、約３０℃でインキュベートすることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２２１】
前記第２の休止期間が、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を、約約１時間、３７℃で、続いて約１５時間～２３時間、約３０℃でインキュベートすることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２２２】
前記第２の休止期間が、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を、約約１時間、３７℃で、続いて約１５時間～２２時間、約３０℃でインキュベートすることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２２３】
前記第１の休止期間が、約３日であり、前記第２の休止期間が、約１０～１６時間である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２２４】
前記第２のＴＩＬ集団または前記第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集する前記ステップが、前記第２のＴＩＬ集団または前記第３のＴＩＬ集団に対して滅菌エレクトロポレーションステップまたはＳＱＺマイクロ流体膜破壊ステップを行うことを含み、前記滅菌エレクトロポレーションステップまたは前記ＳＱＺマイクロ流体膜破壊ステップが、少なくとも１つの遺伝子エディターの移入を媒介する、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２２５】
前記遺伝子エディターが、前記少なくとも１つのタンパク質の発現を調節するためのＴＡＬＥヌクレアーゼ系である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２２６】

前記ＴＡＬＥヌクレアーゼ系が、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＢＬ－Ｂ、及び／またはＬＡＧ－３の発現を調節する、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項２２７】

前記遺伝子エディターが、ＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４の発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項２２８】

前記遺伝子エディターが、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項２２９】

前記遺伝子エディターが、ＰＤ－１及びＣＩＳＨの発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項２３０】

前記遺伝子エディターが、ＰＤ－１及びＣＢＬ－Ｂの発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項２３１】

前記遺伝子エディターが、ＰＤ－１及びＴＩＧＩＴの発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項２３２】

前記遺伝子エディターが、ＣＴＬＡ－４及びＬＡＧ－３の発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項２３３】

前記遺伝子エディターが、ＣＴＬＡ－４及びＣＩＳＨの発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項２３４】

前記遺伝子エディターが、ＣＴＬＡ－４及びＣＢＬ－Ｂの発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項２３５】

前記遺伝子エディターが、ＣＩＳＨ及びＣＢＬ－Ｂの発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項２３６】

前記遺伝子エディターが、ＣＩＳＨ及びＴＩＧＩＴの発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項２３７】

前記遺伝子エディターが、ＰＤ－１の発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項２３８】

前記遺伝子エディターが、ＣＴＬＡ－４の発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項２３９】

前記遺伝子エディターが、ＬＡＧ－３の発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項２４０】

前記遺伝子エディターが、ＣＩＳＨの発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項２４１】

前記遺伝子エディターが、ＣＢＬ－Ｂの発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項２４２】

前記遺伝子エディターが、ＴＩＧＩＴの発現を調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項２４３】
前記方法が、前記遺伝子編集ステップの後、及び前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を培養する前記ステップの前に、前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を休止させるステップをさらに含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２４４】
前記休止ステップが、前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を、約３０～４０℃、約５％のＣＯ２でインキュベートすることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２４５】
前記方法が、前記遺伝子編集ステップの後、及び前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を培養する前記ステップの前に、前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を約１日間休止させるステップをさらに含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２４６】
前記方法が、前記遺伝子編集ステップの後、及び前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を培養する前記ステップの前に、前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を約１２時間～２４時間休止させるステップをさらに含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２４７】
前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を休止させる前記ステップが、前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を約１５時間～１８時間休止させることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２４８】
前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を休止させる前記ステップが、前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を約１５時間休止させることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２４９】
前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を休止させる前記ステップが、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２５０】
前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を休止させる前記ステップが、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を、約１５時間～２３時間、約３０℃でインキュベートすることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２５１】
前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を休止させる前記ステップが、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１５時間～２３時間、約３０℃でインキュベートすることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２５２】
前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を休止させる前記ステップが、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第３のＴＩＬ集団または前記第４のＴＩＬ集団を、約１時間、３７℃で、続いて約１５時間～２２時間、約３０℃でインキュベートすることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２５３】
前記第１のタンパク質及び前記第２のタンパク質が、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂからなる群から独立して選択され、ただし、前記第１のタンパク質及び前記第２のタンパク質が異なることを条件とする、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項２５４】
前記第１のタンパク質及び前記第２のタンパク質が、ＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４からなる群から選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２５５】
前記第１のタンパク質及び前記第２のタンパク質が、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３からなる群から選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２５６】
前記第１のタンパク質及び前記第２のタンパク質が、ＰＤ－１及びＣＩＳＨからなる群から選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２５７】
前記第１のタンパク質及び前記第２のタンパク質が、ＰＤ－１及びＣＢＬ－Ｂからなる群から選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２５８】
前記第１のタンパク質及び前記第２のタンパク質が、ＰＤ－１及びＴＩＧＩＴからなる群から選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２５９】
前記第１のタンパク質及び前記第２のタンパク質が、ＣＴＬＡ－４及びＬＡＧ－３からなる群から選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２６０】
前記第１のタンパク質及び前記第２のタンパク質が、ＣＴＬＡ－４及びＣＩＳＨからなる群から選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２６１】
前記第１のタンパク質及び前記第２のタンパク質が、ＣＴＬＡ－４及びＣＢＬ－Ｂからなる群から選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２６２】
前記第１のタンパク質及び前記第２のタンパク質が、ＬＡＧ－３及びＣＩＳＨからなる群から選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２６３】
前記第１のタンパク質及び前記第２のタンパク質が、ＬＡＧ－３及びＣＢＬ－Ｂからなる群から選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２６４】
前記第１のタンパク質及び前記第２のタンパク質が、ＣＩＳＨ及びＣＢＬ－Ｂからなる群から選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２６５】
前記第１のタンパク質が、ＰＤ－１であり、前記第２のタンパク質が、ＣＴＬＡ－４である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２６６】
前記第１のタンパク質が、ＣＴＬＡ－４であり、前記第２のタンパク質が、ＰＤ－１である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２６７】
前記第１のタンパク質が、ＰＤ－１であり、前記第２のタンパク質が、ＬＡＧ－３である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２６８】
前記第１のタンパク質が、ＬＡＧ－３であり、前記第２のタンパク質が、ＰＤ－１である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２６９】
前記第１のタンパク質が、ＰＤ－１であり、前記第２のタンパク質が、ＣＩＳＨである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２７０】
前記第１のタンパク質が、ＣＩＳＨであり、前記第２のタンパク質が、ＰＤ－１である

、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２７１】
前記第１のタンパク質が、ＰＤ－１であり、前記第２のタンパク質がＣＢＬ－Ｂである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２７２】
前記第１のタンパク質が、ＣＢＬ－Ｂであり、前記第２のタンパク質が、ＰＤ－１である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２７３】
前記第１のタンパク質が、ＰＤ－１であり、前記第２のタンパク質が、ＴＩＧＩＴである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２７４】
前記第１のタンパク質が、ＴＩＧＩＴであり、前記第２のタンパク質が、ＰＤ－１である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２７５】
前記第１のタンパク質が、ＣＴＬＡ－４であり、前記第２のタンパク質が、ＬＡＧ－３である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２７６】
前記第１のタンパク質が、ＬＡＧ－３であり、前記第２のタンパク質が、ＣＴＬＡ－４である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２７７】
前記第１のタンパク質が、ＣＴＬＡ－４であり、前記第２のタンパク質が、ＣＩＳＨである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２７８】
前記第１のタンパク質が、ＣＩＳＨであり、前記第２のタンパク質が、ＣＴＬＡ－４である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２７９】
前記第１のタンパク質が、ＣＴＬＡ－４であり、前記第２のタンパク質がＣＢＬ－Ｂである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２８０】
前記第１のタンパク質が、ＣＢＬ－Ｂであり、前記第２のタンパク質が、ＣＴＬＡ－４である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２８１】
前記第１のタンパク質が、ＬＡＧ－３であり、前記第２のタンパク質が、ＣＩＳＨである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２８２】
前記第１のタンパク質が、ＣＩＳＨであり、前記第２のタンパク質が、ＬＡＧ－３である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２８３】
前記第１のタンパク質が、ＬＡＧ－３であり、前記第２のタンパク質がＣＢＬ－Ｂである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２８４】
前記第１のタンパク質が、ＣＢＬ－Ｂであり、前記第２のタンパク質が、ＬＡＧ－３である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２８５】
前記第１のタンパク質が、ＣＩＳＨであり、前記第２のタンパク質がＣＢＬ－Ｂである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２８６】
前記第１のタンパク質が、ＣＢＬ－Ｂであり、前記第２のタンパク質が、ＣＩＳＨである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２８７】

前記第１のタンパク質または前記第２のタンパク質が、ＰＤ－１である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２８８】
前記第１のタンパク質または前記第２のタンパク質が、ＣＴＬＡ－４である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２８９】
前記第１のタンパク質または前記第２のタンパク質が、ＬＡＧ－３である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２９０】
前記第１のタンパク質または前記第２のタンパク質が、ＣＩＳＨである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２９１】
前記第１のタンパク質または前記第２のタンパク質が、ＣＢＬ－Ｂである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２９２】
前記第１のタンパク質または前記第２のタンパク質が、ＴＩＧＩＴである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２９３】
前記第１の遺伝子エディターが、前記第１のタンパク質の発現を下方調節し、前記第２の遺伝子エディターが、前記第２のタンパク質の発現を下方調節する、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２９４】
前記増加した数のＴＩＬが、治療的ＴＩＬ集団を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２９５】
前記抗原提示細胞（ＡＰＣ）が、ＰＢＭＣである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２９６】
前記ＰＢＭＣが、放射線照射されており、同種異系である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２９７】
前記抗原提示細胞が、人工抗原提示細胞である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２９８】
前記ＩＬ－２濃度が、約１０，０００ＩＵ／ｍＬ～約５，０００ＩＵ／ｍＬである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２９９】
前記第１の細胞培養培地及び／または前記第２の細胞培養培地が、４－１ＢＢアゴニスト及び／またはＯＸ４０アゴニストをさらに含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３００】
前記患者が、ＩＣＩ治療、抗ＶＥＧＦ治療、化学療法治療、またはそれらの組み合わせに対してナイーブである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３０１】
前記患者が、任意のがん治療に対してナイーブである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３０２】
前記患者が、第１選択ＩＣＩ治療及び／または標準治療を受ける、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３０３】
前記患者が、第２選択ＩＣＩ治療及び／または標準治療を受ける、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項３０４】
前記患者が、前記がん治療を受けるか、または前記維持療法を再開し、進行性疾患を示した後に、解凍のステップ及び後続のステップが行われる、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３０５】
前記患者が、ステップ（ａ）の開始時にウォッシュアウト期間にある、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３０６】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団の投与を必要とするがん患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することによって前記がん患者を治療する方法であって、前記がん患者が、少なくとも１つの前の療法を受けており、前記少なくとも１つの前の療法の時またはその後にがん進行を示し、前記ＴＩＬ集団の取得が、多病変試料採取を含み、前記ＴＩＬ集団が、前記がん患者が前記少なくとも１つの前の療法を受ける前に採取された腫瘍試料から作製され、前記ＴＩＬ集団が、前記がん患者が前記少なくとも１つの前の療法の時またはその後にがん進行を示した後に、対象または前記患者に投与される、前記方法。
【請求項３０７】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団の投与を必要とするがん患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することによって前記がん患者を治療する方法であって、前記がん患者が、少なくとも１つの前の療法を受けており、前記少なくとも１つの前の療法の時またはその後にがん進行を示し、前記ＴＩＬ集団の取得が、多病変試料採取を含み、
前記ＴＩＬ集団が、前記がん患者が先行請求項のいずれかに記載の少なくとも１つの前の療法を受ける前に作製され、
前記ＴＩＬ集団が、前記がん患者が前記少なくとも１つの前の療法の時またはその後にがん進行を示した後に、対象または前記患者に投与される、前記方法。
【請求項３０８】
前記腫瘍試料を採取する時点で、前記がん患者が、任意のがん治療に対してナイーブである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３０９】
前記腫瘍試料を採取する時点で、前記患者が、ＩＣＩ治療、抗ＶＥＧＦ治療、または化学療法治療に対してナイーブである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３１０】
前記腫瘍試料を採取する時点で、前記患者が、ステップ（ａ）の時点で中断されている維持療法を受けており、前記維持療法が、ステップ（ａ）の後に再開される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３１１】
前記腫瘍試料を採取する時点で、前記患者が、ステップ（ａ）の開始時にウォッシュアウト期間にある、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３１２】
前記患者が、第１選択ＩＣＩ治療及び／または標準治療を受けるか、または受けることになる、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３１３】
前記患者が、第２選択ＩＣＩ治療及び／または標準治療を受けるか、または受けることになる、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３１４】
前記がん患者に、ＩＣＩを投与することをさらに含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３１５】
前記ＩＣＩが、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＢＡＦＦ（

ＢＲ３）、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲからなる群から選択される遺伝子の阻害剤である、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項３１６】

前記ＴＩＬ集団を前記患者に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項３１７】

前記骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与するステップを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項３１８】

前記骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、及びフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項３１９】

前記シクロホスファミドが、メスナとともに投与される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項３２０】

前記患者への前記ＴＩＬ集団の投与の翌日に開始するＩＬ－２レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項３２１】

前記患者への前記ＴＩＬ集団の投与と同じ日に開始するＩＬ－２レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項３２２】

前記ＩＬ－２レジメンが、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される、６００，０００もしくは７２０，０００ＩＵ／ｋｇのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを含む高用量ＩＬ－２レジメンである、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項３２３】

先行請求項のいずれかに記載の方法によって製造された増加した数の腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）または治療的ＴＩＬ集団。

【請求項３２４】

先行請求項のいずれかに記載の増加した数のＴＩＬまたは治療的ＴＩＬ集団と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

【請求項３２５】

先行請求項のいずれかに記載の方法を使用して製造された、ＴＩＬ集団。

【請求項３２６】

請求項３２５に記載のＴＩＬ集団を含む、薬学的組成物。

【請求項３２７】

ＩＣＩをさらに含む、請求項３２６に記載の薬学的組成物。

【請求項３２８】

前記ＩＣＩが、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＢＡＦＦ（

ＢＲ３）、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲからなる群から選択される遺伝子の阻害剤である、請求項３２７に記載の薬学的組成物。

【請求項３２９】

がん患者に先行請求項のいずれかに記載のＴＩＬ集団または先行請求項のいずれかに記載の薬学的組成物を投与することによって、前記がん患者を治療する方法であって、前記がん患者が、少なくとも１つの前の療法を受けており、前記がん患者が、前記少なくとも１つの前の療法の時またはその後に、がん進行を示す、前記方法。

【誤訳訂正４】

【訂正対象書類名】図面

【訂正対象項目名】全図

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【図面】

【図１】

プロセス２Ａ：ステップＡ～Ｅから約２２日

１．ステップＡ

患者の腫瘍試料を取得する

２．ステップＢ

断片化及び第１の拡張

３日～１４日

３．ステップＣ

第１の拡張から第２の拡張へと移行

ストレージ及び閉鎖系なし

４．ステップＤ

第２の拡張

ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞

閉鎖系

５．ステップＥ

ステップＤからのＴＩＬを採取する

６．ステップＦ

最終製剤化及び／または注入バッグに移す

（任意選択で凍結保存）

【図２Ａ】

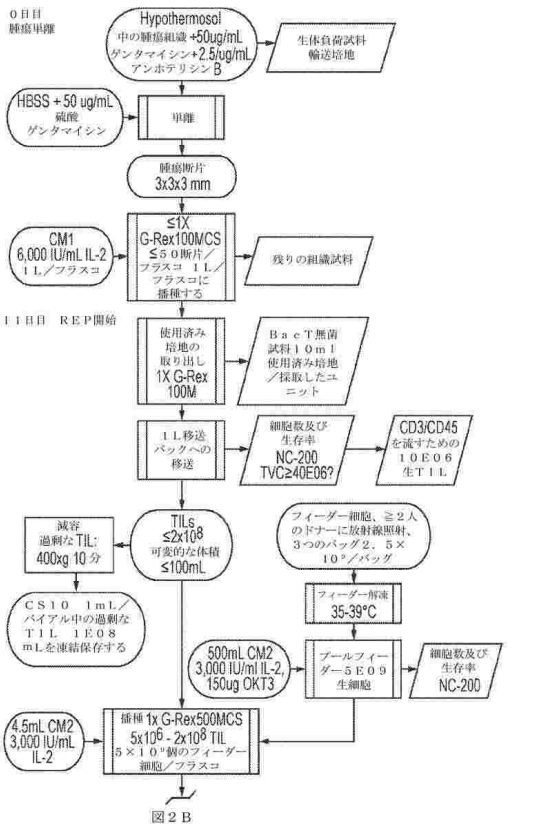
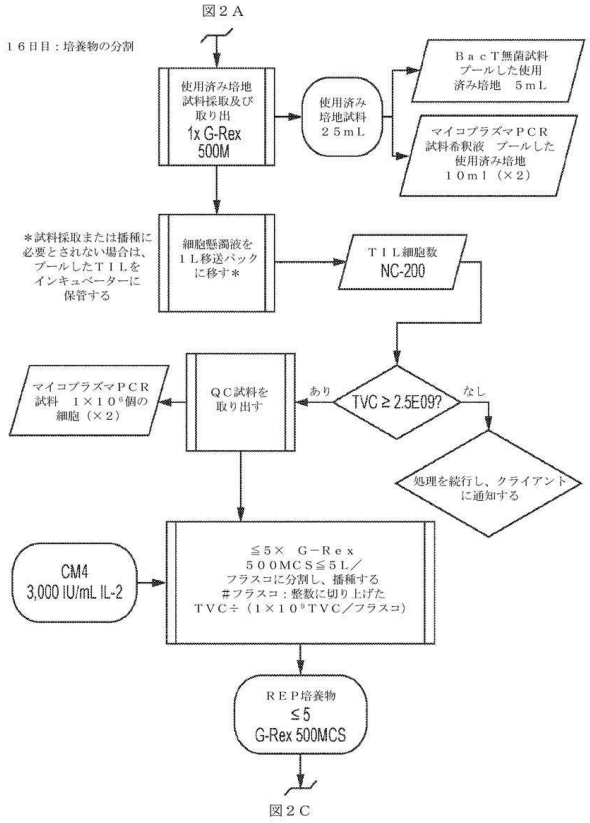
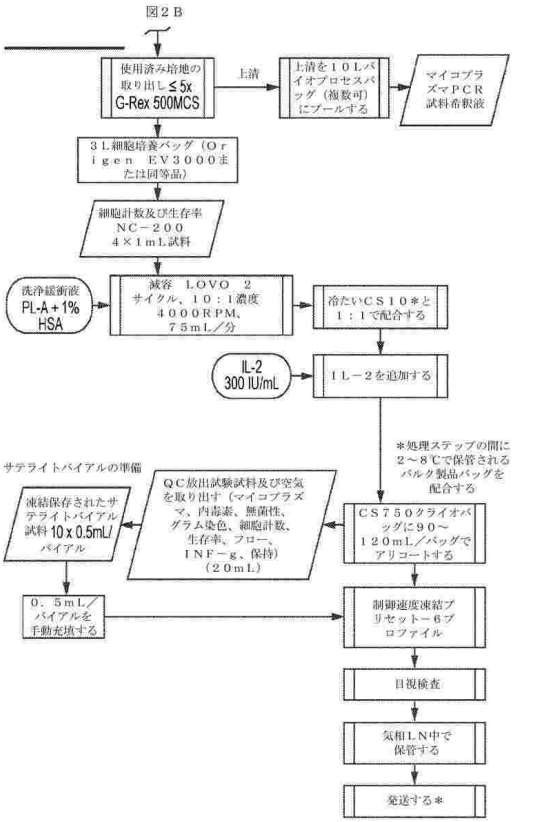


図２Ｂ

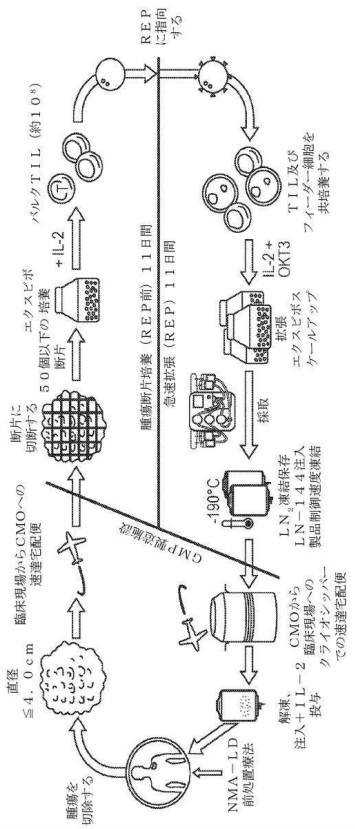
【図２Ｂ】


図２Ａ
１６日目：培養物の分割
使用済み培地
試料採取及び
取り出し
1x G-Rex
500M
使用済み
培地試料
２５ｍＬ
ＢａｃＴ無菌試料
プールした使用
済み培地　５ｍＬ
マイコプラズマＰＣＲ
試料希釈液　プールした
使用済み培地
１０ｍｌ（×２）
＊試料採取または播種に
必要とされない場合は、
プールしたＴＩＬを
インキュベーターに
保管する
細胞懸濁液を
１Ｌ移送パック
に移す＊
ＴＩＬ細胞数
NC-200
マイコプラズマＰＣＲ
試料　１×１０⁶個の
細胞（×２）
ＱＣ試料を
取り出す
あり
TVC ≥ 2.5E09?
なし
処理を続行し、クライアント
に通知する
CM4
3,000 IU/mL IL-2
≦5×　G－Ｒｅｘ
５００ＭＣＳ≦５Ｌ／
フラスコに分割し、播種する
＃フラスコ：整数に切り上げた
ＴＶＣ÷（１×１０⁹ＴＶＣ／フラスコ）
ＲＥＰ培養物
≦5
G-Rex 500MCS
図２Ｃ

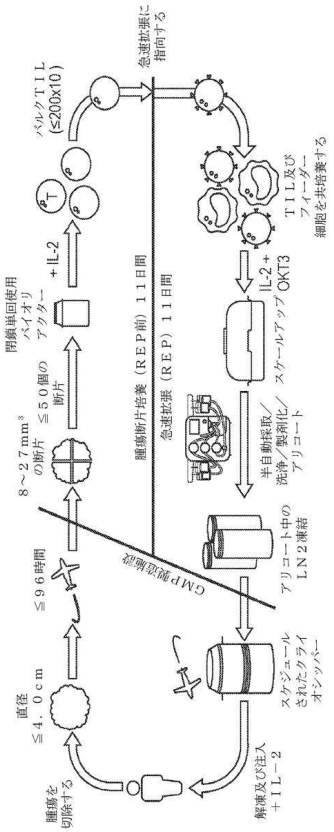
【図２Ｃ】


図２Ｂ
使用済み培地の
取り出し≦5x
G-Rex 500MCS
上清
上清を１０Ｌバ
イオプロセスバ
ッグ（複数可）
にプールする
マイコプラ
ズマＰＣＲ
試料希釈液
３Ｌ細胞培養バッグ（Ｏｒ
ｉｇｅｎ　ＥＶ３０００ま
たは同等品）
細胞計数及び生存率
ＮＣ－２００
４×１ｍＬ試料
洗浄緩衝液
PL-A + 1%
HSA
減容　ＬＯＶＯ　２
サイクル、１０：１濃度
４０００ＲＰＭ、
７５ｍＬ／分
冷たいＣＳ１０＊と
１：１で配合する
IL-2
300 IU/mL
１Ｌ－２を追加する
＊処理ステップの間に
２～８℃で保管され
バルク製品バッグを
配合する
サテライトバイアルの準備
凍結保存されたサ
テライトバイアル
試料 10 x 0.5mL/
バイアル
ＱＣ放出試験試料及び空気
を取り出す（マイコプラズ
マ、内毒素、無菌性、
グラム染色、細胞計数、
生存率、フロー、
ＩＮＦ－ｇ、保持）
（２０ｍＬ）
ＣＳ７５０クライオバ
ッグに９０～
１２０ｍＬ／バッグで
アリコートする
０．５ｍＬ／
バイアルを
手動充填する
制御速度凍結プ
リセット－６プ
ロファイル
目視検査
気相ＬＮ中で
保管する
発送する＊

【図３】


ＲＥＰ
に指向
する
バルクＴＩＬ（約10⁹）
＋IL-2
エクスビボ
５０個以下の
断片
培養
腫瘍断片培養（ＲＥＰ前）１１日間
急速拡張（ＲＥＰ）１１日間
ＴＩＬ及び
フィーダー細胞を
共培養する
IL-2+
OKT3
拡張
エクスビボ
ケールアップ
採取
-190°C
LN₂凍結保存
ＬＮ－１４４注入
製品制御速度凍結
GMP施設施設
臨床現場からCMOへの
速達宅配便
断片に
切断する
直径
≦４．０ｃｍ
腫瘍を
切除する
NMA－ＬＤ
前処置療法
解凍、
注入＋ＩＬ－２
臨床現場への
クライオシッパー
での速達宅配便
CMOから

【図４】


バルクＴＩＬ
(≤200x10⁹)
急速拡張に
指向する
＋IL-2
閉鎖単回使用
バイオリ
アクター
腫瘍断片培養（ＲＥＰ前）１１日間
急速拡張（ＲＥＰ）１１日間
ＴＩＬ及び
フィーダー
細胞を共培養する
IL-2 +
OKT3
スケールアップ
８～２７mm³
の断片
≦５０個の
断片
半自動採取／
洗浄／製剤化／
アリコート
GMP施設施設
≦９６時間
アリコート中の
ＬＮ２凍結
直径
≦４．０ｃｍ
腫瘍を
切除する
スケジュール
されたクライ
オシッパー
解凍及び注入
＋ＩＬ－２

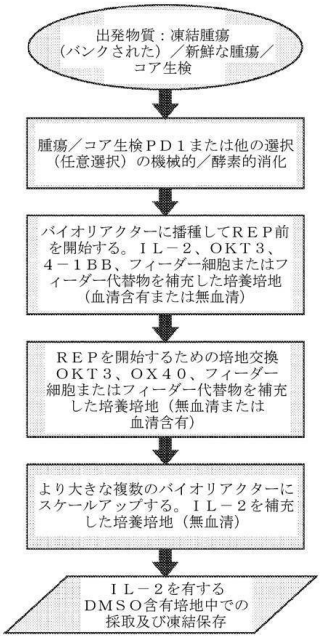
【図５】

プロセス１Ｃ：ステップＡ～Ｅについて４３～５５日	プロセス２Ａ：ステップＡ～Ｅから約２２日
１．ステップＡ 患者の腫瘍試料を取得する	１．ステップＡ 患者の腫瘍試料を取得する
２．ステップＢ 断片化及び第１の拡張 １１日～２１日	２．ステップＢ 断片化及び第１の拡張 ３日～１４日
３．ステップＣ 第１の拡張から第２の拡張へと移行 選択までの任意選択のストレージ	３．ステップＣ 第１の拡張から第２の拡張へと移行 ストレージ及び閉鎖系なし
４．ステップＤ 第２の拡張 ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、抗原提示フィーダー細胞 任意選択で１回以上繰り返す	４．ステップＤ 第２の拡張 ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、抗原提示フィーダー細胞 閉鎖系
５．ステップＥ ステップＤからのＴＩＬを採取する	５．ステップＥ ステップＤからのＴＩＬを採取する 閉鎖系
６．ステップＦ 最終製剤化及び／または注入バッグに移す	６．ステップＦ 最終製剤化及び／または注入バッグに移す （任意選択で凍結保存する）

【図６】

プロセスステップ	プロセス１Ｃ実施形態	プロセス２Ａ実施形態	利点
ＲＥＰ前	• １０個のＧＲＥＸ－１０フラスコ当たり４個の断片 • １１～２１日間	• １つのＧＲＥＸ－１００Ｍフラスコ当たり４０個の断片 • １１日間	• フラスコ当たりの腫瘍断片の増加 • 培養時間の短縮 • ステップ数の削減 • 閉鎖系に適している
ＲＥＰ前からＲＥＰへの移行	• ＲＥＰ前ＴＩＬを、選択のために表現型決定されるまで凍結し、次いで解凍してＲＥＰに進む（－３０日目） • ＲＥＰは、≧４０×10^6ＴＩＬを必要とする	• ＲＥＰ前ＴＩＬは、１１日目に直接ＲＥＰに移動する • ＲＥＰは、２５～２００×10^6ＴＩＬを必要とする	• ＲＥＰ前からＲＥＰプロセスの短縮 • ステップ数の削減 • 表現型決定選択の排除 • 閉鎖系に適している
ＲＥＰ	• ＲＥＰ　０日目に６つのＧＲＥＸ－１００Ｍフラスコ • ＲＥＰ　０日目に５×10^6ＴＩＬ及び５×10^6ＰＢＭＣフィーダー／フラスコ • ＲＥＰ　７日目に１８～３６個のフラスコに分割する • １４日間	• １１日目に１つのＧＲＥＸ－５００Ｍフラスコ • １１日目に２５～２００×10^6ＴＩＬ及び５×10^6ＰＢＭＣフィーダー • １６日目に６個以下のＧＲＥＸ－５００Ｍフラスコに分割する • ＲＥＰ期間の短縮	• ステップ数の削減 • ＲＥＰ期間の短縮 • フラスコ間のＴＩＬの閉鎖系移送 • 閉鎖系培地交換
採取	• 遠心分離によって採取したＴＩＬ	• ＬＯＶＯ自動細胞洗浄系を介して採取したＴＩＬ	• ステップ数の削減 • 自動細胞洗浄 • 閉鎖系 • 洗浄中の製品損失の低減
最終製剤化	• Hypothermosol中の新鮮な製品 • 単回注入バッグ • 限定された発送安定性	• LN_2で保管されたＰｌａｓｍａＬｙｔｅ－Ａ＋１％のＨＳＡ及びＣＳ１０中の凍結保存産物 • 複数のアリコート • より長い発送安定性	• 発送の柔軟性 • 柔軟な患者スケジューリング • よりタイムリーな放出試験
全体の推定プロセス時間	• ４３～５５日	• ２２日	• 患者へのより速い転向

【図７】



【図８Ａ】

プロセス２Ａ：ステップＡ～Ｅから約２２日	プロセスＧＥＮ３：ステップＡ～Ｅから約１４～１８日
ステップＡ 患者腫瘍試料を取得する（任意選択で、ステップＢ前に凍結され得る）	ステップＡ 患者腫瘍試料を取得する（任意選択で、ステップＢ前に凍結され得る）
ステップＢ 第１の拡張（ＩＬ－２を含む培地を用いて約３日～１４日間成長させた容器当たり少なくとも４０個の断片への物理的断片化）	ステップＢ プライミングによる第１の拡張（ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む培地を用いて約１日～７日間成長させた容器当たり最大６０個の断片の物理的断片化）
ステップＣ 第１の拡張から第２の拡張への移行（ステップＢのＴＩＬは、１１日目にステップＤ、任意選択でステップＢに直接移動する）	ステップＣ プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行（ステップＢのＴＩＬは、７日目にステップＤに直接移動する）
ステップＤ 第２の拡張（密閉容器内にＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地において成長したＴＩＬ）	ステップＤ 急速な第２の拡張（ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び２倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地において成長したＴＩＬ、１０～１１日目にスケールアップし、追加のＩＬ－２を追加する）
ステップＥ ステップＤからのＴＩＬを採取する（閉鎖系を介して採取されるＴＩＬ）	ステップＥ ステップＤからのＴＩＬを採取する
ステップＦ 最終製剤及び／または注入バッグに移す（任意選択で凍結保存する）	ステップＦ 最終製剤及び／または注入バッグに移す（任意選択で凍結保存する）

【図８Ｂ】

プロセスＧＥＮ３：ステップＡ～Ｅから約１４～１８日間

ステップＡ
患者腫瘍試料を取得する（任意選択で、ステップＢ前に凍結され得る）

ステップＢ
プライミングによる第１の拡張（ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む培地を用いて約１日～７日間成長させた容器当たり最大６０個の断片の物理的断片化）

ステップＣ
プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行（ステップＢのＴＩＬは、７日目にステップＤに直接移動する）

ステップＤ
急速な第２の拡張（ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び２倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地において成長したＴＩＬ、１０～１１日目にスケールアップし、追加のＩＬ－２を追加する）

ステップＥ
ステップＤからのＴＩＬを採取する

ステップＦ
最終製剤化及び／または注入バッグに移す（任意選択で凍結保存する）

【図８Ｃ】

実施形態ＧＥＮ３．０：ステップＡ～Ｅから約１４～１８日	実施形態ＧＥＮ３．１対照：ステップＡ～Ｅから約１４～１８日	実施形態ＧＥＮ３．１試験／Ｆ：ステップＡ～Ｅから約１４～１８日
ステップＡ 患者腫瘍試料を取得する（任意選択で、ステップＢ前に凍結され得る）	ステップＡ 患者腫瘍試料を取得する（任意選択で、ステップＢ前に凍結され得る）	ステップＡ 患者腫瘍試料を取得する（任意選択で、ステップＢ前に凍結され得る）
ステップＢ プライミングによる第１の拡張（ＩＬ－２を含む培地による約１日～７／８日間成長させた容器当たり最大６０個の断片の物理的断片化）	ステップＢ プライミングによる第１の拡張（ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む培地による約１日～７／８日間成長させた容器当たり最大６０個の断片の物理的断片化）	ステップＢ プライミングによる第１の拡張（ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む培地による約１日～７／８日間成長させた容器当たり最大６０個の断片の物理的断片化）
ステップＣ プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行（ステップＢのＴＩＬは、７／８日目にステップＤに直接移動する）	ステップＣ プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行（ステップＢのＴＩＬは、７／８日目にステップＤに直接移動する）	ステップＣ プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行（ステップＢのＴＩＬは、７／８日目にステップＤに直接移動する）
ステップＤ IL-2) 急速な第２の拡張（ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地において成長したＴＩＬ、１０～１１日目にスケールアップし、追加のＩＬ－２を追加する）	ステップＤ 急速な第２の拡張（ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地において成長したＴＩＬ、１０～１１日目にスケールアップし、追加のＩＬ－２を追加する）	ステップＤ 急速な第２の拡張（ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び２倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地において成長したＴＩＬ、１０～１１日目にスケールアップし、追加のＩＬ－２を追加する）
ステップＥ ステップＤからのＴＩＬを採取する	ステップＥ ステップＤからのＴＩＬを採取する	ステップＥ ステップＤからのＴＩＬを採取する
ステップＦ 最終製剤及び／または注入バッグに移す（任意選択で凍結保存する）	ステップＦ 最終製剤及び／または注入バッグに移す（任意選択で凍結保存する）	ステップＦ 最終製剤及び／または注入バッグに移す（任意選択で凍結保存する）

【図８Ｄ】

修正したＧｅｎ２様プロセス：ステップＡ～Ｅから約２２日

ステップＡ
患者の腫瘍試料を取得する（任意選択で、ステップＢ前に冷凍され得、任意選択で、腫瘍試料は、コア／小生検であり得る）

ステップＢ１
初期培養
容器当たり最大６０個の腫瘍断片または最大１０個のコア／小生検の物理的断片化、ＩＬ－２を含む成長培地中で３日間成長したＴＩＬ

ステップＢ２
プライミングによる第１の拡張
ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地中で８日間成長したＴＩＬ）

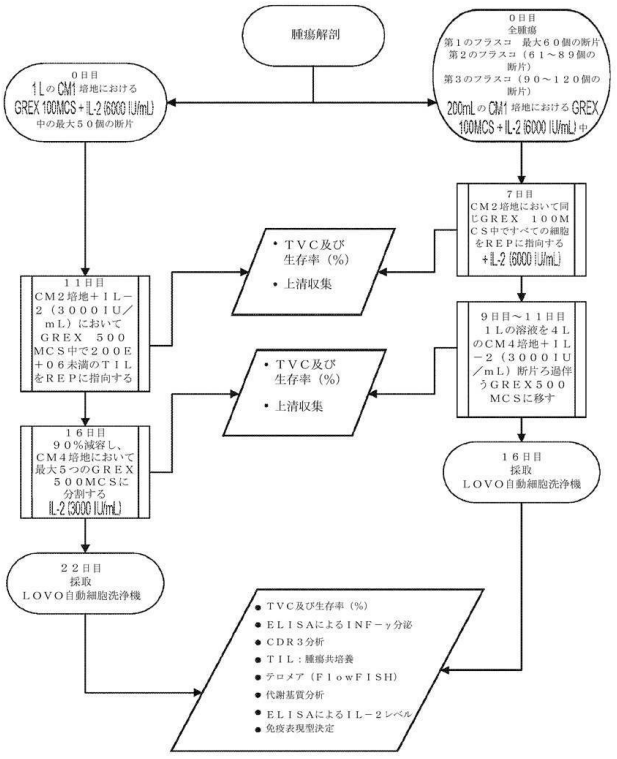
ステップＣ
プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行（ステップＢのＴＩＬは、１１日目にステップＤに直接移動する）

ステップＤ
急速な第２の拡張（ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び５０倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地において成長したＴＩＬ、１６日目にスケールアップし、追加のＩＬ－２を追加する）

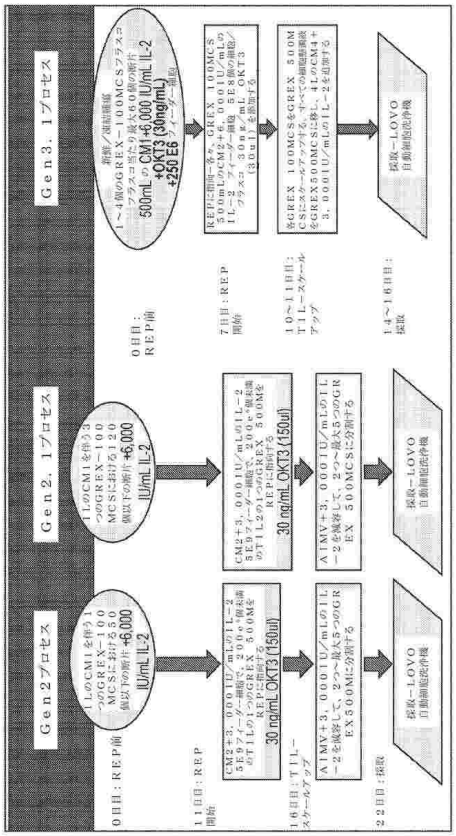
ステップＥ
ステップＤからのＴＩＬを採取する

ステップＦ
最終製剤及び／または注入バッグに移す（任意選択で凍結保存する）

【図９】



【図１０】



【図１１】

Zアップ	Gen 2	Gen 2.1	最適化されたGen 3．0
REP前－0日目	50個以下の断片／1つのG－Rex 100MCS－11日	180個以下の断片／3つのG－Rex、事前配合されたCM1加温培地 100MCS－11日	新鮮または凍結腫瘍 1つのG－Rex当たり30以下の断片から最大60の断片を有する全腫瘍 100MCS（最大4つのG－Rex）、事前に配合された加温培地－7日 REP前，フィーダー2．5 E8個の細胞 +OKT-3 (30ng/mL)
REP開始	REPに誘導する－11日目－ <200 E6 TIL 1G-Rex 500MCS	REPに誘導する－11日目－ 1つのG－Rex 500MCS中の事前配合されたCM2加温培地	REPに指向－7日目－すべての細胞TIL－同じG－Rex 100MCS（100MCS 最大4つのGREX）、標準培地または合成培地（無血清）、追加のフィーダー5 E8個の細胞 +OKT-3 (30ng/mL)
TILの増殖または スケールアップ	1～5つのG－REX 500MCS 16日目に分割する	2～5つのG－REX 500MCS 事前配合されたCM4加温培地 16日目に分割する	G－REX 100MCSから、TIL懸濁液をG－REX 500MCS、最大4つのGREX 500MCSに移す－標準培地または合成培地（無血清）
採取	22日目に採取する、 LOVO自動細胞洗浄機	22日目に採取する、 LOVO自動細胞洗浄機 （5回の洗浄サイクル）	14日目または16日目に採取する、 LOVO自動細胞洗浄機（5回の洗浄サイクル）
最終製剤	凍結保存した製品 LN$_2$中の3001U/m1のIL2－CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品 LN$_2$中の3001U/m1のIL2－CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品 LN$_2$中の3001U/m1のIL2－CS10、複数のアリコート
プロセス期間	22日	22日	16日

【図１２】

プロセス日	条件	Gen 3.1	
0日目－REP開始前	培地CM1	500 mL	
	IL-2 (6000 IU/mL)	+	
	OKT-3 (30ng/mL)	+	
	フィーダー (250 E+06)	+	

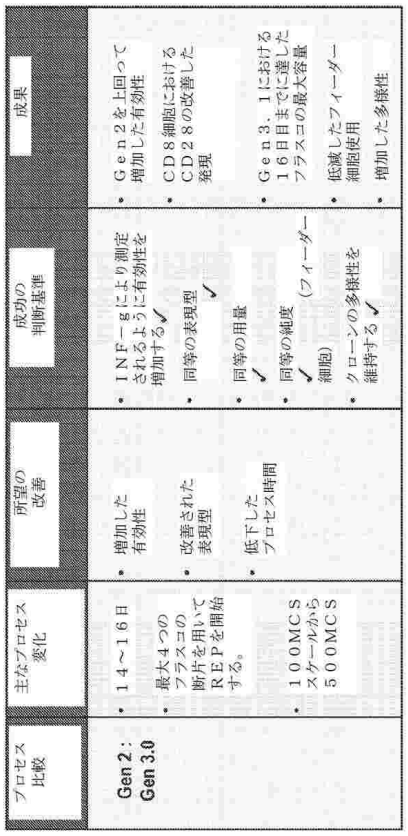
プロセス日	条件	Gen 3.1	
7日目－REP開始	培地CM2	500 mL	
	IL-2 (6000 IU/mL)	+	
	7日目に追加されたOKT-3 (30ng/mL)	+	
	7日目に追加されたフィーダー	500 E06	
	目数での総フィーダー	750 E+06	

プロセス日	条件	Gen 3.1	
9～11日目－スケールアップ	G－REX100MCSから、TIL懸濁液を1つのG－REX500MCS（最大3つのGREX 500MCS）に移す	あり	
16日目－採取	LOVO自動細胞洗浄機	あり	

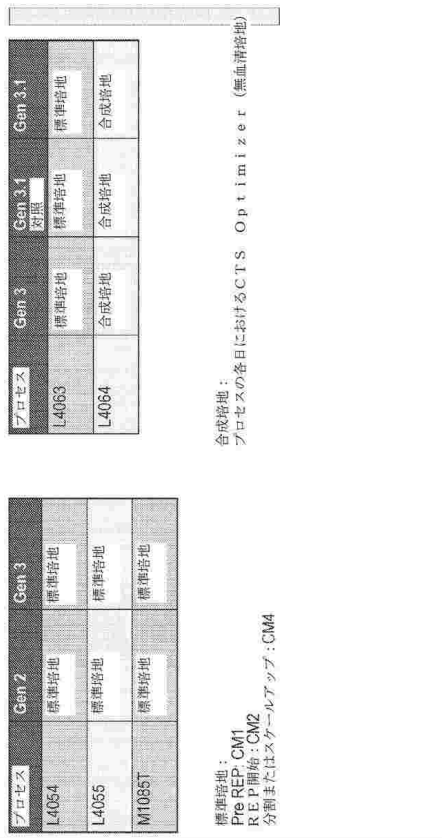
【図１３】

プロセス比較	主なプロセス変化	利点
Gen 2：Gen 2.1	• 1つのプラスコの代わりに2つのプラスコを用いたプロセスを開始する • 2つのG－Rex500MCSプラスコ間のREP開始のフィーダー層に分割する • 使用前に培地を事前に製剤化し、加温する	• 増加したTILレパートリーを用いた最終細胞計数（用量）の倍加の可能性。 • プロセス中のプロセス冗長性
Gen 2.1：Gen 3.1	• 新鮮または凍結腫瘍 • 14～16日のプロセス（22日から） • プロセス中の全フィーダー層を低減する • 0日目に存在するフィーダー層及びOKT3 • 断片で開始したREP • 100MCSスケールから500MCS • 複数のpre－REPのプラスコを計量する • 標準培地及び合成培地（無血清）	• 増加した有効性 • 改善された表現型 • 低下したプロセス時間 • 低減した試薬試験 • 低下したプロセス変動 • 合成された試薬 • 増加したレパートリー • 純度を低減する（フィーダー） • 同等またはより高い用量。

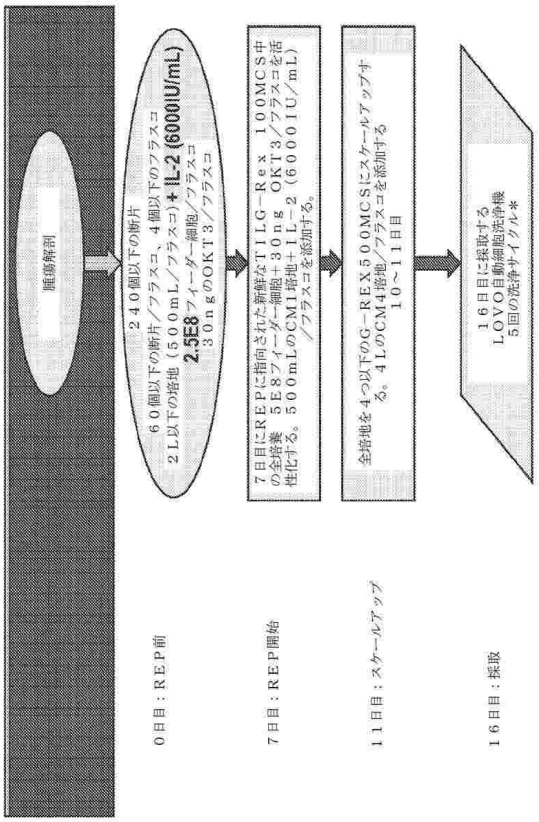
【図１４】



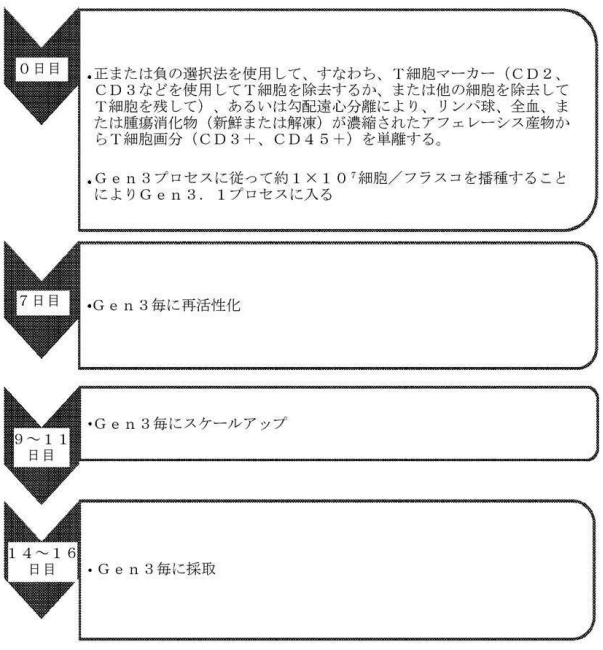
【図１５】



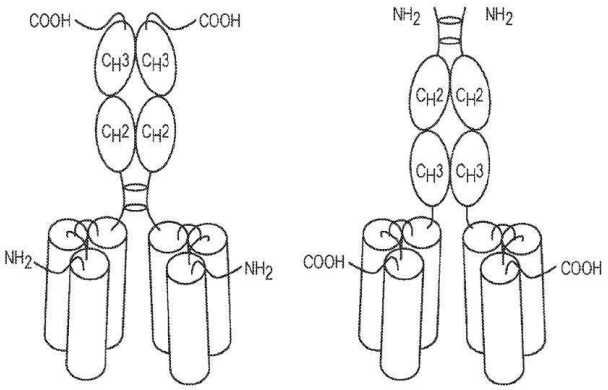
【図１６】



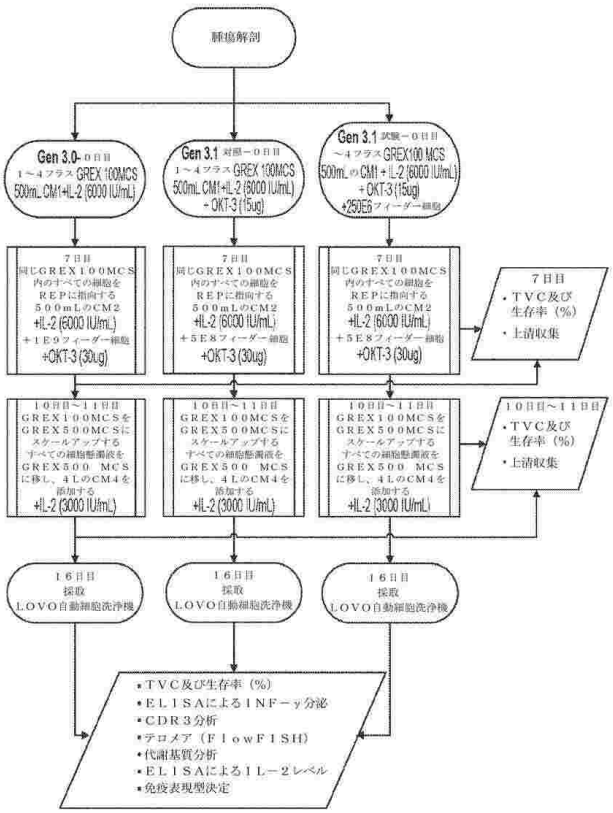
【図１７】



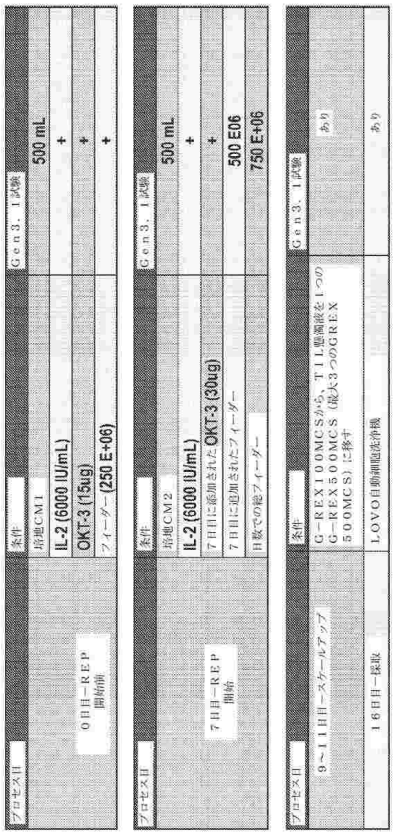
【図１８】



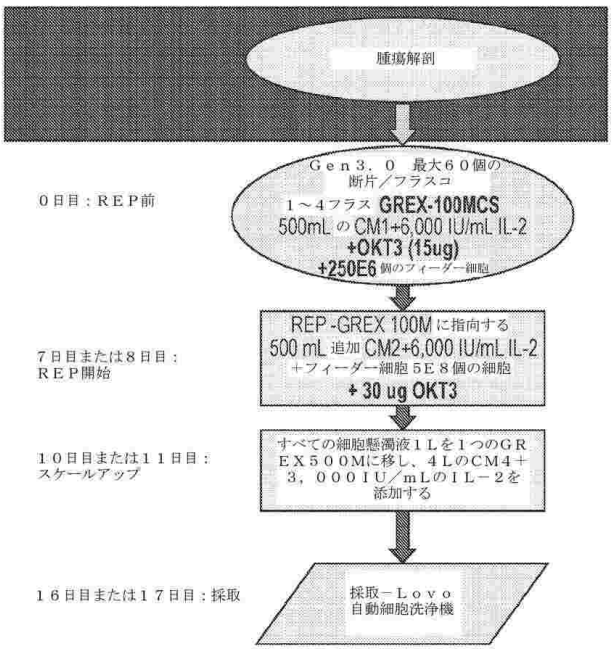
【図１９】



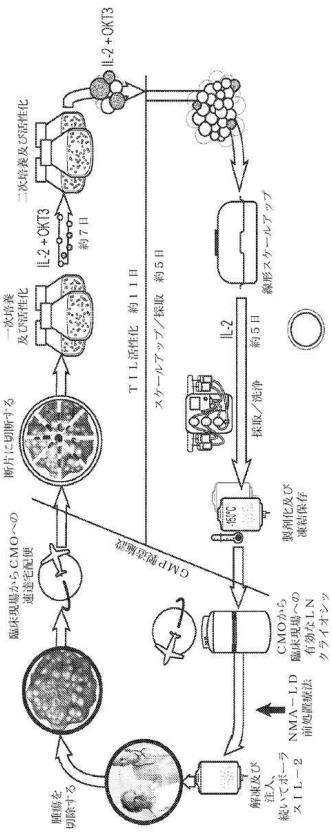
【図２０】



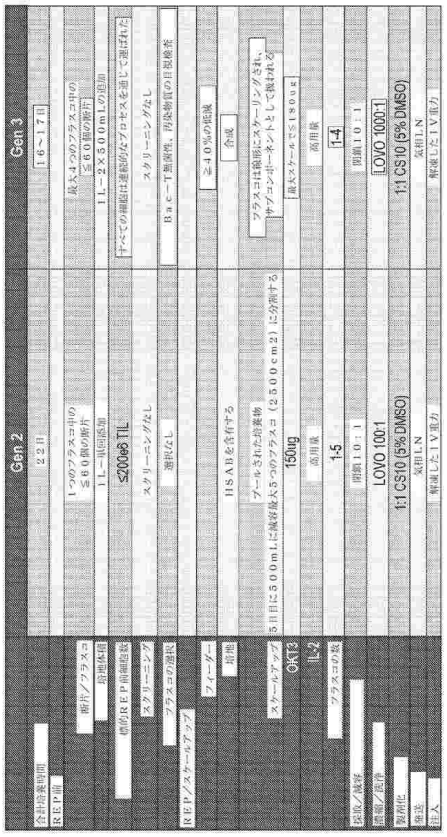
【図２１】



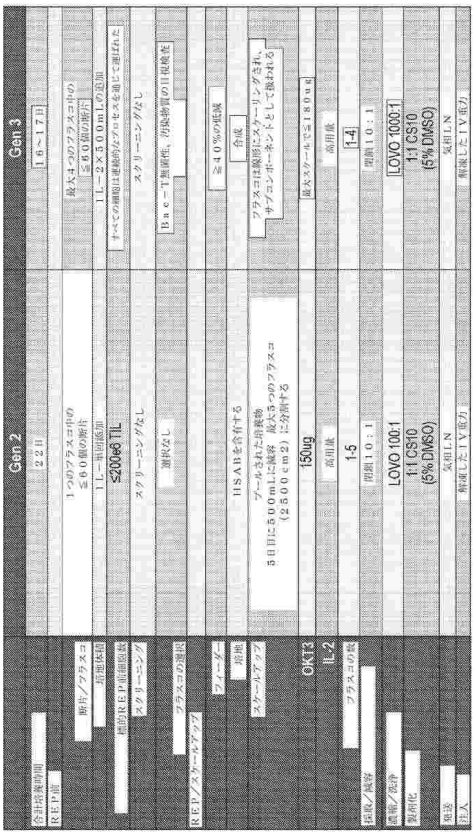
【図２２】



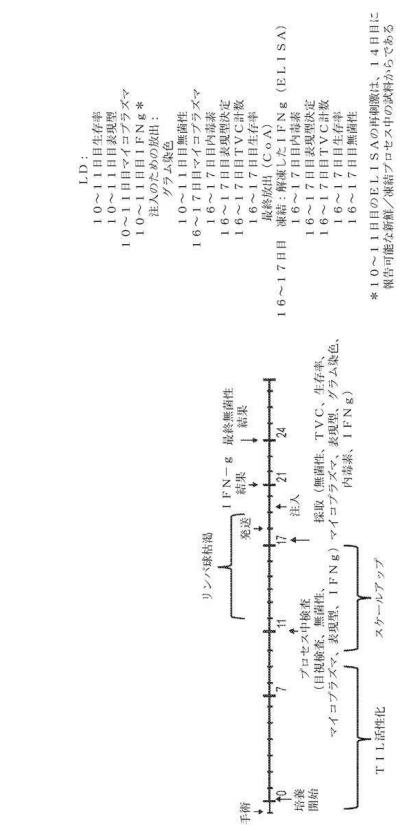
【図２３Ａ】



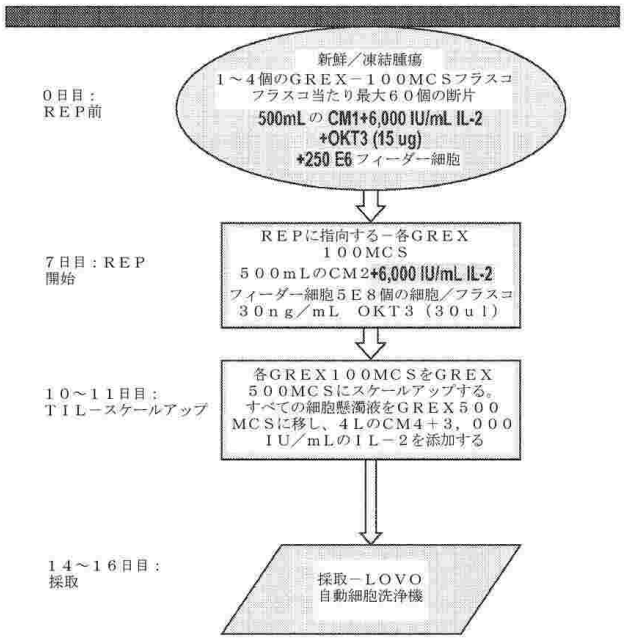
【図２３Ｂ】



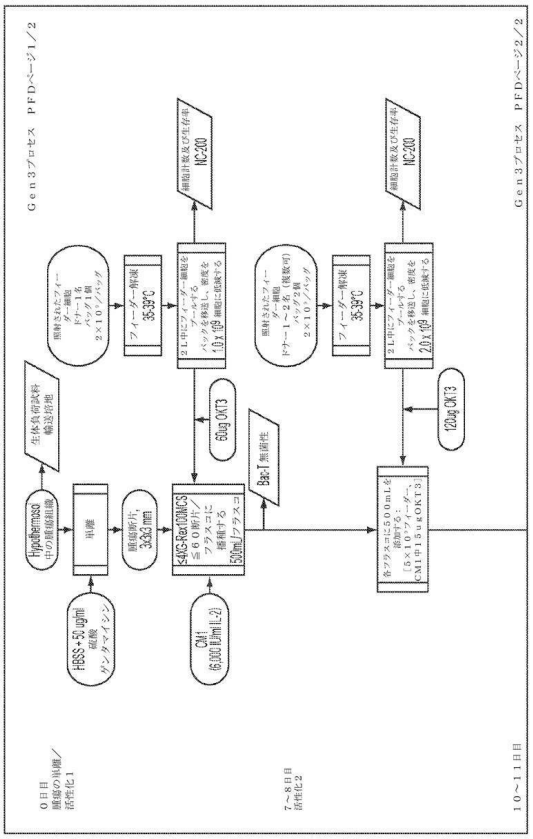
【図２４】



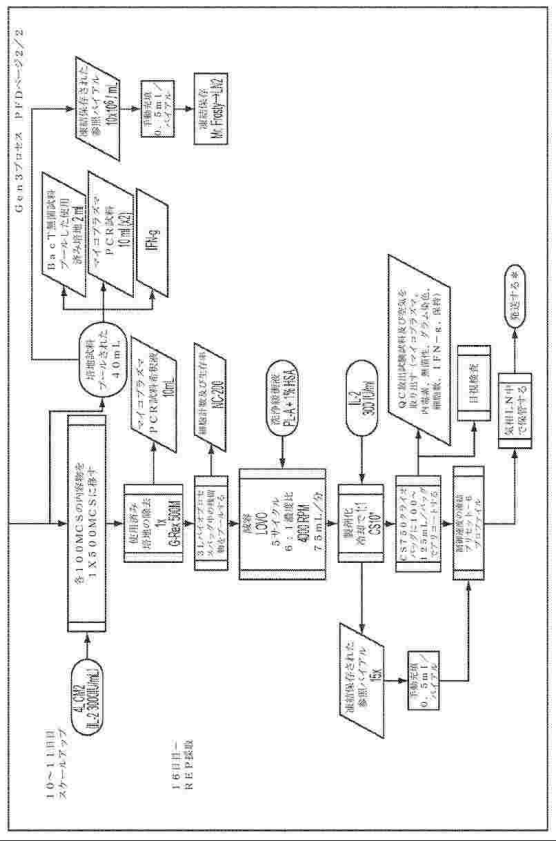
【図２５】



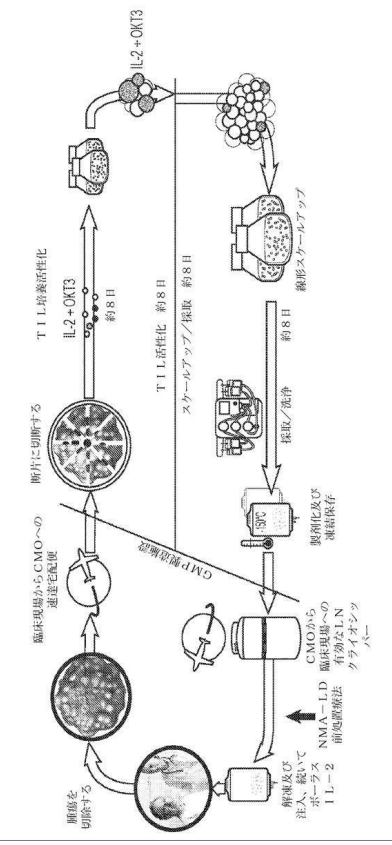
【図２６Ａ】



【図２６Ｂ】



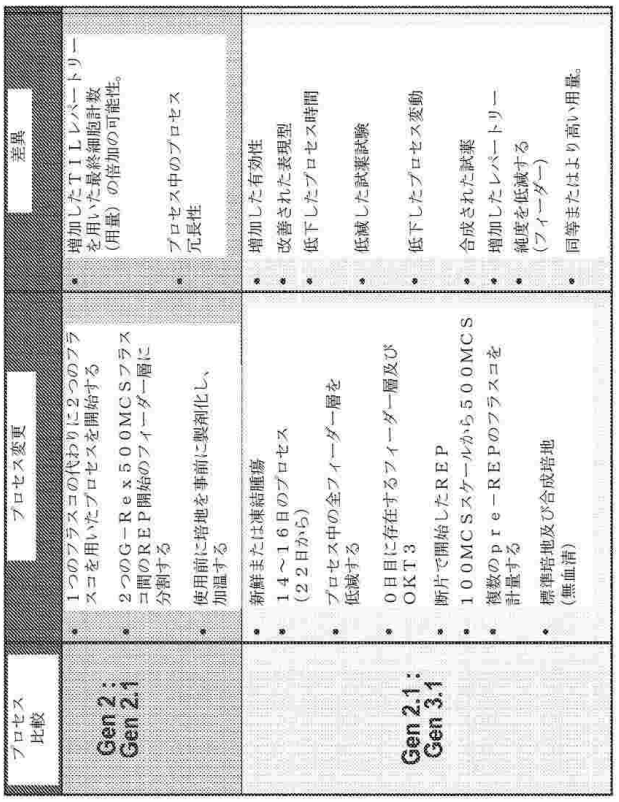
【図２７】



【図２８】

ステップ	Gen 2	Gen 2.1	Gen 3.0
REP前－0日目	50個以下の断片／1つのG－Rex 100MCS－11日	180個以下の断片／3つのG－Rex、事前配合されたCM1加温培地 100MCS－11日	解凍または凍結解除 1つのG－Rex当たり30以下の断片から最大600の断片を有する全解凍 100MCS（最大4つのG－Rex）、事前に配合された加温培地－7日、REP前、フィーダー－250e⁶個の細胞+OKT－3（15ug／mL）
REP開始	REPに誘導する－11日目－ <200e6 TIL 1G-Rex 500MCS	REPに誘導する－11日目－ <200e6 TIL 1つのG－Rex、500MCS中の事前配合されたCM2加温培地	REPに指向－7日目－すべての細胞TIL－同じG－Rex 100MCS（100MCS 最大4つのGREX）、標準培地または合成培地（無血清）、フィーダー－500e⁶個の細胞+OKT－3（30ug／mL）の添加
TILの増殖または スケールアップ	1～5つのG－REX 500MCS 500MCS 16日目に分割する	2～5つのG－REX 500MCS 事前配合されたCM4加温培地 16日目に分割する	G－REX 100MCSから、TIL懸濁液をG－REX 500MCSに移す－標準培地または合成培地（無血清） 10日目または11日目にスケールアップする
採取	22日目に採取する、 LOVO自動細胞洗浄機	22日目に採取する、 LOVO自動細胞洗浄機 （5回の洗浄サイクル）	14日目または16日目に採取する、 LOVO自動細胞洗浄機（5回の洗浄サイクル）
最終製剤	凍結保存した製品 LN₂中の3001U／m1のIL－2－CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品 LN₂中の3001U／m1のIL－2－CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品 LN₂中の3001U／m1のIL－2－CS10、複数のアリコート
プロセス時間	22日	22日	16日

【図２９】



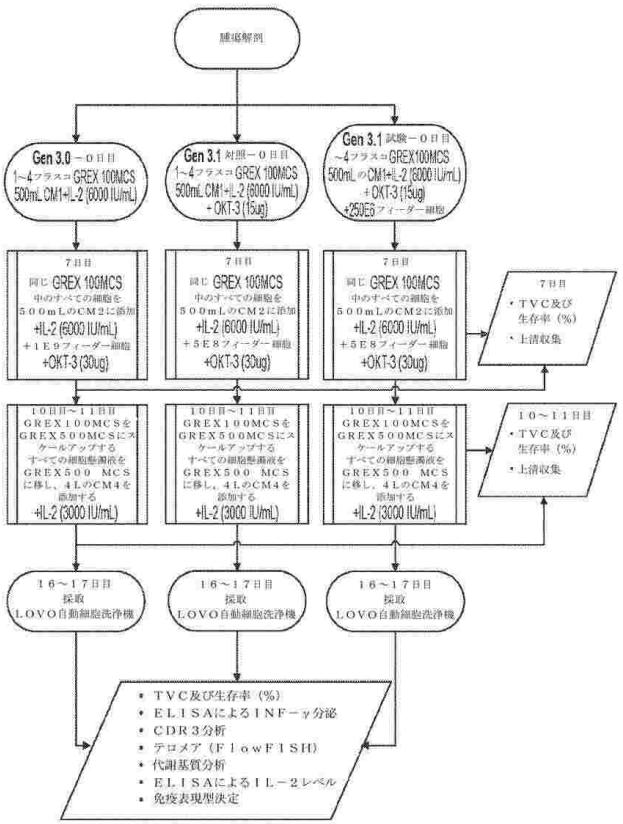
【図３０】

表2．Gen3最適化条件の説明

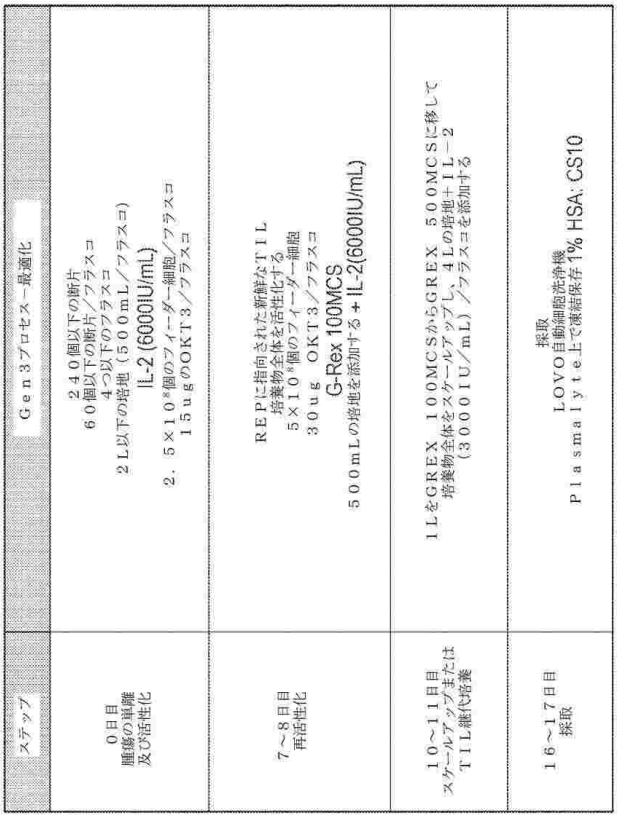
プロセス日	条件	Gen 3.0	Gen 3．1対照	Gen 3．1試験
0日目：腫瘍断片の単離及び活性化	培地（*）	500 mL	500 mL	500 mL
	IL-2	6000 IU/mL	6000 IU/mL	6000 IU/mL
	OKT-3	-	15 ug	15 ug
	フィーダー	-	-	2.5E+06
プロセス日	条件	Gen 3.0	Gen 3．1対照	Gen 3．1試験
7～8日目：TIL培養再活性化	培地（*）	500 mL	500 mL	500 mL
	IL-2	6000 IU/mL	6000 IU/mL	6000 IU/mL
	OKT-3	30 ug	30 ug	30 ug
	フィーダー	1 E+09	500 E+06	500E+06
	7日目までに添加されたフィーダーの合計	1 E+09	500 E+06	750E+06
プロセス日	条件	Gen 3.0	Gen 3．1対照	Gen 3．1試験
10～11日目：培養のスケールアップ	GREX100から、IL－2（3000IU／mL）を含む4L培地を含有する1つのGREX500に、全TIL懸濁液を移す。			
プロセス日	条件	Gen 3.0	Gen 3．1試験	Gen 3．1試験
16～17日目：採取／洗浄／製剤化	LOVO自動細胞洗浄機及びCS10による凍結保存。			

（*）培地は、標準培地またはCTS無血清培地であり得る。

【図３１】



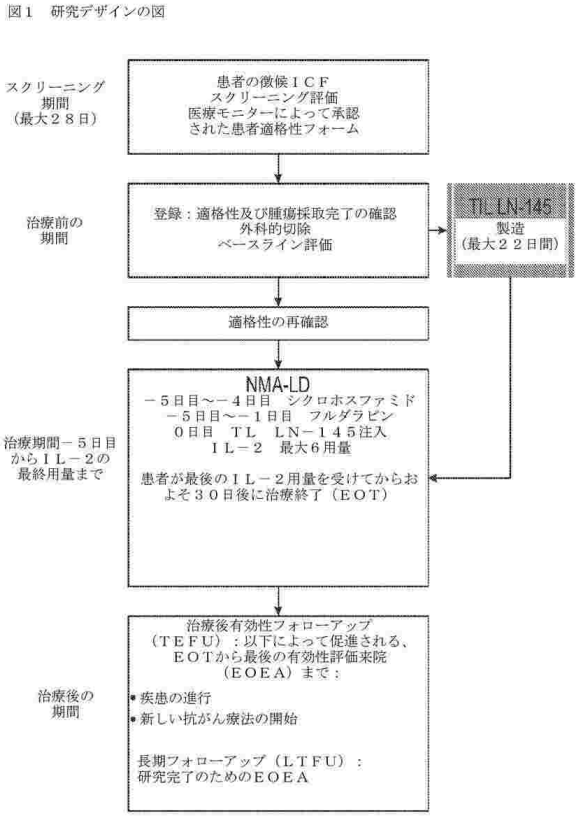
【図３２】



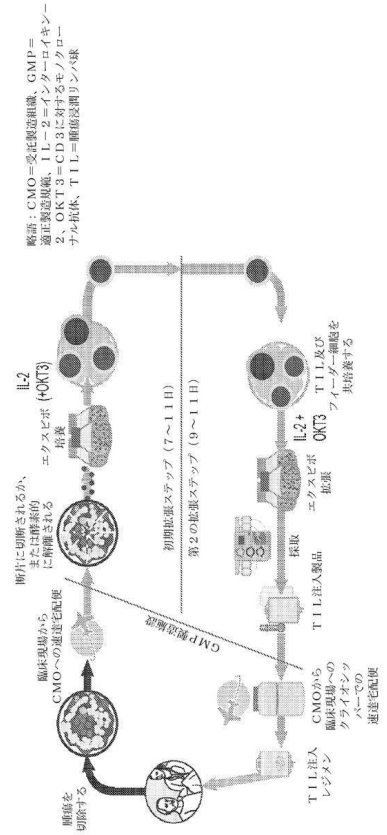
【図３３】

試験	合格判定基準	Ｇｅｎ３．１試験対Ｇｅｎ３．０プロセス
細胞計数（ＴＶＣ）	Ｇｅｎ３．１＞３０％からプロセスＧｅｎ３．０	Ｍｅｔ
生存率（％）	≧７０％の生存率	Ｍｅｔ
免疫表現型決定（%CD3+/ %CD45+）	Ｇｅｎ３．１とＧｅｎ３．０プロセスとの間の≦５％の差	Ｍｅｔ
ＩＦＮγ分泌	Ｇｅｎ３．１≧からプロセスＧｅｎ３．０～	Ｍｅｔ

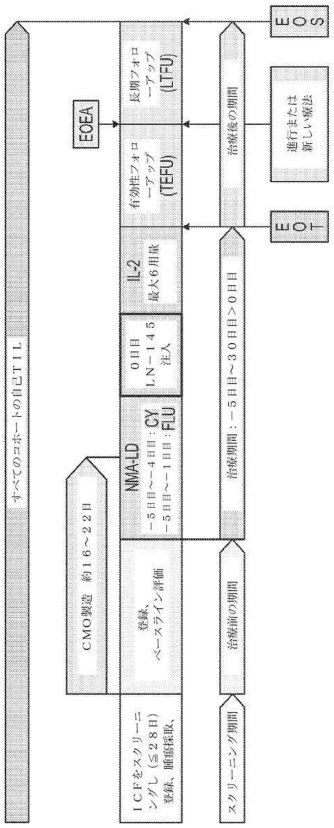
【図３４】



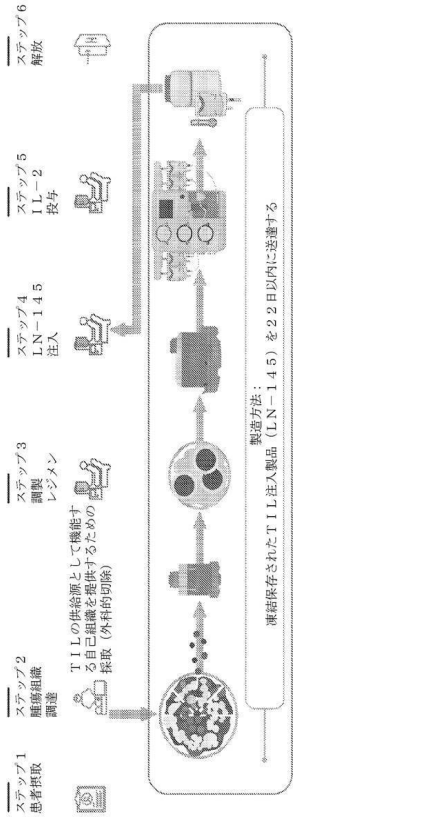
【図３５】



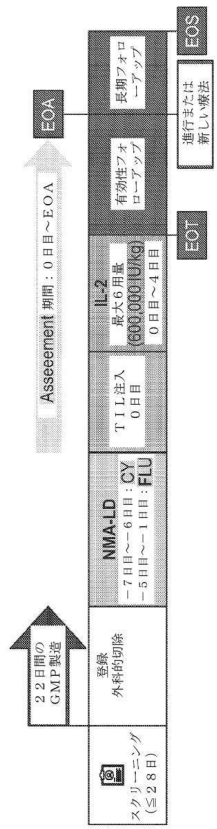
【図３６】



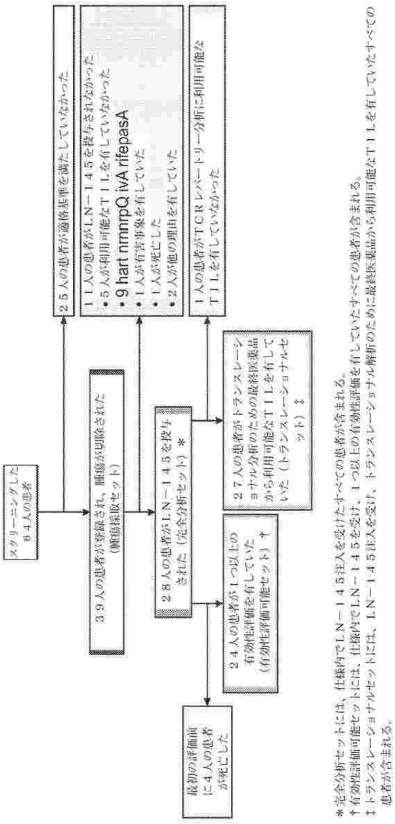
【図３７】



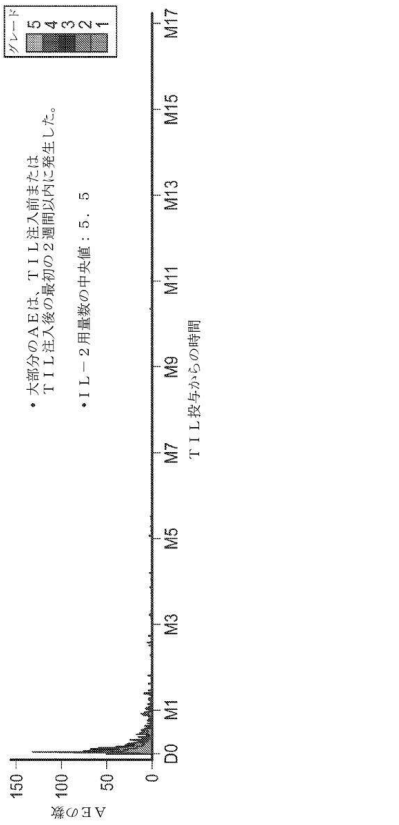
【図３８】



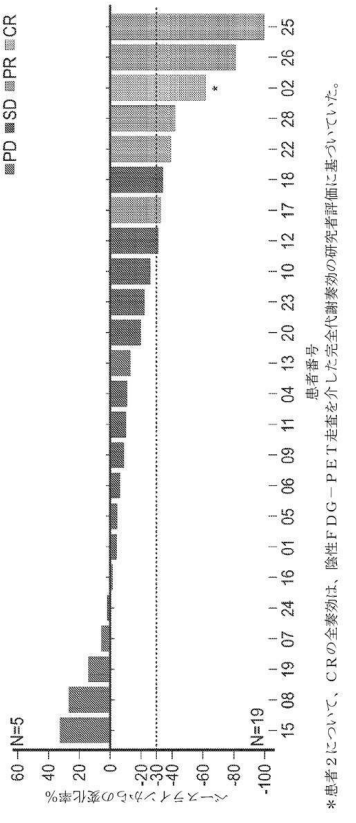
【図３９】



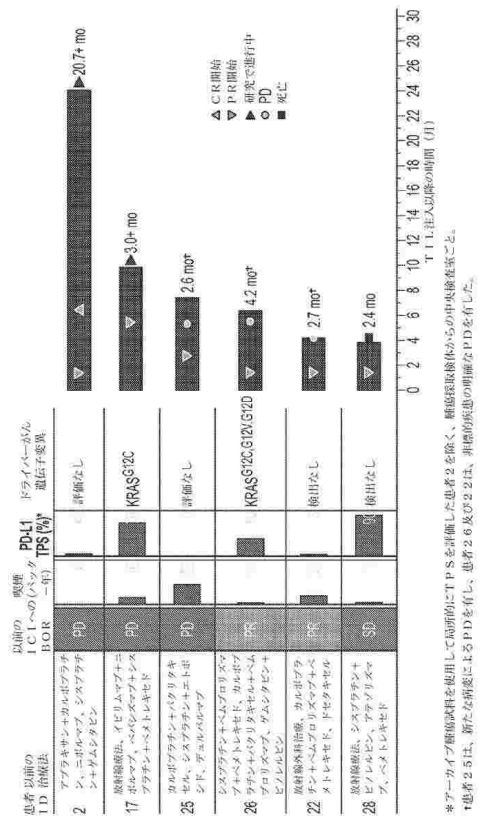
【図４０】



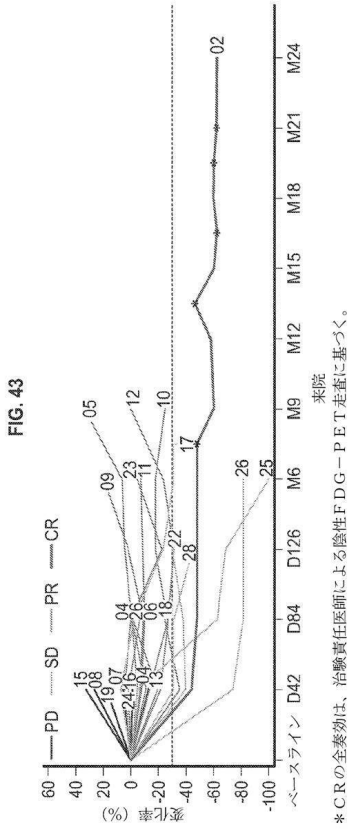
【図４１】



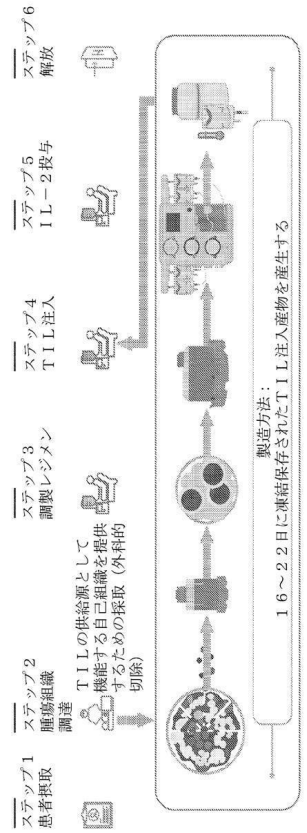
【図４２】



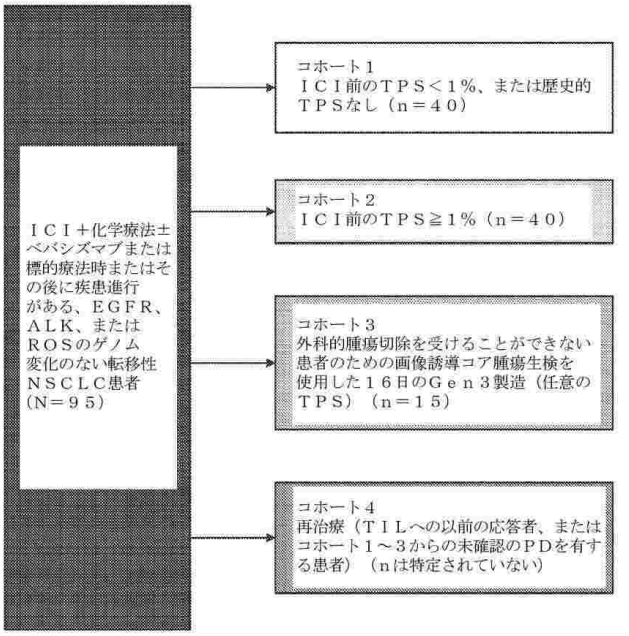
【図４３】



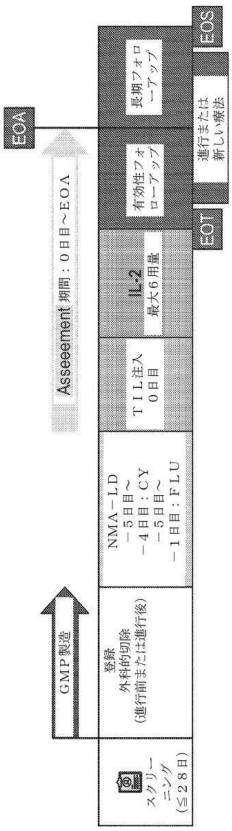
【図４４】



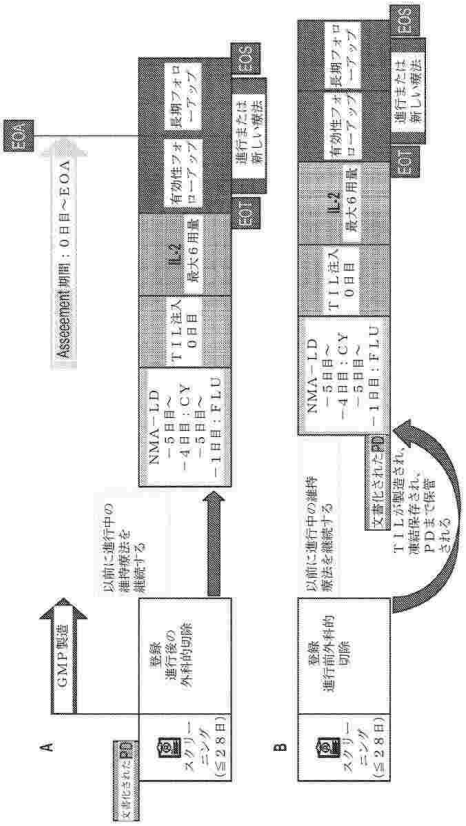
【図４５】



【図４６】



【図４７】



【図４８Ａ】

ステップＡ
患者腫瘍試料を取得する（任意選択で、
ステップＢ前に凍結され得る）

ステップＢ
第１の拡張（物理的断片化及び／または酵素消化；
ＩＬ－２を含む培地中で約３～９日間ＴＩＬを
培養する）

ステップＣ
活性化、遺伝子編集（抗ＣＰ３及び抗ＣＤ３８ビーズを含む培地中で約１～７日間ＴＩＬを培養する；
ＴＡＬＥＮ　ｍＲＮＡでＴＩＬをエレクトロポレーションする；約１日間静置する）

ステップＤ
急速な第２の拡張（ＡＰＣ、ＯＫＴ－３、
及びＩＬ－２を含む培地中で約５～１５日間
ＴＩＬを培養する）

ステップＥ
ステップＤからのＴＩＬを採取する

ステップＦ
最終製剤及び／または注入バッグに移す
（任意選択で凍結保存する）

【図４８Ｂ】

ステップＡ
患者腫瘍試料を取得する（任意選択で、
ステップＢ前に凍結され得る）

ステップＢ
第１の拡張（物理的断片化及び／または酵素消化；
ＩＬ－２を含む培地中で約３～９日間ＴＩＬを
培養する）

ステップＣ
活性化、遺伝子編集（抗ＣＤ３及び抗ＣＤ３８ビーズを含む培地中でＴＩＬを約１～７日間培養する；
ＴＡＬＥＮ　ｍＲＮＡでＴＩＬをエレクトロポレーションする；約１日間静置する）

ステップＤ
急速な第２の拡張（ＡＰＣ、ＯＫＴ－３、及び
ＩＬ－２を含む培地中で約１～７日間ＴＩＬを培養する；スケールアップし、ＩＬ－２を含む培地中に約
３～６日間培養物を添加する）

ステップＥ
ステップＤからのＴＩＬを採取する

ステップＦ
最終製剤及び／または注入バッグに移す
（任意選択で凍結保存する）

【図４８Ｃ】

ステップＡ
患者腫瘍試料を取得する（任意選択で、ステップＢ前に凍結され得る）

ステップＢ
第１の拡張（物理的断片化及び／または酵素消化；ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む培地中で約３～９日間ＴＩＬを培養する）

ステップＣ
遺伝子編集（ＴＡＬＥＮ　ｍＲＮＡでＴＩＬをエレクトロポレーション；約１日間静置）

ステップＤ
急速な第２の拡張（ＡＰＣ、ＯＫＴ－３、
及びＩＬ－２を含む培地中で約５～１５日間
ＴＩＬを培養する）

ステップＥ
ステップＤからのＴＩＬを採取する

ステップＦ
最終製剤及び／または注入バッグに移す
（任意選択で凍結保存する）

【図４８Ｄ】

ステップＡ
患者腫瘍試料を取得する（任意選択で、
ステップＢ前に凍結され得る）

ステップＢ
第１の拡張（物理的断片化及び／または酵素消化；ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む培地中で約３～９日間ＴＩＬを培養する）

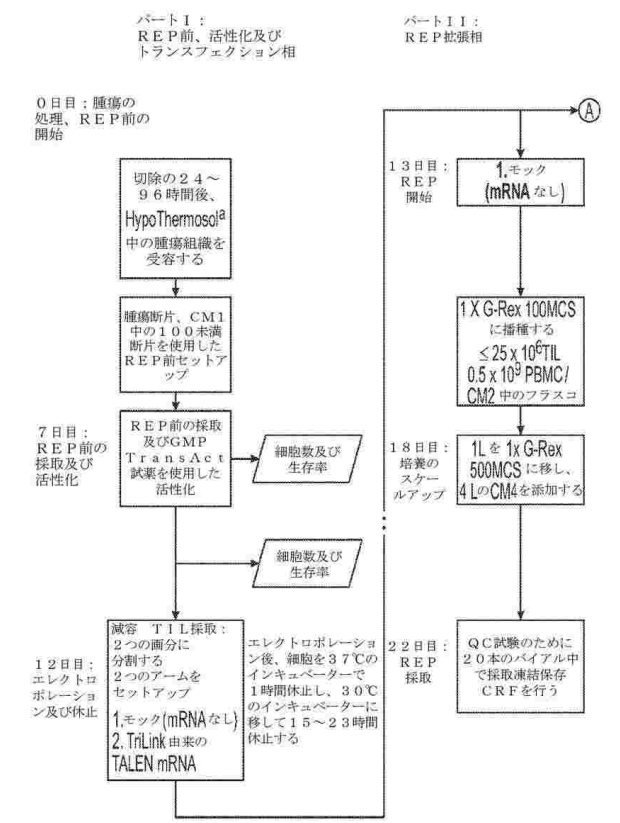
ステップＣ
遺伝子編集（ＴＡＬＥＮ　ｍＲＮＡでＴＩＬをエレクトロポレーション；約１日間静置）

ステップＤ
急速な第２の拡張（ＡＰＣ、ＯＫＴ－３、
及びＩＬ－２を含む培地中で約１～７日間
ＴＩＬを培養する；スケールアップし、
ＩＬ－２を含む培地中に約３～６日間
培養物を添加する）

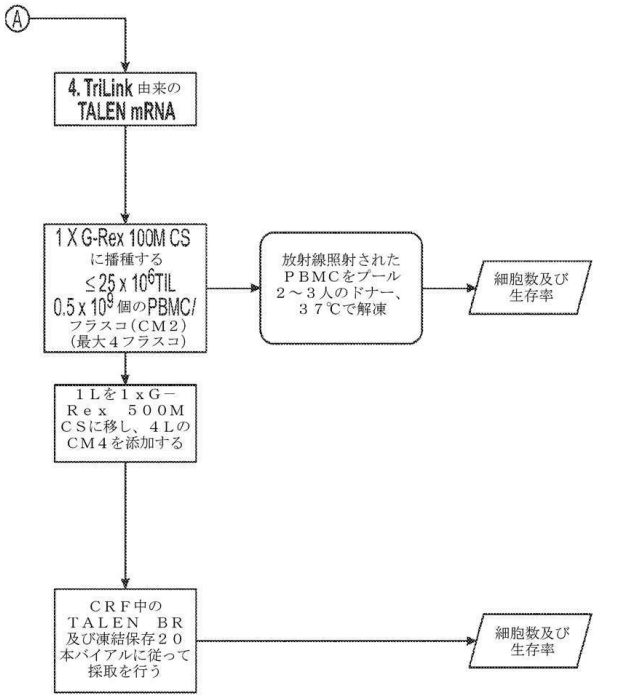
ステップＥ
ステップＤからのＴＩＬを採取する

ステップＦ
最終製剤及び／または注入バッグに移す
（任意選択で凍結保存する）

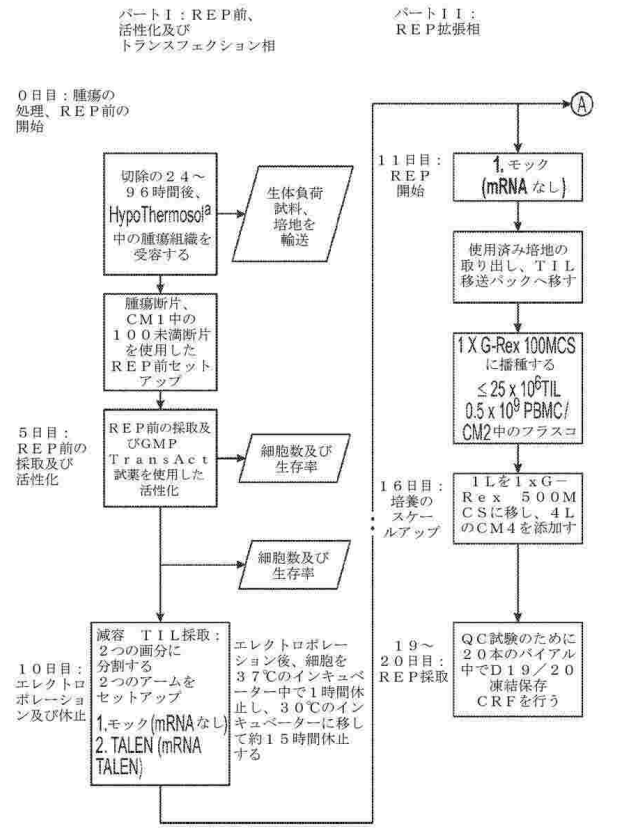
【図４９－１】



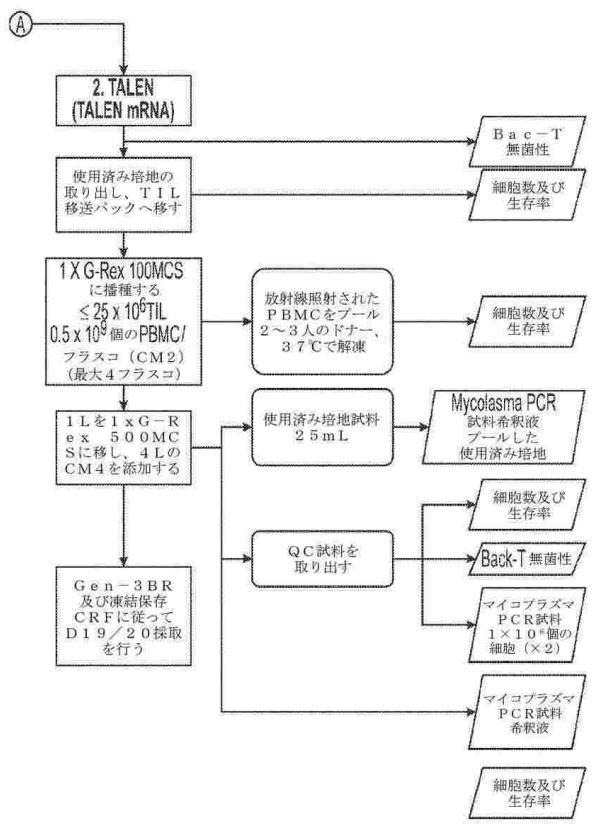
【図４９－２】



【図５０－１】



【図５０－２】



【図５１Ａ】

シグナル配列：[redacted]（配列番号 252）
リンカー：[redacted]（配列番号 246）
アンカー：[redacted]（ヒトＢ７．１膜貫通細胞内アミノ酸配列）
[redacted]（配列番号 239）
ＦｕｒｉｎＡ－Ｐ２Ａ配列：[redacted]（配列番号 251）

テザリングされＩＬ－１２－Ｌｒ１－Ａｒ２
[redacted]（配列番号 303）

テザリングされＩＬ－１２－Ｌｒ１－Ａｒ２
[redacted]（配列番号 304）

【図５１Ｂ】

テザリングされＩＬ－１８－Ｌｒ１－Ａｒ２
[redacted]（配列番号 305）

テザリングされＩＬ－１８－Ｌｒ１－Ａｒ２
[redacted]（配列番号 306）

テザリングされＤＲ－ＩＬ－１８（６－２７バリアント）－Ｌｒ１－Ａｒ２（黄色のハイライト：変異残基）
[redacted]（配列番号 307）

テザリングされＤＲ－ＩＬ－１８（６－２７バリアント）－Ｌｒ１－Ａｒ２
[redacted]（配列番号 308）

【図５１Ｃ】

テザリングされＩＬ－１２／ＩＬ－１５
[redacted]（配列番号 309）

テザリングされＩＬ－１２／ＩＬ－１５
[redacted]（配列番号 310）

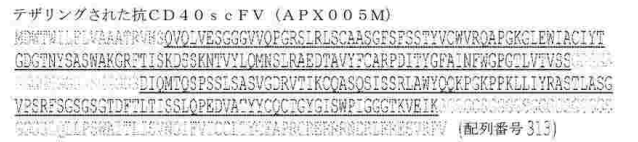
【図５１Ｄ】

テザリングされＩＬ－１８／ＩＬ－１５
[redacted]（配列番号 311）

テザリングされＩＬ－１８／ＩＬ－１５
[redacted]（配列番号 312）

【図５１Ｅ】

テザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ＡＰＸ００５Ｍ）



（配列番号３１３）

テザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ＡＰＸ００５Ｍ）



（配列番号３１４）

【図５１Ｆ】

テザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ダセツズマブ）



（配列番号３１５）

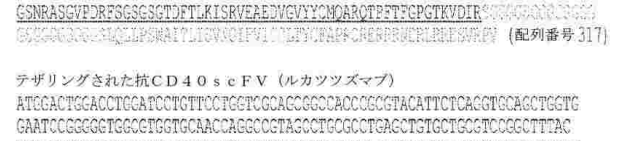
テザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ダセツズマブ）



（配列番号３１６）

【図５１Ｇ】

テザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ルカツツズマブ）



（配列番号３１７）

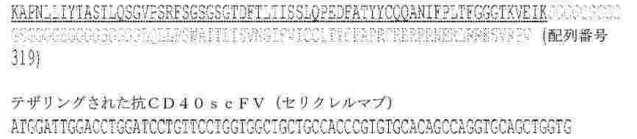
テザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ルカツツズマブ）



（配列番号３１８）

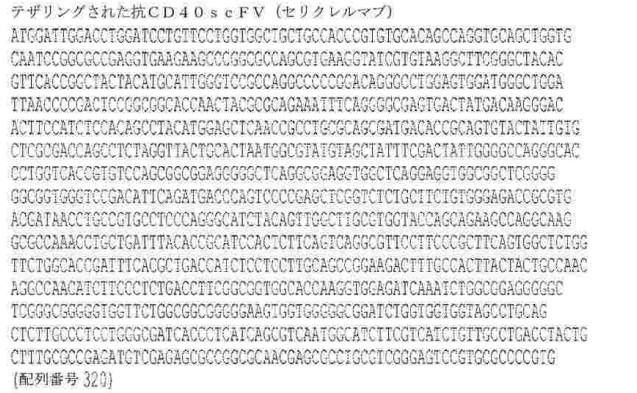
【図５１Ｈ】

テザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（セリクレルマブ）



（配列番号３１９）

テザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（セリクレルマブ）



（配列番号３２０）

【図５１Ｉ】

CD40L

MIETYNQISPRSAAIGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNT
GERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTISVLQWAEKGYYT
MSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQ
QSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL (配列番号 273)

CD40L

ATGATCGAGACCTACAACCAGACTTCCCCACGTAGCGCCGCCACTGGTCTACCCATCTCGATGAAAATCT
TCATGTATCTGCTGACCGTGTTCCTGATCACCCAGATGATCGGTCCGCCTCTGTTTGCCGTGTACCTGCAC
CGCCGCCTGGACAAAATTGAGGACCGAGCGGAATCTGCACGAAGATTTCGTATTTATGAAGACCATCCAG
AGGTGTAACACTGGCGAGCGTTCTCTTTCGTTGCTTAACTGCGAAGACATCAAGAGCCAGTTCGAGGGC
TTCGTCAAGGACATGCTCAACAAGGAGGAGACTAACAAGGAGAACTCCTTTGAGATGCAGAAGGG
TGATCAGAACCCCCAAATTGCAGCGCATGTGATAAGCGAGGCTTCCTCCAAGACAACCAGTGTGCTGCA
GTGGGCGGAGAAGGGCTACTACACCATGTCAAATAACCTGGTGACCCTGGAGAACGGCAAGCAGCTGA
CGCTGAAGCGCCAGGGGCTCTATTACATCTACGCGCAGGTCACGTTCTGTTCGAACCGCGAAGCCTCCT
CTCAGGCTCCCTTCATCGCCTCACTGTGCCTGAAATCTCCGGGACGCTTCGAGCGAATCCTGCTCCGCGC
CGCCAACACGCACTCCTCCGCCAAGCCTTGCGGGCAGCAGAGCATCCACCTTGGTGGGGTTTTTGAGCT
GCAGCCTGGCGCGTCCGTTCGTCAACGTGACCGACCCGTCCCAGGTCTCTCATGGAACCGGCTTCACC
TCCTTCGGCCTGCTCAAGTTG (配列番号 321)

【図５１Ｊ】

テザリングされたＣＤ４０Ｌ／ＩＬ－１５

MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLEEDFVFMKTIQRCNT
GERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKITSVLQWAEKGYYT
MSNNLVTLENGKQLIVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQ
QSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL
[illegible]
[illegible] (配列番号 322)

テザリングされたＣＤ４０Ｌ／ＩＬ－１５

ATGATCGAAACTTACAACCAGACGAGCCGCCGCTCCGCCGCCACCGGGCTGCCCATCTCTATGAAAATCT
TCATGTATCTGCTGACCGTGTTTCTGATCACCCAGATGATCGGTTCCGCGCTGTTTGCCGTGTACCTGCAC
CGCCGCCTGGACAAGATAGAAGACGAGCGCAACCTGCACGAAGATTTCGTCTTCATGAAGACCATCCAG
CGGTGTAATACCGGCGACAGGAGCCTGAGCTTGCTCAACTGCGAGGAGATCAAAAGTCAGTTCGAGGG
CTTCGTTAAGGACATCATGCTCAACAAGGAGGAGACCAAGAAGGAGAACTCCTTCGAGATGCAAAAGG
GGGACCAGAACCCTCAGATCGCCGCGGCATGTAATTTCCGAGCCTCATCCAAGACGACTTCTGTCCTACA
GTGGGCAGAGAAGGCCTACTACACCATGTCTAATAACCTGGTCACCCTTGAGAACGGCAAGCAACTGAC
AGTGAAGCGCCAGGGCCTCTACTACATCTACGCGCAGGTGACCTTCTGCAGCAACCGCGAGGCTTCCTC
CCAAGCTCCCTTCATCGCATCTCTGTGCCTGAAAAGCCCTGGCCGCCTTCGAGCCGATTCTCCTTCGTGCA
GCAAACACTCACTCCTCCGCCAAGCCCTGTGGACAGCAGAGCATCCACCTCGGCGGCGTGTTCGAGCTG
CAGCCAGGCGGCCTCCGTGTTCGTCAACGTGACCGACCCGTCCCAGGTGTCCCATGGCACTGGCTTCACCT
CCTTCGGCCTCCTCAAACTGTCCGGCCGGCCGTGGCAGTCGTCGCCGGGGATCACGTGGCCGCCGCCTCC
GGAGGTGGCCGGTCCGGCGGAGGTTCTCTTCAGCTTCTCCCTAGCTGGGCGATCACCCTGATCTCCGTT
AATGGCATCTTCGTCATTTGTTGTTTGACCTATTGCTTTGCCCCGAGATGTCGAGAGCGTAGACCGCAACG
AGCGCCTGCGCCGTGAAAGCGTGCGACCTGTGCGCGCTAAGCGCAGCGGCTCCGCCGCTACCAACTTCT
CATTACTCAAGCAGGCTGGAGATGTAGAGCAGAATCCAGGGCCAATGGATTGGACCTGGATCCTGTTCC
TGGTGGCCGCCGCGACTCGCGTCCACAGTAATTGGGTCAACGTGATCTCTGACCTGAAAAAGATTGAGG
ACTTGATCCAGAGCATGCACATTGACGCTACCCTGTACACGGAGAGTGACGTGCACCCCTCGTGCAAGG
TGACAGCCATGAAGTGCTTTTTGCTGGAGTTGCAGGTCATCTCTCTAGAGAGCGCGTGATGCCTCCATCCA
TGACACCGTGGAGAACCTTATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGTCGAGCAACGGCAACGTGACCGAGTC
CGGGTGCAAGGAATGTGAGGAGCTGGAGGAGAAAAACATCAAGGAGTTCCTGCAGTCGTTTGTGCACA
TCGTGCAGATGTTTATTAACACCTCTTCTCGCCGTGGGGGATCGGGGGGGGCGCGGCTCCGGCGGTGGC
GGTTCTGGAGGCGGTGGTTCTGGCGGGGGATCTTTACAGCTGCTGCCCAGTTGGGCGATCACTCTCATT
TCCGTGAACGGCATTTCGTCATTTGCTGTTTGACCTACTGCTTTGCCCGAGGTGTCGGAGCGTCGCC
GCAACGAGCGCCTACGGCGGCAATCGGTGAGGCCCGTG (配列番号 323)

【図５２Ａ】

シグナル配列：MDWTWILFLVAAATKVHS (配列番号 252)
シグナル配列：MFPAQLLGLLMLWLPGIKG (配列番号 254)
リンカー[Link]：GGGGSGGGGSGGGGS (配列番号 246)
アンカー[Anc]：{ヒトＢ７．１膜貫通細胞内アミノ酸配列}
LIFCMTSIVTLSAFIIPGYDTSNQTQKPILEGLEGGHRPNQEEKSLRLVEPV (配列番号 239)
ＦｕｒｉｎＡ－Ｐ２Ａ配列：RAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (配列番号 251)
}

テザリングされたＩＬ－２

MRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE
ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
[illegible] (配列番号 324)

テザリングされたＩＬ－２

ATGTATCGGATGCAGCTGCTGTCTTGTATTGCTCTATCACTGGCGCTGGTGACCAACTCCGCTCCTACTTCCAGCTC
GACCAAGAAGACCCAGCTCCAACTTGAGCACCTGCTGCTTGATCTTCAGATGATCCTGAACGGCATCAACAACTAC
AAAAACCCCAAGCTGACCCGCATGCTCACTTTCAAGTTCTACATGCCTAAAAAGGCCACCGAGCTCAAGCACTTGC
AGTGCCTGGAGGAGGAGCTTAAGCCGTTGGAAGAGGTGCTCAACCTGGCCCAGTCCAAGAATTTCCATCTAAGAC
CCCGCGACCTGATCTCTAACATCAACGTGATTGTACTCGAGCTGAAGGGCTCCGAGACCACCTTCATGTGCGAGTA
CGCGGACGAGACTGCAACCATCGTGGAGTTCCTGAACCGCTGGATCACGTTCTGTCAGAGCATCATCTCGACCCTT
ACATCTGGCGGCGGGGGGTCGGGCGGTGGGGGCTCTGGAGGAGGCGGTAGTGGGGGTGGCGGCTCCGGTGGA
GGCAGCCTCCAGCTGCTCCCAAGTTGCGCCATCACCCTGATTAGCGTCAATGGCATCTTCGTCATATGTTGTCTGA
CCTACTGCTTTGCCCCCCGCTGCCGACGAACGTCGCCGCAACGAGCGGCTGCGCAGGGAGTCCGTGCGCCCGGTGT
GA (配列番号 325)

【図５２Ｂ】

テザリングされたＩＬ－１２

MDWTWILFLVAAATRVHSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEF
GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGS
SDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQL
KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW
ASVPCSGGGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPL
ELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELM
QALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG
LIAGPMVTMLSNPETPNIQCLTYDAYNCEKRFNAVLVSVPV (配列番号 326)

テザリングされたＩＬ－１２

ATGTATCGGATGCAGCTGCTGTCTTGTATTGCTCTATCACTGGCGCTGGTGACCAACTCCGCTCCTACTTCCAGCTC
GACCAAGAAGACCCAGCTCCAACTTGAGCACCTGCTGCTTGATCTTCAGATGATCCTGAACGGCATCAACAACTAC
AAAAACCCCAAGCTGACCCGCATGCTCACTTTCAAGTTCTACATGCCTAAAAAGGCCACCGAGCTCAAGCACTTGC
AGTGCCTGGAGGAGGAGCTTAAGCCGTTGGAAGAGGTGCTCAACCTGGCCCAGTCCAAGAATTTCCATCTAAGAC
CCCGCGACCTGATCTCTAACATCAACGTGATTGTACTCGAGCTGAAGGGCTCCGAGACCACCTTCATGTGCGAGTA
CGCGGACGAGACTGCAACCATCGTGGAGTTCCTGAACCGCTGGATCACGTTCTGTCAGAGCATCATCTCGACCCTT
ACATCTGGCGGCGGGGGGTCGGGCGGTGGGGGCTCTGGAGGAGGCGGTAGTGGGGGTGGCGGCTCCGGTGGA
GGCAGCCTCCAGCTGCTCCCAAGTTGGGCCATCACCCTGATTAGCGTCAATGGCATCTTCGTCATATGTTGTCTGA
CCTACTGCTTTGCCCCCCGCTGCCGAGAACGTCGCCGCAACGAGCGGCTGCGCAGGGAGTCCGTGCGCCCGGTGT
GA (配列番号 327)

【図５２Ｃ】

テザリングされたＩＬ－１５

[illegible] (配列番号 328)

テザリングされたＩＬ－１５

ATGGATTGCACCTGGATCCTGTTCCTGCTGGCTCCGGCCACCCCTGTACACAGCAACTCGGCTCAATGTGATCTCCG
ACCTGAAGAAGATTGAGGACCTCATCCAGTCTATGCACATTGACGCAACACTTTACACCGAGACGGATGTGCACCC
CTCTTGCAAGCTGACTGCCATGAAATGTTTCTTGCTGCAATTCGCAGCTCATCTCTGTGCAGAGTGGGGACGCTTCC
ATACATGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTCTCGTCAAATGGCAACGTGACTGAGAGC
GGCTGCAAAGAGTGTGAGGAGCTGGAGCAGAAGAACATCAAGGAGTTCCTGCAGAGCTTCGTCCACATCGTGCA
GATGTTTATTAACACGTCGTCCGGAGCCGGGAGCTCTGCTGCCGCCGGCTCCGGGGCAGCGCCGCTCCGGTGC
GGTGCTTCCGCCGGAGGCTCGCTACAGCTGCTGCCCAGTTGGGCCATCACCCTTATTTCTGTCAACGGCATCTTCG
TTATCTGTTGCCTGACCTACTGCTTTGCGCCGAGGTGTCGGCGAGCGGCGTCGCAACGAGCGCCTGCGCCGAGAAT
CCGTCCGCCCTGTGTGA (配列番号 329)

CD40L

[illegible] (配列番号 273)

CD40L

ATGATCGACACCTACAACCAGACTTCCCCACGTAGCGCCGCCACTGGTCTACCCATCTCGATGAAAATCTTCATCTA
TCTGCTGACCGTGTTCCTGATCACCCAGATGATTGGCTCCGCTCTGTTTGCCGTGTACTTGCACCGCCGCCTGGACA
AAATTGAGGACGAGCGGAATCTGCACGAAGATTTCGTATTTATGAAGACCATCCAGAGGTGTAACACTGGCGAGC
GTTCTCTTTCGTTGCTTAACTGCGAAGAGATCAACAGCCAGTTCGAGGGCTTCGTCAAGGACATCATGCTCAACAA
GGAGGAGACTAAGAAGGAGAACTCCTTTGAGATGCAGAAGGGTGATCAGAACCCCAAATTGCAGCGCATGTGA
TAAGCGAGGCTTCCTCCAAGACAACCAGTGTGCTGCAGTGGGCGGAGAAGGGCTACTACACCATGTCAAATAACC
TGGTGACCCTGGACAACGGCAAGCAGCTGACGGTGAAGCGCCAGGGGCTCTATTACATCTACGCGCAGGTCACG
TTCTGTTCGAACCGCGAAGCCTCCTCTCAGGGTCCCTTCATCGCCTCACTGTGCCTGAAATCTCCGGGACGCTTCGA
GCGAATCCTGCTCCGCGCCGCCAACACGCACTCCTCCGCCAAGCCTTGCGGGCAGCAGACGATCCACCTTGGTGG
GGTTTTTGAGCTGCAGCCTGGCGCGTCCGTGTTCGTCAACGTGACCGACCCGTCCCAGGTCTCTCATGGAACCGGC
TTCACCTCCTTCGGCCTGCTCAAGTTG (配列番号 321)

【図５２Ｄ】

GFP

ATGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCA
CAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCAC
CGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCC
GACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCA
AGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTG
AAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGT
CTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCA
GCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACT
ACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGA
CCGCCGCCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGA (配列番号 330)

テザリングされたＩＬ－２１

[illegible] (配列番号 331)

【手続補正書】
【提出日】令和７年３月５日(２０２５.３.５)
【手続補正１】
【補正対象書類名】誤訳訂正書
【補正対象項目名】誤訳訂正３
【補正方法】削除
【補正の内容】

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/065404

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K35/17 C12N5/0783
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/123832 A1 (INSTIL BIO UK LTD [GB]) 24 June 2021 (2021-06-24) claim 42 claim 87 -----	1-305, 308-329
X	US 2021/274776 A1 (VEERAPATHRAN ANAND [US] ET AL) 9 September 2021 (2021-09-09) paragraphs [0006], [0457]; figure 1 paragraph [0018] -----	1-305, 308-329
X	WO 2018/182817 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]; WARDELL SETH [US] ET AL.) 4 October 2018 (2018-10-04) cited in the application claim 1 paragraph [0323] paragraph [0071] -----	1-305, 308-329
	-/--	

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
6 July 2023	15/09/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Lanzrein, Markus

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/065404

Box No. I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
1-305(completely); 308-329(partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/065404

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 3 034 092 A1 (UNIVERSITÉ DE LAUSANNE [CH]) 22 June 2016 (2016-06-22) paragraph [0001] paragraph [0034] _____	1-305, 308-329

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2023/065404

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021123832 A1	24-06-2021	AU 2020408017 A1	14-07-2022
		BR 112022011795 A2	30-08-2022
		CA 3164986 A1	24-06-2021
		CL 2022001703 A1	10-03-2023
		CN 115244173 A	25-10-2022
		EP 4077641 A1	26-10-2022
		IL 294098 A	01-08-2022
		JP 2023507432 A	22-02-2023
		KR 20220119439 A	29-08-2022
		US 2022348874 A1	03-11-2022
		US 2022356448 A1	10-11-2022
		US 2022356449 A1	10-11-2022
		WO 2021123832 A1	24-06-2021
US 2021274776 A1	09-09-2021	AU 2019342749 A1	18-03-2021
		BR 112021003678 A2	18-05-2021
		CA 3112599 A1	26-03-2020
		CN 112930114 A	08-06-2021
		EP 3852524 A1	28-07-2021
		IL 281423 A	29-04-2021
		JP 2022501038 A	06-01-2022
		KR 20210064269 A	02-06-2021
		SG 11202101787X A	29-04-2021
		TW 202028457 A	01-08-2020
		US 2021274776 A1	09-09-2021
		US 2022322655 A1	13-10-2022
		WO 2020061429 A1	26-03-2020
WO 2018182817 A1	04-10-2018	AU 2018243355 A1	31-10-2019
		BR 112019020326 A2	28-04-2020
		CA 3057975 A1	04-10-2018
		CL 2019002769 A1	08-05-2020
		CL 2020002737 A1	05-03-2021
		CN 110785486 A	11-02-2020
		CO 2019011995 A2	18-02-2020
		CR 20190487 A	17-03-2020
		DK 3601533 T3	03-05-2021
		EC SP19077884 A	31-01-2020
		EP 3601533 A1	05-02-2020
		EP 3722415 A1	14-10-2020
		EP 3730608 A1	28-10-2020
		EP 3766964 A1	20-01-2021
		EP 3910055 A1	17-11-2021
		ES 2874335 T3	04-11-2021
		HR P20210677 T1	25-06-2021
		HU E054829 T2	28-10-2021
		IL 269543 A	28-11-2019
		JP 7169291 B2	10-11-2022
		JP 2020515257 A	28-05-2020
		JP 2021519582 A	12-08-2021
		JP 2023011778 A	24-01-2023
		JP 2023012510 A	25-01-2023
		JP 2023012511 A	25-01-2023
		KR 20190142342 A	26-12-2019
		LT 3601533 T	10-06-2021
		MD 3601533 T2	31-07-2021
		PE 20191841 A1	31-12-2019
		PH 12019502247 A1	29-06-2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2023/065404

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		PL 3601533 T3	16-08-2021
		PT 3601533 T	24-05-2021
		RS 61863 B1	30-06-2021
		SG 11201908994R A	30-10-2019
		SI 3601533 T1	30-09-2021
		TN 2019000273 A1	07-01-2021
		TW 201839129 A	01-11-2018
		US 11202803 B1	21-12-2021
		US 11517592 B1	06-12-2022
		US 11529372 B1	20-12-2022
		US 2018207201 A1	26-07-2018
		US 2018280436 A1	04-10-2018
		US 2018282694 A1	04-10-2018
		US 2018325954 A1	15-11-2018
		US 2019000882 A1	03-01-2019
		US 2019000883 A1	03-01-2019
		US 2019070222 A1	07-03-2019
		US 2019083536 A1	21-03-2019
		US 2019083538 A1	21-03-2019
		US 2019083539 A1	21-03-2019
		US 2019358259 A1	28-11-2019
		US 2019358260 A1	28-11-2019
		US 2019358261 A1	28-11-2019
		US 2020155601 A1	21-05-2020
		US 2020246384 A1	06-08-2020
		US 2020276241 A1	03-09-2020
		US 2020276242 A1	03-09-2020
		US 2020281978 A1	10-09-2020
		US 2020289569 A1	17-09-2020
		US 2020306306 A1	01-10-2020
		US 2020306307 A1	01-10-2020
		US 2021079348 A1	18-03-2021
		US 2021100842 A1	08-04-2021
		US 2021100843 A1	08-04-2021
		US 2021106625 A1	15-04-2021
		US 2021128620 A1	06-05-2021
		US 2021128621 A1	06-05-2021
		US 2021128622 A1	06-05-2021
		US 2021128623 A1	06-05-2021
		US 2021128624 A1	06-05-2021
		US 2021128625 A1	06-05-2021
		US 2021137984 A1	13-05-2021
		US 2021207091 A1	08-07-2021
		US 2021207092 A1	08-07-2021
		US 2021214685 A1	15-07-2021
		US 2021353677 A1	18-11-2021
		US 2021361712 A1	25-11-2021
		US 2021361713 A1	25-11-2021
		US 2021379111 A1	09-12-2021
		US 2022000923 A1	06-01-2022
		US 2022000924 A1	06-01-2022
		US 2022000925 A1	06-01-2022
		US 2022008469 A1	13-01-2022
		US 2022362301 A1	17-11-2022
		US 2022387494 A1	08-12-2022
		US 2022387495 A1	08-12-2022
		US 2022387496 A1	08-12-2022
		US 2022387497 A1	08-12-2022

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2023/065404

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2022387498 A1	08-12-2022
		US 2022395533 A1	15-12-2022
		US 2023012086 A1	12-01-2023
		US 2023015649 A1	19-01-2023
		US 2023045899 A1	16-02-2023
		US 2023133298 A1	04-05-2023
		WO 2018182817 A1	04-10-2018
EP 3034092 A1	22-06-2016	EP 3034092 A1	22-06-2016
		EP 3233114 A1	25-10-2017
		US 2017349880 A1	07-12-2017
		WO 2016096903 A1	23-06-2016

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

International Application No. PCT/US2023/065404

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-305(completely); 308-329(partially)

A method of making a cryopreserved population of TILs from a NSCLC patient, wherein the patient is naive to a cancer treatment or in maintenance therapy, the method comprising:
(a) obtaining and/or receiving a first population of TILs from a tumor resected from the subject of patient by processing a tumor sample obtained from the subject into multiple tumor fragments or a tumor digest;
(b) cryopreserving the tumor fragments or tumor digest comprising the first population of TILs from step (a) to produce cryopreserved tumor fragments or tumor digest;
optionally expanding the TILs into a therapeutic population of TILs.

---

2. claims: 306, 307(completely); 308-329(partially)

A method of treating a cancer patient by administering a population of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) to the cancer patient in need thereof, wherein the cancer patient has received at least one prior therapy and has exhibited cancer progression on or after the at least one prior therapy, wherein obtaining the population of the TILs comprises multilesional sampling, wherein the population of TILs was made from a tumor sample harvested before the cancer patient receives the at least one prior therapy; and wherein the population of TILs is administered to the subject or patient after the cancer patient has exhibited cancer progression on or after the at least one prior therapy.

フロントページの続き

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

４０７０ サン カルロス ドーバー コート １９

(71)出願人 524368071

フォーグト，フレデリック ジー．

アメリカ合衆国，ペンシルベニア州 １９４０１ ウェスト ノーリトン ヘムロック ロード ２１２０

(74)代理人 100079108

弁理士 稲葉 良幸

(74)代理人 100109346

弁理士 大貫 敏史

(74)代理人 100117189

弁理士 江口 昭彦

(74)代理人 100134120

弁理士 内藤 和彦

(72)発明者 ファーディス，マリア

アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０７０，サン カルロス アバディーン ドライブ １０５

(72)発明者 ヴォン フィンケンシュタイン，フリードリヒ グラフ フィンク

アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０７０ サン カルロス ドーバー コート １９

(72)発明者 フォーグト，フレデリック ジー．

アメリカ合衆国，ペンシルベニア州 １９４０１ ウェスト ノーリトン ヘムロック ロード ２１２０

Ｆターム（参考） 4B065 AA90X AB10 AC14 AC20 BA23 BA30 BB19 BD09 BD12 CA44

4C084 AA19 MA02 NA05 ZB26 ZC75

4C087 AA01 AA02 BB63 BB64 DA31 NA05 ZB26