(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7688575号
(P7688575)

(45)発行日　令和7年6月4日(2025.6.4)

(24)登録日　令和7年5月27日(2025.5.27)

(51)国際特許分類		FI		
A61K 35/17 (2025.01)		A61K	35/17	
A61P 35/00 (2006.01)		A61P	35/00	
A61P 11/00 (2006.01)		A61P	11/00	
A61P 43/00 (2006.01)		A61P	43/00	121
A61K 31/675 (2006.01)		A61K	31/675	

請求項の数　18　（全387頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-523888(P2021-523888)
(86)(22)出願日　令和1年11月4日(2019.11.4)
(65)公表番号　特表2022-512899(P2022-512899A)
(43)公表日　令和4年2月7日(2022.2.7)
(86)国際出願番号　PCT/US2019/059720
(87)国際公開番号　WO2020/096989
(87)国際公開日　令和2年5月14日(2020.5.14)
審査請求日　令和4年11月4日(2022.11.4)
(31)優先権主張番号　62/756,025
(32)優先日　平成30年11月5日(2018.11.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国(US)
(31)優先権主張番号　62/903,627
(32)優先日　令和1年9月20日(2019.9.20)
最終頁に続く

(73)特許権者　519006377
アイオバンス バイオセラピューティクス，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 94070 サン カルロス インダストリアル ロード 825 スイート 400
(74)代理人　100079108
弁理士　稲葉 良幸
(74)代理人　100109346
弁理士　大貫 敏史
(74)代理人　100117189
弁理士　江口 昭彦
(74)代理人　100134120
弁理士　内藤 和彦
(72)発明者　ファーディス，マリア
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　抗ＰＤ－１抗体に対して不応性のＮＳＣＬＣ患者の治療

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を治療する方法における使用のための、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を含む薬学的組成物であって、前記方法が、

（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、患者のＮＳＣＬＣ腫瘍から取得される第１のＴＩＬ集団を提供する、または、ＮＳＣＬＣを有する患者から切除される腫瘍から取得される第１のＴＩＬ集団を提供するステップと、

（ｂ）前記第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片を、第１の細胞培養培地と接触させるステップと、

（ｃ）前記第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第２のＴＩＬ集団が、前記第１のＴＩＬ集団よりも数が少なくとも５倍多く、前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、および任意で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、さらに、前記初期拡張が、最大で１日、最大で２日、最大で３日、最大で４日、最大で５日、最大で６日、最大で７日、もしくは最大で８日の期間中、または、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、もしくは８日の期間中に行われるステップと、

（ｄ）第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団の急速拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、および任意に照射された、同種異系末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である

抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、前記急速拡張が、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間中に行われ、任意選択で、前記第３のＴＩＬ集団が、急速拡張の開始から７日後に前記第２のＴＩＬ集団よりも数が少なくとも５０倍多い、ステップと、

（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団を前記患者に投与するステップと、

を含み、

前記ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１抗体による治療に対して不応性である、薬学的組成物。

【請求項２】

前記初期拡張が１～８日間行われ、前記第２の拡張が１～９日間行われる、請求項１に記載の薬学的組成物。

【請求項３】

前記初期拡張が８日間行われ、前記第２の拡張が７～９日間行われる、請求項１に記載の薬学的組成物。

【請求項４】

前記ＡＰＣが、ステップ（ｃ）において４～７日目の任意の時点で追加される、請求項１に記載の薬学的組成物。

【請求項５】

前記初期拡張および前記急速拡張が合計で１４～１６日間行われる、請求項１に記載の薬学的組成物。

【請求項６】

前記第１のＴＩＬ集団が、多病変サンプリング法を用いて取得される、請求項１に記載の薬学的組成物。

【請求項７】

（ａ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１抗体および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体および／または抗ＰＤ－Ｌ２抗体で以前に治療されている、

（ｂ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されていない、

（ｃ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、化学療法剤で以前に治療されている、

（ｄ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１抗体および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、化学療法剤で以前に治療されている、

（ｅ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、化学療法剤で以前に治療されている、または、

（ｆ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、化学療法剤で治療されているが、現在は化学療法剤で治療されていない、

請求項１に記載の薬学的組成物。

【請求項８】

前記不応性ＮＳＣＬＣが、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有し、（ａ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１抗体および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されている、または、（ｂ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されていない、（ｃ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、化学療法剤で治療されている、または（ｄ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、化学療法剤で治療されているが、現在は化学療法剤で治療されていない、請求項１に記載の薬学的組成物。

【請求項９】

（ａ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する、

（ｂ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１抗体および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する、

（ｃ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、化学療法剤で治療されており、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する、または、

（ｄ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、化学療法剤で治療されているが、現在は化学療法剤で

治療されておらず、ベースラインで巨大腫瘤病変を有し、任意選択で、最大腫瘍直径が、横断面もしくは冠状面のいずれかで測定して７ｃｍより大きいか、または腫れたリンパ節が２０ｍｍ以上の短軸直径を有する場合、巨大腫瘤病変が示される、
請求項１に記載の薬学的組成物。
【請求項１０】
前記方法が、ステップ（ｂ）の前に、前記腫瘍を腫瘍断片に断片化するステップをさらに含む、請求項１に記載の薬学的組成物。
【請求項１１】
前記腫瘍が、１つ以上の腫瘍部位から切除される、請求項１～１０のいずれか一項に記載の薬学的組成物。
【請求項１２】
（ａ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１抗体および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体および／または抗ＰＤ－Ｌ２抗体で以前に治療されている、
（ｂ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されていない、
（ｃ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、化学療法剤で治療されている、
（ｄ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１抗体および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、化学療法剤で以前に治療されている、
（ｅ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、化学療法剤で以前に治療されている、または、
（ｆ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、化学療法剤で治療されているが、現在は化学療法剤で治療されていない、
請求項１０に記載の薬学的組成物。
【請求項１３】
前記不応性ＮＳＣＬＣが、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有し、
（ａ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１抗体および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されている、
（ｂ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されていない、
（ｃ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、化学療法剤で治療されている、または、
（ｄ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、化学療法剤で治療されているが、現在は化学療法剤で治療されていない、
請求項１０に記載の薬学的組成物。
【請求項１４】
（ａ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する、
（ｂ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１抗体および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する、
（ｃ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、化学療法剤で治療されており、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する、または、
（ｄ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、化学療法剤で治療されているが、現在は化学療法剤で治療されておらず、ベースラインで巨大腫瘤病変を有し、任意選択で、前記最大腫瘍直径が、前記横断面もしくは冠状面のいずれかで測定して７ｃｍより大きいか、または腫れたリンパ節が２０ｍｍ以上の短軸直径を有する場合、前記巨大腫瘤病変が示される、
請求項１０に記載の薬学的組成物。
【請求項１５】
（ｉ）前記不応性ＮＳＣＬＣが、ネオアジュバント療法またはアジュバント療法を含まない、少なくとも２つの以前の全身治療過程に対して不応性である、および／または、前記不応性ＮＳＣＬＣが、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ＪＳ００１、ＴＳＲ－０４２、ピジリズマブ、ＢＧＢ－Ａ３１７、ＳＨＲ－１２１０、ＲＥＧＮ２８１０、ＭＤＸ－１１０６、ＰＤＲ００１、クローン由来の抗ＰＤ－１：ＲＭＰ１－１４、デュルバルマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、ならびにそれらの断片からなる群から選択される、抗ＰＤ－

１抗体または抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対して不応性であり、任意選択で、前記不応性ＮＳＣＬＣが、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、イピリムマブなどの抗ＣＬＴＡ－４抗体、イピリムマブおよびペムブロリズマブなどの抗ＣＬＴＡ－４抗体、イピリムマブおよびニボルマブなどの抗ＣＬＴＡ－４抗体、デュルバルマブ、アテゾリズマブ、またはアベルマブに対して不応性である、および／または、

（ｉｉ）前記ＩＬ－２が、１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの間の初期濃度で前記第１の細胞培養培地中に存在し、任意選択で、前記ＩＬ－２が、１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの間の初期濃度で存在し、前記ＯＫＴ－３抗体が、約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で前記第２の細胞培養培地中に存在する、および／または、

（ｉｉｉ）前記初期拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、および／または、前記急速拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、および／または、

（ｉｖ）前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む、および／または、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む、および／または、

（ｖ）前記方法が、前記第３のＴＩＬ集団を前記患者に投与する前に、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含む、および／または、前記患者への前記第３のＴＩＬ集団の投与の翌日に開始するＩＬ－２レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含み、任意選択で、前記非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンが、６０ｍｇ／m^2／日の用量で２日間のシクロホスファミドの投与に続いて、２５ｍｇ／m^2／日の用量で５日間のフルダラビンを投与するステップを含む、および／または、前記ＩＬ－２レジメンが、許容範囲まで８時間ごとに１５分間のボーラス静脈内注入として投与される、６００，０００もしくは７２０，０００ＩＵ／ｋｇのアルデスロイキンを含む高用量ＩＬ－２レジメンである、

請求項１～１４のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項１６】

前記ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１抗体および化学療法剤を含む併用治療または療法に対して不応性であり、任意選択で、前記抗ＰＤ－１抗体または前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体が、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ＪＳ００１、ＴＳＲ－０４２、ピジリズマブ、ＢＧＢ－Ａ３１７、ＳＨＲ－１２１０、ＲＥＧＮ２８１０、ＭＤＸ－１１０６、ＰＤＲ００１、クローン由来の抗ＰＤ－１：ＲＭＰ１－１４、デュルバルマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、およびそれらの断片からなる群から選択される、請求項１～１５のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項１７】

（ｉ）前記化学療法剤が、白金ダブレット化学療法剤であり、任意選択で、前記白金ダブレット化学療法が、

（ａ）シスプラチンおよびカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤と、

（ｂ）ビノレルビン、ゲムシタビン、およびタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはｎａｂ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療法剤と、

を含む、および／または、

（ｉｉ）前記化学療法剤が、ペメトレキセドと組み合わされており、任意選択で、前記ＮＳＣＬＣが、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、およびシスプラチンを含む併用療法に対して不応性であるか、前記ＮＳＣＬＣが、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、シスプラチン、ニボルマブ、およびイピリムマブを含む併用療法に対して不応性である、

請求項１６に記載の薬学的組成物。

【請求項１８】

前記急速拡張が、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間中に行われる、請求項１に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本出願は、２０１８年１１月５日に出願された米国仮特許出願第６２／７５６，０２５号および２０１９年９月２０日に出願された米国仮特許出願第６２／９０３，６２７号の優先権を主張し、これらは参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【０００２】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の養子移入を使用した巨大な不応性癌の治療は、予後不良の患者の治療に対する強力なアプローチとなる。Ｇａｔｔｉｎｏｎｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００６，６，３８３－３９３。免疫療法を成功させるには多数のＴＩＬが必要であり、商品化には堅牢かつ信頼性の高いプロセスが必要である。これは、細胞拡張に関する技術、物流、および規制上の問題のために達成することが困難であった。ＩＬ－２ベースのＴＩＬ拡張とそれに続く「急速拡張プロセス」（ＲＥＰ）は、その速度および効率のためにＴＩＬ拡張の好ましい方法になっている。Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２００２，２９８，８５０－５４、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００５，２３，２３４６－５７、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００８，２６，５２３３－３９、Ｒｉｄｄｅｌｌ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ １９９２，２５７，２３８－４１、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００３，２６，３３２－４２。ＲＥＰは、フィーダー細胞としての、多くの場合、複数のドナーに由来する照射された同種異系末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ、単核細胞（ＭＮＣ）としても知られる）の大過剰（例えば、２００倍）、ならびに抗ＣＤ３抗体（ＯＫＴ３）および高用量のＩＬ－２を必要とするが、１４日間にわたってＴＩＬの１，０００倍の拡張をもたらし得る。Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００３，２６，３３２－４２。ＲＥＰ手順を受けたＴＩＬは、黒色腫を有する患者の宿主免疫抑制に続いて、養子細胞療法を成功させた。現在の注入受容パラメーターは、ＴＩＬの組成（例えば、ＣＤ２８、ＣＤ８、またはＣＤ４陽性）の読み取り値、ならびにＲＥＰ産物の倍率拡張および生存率に依存している。

【０００３】

現在のＴＩＬの製造および治療プロセスは、長さ、コスト、無菌性の懸念、および本明細書に記載される他の要因によって制限されているため、抗ＰＤ１に対して不応性であるために患者を治療する可能性は厳しく制限されている。実行可能な治療選択肢がほとんどまたはまったく残っていない患者を治療する際に使用するのに適したＴＩＬ製造プロセスおよびかかるプロセスに基づく治療法を提供することが緊急に必要である。本発明は、抗ＰＤ－１治療に対して不応性である非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）患者の治療に用いることができるＴＩＬを生成する際に使用するための短縮された製造プロセスを提供することによって、この必要性を満たす。

【発明の概要】

【０００４】

本発明は、抗ＰＤ－１治療に対して不応性である非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）患者の治療に使用するために、ＴＩＬを拡張し、治療的ＴＩＬ集団を産生するための改善および／または短縮された方法を提供する。

【０００５】

本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団で治療する方法であって、

（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者のＮＳＣＬＣ腫瘍からの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩ

Ｌ集団を取得および／または受容するステップと、
（ｃ）腫瘍断片を、第１の細胞培養培地と接触させるステップと、
（ｄ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が少なくとも５倍多く、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２を含む、ステップと、
（ｅ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第３のＴＩＬ集団が、急速拡張の開始から７日後に第２のＴＩＬ集団よりも数が少なくとも５０倍多く、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、および任意に照射された同種異系末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われる、ステップと、
（ｆ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｇ）第３のＴＩＬ集団の治療上有効な部分をＮＳＣＬＣを有する患者に投与するステップと、を含み、
ＮＳＣＬＣが、抗ＰＤ－１抗体による治療に対して不応性である、方法を提供する。

【０００６】
いくつかの実施形態では、「取得すること」は、方法および／またはプロセスで用いられるＴＩＬが、方法および／またはプロセスステップの一部として、試料（外科的切除、針生検、コア生検、小生検、もしくは他の試料を含む）から直接誘導され得ることを示す。いくつかの実施形態では、「受容すること」は、方法および／またはプロセスで用いられるＴＩＬが、試料（外科的切除、針生検、コア生検、小生検、もしくは他の試料を含む）から間接的に誘導され、次いで、方法および／またはプロセスで用いられ得る（例えば、ステップ（ａ）が、パート（ａ）に含まれていない別のプロセスによって試料から既に誘導されたＴＩＬで始まる場合、そのようなＴＩＬは、「受容済み」と称され得る）。

【０００７】
いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団は、多病変サンプリング法を含む。

【０００８】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１および／または抗ＰＤ－Ｌ２抗体で以前に治療されている。

【０００９】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されていない。

【００１０】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、化学療法剤で治療されている。

【００１１】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、化学療法剤で以前に治療されている。

【００１２】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、化学療法剤で以前に治療されている。

【００１３】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、化学療法剤で治療されているが、現在は化学療法剤で治療されていない。

【００１４】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。

【００１５】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。

【００１６】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。

【００１７】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、化学療法剤で治療されており、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。
【００１８】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、化学療法剤で治療されているが、現在は化学療法剤で治療されておらず、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。
【００１９】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。
【００２０】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。
【００２１】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、化学療法剤で治療されており、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。
【００２２】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、化学療法剤で治療されているが、現在は化学療法剤で治療されておらず、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。
【００２３】
いくつかの実施形態では、最大腫瘍直径が、横断面もしくは冠状面のいずれかで測定して７ｃｍより大きいか、または腫れたリンパ節が２０ｍｍ以上の短軸直径を有する場合、巨大腫瘤病変が示される。
【００２４】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、ネオアジュバント療法またはアジュバント療法を含まない、少なくとも２つの以前の全身治療過程に対して不応性である。
【００２５】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、イピリムマブ、ＪＳ００１、ＴＳＲ－０４２、ピジリズマブ、ＢＧＢ－Ａ３１７、ＳＨＲ－１２１０、ＲＥＧＮ２８１０、ＭＤＸ－１１０６、ＰＤＲ００１、クローン由来の抗ＰＤ－１：ＲＭＰ１－１４、米国特許第８，００８，４４９号に開示されている抗ＰＤ－１抗体、デュルバルマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、ならびにそれらの断片、誘導体、多様体、およびバイオシミラーからなる群から選択される抗ＰＤ－１抗体または抗ＰＤ－Ｌ１に対して不応性である。
【００２６】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性である。
【００２７】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、ニボルマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性である。
【００２８】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、イピリムマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性である。
【００２９】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、イピリムマブまたはそのバイオシミラー、およびペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性である。
【００３０】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、イピリムマブまたはそのバイオシミラー、およびニボルマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性である。
【００３１】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、デュルバルマブまたはそのバイオシミ

ラーに対して不応性である。
【００３２】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、アテゾリズマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性である。
【００３３】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、アベルマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性である。
【００３４】
いくつかの実施形態では、初期拡張は、２１日以内の期間にわたって行われる。
【００３５】
いくつかの実施形態では、初期拡張は、１４日以内の期間にわたって行われる。
【００３６】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの間の初期濃度で存在する。
【００３７】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの間の初期濃度で存在し、ＯＫＴ－３抗体は、第２の細胞培養培地中に約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する。
【００３８】
いくつかの実施形態では、初期拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。
【００３９】
いくつかの実施形態では、急速拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。
【００４０】
いくつかの実施形態では、第１の細胞培養培地は、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。
【００４１】
いくつかの実施形態では、第２の細胞培養培地は、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。
【００４２】
いくつかの実施形態では、この方法は、第３のＴＩＬ集団を患者に投与する前に、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。
【００４３】
いくつかの実施形態では、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンは、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与するステップを含む。
【００４４】
いくつかの実施形態では、この方法は、第３のＴＩＬ集団を患者に投与した翌日から開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。
【００４５】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、許容範囲まで８時間ごとに１５分間のボーラス静脈内注入として投与される、６００，０００もしくは７２０，０００ＩＵ／ｋｇのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくは多様体を含む高用量ＩＬ－２レジメンである。
【００４６】
いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団で治療する方法であって、
（ａ）患者から腫瘍を切除するステップであって、該腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、ステップと、

（ｂ）該腫瘍を、腫瘍断片に断片化するステップと、
（ｃ）腫瘍断片を、第１の細胞培養培地と接触させるステップと、
（ｄ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が少なくとも５倍多く、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２を含む、ステップと、
（ｅ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第３のＴＩＬ集団が、急速拡張の開始から７日後に第２のＴＩＬ集団よりも数が少なくとも５０倍多く、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、および任意に照射された同種異系末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われる、ステップと、
（ｆ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｇ）第３のＴＩＬ集団の治療上有効な部分を、癌を有する患者に投与するステップと、を含み、
癌が、抗ＰＤ－１抗体による治療に対して不応性である、方法を提供する。

【００４７】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されている。

【００４８】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されていない。

【００４９】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、化学療法剤で治療されている。

【００５０】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、化学療法剤で以前に治療されている。

【００５１】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、化学療法剤で以前に治療されている。

【００５２】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、化学療法剤で治療されているが、現在は化学療法剤で治療されていない。

【００５３】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。

【００５４】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。

【００５５】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。

【００５６】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、化学療法剤で治療されており、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。

【００５７】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、化学療法剤で治療されているが、現在は化学療法剤で治療されておらず、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。

【００５８】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。

【００５９】
いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ

１抗体で以前に治療されており、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。

【００６０】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、化学療法剤で治療されており、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。

【００６１】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、化学療法剤で治療されているが、現在は化学療法剤で治療されておらず、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。

【００６２】

いくつかの実施形態では、最大腫瘍直径が、横断面もしくは冠状面のいずれかで測定して７ｃｍより大きいか、または腫れたリンパ節が２０ｍｍ以上の短軸直径を有する場合、巨大腫瘤病変が示される。

【００６３】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、ネオアジュバント療法またはアジュバント療法を含まない、少なくとも２つの以前の全身治療過程に対して不応性である。

【００６４】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１に対して不応性であるか、または抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ＪＳ００１、ＴＳＲ－０４２、ピジリズマブ、（ＢＧＢ－Ａ３１７、ＳＨＲ－１２１０、ＲＥＧＮ２８１０、ＭＤＸ－１１０６、ＰＤＲ００１、クローン由来の抗ＰＤ－１：ＲＭＰ１－１４、米国特許第８，００８，４４９号に開示されている抗ＰＤ－１抗体、デュルバルマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、ならびにそれらの断片、誘導体、多様体、およびバイオシミラーからなる群から選択される。

【００６５】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性である。

【００６６】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、ニボルマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性である。

【００６７】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、イピリムマブまたはそのバイオシミラーなどの抗ＣＬＴＡ－４抗体に対して不応性である。

【００６８】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、イピリムマブまたはそのバイオシミラー、およびペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーなどの抗ＣＬＴＡ－４抗体に対して不応性である。

【００６９】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、イピリムマブまたはそのバイオシミラー、およびニボルマブまたはそのバイオシミラーなどの抗ＣＬＴＡ－４抗体に対して不応性である。

【００７０】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、デュルバルマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性である。

【００７１】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、アテゾリズマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性である。

【００７２】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、アベルマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性である。

【００７３】

いくつかの実施形態では、初期拡張は、２１日以内の期間にわたって行われる。

【００７４】
いくつかの実施形態では、初期拡張は、１４日以内の期間にわたって行われる。
【００７５】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの間の初期濃度で存在する。
【００７６】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの間の初期濃度で存在し、ＯＫＴ－３抗体は、第２の細胞培養培地中に約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する。
【００７７】
いくつかの実施形態では、初期拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。
【００７８】
いくつかの実施形態では、急速拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。
【００７９】
いくつかの実施形態では、第１の細胞培養培地は、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。
【００８０】
いくつかの実施形態では、第２の細胞培養培地は、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。
【００８１】
いくつかの実施形態では、この方法は、第３のＴＩＬ集団を患者に投与する前に、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。
【００８２】
いくつかの実施形態では、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンは、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与するステップを含む。
【００８３】
いくつかの実施形態では、この方法は、第３のＴＩＬ集団を患者に投与した翌日から開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。
【００８４】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、許容範囲まで８時間ごとに１５分間のボーラス静脈内注入として投与される、６００，０００もしくは７２０，０００ＩＵ／ｋｇのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくは多様体を含む高用量ＩＬ－２レジメンである。
【００８５】
いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を有する対象を治療するための方法であって、癌が、抗ＰＤ－１抗体による治療に対して不応性であり、拡張した腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を投与することを含む方法が、
（ａ）対象から得られた腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得および／または受容することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が少なくとも５０倍多く、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、および抗原提

示細胞（ＡＰＣ）を補足することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、第２のＴＩＬ集団と比較して、エフェクターＴ細胞および／またはセントラルメモリーＴ細胞の増加した亜集団を含む、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）ステップ（ｄ）から得られた治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、

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

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

（ｈ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｇ）の注入バッグから対象に投与することと、を含む、方法を提供する。

【００８６】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されている。

【００８７】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されていない。

【００８８】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、化学療法剤で治療されている。

【００８９】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、化学療法剤で以前に治療されている。

【００９０】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、化学療法剤で以前に治療されている。

【００９１】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、化学療法剤で治療されているが、現在は化学療法剤で治療されていない。

【００９２】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。

【００９３】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。

【００９４】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。

【００９５】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、化学療法剤で治療されており、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。

【００９６】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、化学療法剤で治療されているが、現在は化学療法剤で治療されておらず、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。

【００９７】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されておらず、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。

【００９８】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。

【００９９】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、化学療法剤で治療されており、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。

【０１００】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、化学療法剤で治療されているが、現在は化学療法剤で治療されておらず、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。

【０１０１】

いくつかの実施形態では、最大腫瘍直径が、横断面もしくは冠状面のいずれかで測定して７ｃｍより大きいか、または腫れたリンパ節が２０mm以上の短軸直径を有する場合、巨大腫瘤病変が示される。

【０１０２】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、ネオアジュバント療法またはアジュバント療法を含まない、少なくとも２つの以前の全身治療過程に対して不応性である。

【０１０３】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１に対して不応性であるか、または抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ＪＳ００１、ＴＳＲ－０４２、ピジリズマブ、ＢＧＢ－Ａ３１７、ＳＨＲ－１２１０、ＲＥＧＮ２８１０、ＭＤＸ－１１０６、ＰＤＲ００１、クローン由来の抗ＰＤ－１：ＲＭＰ１－１４、米国特許第８，００８，４４９号に開示されている抗ＰＤ－１抗体、デュルバルマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、ならびにそれらの断片、誘導体、多様体、およびバイオシミラーからなる群から選択される。

【０１０４】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性である。

【０１０５】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、ニボルマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性である。

【０１０６】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、イピリムマブまたはそのバイオシミラーなどの抗ＣＬＴＡ－４抗体に対して不応性である。

【０１０７】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、イピリムマブまたはそのバイオシミラー、およびペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーなどの抗ＣＬＴＡ－４抗体に対して不応性である。

【０１０８】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、イピリムマブまたはそのバイオシミラー、およびニボルマブまたはそのバイオシミラーなどの抗ＣＬＴＡ－４抗体に対して不応性である。

【０１０９】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、デュルバルマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性である。

【０１１０】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、アテゾリズマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性である。

【０１１１】

いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣは、アベルマブまたはそのバイオシミラーに対して不応性である。

【０１１２】

いくつかの実施形態では、初期拡張は、２１日以内の期間にわたって行われる。

【０１１３】

いくつかの実施形態では、初期拡張は、１４日以内の期間にわたって行われる。

【０１１４】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの間の初期濃度で存在する。

【０１１５】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの間の初期濃度で存在し、ＯＫＴ－３抗体は、第２の細胞培養培地中に約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する。

【０１１６】

いくつかの実施形態では、初期拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。

【０１１７】

いくつかの実施形態では、急速拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。

【０１１８】

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

【０１１９】

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

【０１２０】

いくつかの実施形態では、この方法は、第３のＴＩＬ集団を患者に投与する前に、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。

【０１２１】

いくつかの実施形態では、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンは、シクロホスファミドを６０ｍｇ／m^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／m^2／日の用量で５日間投与するステップを含む。

【０１２２】

いくつかの実施形態では、この方法は、第３のＴＩＬ集団を患者に投与した翌日から開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。

【０１２３】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、許容範囲まで８時間ごとに１５分間のボーラス静脈内注入として投与される、６００，０００もしくは７２０，０００ＩＵ／ｋｇのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくは多様体を含む高用量ＩＬ－２レジメンである。

【０１２４】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および化学療法剤を含む併用療法に対して不応性である。

【０１２５】

いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ＪＳ００１、ＴＳＲ－０４２、ピジリズマブ、（ＢＧＢ－Ａ３１７、ＳＨＲ－１２１０、ＲＥＧＮ２８１０、ＭＤＸ－１１０６、ＰＤＲ００１、クローン由来の抗ＰＤ－１：ＲＭＰ１－１４、米国特許第８，００８，４４９号に開示されている抗ＰＤ－１抗体、デュルバルマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、ならびにそれらの断片、誘導体、多様体、およびバイオシミラーからなる群から選択される。

【０１２６】

いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１は、ペムブロリズマブである。

【０１２７】

いくつかの実施形態では、化学療法剤（複数可）は、白金ダブレット化学療法剤である。

【０１２８】

いくつかの実施形態では、白金ダブレット療法は、

ｉ）シスプラチンおよびカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤と、

ｉｉ）ビノレルビン、ゲムシタビン、およびタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはｎａｂ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療法剤と、を含む。

【０１２９】

いくつかの実施形態では、化学療法剤は、ペメトレキセドと組み合わされている。

【０１３０】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、およびシスプラチンを含む併用療法に対して不応性である。

【０１３１】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、シスプラチン、ニボルマブ、およびイピリムマブを含む併用療法に対して不応性である。

【図面の簡単な説明】

【０１３２】

【図１】ステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的なプロセス２Ａチャート。

【図２】プロセス２Ａのプロセスフローチャート。

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

【図４】２２日間のＴＩＬ製造プロセスであるプロセス２Ａの実施形態の図を示す。

【図５】プロセス１Ｃおよびプロセス２Ａの例示的な実施形態からのステップＡ～Ｆの比較表。

【図６】プロセス１Ｃの実施形態およびプロセス２Ａの実施形態の詳細な比較。

【図７】ＮＳＣＬＣ腫瘍の例示的なＧＥＮ３型プロセス。

【図８Ａ－８Ｂ】Ａ）２Ａプロセス（およそ２２日プロセス）と、ＴＩＬ製造のためのＧｅｎ３プロセス（およそ１４日～１６日プロセス）の実施形態との比較を示す。Ｂ）ステップＡ～Ｆ（およそ１４日～１６日プロセス）の概要を提供する例示的なプロセスＧｅｎ３チャート。Ｃ）３つのプロセスバリエーションの各々について、ステップＡ～Ｆ（およそ１４日～１６日プロセス）の概要とともに３つの例示的なＧｅｎ３プロセスを提供するチャート。

【図９】ＧＥＮ２（プロセス２Ａ）とＧＥＮ３との間の比較可能性についての実験フローチャートを提供する。

【図１０Ａ－１０Ｃ】Ａ）Ｌ４０５４－Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３プロセスでのＴＩＬ産物に関する表現型の特徴付け。Ｂ）Ｌ４０５５－Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３プロセスでのＴＩＬ産物に関する表現型の特徴付け。Ｃ）Ｍ１０８５Ｔ－Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３プロセスでのＴＩＬ産物の表現型の特徴付け。

【図１１Ａ－１１Ｃ】Ａ）Ｌ４０５４－Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３プロセスからのＴＩＬ産物に関するメモリーマーカー分析。Ｂ）Ｌ４０５５－Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３プロセスからのＴＩＬ産物に関するメモリーマーカー分析。Ｃ）Ｍ１０８５Ｔ－Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３プロセスからのＴＩＬ産物に関するメモリーマーカー分析。

【図１２】Ｌ４０５４活性化および疲弊マーカー（Ａ）ＣＤ４＋でゲート、（Ｂ）ＣＤ８＋でゲート。

【図１３】Ｌ４０５５活性化および疲弊マーカー（Ａ）ＣＤ４＋でゲート、（Ｂ）ＣＤ８＋でゲート。

【図１４】ＩＦＮγ産生（ｐｇ／ｍＬ）：Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３プロセスの（Ａ）Ｌ４０５４、（Ｂ）Ｌ４０５５、および（Ｃ）Ｍ１０８５：ここに表される各棒は、刺激、非刺激、および培地対照のＩＦＮγレベルの平均＋ＳＥＭである。４５０ｎｍで測定された

光学密度。
【図１５】細胞培養上清中のＩＬ－２濃度のＥＬＩＳＡ分析：（Ａ）Ｌ４０５４および（Ｂ）Ｌ４０５５。ここに表される各棒は、使用済み培地のＩＬ－２レベルの平均＋ＳＥＭである。４５０ｎｍで測定された光学密度。
【図１６】使用済み培地中のグルコースおよび乳酸塩（ｇ／Ｌ）の定量化：（Ａ）グルコースおよび（Ｂ）乳酸塩：２つの腫瘍系統、および両方のプロセスにおいて、ＲＥＰ拡張全体でグルコースの減少が観察された。逆に、予想通り、乳酸塩の増加が観察された。グルコースの減少および乳酸塩の増加は両方とも、Ｇｅｎ２プロセスとＧｅｎ３プロセスとの間で同等であった。
【図１７】Ａ）Ｌ４０５４およびＬ４０５５の使用済み培地中のＬ－グルタミンの定量化。Ｂ）Ｌ４０５４およびＬ４０５５の使用済み培地中のＧｌｕｔａｍａｘの定量化。Ｃ）Ｌ４０５４およびＬ４０５５の使用済み培地中のアンモニアの定量化。
【図１８】テロメア長分析。相対テロメア長（ＲＴＬ）値は、ＤＡＫＯキットを使用した対照細胞株（１３０１白血病細胞株）における染色体／ゲノムあたりのテロメア蛍光を超える、Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３プロセスにおける染色体／ゲノムあたりの平均テロメア蛍光を示す。
【図１９】Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３プロセスにおけるＬ４０５４およびＬ４０５５のＴＩＬ最終産物の固有のＣＤＲ３配列分析。列は、Ｇｅｎ２（例えば、２２日目）およびＧｅｎ３プロセス（例えば、１４～１６日目）の採取日に収集された１×１０^{6}個の細胞から同定された固有のＴＣＲ　Ｂクロノタイプの数を示す。Ｇｅｎ３は、試料内の固有のペプチドＣＤＲの数に基づいて、Ｇｅｎ２と比較して高いクローン多様性を示す。
【図２０】Ｌ４０５４　ＩＬで採取した最終細胞産物（Ｇｅｎ２（例えば、２２日目）およびＧｅｎ３プロセス（例えば、１４～１６日目））での固有のＣＤＲ３配列の頻度。
【図２１】採取されたＬ４０５５　ＴＩＬ最終細胞産物（Ｇｅｎ２（例えば、２２日目）およびＧｅｎ３プロセス（例えば、１４～１６日目））での固有のＣＤＲ３配列の頻度。
【図２２】Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３プロセスにおけるＬ４０５４およびＬ４０５５のＴＩＬ最終産物の多様性指数。シャノンエントロピー多様性指数は、比較のためのより信頼性の高い一般的なメトリックである。Ｇｅｎ３　Ｌ４０５４およびＬ４０５５は、Ｇｅｎ２よりもわずかに高い多様性を示した。
【図２３】表４５に提示される７日目－Ｇｅｎ３　ＲＥＰ開始の細胞数の生データ（以下の実施例８を参照）。
【図２４】表４５に提示される１１日目－Ｇｅｎ２　ＲＥＰ開始およびＧｅｎ３スケールアップの細胞数の生データ（以下の実施例８を参照）。
【図２５】表４６に提示される１６日目－Ｇｅｎ２スケールアップおよびＧｅｎ３採取（例えば、１６日目）の細胞数の生データ（以下の実施例８を参照）。
【図２６】表４６に提示される２２日目－Ｇｅｎ２採取（例えば、２２日目）の細胞数の生データ（以下の実施例８を参照）。Ｌ４０５４　Ｇｅｎ２の場合、研究の総数であったため、ＬＯＶＯ後のカウントは４つのフラスコに外挿された。１つのフラスコが汚染され、合計＝６．６７Ｅ＋１０について外挿が行われた。
【図２７】図１０Ａ、１０Ａ、１０Ｂに示されるフローサイトメトリー結果の生データ。
【図２８】図１０Ｃおよび１０Ｃに示されるフローサイトメトリー結果の生データ。
【図２９】図１２および１３に示されるフローサイトメトリー結果の生データ。
【図３０】図１４に示されるＬ４０５４試料のＩＦＮγ産生アッセイ結果の生データ。
【図３１】図１４に示されるＬ４０５５試料のＩＦＮγ産生アッセイ結果の生データ。
【図３２】図１４に示されるＭ１０８５Ｔ試料のＩＦＮγ産生アッセイ結果の生データ。
【図３３】図１５に示されるＩＬ－２　ＥＬＩＳＡアッセイ結果の生データ。
【図３４】図１６および１７に提示される代謝基質および代謝分析結果の生データ。
【図３５】図１８に提示される相対テロメア長分析結果の生データ。
【図３６】図１９および２２に提示される固有のＣＤ３配列およびクローン多様性分析結果の生データ。

【図３７】様々なＧｅｎ２（２Ａプロセス）とＧｅｎ３．１プロセスとの実施形態の比較を示す。
【図３８】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１、およびＧｅｎ３．０プロセスの実施形態の様々な特徴を説明する表。
【図３９】Ｇｅｎ３．１と称されるＧｅｎ３プロセスの実施形態の培地条件の概要。
【図４０】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１、Ｇｅｎ３．０プロセスの実施形態の様々な特徴を説明する表。
【図４１】Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３．０プロセスの実施形態の様々な特徴を比較する表。
【図４２】記載された拡張プロセスの様々な実施形態における培地の使用を提供する表。
【図４３】表現型比較：プロセスのＧｅｎ３．０およびＧｅｎ３．１の実施形態は、同等のＣＤ２８、ＣＤ２７、およびＣＤ５７の発現を示した。
【図４４】Ｇｅｎ３最終産物でのＩＦＮγの産生の増加。培養凍結上清においてＩＦＮγ分析（ＥＬＩＳＡによる）を評価して、両方のプロセスを比較した。各腫瘍について、各Ｇｅｎ２（例えば、２２日目）およびＧｅｎ３プロセス（例えば、１６日目）で新鮮なＴＩＬ産物を使用して、コーティングされた抗ＣＤ３プレートで一晩刺激。ここに表される各棒は、刺激、非刺激、および培地対照のＩＦＮγレベルである。
【図４５】上：ＴＩＬ最終産物のための固有のＣＤＲ３配列分析：列は、Ｇｅｎ２（例えば、２２日目）およびＧｅｎ３プロセス（例えば、１４～１６日目）で収集された１×１０^{6}個の細胞から同定された固有のＴＣＲ　Ｂクロノタイプの数を示す。Ｇｅｎ３は、試料内の固有のペプチドＣＤＲの数に基づいて、Ｇｅｎ２と比較して高いクローン多様性を示す。下：ＴＩＬ最終産物の多様性指数：シャノンエントロピー多様性指数は、比較のためのより信頼性の高い一般的なメトリックである。Ｇｅｎ３は、Ｇｅｎ２よりもわずかに高い多様性を示した。
【図４６】１９９配列が、Ｇｅｎ３最終産物とＧｅｎ２最終産物との間で共有され、Ｇｅｎ３最終産物と共有されるＧｅｎ２からの固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の９７．０７％に相当する。
【図４７】１８３３配列が、Ｇｅｎ３最終産物とＧｅｎ２最終産物との間で共有され、Ｇｅｎ３最終産物と共有されるＧｅｎ２からの固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の９９．４５％に相当する。
【図４８】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図４９】Ｇｅｎ３拡張プラットフォームを使用して造血器悪性腫瘍からＴ細胞を拡張するための方法の例示的な実施形態の概略図。
【図５０】構造Ｉ－ＡおよびＩ－Ｂを提供し、円筒は、個々のポリペプチド結合ドメインを指す。構造Ｉ－ＡおよびＩ－Ｂは、例えば、４－１ＢＢＬまたは４－１ＢＢに結合する抗体から誘導される３つの線形に結合したＴＮＦＲＳＦ結合ドメインを含み、これらを折り畳んで三価タンパク質を形成し、次いでこれをＩｇＧ１－Ｆｃ（ＣＨ３およびＣＨ２ドメインを含む）によって第２の三価タンパク質に結合し、次いでこれを使用して、三価タンパク質のうちの２つをジスルフィド結合（小さい長楕円）によって一緒に結合し、構造を安定化し、６つの受容体およびシグナル伝達タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを一緒にして、シグナル伝達複合体を形成することができるアゴニストを提供する。円筒として示されるＴＮＦＲＳＦ結合ドメインは、例えば、親水性残基および柔軟性のためのＧｌｙおよびＳｅｒ配列、ならびに溶解性のためのＧｌｕおよびＬｙｓを含み得るリンカーによって接続されたＶＨおよびＶＬ鎖を含む、ｓｃＦｖドメインであり得る。
【図５１】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図５２】Ｇｅｎ３．１プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態（Ｇｅｎ３．１試験）のプロセスの概要を提供する。
【図５３】Ｇｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、Ｇｅｎ３．１試験）の例示的な実施形態について、ＴＩＬ増殖からのデータ、腫瘍断片あたりの平均総生細胞数、採取日の生存率、および採取日の総生細胞数（ＴＶＣ）を提供する。Ｇｅｎ３．１試験（０日目にＯＫＴ－３およびフィーダーの添加を含む）は、採取時にフラスコの最大容量

に達した。０日目に最大４つのフラスコを開始する場合は、各ＴＶＣ採取量に４を掛ける必要がある。

【図５４】１６日プロセスであるＧｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、Ｇｅｎ３．１試験）の例示的な実施形態について、総生細胞数（ＴＶＣ）および生存率を示す棒グラフ。

【図５５】Ｇｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１試験）の例示的な実施形態が、同等のＣＤ２８、ＣＤ２７、およびＣＤ５７発現を示す細胞を産生したことを示すデータを提供する。

【図５６】ＴＩＬメモリーステータスが、Ｇｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１試験）の例示的な実施形態によって産生された細胞間で同等であったことを示すデータを提供する。ＲＥＰ　ＴＩＬのメモリーステータスは、次のように示される。ＣＤ４＋またはＣＤ８＋ＴＩＬメモリーサブセットを異なるメモリーサブセットに分割した。ナイーブ（ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＤ６２Ｌ＋）、ＣＭ：セントラルメモリー（ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ６２Ｌ＋）、ＥＭ：エフェクターメモリー（ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ６２Ｌ－）、ＴＥＭＲＡ／ＴＥＦＦ：ＲＡ＋エフェクターメモリー／エフェクター（ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＤ６２Ｌ＋）。提示された棒グラフは、ＣＤ４＋またはＣＤ８＋でゲートされた場合の陽性ＣＤ４５＋／－ＣＤ６２Ｌ＋／－のパーセンテージである。

【図５７】ＴＩＬ活性化／疲弊マーカーが、ＣＤ４＋でゲートした場合のＧｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１試験）の例示的な実施形態によって産生された細胞間で同等であったことを示すデータを提供する。ＲＥＰ　ＴＩＬの活性化および疲弊は、マルチカラーフローサイトメトリーによって決定された。採取したＴＩＬ試料を、フローサイトメトリー抗体（ＣＤ３－ＢＵＶ３９５、ＰＤ－１－ＢＶ４２１、２Ｂ４／ＣＤ２４４－ＰＢ、ＣＤ８－ＢＢ５１５、ＣＤ２５－ＢＵＶ５６３、ＢＴＬＡ－ＰＥ、ＫＬＲＧ１－ＰＥ－Ｄａｚｚｌｅ　５９４、ＴＩＭ－３－ＢＶ６５０、ＣＤ１９４／ＣＣＲ４－ＡＰＣ、ＣＤ４－ＶｉｏＧｒｅｅｎ、ＴＩＧＩＴ－ＰｅｒＣＰ－ｅＦｌｕｏｒ　７１０、ＣＤ１８３－ＢＶ７１１、ＣＤ６９－ＡＰＣ－Ｒ７００、ＣＤ９５－ＢＵＶ７３７、ＣＤ１２７－ＰＥ－Ｃｙ７、ＣＤ１０３－ＢＶ７８６、ＬＡＧ－３－ＡＰＣ－ｅＦｌｕｏｒ　７８０）で染色した。提示される棒グラフは、ＲＥＰ　ＴＩＬのＣＤ４＋またはＣＤ８＋ＴＩＬのパーセンテージである。

【図５８】ＴＩＬ活性化／疲弊マーカーが、ＣＤ８＋でゲートした場合のＧｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１）の例示的な実施形態によって産生された細胞間で同等であったことを示すデータを提供する。ＲＥＰ　ＴＩＬの活性化および疲弊は、マルチカラーフローサイトメトリーによって決定された。採取したＴＩＬ試料を、フローサイトメトリー抗体（ＣＤ３－ＢＵＶ３９５、ＰＤ－１－ＢＶ４２１、２Ｂ４／ＣＤ２４４－ＰＢ、ＣＤ８－ＢＢ５１５、ＣＤ２５－ＢＵＶ５６３、ＢＴＬＡ－ＰＥ、ＫＬＲＧ１－ＰＥ－Ｄａｚｚｌｅ　５９４、ＴＩＭ－３－ＢＶ６５０、ＣＤ１９４／ＣＣＲ４－ＡＰＣ、ＣＤ４－ＶｉｏＧｒｅｅｎ、ＴＩＧＩＴ－ＰｅｒＣＰ－ｅＦｌｕｏｒ　７１０、ＣＤ１８３－ＢＶ７１１、ＣＤ６９－ＡＰＣ－Ｒ７００、ＣＤ９５－ＢＵＶ７３７、ＣＤ１２７－ＰＥ－Ｃｙ７、ＣＤ１０３－ＢＶ７８６、ＬＡＧ－３－ＡＰＣ－ｅＦｌｕｏｒ　７８０）で染色した。提示される棒グラフは、ＲＥＰ　ＴＩＬのＣＤ４＋またはＣＤ８＋ＴＩＬのパーセンテージである。

【図５９】Ｇｅｎ３．１最終産物によって示されるＩＦＮ－γの産生量が多いことを示すデータを提供する。培養凍結上清においてＩＦＮγ分析ＥＬＩＳＡを評価して、両方のプロセスを比較した。各腫瘍について、各採取日に新鮮なＴＩＬ産物を使用して、コーティングされた抗ＣＤ３プレートで一晩刺激。ここに表される各棒は、刺激、非刺激、および培地対照のＩＦＮγレベルである。

【図６０】上清のＩＬ－２濃度が、標準培地を使用したＧｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、Ｇｅｎ３．１試験）の例示的な実施形態にわたって同等であったことを示すデータを提供する。左パネル：Ｌ４０６３－Ｇｅｎ２標準培地。右パネル：Ｌ４０６４－ＣＴＳ　Ｏｐｔｉｍｉｚｅｒ培地。＊ＥＬＩＳＡはＡＩＭ　Ｖ希釈剤で行った

【図６１】代謝物濃度が、Ｇｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、Ｇｅｎ３．１試験）の例示的な実施形態にわたって上清上清で同等であったことを示すデータを提供する。Ｌ４０６３　ＴＩＬは標準培地中で拡張された。Ｌ４０６４　ＴＩＬはＣＴＳ　Ｏｐｔｉｍｉｚｅｒ培地中で拡張された。

【図６２】Ｇｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、Ｇｅｎ３．１試験）の例示的な実施形態に関するテロメア長分析。腫瘍識別番号Ｌ４０６３およびＬ４０６４によって産生された細胞のテロメア長分析：相対テロメア長（ＲＴＬ）値は、ＤＡＫＯキットを使用した対照細胞株（１３０１白血病細胞株）における染色体／ゲノムあたりのテロメア蛍光を超える、Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１試験プロセスによって産生された細胞における染色体／ゲノムあたりの平均テロメア蛍光を示す。

【図６３】Ｇｅｎ３．１試験（Ｇｅｎ３．１最適化）プロセス（１６～１７日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。

【図６４】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。

【図６５Ａ－６５Ｂ】例示的な差異が強調された、例示的なＧｅｎ２プロセスおよび例示的なＧｅｎ３プロセスの比較表。

【図６６】Ｇｅｎ３プロセス（１６／１７日プロセス）の調製タイムラインの例示的な実施形態の概略図。

【図６７】Ｇｅｎ３プロセス（１４～１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。

【図６８】例示的なＧｅｎ３プロセス実施形態の３回の操作的実行の１６／１７日目からのデータの要約。

【図６９】ＴＩＬの拡張表現型に関するデータ：例示的なＧｅｎ３プロセス実施形態の２回の操作的実行によって産生された細胞のＴＩＬ同一性（ＩＤ）仕様に対する分化特徴が示される。

【図７０】肺腫瘍から拡張したＴＩＬの拡張表現型に関するデータ：肺腫瘍組織を使用した例示的なＧｅｎ３プロセス実施形態の２つのプロセス開発（ＰＤ）実行によって産生された細胞のＴＩＬ同一性（ＩＤ）仕様に対する分化特徴が示される。

【図７１】卵巣腫瘍から拡張したＴＩＬの拡張表現型（純度、同一性、およびメモリー）に関するデータ：例示的なＧｅｎ２、Ｇｅｎ３．１、およびＦＲ　ＥＲ（凍結腫瘍、早期ＲＥＰ）プロセスの実施形態を使用して卵巣腫瘍から拡張した細胞の純度、同一性、およびメモリー表現型特徴が示され、＊は、試験されていない状態を示し、ＹＹは、サンプリング問題、低いＴＶＣ数、または解凍中の生存不能な細胞を示す。

【図７２】ＴＩＬの特徴付けのためのゲーティング戦略（ゲーティング階層が示される）、および例示的なＧｅｎ３プロセス実施形態の２つの操作的実行によって産生された細胞の拡張表現型特徴に関するデータが示される。

【図７３】ＴＩＬの特徴付けのためのゲーティング戦略（ゲーティング階層が示される）、および例示的なＧｅｎ３プロセス実施形態の２つの操作的実行によって産生された細胞のＣＤ４＋亜集団およびＣＤ８＋亜集団の拡張表現型特徴に関するデータが示される。

【図７４】例示的なＧｅｎ３プロセス実施形態の２回の操作的実行によって産生された細胞のグランザイムＢ　ＥＬＩＳＡ分析に関するデータが示される。

【図７５Ａ－７５Ｂ】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。

【図７６】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。

【図７７】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１、およびＧｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の実施形態の比較。

【図７８】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１、およびＧｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の実施形態の比較。

【図７９】Ｇｅｎ３実施形態の構成要素。

【図８０】Ｇｅｎ３実施形態のフローチャート比較（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、Ｇｅｎ３．１試験）。

【図８１】標準的な細胞培養培地および無血清細胞培養培地を使用した、例示的なＧｅｎ３実施形態（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１試験）について、総

生細胞数および倍率拡張が提示される。
【図８２】標準的な細胞培養培地および無血清細胞培養培地を使用した例示的なＧｅｎ３実施形態（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１試験）について、再活性化、培養スケールアップ、およびＴＩＬ採取時の生存率％スコアが提示される。
【図８３】標準的な細胞培養培地およびＣＴＳ無血清細胞培養培地を使用して、例示的なＧｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１試験）においてＬ４０６３およびＬ４０６４腫瘍試料を処理することによって産生された最終ＴＩＬ産物の表現型特徴が提示される。
【図８４】標準的な細胞培養培地およびＣＴＳ無血清細胞培養培地を使用して、例示的なＧｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１試験）においてＬ４０６３およびＬ４０６４腫瘍試料を処理することによって産生されたＴＩＬ産物のメモリーマーカー分析が提示される。
【図８５】標準的な細胞培養培地およびＣＴＳ無血清細胞培養培地を使用して、例示的なＧｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１試験）においてＬ４０６３およびＬ４０６４腫瘍試料を処理し、続いてＣＤ４＋ゲートで細胞選別することによって産生されたＴＩＬの活性化および疲弊マーカーが提示される。
【図８６】標準的な細胞培養培地およびＣＴＳ無血清細胞培養培地を使用して、例示的なＧｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１試験）においてＬ４０６３およびＬ４０６４腫瘍試料を処理し、続いてＣＤ８＋ゲートで細胞選別することによって産生されたＴＩＬの活性化および疲弊マーカーが提示される。
【図８７】標準的な細胞培養培地およびＣＴＳ無血清細胞培養培地を使用して、例示的なＧｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１試験）においてＬ４０６３およびＬ４０６４腫瘍試料を処理することによって産生された最終ＴＩＬ産物のＩＦＮ－γ産生（ｐｇ／ｍＬ）スコアが提示される。
【図８８】標準的な細胞培養培地およびＣＴＳ無血清細胞培養培地を使用して、例示的なＧｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１試験）においてＬ４０６３およびＬ４０６４腫瘍試料を処理することからの（再活性化、培養スケールアップ、およびＴＩＬ採取時に収集された）使用済み培地のＩＬ－２濃度（ｐｇ／ｍＬ）分析が提示される。
【図８９】標準的な細胞培養培地およびＣＴＳ無血清細胞培養培地を使用して、例示的なＧｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１試験）においてＬ４０６３およびＬ４０６４腫瘍試料を処理することからの（再活性化、培養スケールアップ、およびＴＩＬ採取時に収集された）使用済み培地中のグルコース濃度（ｇ／Ｌ）が提示される。
【図９０】標準的な細胞培養培地およびＣＴＳ無血清細胞培養培地を使用して、例示的なＧｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１試験）においてＬ４０６３およびＬ４０６４腫瘍試料を処理することからの（再活性化、培養スケールアップ、およびＴＩＬ採取時に収集された）使用済み培地中の乳酸塩濃度（ｇ／Ｌ）が提示される。
【図９１】標準的な細胞培養培地およびＣＴＳ無血清細胞培養培地を使用して、例示的なＧｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１試験）においてＬ４０６３およびＬ４０６４腫瘍試料を処理することからの（再活性化、培養スケールアップ、およびＴＩＬ採取時に収集された）使用済み培地中のグルタミン濃度（ｍｍｏｌ／Ｌ）が提示される。
【図９２】標準的な細胞培養培地およびＣＴＳ無血清細胞培養培地を使用して、例示的なＧｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１試験）においてＬ４０６３およびＬ４０６４腫瘍試料を処理することからの（再活性化、培養スケールアップ、およびＴＩＬ採取時に収集された）使用済み培地中のｇｌｕｔａｍａｘ濃度（ｍｍｏｌ／Ｌ）が提示される。
【図９３】標準的な細胞培養培地およびＣＴＳ無血清細胞培養培地を使用して、例示的な

Ｇｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１試験）においてＬ４０６３およびＬ４０６４腫瘍試料を処理することからの（再活性化、培養スケールアップ、およびＴＩＬ採取時に収集された）使用済み培地中のアンモニア濃度（ｍｍｏｌ／Ｌ）が提示される。Ｇｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、Ｇｅｎ３．１試験）の例示的な実施形態に関するテロメア長分析。腫瘍識別番号Ｌ４０６３およびＬ４０６４によって産生された細胞のテロメア長分析：相対テロメア長（ＲＴＬ）値は、ＤＡＫＯキットを使用した対照細胞株（１３０１白血病細胞株）の染色体／ゲノムあたりのテロメア蛍光を超える、Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１試験プロセスによって産生された細胞における染色体／ゲノムあたりの平均テロメア蛍光を示す。

【図９４】標準的な細胞培養培地およびＣＴＳ無血清細胞培養培地を使用して、Ｇｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１試験）の例示的な実施形態によって産生されたＴＩＬに関するテロメア長分析。腫瘍識別番号Ｌ４０６３およびＬ４０６４によって産生された細胞のテロメア長分析：相対テロメア長（ＲＴＬ）値は、ＤＡＫＯキットを使用した対照細胞株（１３０１白血病細胞株）における染色体／ゲノムあたりのテロメア蛍光を超える、Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１試験プロセスによって産生された細胞における染色体／ゲノムあたりの平均テロメア蛍光を示す。

【図９５】標準細胞培養培地およびＣＴＳ無血清細胞培養培地を使用したＧｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、Ｇｅｎ３．１試験）の例示的な実施形態によって産生されたＴＩＬのＴＣＲ　Ｖβレパートリーの要約。固有のＣＤＲ３配列のＴＣＲ　Ｖβレパートリーによって測定された、Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、およびＧｅｎ３．１試験プロセスによって産生された腫瘍識別番号Ｌ４０６３およびＬ４０６４によって産生された最終ＴＩＬ産物のＴＩＬのクローン性について説明される。

【図９６】Ｌ４０６３腫瘍試料の処理から採取したＴＩＬ産物中の固有のＣＤＲ３配列の頻度に関して、Ｇｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、Ｇｅｎ３．１試験）の例示的な実施形態によって産生されたＴＩＬの比較。

【図９７】Ｌ４０６３腫瘍試料の処理から採取されたＴＩＬ細胞産物中の共有される固有のＣＤＲ３配列のパーセンテージに関する、Ｇｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、Ｇｅｎ３．１試験）の例示的な実施形態によって産生されたＴＩＬの比較：９７５配列が、Ｇｅｎ３．０最終産物とＧｅｎ３．１試験最終産物との間で共有され、これは、Ｇｅｎ３．１試験最終産物と共有されるＧｅｎ３．０の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の８８％に相当する。

【図９８】Ｌ４０６４腫瘍試料の処理から採取されたＴＩＬ細胞産物中の共有される固有のＣＤＲ３配列のパーセンテージに関する、Ｇｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、Ｇｅｎ３．１試験）の例示的な実施形態によって産生されたＴＩＬの比較：２１６３配列が、Ｇｅｎ３．０最終産物とＧｅｎ３．１試験最終産物との間で共有され、これは、Ｇｅｎ３．１試験最終産物と共有されるＧｅｎ３．０の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の８７％に相当する。

【図９９】Ｌ４０６４腫瘍試料の処理から採取されたＴＩＬ産物中の固有のＣＤＲ３配列の頻度に関して、Ｇｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、Ｇｅｎ３．１試験）の例示的な実施形態によって産生されたＴＩＬの比較。

【図１００】Ｇｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３最適化、１６～１７日プロセス）の例示的な実施形態の構成要素が示される。

【図１０１】承認基準表。

【図１０２】細胞数再活性化日。

【図１０３】細胞数スケールアップ日。

【図１０４】細胞数採取Ｌ４０６３。

【図１０５】細胞数採取Ｌ４０６４。

【図１０６】フローデータ。

【図１０７】フローデータ。

【図１０８】フローデータ。
【図１０９】フローデータ。
【図１１０】ＩＦＮ－γ産生データ図７－Ｌ４０６３。
【図１１１】ＩＦＮ－γ産生データ図７－Ｌ４０６４。
【図１１２】ＩＬ－２濃度データのＥＬＩＳＡ分析。
【図１１３】代謝データ要約表。
【図１１４】要約データ。
【図１１５】要約データ。
【図１１６】シャノン多様性指数。
【０１３３】
配列表の簡単な説明
配列番号１は、ムロモナブの重鎖のアミノ酸配列である。
【０１３４】
配列番号２は、ムロモナブの軽鎖のアミノ酸配列である。
【０１３５】
配列番号３は、組み換えヒトＩＬ－２タンパク質のアミノ酸配列である。
【０１３６】
配列番号４は、アルデスロイキンのアミノ酸配列である。
【０１３７】
配列番号５は、組み換えヒトＩＬ－４タンパク質のアミノ酸配列である。
【０１３８】
配列番号６は、組み換えヒトＩＬ－７タンパク質のアミノ酸配列である。
【０１３９】
配列番号７は、組み換えヒトＩＬ－１５タンパク質のアミノ酸配列である。
【０１４０】
配列番号８は、組み換えヒトＩＬ－２１タンパク質のアミノ酸配列である。
【０１４１】
配列番号９は、ヒト４－１ＢＢのアミノ酸配列である。
【０１４２】
配列番号１０は、マウス４－１ＢＢのアミノ酸配列である。
【０１４３】
配列番号１１は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖である。
【０１４４】
配列番号１２は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖である。
【０１４５】
配列番号１３は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０１４６】
配列番号１４は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０１４７】
配列番号１５は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖ＣＤＲ１である。
【０１４８】
配列番号１６は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖ＣＤＲ２である。
【０１４９】
配列番号１７は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５

０８２５６６）の重鎖ＣＤＲ３である。
【０１５０】
配列番号１８は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０１５１】
配列番号１９は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０１５２】
配列番号２０は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０１５３】
配列番号２１は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖である。
【０１５４】
配列番号２２は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖である。
【０１５５】
配列番号２３は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０１５６】
配列番号２４は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０１５７】
配列番号２５は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖ＣＤＲ１である。
【０１５８】
配列番号２６は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖ＣＤＲ２である。
【０１５９】
配列番号２７は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖ＣＤＲ３である。
【０１６０】
配列番号２８は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０１６１】
配列番号２９は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０１６２】
配列番号３０は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０１６３】
配列番号３１は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のＦｃドメインである。
【０１６４】
配列番号３２は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１６５】
配列番号３３は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１６６】
配列番号３４は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１６７】
配列番号３５は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【０１６８】
配列番号３６は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１６９】
配列番号３７は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１７０】
配列番号３８は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１７１】
配列番号３９は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１７２】
配列番号４０は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１７３】
配列番号４１は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１７４】
配列番号４２は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のＦｃドメインである。
【０１７５】
配列番号４３は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１７６】
配列番号４４は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１７７】
配列番号４５は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１７８】
配列番号４６は、４－１ＢＢリガンド（４－１ＢＢＬ）アミノ酸配列である。
【０１７９】
配列番号４７は、４－１ＢＢＬポリペプチドの可溶性部分である。
【０１８０】
配列番号４８は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン１の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０１８１】
配列番号４９は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン１の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０１８２】
配列番号５０は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン２の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０１８３】
配列番号５１は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン２の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０１８４】
配列番号５２は、４－１ＢＢアゴニスト抗体Ｈ３９Ｅ３－２の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０１８５】
配列番号５３は、４－１ＢＢアゴニスト抗体Ｈ３９Ｅ３－２の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０１８６】
配列番号５４は、ヒトＯＸ４０のアミノ酸配列である。
【０１８７】
配列番号５５は、マウスＯＸ４０のアミノ酸配列である。
【０１８８】
配列番号５６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖である。
【０１８９】

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

【０１９０】

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

【０１９１】

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

【０１９２】

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

【０１９３】

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

【０１９４】

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

【０１９５】

配列番号６３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖ＣＤＲ１である。

【０１９６】

配列番号６４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖ＣＤＲ２である。

【０１９７】

配列番号６５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖ＣＤＲ３である。

【０１９８】

配列番号６６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖である。

【０１９９】

配列番号６７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖である。

【０２００】

配列番号６８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖可変領域（ＶＨ）である。

【０２０１】

配列番号６９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。

【０２０２】

配列番号７０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ１である。

【０２０３】

配列番号７１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ２である。

【０２０４】

配列番号７２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ３である。

【０２０５】

配列番号７３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ１である。

【０２０６】

配列番号７４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ２であ

る。
【０２０７】
配列番号７５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０２０８】
配列番号７６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖である。
【０２０９】
配列番号７７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖である。
【０２１０】
配列番号７８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０２１１】
配列番号７９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０２１２】
配列番号８０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ１である。
【０２１３】
配列番号８１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ２である。
【０２１４】
配列番号８２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ３である。
【０２１５】
配列番号８３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０２１６】
配列番号８４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０２１７】
配列番号８５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０２１８】
配列番号８６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０２１９】
配列番号８７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０２２０】
配列番号８８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖ＣＤＲ１である。
【０２２１】
配列番号８９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖ＣＤＲ２である。
【０２２２】
配列番号９０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖ＣＤＲ３である。
【０２２３】
配列番号９１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖ＣＤＲ１である。

【０２２４】
配列番号９２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０２２５】
配列番号９３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０２２６】
配列番号９４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０２２７】
配列番号９５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０２２８】
配列番号９６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖ＣＤＲ１である。
【０２２９】
配列番号９７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖ＣＤＲ２である。
【０２３０】
配列番号９８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖ＣＤＲ３である。
【０２３１】
配列番号９９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０２３２】
配列番号１００は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０２３３】
配列番号１０１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０２３４】
配列番号１０２は、ＯＸ４０リガンド（ＯＸ４０Ｌ）アミノ酸配列である。
【０２３５】
配列番号１０３は、ＯＸ４０Ｌポリペプチドの可溶性部分である。
【０２３６】
配列番号１０４は、ＯＸ４０Ｌポリペプチドの代替可溶性部分である。
【０２３７】
配列番号１０５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体００８の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０２３８】
配列番号１０６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体００８の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０２３９】
配列番号１０７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０１１の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０２４０】
配列番号１０８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０１１の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０２４１】
配列番号１０９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２１の重鎖可変領域（Ｖ

Ｈ）である。
【０２４２】
配列番号１１０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２１の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０２４３】
配列番号１１１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２３の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０２４４】
配列番号１１２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２３の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０２４５】
配列番号１１３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０２４６】
配列番号１１４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０２４７】
配列番号１１５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０２４８】
配列番号１１６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０２４９】
配列番号１１７は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０２５０】
配列番号１１８は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０２５１】
配列番号１１９は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０２５２】
配列番号１２０は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０２５３】
配列番号１２１は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０２５４】
配列番号１２２は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０２５５】
配列番号１２３は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０２５６】
配列番号１２４は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０２５７】
配列番号１２５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０２５８】

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

【０２５９】

配列番号１２７～４６２は、現在割り当てられていない。

【０２６０】

配列番号４６３は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖アミノ酸配列である。

【０２６１】

配列番号４６４は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【０２６２】

配列番号４６５は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。

【０２６３】

配列番号４６６は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。

【０２６４】

配列番号４６７は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。

【０２６５】

配列番号４６８は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。

【０２６６】

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

【０２６７】

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

【０２６８】

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

【０２６９】

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

【０２７０】

配列番号４７３は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖アミノ酸配列である。

【０２７１】

配列番号４７４は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【０２７２】

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

【０２７３】

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

【０２７４】

配列番号４７７は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。

【０２７５】

配列番号４７８は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。

【０２７６】

配列番号４７９は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。

【０２７７】

配列番号４８０は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。

【０２７８】

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

る。
【０２７９】
配列番号４８２は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２８０】
配列番号４８３は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０２８１】
配列番号４８４は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０２８２】
配列番号４８５は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０２８３】
配列番号４８６は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０２８４】
配列番号４８７は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２８５】
配列番号４８８は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２８６】
配列番号４８９は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２８７】
配列番号４９０は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２８８】
配列番号４９１は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２８９】
配列番号４９２は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２９０】
配列番号４９３は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０２９１】
配列番号４９４は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０２９２】
配列番号４９５は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０２９３】
配列番号４９６は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０２９４】
配列番号４９７は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２９５】
配列番号４９８は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２９６】
配列番号４９９は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２９７】
配列番号５００は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。

【０２９８】
配列番号５０１は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２９９】
配列番号５０２は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０３００】
配列番号５０３は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０３０１】
配列番号５０４は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０３０２】
配列番号５０５は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０３０３】
配列番号５０６は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０３０４】
配列番号５０７は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３０５】
配列番号５０８は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３０６】
配列番号５０９は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０３０７】
配列番号５１０は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３０８】
配列番号５１１は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３０９】
配列番号５１２は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【発明を実施するための形態】
【０３１０】
Ｉ．導入
急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）によってエクスビボで培養されたＴＩＬを利用した養子細胞療法は、黒色腫などの癌を有する患者の宿主免疫抑制後の養子細胞療法に成功している。現在の注入受容パラメーターは、ＴＩＬの組成（例えば、ＣＤ２８、ＣＤ８、またはＣＤ４陽性）の読み取り値、ならびにＲＥＰ産物の拡張の数値倍率および生存率に依存している。
【０３１１】
現在のＲＥＰプロトコルは、患者に注入されるＴＩＬの健康状態についてほとんど洞察を与えていない。Ｔ細胞は、ナイーブＴ細胞からエフェクターＴ細胞への成熟の過程で、重大な代謝シフトを起こす（Ｃｈａｎｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１６，１７，３６４を参照、その全体が本明細書に明示的に組み込まれ、特に考察のために、ならびに嫌気性および好気性代謝のマーカー）。例えば、ナイーブＴ細胞は、ミトコンドリア呼吸に依存してＡＴＰを産生するが、ＴＩＬなどの成熟した健康なエフェクターＴ細胞は、高度に解糖系であり、好気性解糖に依存して増殖、移動、活性化、および抗腫瘍効果に必要な生体エネルギー基質を提供する。
【０３１２】

現在のＴＩＬの製造および治療プロセスは、長さ、コスト、無菌性の懸念、および本明細書に記載される他の要因によって制限されているため、抗ＰＤ１に対して不応性であるために患者を治療する可能性は厳しく制限されている。実行可能な治療選択肢がほとんどまたはまったく残っていない患者を治療する際に使用するのに適したＴＩＬ製造プロセスおよびかかるプロセスに基づく治療法を提供することが緊急に必要である。本発明は、抗ＰＤ－１治療に対して不応性である非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）患者の治療に用いることができるＴＩＬを生成する際に使用するための短縮された製造プロセスを提供することによって、この必要性を満たす。

【０３１３】

ＩＩ．定義

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

【０３１４】

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

【０３１５】

「インビボ」という用語は、対象の体内で起こる事象を指す。

【０３１６】

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

【０３１７】

「エクスビボ」という用語は、対象の体から除去された細胞、組織、および／または器官に対して治療する、または処置を行うことを伴う事象を指す。適切には、細胞、組織、および／または器官は、外科手術または治療の方法で対象の体に戻され得る。

【０３１８】

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

【０３１９】

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

【０３２０】

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

【０３２１】

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

【０３２２】

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

【０３２３】

ＴＩＬは、一般に、細胞表面マーカーを使用して生化学的に定義され得るか、または腫瘍に浸潤して治療を行う能力によって機能的に定義され得る。ＴＩＬは、一般に、ＣＤ４、ＣＤ８、ＴＣＲαβ、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ５６、ＣＣＲ７、ＣＤ４５Ｒａ、ＣＤ９５、ＰＤ－１、およびＣＤ２５のうちの１つ以上のバイオマーカーを発現させることによって分類され得る。加えておよび代替的に、ＴＩＬは、患者への再導入時に固形腫瘍に浸潤する能力によって機能的に定義することができる。

【０３２４】

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

【０３２５】

「セントラルメモリーＴ細胞」という用語は、ヒトではＣＤ４５Ｒ０＋であり、ＣＣＲ７（ＣＣＲ７^{hi}）およびＣＤ６２Ｌ（ＣＤ６２^{hi}）を構成的に発現するＴ細胞のサブセットを指す。セントラルメモリーＴ細胞の表面表現型には、ＴＣＲ、ＣＤ３、ＣＤ１２７（ＩＬ－７Ｒ）、およびＩＬ－１５Ｒも含まれる。セントラルメモリーＴ細胞の転写因子には、ＢＣＬ－６、ＢＣＬ－６Ｂ、ＭＢＤ２、およびＢＭＩ１が含まれる。セントラルメモリーＴ細胞は、ＴＣＲトリガー後、主にエフェクター分子としてＩＬ－２およびＣＤ４０Ｌを分泌する。セントラルメモリーＴ細胞は、血液中のＣＤ４コンパートメントで優勢であり、ヒトではリンパ節および扁桃腺において比例して濃縮される。

【０３２６】

「エフェクターメモリーＴ細胞」という用語は、セントラルメモリーＴ細胞と同様にＣＤ４５Ｒ０＋であるが、ＣＣＲ７の構成的発現を失い（ＣＣＲ７^{lo}）、ＣＤ６２Ｌ発現が不均一であるかまたは低い（ＣＤ６２Ｌ^{lo}）、ヒトまたは哺乳動物Ｔ細胞のサブセットを指す。セントラルメモリーＴ細胞の表面表現型には、ＴＣＲ、ＣＤ３、ＣＤ１２７（ＩＬ－７Ｒ）、およびＩＬ－１５Ｒも含まれる。セントラルメモリーＴ細胞の転写因子には、ＢＬＩＭＰ１が含まれる。エフェクターメモリーＴ細胞は、抗原刺激後に高レベルの炎症性サイトカイン（インターフェロン－γ、ＩＬ－４、およびＩＬ－５を含む）を急速に分泌する。エフェクターメモリーＴ細胞は、血液中のＣＤ８コンパートメントで優勢で

あり、ヒトでは肺、肝臓、および腸において比例して濃縮される。ＣＤ８＋エフェクターメモリーＴ細胞は、大量のパーフォリンを担持する。

【０３２７】

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

【０３２８】

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

【０３２９】

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

【０３３０】

「末梢血リンパ球」および「ＰＢＬ」という用語は、末梢血から拡張したＴ細胞を指す。いくつかの実施形態では、ＰＢＬは、ドナーからの全血またはアフェレーシス産物から分離される。いくつかの実施形態では、ＰＢＬは、ＣＤ３＋ＣＤ４５＋のＴ細胞表現型などのＴ細胞表現型の正または負の選択によって、ドナーからの全血またはアフェレーシス産物から分離される。

【０３３１】

「抗ＣＤ３抗体」という用語は、抗体またはその多様体、例えば、モノクローナル抗体を指し、成熟Ｔ細胞のＴ細胞抗原受容体のＣＤ３受容体に対して向けられるヒト、ヒト化、キメラ、またはマウス抗体を含む。抗ＣＤ３抗体には、ムロモナブとしても知られるＯＫＴ－３が含まれる。抗ＣＤ３抗体には、Ｔ３およびＣＤ３εとしても知られるＵＨＣＴ１クローンも含まれる。他の抗ＣＤ３抗体には、例えば、オテリキシズマブ、テプリズマブ、およびビシリズマブが含まれる。

【０３３２】

「ＯＫＴ－３」（本明細書では「ＯＫＴ３」とも称される）という用語は、成熟Ｔ細胞のＴ細胞抗原受容体中のＣＤ３受容体に対して向けられるヒト、ヒト化、キメラ、またはマウス抗体を含む、モノクローナル抗体またはそのバイオシミラーもしくは多様体を指し、ＯＫＴ－３（３０ｎｇ／ｍＬ、ＭＡＣＳ ＧＭＰ ＣＤ３ ｐｕｒｅ、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）およびムロモナブもしくは多様体、保存的アミノ酸置換、グリコフォーム、またはそれらのバイオシミラーなどの市販の形態を含む。ムロモナブの重鎖および軽鎖のアミノ酸配列を表１に示す（配列番号１および配列番号２）。ＯＫＴ－３を産生することができるハイブリドーマは、アメリカンタイプカルチャーコレクション（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）に寄託され、ＡＴＣＣ受託番号ＣＲＬ８００１が割り当てられている。ＯＫＴ－３を産生することができるハイブリドーマは、Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ａｕｔｈｅｎｔｉｃａｔｅｄ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ（ＥＣＡＣＣ）にも寄託され、カタログ番号８６０２２７０６が割り当てられている。

【表１】

表１．ムロモナブのアミノ酸配列。

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

【０３３３】

「ＩＬ－２」（本明細書では「ＩＬ２」とも称される）という用語は、インターロイキン－２として知られるＴ細胞成長因子を指し、ヒトおよび哺乳動物の形態、保存的アミノ酸置換、グリコフォーム、バイオシミラー、およびそれらの多様体を含む、すべての形態のＩＬ－２を含む。ＩＬ－２は、例えば、Ｎｅｌｓｏｎ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００４，１７２，３９８３－８８およびＭａｌｅｋ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００８，２６，４５３－７９に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に適した組み換えヒトＩＬ－２のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号３）。例えば、ＩＬ－２という用語は、アルデスロイキン（ＰＲＯＬＥＵＫＩＮ、単回使用バイアルあたり２２００万ＩＵで複数の供給業者から市販されている）などのヒト組み換え形態のＩＬ－２、ならびにＣｅｌｌＧｅｎｉｘ，Ｉｎｃ．，Ｐｏｒｔｓｍｏｕｔｈ，ＮＨ，ＵＳＡ（ＣＥＬＬＧＲＯ　ＧＭＰ）またはＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ　ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ　Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ　Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡによって市販されている組み換えＩＬ－２の形態（カタログ番号ＣＹＴ－２０９－ｂ）および他のベンダーからの他の商用同等物を包含する。アルデスロイキン（デス－アラニル－１、セリン－１２５ヒトＩＬ－２）は、およそ１５ｋＤａの分子量を有する非グリコシル化ヒト組み換え形態のＩＬ－２である。本発明での使用に適したアルデスロイキンのアミノ酸配列を表２に示す（配列番号４）。ＩＬ－２という用語はまた、Ｎｅｋｔａｒ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（Ｓｏｕｔｈ　Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）から入手可能なペグ化ＩＬ２プロドラッグＮＫＴＲ－２１４を含む、本明細書に記載されるペグ化形態のＩＬ－２を包含する。本発明での使用に適したＮＫＴＲ－２１４およびペグ化ＩＬ－２は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１４／０３２８７９１Ａ１号および国際特許出願公開番号ＷＯ２０１２／０６５０８６Ａ１号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に適したコンジュゲートＩＬ－２の代替形態は、米国特許第４，７６６，１０６号、第５，２０６，３４４号、第５，０８９，２６１号、および第４，９０２，５０２号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に適したＩＬ－２の製剤は、米国特許第６，７０６，２８９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【表２】

表２．インターロイキンのアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号３ 組み換えヒトＩＬ－２（ｒｈＩＬ－２）	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
配列番号４ アルデスロイキン	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
配列番号５ 組み換えヒトＩＬ－４ （ｒｈＩＬ－４）	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREKYSKCSS 130
配列番号６ 組み換えヒトＩＬ－７ （ｒｈＩＬ－７）	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH 153
配列番号７ 組み換えヒトＩＬ－１５ （ｒｈＩＬ－１５）	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115
配列番号８ 組み換えヒトＩＬ－２１ （ｒｈＩＬ－２１）	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132

【０３３４】

「ＩＬ－４」（本明細書では「ＩＬ４」とも称される）という用語は、インターロイキン４として知られるサイトカインを指し、これは、Ｔｈ２　Ｔ細胞ならびに好酸球、好塩基球、および肥満細胞によって産生される。ＩＬ－４は、ナイーブヘルパーＴ細胞（Ｔｈ０細胞）からＴｈ２　Ｔ細胞への分化を調節する。Ｓｔｅｉｎｋｅ　ａｎｄ　Ｂｏｒｉｓｈ，Ｒｅｓｐｉｒ．Ｒｅｓ．２００１，２，６６－７０。ＩＬ－４によって活性化されると、その後Ｔｈ２　Ｔ細胞は、正のフィードバックループで追加のＩＬ－４を産生する。ＩＬ－４はまた、Ｂ細胞増殖およびクラスＩＩ　ＭＨＣ発現を刺激し、Ｂ細胞からのＩｇＥおよびＩｇＧ$_1$の発現へのクラス切り替えを誘導する。本発明での使用に適した組み換えヒトＩＬ－４は、ＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ　ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ　Ｌｔｄ．，ＥａｓｔＢｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡ（カタログ番号ＣＹＴ－２１１）およびＴｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ（ヒトＩＬ－１５組み換えタンパク質、カタログ番号Ｇｉｂｃｏ　ＣＴＰ００４３）を含む、複数の供給元から市販されている。本発明での使用に適した組み換えヒトＩＬ－４のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号５）。

【０３３５】

「ＩＬ－７」（本明細書では「ＩＬ７」とも称される）という用語は、インターロイキン７として知られるグリコシル化組織由来のサイトカインを指し、これは、間質細胞および上皮細胞、ならびに樹状細胞から得ることができる。Ｆｒｙ　ａｎｄ　Ｍａｃｋａｌｌ，Ｂｌｏｏｄ　２００２，９９，３８９２－９０４。ＩＬ－７は、Ｔ細胞の発達を刺激する

ことができる。ＩＬ－７は、ＩＬ－７受容体αおよび共通γ鎖受容体からなるヘテロ二量体であるＩＬ－７受容体に結合し、これは、胸腺内のＴ細胞の発達および末梢内の生存に重要な一連のシグナルである。本発明での使用に適した組み換えヒトＩＬ－７は、ＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡ（カタログ番号ＣＹＴ－２５４）およびＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ（ヒトＩＬ－１５組み換えタンパク質、カタログ番号Ｇｉｂｃｏ ＰＨＣ００７１）を含む、複数の供給元から市販されている。本発明での使用に適した組み換えヒトＩＬ－７のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号６）。

【０３３６】

「ＩＬ－１５」（本明細書では「ＩＬ１５」とも称される）という用語は、インターロイキン－１５として知られるＴ細胞成長因子を指し、ヒトおよび哺乳動物の形態、保存的アミノ酸置換、グリコフォーム、バイオシミラー、およびそれらの多様体を含む、すべての形態のＩＬ－２を含む。ＩＬ－１５は、例えば、Ｆｅｈｎｉｇｅｒ ａｎｄ Ｃａｌｉｇｉｕｒｉ，Ｂｌｏｏｄ ２００１，９７，１４－３２に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＩＬ－１５は、βおよびγシグナル伝達受容体サブユニットをＩＬ－２と共有する。組み換えヒトＩＬ－１５は、１２．８ｋＤａの分子量を有する１１４アミノ酸（およびＮ末端メチオニン）を含有する単一の非グリコシル化ポリペプチド鎖である。組み換えヒトＩＬ－１５は、ＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡ（カタログ番号ＣＹＴ－２３０－ｂ）およびＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ（ヒトＩＬ－１５組み換えタンパク質、カタログ番号３４－８１５９－８２）を含む、複数の供給元から市販されている。本発明での使用に適した組み換えヒトＩＬ－１５のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号７）。

【０３３７】

「ＩＬ－２１」（本明細書では「ＩＬ２１」とも称される）という用語は、インターロイキン－２１として知られる多面発現サイトカインタンパク質を指し、ヒトおよび哺乳動物の形態、保存的アミノ酸置換、グリコフォーム、バイオシミラー、およびそれらの多様体を含む、すべての形態のＩＬ－２１を含む。ＩＬ－２１は、例えば、Ｓｐｏｌｓｋｉ ａｎｄ Ｌｅｏｎａｒｄ，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｄｒｕｇ．Ｄｉｓｃ．２０１４，１３，３７９－９５に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＩＬ－２１は、主にナチュラルキラーＴ細胞および活性化ヒトＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞によって産生される。組み換えヒトＩＬ－２１は、１５．４ｋＤａの分子量を有する１３２アミノ酸を含有する単一の非グリコシル化ポリペプチド鎖である。組み換えヒトＩＬ－２１は、ＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡ（カタログ番号ＣＹＴ－４０８－ｂ）およびＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ（ヒトＩＬ－２１組み換えタンパク質、カタログ番号１４－８２１９－８０）を含む、複数の供給元から市販されている。本発明での使用に適した組み換えヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号８）。

【０３３８】

「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」、または「治療量」が示された場合、投与される本発明の組成物の正確な量は、年齢、体重、腫瘍の大きさ、感染または転移の程度、および患者（対象）の状態の個人差を考慮して、医師が決定することができる。一般に、本明細書に記載される腫瘍浸潤リンパ球（例えば、二次ＴＩＬまたは遺伝子改変された細胞傷害性リンパ球）は、体重１ｋｇあたり10^{4}～10^{11}細胞（例えば、体重１ｋｇあたり10^{5}～10^{6}、10^{5}～10^{10}、10^{5}～10^{11}、10^{6}～10^{10}、10^{6}～10^{11}、10^{7}～10^{11}、10^{7}～10^{10}、10^{8}～10^{11}、10^{8}～10^{10}、10^{9}～10^{11}、または10^{9}～10^{10}細胞）（それらの範囲内のすべての整数値を含む）の投与量で投与され得る。腫瘍浸潤リンパ球（場合によっては、遺伝子改変された細胞傷害性

リンパ球を含む）組成物もまた、これらの投与量で複数回投与され得る。腫瘍浸潤リンパ球（場合によっては遺伝的を含む）は、免疫療法で一般的に知られている注入技法を使用することによって投与することができる（例えば、Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｗ Ｅｎｇ．Ｊ．ｏｆ Ｍｅｄ．３１９：１６７６，１９８８を参照）。特定の患者に最適な投与量および治療レジメンは、疾患の兆候について患者を監視し、それに応じて治療を調整することにより、医学の当業者によって容易に決定することができる。

【０３３９】

「血液学的悪性腫瘍」、「血液系悪性腫瘍」という用語または相関する意味の用語は、血液、骨髄、リンパ節、およびリンパ系の組織を含むがこれらに限定されない造血およびリンパ組織の哺乳動物の癌および腫瘍を指す。血液学的悪性腫瘍はまた、「液体腫瘍」と称される。血液学的悪性腫瘍には、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ性リンパ腫（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、急性単球性白血病（ＡＭｏＬ）、ホジキンリンパ腫、および非ホジキンリンパ腫が含まれ得るが、これらに限定されない。「Ｂ細胞血液学的悪性腫瘍」という用語は、Ｂ細胞に影響を与える血液学的悪性腫瘍を指す。

【０３４０】

「液体腫瘍」という用語は、本質的に流動性である細胞の異常な塊を指す。液体腫瘍癌には、白血病、骨髄腫、およびリンパ腫、ならびに他の血液学的悪性腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。液体腫瘍から得られたＴＩＬは、本明細書では骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）と称されることもある。末梢血中で循環する液体腫瘍を含む、液体腫瘍から得られるＴＩＬは、本明細書ではＰＢＬと称されることもある。ＭＩＬ、ＴＩＬ、およびＰＢＬという用語は、本明細書では互換的に使用され、細胞が由来する組織タイプに基づいてのみ異なる。

【０３４１】

本明細書で使用される「微小環境」という用語は、全体としての固形もしくは血液学的腫瘍微小環境、または微小環境内の細胞の個々のサブセットを指す場合がある。本明細書で使用される腫瘍微小環境は、Ｓｗａｒｔｚ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，２０１２，７２，２４７３に記載されるように、「細胞、可溶性因子、シグナル伝達分子、細胞外マトリックス、および腫瘍性形質転換を促進し、腫瘍の成長および浸潤をサポートし、腫瘍を宿主免疫から保護し、治療抵抗性を促進し、優勢な転移が成功するためのニッチを提供する機械的手がかり」の複雑な混合物を指す。腫瘍はＴ細胞によって認識されるべき抗原を発現するが、微小環境による免疫抑制のため、免疫系による腫瘍クリアランスはまれである。

【０３４２】

実施形態では、本発明は、ＴＩＬの集団で癌を治療する方法を含み、患者は、本発明によるＴＩＬの注入の前に非骨髄破壊的化学療法で予め治療される。いくつかの実施形態では、患者が本発明によるＴＩＬの注入の前に非骨髄破壊的化学療法で予め治療される、ＴＩＬの集団が提供され得る。実施形態では、非骨髄破壊的化学療法は、シクロホスファミド６０ｍｇ／ｋｇ／日で２日間（ＴＩＬ注入の２７日前および２６日前）、ならびにフルダラビン２５ｍｇ／ｍ２／日で５日間（ＴＩＬ注入の２７日前～２３日前）である。実施形態では、本発明による非骨髄破壊的化学療法およびＴＩＬ注入（０日目）の後、患者は、生理学的許容範囲まで８時間ごとに７２０，０００ＩＵ／ｋｇでＩＬ－２の静脈内注入を受ける。

【０３４３】

実験結果は、腫瘍特異的Ｔリンパ球の養子移入前のリンパ球枯渇が、調節性Ｔ細胞および免疫系の競合要素（「サイトカインシンク」）を排除することによって治療効果を高める上で重要な役割を果たすことを示している。したがって、本発明のいくつかの実施形態は、本発明のｒＴＩＬを導入する前に、患者に対してリンパ球枯渇ステップ（「免疫抑制コンディショニング」と称されることもある）を利用する。

【０３４４】

「有効量」または「治療有効量」という用語は、疾患治療を含むがこれに限定されない、意図された用途を達成するのに十分である、本明細書に記載の化合物または化合物の組み合わせの量を指す。治療有効量は、意図される用途（インビトロもしくはインビボ）、または治療される対象および病状（例えば、対象の体重、年齢、および性別）、病状の重症度、または投与方法に応じて異なり得る。この用語はまた、標的細胞において特定の応答（例えば、血小板粘着および／または細胞遊走の低減）を誘導する用量にも適用される。特定の用量は、選択された特定の化合物、従うべき投薬レジメン、化合物が他の化合物と組み合わせて投与されるかどうか、投与のタイミング、それが投与される組織、および化合物が運ばれる物理的送達系に応じて異なる。

【０３４５】

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

【０３４６】

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

【０３４７】

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

ォルトパラメーターが使用される。

【０３４８】

本明細書で使用される場合、「多様体」という用語は、参照抗体のアミノ酸配列内または隣接する特定の位置における１つ以上の置換、欠失、および／または付加によって参照抗体のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む抗体または融合タンパク質を包含するが、これらに限定されない。多様体は、参照抗体のアミノ酸配列と比較して、そのアミノ酸配列に１つ以上の保存的置換を含み得る。保存的置換は、例えば、同様に荷電または非荷電のアミノ酸の置換を含み得る。多様体は、参照抗体の抗原に特異的に結合する能力を保持している。多様体という用語には、ペグ化抗体またはタンパク質も含まれる。

【０３４９】

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

【０３５０】

ＴＩＬは、一般に、細胞表面マーカーを使用して生化学的に定義され得るか、または腫瘍に浸潤して治療を行う能力によって機能的に定義され得る。ＴＩＬは、一般に、ＣＤ４、ＣＤ８、ＴＣＲαβ、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ５６、ＣＣＲ７、ＣＤ４５Ｒａ、ＣＤ９５、ＰＤ－１、およびＣＤ２５のうちの１つ以上のバイオマーカーを発現させることによって分類され得る。加えておよび代替的に、ＴＩＬは、患者への再導入時に固形腫瘍に浸潤する能力によって機能的に定義することができる。ＴＩＬは、効力によってさらに特徴付けることができ、例えば、インターフェロン（ＩＦＮ）の放出が、約５０ｐｇ／ｍＬを超える、約１００ｐｇ／ｍＬを超える、約１５０ｐｇ／ｍＬを超える、または約２００ｐｇ／ｍＬを超える場合、ＴＩＬは強力であるとみなすことができる。

【０３５１】

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

【０３５２】

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

【０３５３】

「薬学的に許容される担体」または「薬学的に許容される賦形剤」という用語は、ありとあらゆる溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅

延剤、ならびに不活性成分を含むことが意図される。医薬品有効成分のためのかかる薬学的に許容される担体または薬学的に許容される賦形剤の使用は、当該技術分野で周知である。任意の従来の薬学的に許容される担体または薬学的に許容される賦形剤が医薬品有効成分と適合しない場合を除いて、本発明の治療用組成物におけるその使用が企図される。他の薬物などの追加の医薬品有効成分を、記載された組成物および方法に組み込むこともできる。

【０３５４】

「約」および「およそ」という用語は、統計的に意味のある値の範囲内を意味する。かかる範囲は、所与の値または範囲の１桁以内、好ましくは５０％以内、より好ましくは２０％以内、より好ましくは依然として１０％以内、さらにより好ましくは５％以内であり得る。「約」または「およそ」という用語によって包含される許容される変動は、研究中の特定のシステムに依存し、当業者によって容易に理解することができる。さらに、本明細書で使用される場合、「約」および「およそ」という用語は、寸法、サイズ、配合、パラメーター、形状、ならびに他の量および特徴が正確でなく、また正確である必要はないが、およその、かつ／またはより大きいもしくは小さい場合があり、必要に応じて、公差、変換係数、四捨五入、測定誤差など、および当業者に知られている他の要因を反映する。一般に、寸法、サイズ、配合、パラメーター、形状、または他の量もしくは特徴は、そのように明示的に述べられているかどうかにかかわらず、「約」または「およそ」である。非常に異なるサイズ、形状、および寸法の実施形態は、記載された配置を採用し得ることに留意されたい。

【０３５５】

添付の特許請求の範囲で使用される場合、「含む」、「から本質的になる」、および「からなる」という移行語は、元の形式および補正された形式で、記載されていない追加のクレーム要素またはステップに関して特許請求の範囲を定義し、もしあれば特許請求の範囲から除外される。「含む」という用語は、包括的または自由形式であることが意図されており、いかなる追加の、記載されていない要素、方法、ステップ、または材料を除外するものではない。「からなる」という用語は、特許請求の範囲で指定されたもの以外のいかなる要素、ステップ、または材料、および後者の場合、指定された材料（複数可）に通常関連する不純物も除外する。「から本質的になる」という用語は、特許請求の範囲を、特定の要素、ステップ、または材料（複数可）、および特許請求された発明の基本的および新規の特徴（複数可）に実質的に影響を与えないものに限定する。本発明を具体化する本明細書に記載のすべての組成物、方法、およびキットは、代替の実施形態において、「含む」、「から本質的になる」、および「からなる」という移行語のうちのいずれかによってより具体的に定義することができる。

【０３５６】

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

合を媒介し得る。

【０３５７】

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

【０３５８】

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

【０３５９】

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

【０３６０】

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

【０３６１】

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

【０３６２】

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

【０３６３】

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

【０３６４】

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

【０３６５】

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

【０３６６】

「ヒト化抗体」、「ヒト化抗体（複数）」、および「ヒト化」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系に由来するＣＤＲ配列が、ヒトフレームワーク配列に移植されている抗体を指すことを意図している。追加のフレームワーク領域の修飾は、ヒトフレームワーク配列内で行うことができる。非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの

場合、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、レシピエントの超可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、ウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）または非ヒト霊長類の１５超可変領域からの残基によって置き換えられる。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク（ＦＲ）残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体には見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体の性能をさらに向上させるために行われる。一般に、ヒト化抗体は、超可変ループのすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、ＦＲ領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的すべてを含むことになる。ヒト化抗体はまた、任意に、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含むであろう。さらなる詳細については、Ｊｏｎｅｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ １９８６，３２１，５２２－５２５、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ １９８８，３３２，３２３－３２９、およびＰｒｅｓｔａ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．１９９２，２，５９３－５９６を参照されたい。本明細書に記載される抗体はまた、エフェクター機能および／またはＦｃＲ結合の改善（例えば、低減）を与えることが知られている任意のＦｃ多様体を用いるように修飾され得る。Ｆｃ多様体は、例えば、国際特許出願公開第ＷＯ１９８８／０７０８９Ａ１号、同第ＷＯ１９９６／１４３３９Ａ１号、同第ＷＯ１９９８／０５７８７Ａ１号、同第ＷＯ１９９８／２３２８９Ａ１号、同第ＷＯ１９９９／５１６４２Ａ１号、同第ＷＯ９９／５８５７２Ａ１号、同第ＷＯ２０００／０９５６０Ａ２号、同第ＷＯ２０００／３２７６７Ａ１号、同第ＷＯ２０００／４２０７２Ａ２号、同第ＷＯ２００２／４４２１５Ａ２号、同第ＷＯ２００２／０６０９１９Ａ２号、同第ＷＯ２００３／０７４５６９Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０１６７５０Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０２９２０７Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０３５７５２Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０６３３５１Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０７４４５５Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０９９２４９Ａ２号、同第ＷＯ２００５／０４０２１７Ａ２号、同第ＷＯ２００５／０７０９６３Ａ１号、同第ＷＯ２００５／０７７９８１Ａ２号、同第ＷＯ２００５／０９２９２５Ａ２号、同第ＷＯ２００５／１２３７８０Ａ２号、同第ＷＯ２００６／０１９４４７Ａ１号、同第ＷＯ２００６／０４７３５０Ａ２号、および同第ＷＯ２００６／０８５９６７Ａ２号、ならびに米国特許第５，６４８，２６０号、同第５，７３９，２７７号、同第５，８３４，２５０号、同第５，８６９，０４６号、同第６，０９６，８７１号、同第６，１２１，０２２号、同第６，１９４，５５１号、同第６，２４２，１９５号、同第６，２７７，３７５号、同第６，５２８，６２４号、同第６，５３８，１２４号、同第６，７３７，０５６号、同第６，８２１，５０５号、同第６，９９８，２５３号、および同第７，０８３，７８４号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるアミノ酸置換のうちのいずれか１つを含み得る。

【０３６７】

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

【０３６８】

「二重特異性抗体（ｄｉａｂｏｄｙ）」は、２つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片である。断片は、同じポリペプチド鎖（V_H－V_LまたはV_L－V_H）中に軽鎖可変ドメイン（V_L）に接続された重鎖可変ドメイン（V_H）を含む。同じ鎖上の２つのドメインをペアリングするには短すぎるリンカーを使用すると、ドメインは別のチェーンの相補ドメインとペアリングさせられ、２つの抗原結合部位が作成される。二重特異性抗体は、例えば、欧州特許第ＥＰ４０４，０９７号、国際特許公開第ＷＯ９３／１１１６１号、およびＢｏｌｌｉｇｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １９９３，９０，６４４４－６４４８においてより完全に記載されている。

【０３６９】

「グリコシル化」という用語は、抗体の修飾誘導体を指す。非グリコシル化抗体は、グリコシル化を欠いている。グリコシル化は、例えば、抗原に対する抗体の親和性を増加させるように変化され得る。かかる炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内の１つ以上のグリコシル化部位を変化させることによって達成され得る。例えば、１つ以上の可変領域フレームワークのグリコシル化部位の排除をもたらす、１つ以上のアミノ酸置換を行ない、それによってその部位でのグリコシル化を排除することができる。米国特許第５，７１４，３５０号および同第６，３５０，８６１号に記載されているように、非グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を高める可能性がある。加えてまたは代替的に、改変した種類のグリコシル化を有する抗体、例えば、フコシル残基の量が低減した低フコシル化抗体または二分ＧｌｃＮａｃ構造が増加した抗体が作製され得る。かかるグリコシル化パターンの変化は、抗体の能力を増加させることが実証されている。かかる炭水化物修飾は、例えば、抗体をグリコシル化機構が変化した宿主細胞で発現させることによって達成され得る。グリコシル化機構が変化した細胞については、当該技術分野で説明されており、本発明の組み換え抗体を発現させ、それによりグリコシル化が変化した抗体を産生する宿主細胞として使用され得る。例えば、Ｍｓ７０４、Ｍｓ７０５、およびＭｓ７０９細胞株で発現される抗体が、それらの炭水化物上のフコースを欠くように、細胞株Ｍｓ７０４、Ｍｓ７０５、およびＭｓ７０９は、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子ＦＵＴ８（α（１，６）フコシルトランスフェラーゼ）を欠く。Ｍｓ７０４、Ｍｓ７０５、およびＭｓ７０９　ＦＵＴ８－／－細胞株は、２つの置換ベクターを使用したＣＨＯ／ＤＧ４４細胞中のＦＵＴ８遺伝子の標的破壊によって作成された（例えば、米国特許公開第２００４／０１１０７０４号またはＹａｍａｎｅ－Ｏｈｎｕｋｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．，２００４，８７，６１４－６２２を参照）。別の例として、欧州特許第ＥＰ１，１７６，１９５号は、フコシルトランスフェラーゼをコードし、それによりかかる細胞株で発現される抗体が、α１，６結合関連酵素を低減または排除することによって低フコシル化を示す、機能的に破壊されたＦＵＴ８遺伝子を有する細胞株を説明しており、抗体のＦｃ領域に結合するＮ－アセチルグルコサミンにフコースを付加するための酵素活性が低いか、または酵素活性を有しない細胞株、例えばラット骨髄腫細胞株ＹＢ２／０（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１６６２）についても説明している。国際特許公開第ＷＯ０３／０３５８３５号は、フコースをＡｓｎ（２９７）結合型炭水化物に付着させる能力が低減し、さらにその宿主細胞で発現される抗体の低フコシル化ももたらす多様体ＣＨＯ細胞株、Ｌｅｃ１３細胞について説明している（Ｓｈｉｅｌｄｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２００２，２７７，２６７３３－２６７４０も参照）。国際特許公開第ＷＯ９９／５４３４２号は、糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ（例えば、β（１，４）－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩＩ（ＧｎＴＩＩＩ））を発現するように操作され、それにより操作された細胞株で発現される抗体が、二分性ＧｌｃＮａｃ構造の増加を示し、抗体のＡＤＣＣ活性の増加をもたらす、細胞株について記載している（Ｕｍａｎａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１９９９，１７，１７６－１８０も参照）。代替てきに、フコシダーゼ酵素を使用して、抗体のフコース残基を切断でき得る。例えば、フコシダーゼα－Ｌ－フコシダーゼは、Ｔａｒｅｎｔｉｎｏ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．１９７５，１４，５５１６－５５２３に記載されているように、抗体からフコシル残基を除去する。

【０３７０】

「ペグ化」は、１つ以上のＰＥＧ基が抗体または抗体断片に付着する条件下で、ＰＥＧの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体などのポリエチレングリコール（ＰＥＧ）と反応させる、修飾抗体またはその断片を指す。ペグ化は、例えば、抗体の生物学的（例えば、血清）半減期を増加させることができる。好ましくは、ペグ化は、反応性ＰＥＧ分子（または類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実行される。本明細書で使用される場合、「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ（C_1～C_{10}）アルコキシ－もしくはアリールオキシ－ポリエチレングリコール、またはポリエチレングリコール－マレイミドなどの、他のタンパク質を誘導体化するために使用

されているＰＥＧの形態のうちのいずれかを包含することが意図される。ペグ化される抗体は、非グリコシル化抗体であり得る。ペグ化のための方法は、当該技術分野で知られており、例えば欧州特許第ＥＰ０１５４３１６号および同第ＥＰ０４０１３８４号、ならびに米国特許第５，８２４，７７８号（各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、本発明の抗体に適用することができる。

【０３７１】

「バイオシミラー」という用語は、モノクローナル抗体またはタンパク質を含む、臨床的に不活性な成分にわずかな違いがあるにもかかわらず、米国で認可された参照バイオ製品と非常に類似しており、製品の安全性、純度、および効力に関してバイオ製品と参照製品との間に臨床的に意味のある差異がない、バイオ製品を意味する。さらに、類似のバイオまたは「バイオシミラー」医薬品は、欧州医薬品庁によって既に使用が許可されている別のバイオ医薬品に類似したバイオ医薬品である。「バイオシミラー」という用語は、他の国および地域の規制機関によっても同義的に使用されている。バイオ製品またはバイオ医薬品は、細菌または酵母などの生物源によって作製された、またはそれに由来する医薬品である。それらは、ヒトインスリンもしくはエリスロポエチンなどの比較的小さな分子、またはモノクローナル抗体などの複雑な分子からなり得る。例えば、参照ＩＬ－２タンパク質がアルデスロイキン（ＰＲＯＬＥＵＫＩＮ）である場合、アルデスロイキンに関して薬物規制当局によって承認されたタンパク質は、アルデスロイキンの「バイオシミラー」であるか、またはアルデスロイキンの「そのバイオシミラー」である。欧州では、類似のバイオまたは「バイオシミラー」医薬品は、欧州医薬品庁（ＥＭＡ）によって既に使用が許可されている別のバイオ医薬品に類似したバイオ医薬品である。欧州における同様の生物学的用途に関連する法的根拠は、補正されたＲｅｇｕｌａｔｉｏｎ（ＥＣ）Ｎｏ ７２６／２００４の第６条およびＤｉｒｅｃｔｉｖｅ ２００１／８３／ＥＣの第１０（４）条であり、したがって欧州では、バイオシミラーは、Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ（ＥＣ）Ｎｏ ７２６／２００４の第６条およびＤｉｒｅｃｔｉｖｅ ２００１／８３／ＥＣの第１０（４）条の下で、認可または認可申請の対象について認可、承認され得る。すでに認可されているオリジナルのバイオ医薬品は、欧州では「参照医薬品」と称されることがある。バイオシミラーとみなされる製品に対する要件のうちのいくつかは、バイオシミラー医薬品に関するＣＨＭＰガイドラインに概説されている。さらに、モノクローナル抗体バイオシミラーに関連するガイドラインを含む製品固有のガイドラインは、ＥＭＡによって製品ごとに提供され、そのウェブサイトで公開されている。本明細書に記載のバイオシミラーは、品質特徴、生物活性、作用機序、安全性プロファイル、および／または有効性の点で、参照医薬品に類似している可能性がある。さらに、バイオシミラーは、参照医薬品と同じ状態を治療するために使用され得るか、または使用を意図され得る。したがって、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した品質特徴を有するとみなされ得る。代替的に、またはさらに、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した生物活性を有するとみなされ得る。代替的に、またはさらに、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した安全性プロファイルを有するとみなされ得る。代替的に、またはさらに、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した効力を有するとみなされ得る。本明細書に記載されているように、欧州におけるバイオシミラーは、ＥＭＡによって認可された参照医薬品と比較される。しかしながら、場合によっては、バイオシミラーは、特定の研究で欧州経済領域外で認可されたバイオ医薬品（ＥＥＡ認可されていない「コンパレーター」）と比較される場合がある。かかる研究には、例えば、特定の臨床研究およびインビボ非臨床研究が含まれる。本明細書で使用される場合、「バイオシミラー」という用語は、ＥＥＡ認可されていないコンパレーターと比較された、または比較され得るバイオ医薬品にも関する。特定のバイオシミラーは、抗体、抗体断片（例えば、抗原結合部分）、および融合タンパク質などのタンパク質である。タンパク質バイオシミラーは、ポリペプチドの機能に有意な影響を及ぼさない、アミノ酸構造にわずかな修飾（例えば、アミノ酸の欠失、付加、および／または置換を含む）を有するアミノ酸配列を有し得る。バ

イオシミラーは、その参照医薬品のアミノ酸配列に対して９７％以上、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。バイオシミラーは、その違いが医薬品の安全性および／または有効性の変化をもたらさないならば、１つ以上の翻訳後修飾、例えば、限定されないが、参照医薬品の翻訳後修飾とは異なる、グリコシル化、酸化、脱アミド化、および／または切断を含み得る。バイオシミラーは、参照医薬品と同一または異なるグリコシル化パターンを有し得る。特に、排他的ではないが、バイオシミラーは、その違いが参照医薬品に関連する安全性の懸念に対処するか、対処することを意図している場合、異なるグリコシル化パターンを有し得る。加えて、バイオシミラーは、医薬品の安全性および有効性が損なわれないならば、例えば、その強度、剤形、製剤、賦形剤、および／または提示において参照医薬品から逸脱する可能性がある。バイオシミラーは、参照医薬品と比較して、例えば薬物動態（ＰＫ）および／または薬力学的（ＰＤ）プロファイルの違いを含み得るが、それでも、認可される、または認可に適しているとみなされるように、参照医薬品と十分に類似しているとみなされる。特定の状況において、バイオシミラーは、参照医薬品と比較して異なる結合特徴を示し、異なる結合特徴は、ＥＭＡなどの規制当局によって類似のバイオ製品としての認可の障壁ではないとみなされる。「バイオシミラー」という用語は、他の国および地域の規制機関によっても同義的に使用されている。

【０３７２】

ＩＩＩ．ＴＩＬ製造プロセス－２Ａ

これらの特徴のうちのいくつかを含むプロセス２Ａとして知られる例示的なＴＩＬプロセスが図２に示され、プロセス１Ｃに対する本発明のこの実施形態の利点のうちのいくつかが図ＦおよびＧに記載される。プロセス２Ａの実施形態が図１に示される。

【０３７３】

本明細書で考察されるように、本発明は、凍結保存されたＴＩＬを再刺激して、それらの代謝活性、したがって患者への移植前の相対的健康を高めることに関するステップ、および該代謝健康を試験する方法を含み得る。本明細書で一般に概説されるように、ＴＩＬは、一般に患者試料から採取され、患者への移植前にそれらの数を拡張するように操作される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、以下で考察されるように、任意に遺伝子操作され得る。

【０３７４】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、凍結保存され得る。一旦解凍すると、それらを再刺激して、患者への注入前に代謝を高めることができる。

【０３７５】

いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例および図において詳細に考察されるように、第１の拡張（ｐｒｅＲＥＰと称されるプロセスおよび図１においてステップＡとして示されるプロセスを含む）は、３～１４日に短縮され、第２の拡張（ＲＥＰと称されるプロセスおよび図１においてステップＢとして示されるプロセスを含む）は、７～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、第１の拡張（例えば、図１においてステップＢとして記載される拡張）は、１１日に短縮され、第２の拡張（例えば、図１のステップＤにおいて記載される拡張）は、１１日に短縮される。いくつかの実施形態では、第１の拡張および第２の拡張（例えば、図１においてステップＢおよびステップＤとして記載される拡張）の組み合わせは、以下ならびに実施例および図において詳細に考察されるように、２２日に短縮される。

【０３７６】

以下のＡ、Ｂ、Ｃなどの「ステップ」指定は、図１を参照し、本明細書に記載の特定の実施形態を参照している。以下および図１におけるステップの順序は例示であり、ステップの任意の組み合わせまたは順序、ならびに追加のステップ、ステップの繰り返し、および／またはステップの省略は、本出願および本明細書に開示される方法によって企図される。

【０３７７】

Ａ．ステップＡ：患者の腫瘍試料を取得する

一般に、ＴＩＬは、最初に患者の腫瘍試料（「一次ＴＩＬ」）から取得され、次いで本明細書に記載されるさらなる操作のためにより大きな集団に拡張され、任意に凍結保存され、本明細書に概説されるように再刺激され、任意にＴＩＬ健康の指標として表現型および代謝パラメーターについて評価される。

【０３７８】

患者の腫瘍試料は、一般に外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段を介して、当該技術分野で知られている方法を使用して取得することができる。いくつかの実施形態では、多病変サンプリングが使用される。いくつかの実施形態では、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段は、多病変サンプリングを含む（すなわち、患者の１つ以上の腫瘍引用および／または場所、ならびに同じ場所または近接した１つ以上の腫瘍から試料を取得する）。一般に、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍試料はまた、血液系悪性腫瘍から得られた腫瘍などの液体腫瘍であり得る。固形腫瘍は、肺組織のものであり得る。いくつかの実施形態では、有用なＴＩＬは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）から得られる。

【０３７９】

一旦得られると、腫瘍試料は、一般に鋭的剥離を使用して１～約８mm^3の間の小片に断片化され、約２～３mm^3が特に有用である。ＴＩＬは、酵素腫瘍消化物を使用してこれらの断片から培養される。かかる腫瘍消化物は、酵素培地（例えば、Ｒｏｓｗｅｌｌ Ｐａｒｋ Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＲＰＭＩ）１６４０緩衝液、２ｍＭグルタメート、１０ｍｃｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０単位／ｍＬのＤＮａｓｅ、および１．０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼ）でのインキュベーション、続いて機械的解離（例えば、組織解離剤を使用する）によって産生することができる。腫瘍消化物は、腫瘍を酵素培地に入れ、腫瘍をおよそ１分間機械的に解離させ、続いて５％CO_2中３７℃で３０分間インキュベートし、続いて小さな組織片のみが存在するまで、前述の条件下で機械的解離およびインキュベーションのサイクルを繰り返すことによって産生することができる。このプロセスの最後に、細胞懸濁液に多数の赤血球または死細胞が含まれている場合、ＦＩＣＯＬＬ分岐親水性多糖類を使用した密度勾配分離を行い、これらの細胞を除去することができる。米国特許出願公開第２０１２／０２４４１３３Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものなど、当該技術分野で知られている代替方法を使用することができる。前述の方法のうちのいずれかは、ＴＩＬを拡張する方法または癌を治療する方法についての本明細書に記載される実施形態のうちのいずれかにおいて使用され得る。

【０３８０】

上に示したように、いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、固形腫瘍に由来する。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、断片化されない。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は断片化されず、腫瘍全体として酵素消化に供される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、およびヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、およびヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、およびヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％CO_2で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、およびヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％CO_2で回転を伴って消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、３７℃、５％CO_2で一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍全体が酵素と組み合わされて、腫瘍消化反応混合物を形成する。

【０３８１】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、無菌緩衝液中の凍結乾燥酵素で再構成される。いくつかの実施形態では、緩衝液は、無菌ＨＢＳＳである。

【０３８２】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、コラゲナーゼを含む。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、コラゲナーゼＩＶである。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼの作用ストックは、１００ｍｇ／ｍＬの１０Ｘ作用ストックである。

【０３８３】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ＤＮＡｓｅを含む。いくつかの実施形態では、ＤＮＡｓｅの作用ストックは、１０，０００ＩＵ／ｍＬの１０Ｘ作用ストックである。

【０３８４】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ヒアルロニダーゼを含む。いくつかの実施形態では、ヒアルロニダーゼの作用ストックは、１０ｍｇ／ｍＬの１０Ｘ作用ストックである。

【０３８５】

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

【０３８６】

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

【０３８７】

一般に、採取された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに採取された」細胞集団と呼ばれる。

【０３８８】

いくつかの実施形態では、断片化は、例えば、剥離および消化を含む物理的断片化を含む。いくつかの実施形態では、断片化は、物理的断片化である。いくつかの実施形態では、断片化は、剥離である。いくつかの実施形態では、断片化は、消化によるものである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、最初に、患者から得られた酵素的腫瘍消化物および腫瘍断片から培養され得る。実施形態では、ＴＩＬは、最初に、患者から得られた酵素的腫瘍消化物および腫瘍断片から培養され得る。

【０３８９】

腫瘍が固形腫瘍であるいくつかの実施形態では、腫瘍試料が、例えば、ステップＡ（図１に提供される）で得られた後、腫瘍は物理的断片化を受ける。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存前に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存後に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、腫瘍を得た後、いかなる凍結保存もない場合に起こる。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、１０、２０、３０、４０個またはそれ以上の断片または小片が、第１の拡張のために各容器に配置される。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、３０または４０個の断片または小片が、第１の拡張のために各容器に配置される。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、４０個の断片または小片が、最初の拡張のために各容器に配置される。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約４～約５０個の断片を含み、各断片は、約２７mm^3の体積を有する。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約３０～約６０個の断片を含み、総体積は約１３００mm^3～約１５００mm^3である。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約５０個の断片を含み、総体積は約１３５０mm^3である。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約５０個の断片を含み、総質量は約１グラム～約１．５グラムである。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約４個の断片を含む。

【０３９０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍断片から得られる。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、鋭的剥離によって得られる。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3～１０mm^3の間である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3～８mm^3の間である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3である。いくつかの

実施形態では、腫瘍断片は、約２mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約３mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約４mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約５mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約６mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約７mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約８mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約９mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１０mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、１～４mm×１～４mm×１～４mmである。いくつかの実施形態では、腫瘍は、１mm×１mm×１mmである。いくつかの実施形態では、腫瘍は、２mm×２mm×２mmである。いくつかの実施形態では、腫瘍は、３mm×３mm×３mmである。いくつかの実施形態では、腫瘍は、４mm×４mm×４mmである。

【０３９１】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性、壊死性、および／または脂肪性組織の量を最小化するために切除される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性組織の量を最小化するために切除される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の壊死性組織の量を最小化するために切除される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の脂肪性組織の量を最小化するために切除される。

【０３９２】

いくつかの実施形態では、腫瘍の内部構造を維持するために、腫瘍の断片化が行われる。いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、メスで鋸引き動作を行うことなく実行される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から得られる。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、酵素培地、例えば、限定されないが、ＲＰＭＩ １６４０、２mM ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０mg／mLゲンタマイシン、３０Ｕ／mL ＤＮａｓｅ、および１．０mg／mLコラゲナーゼ中でのインキュベーション、続いて機械的解離によって生成された（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍を、およそ１分間機械的に解離することができる。次いで、溶液を５％CO_2中３７℃で３０分間インキュベートし、その後、およそ１分間再び機械的に破壊することができる。５％CO_2中３７℃で３０分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ１分間、３回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きな組織片が存在する場合の３回目の機械的破壊後、５％CO_2中３７℃で３０分間の追加のインキュベーションの有無にかかわらず、１回または２回の追加の機械的解離を試料に適用した。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、Ｆｉｃｏｌｌを使用した密度勾配分離を行い、これらの細胞を除去することができる。

【０３９３】

いくつかの実施形態では、第１の拡張ステップの前に採取された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに採取された」細胞集団と呼ばれる。

【０３９４】

いくつかの実施形態では、細胞は、試料採取後に任意に凍結され、ステップＢに記載される拡張に入る前に凍結保存され得、これは、以下でさらに詳細に説明されるとともに、図１に例示される。

【０３９５】

Ｂ．ステップＢ：第１の拡張

いくつかの実施形態では、本方法は、対象／患者への投与時に複製サイクルを増加させることができ、したがって、より古いＴＩＬ（すなわち、対象／患者への投与前により多くの複製ラウンドをさらに受けたＴＩＬ）よりも追加の治療上の利益を提供し得る、若いＴＩＬを得ることを提供する。若いＴＩＬの特徴は、文献、例えば、Ｄｏｎｉａ，ａｔ ａｌ．，Ｓｃａｎｄｉｎａｖｉａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，７５：１５７－１６７（２０１２）、Ｄｕｄｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ，１６：６１２２－６１３１（２０１０）、Ｈｕａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ，２８（３）：２５８－２６７（２００５）、Ｂｅｓｓｅｒ ｅｔ ａｌ．

，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ，１９（１７）：ＯＦ１－ＯＦ９（２０１３）、Ｂｅｓｓｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ ３２：４１５－４２３（２００９）、Ｒｏｂｂｉｎｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２００４；１７３：７１２５－７１３０、Ｓｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ，３０：１２３－１２９（２００７）、Ｚｈｏｕ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ，２８：５３－６２（２００５）、およびＴｒａｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ，３１：７４２－７５１（２００８）に記載されており、これらのすべては参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【０３９６】

Ｔリンパ球およびＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた、但し多数の遺伝子セグメントの体細胞組み換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、およびＣ（一定）は、免疫グロブリンおよびＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性および下流への応用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって得られたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって得られたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬおよび／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって得られたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬならびに／または図５および／もしくは図６に例示されるようにプロセス１Ｃと称される方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第１の拡張において得られたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性および／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、α、β、γ、およびδ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）αおよび／またはβの発現が増加している。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）αの発現が増加している。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）βの発現が増加している。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加している。

【０３９７】

例えば図１のステップＡに記載されているように、腫瘍断片の解剖または消化後、得られた細胞は、腫瘍および他の細胞よりもＴＩＬの成長に有利な条件下でＩＬ－２を含む血清中で培養される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、２ｍＬウェルにおいて、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む不活化ヒトＡＢ血清を含む培地中でインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に３～１４日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、７～１４日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、１０～１４日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、約１１日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。

【０３９８】

好ましい実施形態では、ＴＩＬの拡張は、以下および本明細書に記載される第１のバルクＴＩＬ拡張ステップ（例えば、図１のステップＢに記載されるものなど、ｐｒｅ－ＲＥＰと称されるプロセスを含むことができる）、続いて以下のステップＤおよび本明細書に記載される第２の拡張（ステップＤ、急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）ステップと称される

プロセスを含む）、続いて任意の凍結保存、ならびに以下および本明細書に記載される第２のステップＤ（再刺激ＲＥＰステップと称されるプロセスを含む）を使用して行われ得る。このプロセスから得られたＴＩＬは、本明細書に記載の表現型特徴および代謝パラメーターについて任意に特徴付けることができる。

【０３９９】

ＴＩＬ培養物が２４ウェルプレートで開始される実施形態では、例えば、Ｃｏｓｔａｒ２４ウェル細胞培養クラスター、平底（Ｃｏｒｎｉｎｇ Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｅｄ，Ｃｏｒｎｉｎｇ，ＮＹ）を使用して、ＩＬ－２（６０００ＩＵ／ｍＬ、Ｃｈｉｒｏｎ Ｃｏｒｐ．，Ｅｍｅｒｙｖｉｌｌｅ，ＣＡ）を含む２ｍＬの完全培地（ＣＭ）中の１×１０^{6}個の腫瘍消化細胞または１つの腫瘍断片を、各ウェルに播種することができる。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１ｍｍ^{3}～１０ｍｍ^{3}の間である。

【０４００】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、ステップＢのＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭ Ｈｅｐｅｓ、および１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンで補足された、ＧｌｕｔａＭＡＸを伴うＲＰＭＩ １６４０からなる。培養物が４０ｍＬ容量および１０ｃｍ^{2}ガス透過性シリコン底部（例えば、Ｇ－Ｒｅｘ１０、Ｗｉｌｓｏｎ Ｗｏｌｆ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ，Ｎｅｗ Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ）を有するガス透過性フラスコ内で開始される実施形態では（図１）、ＩＬ－２を含む１０～４０ｍＬのＣＭ中の１０～４０×１０^{6}個の生きた腫瘍消化細胞または５～３０個の腫瘍断片を、各フラスコに入れた。Ｇ－Ｒｅｘ１０および２４ウェルプレートの両方を、５％ ＣＯ$_{2}$中３７℃の加湿インキュベーター内でインキュベートし、培養開始から５日後、培地の半分を取り除き、新たなＣＭおよびＩＬ－２で置き換え、５日後、培地の半分を２～３日ごとに交換した。

【０４０１】

腫瘍断片の調製後、得られた細胞（すなわち、断片）は、腫瘍および他の細胞よりもＴＩＬの成長に有利な条件下で、ＩＬ－２を含有する血清中で培養される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、２ｍＬウェルにおいて、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む不活化ヒトＡＢ血清を含む培地中（または、場合によっては、本明細書で概説されるように、ＡＰＣ細胞集団の存在下）でインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に１０～１４日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、第１の拡張中の成長培地は、ＩＬ－２またはその多様体を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬは、組み換えヒトＩＬ－２（ｒｈＩＬ－２）である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルについて２０～３０×１０^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルについて２０×１０^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルについて２５×１０^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルについて３０×１０^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、４～８×１０^{6}ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、５～７×１０^{6}ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、６×１０^{6}ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、実施例５に記載されるように調製される。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約１０，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、または約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～

約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。好ましい実施形態では、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。実施形態では、細胞培養培地は、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、約４０００ＩＵ／ｍＬ、約４５００ＩＵ／ｍＬ、約５０００ＩＵ／ｍＬ、約５５００ＩＵ／ｍＬ、約６０００ＩＵ／ｍＬ、約６５００ＩＵ／ｍＬ、約７０００ＩＵ／ｍＬ、約７５００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。実施形態では、細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬの間、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬの間、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬの間、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬの間、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬの間、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ、または８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【０４０２】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１６０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１４０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、または約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－１５をさらに含む。好ましい実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。

【０４０３】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約４ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、または約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２１をさらに含む。好ましい実施形態では、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。

【０４０４】

実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。実施形態では、細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎ

ｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、および約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。実施形態では、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬの間、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬの間、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬの間、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇの間、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬの間、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬの間、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬの間、および５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含まない。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３抗体は、ムロモナブである。

【表３】

表３：ムロモナブのアミノ酸配列（例示的なＯＫＴ－３抗体）

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

【０４０５】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、細胞培養培地中に１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは４－１ＢＢアゴニストであり、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、ＥＵ－１０１、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、多様体、バイオシミラー、および組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、０．１μｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬの間の細胞培養培地中の濃度を達成するのに十分な濃度で添加される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの間の細胞培養培地中の濃度を達成するのに十分な濃度で添加される。

【０４０６】

いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、細胞培養培地は、ＩＬ－２を約３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、およびＯＫＴ－３を約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０４０７】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、それは、ＣＭ１（培養培地１）と称される。いくつかの実施形態では、ＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、および１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンで補足された、ＧｌｕｔａＭＡＸを伴うＲＰＭＩ　１６４０からなる。培養物が４０ｍＬ容量および１０ｃｍ^{2}ガス透過性シリコン底部（例えば、Ｇ－Ｒｅｘ１０、Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ　Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ，Ｎｅｗ　Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ）を有するガス透過性フラスコ内で開始される実施形態では（図１）、ＩＬ－２を含む１０～４０ｍＬのＣＭ中の１０～４０×１０^{6}個の生きた腫瘍消化細胞または５～３０個の腫瘍断片を、各フラスコに入れた。Ｇ－Ｒｅｘ１０および２４ウェルプレートの両方を、５％　CO_2中３７℃の加湿インキュベーター内でインキュベートし、培養開始から５日後、培地の半分を取り除き、新たなＣＭおよびＩＬ－２で置き換え、５日後、培地の半分を２～３日ごとに交換した。いくつかの実施形態では、ＣＭは、実施例に記載さ

れているＣＭ１であり、実施例１を参照されたい。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、最初の細胞培養培地または第１の細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、最初の細胞培養培地または第１の細胞培養培地は、ＩＬ－２を含む。

【０４０８】

いくつかの実施形態では、第１の拡張（例えば、図１のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ｐｒｅ－ＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例および図において考察されるように、３～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、第１の拡張（例えば、図１のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、ｐｒｅ－ＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）は、実施例において考察され、図４および５に示されるように、７～１４日に短縮されるとともに、例えば、図１のステップＢに記載される拡張も含む。いくつかの実施形態では、ステップＢの第１の拡張は、１０～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、例えば、図１のステップＢに記載される拡張において考察されるように、１１日に短縮される。

【０４０９】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、または１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日～１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、３日～１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、４日～１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、５日～１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、６日～１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、７日～１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、８日～１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、９日～１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１０日～１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１１日～１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１２日～１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１３日～１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日～１１日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～１１日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、３日～１１日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、４日～１１日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、５日～１１日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、６日～１１日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、７日～１１日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、８日～１１日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、９日～１１日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１０日～１１日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１１日間進行することができる。

【０４１０】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、および／またはＩＬ－２１の組み合わせは、第１の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、および／またはＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図１による、ならびに本明細書に記載されるステップＢプロセス中を含む、第１の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１の組み合わせは、第１の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１、ならびにそれらの

任意の組み合わせは、図１による、および本明細書に記載されるステップＢプロセス中に含まれ得る。

【０４１１】

いくつかの実施形態では、第１の拡張（ｐｒｅ－ＲＥＰと称されるプロセスを含む、例えば、図１によるステップＢ）プロセスは、実施例および図で考察されるように、３～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、ステップＢの第１の拡張は、７～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、ステップＢの第１の拡張は、１０～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、１１日に短縮される。

【０４１２】

いくつかの実施形態では、第１の拡張、例えば、図１によるステップＢは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、ＴＩＬ拡張のために閉鎖系が用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【０４１３】

Ｃ．ステップＣ：第１の拡張から第２の拡張への移行

場合によっては、例えば、図１に示されるような、例えばステップＢから得られるＴＩＬ集団を含む、第１の拡張から得られるバルクＴＩＬ集団は、以下で考察されるプロトコルを使用して、直ちに凍結保存され得る。代替的に、第２のＴＩＬ集団と称される、第１の拡張から得られたＴＩＬ集団は、第２の拡張（ＲＥＰと称されることもある拡張を含み得る）を受け、次いで以下で考察されるように凍結保存され得る。同様に、遺伝子改変ＴＩＬが治療に使用される場合、第１のＴＩＬ集団（バルクＴＩＬ集団と称されることもある）または第２のＴＩＬ集団（いくつかの実施形態では、ＲＥＰ　ＴＩＬ集団と称される集団を含み得る）は、拡張前または第１の拡張後、および第２の拡張前に、好適な治療のために遺伝子改変に供され得る。

【０４１４】

いくつかの実施形態では、第１の拡張から（例えば、図１に示されるようにステップＢから）得られたＴＩＬは、選択のために表現型決定されるまで保存される。いくつかの実施形態では、第１の拡張から（例えば、図１に示されるようにステップＢから）得られたＴＩＬは保存されず、第２の拡張に直接進行する。いくつかの実施形態では、第１の拡張から得られたＴＩＬは、第１の拡張後、および第２の拡張前に凍結保存されない。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、または１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約３日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約４日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約４日～１０日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約７日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約１４日で起こる。

【０４１５】

いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、または１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから３日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから４日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片

化が起こってから５日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから６日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから７日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから８日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから９日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１０日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１１日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１２日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１３日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから２日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから３日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから４日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから５日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから６日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから７日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから８日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから９日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１０日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１１日で起こる。

【０４１６】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、第１の拡張後、および第２の拡張前に保存されず、ＴＩＬは、第２の拡張に直接進行する（例えば、いくつかの実施形態では、図１に示されるようにステップＢからステップＤへの移行中の保存がない）。いくつかの実施形態では、移行は、本明細書に記載されるように、閉鎖系で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張からのＴＩＬ、第２のＴＩＬ集団は、移行期間なしで第２の拡張に直接進行する。

【０４１７】

いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行、例えば、図１によるステップＣは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、ＴＩＬ拡張のために閉鎖系が用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【０４１８】

１．サイトカイン

本明細書に記載の拡張方法は、一般に、当該技術分野で知られているように、高用量のサイトカイン、特にＩＬ－２を含む培養培地を使用する。

【０４１９】

代替的に、国際公開第ＷＯ２０１５／１８９３５６号およびＷ国際公開第ＷＯ２０１５／１８９３５７号（参照によりそれらの全体が本明細書に明示的に組み込まれる）に一般に概説されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせで、ＴＩＬＳの急速拡張および／または第２の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することもさらに可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ

－２およびＩＬ－１５、ＩＬ－２およびＩＬ－２１、ＩＬ－１５およびＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１が含まれ、後者は多くの実施形態において特定の用途を見出す。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようなＴ細胞の生成に特に有利に働く。

【表４】

表４：インターロイキンのアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 3 組み換えヒトIL-2(rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
配列番号 4 アルデスロイキン	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
配列番号 5 組み換えヒトIL-4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREKYSKCSS 130
配列番号 6 組み換えヒトIL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH 153
配列番号 7 組み換えヒトIL-15 (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115
配列番号 8 組み換えヒトIL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132

【０４２０】

Ｄ．ステップＤ：第２の拡張

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ細胞集団は、採取および最初のバルク処理後、例えば、ステップＡおよびステップＢ、ならびに図１に示されるようにステップＣと称される移行後に数が拡張される）。このさらなる拡張は、本明細書では第２の拡張と称され、これは、当該技術分野で一般に急速拡張プロセス（ＲＥＰ、および図１のステップＤに示されるプロセス）と称される拡張プロセスを含み得る。第２の拡張は、一般に、フィーダー細胞、サイトカイン源、および抗ＣＤ３抗体を含むいくつかの成分を含む培養培地を使用して、ガス透過性容器内で達成される。

【０４２１】

いくつかの実施形態では、第２の拡張または第２のＴＩＬ拡張（ＲＥＰと称されることもある拡張、ならびに図１のステップＤに示されるプロセスを含み得る）は、当業者に知られている任意のＴＩＬフラスコまたは容器を使用して行うことができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、または１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約７日～約１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約８日～約１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約９日～約１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１０日～約１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１１日～約１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１２日～約１４日間進行することができる。いくつかの実

施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１３日～約１４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１４日間進行することができる。

【０４２２】

実施形態では、第２の拡張は、本開示の方法（例えば、ＲＥＰと称される拡張、ならびに図１のステップＤに示されるプロセスを含む）を使用して、ガス透過性容器内で行うことができる。例えば、ＴＩＬは、インターロイキン－２（ＩＬ－２）またはインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）の存在下で非特異的Ｔ細胞受容体刺激を使用して、急速に拡張させることができる。非特異的Ｔ細胞受容体刺激は、例えば、抗ＣＤ３抗体、例えば約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３、マウスモノクローナル抗ＣＤ３抗体（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ，Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪもしくはＭｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡから市販）またはＵＨＣＴ－１（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡから市販）を含み得る。ＴＩＬは、癌のエピトープ（複数可）などのその抗原性部分を含む、第２の拡張中に１つ以上の抗原を含むことによって、インビトロでＴＩＬのさらなる刺激を誘導するように拡張することができ、これは、ヒト白血球抗原Ａ２（ＨＬＡ－Ａ２）結合ペプチドなどのベクター、例えば、０．３μＭ ＭＡＲＴ－１：２６－３５（２７Ｌ）またはｇｐｌ００：２０９－２１７（２１０Ｍ）から、任意に３００ＩＵ／ｍＬ ＩＬ－２またはＩＬ－１５などのＴ細胞成長因子の存在下で任意に発現され得る。他の好適な抗原には、例えば、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、チロシナーゼ癌抗原、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＳＳＸ－２、およびＶＥＧＦＲ２、またはそれらの抗原性部分が含まれ得る。ＴＩＬはまた、ＨＬＡ－Ａ２を発現する抗原提示細胞にパルスされた癌の同じ抗原（複数可）で再刺激することによっても急速に拡張され得る。代替的に、ＴＩＬは、例えば、例として照射された自己リンパ球、または照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球およびＩＬ－２でさらに再刺激され得る。いくつかの実施形態では、再刺激は、第２の拡張の一部として起こる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、照射された自己リンパ球の存在下で、または照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球およびＩＬ－２を用いて起こる。

【０４２３】

実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。実施形態では、細胞培養培地は、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、約４０００ＩＵ／ｍＬ、約４５００ＩＵ／ｍＬ、約５０００ＩＵ／ｍＬ、約５５００ＩＵ／ｍＬ、約６０００ＩＵ／ｍＬ、約６５００ＩＵ／ｍＬ、約７０００ＩＵ／ｍＬ、約７５００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。実施形態では、細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬの間、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬの間、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬの間、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬの間、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬの間、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ、または８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【０４２４】

実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。実施形態では、細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、および約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。実施形態では、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬの間、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬの間、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬの間、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇの間、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬの間、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬの間、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬの間、および５０ｎｇ

／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含まない。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３抗体は、ムロモナブである。

【０４２５】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、細胞培養培地中に１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは４－１ＢＢアゴニストであり、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、ＥＵ－１０１、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、多様体、バイオシミラー、および組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、０．１μｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬの間の細胞培養培地中の濃度を達成するのに十分な濃度で添加される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの間の細胞培養培地中の濃度を達成するのに十分な濃度で添加される。

【０４２６】

いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、細胞培養培地は、ＩＬ－２を約３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、およびＯＫＴ－３を約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０４２７】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、および／またはＩＬ－２１の組み合わせは、第２の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、および／またはＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図１による、ならびに本明細書に記載されるステップＤプロセス中を含む、第２の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１の組み合わせは、第２の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図１による、および本明細書に記載されるステップＤプロセス中に含まれ得る。

【０４２８】

いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、抗原提示フィーダー細胞、および任意にＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む補足された細胞培養培地において実施され得る。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、補足された細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、補足された細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、および抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、第２の細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、および抗原提示細胞（ＡＰＣ、抗原提示フィーダー細胞とも称される）を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、および抗原提示フィーダー細胞（すなわち、抗原提示細胞）を含む細胞培養培地中で起こる。

【０４２９】

いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１６０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１４０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、または約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－１５をさらに含む。好ましい実施形態では、細胞培養培地は、約１８０Ｉ

Ｕ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。

【０４３０】

いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約４ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、または約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２１をさらに含む。好ましい実施形態では、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。

【０４３１】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）は、ＰＢＭＣである。実施形態では、急速拡張および／または第２の拡張におけるＴＩＬ対ＰＢＭＣおよび／または抗原提示細胞の比は、約１対２５、約１対５０、約１対１００、約１対１２５、約１対１５０、約１対１７５、約１対２００、約１対２２５、約１対２５０、約１対２７５、約１対３００、約１対３２５、約１対３５０、約１対３７５、約１対４００、または約１対５００である。実施形態では、急速拡張および／または第２の拡張におけるＴＩＬ対ＰＢＭＣの比は、１対５０～１対３００の間である。実施形態では、急速拡張および／または第２の拡張におけるＴＩＬ対ＰＢＭＣの比は、１対１００～１対２００の間である。

【０４３２】

実施形態では、ＲＥＰおよび／または第２の拡張は、バルクＴＩＬが１５０ｍＬの培地中の１００倍または２００倍過剰の不活化フィーダー細胞、３０ｍｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗ＣＤ３抗体、および３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２と混合されているフラスコ内で行われる。細胞が代替の成長チャンバーに移されるまで、培地交換が行われる（一般に、新鮮な培地での呼吸による３分の２の培地交換）。代替の成長チャンバーには、以下でより完全に考察されるように、Ｇ－ＲＥＸフラスコおよびガス透過性容器が含まれる。

【０４３３】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰプロセスと称されるプロセスを含み得る）は、実施例および図で考察されるように、７～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、１１日に短縮される。

【０４３４】

実施形態では、ＲＥＰおよび／または第２の拡張は、以前に記載されたＴ－１７５フラスコおよびガス透過性バッグ（Ｔｒａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００８，３１，７４２－５１、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００３，２６，３３２－４２）またはガス透過性培養器具（Ｇ－Ｒｅｘフラスコ）を使用して行うことができる。いくつかの実施形態では、第２の拡張（急速拡張と称される拡張を含む）は、Ｔ－１７５フラスコ内で行われ、１５０ｍＬの培地に懸濁された約１×１０^{6}個のＴＩＬを、各Ｔ－１７５フラスコに添加することができる。ＴＩＬは、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１および３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３で補足された、ＣＭとＡＩＭ－Ｖ培地との１対１の混合物中で培養することができる。Ｔ－１７５フラスコを、５％ＣＯ$_{2}$中３７℃でインキュベートすることができる。培地の半分を、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む５０／５０培地を使用して５日目に交換することができる。いくつかの実

施形態では、７日目に、２つのＴ－１７５フラスコからの細胞を３Ｌバッグ内で組み合わせ、５％ヒトＡＢ血清および３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む３００ｍＬのＡＩＭＶを、３００ｍＬのＴＩＬ懸濁液に添加した。各バッグ内の細胞の数を、毎日または隔日カウントし、新鮮な培地を添加して、０．５～２．０×１０^{6}細胞／ｍＬの間の細胞数を維持した。

【０４３５】

実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張、ならびに図１のステップＤで参照される拡張を含み得る）は、１００ｃｍのガス透過性シリコン底部（Ｇ－Ｒｅｘ　１００、Ｗｉｌｓｏｎ Ｗｏｌｆ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｎｅｗ Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ，ＵＳＡから市販）を有する５００ｍＬ容量のガス透過性フラスコ内で行うことができる。５×１０^{6}または１０×１０^{6}ＴＩＬは、５％ヒトＡＢ血清、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、および３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）で補足された４００ｍＬの５０／５０培地中、ＰＢＭＣで培養され得る。Ｇ－Ｒｅｘ　１００フラスコを、５％CO_2中３７℃でインキュベートすることができる。５日目に、２５０ｍＬの上清を除去して遠心分離ボトルに入れ、１５００ｒｐｍ（４９１×ｇ）で１０分間遠心分離する。ＴＩＬペレットを、５％ヒトＡＢ血清、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬの新鮮な培地で再懸濁し、元のＧ－Ｒｅｘ　１００フラスコに戻すことができる。ＴＩＬがＧ－Ｒｅｘ　１００フラスコ内で連続的に拡張される場合、７日目に、各Ｇ－Ｒｅｘ　１００内のＴＩＬを、各フラスコに存在する３００ｍＬの培地に懸濁することができ、細胞懸濁液を３つの１００ｍＬアリコートに分割することができ、それを使用して３つのＧ－Ｒｅｘ　１００フラスコに播種することができる。次いで、５％ヒトＡＢ血清および３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのＡＩＭ－Ｖを、各フラスコに添加することができる。Ｇ－Ｒｅｘ　１００フラスコを、５％　CO_2中３７℃でインキュベートし、４日後に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのＡＩＭ－Ｖを、各Ｇ－ＲＥＸ　１００フラスコに添加することができる。培養１４日目に、細胞を採取することができる。

【０４３６】

実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）は、バルクＴＩＬが１５０ｍＬの培地中の１００倍または２００倍過剰の不活化フィーダー細胞、３０ｍｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗ＣＤ３抗体、および３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２と混合されているフラスコで行われる。いくつかの実施形態では、培地交換は、細胞が代替の成長チャンバーに移されるまで行われる。いくつかの実施形態では、培地の３分の２は、新鮮な培地による呼吸によって置き換えられる。いくつかの実施形態では、代替の成長チャンバーには、以下でより完全に考察されるように、Ｇ－ＲＥＸフラスコおよびガス透過性容器が含まれる。

【０４３７】

実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）が行われ、優れた腫瘍反応性のためにＴＩＬが選択されるステップをさらに含む。当該技術分野で知られている任意の選択方法を使用することができる。例えば、米国特許出願公開第２０１６／００１００５８Ａ１号に記載されている方法は、その開示が参照により本明細書に組み込まれ、優れた腫瘍反応性のためのＴＩＬの選択に使用することができる。

【０４３８】

任意に、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準的なアッセイを使用して、第２の拡張（ＲＥＰ拡張と称される拡張を含む）の後に行うことができる。例えば、トリパンブルー排除アッセイは、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするバルクＴＩＬの試料上で行うことができる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ試料は、Ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２自動セルカウンター（Ｎｅｘｃｅｌｏｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｌａｗｒｅｎｃｅ，ＭＡ）を使用してカウントされ、生存率が決定され得る。いくつかの実施形態では、生存率は、標準的なＣｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２　Ｉｍａｇｅ　Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ自動セルカウンタープロトコルに従って決定される。

【０４３９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）は、以前に記載されているＴ－１７５フラスコおよびガス透過性バッグ（Ｔｒａｎ ＫＱ，Ｚｈｏｕ Ｊ，Ｄｕｒｆｌｉｎｇｅｒ ＫＨ，ｅｔ ａｌ．，２００８，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，３１：７４２－７５１およびＤｕｄｌｅｙ ＭＥ，Ｗｕｎｄｅｒｌｉｃｈ ＪＲ，Ｓｈｅｌｔｏｎ ＴＥ，ｅｔ ａｌ．２００３，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２６：３３２－３４２）またはガス透過性Ｇ－Ｒｅｘフラスコを使用して行われ得る。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、フラスコを使用して行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ガス透過性Ｇ－Ｒｅｘフラスコを使用して行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、Ｔ－１７５フラスコ内で行われ、約１×１０^{6}個のＴＩＬは、約１５０ｍＬの培地に懸濁され、これを各Ｔ－１７５フラスコに添加する。ＴＩＬは、照射された（５０Ｇｙ）同種異系ＰＢＭＣを「フィーダー」細胞として１対１００の比で培養し、細胞は、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２および３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３で補足された、ＣＭとＡＩＭ－Ｖ培地との１対１混合物（５０／５０培地）中で培養した。Ｔ－１７５フラスコを、５％CO_2中３７℃でインキュベートする。いくつかの実施形態では、培地の半分は、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む５０／５０培地を使用して５日目に交換される。いくつかの実施形態では、７日目に、２つのＴ－１７５フラスコからの細胞を３Ｌバッグ内で組み合わせ、５％ヒトＡＢ血清および３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む３００ｍＬのＡＩＭ－Ｖを、３００ｍＬのＴＩＬ懸濁液に添加した。各バッグ内の細胞の数は、毎日または隔日カウントすることができ、新鮮な培地を添加して、約０．５～約２．０×１０^{6}細胞／ｍＬの間の細胞数を維持することができる。

【０４４０】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）は、１００ｃｍ^{2}のガス透過性シリコン底部（Ｇ－Ｒｅｘ １００、Ｗｉｌｓｏｎ Ｗｏｌｆ）を有する５００ｍＬ容量のフラスコ内で行われ（図１）、約５×１０^{6}または１０×１０^{6}ＴＩＬを、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２および３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３で補足された、４００ｍＬの５０／５０培地中、１対１００の比で照射された同種異系ＰＢＭＣとともに培養する。Ｇ－Ｒｅｘ １００フラスコを、５％CO_2中３７℃でインキュベートする。いくつかの実施形態では、５日目に、２５０ｍＬの上清を除去し、遠心分離ボトルに入れ、１５００ｒｐｍ（４９１ｇ）で１０分間遠心分離する。次いで、ＴＩＬペレットを、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬの新鮮な５０／５０培地に再懸濁し、元のＧ－Ｒｅｘ １００フラスコに戻すことができる。ＴＩＬがＧ－Ｒｅｘ １００フラスコ内で連続的に拡張される実施形態では、７日目に、各Ｇ－Ｒｅｘ １００内のＴＩＬを、各フラスコ内に存在する３００ｍＬの培地に懸濁し、細胞懸濁液を３つの１００ｍＬアリコートに分割し、それを使用して３つのＧ－Ｒｅｘ １００フラスコに播種する。次いで、５％ヒトＡＢ血清および３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのＡＩＭ－Ｖを、各フラスコに添加する。Ｇ－Ｒｅｘ １００フラスコを、５％CO_2中３７℃でインキュベートし、４日後に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのＡＩＭ－Ｖを、各Ｇ－Ｒｅｘ １００フラスコに添加する。培養１４日目に、細胞を採取する。

【０４４１】

Ｔリンパ球およびＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた、但し多数の遺伝子セグメントの体細胞組み換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、およびＣ（一定）は、免疫グロブリンおよびＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性および下流への応用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって得られたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第２の拡張において得られたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性および／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細

胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、α、β、γ、およびδ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）αおよび／またはβの発現が増加している。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）αの発現が増加している。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）βの発現が増加している。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加している。

【０４４２】

いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地と称されることもある）は、以下でさらに詳細に考察されるように、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、ならびに抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。

【０４４３】

いくつかの実施形態では、第２の拡張、例えば、図１によるステップＤは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、ＴＩＬ拡張のために閉鎖系が用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【０４４４】

１．フィーダー細胞および抗原提示細胞

実施形態では、本明細書に記載される第２の拡張手順（例えば、図１のステップＤに記載されるような拡張、ならびにＲＥＰと称されるものを含む）は、ＲＥＰ　ＴＩＬ拡張中および／または第２の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な献血者からの標準的な全血単位から得られる末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準的な方法を使用して得られる。

【０４４５】

一般に、同種異系ＰＢＭＣは、照射または熱処理のいずれかによって不活化され、実施例に記載されるように、ＲＥＰ手順で使用され、これは、照射された同種異系ＰＢＭＣの複製能力を評価するための例示的なプロトコルを提供する。

【０４４６】

いくつかの実施形態では、１４日目の生細胞の総数が、ＲＥＰの０日目および／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された最初の生細胞数よりも少ない場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。

【０４４７】

いくつかの実施形態では、７日目および１４日目のＯＫＴ３およびＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、ＲＥＰの０日目および／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された最初の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【０４４８】

いくつかの実施形態では、７日目および１４日目のＯＫＴ３およびＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、ＲＥＰの０日目および／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された最初の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、５～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および１０００～６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１０～５０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および２０００～５０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２０～４０

ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および２０００～４０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２５～３５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および２５００～３５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【０４４９】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬ対抗原提示フィーダー細胞の比は、約１対２５、約１対５０、約１対１００、約１対１２５、約１対１５０、約１対１７５、約１対２００、約１対２２５、約１対２５０、約１対２７５、約１対３００、約１対３２５、約１対３５０、約１対３７５、約１対４００、または約１対５００である。実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬ対抗原提示フィーダー細胞の比は、１対５０～１対３００の間である。実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬ対抗原提示フィーダー細胞の比は、１対１００～１対２００の間である。

【０４５０】

実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約２．５×１０^{9}フィーダー細胞対約１００×１０^{6}ＴＩＬの比を必要とする。実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約２．５×１０^{9}フィーダー細胞対約５０×１０^{6}ＴＩＬの比を必要とする。さらに別の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約２．５×１０^{9}フィーダー細胞対約２５×１０^{6}ＴＩＬを必要とする。

【０４５１】

実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、第２の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な献血者からの標準的な全血単位から得られる末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準的な方法を使用して得られる。実施形態では、人工抗原提示（ａＡＰＣ）細胞が、ＰＢＭＣの代わりに使用される。

【０４５２】

一般に、同種異系ＰＢＭＣは、照射または熱処理のいずれかによって不活化され、図および実施例に記載される例示的な手順を含む、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順で使用される。

【０４５３】

実施形態では、人工抗原提示細胞は、ＰＢＭＣの代替として、またはＰＢＭＣと組み合わせて、第２の拡張において使用される。

【０４５４】

２．サイトカイン

本明細書に記載の拡張方法は、一般に、当該技術分野で知られているように、高用量のサイトカイン、特にＩＬ－２を含む培養培地を使用する。

【０４５５】

代替的に、国際公開第ＷＯ２０１５／１８９３５６号およびW国際公開第ＷＯ２０１５／１８９３５７号（参照によりそれらの全体が本明細書に明示的に組み込まれる）に一般に概説されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせで、ＴＩＬＳの急速拡張および／または第２の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することもさらに可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２およびＩＬ－１５、ＩＬ－２およびＩＬ－２１、ＩＬ－１５およびＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１が含まれ、後者は多くの実施形態において特定の用途を見出す。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようなＴ細胞の生成に特に有利に働く。

【０４５６】

Ｅ．ステップＥ：ＴＩＬを採取する

第２の拡張ステップ後、細胞を採取することができる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図１に提供されるように、１、２、３、４、またはそれ以上の拡張ステッ

プ後に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図１に提供されるように、２つの拡張ステップ後に採取される。

【０４５７】

ＴＩＬは、任意の適切で無菌的な方法で、例えば、遠心分離によって採取され得る。ＴＩＬ採取のための方法は、当該技術分野で周知であり、かかる既知の方法は、本プロセスで用いることができる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、自動化されたシステムを使用して採取される。

【０４５８】

細胞採取機および／または細胞処理システムは、例えば、Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ Ｋａｂｉ、Ｔｏｍｔｅｃ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ、およびＩｎｏｔｅｃｈ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃを含む様々な供給源から市販されている。任意の細胞ベースの採取機を、本方法で用いることができる。いくつかの実施形態では、細胞採取機および／または細胞処理システムは、膜ベースの細胞採取機である。いくつかの実施形態では、細胞採取は、ＬＯＶＯシステム（Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ Ｋａｂｉによって製造された）などの細胞処理システムを介して行われる。「ＬＯＶＯ細胞処理システム」という用語はまた、細胞を含む溶液を、無菌および／または閉鎖系環境において、紡糸膜または紡糸フィルターなどの膜またはフィルターを通してポンプ輸送し、ペレット化せずに上清または細胞培養培地を除去するための連続フローおよび細胞処理を可能にする、任意のベンダーによって製造された任意の機器または装置を指す。いくつかの実施形態では、細胞採取機および／または細胞処理システムは、閉鎖された無菌システムにおいて、細胞分離、洗浄、流体交換、濃縮、および／または他の細胞処理ステップを行うことができる。

【０４５９】

いくつかの実施形態では、採取、例えば、図１によるステップＥは、閉鎖系バイオリアクターから行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、ＴＩＬ拡張のために閉鎖系が用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【０４６０】

いくつかの実施形態では、図１によるステップＥは、実施例Ｇに記載のプロセスに従って行われる。いくつかの実施形態では、システムの無菌性および閉鎖性を維持するために、無菌条件下で注射器を介して閉鎖系にアクセスする。いくつかの実施形態では、実施例Ｇに記載されるような閉鎖系が用いられる。

【０４６１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、実施例Ｇに記載の方法に従って採取される。いくつかの実施形態では、１日目～１１日目の間のＴＩＬは、セクション８．５に記載の方法を使用して採取される（実施例Ｇでは１１日目のＴＩＬ採取と称される）。いくつかの実施形態では、１２日目～２２日目の間のＴＩＬは、セクション８．１２に記載の方法を使用して採取される（実施例Ｇでは２２日目のＴＩＬ採取と称される）。

【０４６２】

Ｆ．ステップＦ：最終製剤／注入バッグへの移行

図１に例示的な順序で提供され、上記および本明細書に詳細に概説されるステップＡ～Ｅが完了した後、細胞は、患者への投与に使用するために容器に移される。いくつかの実施形態では、治療上十分な数のＴＩＬが上記の拡張方法を使用して得られると、それらは、患者への投与に使用するために容器に移される。

【０４６３】

実施形態では、本開示のＡＰＣを使用して拡張されたＴＩＬは、薬学的組成物として患者に投与される。実施形態では、薬学的組成物は、無菌緩衝液中のＴＩＬの懸濁液である。本開示のＰＢＭＣを使用して拡張されたＴＩＬは、当該技術分野で知られている任意の

好適な経路によって投与することができる。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、単一の動脈内または静脈内注入として投与され、これは好ましくは、およそ３０～６０分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、およびリンパ内が含まれる。

【０４６４】

Ｇ．任意の細胞培地成分

１．抗ＣＤ３抗体

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用される培養培地（ＲＥＰと称されるものを含む、例えば、図１を参照）はまた、抗ＣＤ３抗体を含む。ＩＬ－２と組み合わせた抗ＣＤ３抗体は、ＴＩＬ集団のＴ細胞活性化および細胞分裂を誘導する。この効果は、完全長抗体、ＦａｂおよびＦ（ａｂ′）２断片で見られ、前者が一般的に好まれる。例えば、Ｔｓｏｕｋａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９８５，１３５，１７１９（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【０４６５】

当業者によって理解されるように、マウス、ヒト、霊長類、ラット、およびイヌ抗体を含むがこれらに限定されない様々な哺乳動物からの抗ヒトＣＤ３ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を含む、本発明での使用が見出されるいくつかの好適な抗ヒトＣＤ３抗体が存在する。特定の実施形態では、ＯＫＴ３抗ＣＤ３抗体が使用される（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ，Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪまたはＭｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡから市販されている）。

【表５】

表５：ムロモナブのアミノ酸配列（例示的なＯＫＴ－３抗体）

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

【０４６６】

２．４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）アゴニスト

実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）アゴニストである。４－１ＢＢアゴニストは、当該技術分野で知られている任意の４－１ＢＢ結合分子であり得る。４－１ＢＢ結合分子は、ヒトまたは哺乳動物の４－１ＢＢに結合することができるモノクローナル抗体または融合タンパク質であり得る。４－１ＢＢアゴニストまたは４－１ＢＢ結合分子は、任意のアイソタイプ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、およびＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、およびＩｇＡ２）またはサブクラスの免疫グロブリン分子の免疫グロブリン重鎖を含み得る。４－１ＢＢアゴニストまたは４－１ＢＢ結合分子は、重鎖および軽鎖の両方を有し得る。本明細書で使用される場合、結合分子という用語はまた、抗体（完全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、および抗体断片、例えば、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ′）断片、Ｆａｂ発現ライブラリーによって産生された断片、上記のうちのいずれかのエピトープ結合断片、ならびに４－１ＢＢに結合する操作された形態の抗体、例えば、ｓｃＦｖ分子を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、完全なヒト抗体である抗原結合タンパク質である。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ヒト化抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形

態では、ここに開示される方法および組成物において使用するための４－１ＢＢアゴニストには、抗４－１ＢＢ抗体、ヒト抗４－１ＢＢ抗体、マウス抗４－１ＢＢ抗体、哺乳動物抗４－１ＢＢ抗体、モノクローナル抗４－１ＢＢ抗体、ポリクローナル抗４－１ＢＢ抗体、キメラ抗４－１ＢＢ抗体、抗４－１ＢＢアドネクチン、抗４－１ＢＢドメイン抗体、一本鎖抗４－１ＢＢ断片、重鎖抗４－１ＢＢ断片、軽鎖抗４－１ＢＢ断片、抗４－１ＢＢ融合タンパク質、およびそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、多様体、またはバイオシミラーが含まれる。アゴニスト抗４－１ＢＢ抗体は、強力な免疫応答を誘導することが知られている。Ｌｅｅ，ｅｔ ａｌ．，ＰＬＯＳ Ｏｎｅ ２０１３，８，ｅ６９６７７。好ましい実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、アゴニスト、抗４－１ＢＢヒト化、または完全ヒトモノクローナル抗体（すなわち、単一の細胞株に由来する抗体）である。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＥＵ－１０１（Ｅｕｔｉｌｅｘ Ｃｏ．Ｌｔｄ．）、ウトミルマブ、もしくはウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、多様体、もしくはバイオシミラーである。好ましい実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブもしくはウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、多様体、もしくはバイオシミラーである。

【０４６７】

好ましい実施形態では、４－１ＢＢアゴニストまたは４－１ＢＢ結合分子はまた、融合タンパク質であり得る。好ましい実施形態では、三量体または六量体４－１ＢＢアゴニスト（３つまたは６つのリガンド結合ドメインを有する）などの多量体４－１ＢＢアゴニストは、典型的に２つのリガンド結合ドメインを有するアゴニストモノクローナル抗体と比較して、優れた受容体（４－１ＢＢＬ）クラスター化および内部細胞シグナル伝達複合体形成を誘導し得る。３つのＴＮＦＲＳＦ結合ドメインおよびＩｇＧ１－Ｆｃを含み、任意にこれらの融合タンパク質のうちの２つ以上をさらに結合する三量体（三価）または六量体（もしくは六価）またはそれ以上の融合タンパク質は、例えば、Ｇｉｅｆｆｅｒｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ２０１３，１２，２７３５－４７に記載されている。

【０４６８】

アゴニスト４－１ＢＢ抗体および融合タンパク質は、強い免疫応答を誘導することが知られている。好ましい実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、毒性を低減するのに十分な方法で４－１ＢＢ抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、抗体依存性細胞毒性（ＡＤＣＣ）、例えば、ＮＫ細胞細胞傷害を無効にするアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）を無効にするアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を無効にするアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、Ｆｃ領域機能性を無効にするアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。

【０４６９】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ヒト４－１ＢＢ（配列番号９）に高い親和性およびアゴニスト活性で結合することを特徴とする。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ヒト４－１ＢＢ（配列番号９）に結合する結合分子である。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、マウス４－１ＢＢ（配列番号１０）に結合する結合分子である。４－１ＢＢアゴニストまたは結合分子が結合する４－１ＢＢ抗原のアミノ酸配列を表６に要約する。

【表６】

表６．４－１ＢＢ抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号９　ヒト4-1BB、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー9（ホモサピエンス）	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRFPEEEE GGCEL 255
配列番号10　マウス4-1BB、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー9（ハツカネズミ）	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 60 CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG 180 GHSLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKTT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGGYEL 256

【０４７０】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、および方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１００ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約７０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約６０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約５０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約４０ｐＭ以下のK_Dで結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約３０ｐＭ以下のK_Dで結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０４７１】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、および方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約7.5×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約7.5×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約8×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約8.5×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約9×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約9.5×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約1×10^{6}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０４７２】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、および方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約2×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約2.1×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約2.2×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約2.3×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約2.4×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約2.5×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約2.6×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約2.7×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約2.8×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約2.9×10^{-5}ｌ／ｓ以

下のk_{dissoc}で結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約３×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０４７３】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、および方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１０ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約７ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約６ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約５ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約４ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約３ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０４７４】

好ましい実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＰＦ－０５０８２５６６もしくはＭＯＲ－７４８０としても知られるウトミルマブ、またはそれらの断片、誘導体、多様体、もしくはバイオシミラーである。ウトミルマブは、Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．から入手可能である。ウトミルマブは、免疫グロブリンＧ２－λ、抗［ホモサピエンスＴＮＦＲＳＦ９（腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーメンバー９、４－１ＢＢ、Ｔ細胞抗原ＩＬＡ、ＣＤ１３７）］、ホモサピエンス（完全ヒト）モノクローナル抗体である。ウトミルマブのアミノ酸配列を表ＥＥに示す。ウトミルマブは、Ａｓｎ５９およびＡｓｎ２９２におけるグリコシル化部位、２２－９６位（V_H－V_L）、１４３－１９９位（C_H１－C_L）、２５６－３１６位（C_H２）、および３６２－４２０位（C_H３）における重鎖鎖内ジスルフィド架橋；２２′－８７′位（V_H－V_L）および１３６′－１９５′位（C_H１－C_L）における軽鎖鎖内ジスルフィド架橋；ＩｇＧ２Ａアイソフォーム２１８－２１８、２１９－２１９、２２２－２２２、および２２５－２２５位、ＩｇＧ２Ａ／Ｂアイソフォーム２１８－１３０、２１９－２１９、２２２－２２２、および２２５－２２５位における鎖間重鎖－重鎖ジスルフィド架橋；ならびにＩｇＧ２Ａアイソフォーム１３０－２１３′（２）位、ＩｇＧ２Ａ／Ｂアイソフォーム２１８－２１３′位および１３０－２１３′位、ならびにＩｇＧ２Ｂアイソフォーム２１８－２１３′（２）位における鎖間重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウトミルマブならびにその多様体および断片の調製および特性は、米国特許第８，８２１，８６７号、同第８，３３７，８５０号、および同第９，４６８，６７８号、ならびに国際特許出願公開第ＷＯ２０１２／０３２４３３Ａ１（これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。ウトミルマブの前臨床特徴は、Ｆｉｓｈｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇ．＆Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１２，６１，１７２１－３３に記載されている。様々な血液学的および固形腫瘍の適応症におけるウトミルマブの現在の臨床試験には、アメリカ国立衛生研究所のｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０２４４４７９３、ＮＣＴ０１３０７２６７、ＮＣＴ０２３１５０６６、およびＮＣＴ０２５５４８１２が含まれる。

【０４７５】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、配列番号１１によって与えられる重鎖および配列番号１２によって与えられる軽鎖を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号１１および配列番号１２に示される配列を有する重鎖および軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、多様体、もしくはコンジュゲートを含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１および配列番号１２に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１および配列番号１２に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１および配

列番号１２に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１および配列番号１２に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１および配列番号１２に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖および軽鎖を含む。

【０４７６】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブの重鎖および軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１３に示される配列を含み、４－１ＢＢアゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１４に示される配列、およびその保存的アミノ酸置換を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１３および配列番号１４に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１３および配列番号１４に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１３および配列番号１４に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１３および配列番号１４に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１３および配列番号１４に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、配列番号１３および配列番号１４に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む、ｓｃＦｖ抗体を含む。

【０４７７】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号１５、配列番号１６、および配列番号１７に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１８、配列番号１９、および配列番号２０に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【０４７８】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブに関して薬物規制当局によって承認された４－１ＢＢアゴニストのバイオシミラーモノクローナル抗体である。実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、４－１ＢＢ抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、および切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された４－１ＢＢアゴニスト抗体であり、４－１ＢＢアゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。４－１ＢＢアゴニスト抗体は、米国ＦＤＡおよび／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。

【表７】

表７．ウトミルマブに関連する４－１ＢＢアゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 11　ウトミルマブの重鎖	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTNY 60 SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK 120 GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS 180 LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP 240 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV 300 LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL 360 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC 420 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G 441
配列番号 12　ウトミルマブの軽鎖	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF 120 PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL 180 SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS 214
配列番号 13　ウトミルマブの重鎖可変領域	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN 60 YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS 118
配列番号 14　ウトミルマブの軽鎖可変領域	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL 108
配列番号 15　ウトミルマブの重鎖 CDR1	STYWIS 6
配列番号 16　ウトミルマブの重鎖 CDR2	KIYPGDSYTN YSPSFQG 17
配列番号 17　ウトミルマブの重鎖 CDR3	RGYGIFDY 8
配列番号 18　ウトミルマブ用軽鎖 CDR1	SGDNIGDQYA H 11
配列番号 19　ウトミルマブ用軽鎖 CDR2	QDKNRPS 7
配列番号 20　ウトミルマブ用軽鎖 CDR3	ATYTGFGSLA V 11

【０４７９】

好ましい実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＢＭＳ－６６３５１３および２０Ｈ４．９．ｈ４ａとしても知られるモノクローナル抗体ウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、多様体、もしくはバイオシミラーである。ウレルマブは、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ，Ｉｎｃ．およびＣｒｅａｔｉｖｅ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｉｎｃ．から入手可能である。ウレルマブは、免疫グロブリンＧ４－κ、抗［ホモサピエンスＴＮＦＲＳＦ９（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー９、４－１ＢＢ、Ｔ細胞抗原ＩＬＡ、ＣＤ１３７）］、ホモサピエンス（完全ヒト）モノクローナル抗体である。ウレルマブのアミノ酸配列を表ＥＥに示す。ウレルマブは、２９８位（および２９８′′）にお

けるＮ－グリコシル化部位；２２－９５位（V_H－V_L）、１４８－２０４位（C_H1－C_L）、２６２－３２２位（C_H2）、および３６８－４２６位（C_H3）（２２′′－９５′′、１４８′′－２０４′′、２６２′′－３２２′′、および３６８′′－４２６′′位）における重鎖鎖内ジスルフィド架橋；２３′－８８′位（V_H－V_L）および１３６′－１９６′位（C_H1－C_L）（２３′′′－８８′′′および１３６′′′－１９６′′′位）における軽鎖鎖内ジスルフィド架橋；ならびに１３５－２１６′および１３５′′－２１６′′′における鎖間重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウレルマブならびにその多様体および断片の調製および特性は、米国特許第７，２８８，６３８号および第８，９６２，８０４号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ウレルマブの前臨床および臨床特徴は、Ｓｅｇａｌ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１６に記載されており、ｈｔｔｐ：／ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１５８／１０７８－０４３２．ＣＣＲ－１６－１２７２において入手可能である。様々な血液学的および固形腫瘍の適応症におけるウレルマブの現在の臨床試験には、アメリカ国立衛生研究所のｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０１７７５６３１、ＮＣＴ０２１１００８２、ＮＣＴ０２２５３９９２、およびＮＣＴ０１４７１２１０が含まれる。

【０４８０】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、配列番号２１によって与えられる重鎖および配列番号２２によって与えられる軽鎖を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号２１および配列番号２２に示される配列を有する重鎖および軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、多様体、もしくはコンジュゲートを含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号２１および配列番号２２に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号２１および配列番号２２に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号２１および配列番号２２に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号２１および配列番号２２に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号２１および配列番号２２に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖および軽鎖を含む。

【０４８１】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブの重鎖および軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号２３に示される配列を含み、４－１ＢＢアゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号２４に示される配列、およびその保存的アミノ酸置換を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号２３および配列番号２４に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号２３および配列番号２４に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号２３および配列番号２４に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号２３および配列番号２４に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号２３および配列番号２４に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、配列番号２３および配列番号２４に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む、ｓｃＦｖ抗体を含む。

【０４８２】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号２５、配列番号２６、お

よび配列番号２７に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２８、配列番号２９、および配列番号３０に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【０４８３】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブに関して薬物規制当局によって承認された４－１ＢＢアゴニストのバイオシミラーモノクローナル抗体である。実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、４－１ＢＢ抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、および切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された４－１ＢＢアゴニスト抗体であり、４－１ＢＢアゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。４－１ＢＢアゴニスト抗体は、米国ＦＤＡおよび／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。

【表８】

表８：ウレルマブに関連する４－１ＢＢアゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 21　ウレルマブの重鎖	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN 60 PSLESRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK 448
配列番号 22　ウレルマブの軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF 120 PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST 180 LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC 216
配列番号 23　ウレルマブの可変重鎖	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP 60 EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP 120
配列番号 24　ウレルマブの可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP 60 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ 110
配列番号 25　ウレルマブの重鎖 CDR1	GYYWS 5
配列番号 26　ウレルマブの重鎖 CDR2	EINHGGYVTY NPSLES 16
配列番号 27　ウレルマブの重鎖 CDR3	DYGPGNYDWY FDL 13
配列番号 28　ウレルマブの軽鎖 CDR1	RASQSVSSYL A 11
配列番号 29　ウレルマブの軽鎖 CDR2	DASNRAT 7
配列番号 30　ウレルマブの軽鎖 CDR3	QQRSDWPPAL T 11

【０４８４】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、１Ｄ８、３Ｅｌｏｒ、４Ｂ４（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　３０９８０９）、Ｈ４－１ＢＢ－Ｍ１２７（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ　５５２５３２）、ＢＢＫ２（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　ＭＳ６２１ＰＡＢＸ）、１４５５０１（Ｌｅｉｎｃｏ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｂ５９１）、ＡＴＣＣ番号ＨＢ－１１２４８として寄託された細胞株によって産生され、米国特許第６，９７４，８６３号に開示される抗体、５Ｆ４（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　３１　１５０３）、Ｃ６５－４８５（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ　５５９４４６）、米国特許出願公開第ＵＳ２００５／００９５２４４号に開示される抗体、米国特許第７，２８８，６３８号に開示される抗体（例えば、２０Ｈ４．９－ＩｇＧｌ（ＢＭＳ－６６３０３１））、米国特許第６，８８７，６７３号に開示

される抗体（例えば、４Ｅ９もしくはＢＭＳ－５５４２７１）、米国特許第７，２１４，４９３号に開示される抗体、米国特許第６，３０３，１２１号に開示される抗体、米国特許第６，５６９，９９７号に開示される抗体、米国特許第６，９０５，６８５号に開示される抗体（例えば、４Ｅ９もしくはＢＭＳ－５５４２７１）、米国特許第６，３６２，３２５号に開示される抗体（例えば、１Ｄ８もしくはＢＭＳ－４６９４９２、３Ｈ３もしくはＢＭＳ－４６９４９７、または３Ｅｌ）、米国特許第６，９７４，８６３号に開示される抗体（例えば、５３Ａ２）、米国特許第６，２１０，６６９号に開示される抗体（例えば、１Ｄ８、３Ｂ８、もしくは３Ｅｌ）、米国特許第５，９２８，８９３号に開示される抗体、米国特許第６，３０３，１２１号に開示される抗体、米国特許第６，５６９，９９７号に開示される抗体、国際特許出願公開第ＷＯ２０１２／１７７７８８号、同第ＷＯ２０１５／１１９９２３号、および同第ＷＯ２０１０／０４２４３３号に開示される抗体、ならびにそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、多様体、またはバイオシミラーからなる群から選択され、前述の特許または特許出願公開の各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０４８５】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、国際特許出願公開第ＷＯ２００８／０２５５１６Ａ１号、同第ＷＯ２００９／００７１２０Ａ１号、同第ＷＯ２０１０／００３７６６Ａ１号、同第ＷＯ２０１０／０１００５１Ａ１号、および同第ＷＯ２０１０／０７８９６６Ａ１号；米国特許出願公開第ＵＳ２０１１／００２７２１８Ａ１号、同第ＵＳ２０１５／０１２６７０９Ａ１号、同第ＵＳ２０１１／０１１１４９４Ａ１号、同第ＵＳ２０１５／０１１０７３４Ａ１号、および同第ＵＳ２０１５／０１２６７１０Ａ１号；ならびに米国特許第９，３５９，４２０号、同第９，３４０，５９９号、同第８，９２１，５１９号、および同第８，４５０，４６０号に記載される４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質であり、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０４８６】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、構造Ｉ－Ａ（Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）もしくは構造Ｉ－Ｂ（Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）に示されるような４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質、またはそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、多様体、もしくはバイオシミラーである（図５０を参照）。構造Ｉ－ＡおよびＩ－Ｂにおいて、円筒は、個々のポリペプチド結合ドメインを指す。構造Ｉ－ＡおよびＩ－Ｂは、例えば、４－１ＢＢＬまたは４－１ＢＢに結合する抗体から誘導される３つの線形に結合したＴＮＦＲＳＦ結合ドメインを含み、これらを折り畳んで三価タンパク質を形成し、次いでこれをＩｇＧ１－Ｆｃ（C_H3およびC_H2ドメインを含む）によって第２の三価タンパク質に結合させ、次いでこれを使用して、三価タンパク質のうちの２つをジスルフィド結合（小さい長楕円）によって一緒に結合し、構造を安定化し、６つの受容体およびシグナル伝達タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを一緒にして、シグナル伝達複合体を形成することができるアゴニストを提供する。円筒として示されるＴＮＦＲＳＦ結合ドメインは、例えば、親水性残基および柔軟性のためのＧｌｙおよびＳｅｒ配列、ならびに溶解性のためのＧｌｕおよびＬｙｓを含み得るリンカーによって接続されたV_HおよびV_L鎖を含む、ｓｃＦｖドメインであり得る。ｄｅ Ｍａｒｃｏ，Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ｃｅｌｌ Ｆａｃｔｏｒｉｅｓ，２０１１，１０，４４、Ａｈｍａｄ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．＆Ｄｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２，９８０２５０、Ｍｏｎｎｉｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，２０１３，２，１９３－２０８、または本明細書の他の場所に組み込まれている参照文献に記載されるものなどの任意のｓｃＦｖドメイン設計を使用することができる。この形態の融合タンパク質構造は、米国特許第９，３５９，４２０号、第９，３４０，５９９号、第８，９２１，５１９号、および第８，４５０，４６０号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０４８７】

構造Ｉ－Ａの他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表ＧＧに示す。Ｆｃドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン（配列番号３１のアミノ酸１７～２３０）、完全な

ヒンジドメイン（配列番号３１のアミノ酸１～１６）、またはヒンジドメインの部分（例えば、配列番号３１のアミノ酸４～１６）を含む。Ｃ末端Ｆｃ抗体を接続するための好ましいリンカーは、追加のポリペプチドの融合に適したリンカーを含む、配列番号３２～配列番号４１に示される実施形態から選択され得る。

【表９】

表９：Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質設計（構造Ｉ－Ａ）を有する、４－１ＢＢ融合タンパク質を含むＴＮＦＲＳＦ融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 31　Fc ドメイン	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 60 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS 120 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 180 LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 230
配列番号 32　リンカー	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
配列番号 33　リンカー	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
配列番号 34　リンカー	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
配列番号 35　リンカー	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
配列番号 36　リンカー	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
配列番号 37　リンカー	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
配列番号 38　リンカー	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE 24
配列番号 39　リンカー	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE 23
配列番号 40　リンカー	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E 21
配列番号 41　リンカー	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE 25

【０４８８】

構造Ｉ－Ｂの他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表ＨＨに示す。Ｆｃ抗体断片が、構造Ｉ－ＢのようにＴＮＲＦＳＦ融合タンパク質のＮ末端に融合される場合、Ｆｃモジュールの配列は、好ましくは、配列番号４２に示されるものであり、リンカー配列は、好ましくは、配列番号４３～配列番号４５に示されるそれらの実施形態から選択される。

【表１０】

表１０：Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質設計（構造Ｉ－Ｂ）を有する、４－１ＢＢ融合タンパク質を含むＴＮＦＲＳＦ融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 42　Fc ドメイン	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT 60 CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK 120 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE 180 WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS 240 LSLSPG 246
配列番号 43　リンカー	SGSGSGSGSG S 11
配列番号 44　リンカー	SSSSSSGSGS GS 12
配列番号 45　リンカー	SSSSSSGSGS GSGSGS 16

【０４８９】

実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、ウトミルマブの可変重鎖および可変軽鎖、ウレルマブの可変重鎖および可変軽鎖、ウトミルマブの可変重鎖および可変軽鎖、表ＧＧに記載の可変重鎖および可変軽鎖から選択される可変重鎖および可変軽鎖、前述の可変重鎖および可変軽鎖の任意の組み合わせ、ならびにそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、多様体、およびバイオシミラーからなる群から選択される１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。

【０４９０】

実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、４－１ＢＢＬ配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、配列番号４６による配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、可溶性４－１ＢＢＬ配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、配列番号４７による配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。

【０４９１】

実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号１３および配列番号１４に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、V_HおよびV_Lドメインは、リンカーによって接続されている。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号２３および配列番号２４に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、V_HおよびV_Lドメインは、リンカーによって接続されている。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、各々が表１１に示されるV_HおよびV_H配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、V_HおよびV_Lドメインが、リンカーによって接続されている。

【表１１】

表１１：融合タンパク質の４－１ＢＢ結合ドメインとしてまたはｓｃＦｖ　４－１ＢＢアゴニスト抗体として有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 46 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA 60 SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL 120 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA 180 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV 240 TPEIPAGLPS PRSE 254
配列番号 47 4-1BBL 可溶性ドメイン	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ 60 LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL 120 SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE 168
配列番号 48 4B4-1-1 バージョン 1 の可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS 118
配列番号 49 4B4-1-1 バージョン 1 の可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK 107
配列番号 50 4B4-1-1 バージョン 2 の可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA 119
配列番号 51 4B4-1-1 バージョン 2 の可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR 108
配列番号 52 H39E3-2 の可変重鎖	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP 60 GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT 120
配列番号 53 H39E3-2 の可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL 60 WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA 110

【０４９２】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、（ｉ）第１の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、および（ｖ）第３の可溶性４－１ＢＢ結合ドメインを含む４－１ＢＢアゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端および／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインである。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、（ｉ）第１の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、および（ｖ）第３の可溶性４－１ＢＢ結合ドメインを含む４－１ＢＢアゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端および／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインであり、可溶性４－１ＢＢドメインの各々が、茎領域（三量体化に寄与し、細胞膜まで一定の距離を提供するが、４－１ＢＢ結合ドメインの一部ではない）を欠き、第１および第２のペプチドリンカーは、独立して、３～８アミノ酸の長さを有する。

【０４９３】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、（ｉ）第１の可溶性腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）

スーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、および（ｖ）第３の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインを含む４－１ＢＢアゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインの各々は、茎領域を欠き、第１および第２のペプチドリンカーは、独立して、３～８アミノ酸の長さであり、各ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインは、４－１ＢＢ結合ドメインである。

【０４９４】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、前述のV_Lドメインのうちのいずれかに結合された前述のV_Hドメインのうちのいずれかを含む、４－１ＢＢアゴニストｓｃＦｖ抗体である。

【０４９５】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＢＰＳ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）から市販されているＢＰＳ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ ４－１ＢＢアゴニスト抗体カタログ番号７９０９７－２である。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、Ｃｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ（Ｓｈｉｒｌｅｙ，ＮＹ，ＵＳＡ）から市販されているＣｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ ４－１ＢＢアゴニスト抗体カタログ番号ＭＯＭ－１８１７９である。

【０４９６】

３．ＯＸ４０（ＣＤ１３４）アゴニスト

実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、ＯＸ４０（ＣＤ１３４）アゴニストである。ＯＸ４０アゴニストは、当該技術分野で知られている任意のＯＸ４０結合分子であり得る。ＯＸ４０結合分子は、ヒトまたは哺乳動物のＯＸ４０に結合することができるモノクローナル抗体または融合タンパク質であり得る。ＯＸ４０アゴニストまたはＯＸ４０結合分子は、任意のアイソタイプ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、およびＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、およびＩｇＡ２）、またはサブクラスの免疫グロブリン分子の免疫グロブリン重鎖を含み得る。ＯＸ４０アゴニストまたはＯＸ４０結合分子は、重鎖および軽鎖の両方を有し得る。本明細書で使用される場合、結合分子という用語はまた、抗体（完全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、および抗体断片、例えば、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ′）断片、Ｆａｂ発現ライブラリーによって産生された断片、上記のうちのいずれかのエピトープ結合断片、ならびにＯＸ４０に結合する操作された形態の抗体、例えば、ｓｃＦｖ分子を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、完全なヒト抗体である抗原結合タンパク質である。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ヒト化抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ここで開示される方法および組成物において使用するためのＯＸ４０アゴニストには、抗ＯＸ４０抗体、ヒト抗ＯＸ４０抗体、マウス抗ＯＸ４０抗体、哺乳動物抗ＯＸ４０抗体、モノクローナル抗ＯＸ４０抗体、ポリクローナル抗ＯＸ４０抗体、キメラ抗ＯＸ４０抗体、抗ＯＸ４０アドネクチン、抗ＯＸ４０ドメイン抗体、一本鎖抗ＯＸ４０断片、重鎖抗ＯＸ４０断片、軽鎖抗ＯＸ４０断片、抗ＯＸ４０融合タンパク質、およびそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、多様体、またはバイオシミラーが含まれる。好ましい実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、アゴニスト、抗ＯＸ４０ヒト化、または完全ヒトモノクローナル抗体（すなわち、単一の細胞株に由来する抗体）である。

【０４９７】

好ましい実施形態では、ＯＸ４０アゴニストまたはＯＸ４０結合分子はまた、融合タンパク質であり得る。ＯＸ４０Ｌに融合されたＦｃドメインを含むＯＸ４０融合タンパク質は、例えば、Ｓａｄｕｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００９，１８２，１４８１－８９に記載されている。好ましい実施形態では、三量体または六量体ＯＸ４０アゴニスト（３つまたは６つのリガンド結合ドメインを有する）などの多量体ＯＸ４０

アゴニストは、典型的に２つのリガンド結合ドメインを有するアゴニストモノクローナル抗体と比較して、優れた受容体（ＯＸ４０Ｌ）クラスター化および内部細胞シグナル伝達複合体形成を誘導し得る。３つのＴＮＦＲＳＦ結合ドメインおよびＩｇＧ１－Ｆｃを含み、任意にこれらの融合タンパク質のうちの２つ以上をさらに結合する三量体（三価）または六量体（もしくは六価）またはそれ以上の融合タンパク質は、例えば、Ｇｉｅｆｆｅｒｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ２０１３，１２，２７３５－４７に記載されている。

【０４９８】

アゴニストＯＸ４０抗体および融合タンパク質は、強い免疫応答を誘導することが知られている。Ｃｕｒｔｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１３，７３，７１８９－９８。好ましい実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、毒性を低減するのに十分な方法でＯＸ４０抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体依存性細胞毒性（ＡＤＣＣ）、例えば、ＮＫ細胞細胞傷害を無効にするアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）を無効にするアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を無効にするアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｆｃ領域機能性を無効にするアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。

【０４９９】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ヒトＯＸ４０（配列番号５４）に高い親和性およびアゴニスト活性で結合することを特徴とする。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ヒトＯＸ４０（配列番号５４）に結合する結合分子である。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、マウスＯＸ４０（配列番号５５）に結合する結合分子である。ＯＸ４０アゴニストまたは結合分子が結合するＯＸ４０抗原のアミノ酸配列を表１２に要約する。

【表１２】

表１２：ＯＸ４０抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 54 ヒト OX40 （ホモサピエンス）	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ 60 NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK 120 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ 180 GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL 240 RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI 277
配列番号 55 マウス OX40 （ハツカネズミ）	MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC 60 HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG 120 VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP 180 TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW 240 RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI 272

【０５００】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、および方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１００ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約６０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約５０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約４０ｐＭ以下のK_Dで結合する、またはヒトもしくはマウスＯＸ４０に約３０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【０５０１】
いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、および方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７．５×１０^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７．５×１０^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８×１０^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８．５×１０^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９×１０^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９．５×１０^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、またはヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１×１０^{6}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【０５０２】
いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、および方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．１×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．２×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．３×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．４×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．５×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．６×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．７×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．８×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．９×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、またはヒトもしくはマウスＯＸ４０に約３×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【０５０３】
いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、および方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１０ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約６ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約５ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約４ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約３ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【０５０４】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＭＥＤＩ０５６２またはＭＥＤＩ－０５６２としても知られるタボリキシズマブである。タボリキシズマブは、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ，Ｉｎｃ．の子会社であるＭｅｄＩｍｍｕｎｅから入手可能である。タボリキシズマブは、免疫グロブリンＧ１－κ、抗［ホモサピエンスＴＮＦＲＳＦ４（腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーメンバー４、ＯＸ４０、ＣＤ１３４）］、ヒト化およびキメラモノクローナル抗体である。タボリキシズマブのアミノ酸配列を表ＫＫに示す。タボリキシズマブは、３０１および３０１′′位における、フコシル化複合体二分性ＣＨＯ型グリカンを有するＮ－グリコシル化部位；２２－９５位（V_H－V_L）、１４８－２０４位（C_H1－C_L）、２６５－３２５位（C_H2）、および３７１－４２９位（C_H3）（２２′′－９５′′、１４８′′－２０４′′、２６５′′－３２５′′、および３７１′′－４２９′′位）における重鎖鎖内ジスルフィド架橋；２３′－８８′位（V_H－V_L）および１３４′－１９４′位（C_H1－C_L）（２３′′′－８８′′′および１３４′′′－１９４′′′位）における軽鎖鎖内ジスルフィド架橋；ならびに２２４－２１４′および２２４′′－２１４′′′における鎖間重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。様々な固形腫瘍の適応症におけるタボリキシズマブの現在の臨床試験には、アメ

リカ国立衛生研究所のｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０２３１８３９４およびＮＣＴ０２７０５４８２が含まれる。

【０５０５】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号５６によって与えられる重鎖および配列番号５７によって与えられる軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号５６および配列番号５７に示される配列を有する重鎖および軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、多様体、もしくはコンジュゲートを含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５６および配列番号５７に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５６および配列番号５７に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５６および配列番号５７に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５６および配列番号５７に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５６および配列番号５７に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖および軽鎖を含む。

【０５０６】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、タボリキシズマブの重鎖および軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号５８に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号５９に示される配列、およびその保存的アミノ酸置換を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５８および配列番号５９に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５８および配列番号５９に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５８および配列番号５９に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５８および配列番号５９に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５８および配列番号５９に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、配列番号５８および配列番号５９に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む、ｓｃＦｖ抗体を含む。

【０５０７】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号６０、配列番号６１、および配列番号６２に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号６３、配列番号６４、および配列番号６５に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【０５０８】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、タボリキシズマブに関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストのバイオシミラーモノクローナル抗体である。実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、および切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出され

たＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡおよび／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。

【表１３】

表１３：タボリキシズマブに関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 56　タボリキシズマブの重鎖	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
配列番号 57　タボリキシズマブの軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号 58　タボリキシズマブの重鎖可変領域	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT 118
配列番号 59　タボリキシズマブの軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR 108
配列番号 60　タボリキシズマブの重鎖 CDR1	GSFSSGYWN 9
配列番号 61　タボリキシズマブの重鎖 CDR2	YIGYISYNGI TYH 13
配列番号 62　タボリキシズマブの重鎖 CDR3	RYKYDYDGGH AMDY 14
配列番号 63　タボリキシズマブの軽鎖 CDR1	QDISNYLN 8
配列番号 64　タボリキシズマブの軽鎖 CDR2	LLIYYTSKLH S 11
配列番号 65　タボリキシズマブの軽鎖 CDR3	QQGSALPW 8

【０５０９】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．から入手可能な完全ヒト抗体である１１Ｄ４である。１１Ｄ４の調製および特性は、米国特許第７，９６０，５１５号、同第８，２３６，９３０号、および同第９，０２８，８２４号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。１１Ｄ４のアミノ酸配列を表ＬＬに示す。

【０５１０】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号６６によって与えられる重鎖および配列番号６７によって与えられる軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それ

ぞれ、配列番号６６および配列番号６７に示される配列を有する重鎖および軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、多様体、もしくはコンジュゲートを含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号６６および配列番号６７に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号６６および配列番号６７に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号６６および配列番号６７に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号６６および配列番号６７に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号６６および配列番号６７に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖および軽鎖を含む。

【０５１１】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１１Ｄ４の重鎖および軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号６８に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号６９に示される配列、およびその保存的アミノ酸置換を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号６８および配列番号６９に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号６８および配列番号６９に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号６８および配列番号６９に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号６８および配列番号６９に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号６８および配列番号６９に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。

【０５１２】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号７０、配列番号７１、および配列番号７２に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号７３、配列番号７４、および配列番号７５に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【０５１３】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１１Ｄ４に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストのバイオシミラーモノクローナル抗体である。実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、１１Ｄ４である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、および切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、１１Ｄ４である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡおよび／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１１Ｄ４である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上

の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１１Ｄ４である。

【表１４】

表１４：１１Ｄ４に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 66 11D4 の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPPCPAP PVAGPSVFLF 240 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV 300 SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV 360 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF 420 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK 444
配列番号 67 11D4 の軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号 68 11D4 の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS 118
配列番号 69 11D4 の軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK 107
配列番号 70 11D4 の重鎖ＣＤＲ1	SYSMN 5
配列番号 71 11D4 の重鎖ＣＤＲ2	YISSSSSTID YADSVKG 17
配列番号 72 11D4 の重鎖ＣＤＲ3	ESGWYLFDY 9
配列番号 73 11D4 の軽鎖ＣＤＲ1	RASQGISSWL A 11
配列番号 74 11D4 の軽鎖ＣＤＲ2	AASSLQS 7
配列番号 75 11D4 の軽鎖ＣＤＲ3	QQYNSYPPT 9

【０５１４】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．から入手可能な完全ヒト抗体である１８Ｄ８である。１８Ｄ８の調製および特性は、米国特許第７，９６０，５１５号、同第８，２３６，９３０号、および同第９，０２８，８２４号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。１８Ｄ８のアミノ酸配列を表ＭＭに示す。

【０５１５】
実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号７６によって与えられる重鎖および配列番号７７によって与えられる軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号７６および配列番号７７に示される配列を有する重鎖および軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、多様体、もしくはコンジュゲートを含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号７６および配列番号７７に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号７６および配列番号７７に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号７６および配列番号７７に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号７６および配列番号７７に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号７６および配列番号７７に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖および軽鎖を含む。

【０５１６】
実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１８Ｄ８の重鎖および軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号７８に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号７９に示される配列、およびその保存的アミノ酸置換を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号７８および配列番号７９に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号７８および配列番号７９に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号７８および配列番号７９に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号７８および配列番号７９に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号７８および配列番号７９に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。

【０５１７】
実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号８０、配列番号８１、および配列番号８２に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号８３、配列番号８４、および配列番号８５に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【０５１８】
実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１８Ｄ８に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストのバイオシミラーモノクローナル抗体である。実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、および切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡおよび／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以

上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。

【表１５】

表１５：１８Ｄ８に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 76 18D8 の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV 120 TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV 180 LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN 300 STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE 360 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
配列番号 77 18D8 の軽鎖	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213
配列番号 78 18D8 の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV 120 TVSS 124
配列番号 79 18D8 の軽鎖可変領域	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK 106
配列番号 80 18D8 の重鎖 CDR1	DYAMH 5
配列番号 81 18D8 の重鎖 CDR2	GISWNSGSIG YADSVKG 17
配列番号 82 18D8 の重鎖 CDR3	DQSTADYYFY YGMDV 15
配列番号 83 18D8 の軽鎖 CDR1	RASQSVSSYL A 11
配列番号 84 18D8 の軽鎖 CDR2	DASNRAT 7
配列番号 85 18D8 の軽鎖 CDR3	QQRSNWPT 8

【０５１９】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎ ｐｌｃ．から入手可能なヒト化抗体であるＨｕ１１９－１２２である。Ｈｕ１１９－１２２の調製および特性は、米国特許第９，００６，３９９号および同第９，１６３，０８５号

、ならびに国際特許公開第ＷＯ２０１２／０２７３２８号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。Ｈｕ１１９－１２２のアミノ酸配列を表ＮＮに示す。

【０５２０】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１１９－１２２の重鎖および軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号８６に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号８７に示される配列、およびその保存的アミノ酸置換を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８６および配列番号８７に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８６および配列番号８７に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８６および配列番号８７に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８６および配列番号８７に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８６および配列番号８７に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。

【０５２１】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号８８、配列番号８９、および配列番号９０に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号９１、配列番号９２、および配列番号９３に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【０５２２】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１１９－１２２に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストのバイオシミラーモノクローナル抗体である。実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１１９－１２２である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、および切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１１９－１２２である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡおよび／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１１９－１２２である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１１９－１２２である。

【表１６】

表１６：Ｈｕ１１９－１２２に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 86 Hu119－122 の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS 120
配列番号 87 Hu119－122 の軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
配列番号 88 Hu119－122 の重鎖 CDR1	SHDMS 5
配列番号 89 Hu119－122 の重鎖 CDR2	AINSDGGSTY YPDTMER 17
配列番号 90 Hu119－122 の重鎖 CDR3	HYDDYYAWFA Y 11
配列番号 91 Hu119－122 の軽鎖 CDR1	RASKSVSTSG YSYMH 15
配列番号 92 Hu119－122 の軽鎖 CDR2	LASNLES 7
配列番号 93 Hu119－122 の軽鎖 CDR3	QHSRELPLT 9

【０５２３】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎ ｐｌｃ．から入手可能なヒト化抗体であるＨｕ１０６－２２２である。Ｈｕ１０６－２２２の調製および特性は、米国特許第９，００６，３９９号および同第９，１６３，０８５号、ならびに国際特許公開第ＷＯ２０１２／０２７３２８号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。Ｈｕ１０６－２２２のアミノ酸配列を表ＯＯに示す。

【０５２４】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１０６－２２２の重鎖および軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号９４に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号９５に示される配列、およびその保存的アミノ酸置換を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９４および配列番号９５に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９４および配列番号９５に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９４および配列番号９５に示される配列と少なくとも９

７％同一であるＶ$_H$およびＶ$_L$領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９４および配列番号９５に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶ$_H$およびＶ$_L$領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９４および配列番号９５に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶ$_H$およびＶ$_L$領域を含む。

【０５２５】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号９６、配列番号９７、および配列番号９８に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号９９、配列番号１００、および配列番号１０１に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【０５２６】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１０６－２２２に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストのバイオシミラーモノクローナル抗体である。実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１０６－２２２である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、および切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１０６－２２２である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡおよび／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１０６－２２２である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１０６－２２２である。

【表１７】

表１７：Ｈｕ１０６－２２２に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 94 Hu106－222 の重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV 120 SS 122
配列番号 95 Hu106－222 の軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS 60 RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK 107
配列番号 96 Hu106－222 の重鎖 CDR1	DYSMH 5
配列番号 97 Hu106－222 の重鎖 CDR2	WINTETGEPT YADDFKG 17
配列番号 98 Hu106－222 の重鎖 CDR3	PYYDYVSYYA MDY 13
配列番号 99 Hu106－222 の軽鎖 CDR1	KASQDVSTAV A 11
配列番号 100 Hu106－222 の軽鎖 CDR2	SASYLYT 7
配列番号 101 Hu106－222 の軽鎖 CDR3	QQHYSTPRT 9

【０５２７】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＭＥＤＩ６４６９（９Ｂ１２とも称される）である。ＭＥＤＩ６４６９は、マウスモノクローナル抗体である。Ｗｅｉｎｂｅｒｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００６，２９，５７５－５８５。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｗｅｉｎｂｅｒｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００６，２９，５７５－５８５に記載されているように、Ｂｉｏｖｅｓｔ Ｉｎｃ．（Ｍａｌｖｅｒｎ，ＭＡ，ＵＳＡ）に寄託された９Ｂ１２ハイブリドーマによって産生された抗体であり、その開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗体は、ＭＥＤＩ６４６９のＣＤＲ配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＭＥＤＩ６４６９の重鎖可変領域配列および／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０５２８】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｌ１０６ ＢＤ（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体Ｌ１０６（ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）のＣＤＲを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体Ｌ１０６（ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）の重鎖可変領域配列および／または軽鎖可変領域配列を含む。実施形態

では、ＯＸ４０アゴニストは、ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）のＣＤＲを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）の重鎖可変領域配列および／または軽鎖可変領域配列を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＩｎＶｉｖｏＭＡｂ、ＢｉｏＸｃｅｌｌ Ｉｎｃ（Ｗｅｓｔ Ｌｅｂａｎｏｎ，ＮＨ）から市販されているマウスモノクローナル抗体抗ｍＣＤ１３４／ｍＯＸ４０（クローンＯＸ８６）である。

【０５２９】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、国際特許出願公開第ＷＯ９５／１２６７３号、同第ＷＯ９５／２１９２５号、同第ＷＯ２００６／１２１８１０号、同第ＷＯ２０１２／０２７３２８号、同第ＷＯ２０１３／０２８２３１号、同第ＷＯ２０１３／０３８１９１号、および同第ＷＯ２０１４／１４８８９５号；欧州特許出願第ＥＰ０６７２１４１号；米国特許出願公開第ＵＳ２０１０／１３６０３０号、同第ＵＳ２０１４／３７７２８４号、同第ＵＳ２０１５／１９０５０６号、および同第ＵＳ２０１５／１３２２８８号（クローン２０Ｅ５および１２Ｈ３を含む）；ならびに米国特許第７，５０４，１０１号、同第７，５５０，１４０号、同第７，６２２，４４４号、同第７，６９６，１７５号、同第７，９６０，５１５号、同第７，９６１，５１５号、同第８，１３３，９８３号、同第９，００６，３９９号、および同第９，１６３，０８５号（各々の開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるＯＸ４０アゴニストから選択される。

【０５３０】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、構造Ｉ－Ａ（Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）もしくは構造Ｉ－Ｂ（Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）に示されるようなＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質、またはそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、多様体、もしくはバイオシミラーである。構造Ｉ－ＡおよびＩ－Ｂの特性は、上記および米国特許第９，３５９，４２０号、第９，３４０，５９９号、第８，９２１，５１９号、および第８，４５０，４６０号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。構造Ｉ－Ａのポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表ＧＧに示す。Ｆｃドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン（配列番号３１のアミノ酸１７～２３０）、完全なヒンジドメイン（配列番号３１のアミノ酸１～１６）、またはヒンジドメインの部分（例えば、配列番号３１のアミノ酸４～１６）を含む。Ｃ末端Ｆｃ抗体を接続するための好ましいリンカーは、追加のポリペプチドの融合に適したリンカーを含む、配列番号３２～配列番号４１に示される実施形態から選択され得る。同様に、構造Ｉ－Ｂのポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表ＨＨに示す。Ｆｃ抗体断片が、構造Ｉ－ＢのようにＴＮＲＦＳＦ融合タンパク質のＮ末端に融合される場合、Ｆｃモジュールの配列は、好ましくは、配列番号４２に示されるものであり、リンカー配列は、好ましくは、配列番号４３～配列番号４５に示されるそれらの実施形態から選択される。

【０５３１】

実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、タボリキシズマブの可変重鎖および可変軽鎖、１１Ｄ４の可変重鎖および可変軽鎖、１８Ｄ８の可変重鎖および可変軽鎖、Ｈｕ１１９－１２２の可変重鎖および可変軽鎖、表ＯＯに記載の可変重鎖および可変軽鎖から選択される可変重鎖および可変軽鎖、前述の可変重鎖および可変軽鎖の任意の組み合わせ、ならびにそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、多様体、およびバイオシミラーからなる群から選択される１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。

【０５３２】

実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、ＯＸ４０Ｌ配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１０２による配列

を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、可溶性ＯＸ４０Ｌ配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１０３による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１０４による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。

【０５３３】

実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号５８および配列番号５９に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_HおよびV_Lドメインは、リンカーによって接続されている。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号６８および配列番号６９に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_HおよびV_Lドメインは、リンカーによって接続されている。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号７８および配列番号７９に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_HおよびV_Lドメインは、リンカーによって接続されている。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号８６および配列番号８７に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_HおよびV_Lドメインは、リンカーによって接続されている。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号９４および配列番号９５に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_HおよびV_Lドメインは、リンカーによって接続されている。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が表１８に示されるV_HおよびV_L配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_HおよびV_Lドメインは、リンカーによって接続されている。

【表１８－１】

表１８：融合タンパク質（例えば、構造Ｉ－ＡおよびＩ－Ｂ）におけるＯＸ４０結合ドメインとしてまたはｓｃＦｖ　ＯＸ４０アゴニスト抗体ドメインとして有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 102 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ 60 SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ 120 KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF 180 CVL 183
配列番号 103 OX40L 可溶性ドメイン	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE 60 VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL 120 IHQNPGEFCV L 131
配列番号 104 OX40L 可溶性ドメイン（代替）	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI 60 SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ 120 NPGEFCVL 128
配列番号 105 008 の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS 120
配列番号 106 008 の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
配列番号 107 011 の可変重鎖	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD 60 SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA 120
配列番号 108 011 の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
配列番号 109 021 の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS 120
配列番号 110 021 の可変軽鎖	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK 108
配列番号 111 023 の可変重鎖	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA 60 DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS 120
配列番号 112 023 の可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR 108
配列番号 113　重鎖可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY 60 NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS 119
配列番号 114　軽鎖可変領域	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR 108
配列番号 115　重鎖可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY 60 NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS 120 P 121
配列番号 116　軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD 60 RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR 108
配列番号 117　ヒト化抗体の重鎖可変領域	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV 120 SS 122

【表１８－２】

配列番号 118　ヒト化抗体の重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV 120 SS 122
配列番号 119　ヒト化抗体の軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
配列番号 120　ヒト化抗体の軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
配列番号 121　ヒト化抗体の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA 120
配列番号 122　ヒト化抗体の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS 120
配列番号 123　ヒト化抗体の軽鎖可変領域	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K 111
配列番号 124　ヒト化抗体の軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
配列番号 125　重鎖可変領域	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP 60 EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG 120 EVFYFDYWGQ GTTLTVSS 138
配列番号 126　軽鎖可変領域	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP 60 GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG 120 TKLELK 126

【０５３４】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、（ｉ）第１の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、および（ｖ）第３の可溶性ＯＸ４０結合ドメインを含むＯＸ４０アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端および／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインである。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、（ｉ）第１の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、および（ｖ）第３の可溶性ＯＸ４０結合ドメインを含むＯＸ４０アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端および／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインであり、可溶性ＯＸ４０ドメインの各々が、茎領域（三量体化に寄与し、細胞膜まで一定の距離を提供するが、ＯＸ４０結合ドメインの一部ではない）を欠き、第１および第２のペプチドリンカーは、独立して、３～８アミノ酸の長さを有する。

【０５３５】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、（ｉ）第１の可溶性腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）スーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、および（ｖ）第３の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインを

含むＯＸ４０アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインの各々は、茎領域を欠き、第１および第２のペプチドリンカーは、独立して、３～８アミノ酸の長さであり、ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインは、ＯＸ４０結合ドメインである。

【０５３６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＭＥＤＩ６３８３である。ＭＥＤＩ６３８３は、ＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質であり、米国特許第６，３１２，７００号に記載されているように調製することができ、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０５３７】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、前述のV_Lドメインのうちのいずれかに結合された前述のV_Hドメインのうちのいずれかを含む、ＯＸ４０アゴニストｓｃＦｖ抗体である。

【０５３８】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｃｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｉｎｃ．（Ｓｈｉｒｌｅｙ，ＮＹ，ＵＳＡ）から市販されているＣｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体ＭＯＭ－１８４５５である。

【０５３９】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，Ｉｎｃ．（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）から市販されているＯＸ４０アゴニスト抗体クローンＢｅｒ－ＡＣＴ３５である。

【０５４０】

Ｈ．任意の細胞生存率分析

任意に、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準的なアッセイを使用して、最初の拡張（初期バルク拡張と称されることもある）の後に行うことができる。例えば、トリパンブルー排除アッセイは、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするバルクＴＩＬの試料上で行うことができる。生存率の試験に使用する他のアッセイには、アラマーブルーアッセイおよびＭＴＴアッセイが含まれるが、これらに限定されない。

【０５４１】

１．細胞数、生存率、フローサイトメトリー

いくつかの実施形態では、細胞数および／または生存率が測定される。ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、およびＣＤ５６などであるがこれらに限定されないマーカー、ならびに本明細書に開示または記載される任意の他のマーカーの発現は、例えば、ＢＤ Ｂｉｏ－ｓｃｉｅｎｃｅｓ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）から市販されているものに限定されない抗体を用いたフローサイトメトリーによって、ＦＡＣＳＣａｎｔｏ（商標）フローサイトメーター（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して測定することができる。細胞は、使い捨てのｃチップ血球計数器（ＶＷＲ，Ｂａｔａｖｉａ，ＩＬ）を使用して手動でカウントすることができ、生存率は、トリパンブルー染色を含むがこれに限定されない当該技術分野で知られている任意の方法を使用して評価することができる。細胞生存率はまた、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるＵＳＳＮ１５／８６３，６３４に基づいてアッセイすることができる。

【０５４２】

場合によっては、以下で考察されるプロトコルを使用して、バルクＴＩＬ集団を直ちに凍結保存することができる。代替的に、バルクＴＩＬ集団をＲＥＰに供し、以下で考察されるように凍結保存することができる。同様に、遺伝子改変ＴＩＬが治療に使用される場合、バルクまたはＲＥＰ ＴＩＬ集団は、好適な治療のために遺伝子改変を受け得る。

【０５４３】

本開示によれば、生存率および／または対象への投与におけるさらなる使用についてＴＩＬをアッセイするための方法。いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）をアッセイするための方法は、

（ｉ）第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｉｉ）ＩＬ－２および任意にＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｉｉｉ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、および抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第３のＴＩＬ集団は、第２のＴＩＬ集団より数が少なくとも５０倍多い、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｉｖ）第３のＴＩＬ集団を採取、洗浄、および凍結保存することと、
（ｖ）凍結保存されたＴＩＬを極低温で保存することと、
（ｖｉ）第３のＴＩＬ集団を解凍して、解凍された第３のＴＩＬ集団を提供することと、
（ｖｉｉ）少なくとも３日の追加の拡張期間（ｒｅＲＥＰ期間と称されることもある）にわたって第３の集団の細胞培養培地をＩＬ－２、ＯＫＴ－３、およびＡＰＣで補足することによって、解凍された第３のＴＩＬ集団の部分の追加の第２の拡張を行うことであって、第３の拡張を行って第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数を、第３のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数と比較して比を求める、追加の第２の拡張を行うことと、
（ｖｉｉｉ）ステップ（ｖｉｉ）の比に基づいて、解凍されたＴＩＬの集団が患者への投与に適しているかどうかを判断することと、
（ｉｘ）第４のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数と第３のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数との比が、ステップ（ｖｉｉｉ）において５：１より大きいと判断された場合、治療上有効な投与量の解凍された第３のＴＩＬ集団を患者に投与することと、を含む。

【０５４４】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ステップ（ｖｉｉ）の後に生存率についてアッセイされる。

【０５４５】
本開示はまた、ＴＩＬをアッセイするためのさらなる方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、ＴＩＬをアッセイするための方法であって、
（ｉ）凍結保存された第１のＴＩＬ集団の部分を取得することと、
（ｉｉ）凍結保存された第１のＴＩＬ集団の部分を解凍することと、
（ｉｉｉ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、および抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の部分を、少なくとも３日の追加の拡張期間（ｒｅＲＥＰ期間と称されることもある）培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１のＴＩＬ集団からの部分を、第２のＴＩＬ集団と比較して、ＴＩＬの数の比を求め、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数と第１のＴＩＬ集団の部分におけるＴＩＬの数との比が、５：１より大きい、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｉｖ）ステップ（ｉｉｉ）での比に基づいて、第１のＴＩＬ集団が、患者への治療的投与での使用に適しているかどうかを判断することと、
（ｖ）第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数と第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数との比が、ステップ（ｉｖ）において５：１より大きいと判断された場合、第１のＴＩＬ集団が、治療的投与での使用に適していると判断することと、を含む、方法を提供する。

【０５４６】
いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数と第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数との比は、５０：１より大きい。

【０５４７】
いくつかの実施形態では、この方法は、本明細書で提供される実施形態のうちのいずれかに記載の方法に従って、ステップ（ｉ）からの凍結保存された第１のＴＩＬ集団全体の拡張を行うことをさらに含む。

【０５４８】
いくつかの実施形態では、この方法は、ステップ（ｉ）からの凍結保存された第１のＴＩＬ集団全体を患者に投与することをさらに含む。

【０５４９】
２．細胞培養
実施形態では、上で考察され、図１に例示されたものを含む、ＴＩＬを拡張するための方法は、約５，０００ｍＬ～約２５，０００ｍＬの細胞培地、約５，０００ｍＬ～約１０，０００ｍＬの細胞培地、または約５，８００ｍＬ～約８，７００ｍＬの細胞培地を使用することを含み得る。いくつかの実施形態では、培地は、無血清培地である。いくつかの実施形態では、第１の拡張における培地は、無血清である。いくつかの実施形態では、第２の拡張における培地は、無血清である。いくつかの実施形態では、第１の拡張および第２の拡張における培地は、両方とも無血清である。実施形態では、ＴＩＬの数を拡張することは、たった１種類の細胞培養培地を使用する。任意の好適な細胞培養培地、例えば、ＡＩＭ－Ｖ細胞培地（Ｌ－グルタミン、５０μＭの硫酸ストレプトマイシン、および１０μＭの硫酸ゲンタマイシン）細胞培養培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ ＣＡ）を使用することができる。これに関して、本発明の方法は、ＴＩＬの数を拡張するために必要な培地の量および培地の種類の数を有利に低減する。実施形態では、ＴＩＬの数を拡張することは、３日または４日に１回以下の頻度で細胞にフィードすることを含み得る。ガス透過性容器内の細胞の数を拡張することは、細胞を拡張するために必要なフィーディング頻度を低減することによって、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化する。

【０５５０】
実施形態では、第１および／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ろ過されていない。ろ過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。実施形態では、第１および／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、βメルカプトエタノール（ＢＭＥ）を欠いている。

【０５５１】
実施形態では、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、細胞培地を中に含む第１のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を培養することと、腫瘍組織試料からＴＩＬを取得することと、細胞培地を含有する第２のガス透過性容器内でＴＩＬの数を拡張することと、を含む方法の期間は、約７～１４日、例えば、約１１日の期間である。いくつかの実施形態では、ｐｒｅ－ＲＥＰは、約７～１４日間、例えば、約１１日間である。いくつかの実施形態では、ＲＥＰは、約７～１４日間、例えば、約１１日間である。

【０５５２】
実施形態では、ＴＩＬは、ガス透過性容器内で拡張される。ガス透過性容器は、米国特許出願公開第２００５／０１０６７１７Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものを含む、当該技術分野で知られている方法、組成物、およびデバイスを使用し、ＰＢＭＣを使用してＴＩＬを拡張するために使用されてきた。実施形態では、ＴＩＬは、ガス透過性バッグ内で拡張される。実施形態では、ＴＩＬは、Ｘｕｒｉ細胞拡張システムＷ２５（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）などの、ガス透過性バッグ内のＴＩＬを拡張する細胞拡張システムを使用して拡張される。実施形態では、ＴＩＬは、Ｘｕｒｉ細胞拡張システムＷ５（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）としても知られるＷＡＶＥバイオリアクターシステムなどの、ガス透過性バッグ内でＴＩＬを拡張する細胞拡張システムを使用して拡張される。実施形態では、細胞拡張システムは、約１００ｍＬ、約２００ｍＬ、約３００ｍＬ、約４００ｍＬ、約５００ｍＬ、約６００ｍＬ、約７００ｍＬ、約８００ｍＬ、約９００ｍＬ、約１Ｌ、約２Ｌ、約３Ｌ、約４Ｌ、約５Ｌ、約６Ｌ、約７Ｌ、約８Ｌ、約９Ｌ、および約１０Ｌからなる群から選択される容量を有するガス透過性細胞バッグを含む。

【０５５３】
実施形態では、ＴＩＬは、Ｇ－Ｒｅｘフラスコ（Ｗｉｌｓｏｎ Ｗｏｌｆ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇから市販されている）内で拡張することができる。かかる実施形態は、細胞集団が約５×１０^{5}細胞／ｃｍ^{2}から１０×１０^{6}～３０×１０^{6}細胞／ｃｍ^{2}の間まで拡張するのを可能にする。実施形態では、これは、フィーディングなしである。実施形態

では、これは、培地がＧ－Ｒｅｘフラスコ内の約１０ｃｍの高さに存在する限り、フィーディングなしである。実施形態では、これは、フィーディングなしであるが、１つ以上のサイトカインの添加を伴う。実施形態では、サイトカインを培地と混合する必要なしに、サイトカインをボーラスとして添加することができる。かかる容器、装置、および方法は、当該技術分野で知られており、ＴＩＬを拡張するために使用されており、米国特許出願公開第ＵＳ２０１４／０３７７７３９Ａ１号、国際公開第ＷＯ２０１４／２１００３６Ａ１号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３／０１１５６１７Ａ１号、国際公開第ＷＯ２０１３／１８８４２７Ａ１、米国特許出願公開第ＵＳ２０１１／０１３６２２８Ａ１、米国特許第ＵＳ８，８０９，０５０Ｂ２号、国際公開第ＷＯ２０１１／０７２０８８Ａ２号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１６／０２０８２１６Ａ１号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１２／０２４４１３３Ａ１号、国際公開第ＷＯ２０１２／１２９２０１Ａ１号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３／０１０２０７５Ａ１号、米国特許第ＵＳ８，９５６，８６０Ｂ２号、国際公開第ＷＯ２０１３／１７３８３５Ａ１号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１５／０１７５９６６Ａ１号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものを含む。かかるプロセスはまた、Ｊｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，２０１２，３５：２８３－２９２に記載されている。

【０５５４】

Ｉ．ＴＩＬの任意の遺伝子操作

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、高親和性Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）、例えば、ＭＡＧＥ－１、ＨＥＲ２、もしくはＮＹ－ＥＳＯ－１などの腫瘍関連抗原で標的されるＴＣＲ、または腫瘍関連細胞表面分子（例えば、メソセリン）もしくは系統制限細胞表面分子（例えば、ＣＤ１９）に結合するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含むがこれらに限定されない追加の機能を含むように任意に遺伝子操作される。

【０５５５】

Ｊ．ＴＩＬの任意の凍結保存

上で考察されるように、図１に示されるステップＡ～Ｅで例示されるように、凍結保存は、ＴＩＬ拡張プロセス全体の様々な時点で起こり得る。いくつかの実施形態では、第２の拡張後の拡張されたＴＩＬ集団（例えば、図１のステップＤに従って提供される）を、凍結保存することができる。凍結保存は、一般に、ＴＩＬ集団を凍結溶液、例えば８５％補体不活化ＡＢ血清および１５％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に入れることによって達成することができる。溶液中の細胞を極低温バイアルに入れ、－８０℃で２４時間保存し、任意に、凍結保存のためにガス状窒素冷凍庫に移す。Ｓａｄｅｇｈｉ，ｅｔ ａｌ．，Ａｃｔａ Ｏｎｃｏｌｏｇｉｃａ ２０１３，５２，９７８－９８６を参照されたい。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、５％ ＤＭＳＯ中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、５％ ＤＭＳＯを加えた細胞培養培地中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、実施例ＦおよびＧに提供される方法に従って凍結保存される。

【０５５６】

必要に応じて、細胞を冷凍庫から取り出し、溶液のおよそ５分の４が解凍されるまで、３７℃の水浴中で解凍する。細胞は、一般に完全培地に再懸濁され、任意に１回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍されたＴＩＬは、当該技術分野で知られているようにカウントされ、生存率について評価することができる。

【０５５７】

Ｋ．ＴＩＬ製造のための閉鎖系

本発明は、ＴＩＬ培養プロセス中の閉鎖系の使用を提供する。かかる閉鎖系は、微生物汚染の防止および／または低減を可能にし、より少ないフラスコの使用を可能にし、かつコスト削減を可能にする。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、２つの容器を使用する。

【０５５８】

かかる閉鎖系は当該技術分野でよく知られており、例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｆｄａ．ｇｏｖ／ｃｂｅｒ／ｇｕｉｄｅｌｉｎｅｓ．ｈｔｍおよびｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ

．ｆｄａ．ｇｏｖ／ＢｉｏｌｏｇｉｃｓＢｌｏｏｄＶａｃｃｉｎｅｓ／ＧｕｉｄａｎｃｅＣｏｍｐｌｉａｎｃｅＲｅｇｕｌａｔｏｒｙＩｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ／Ｇｕｉｄａｎｃｅｓ／Ｂｌｏｏｄ／ｕｃｍ０７６７７９．ｈｔｍで見出すことができる。

【０５５９】

無菌接続装置（ＳＴＣＤ）は、互換性のある２本の管の間の無菌溶接を行う。この手順により、様々な容器と管の直径を無菌接続することができる。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、例えば実施例Ｇに記載されるようなルアーロック系およびヒートシール系を含む。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、系の無菌性および閉鎖性を維持するために、無菌条件下で注射器を介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、実施例Ｇに記載されるような閉鎖系が用いられる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、実施例Ｇのセクション「最終製剤および充填」に記載される方法に従って、最終製品製剤容器に配合される。

【０５６０】

いくつかの実施形態では、閉鎖系は、腫瘍断片が得られてから、ＴＩＬが患者への投与または凍結保存の準備ができるまで、１つの容器を使用する。いくつかの実施形態では、２つの容器が使用される場合、第１の容器は閉じたＧ容器であり、ＴＩＬの集団は遠心分離され、第１の閉じたＧ容器を開かずに注入バッグに移される。いくつかの実施形態では、２つの容器が使用される場合、注入バッグは、ＨｙｐｏＴｈｅｒｍｏｓｏｌを含有する注入バッグである。閉鎖系または閉鎖ＴＩＬ細胞培養系は、腫瘍試料および／または腫瘍断片が追加されると、系が外部からしっかりと密閉され、細菌、真菌、および／またはいかなる他の微生物汚染も侵入しない閉鎖環境を形成することを特徴とする。

【０５６１】

いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％～約１００％の間である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％～約９５％の間である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％～約９０％の間である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約１０％～約９０％の間である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約１５％～約８５％の間である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％、約１０％、約１５％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、約９７％、約９８％、約９９％、または約１００％である。

【０５６２】

閉鎖系は、微生物汚染がない状態で、および／または微生物汚染を大幅に低減して、ＴＩＬの成長を可能にする。

【０５６３】

さらに、ＴＩＬ細胞培養環境のｐＨ、二酸化炭素分圧、および酸素分圧は各々、細胞が培養されるにつれて変化する。したがって、細胞培養に適した培地を循環させても、ＴＩＬ増殖に最適な環境として常に閉鎖環境を一定に維持する必要がある。この目的のために、閉鎖環境の培養液内のｐＨ、二酸化炭素分圧、および酸素分圧の物理的要因をセンサーによって監視すること、そのシグナルを使用して、培養環境の入口に設置されたガス交換器を制御すること、および細胞培養環境を最適化するように、閉鎖環境のガス分圧を培養液の変化に応じてリアルタイムで調整することが望ましい。いくつかの実施形態では、本発明は、閉鎖環境への入口に、閉鎖環境のｐＨ、二酸化炭素分圧、および酸素分圧を測定するモニタリング装置を備えたガス交換器を組み込む閉鎖細胞培養システムを提供し、モニタリング装置からのシグナルに基づいてガス濃度を自動的に調整することによって、細胞培養環境を最適化する。

【０５６４】

いくつかの実施形態では、閉鎖環境内の圧力は、連続的または断続的に制御される。すなわち、閉鎖環境における圧力は、例えば、圧力維持装置によって変化させることができ、したがって、空間が正圧状態でのＴＩＬの成長に好適であることを保証するか、または負圧状態での流体の浸出を促進し、したがって、細胞増殖を促進する。さらに、断続的に

陰圧を加えることにより、閉鎖環境の体積の一時的な収縮によって、閉鎖環境内の循環液体を均一かつ効率的に置き換えることが可能である。

【０５６５】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの増殖のための最適な培養成分を置換または添加することができ、ＩＬ－２および／またはＯＫＴ３などの因子、ならびに組み合わせを添加することができる。

【０５６６】

Ｌ．ＴＩＬの任意の凍結保存

バルクＴＩＬ集団またはＴＩＬの拡張集団のいずれかを、任意に凍結保存することができる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、治療的ＴＩＬ集団上で起こる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、第２の拡張後に採取されたＴＩＬ上で起こる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、図１の例示的なステップＦにおいて、ＴＩＬ上で起こる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、注入バッグ内で凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、注入バッグに入れる前に凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、凍結保存され、注入バッグに入っていない。いくつかの実施形態では、凍結保存は、凍結保存培地を使用して行われる。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含有する。これは一般に、ＴＩＬ集団を凍結溶液、例えば８５％補体不活化ＡＢ血清および１５％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に入れることによって達成される。溶液中の細胞を極低温バイアルに入れ、－８０℃で２４時間保存し、任意に、凍結保存のためにガス状窒素冷凍庫に移す。Ｓａｄｅｇｈｉ，ｅｔ ａｌ．，Ａｃｔａ Ｏｎｃｏｌｏｇｉｃａ ２０１３，５２，９７８－９８６を参照されたい。

【０５６７】

必要に応じて、細胞を冷凍庫から取り出し、溶液のおよそ５分の４が解凍されるまで、３７℃の水浴中で解凍する。細胞は、一般に完全培地に再懸濁され、任意に１回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍されたＴＩＬは、当該技術分野で知られているようにカウントされ、生存率について評価することができる。

【０５６８】

好ましい実施形態では、ＴＩＬの集団は、ＣＳ１０凍結保存培地（ＣｒｙｏＳｔｏｒ１０、ＢｉｏＬｉｆｅ Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ）を使用して凍結保存される。好ましい実施形態では、ＴＩＬの集団は、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含有する凍結保存培地を使用して凍結保存される。好ましい実施形態では、ＴＩＬの集団は、１：１（体積：体積）比のＣＳ１０および細胞培養培地を使用して凍結保存される。好ましい実施形態では、ＴＩＬの集団は、約１：１（体積：体積）比のＣＳ１０および細胞培養培地を使用して凍結保存され、さらに追加のＩＬ－２を含む。

【０５６９】

上記のステップＡ～Ｅで考察されるように、凍結保存は、ＴＩＬ拡張プロセス全体の様々な時点で起こり得る。いくつかの実施形態では、ステップＢによる第１の拡張後のバルクＴＩＬ集団、またはステップＤによる１回以上の第２の拡張後の拡張されたＴＩＬ集団を、凍結保存することができる。凍結保存は、一般に、ＴＩＬ集団を凍結溶液、例えば８５％補体不活化ＡＢ血清および１５％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に入れることによって達成することができる。溶液中の細胞を極低温バイアルに入れ、－８０℃で２４時間保存し、任意に、凍結保存のためにガス状窒素冷凍庫に移す。Ｓａｄｅｇｈｉ，ｅｔ ａｌ．，Ａｃｔａ Ｏｎｃｏｌｏｇｉｃａ ２０１３，５２，９７８－９８６を参照されたい。

【０５７０】

必要に応じて、細胞を冷凍庫から取り出し、溶液のおよそ５分の４が解凍されるまで、３７℃の水浴中で解凍する。細胞は、一般に完全培地に再懸濁され、任意に１回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍されたＴＩＬは、当該技術分野で知られているようにカウントされ、生存率について評価することができる。

【０５７１】

場合によっては、以下で考察されるプロトコルを使用して、ステップＢ　ＴＩＬ集団を直ちに凍結保存することができる。代替的に、バルクＴＩＬ集団をステップＣおよびステップＤに供し、ステップＤの後に凍結保存することができる。同様に、遺伝子操作されたＴＩＬを治療に使用する場合、ステップＢまたはステップＤ　ＴＩＬ集団を好適な治療のために遺伝子改変に供することができる。

【０５７２】

ＩＶ．ＴＩＬ製造プロセス（ＧＥＮ３プロセスの実施形態、任意に合成培地を含む）

いかなる特定の理論にも限定されることなく、本発明の方法に記載される、Ｔ細胞の活性化をプライミングする、第１のプライミング拡張と、それに続くＴ細胞の活性化を促進する第２の急速拡張により、「より若い」表現型を保持する拡張されたＴ細胞の調製が可能になると考えられ、したがって本発明の拡張されたＴ細胞は、他の方法によって拡張されたＴ細胞よりも癌細胞に対してより大きな細胞傷害を示すことが予想される。特に、本発明の方法によって教示される、抗ＣＤ３抗体（例えば、ＯＫＴ－３）、ＩＬ－２、および任意に抗原提示細胞（ＡＰＣ）への曝露によってプライミングされ、その後の追加の抗ＣＤ－３抗体（例えば、ＯＫＴ－３）、ＩＬ－２、およびＡＰＣへの曝露によって促進されるＴ細胞の活性化は、培養におけるＴ細胞の成熟を限定または回避し、成熟度の低い表現型を有するＴ細胞の集団を産生し、これらのＴ細胞は、培養における拡張によってあまり疲弊せず、癌細胞に対してより高い細胞傷害を示す。いくつかの実施形態では、第２の急速拡張のステップは、複数のステップに分割され、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の小規模培養において約３～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（ｂ）小規模培養におけるＴ細胞を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移し、小規模培養からのＴ細胞を、第２の容器内の大規模培養において約４～７日間培養することによって、培養のスケールアップを達成する。いくつかの実施形態では、急速拡張のステップは、複数のステップに分割され、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の第１の小規模培養において３～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（ｂ）第１の小規模培養からのＴ細胞を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移し、配分することによって培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された第１の小規模培養からのＴ細胞の部分は、第２の小規模培養において約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張のステップは、複数のステップに分割され、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の小規模培養において約３～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（ｂ）小規模培養からのＴ細胞を、第１の容器よりも大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移し、配分することによって培養のスケールアウトおよびスケールアップを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された小規模培養からのＴ細胞の部分は、より大規模の培養において約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張のステップは、複数のステップに分割され、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の小規模培養において約４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（ｂ）小規模培養からのＴ細胞を、第１の容器よりも大きい２、３、または４個の第２の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移し、配分することによって培養のスケールアウトおよびスケールアップを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された小規模培養からのＴ細胞の部分は、より大規模の培養において約５日間培養される。

【０５７３】

いくつかの実施形態では、第２の急速拡張は、第１のプライミング拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が減少、軽減、衰退、または沈静化し始めた後に行われる。

【０５７４】

いくつかの実施形態では、第２の急速拡張は、第１のプライミング拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％減少した後に行われる。

【０５７５】

いくつかの実施形態では、第２の急速拡張は、第１のプライミング拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、約１％～１００％の範囲のパーセンテージで減少した後に行われる。

【０５７６】

いくつかの実施形態では、第２の急速拡張は、第１のプライミング拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、約１％～１０％、１０％～２０％、２０％～３０％、３０％～４０％、４０％～５０％、５０％～６０％、６０％～７０％、７０％～８０％、８０％～９０％、または９０％～１００％の範囲のパーセンテージで減少した後に行われる。

【０５７７】

いくつかの実施形態では、第２の急速拡張は、第１のプライミング拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、少なくともまたは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８または９９％減少した後に行われる。

【０５７８】

いくつかの実施形態では、第２の急速拡張は、第１のプライミング拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、最大でまたは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％減少した後に行われる。

【０５７９】

いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化の減少は、抗原による刺激に応答してＴ細胞によって放出されるインターフェロンγの量の低減によって決定される。

【０５８０】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞の第１のプライミング拡張は、最大でまたは約７日または約８日の期間中に行われる。

【０５８１】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞の第１のプライミング拡張は、最大でまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日の期間中に行われる。

【０５８２】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞の第１のプライミング拡張は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日の期間中に行われる。
【０５８３】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞の第２の急速拡張は、最大でまたは約１１日の期間中に行われる。
【０５８４】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞の第２の急速拡張は、最大でまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間中に行われる。
【０５８５】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞の第２の急速拡張は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間中に行われる。
【０５８６】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞の第１のプライミング拡張は、約１日～約７日の期間中に行われ、Ｔ細胞の第２の急速拡張は、約１日～約１１日の期間中に行われる。
【０５８７】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞の第１のプライミング拡張は、最大でまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日の期間中に行われ、Ｔ細胞の第２の急速拡張は、最大でまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間中に行われる。
【０５８８】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞の第１のプライミング拡張は、約１日～約８日の期間中に行われ、Ｔ細胞の第２の急速拡張は、約１日～約９日の期間中に行われる。
【０５８９】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞の第１のプライミング拡張は、８日の期間中に行われ、Ｔ細胞の第２の急速拡張は、９日の期間中に行われる。
【０５９０】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞の第１のプライミング拡張は、約１日～約７日の期間中に行われ、Ｔ細胞の第２の急速拡張は、約１日～約９日の期間中に行われる。
【０５９１】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞の第１のプライミング拡張は、７日の期間中に行われ、Ｔ細胞の第２の急速拡張は、９日の期間中に行われる。
【０５９２】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）である。
【０５９３】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）である。
【０５９４】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、末梢血リンパ球（ＰＢＬ）である。
【０５９５】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、癌に罹患しているドナーから得られる。
【０５９６】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、癌を患っている患者から切除された腫瘍から得られたＴＩＬである。
【０５９７】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、血液系悪性腫瘍を患っている患者の骨髄から得られたＭＩＬである。
【０５９８】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ドナーからの末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）から得られたＰＢＬである。いくつかの実施形態では、ドナーは、癌を患っている。いくつかの実施形態では、癌は、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌

（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされる癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、および腎細胞癌からなる群から選択される癌である。いくつかの実施形態では、癌は、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされる癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、および腎細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ドナーは、腫瘍を患っている。いくつかの実施形態では、腫瘍は、液体腫瘍である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、ドナーは、血液系悪性腫瘍を患っている。

【０５９９】

本開示の特定の態様では、免疫エフェクター細胞、例えばＴ細胞は、ＦＩＣＯＬＬ分離などの当業者に知られている任意の数の技法を使用して対象から収集された血液の単位から得ることができる。１つの好ましい態様では、個体の循環血液からの細胞は、アフェレーシスによって得られる。アフェレーシス産物には通常、Ｔ細胞、単球、顆粒球、Ｂ細胞を含むリンパ球、他の有核白血球、赤血球、血小板が含まれる。一態様では、アフェレーシスによって収集された細胞を洗浄して血漿画分を除去し、任意に、後続の処理ステップのために細胞を適切な緩衝液または培地に入れることができる。一実施形態では、細胞をリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で洗浄する。代替の実施形態では、洗浄溶液は、カルシウムを欠き、マグネシウムを欠くか、またはすべてではないにしても多くの二価カチオンを欠く可能性がある。一態様では、Ｔ細胞は、赤血球を溶解し、単球を枯渇させることによって、例えば、ＰＥＲＣＯＬＬ勾配による遠心分離によって、または対向流遠心溶出法によって末梢血リンパ球から単離される。

【０６００】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ドナーからのリンパ球が濃縮された全血またはアフェレーシス産物から分離されたＰＢＬである。いくつかの実施形態では、ドナーは、癌を患っている。いくつかの実施形態では、癌は、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされる癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、および腎細胞癌からなる群から選択される癌である。いくつかの実施形態では、癌は、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされる癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、および腎細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ドナーは、腫瘍を患っている。いくつかの実施形態では、腫瘍は、液体腫瘍である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、ドナーは、血液系悪性腫瘍を患っている。いくつかの実施形態では、ＰＢＬは、正または負の選択法を使用することによって、すなわち、Ｔ細胞表現型について、マーカー（複数可）、例えばＣＤ３＋ＣＤ４５＋を使用してＰＢＬを除去する、または非Ｔ細胞表現型細胞を除去してＰＢＬを残すことによって、リンパ球が濃縮された全血またはアフェレーシス産物から単離される。他の実施形態では、ＰＢＬは、勾配遠心分離によって単離される。ドナー組織からＰＢＬを単離すると、ＰＢＬの第１のプライミング拡張は、本明細書に記載される方法のうちのいずれかの第１のプライミング拡張ステップに従って、第１のプライミング拡張培養物に好適な数の単離されたＰＢＬ（いくつかの実施形態では、およそ$１×１０^{7}$ＰＢＬ）を播種することによって開始され得る。

【０６０１】

これらの特徴のうちのいくつかを含有するプロセス３（本明細書ではＧＥＮ３とも称される）として知られる例示的なＴＩＬプロセスが、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に示され、プロセス２Ａに関する本発明のこの実施形態の利点のうちのいくつかは、図１、２、３０、および３１（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に記載されている。プロセス３の２つの実施形態は、図１および３０（特に、例えば図８Ｂお

よび／または図８Ｃ）に示される。プロセス２ＡまたはＧｅｎ２はまた、米国特許公開第２０１８／０２８０４３６号に記載されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。Ｇｅｎ３プロセスは、２０１８年１１月５日に提出されたＵＳＳＮ６２／７５５，９５４（１１６９８３－５０４５－ＰＲ）にも記載されている。

【０６０２】

本明細書で考察され、一般に概説されるように、ＴＩＬは、患者試料から採取され、本明細書に記載され、Ｇｅｎ３と称されるＴＩＬ拡張プロセスを使用して患者に移植する前に、それらの数を拡張するように操作される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、以下で考察されるように、任意に遺伝子操作され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、拡張の前または後に凍結保存され得る。一旦解凍すると、それらを再刺激して、患者への注入前に代謝を高めることができる。

【０６０３】

いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例および図において詳細に考察されるように、第１のプライミング拡張（本明細書においてｐｒｅ－急速拡張（Ｐｒｅ－ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＢとして示されるプロセスを含む）は、１～８日に短縮され、第２の急速拡張（本明細書において急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図１（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＤとして示されるプロセスを含む）は、１～９日に短縮される。いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例および図において詳細に考察されるように、第１のプライミング拡張（本明細書においてｐｒｅ－急速拡張（Ｐｒｅ－ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図１（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＢとして示されるプロセスを含む）は、１～８日に短縮され、第２の急速拡張（本明細書において急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図１（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＤとして示されるプロセスを含む）は、１～８日に短縮される。いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例および図において詳細に考察されるように、第１のプライミング拡張（本明細書においてｐｒｅ－急速拡張（Ｐｒｅ－ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図１（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＢとして示されるプロセスを含む）は、１～７日に短縮され、第２の急速拡張（本明細書において急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図１（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＤとして示されるプロセスを含む）は、１～９日に短縮される。いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例および図において詳細に考察されるように、第１のプライミング拡張（本明細書においてｐｒｅ－急速拡張（Ｐｒｅ－ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図１（特に、例えば図１Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＢとして示されるプロセスを含む）は、１～７日間であり、第２の急速拡張（本明細書において急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図１（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＤとして示されるプロセスを含む）は、１～１０日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図１（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＢとして記載される拡張）は、８日に短縮され、第２の急速拡張（例えば、図１（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＤに記載される拡張）は、７～９日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図１（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＢとして記載される拡張）は、８日間であり、第２の急速拡張（例えば、図１（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＤに記載される拡張）は、８～９日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図１（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＢとして記載される拡張）は、７日に短縮され、第２の急速拡張（例えば、図１（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＤに記載される拡張）は、７～８日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＢとして記載され

る拡張）は、８日に短縮され、第２の急速拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＤに記載される拡張）は、８日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＢとして記載される拡張）は、８日間であり、第２の急速拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＤに記載される拡張）は、９日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＢとして記載される拡張）は、８日間であり、第２の急速拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＤに記載される拡張）は、１０日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＢとして記載される拡張）は、７日間であり、第２の急速拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＤに記載される拡張）は、７～１０日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＢとして記載される拡張）は、７日間であり、第２の急速拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＤに記載される拡張）は、８～１０日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＢとして記載される拡張）は、７日間であり、第２の急速拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＤに記載される拡張）は、９～１０日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＢとして記載される拡張）は、７日に短縮され、第２の急速拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＤに記載される拡張）は、７～９日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張と第２の急速拡張（例えば、図１（特に、例えば図１Ｂおよび／または図８Ｃ）においてステップＢおよびステップＤとして記載される拡張）との組み合わせは、以下ならびに実施例および図において詳細に考察されるように、１４～１６日間である。特に、本発明の特定の実施形態は、抗ＣＤ３抗体、例えばＩＬ－２の存在下でのＯＫＴ－３への曝露、または少なくともＩＬ－２および抗ＣＤ３抗体、例えばＯＫＴ－３の存在下での抗原への曝露によってＴＩＬが活性化される、第１のプライミング拡張ステップを含むと考えられる。特定の実施形態では、上記のように第１のプライミング拡張ステップで活性化されるＴＩＬは、第１のＴＩＬ集団であり、すなわち、一次細胞集団である。

【０６０４】

以下の「ステップ」指定Ａ、Ｂ、Ｃなどは、図８（特に、例えば、図８Ｂおよび／または図８Ｃ）における非限定的な例を参照し、本明細書に記載される特定の非限定的な実施形態を参照している。以下および図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）におけるステップの順序は例示であり、ステップの任意の組み合わせまたは順序、ならびに追加のステップ、ステップの繰り返し、および／またはステップの省略は、本出願および本明細書に開示される方法によって企図される。

【０６０５】

Ａ．ステップＡ：患者の腫瘍試料を取得する

一般に、ＴＩＬは、最初に患者の腫瘍試料（「一次ＴＩＬ」）から、またはＴＩＬ様の特徴を有する末梢血リンパ球を含む末梢血リンパ球などの循環リンパ球から得られ、その後、本明細書に記載されるように、さらなる操作のためにより大きな集団に拡張され、任意に凍結保存され、任意にＴＩＬの健康の指標として表現型および代謝パラメーターについて評価される。

【０６０６】

患者の腫瘍試料は、一般に外科的切除、針生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段を介して、当該技術分野で知られている方法を使用して取得することができる。一般に、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、または

転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍試料はまた、血液系悪性腫瘍から得られた腫瘍などの液体腫瘍であり得る。固形腫瘍は、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、結腸直腸癌、肺癌、脳癌、腎癌、胃癌、および皮膚癌を含むが、これらに限定されない（扁平上皮癌、基底細胞癌、および黒色腫を含むが、これらに限定されない）任意の癌の種類であり得る。いくつかの実施形態では、癌は、子宮頸癌、頭頸部癌（例えば、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭ）、胃腸癌、卵巣癌、肉腫、膵臓癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、および非小細胞肺癌から選択される。いくつかの実施形態では、悪性黒色腫腫瘍が特に高レベルのＴＩＬを有することが報告されているため、有用なＴＩＬは、悪性黒色腫腫瘍から得られる。

【０６０７】

一旦得られると、腫瘍試料は、一般に鋭的剥離を使用して１～約８mm^3の間の小片に断片化され、約２～３mm^3が特に有用である。ＴＩＬは、酵素腫瘍消化物を使用してこれらの断片から培養される。かかる腫瘍消化物は、酵素培地（例えば、Ｒｏｓｗｅｌｌ Ｐａｒｋ Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＲＰＭＩ）１６４０緩衝液、２ｍＭグルタメート、１０ｍｃｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０単位／ｍＬのＤＮａｓｅ、および１．０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼ）でのインキュベーション、続いて機械的解離（例えば、組織解離剤を使用する）によって産生することができる。腫瘍消化物は、腫瘍を酵素培地に入れ、腫瘍をおよそ１分間機械的に解離させ、続いて５％CO_2中３７℃で３０分間インキュベートし、続いて小さな組織片のみが存在するまで、前述の条件下で機械的解離およびインキュベーションのサイクルを繰り返すことによって産生することができる。このプロセスの最後に、細胞懸濁液に多数の赤血球または死細胞が含まれている場合、ＦＩＣＯＬＬ分岐親水性多糖類を使用した密度勾配分離を行い、これらの細胞を除去することができる。米国特許出願公開第２０１２／０２４４１３３Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものなど、当該技術分野で知られている代替方法を使用することができる。前述の方法のうちのいずれかは、ＴＩＬを拡張する方法または癌を治療する方法についての本明細書に記載される実施形態のうちのいずれかにおいて使用され得る。

【０６０８】

上に示したように、いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、固形腫瘍に由来する。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、断片化されない。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は断片化されず、腫瘍全体として酵素消化に供される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、およびヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、およびヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、およびヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％CO_2で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、およびヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％CO_2で回転を伴って消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、３７℃、５％CO_2で一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍全体が酵素と組み合わされて、腫瘍消化反応混合物を形成する。

【０６０９】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、無菌緩衝液中の凍結乾燥酵素で再構成される。いくつかの実施形態では、緩衝液は、無菌ＨＢＳＳである。

【０６１０】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、コラゲナーゼを含む。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、コラゲナーゼＩＶである。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼの作用ストックは、１００ｍｇ／ｍＬの１０×作用ストックである。

【０６１１】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ＤＮＡｓｅを含む。いくつかの実施形態では

、ＤＮＡｓｅの作用ストックは、１０，０００ＩＵ／ｍＬの１０Ｘ作用ストックである。

【０６１２】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ヒアルロニダーゼを含む。いくつかの実施形態では、ヒアルロニダーゼの作用ストックは、１０ｍｇ／ｍＬの１０Ｘ作用ストックである。

【０６１３】

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

【０６１４】

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

【０６１５】

一般に、腫瘍から得られた細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに得られた」または「新たに単離された」細胞集団と呼ばれる。特定の実施形態では、ＴＩＬの新たに得られた細胞集団は、抗原提示細胞、ＩＬ－１２、およびＯＫＴ－３を含む細胞培養培地に曝露される。

【０６１６】

いくつかの実施形態では、断片化は、例えば、剥離および消化を含む物理的断片化を含む。いくつかの実施形態では、断片化は、物理的断片化である。いくつかの実施形態では、断片化は、剥離である。いくつかの実施形態では、断片化は、消化によるものである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、最初に、患者から得られた酵素的腫瘍消化物および腫瘍断片から培養され得る。実施形態では、ＴＩＬは、最初に、患者から得られた酵素的腫瘍消化物および腫瘍断片から培養され得る。

【０６１７】

腫瘍が固形腫瘍であるいくつかの実施形態では、腫瘍試料が、例えば、ステップＡ（図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に提供される）で得られた後、腫瘍は物理的断片化を受ける。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存前に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存後に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、腫瘍を得た後、いかなる凍結保存もない場合に起こる。いくつかの実施形態では、断片化のステップは、インビトロまたはエクスビボプロセスである。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、１０、２０、３０、４０個またはそれ以上の断片または小片が、第１のプライミング拡張のために各容器に配置される。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、３０または４０個の断片または小片が、第１のプライミング拡張のために各容器に配置される。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、４０個の断片または小片が、第１のプライミング拡張のために各容器に配置される。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約４～約５０個の断片を含み、各断片は、約２７mm^3の体積を有する。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約３０～約６０個の断片を含み、総体積は約１３００mm^3～約１５００mm^3である。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約５０個の断片を含み、総体積は約１３５０mm^3である。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約５０個の断片を含み、総質量は約１グラム～約１．５グラムである。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約４個の断片を含む。

【０６１８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍断片から得られる。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、鋭的剥離によって得られる。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3～１０mm^3の間である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3～８mm^3の間である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約２mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約３mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約４mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約５mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約６mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約７mm^3である。いくつ

かの実施形態では、腫瘍断片は、約８mm^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約９mm^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１０mm^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、１～４mm×１～４mm×１～４mmである。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、１mm×１mm×１mmである。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、２mm×２mm×２mmである。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、３mm×３mm×３mmである。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、４mm×４mm×４mmである。

【０６１９】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性、壊死性、および／または脂肪性組織の量を最小化するために断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性組織の量を最小化するために断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の壊死性組織の量を最小化するために断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の脂肪性組織の量を最小化するために断片化される。特定の実施形態では、腫瘍の断片化のステップは、インビトロまたはエクスビボの方法である。

【０６２０】

いくつかの実施形態では、腫瘍の内部構造を維持するために、腫瘍の断片化が行われる。いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、メスで鋸引き動作を行うことなく実行される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から得られる。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、酵素培地、例えば、限定されないが、ＲＰＭＩ　１６４０、２mMＧｌｕｔａＭＡＸ、１０mg／mLゲンタマイシン、３０Ｕ／mL　ＤＮａｓｅ、および１．０mg／mLコラゲナーゼ中でのインキュベーション、続いて機械的解離によって生成された（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍を、およそ１分間機械的に解離することができる。次いで、溶液を５％CO_2中３７℃で３０分間インキュベートし、その後、およそ１分間再び機械的に破壊することができる。５％CO_2中３７℃で３０分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ１分間、３回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きな組織片が存在する場合の３回目の機械的破壊後、５％CO_2中３７℃で３０分間の追加のインキュベーションの有無にかかわらず、１回または２回の追加の機械的解離を試料に適用した。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、Ｆｉｃｏｌｌを使用した密度勾配分離を行い、これらの細胞を除去することができる。

【０６２１】

いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張ステップの前の細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに得られた」または「新たに単離された」細胞集団と呼ばれる。

【０６２２】

いくつかの実施形態では、細胞は、試料単離後（例えば、腫瘍試料を得た後および／または腫瘍試料から細胞懸濁液を得た後）、任意に凍結され得、ステップＢに記載の拡張に入る前に凍結保存され得、これは以下でさらに詳細に説明されるとともに、図８（特に、例えば図８Ｂ）に例示される。

【０６２３】

１．コア／小生検由来のＴＩＬ

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、コア生検または同様の手順によって得られた患者腫瘍試料（「一次ＴＩＬ」）から最初に得られ、次いで、本明細書に記載されるさらなる操作のためにより大きな集団に拡張され、任意に凍結保存され、任意に表現型および代謝パラメーターについて評価される。

【０６２４】

いくつかの実施形態では、患者の腫瘍試料は、一般に小生検、コア生検、針生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段を介して、当該技術分野で知られている方法を使用して取得することができる。一般に、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍

試料はまた、血液系悪性腫瘍から得られた腫瘍などの液体腫瘍であり得る。いくつかの実施形態では、試料は、複数の小さな腫瘍試料または生検に由来し得る。いくつかの実施形態では、試料は、同じ患者からの単一の腫瘍からの複数の腫瘍試料を含むことができる。いくつかの実施形態では、試料は、同じ患者からの１つ、２つ、３つ、または４つの腫瘍からの複数の腫瘍試料を含むことができる。いくつかの実施形態では、試料は、同じ患者からの複数の腫瘍からの複数の腫瘍試料を含むことができる。固形腫瘍は、肺癌および／または非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）であり得る。

【０６２５】

一般に、腫瘍コアまたは断片から得られた細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに得られた」または「新たに単離された」細胞集団と呼ばれる。特定の実施形態では、ＴＩＬの新たに得られた細胞集団は、抗原提示細胞、ＩＬ－２およびＯＫＴ－３を含む細胞培養培地に曝露される。

【０６２６】

いくつかの実施形態では、腫瘍が転移性であり、原発性病変が過去に効率的に治療／除去された場合、転移性病変のうちの１つの除去が必要とされ得る。いくつかの実施形態では、最も侵襲性の低いアプローチは、皮膚病変、または利用可能な場合は首または腋窩領域のリンパ節を除去することである。いくつかの実施形態では、皮膚病変が除去されるか、またはその小生検が除去される。いくつかの実施形態では、リンパ節またはその小生検が除去される。いくつかの実施形態では、肺もしくは肝臓の転移性病変、あるいは腹腔内もしくは胸部リンパ節またはそれらの小生検を用いることができる。

【０６２７】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、黒色腫である。いくつかの実施形態では、黒色腫の小さな生検は、ほくろまたはその部分を含む。

【０６２８】

いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検である。いくつかの実施形態では、パンチ生検は、皮膚に押し込まれた円形の刃で得られる。いくつかの実施形態では、パンチ生検は、疑わしいほくろの周りの皮膚に押し込まれた円形の刃で得られる。いくつかの実施形態では、パンチ生検は、皮膚に押し込まれた円形の刃で得られ、皮膚の丸い部分が除去される。いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検であり、腫瘍の丸い部分が除去される。

【０６２９】

いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検であり、ほくろまたは成長の全体が除去される。いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検であり、ほくろまたは成長の全体が、正常に見える皮膚の小さな境界とともに除去される。

【０６３０】

いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検であり、ほくろまたは成長の最も不規則な部分のみが採取される。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検であり、切開生検は、疑わしいほくろが非常に大きい場合など、他の技法を完了できない場合に使用される。

【０６３１】

いくつかの実施形態では、小生検は、肺生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、気管支鏡検査によって得られる。一般に、気管支鏡検査では、患者は麻酔下に置かれ、小さな道具が鼻または口を通り、喉を下って気管支通路に入り、そこで小さな道具を使用していくらかの組織を除去する。気管支鏡検査によって腫瘍または成長に到達できないいくつかの実施形態では、経胸腔針生検を用いることができる。一般に、経胸腔針生検の場合もまた、患者は麻酔下にあり、針を皮膚から疑わしい場所に直接挿入して、小さな組織試料を除去する。いくつかの実施形態では、経胸壁針生検は、介入的画像診断（例えば、針を誘導するためのＸ線またはＣＴ走査の使用）を必要とし得る。いくつかの実施形態では、小生検は、針生検によって得られる。いくつかの実施形態では、小生検は、超音波

内視鏡で得られる（例えば、照明付きの内視鏡であり、口を通して食道に配置される）。いくつかの実施形態では、小生検は、外科的に得られる。

【０６３２】

いくつかの実施形態では、小生検は、頭頸部生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検であり、組織の小片が異常に見える領域から切り取られる。いくつかの実施形態では、異常な領域に容易にアクセスできる場合、入院せずに試料を採取することができる。いくつかの実施形態では、腫瘍が口または喉のより深いところにある場合、生検は、全身麻酔を用いて手術室で行われる必要があり得る。いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、全領域が除去される切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、細針吸引（ＦＮＡ）である。いくつかの実施形態では、小生検は、細針吸引（ＦＮＡ）であり、注射器に取り付けられた非常に細い針を使用して、腫瘍または塊から細胞を抽出（吸引）する。いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検であり、パンチ鉗子を使用して疑わしい領域の一片を除去する。

【０６３３】

いくつかの実施形態では、小生検は、子宮頸部生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、膣鏡検査を介して得られる。一般に、膣鏡検査法は、拡大双眼鏡に取り付けられた照明付きの拡大鏡（膣鏡）を用い、次いでこれを使用して、子宮頸部の表面の小さな切片を生検する。いくつかの実施形態では、小生検は、円錐切除／円錐生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、円錐切除／円錐生検であり、子宮頸部からより大きな組織片を除去するために外来手術が必要となる場合がある。いくつかの実施形態では、円錐生検は、診断を確認するのを助けることに加えて、円錐生検が初期治療として役立ち得る。

【０６３４】

「固形腫瘍」という用語は、通常、嚢胞または液体領域を含まない組織の異常な塊を指す。固形腫瘍は、良性または悪性であり得る。「固形腫瘍癌」という用語は、悪性、腫瘍性、または癌性の固形腫瘍を指す。固形腫瘍癌には、肺の癌が含まれる。いくつかの実施形態では、癌は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）である。固形腫瘍の組織構造には、実質（癌細胞）を含む相互依存する組織区画、および癌細胞が分散し、支持微小環境を提供する可能性のある支持間質細胞が含まれる。

【０６３５】

いくつかの実施形態では、腫瘍からの試料は、細針吸引物（ＦＮＡ）、コア生検、小生検（例えば、パンチ生検を含む）として得られる。いくつかの実施形態では、試料は、最初にＧ－Ｒｅｘ　１０に入れられる。いくつかの実施形態では、１つまたは２つのコア生検および／または小生検試料がある場合、試料は最初にＧ－Ｒｅｘ　１０に入れられる。いくつかの実施形態では、３、４、５、６、８、９、または１０個以上のコア生検および／または小生検試料がある場合、試料は最初にＧ－Ｒｅｘ　１００に入れられる。いくつかの実施形態では、３、４、５、６、８、９、または１０個以上のコア生検および／または小生検試料がある場合、試料は最初にＧ－Ｒｅｘ　５００に入れられる。

【０６３６】

ＦＮＡは、例えば、ＮＳＣＬＣを含む肺腫瘍から得ることができる。いくつかの実施形態では、ＦＮＡは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を有する患者からの肺腫瘍などの肺腫瘍から得られる。場合によっては、ＮＳＣＬＣを有する患者は、以前に外科的治療を受けたことがある。

【０６３７】

本明細書に記載のＴＩＬは、ＦＮＡ試料から得ることができる。場合によっては、ＦＮＡ試料は、１８ゲージ針～２５ゲージ針の範囲の細いゲージ針を使用して、患者から取得または単離される。細いゲージ針は、１８ゲージ、１９ゲージ、２０ゲージ、２１ゲージ、２２ゲージ、２３ゲージ、２４ゲージ、または２５ゲージであり得る。いくつかの実施形態では、患者からのＦＮＡ試料は、少なくとも４００，０００ＴＩＬ、例えば、４００

，０００ＴＩＬ、４５０，０００ＴＩＬ、５００，０００ＴＩＬ、５５０，０００ＴＩＬ、６００，０００ＴＩＬ、６５０，０００ＴＩＬ、７００，０００ＴＩＬ、７５０，０００ＴＩＬ、８００，０００ＴＩＬ、８５０，０００ＴＩＬ、９００，０００ＴＩＬ、９５０，０００ＴＩＬ、またはそれ以上を含有し得る。

【０６３８】

場合によっては、本明細書に記載のＴＩＬは、コア生検試料から得られる。場合によっては、コア生検試料は、１１ゲージ針～１６ゲージ針の範囲の外科用または医療用針を使用して患者から取得または単離される。針は、１１ゲージ、１２ゲージ、１３ゲージ、１４ゲージ、１５ゲージ、または１６ゲージであり得る。いくつかの実施形態では、患者からのコア生検試料は、少なくとも４００，０００ＴＩＬ、例えば、４００，０００ＴＩＬ、４５０，０００ＴＩＬ、５００，０００ＴＩＬ、５５０，０００ＴＩＬ、６００，０００ＴＩＬ、６５０，０００ＴＩＬ、７００，０００ＴＩＬ、７５０，０００ＴＩＬ、８００，０００ＴＩＬ、８５０，０００ＴＩＬ、９００，０００ＴＩＬ、９５０，０００ＴＩＬ、またはそれ以上を含有し得る。

【０６３９】

一般に、採取された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに採取された」細胞集団と呼ばれる。

【０６４０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から得られない。いくつかの実施形態では、固形腫瘍コアは、断片化されない。

【０６４１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から得られる。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、酵素培地、例えば、限定されないが、ＲＰＭＩ　１６４０、２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、および１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ中でのインキュベーション、続いて機械的解離によって生成された（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍を、およそ１分間機械的に解離することができる。次いで、溶液を５％　CO_2中３７℃で３０分間インキュベートし、その後、およそ１分間再び機械的に破壊することができる。５％CO_2中３７℃で３０分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ１分間、３回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きな組織片が存在する場合の３回目の機械的破壊後、５％CO_2中３７℃で３０分間の追加のインキュベーションの有無にかかわらず、１回または２回の追加の機械的解離を試料に適用した。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、Ｆｉｃｏｌｌを使用した密度勾配分離を行い、これらの細胞を除去することができる。

【０６４２】

２．末梢血から末梢血リンパ球（ＰＢＬ）を拡張する方法

ＰＢＬ法１。本発明の実施形態では、ＰＢＬは、本明細書に記載のプロセスを使用して拡張される。本発明の実施形態では、この方法は、全血からＰＢＭＣ試料を取得することを含む。実施形態では、この方法は、非ＣＤ１９＋画分の負の選択を使用して、ＰＢＭＣから純粋なＴ細胞を単離することによってＴ細胞を濃縮することを含む。実施形態では、この方法は、非ＣＤ１９＋画分の磁気ビーズベースの負の選択を使用して、ＰＢＭＣから純粋なＴ細胞を単離することによってＴ細胞を濃縮することを含む。

【０６４３】

本発明の実施形態では、ＰＢＬ法１は、以下のように行われる：０日目に、凍結保存されたＰＢＭＣ試料を解凍し、ＰＢＭＣをカウントする。Ｔ細胞は、ヒトＰａｎ　Ｔ細胞単離キットおよびＬＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して単離される。

【０６４４】

ＰＢＬ法２。本発明の実施形態では、全血からＰＢＭＣ試料を取得することを含むＰＢＬ法２を使用して、ＰＢＬを拡張する。ＰＢＭＣからのＴ細胞は、ＰＢＭＣを３７℃で少

なくとも３時間インキュベートし、次いで非接着細胞を単離することによって濃縮される。

【０６４５】

本発明の実施形態では、ＰＢＬ法２は、以下のように行われる：０日目に、凍結保存されたＰＭＢＣ試料を解凍し、ＰＢＭＣ細胞を、ＣＭ－２培地中の６ウェルプレートに１ウェルあたり６００万細胞で播種し、３７℃で３時間インキュベートする。３時間後、ＰＢＬである非接着細胞を除去し、カウントする。

【０６４６】

ＰＢＬ法３。本発明の実施形態では、末梢血からＰＢＭＣ試料を取得することを含むＰＢＬ法３を使用して、ＰＢＬを拡張する。Ｂ細胞は、ＣＤ１９＋選択を使用して単離され、Ｔ細胞は、ＰＢＭＣ試料の非ＣＤ１９＋画分の負の選択を使用して選択される。

【０６４７】

本発明の実施形態では、ＰＢＬ法３は、以下のように行われる：０日目に、末梢血に由来する凍結保存されたＰＢＭＣを解凍し、カウントする。ＣＤ１９＋Ｂ細胞は、ＣＤ１９Ｍｕｌｔｉｓｏｒｔキット、ヒト（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して選別される。非ＣＤ１９＋細胞画分のうち、Ｔ細胞は、ヒトＰａｎ　Ｔ細胞単離キットおよびＬＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して精製される。

【０６４８】

実施形態では、ＰＢＭＣは、全血試料から単離される。実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、ＰＢＬを拡張するための出発材料として使用される。実施形態では、試料は、拡張プロセスの前に凍結保存される。別の実施形態では、新鮮な試料が、ＰＢＬを拡張するための出発材料として使用される。本発明の実施形態では、Ｔ細胞は、当該技術分野で知られている方法を使用してＰＢＭＣから単離される。実施形態では、Ｔ細胞は、ヒトＰａｎ　Ｔ細胞単離キットおよびＬＳカラムを使用して単離される。本発明の実施形態では、Ｔ細胞は、当該技術分野で知られている抗体選択方法、例えば、ＣＤ１９負の選択を使用して、ＰＢＭＣから単離される。

【０６４９】

本発明の実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、非接着細胞を同定するのに有効な所望の温度で一定期間インキュベートされる。本発明の実施形態では、インキュベーション時間は、約３時間である。本発明の実施形態では、温度は、約３７℃である。次いで、非接着細胞は、上記のプロセスを使用して拡張される。

【０６５０】

いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで任意に前処理された対象または患者からのものである。いくつかの実施形態では、腫瘍試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前処理された対象または患者からのものである。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療され、少なくとも１ヶ月、少なくとも２ヶ月、少なくとも３ヶ月、少なくとも４ヶ月、少なくとも５ヶ月、少なくとも６ヶ月、または１年以上治療を受けた対象または患者からのものである。別の実施形態では、ＰＢＭＣは、イブルチニブなどのＩＴＫ阻害剤レジメンを現在受けている患者に由来する。

【０６５１】

いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療され、キナーゼ阻害剤またはイブルチニブなどのＩＴＫ阻害剤での治療に不応性である対象または患者からのものである。

【０６５２】

いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前処理されたが、もはやキナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤による治療を受けていない対象または患者からのものである。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療されたが、もはやキナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤による治療を受けておらず、少なくとも１ヶ月、少なくとも２ヶ月、少なくとも３ヶ月、少なくとも４ヶ月、少なくとも５ヶ月、少なくとも６ヶ月、また

は少なくとも１年以上治療を受けていない対象または患者からのものである。別の実施形態では、ＰＢＭＣは、ＩＴＫ阻害剤に以前に曝露されたが、少なくとも３ヶ月、少なくとも６ヶ月、少なくとも９ヶ月、または少なくとも１年以内に治療されていない患者に由来する。

【０６５３】

本発明の実施形態では、０日目に、細胞がＣＤ１９＋のために選択され、それに応じて選別される。本発明の実施形態では、抗体結合ビーズを使用して選択が行われる。本発明の実施形態では、純粋なＴ細胞が、０日目にＰＢＭＣから単離される。

【０６５４】

本発明の実施形態では、イブルチニブまたは他のＩＴＫ阻害剤で前処理されていない患者の場合、１０～１５ｍＬのバフィーコートは、約５×１０^{9}個のＰＢＭＣを産生し、これは次に、約５．５×１０^{7}個のＰＢＬを産生する。

【０６５５】

本発明の実施形態では、イブルチニブまたは他のＩＴＫ阻害剤で前処理された患者の場合、拡張プロセスにより、約２０×１０^{9}個のＰＢＬが産生される。本発明の実施形態では、４０．３×１０^{6}個のＰＢＭＣは、約４．７×１０^{5}個のＰＢＬを産生する。

【０６５６】

前述の実施形態のうちのいずれかにおいて、ＰＢＭＣは、全血試料から、アフェレーシスによって、バフィーコートから、またはＰＢＭＣを取得するための当該技術分野で知られている任意の他の方法から誘導され得る。

【０６５７】

３．骨髄由来のＰＢＭＣから骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）を拡張する方法

ＭＩＬ方法３。本発明の実施形態では、この方法は、骨髄からＰＢＭＣを取得することを含む。０日目に、ＣＤ３＋／ＣＤ３３＋／ＣＤ２０＋／ＣＤ１４＋に対してＰＢＭＣを選択し、選別し、非ＣＤ３＋／ＣＤ３３＋／ＣＤ２０＋／ＣＤ１４＋細胞画分を超音波処理し、超音波処理された細胞画分の部分を、選択された細胞画分に追加する。

【０６５８】

本発明の実施形態では、ＭＩＬ方法３は、以下のように行われる：０日目に、凍結保存されたＰＢＭＣ試料を解凍し、ＰＢＭＣをカウントする。細胞をＣＤ３、ＣＤ３３、ＣＤ２０、およびＣＤ１４抗体で染色し、選別されたＳ３ｅ細胞（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して選別する。細胞を、免疫細胞画分（またはＭＩＬ画分）（ＣＤ３＋ＣＤ３３＋ＣＤ２０＋ＣＤ１４＋）およびＡＭＬ芽球画分（非ＣＤ３＋ＣＤ３３＋ＣＤ２０＋ＣＤ１４＋）の２つの画分に選別される。

【０６５９】

本発明の実施形態では、ＰＢＭＣは、骨髄から取得される。実施形態では、ＰＢＭＣは、アフェレーシス、吸引、針生検、または当該技術分野で知られている他の同様の手段を介して骨髄から取得される。実施形態では、ＰＢＭＣは、新鮮である。別の実施形態では、ＰＢＭＣは、凍結保存される。

【０６６０】

本発明の実施形態では、ＭＩＬは、１０～５０ｍｌの骨髄吸引物から拡張される。本発明の実施形態では、１０ｍＬの骨髄吸引物が患者から取得される。別の実施形態では、２０ｍＬの骨髄吸引物が患者から取得される。別の実施形態では、３０ｍＬの骨髄吸引物が患者から取得される。別の実施形態では、４０ｍＬの骨髄吸引物が患者から取得される。別の実施形態では、５０ｍＬの骨髄吸引物が患者から取得される。

【０６６１】

本発明の実施形態では、約１０～５０ｍＬの骨髄吸引物から産生されたＰＢＭＣの数は、約５×１０^{7}～約１０×１０^{7}個のＰＢＭＣである。別の実施形態では、産生されたＰＭＢＣの数は、約７×１０^{7}個のＰＢＭＣである。

【０６６２】

本発明の実施形態では、約５×１０^{7}～約１０×１０^{7}個のＰＢＭＣは、約０．５×１０

^{6}～約１．５×１０^{6}個のＭＩＬを産生する。本発明の実施形態では、約１×１０^{6}個のＭＩＬが産生される。

【０６６３】

本発明の実施形態では、骨髄吸引物に由来する１２×１０^{6}個のＰＢＭＣは、およそ１．４×１０^{5}個のＭＩＬを産生する。

【０６６４】

前述の実施形態のうちのいずれかにおいて、ＰＢＭＣは、全血試料から、骨髄から、アフェレーシスによって、バフィーコートから、またはＰＢＭＣを取得するための当該技術分野で知られている任意の他の方法から誘導され得る。

【０６６５】

Ｂ．ステップＢ：第１のプライミング拡張

いくつかの実施形態では、本方法は、より古いＴＩＬ（すなわち、対象／患者への投与前により多くの複製ラウンドをさらに受けたＴＩＬ）よりも追加の治療上の利益を提供し得る、より若いＴＩＬを提供する。若いＴＩＬの特徴は、文献、例えば、Ｄｏｎｉａ，ａｔ ａｌ．，Ｓｃａｎｄｉｎａｖｉａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，７５：１５７－１６７（２０１２）、Ｄｕｄｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ，１６：６１２２－６１３１（２０１０）、Ｈｕａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ，２８（３）：２５８－２６７（２００５）、Ｂｅｓｓｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ，１９（１７）：ＯＦ１－ＯＦ９（２０１３）、Ｂｅｓｓｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ ３２：４１５－４２３（２００９）、Ｒｏｂｂｉｎｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２００４；１７３：７１２５－７１３０、Ｓｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ，３０：１２３－１２９（２００７）、Ｚｈｏｕ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ，２８：５３－６２（２００５）、およびＴｒａｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ，３１：７４２－７５１（２００８）に記載されており、これらのすべては参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【０６６６】

例えば、図１（特に、例えば図１Ｂおよび／または図８Ｃ）のステップＡに記載されるような腫瘍断片および／または腫瘍断片の剥離または消化後、得られた細胞を、腫瘍および他の細胞よりもＴＩＬの成長に有利な条件下、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、およびフィーダー細胞（例えば、抗原提示フィーダー細胞）を含有する血清中で培養する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、およびフィーダー細胞は、培養開始時に、腫瘍消化物および／または腫瘍断片とともに（例えば、０日目に）添加される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物および／または腫瘍断片は、容器あたり最大６０個の断片および６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む容器内でインキュベートされる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に１～８日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に１～７日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張は、１～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張は、１～７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この第１のプライミング拡張は、５～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この第１のプライミング拡張は、５～７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この第１のプライミング拡張は、６～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この第１のプライミング拡張は、６～７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この第１

のプライミング拡張は、７～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この第１のプライミング拡張は、約７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この第１のプライミング拡張は、約８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。

【０６６７】

好ましい実施形態では、ＴＩＬの拡張は、以下および本明細書に記載される第１のプライミング拡張ステップ（例えば、ｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されるプロセスを含み得、０日目および／または培養開始からのフィーダー細胞を含有する、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなど）、続いて以下のステップＤおよび本明細書に記載される第２の急速拡張（ステップＤ、急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）ステップと称されるプロセスを含む）、続いて任意に凍結保存、続いて以下および本明細書に記載される第２のステップＤ（再刺激ＲＥＰステップと称されるプロセスを含む）を使用して行うことができる。このプロセスから得られたＴＩＬは、本明細書に記載の表現型特徴および代謝パラメーターについて任意に特徴付けることができる。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１ｍｍ^{3}～１０ｍｍ^{3}の間である。

【０６６８】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、ステップＢのＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭＨｅｐｅｓ、および１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンで補足された、ＧｌｕｔａＭＡＸを伴うＲＰＭＩ　１６４０からなる。

【０６６９】

いくつかの実施形態では、２４０個以下の腫瘍断片が存在する。いくつかの実施形態では、４つ以下の容器に入れられた２４０個以下の腫瘍断片が存在する。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、６０個以下の腫瘍断片が、１つの容器に入れられる。いくつかの実施形態では、各容器は、容器あたり５００ｍＬ以下の培地を含む。いくつかの実施形態では、培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、抗原提示フィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器あたり２．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器あたり３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇのＯＫＴ－３、および２．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器あたり６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、および２．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【０６７０】

腫瘍断片の調製後、得られた細胞（すなわち、一次細胞集団である断片）は、腫瘍および他の細胞よりもＴＩＬの成長に有利な条件下、ＩＬ－２、抗原提示フィーダー細胞、およびＯＫＴ－３を含む培地で培養され、０日目の培養開始からＴＩＬプライミングと加速された成長を可能にする。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物および／または腫瘍断片は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、ならびに抗原提示フィーダー細胞およびＯＫＴ－３とともにインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に１～８日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張中の成長培地は、ＩＬ－２またはその多様体、ならびに抗原提示フィーダー細胞およびＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に１～７日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、

第１のプライミング拡張中の成長培地は、ＩＬ－２またはその多様体、ならびに抗原提示フィーダー細胞およびＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、組み換えヒトＩＬ－２（ｒｈＩＬ－２）である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルについて２０～３０×１０^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルについて２０×１０^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルについて２５×１０^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルについて３０×１０^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、４～８×１０^{6}ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、５～７×１０^{6}ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、６×１０^{6}ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、実施例Ｃに記載されるように調製される。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、約１０，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、または約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。実施形態では、第１のプライミング拡張細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。好ましい実施形態では、第１のプライミング拡張細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。実施形態では、第１のプライミング拡張細胞培養培地は、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、約４０００ＩＵ／ｍＬ、約４５００ＩＵ／ｍＬ、約５０００ＩＵ／ｍＬ、約５５００ＩＵ／ｍＬ、約６０００ＩＵ／ｍＬ、約６５００ＩＵ／ｍＬ、約７０００ＩＵ／ｍＬ、約７５００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。実施形態では、第１のプライミング拡張細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬの間、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬの間、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬの間、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬの間、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬの間、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ、または８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【０６７１】

いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１６０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１４０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、または約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。実施形態では、第１のプライミング拡張細胞培養培地は、ＩＬ－１５をさらに含む。好ましい実施形態では、第１の

プライミング拡張細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。

【０６７２】

いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約４ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、または約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２１をさらに含む。好ましい実施形態では、第１のプライミング拡張細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。

【０６７３】

実施形態では、第１のプライミング拡張細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。実施形態では、第１のプライミング拡張細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、および約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。実施形態では、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬの間、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬの間、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬの間、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇの間、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬの間、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬの間、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬの間、および５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、１５ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬの間のＯＫＴ－３抗体を含む。実施形態では、細胞培養培地は、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３抗体は、ムロモナブである。

【表１９】

表１９：ムロモナブのアミノ酸配列（例示的なＯＫＴ－３抗体）

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

【０６７４】
いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張細胞培養培地は、細胞培養培地中に１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは４－１ＢＢアゴニストであり、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、ＥＵ－１０１、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、多様体、バイオシミラー、および組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、０．１μｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬの間の細胞培養培地中の濃度を達成するのに十分な濃度で添加される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの間の細胞培養培地中の濃度を達成するのに十分な濃度で添加される。

【０６７５】
いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、第１のプライミング拡張細胞培養培地は、ＩＬ－２を約３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、およびＯＫＴ－３を約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、第１のプライミング拡張細胞培養培地は、ＩＬ－２を約６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、およびＯＫＴ－３を約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０６７６】
いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、それは、ＣＭ１（培養培地１）と称される。いくつかの実施形態では、ＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、および１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンで補足された、ＧｌｕｔａＭＡＸを伴うＲＰＭＩ　１６４０からなる。いくつかの実施形態では、ＣＭは、実施例に記載されるＣＭ１であり、実施例Ａを参照されたい。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張は、初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張培地または初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、および抗原提示フィーダー細胞（本明細書ではフィーダー細胞とも称される）を含む。

【０６７７】
いくつかの実施形態では、本明細書に開示される拡張プロセスで使用される培地は、無血清培地または合成培地である。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地および血清サプリメントおよび／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、血清含有培地のロット間の変動に部分的に起因する実験的変動を防止および／または減少させるために使用される。

【０６７８】
いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地および血清サプリメントおよび／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張基礎培地、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞増殖ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ培地、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ　ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ細胞拡張ゼノフリー培地、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ　１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴーの最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、およびイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。

【０６７９】
いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ　Ｔ細胞拡張血清サプリメント、ＣＴＳ（商標）免疫細胞血清代替物、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン

、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の抗生物質、および１つ以上の微量元素が含まれるがこれらに限定されない。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、およびZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、および／または２－メルカプトエタノールをさらに含む。

【０６８０】

いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞免疫細胞血清置換は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張基礎培地、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ培地、ＣＳＴ（商標）ＡＩＭ－Ｖ　ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ細胞拡張ゼノフリー培地、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ　１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴーの最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、およびイスコフ改変ダルベッコ培地を含むがこれらに限定されない従来の成長培地とともに使用される。

【０６８１】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地中の総血清置換濃度（ｖｏｌ％）は、無血清または合成培地の合計の約１体積％、２体積％、３体積％、４体積％、５体積％、６体積％、７体積％、８体積％、９体積％、１０体積％、１１体積％、１２体積％、１３体積％、１４体積％、１５体積％、１６体積％、１７体積％、１８体積％、１９体積％、または２０体積％である。いくつかの実施形態では、総血清置換濃度は、無血清または合成培地の総体積の約３％である。いくつかの実施形態では、総血清置換濃度は、無血清または合成培地の総体積の約５％である。いくつかの実施形態では、総血清置換濃度は、無血清または合成培地の総体積の約１０％である。

【０６８２】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）の任意の製剤は、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張基礎培地および２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張サプリメントの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で補足される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で補足される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で補足され、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【０６８３】

いくつかの実施形態では、合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）の任意の製剤は、本発明において有用である。ＣＴＳ（商

標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張基礎培地および２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張サプリメントの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で補足される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、および２ｍＭのＬ－グルタミンで補足される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、および２ｍＭのＬ－グルタミンで補足され、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、および２ｍＭのＬ－グルタミンで補足され、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、および２ｍＭのＬ－グルタミンで補足され、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）および５５ｍＭの２－メルカプトエタノールで補足され、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）および５５ｍＭの２－メルカプトエタノールで補足され、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）および５５ｍＭの２－メルカプトエタノールで補足され、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）および約２ｍＭのグルタミンで補足され、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）および約２ｍＭのグルタミンで補足され、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）および約２ｍＭのグルタミンで補足され、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で補足され、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【０６８４】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地は、約０．１ｍＭ～約１０ｍＭ、０．５ｍＭ～約９ｍＭ、１ｍＭ～約８ｍＭ、２ｍＭ～約７ｍＭ、３ｍＭ～約６ｍＭ、または４ｍＭ～約５ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））で補足される。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地は、約２ｍＭの濃度で

グルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））で補足される。

【０６８５】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地は、約５ｍＭ～約１５０ｍＭ、１０ｍＭ～約１４０ｍＭ、１５ｍＭ～約１３０ｍＭ、２０ｍＭ～約１２０ｍＭ、２５ｍＭ～約１１０ｍＭ、３０ｍＭ～約１００ｍＭ、３５ｍＭ～約９５ｍＭ、４０ｍＭ～約９０ｍＭ、４５ｍＭ～約８５ｍＭ、５０ｍＭ～約８０ｍＭ、５５ｍＭ～約７５ｍＭ、６０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約６５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補足される。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地は、約５５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補足される。いくつかの実施形態では、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【０６８６】

いくつかの実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる国際ＰＣＴ公開第ＷＯ／１９９８／０３０６７９号に記載されている合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養での細胞の成長をサポートすることができる無血清サプリメントで補足された基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の微量元素、および１つ以上の抗生物質からなる群から選択される１つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって得られる。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、および／またはβ－メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、および１つ以上の微量元素からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、およびZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ　１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、およびイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

【０６８７】

いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌの範囲であり、Ｌ－ヒスチジンの濃度は、約５～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－イソロイシンの濃度は、約５～３００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－メチオニンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－フェニルアラニンの濃度は、約５～４００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－プロリンの濃度は、約１～１０００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－ヒドロキシプロリンの濃度は、約１～４５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－セリンの濃度は、約１～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－スレオニンの濃度は、約１０～５００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－トリプトファンの濃度は、約２～１１０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－チロシンの濃度は、約３～１７５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－バリンの濃度は、約５～５００ｍｇ／Ｌであり、チアミンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、還元型グルタチオンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩の濃度は、約１～２００ｍｇ／Ｌであり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約１～５

０ｍｇ／Ｌであり、インスリンの濃度は、約１～１００ｍｇ／Ｌであり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約０．０００００１～０．０００１ｍｇ／Ｌであり、アルブミン（例えば、ＡｌｂｕＭＡＸ（登録商標）Ｉ）の濃度は、約５０００～５０，０００ｍｇ／Ｌである。

【０６８８】

いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、以下の表Ａの「１Ｘ培地中の濃度範囲」という見出しの下の列にリストされた濃度範囲で存在する。他の実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、以下の表Ａの「１Ｘ培地の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされた最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかにおいて、無血清サプリメントは、以下の表Ａの「サプリメントの好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされたタイプおよび濃度の非微量部分成分を含む。

【表２０】

表Ａ：非微量元素の部分成分の濃度

成分	サプリメントの好ましい実施形態(mg/L)（約）	1X培地の濃度範囲(mg/L)（約）	1X培地の好ましい実施形態(mg/L)（約）
グリシン	150	5-200	53
L-ヒスチジン	940	5-250	183
L-イソロイシン	3400	5-300	615
L-メチオニン	90	5-200	44
L-フェニルアラニン	1800	5-400	336
L-プロリン	4000	1-1000	600
L-ヒドロキシプロリン	100	1-45	15
L-セリン	800	1-250	162
L-トレオニン	2200	10-500	425
L-トリプトファン	440	2-110	82
L-チロシン	77	3-175	84
L-バリン	2400	5-500	454
チアミン	33	1-20	9
還元型グルタチオン	10	1-20	1.5
アスコルビン酸-2-PO_4（マグネシウム塩）	330	1-200	50
トランスフェリン（鉄飽和）	55	1-50	8
インスリン	100	1-100	10
亜セレン酸ナトリウム	0.07	0.000001-0.0001	0.00001
AlbuMAX(登録商標)I	83,000	5000-50,000	12,500

【０６８９】

いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約２６０～３５０ｍＯｓｍｏｌの間である。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約２８０～３１０ｍＯｓｍｏｌの間である。いくつかの実施形態では、合成培地は、最大約３．７ｇ／Ｌ、または約２．２ｇ／Ｌの重炭酸ナトリウムで補足される。合成培地には、Ｌ－グルタミン（最終濃度約２ｍＭ）、１つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ、最終濃度約１００μＭ）、２－メルカプ

トエタノール（最終濃度約１００μＭ）でさらに補足され得る。

【０６９０】

いくつかの実施形態では、Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ ａｌ．，"Ｅｘ ｖｉｖｏ ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ｏｆ ｈｕｍａｎ Ｔ ｃｅｌｌｓ ｆｏｒ ａｄｏｐｔｉｖｅ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｕｓｉｎｇ ｔｈｅ ｎｏｖｅｌ Ｘｅｎｏ－ｆｒｅｅ ＣＴＳ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ，"Ｃｌｉｎ Ｔｒａｎｓｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，４（１）２０１５（ｄｏｉ：１０．１０３８／ｃｔｉ．２０１４．３１）に記載の合成培地は、本発明において有用である。簡単に説明すると、ＲＰＭＩまたはＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒを基礎細胞培地として使用し、０、２％、５％、または１０％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清代替物で補足した。

【０６９１】

実施形態では、第１および／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ろ過されていない。ろ過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。実施形態では、第１および／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、βメルカプトエタノール（ＢＭＥまたはβＭＥ、２－メルカプトエタノールとしても知られる、ＣＡＳ６０－２４－２）を欠いている。

【０６９２】

いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図１（特に、例えば図１Ｂおよび／もしくは図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例および図において考察されるように、１～８日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図１（特に、例えば図１Ｂおよび／もしくは図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、２～８日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図１（特に、例えば図１Ｂおよび／もしくは図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、３～８日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図１（特に、例えば図８Ｂおよび／もしくは図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例および図において考察されるように、４～８日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／もしくは図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例および図において考察されるように、１～７日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図１（特に、例えば図１Ｂおよび／もしくは図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、２～８日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／もしくは図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、２～７日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／もしくは図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、３～８日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／もしくは図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、３～７日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／もしくは図８Ｃ）のステップＢに記載さ

れるものなどのプロセスを含み、これは、ｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、４～８日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／もしくは図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、４～７日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／もしくは図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、５～８日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／もしくは図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、５～７日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／もしくは図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、６～８日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／もしくは図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、６～７日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図１（特に、例えば図８Ｂおよび／もしくは図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、７～８日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／もしくは図８Ｃ）のステップＢに提供されるものなどのプロセスを含み、これは、ｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、８日間である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／もしくは図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、７日間である。

【０６９３】

いくつかの実施形態では、第１のプライミングＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから１日～８日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のプライミングＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから１日～７日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のプライミングＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから２日～８日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のプライミングＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから２日～７日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のプライミングＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから３日～８日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のプライミングＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから３日～７日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のプライミングＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから４日～８日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のプライミングＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから４日～７日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のプライミングＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから５日～８日間進行することができる。いくつかの実施

形態では、第１のプライミングＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから５日～７日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のプライミングＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから６日～８日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のプライミングＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから６日～７日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のプライミングＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから７日～８日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のプライミングＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから８日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のプライミングＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから７日間進行することができる。

【０６９４】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの第１のプライミング拡張は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日～８日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日～７日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～８日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～７日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、３日～８日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、３日～７日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、４日～８日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、４日～７日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、５日～８日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、５日～７日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、６日～８日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、６日～７日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、７日～８日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、８日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、７日間進行することができる。

【０６９５】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、および／またはＩＬ－２１の組み合わせは、第１のプライミング拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、および／またはＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）による、ならびに本明細書に記載されるステップＢプロセス中を含む、第１の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１の組み合わせは、第１のプライミング拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）による、および本明細書に記載されるステップＢプロセス中に含まれ得る。

【０６９６】

いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張、例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）によるステップＢは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、ＴＩＬ拡張のために閉鎖系が用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターは、容器として用いられる。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－１００である。

いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－１０である。

【０６９７】

１．フィーダー細胞および抗原提示細胞

実施形態では、本明細書に記載の第１のプライミング拡張手順（例えば、図１（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ第１のプライミング拡張中に追加される。実施形態では、本明細書に記載の第１のプライミング拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ４～８日目の任意の時点で第１のプライミング拡張中に追加される。実施形態では、本明細書に記載の第１のプライミング拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ４～７日目の任意の時点で第１のプライミング拡張中に追加される。実施形態では、本明細書に記載の第１のプライミング拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ５～８日目の任意の時点で第１のプライミング拡張中に追加される。実施形態では、本明細書に記載の第１のプライミング拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ５～７日目の任意の時点で第１のプライミング拡張中に追加される。実施形態では、本明細書に記載の第１のプライミング拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ６～８日目の任意の時点で第１のプライミング拡張中に追加される。実施形態では、本明細書に記載の第１のプライミング拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ６～７日目の任意の時点で第１のプライミング拡張中に追加される。実施形態では、本明細書に記載の第１のプライミング拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ７または８日目の任意の時点で第１のプライミング拡張中に追加される。実施形態では、本明細書に記載の第１のプライミング拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ７日目の任意の時点で第１のプライミング拡張中に追加される。実施形態では、本明細書に記載の第１のプライミング拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細

書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ８日目の任意の時点で第１のプライミング拡張中に追加される。

【０６９８】

実施形態では、本明細書に記載の第１のプライミング拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにｐｒｅ－ＲＥＰまたはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時および第１のプライミング拡張中にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要する。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者からの標準的な全血単位から得られる末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準的な方法を使用して得られる。いくつかの実施形態では、２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞が、第１のプライミング拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、容器あたり２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞が、第１のプライミング拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、ＧＲＥＸ－１０あたり２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞が、第１のプライミング拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、ＧＲＥＸ－１００あたり２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞が、第１のプライミング拡張中に使用される。

【０６９９】

一般に、同種異系ＰＢＭＣは、照射または熱処理のいずれかによって不活化され、実施例に記載されるように、ＲＥＰ手順で使用され、これは、照射された同種異系ＰＢＭＣの複製能力を評価するための例示的なプロトコルを提供する。

【０７００】

いくつかの実施形態では、１４日目の生細胞の総数が、第１のプライミング拡張の０日目に培養された最初の生細胞数よりも少ない場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。

【０７０１】

いくつかの実施形態では、７日目のＯＫＴ３およびＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、第１のプライミング拡張の０日目に培養された最初の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【０７０２】

いくつかの実施形態では、７日目のＯＫＴ３およびＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、第１のプライミング拡張の０日目に培養された最初の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、５～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および１０００～６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１０～５０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および２０００～５０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２０～４０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および２０００～４０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２５～３５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および２５００～３５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【０７０３】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、ＰＢＭＣである。いくつかの実

施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬ対抗原提示フィーダー細胞の比は、約１対２５、約１対５０、約１対１００、約１対１２５、約１対１５０、約１対１７５、約１対２００、約１対２２５、約１対２５０、約１対２７５、約１対３００、約１対３２５、約１対３５０、約１対３７５、約１対４００、または約１対５００である。実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬ対抗原提示フィーダー細胞の比は、１対５０～１対３００の間である。実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬ対抗原提示フィーダー細胞の比は、１対１００～１対２００の間である。

【０７０４】

実施形態では、本明細書に記載の第１のプライミング拡張手順は、約２．５×１０^{8}フィーダー細胞対約１００×１０^{6}ＴＩＬの比を必要とする。別の実施形態では、本明細書に記載の第１のプライミング拡張手順は、約２．５×１０^{8}フィーダー細胞対約５０×１０^{6}ＴＩＬの比を必要とする。さらに別の実施形態では、本明細書に記載の第１のプライミング拡張手順は、約２．５×１０^{8}フィーダー細胞対約２５×１０^{6}ＴＩＬを必要とする。さらに別の実施形態では、本明細書に記載の第１のプライミング拡張は、約２．５×１０^{8}フィーダー細胞を必要とする。さらに別の実施形態では、第１のプライミング拡張は、第２の急速拡張で使用されるフィーダー細胞の数の４分の１、３分の１、１２分の５、または半分を必要とする。

【０７０５】

いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張における培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張における培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張における培地は、容器あたり２．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張における培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器あたり３０ｎｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、および２．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器あたり６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、および２．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器あたり５００ｍＬの培養培地および２．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞あたり１５μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器あたり５００ｍＬの培養培地および１５μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、５００ｍＬの培養培地、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、および２．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器あたり５００ｍＬの培養培地、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、１５μｇのＯＫＴ－３、および２．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器あたり５００ｍＬの培養培地および２．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞あたり１５μｇのＯＫＴ－３を含む。

【０７０６】

実施形態では、本明細書に記載の第１のプライミング拡張手順は、第２の拡張中にＴＩＬを超える過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者からの標準的な全血単位から得られる末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準的な方法を使用して得られる。実施形態では、人工抗原提示（ａＡＰＣ）細胞が、ＰＢＭＣの代わりに使用される。

【０７０７】

一般に、同種異系ＰＢＭＣは、照射または熱処理のいずれかによって不活化され、図お

よび実施例に記載される例示的な手順を含む、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順で使用される。

【０７０８】

実施形態では、人工抗原提示細胞は、ＰＢＭＣの代替として、またはＰＢＭＣと組み合わせて、第１のプライミング拡張において使用される。

【０７０９】

２．サイトカイン

本明細書に記載の拡張方法は、一般に、当該技術分野で知られているように、高用量のサイトカイン、特にＩＬ－２を含む培養培地を使用する。

【０７１０】

代替的に、国際公開第ＷＯ２０１５／１８９３５６号および同第ＷＯ２０１５／１８９３５７号（参照によりそれらの全体が本明細書に明示的に組み込まれる）に一般に概説されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせで、ＴＩＬの第１のプライミング拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することもさらに可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２およびＩＬ－１５、ＩＬ－２およびＩＬ－２１、ＩＬ－１５およびＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１が含まれ、後者は多くの実施形態では特定の用途を見出す。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようなＴ細胞の生成に特に有利に働く。

【表２１】

表２０：インターロイキンのアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 3 組み換えヒト IL－2 （rhIL－2）	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
配列番号 4 アルデスロイキン	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
配列番号 5 組み換えヒト IL－4 （rhIL－4）	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREKYSKCSS 130
配列番号 6 組み換えヒト IL－7 （rhIL－7）	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH 153
配列番号 7 組み換えヒト IL-15 (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115
配列番号 8 組み換えヒト IL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132

【０７１１】

Ｃ．ステップＣ：第１のプライミング拡張から第２の急速拡張への移行

場合によっては、例えば図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に示されるようにステップＢから得られるＴＩＬ集団を含む、第１のプライミング拡張から得られたバルクＴＩＬ母集団（ｐｒｅ－ＲＥＰと称されることもある拡張を含み得る）は、第２の急速拡張（これは、急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されることもある拡張を含み得る）に供され、次いで、以下で考察されるように凍結保存され得る。同様に、遺伝子改変Ｔ

ＩＬが治療に使用される場合、第１のプライミング拡張からの拡張ＴＩＬ集団、または第２の急速拡張からの拡張ＴＩＬ集団は、拡張ステップの前または第１のプライミング拡張の後および第２の急速拡張前に好適な治療のために遺伝子改変に供され得る。

【０７１２】

いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から（例えば、図１（特に、例えば図１Ｂおよび／または図８Ｃ）に示されるようにステップＢから）得られたＴＩＬは、選択のために表現型決定されるまで保存される。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から（例えば、図１（特に、例えば図１Ｂおよび／または図８Ｃ）に示されるようにステップＢから）得られたＴＩＬは保存されず、第２の急速拡張に直接進行する。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から得られたＴＩＬは、第１のプライミング拡張後、および第２の急速拡張前に凍結保存されない。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の拡張への移行は、腫瘍の断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから約２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の急速拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから約３日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の急速拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから約３日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから約４日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから約４日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから約５日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから約５日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから約６日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから約６日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから約７日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから約７日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから約８日で起こる。

【０７１３】

いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の急速拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の急速拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから１日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の急速拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから１日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから２日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプ

ライミング拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから２日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから３日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから３日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の急速拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから４日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の急速拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから４日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の急速拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから５日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の急速拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから５日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の急速拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから６日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の急速拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから６日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の急速拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから７日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の急速拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから７日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の急速拡張への移行は、断片化が起こったとき、および／または第１のプライミング拡張ステップが開始されたときから８日で起こる。

【０７１４】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、第１の初期拡張後、および第２の急速拡張前に保存されず、ＴＩＬは、第２の急速拡張に直接進行する（例えば、いくつかの実施形態では、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に示されるようにステップＢからステップＤへの移行中の保存がない）。いくつかの実施形態では、移行は、本明細書に記載されるように、閉鎖系で起こる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張からのＴＩＬ、第２のＴＩＬ集団は、移行期間なしで第２の急速拡張に直接進行する。

【０７１５】

いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の急速拡張への移行、例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）によるステップＣは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、ＴＩＬ拡張のために閉鎖系が用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、ＧＲＥＸ－１０またはＧＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張から第２の急速拡張への移行は、容器サイズのスケールアップを伴う。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張は、第２の急速拡張よりも小さい容器内で行われる。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張は、ＧＲＥＸ－１００内で行われ、第２の急速拡張は、ＧＲＥＸ－５００内で行われる。

【０７１６】

Ｄ．ステップＤ：第２の急速拡張

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ細胞集団は、採取および第１のプライミング拡張後、ステップＡおよびステップＢ、ならびに図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ

））に示されるようにステップＣと称される移行後に数がさらに拡張される。このさらなる拡張は、本明細書では第２の急速拡張と称され、これは、当該技術分野で一般に急速拡張プロセス（急速拡張プロトコルまたはＲＥＰ、および図８（特に、例えば図８Ｂ）のステップＤに示されるプロセス）と称される拡張プロセスを含み得る。第２の拡張は、一般に、フィーダー細胞、サイトカイン源、および抗ＣＤ３抗体を含むいくつかの成分を含む培養培地を使用して、ガス透過性容器内で達成される。いくつかの実施形態では、第２の急速拡張の開始後１日、２日、３日、または４日（すなわち、Ｇｅｎ３プロセス全体の８、９、１０、または１１日目）に、ＴＩＬは、大容量のコンテナに移される。

【０７１７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの第２の急速拡張（ＲＥＰと称されることもある拡張、ならびに図１（特に、例えば図１Ｂおよび／または図８Ｃ）のステップＤに示されるプロセスを含み得る）は、当業者に知られている任意のＴＩＬフラスコまたは容器を使用して行うことができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、または１０日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約１日～約９日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約１日～約１０日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約２日～約９日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約２日～約１０日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約３日～約９日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約３日～約１０日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約４日～約９日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約４日～約１０日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約５日～約９日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約５日～約１０日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約６日～約９日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約６日～約１０日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約７日～約９日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約７日～約１０日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約８日～約９日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約８日～約１０日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約９日～約１０日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約１日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約２日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約３日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約４日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約５日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約６日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約７日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約８日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約９日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、第２の急速拡張の開始後、約１０日間進行することができる。

【０７１８】
実施形態では、第２の急速拡張は、本開示の方法（例えば、ＲＥＰと称される拡張、ならびに図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）のステップＤに示されるプロセスを含む）を使用して、ガス透過性容器内で行うことができる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、およびフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）の存在下での第２の急速拡張において拡張される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、およびフィーダー細胞の存在下での第２の急速拡張において拡張され、フィーダー細胞は、第１のプライミング拡張において存在するフィーダー細胞の濃度の２倍、２．４倍、２．５倍、３倍、３．５倍、または４倍である最終濃度まで添加される。例えば、ＴＩＬは、インターロイキン－２（ＩＬ－２）またはインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）の存在下で非特異的Ｔ細胞受容体刺激を使用して、急速に拡張させることができる。非特異的Ｔ細胞受容体刺激は、例えば、抗ＣＤ３抗体、例えば約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３、マウスモノクローナル抗ＣＤ３抗体（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ，Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪもしくはＭｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡから市販）またはＵＨＣＴ－１（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡから市販）を含み得る。ＴＩＬは、癌のエピトープ（複数可）などのその抗原性部分を含む、第２の拡張中に１つ以上の抗原を含むことによって、インビトロでＴＩＬのさらなる刺激を誘導するように拡張することができ、これは、ヒト白血球抗原Ａ２（ＨＬＡ－Ａ２）結合ペプチドなどのベクター、例えば、０．３μＭ ＭＡＲＴ－１：２６－３５（２７Ｌ）またはｇｐｌ００：２０９－２１７（２１０Ｍ）から、任意に３００ＩＵ／ｍＬ ＩＬ－２またはＩＬ－１５などのＴ細胞成長因子の存在下で任意に発現され得る。他の好適な抗原には、例えば、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、チロシナーゼ癌抗原、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＳＳＸ－２、およびＶＥＧＦＲ２、またはそれらの抗原性部分が含まれ得る。ＴＩＬはまた、ＨＬＡ－Ａ２を発現する抗原提示細胞にパルスされた癌の同じ抗原（複数可）で再刺激することによっても急速に拡張され得る。代替的に、ＴＩＬは、例えば、例として照射された自己リンパ球、または照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球およびＩＬ－２でさらに再刺激され得る。いくつかの実施形態では、再刺激は、第２の拡張の一部として起こる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、照射された自己リンパ球の存在下で、または照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球およびＩＬ－２を用いて起こる。

【０７１９】
実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。実施形態では、細胞培養培地は、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、約４０００ＩＵ／ｍＬ、約４５００ＩＵ／ｍＬ、約５０００ＩＵ／ｍＬ、約５５００ＩＵ／ｍＬ、約６０００ＩＵ／ｍＬ、約６５００ＩＵ／ｍＬ、約７０００ＩＵ／ｍＬ、約７５００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。実施形態では、細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬの間、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬの間、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬの間、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬの間、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬの間、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ、または８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【０７２０】
実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。実施形態では、細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、および約

１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。実施形態では、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬの間、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬの間、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬの間、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇの間、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬの間、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬの間、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬの間、および５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、１５ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬの間のＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬ～６０ｎｇ／ｍＬの間のＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３抗体は、ムロモナブである。

【０７２１】

いくつかの実施形態では、第２の急速拡張における培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第２の急速拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、第２の急速拡張における培地は、容器あたり７．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、第２の急速拡張における培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、第２の急速拡張培地中に、容器あたり５００ｍＬの培養培地および３０μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、第２の急速拡張培地中に、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、および７．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器あたり５００ｍＬの培養培地、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０μｇのＯＫＴ－３、および７．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【０７２２】

いくつかの実施形態では、第２の急速拡張における培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第２の急速拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器あたり５×１０^{8}～７．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、第２の急速拡張における培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、第２の急速拡張における培地は、容器あたり５００ｍＬの培養培地および３０μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、第２の急速拡張における培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、および５×１０^{8}～７．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、第２の急速な拡張における培地は、容器あたり５００ｍＬの培養培地、ならびに６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０μｇのＯＫＴ－３、および５×１０^{8}～７．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【０７２３】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、細胞培養培地中に１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは４－１ＢＢアゴニストであり、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、ＥＵ－１０１、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、多様体、バイオシミラー、および組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、０．１μｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬの間の細胞培養培地中の濃度を達成するのに十分な濃度で添加される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの間の細胞培養培地中の濃度を達成するのに十分な濃度で添加される。

【０７２４】

いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、細胞培養培地は、ＩＬ－２を約３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、およびＯＫＴ－３を約３０ｎｇ／ｍ

Ｌの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０７２５】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、および／またはＩＬ－２１の組み合わせは、第２の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、および／またはＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）による、ならびに本明細書に記載されるステップＤプロセス中を含む、第２の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１の組み合わせは、第２の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）による、および本明細書に記載されるステップＤプロセス中に含まれ得る。

【０７２６】

いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、抗原提示フィーダー細胞、および任意にＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む補足された細胞培養培地において実施され得る。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、補足された細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、補足された細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、および抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、第２の細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、および抗原提示細胞（ＡＰＣ、抗原提示フィーダー細胞とも称される）を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、および抗原提示フィーダー細胞（すなわち、抗原提示細胞）を含む細胞培養培地中で起こる。

【０７２７】

いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１６０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１４０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、または約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－１５をさらに含む。好ましい実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。

【０７２８】

いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約４ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、または約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１

ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２１をさらに含む。好ましい実施形態では、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。

【０７２９】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）は、ＰＢＭＣである。実施形態では、急速拡張および／または第２の拡張におけるＴＩＬ対ＰＢＭＣおよび／または抗原提示細胞の比は、約１対１０、約１対１５、約１対２０、約１対２５、約１対３０、約１対３５、約１対４０、約１対４５、約１対５０、約１対７５、約１対１００、約１対１２５、約１対１５０、約１対１７５、約１対２００、約１対２２５、約１対２５０、約１対２７５、約１対３００、約１対３２５、約１対３５０、約１対３７５、約１対４００、または約１対５００である。実施形態では、急速拡張および／または第２の拡張におけるＴＩＬ対ＰＢＭＣの比は、１対５０～１対３００の間である。実施形態では、急速拡張および／または第２の拡張におけるＴＩＬ対ＰＢＭＣの比は、１対１００～１対２００の間である。

【０７３０】

実施形態では、ＲＥＰおよび／または第２の急速拡張は、バルクＴＩＬが１００倍または２００倍過剰の不活化フィーダー細胞と混合されているフラスコ内で行われ、フィーダー細胞濃度は、１５０ｍＬ培地中の３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３、抗ＣＤ３抗体、および６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の第１のプライミング拡張におけるフィーダー細胞濃度の少なくとも１．１倍（１．１Ｘ）、１．２Ｘ、１．３Ｘ、１．４Ｘ、１．５Ｘ、１．６Ｘ、１．７Ｘ、１．８Ｘ、１．８Ｘ、２Ｘ、２．１Ｘ、２．２Ｘ、２．３Ｘ、２．４Ｘ、２．５Ｘ、２．６Ｘ、２．７Ｘ、２．８Ｘ、２．９Ｘ、３．０Ｘ、３．１Ｘ、３．２Ｘ、３．３Ｘ、３．４Ｘ、３．５Ｘ、３．６Ｘ、３．７Ｘ、３．８Ｘ、３．９Ｘ、または４．０Ｘである。細胞が代替の成長チャンバーに移されるまで、培地交換が行われる（一般に、使用済み培地の３分の２の吸引および等量の新鮮な培地での交換による３分の２の培地交換）。代替の成長チャンバーには、以下でより完全に考察されるように、Ｇ－ＲＥＸフラスコおよびガス透過性容器が含まれる。

【０７３１】

いくつかの実施形態では、第２の急速拡張（ＲＥＰプロセスと称されるプロセスを含み得る）は、実施例および図で考察されるように、７～９日間である。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、７日間である。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、８日間である。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、９日間である。

【０７３２】

実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張、ならびに図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）のステップＤで参照される拡張を含み得る）は、１００ｃｍのガス透過性シリコン底部（Ｇ－Ｒｅｘ　１００、Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ　Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｎｅｗ　Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ，ＵＳＡから市販）を有する５００ｍＬ容量のガス透過性フラスコ内で行うことができる。5×10^{6}または10×10^{6}ＴＩＬは、５％ヒトＡＢ血清、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、および３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）で補足された４００ｍＬの５０／５０培地中でＰＢＭＣとともに培養され得る。Ｇ－Ｒｅｘ　１００フラスコを、５％　CO_2中３７℃でインキュベートすることができる。５日目に、２５０ｍＬの上清を除去して遠心分離ボトルに入れ、１５００ｒｐｍ（４９１×ｇ）で１０分間遠心分離する。ＴＩＬペレットを、５％ヒトＡＢ血清、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬの新鮮な培地で再懸濁し、元のＧＲＥＸ－１００フラスコに戻すことができる。ＴＩＬがＧＲＥＸ－１００フラスコで連続的に拡張される場合、１０日目または１１日目に、ＴＩＬをＧＲＥＸ－５００などのより大きなフラスコに移すことができる。培養１４日目に、細胞を採取することができる。培養１５日目に、細胞を採取することができる。培養１６日目に、細胞を採取することができる。いくつかの実施形態では、培地交換は、細胞が代替の成長チャンバーに移されるまで行われる。いくつかの実施形態では、培地の３分の２は、使用済み培地の吸

引および等量の新鮮な培地との交換によって置き換えられる。いくつかの実施形態では、代替の成長チャンバーには、以下でより完全に考察されるように、ＧＲＥＸフラスコおよびガス透過性容器が含まれる。

【０７３３】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される拡張プロセスで使用される培地は、無血清培地または合成培地である。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地および血清サプリメントおよび／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、血清含有培地のロット間の変動に部分的に起因する実験的変動を防止および／または減少させるために使用される。

【０７３４】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地および血清サプリメントおよび／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張基礎培地、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞増殖ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ培地、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ　ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ細胞拡張ゼノフリー培地、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ　１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴーの最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、およびイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。

【０７３５】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ　Ｔ細胞拡張血清サプリメント、ＣＴＳ（商標）免疫細胞血清代替物、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の抗生物質、および１つ以上の微量元素が含まれるがこれらに限定されない。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、およびZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、および／または２－メルカプトエタノールをさらに含む。

【０７３６】

いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞免疫細胞血清置換は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張基礎培地、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ培地、ＣＳＴ（商標）ＡＩＭ－Ｖ　ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ細胞拡張ゼノフリー培地、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ　１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴーの最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、およびイスコフ改変ダルベッコ培地を含むがこれらに限定されない従来の成長培地とともに使用される。

【０７３７】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地中の総血清置換濃度（ｖｏｌ％）は、無血清または合成培地の合計の約１体積％、２体積％、３体積％、４体積％、５体積％、６体積％、７体積％、８体積％、９体積％、１０体積％、１１体積％、１２体積％、１３体積％、１４体積％、１５体積％、１６体積％、１７体積％、１８体積％、１９体積％、または２０体積％である。いくつかの実施形態では、総血清置換濃度は、無血清または合

成培地の総体積の約３％である。いくつかの実施形態では、総血清置換濃度は、無血清または合成培地の総体積の約５％である。いくつかの実施形態では、総血清置換濃度は、無血清または合成培地の総体積の約１０％である。

【０７３８】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）の任意の製剤は、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張基礎培地および２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張サプリメントの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で補足される。

【０７３９】

いくつかの実施形態では、合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）の任意の製剤は、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張基礎培地および２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張サプリメントの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で補足される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、および２ｍＭのＬ－グルタミンで補足される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、および２ｍＭのＬ－グルタミンで補足され、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、および２ｍＭのＬ－グルタミンで補足され、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、および２ｍＭのＬ－グルタミンで補足され、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）および５５ｍＭの２－メルカプトエタノールで補足され、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）および５５ｍＭの２－メルカプトエタノールで補足され、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）および５５ｍＭの２－メルカプトエタノールで補足され、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）

ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）および約２ｍＭのグルタミンで補足され、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）および約２ｍＭのグルタミンで補足され、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭは、約３％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清置換（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）および約２ｍＭのグルタミンで補足され、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。

【０７４０】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地は、約０．１ｍＭ～約１０ｍＭ、０．５ｍＭ～約９ｍＭ、１ｍＭ～約８ｍＭ、２ｍＭ～約７ｍＭ、３ｍＭ～約６ｍＭ、または４ｍＭ～約５ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））で補足される。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地は、約２ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））で補足される。

【０７４１】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地は、約５ｍＭ～約１５０ｍＭ、１０ｍＭ～約１４０ｍＭ、１５ｍＭ～約１３０ｍＭ、２０ｍＭ～約１２０ｍＭ、２５ｍＭ～約１１０ｍＭ、３０ｍＭ～約１００ｍＭ、３５ｍＭ～約９５ｍＭ、４０ｍＭ～約９０ｍＭ、４５ｍＭ～約８５ｍＭ、５０ｍＭ～約８０ｍＭ、５５ｍＭ～約７５ｍＭ、６０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約６５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補足される。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地は、約５５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補足される。

【０７４２】

いくつかの実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる国際ＰＣＴ公開第ＷＯ／１９９８／０３０６７９号に記載されている合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養での細胞の成長をサポートすることができる無血清サプリメントで補足された基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の微量元素、および１つ以上の抗生物質からなる群から選択される１つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって得られる。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、および／またはβ－メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物、ならびに１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、および１つ以上の微量元素からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分$Ａｇ^{+}$、$Ａｌ^{3+}$、$Ｂａ^{2+}$、$Ｃｄ^{2+}$、$Ｃｏ^{2+}$、$Ｃｒ^{3+}$、$Ｇｅ^{4+}$、$Ｓｅ^{4+}$、Ｂｒ、Ｔ、$Ｍｎ^{2+}$、Ｐ、$Ｓｉ^{4+}$、$Ｖ^{5+}$、$Ｍｏ^{6+}$、$Ｎｉ^{2+}$、$Ｒｂ^{+}$、$Ｓｎ^{2+}$、および$Ｚｒ^{4+}$を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ １６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（

αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、およびイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

【０７４３】

いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌの範囲であり、Ｌ－ヒスチジンの濃度は、約５～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－イソロイシンの濃度は、約５～３００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－メチオニンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－フェニルアラニンの濃度は、約５～４００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－プロリンの濃度は、約１～１０００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－ヒドロキシプロリンの濃度は、約１～４５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－セリンの濃度は、約１～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－スレオニンの濃度は、約１０～５００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－トリプトファンの濃度は、約２～１１０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－チロシンの濃度は、約３～１７５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－バリンの濃度は、約５～５００ｍｇ／Ｌであり、チアミンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、還元型グルタチオンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩の濃度は、約１～２００ｍｇ／Ｌであり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約１～５０ｍｇ／Ｌであり、インスリンの濃度は、約１～１００ｍｇ／Ｌであり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約０．０００００１～０．０００１ｍｇ／Ｌであり、アルブミン（例えば、ＡｌｂｕＭＡＸ（登録商標）Ｉ）の濃度は、約５０００～５０，０００ｍｇ／Ｌである。

【０７４４】

いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、以下の表Ａの「１Ｘ培地中の濃度範囲」という見出しの下の列にリストされた濃度範囲で存在する。他の実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、以下の表Ａの「１Ｘ培地の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされた最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかにおいて、無血清サプリメントは、以下の表Ａの「サプリメントの好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされたタイプおよび濃度の非微量部分成分を含む。

【表２２】

表Ａ：非微量元素の部分成分の濃度

成分	サプリメントの好ましい実施形態(mg/L)（約）	１Ｘ培地の濃度範囲(mg/L)（約）	１Ｘ培地の好ましい実施形態(mg/L)（約）
グリシン	150	5-200	53
Ｌ－ヒスチジン	940	5-250	183
Ｌ－イソロイシン	3400	5-300	615
Ｌ－メチオニン	90	5-200	44
Ｌ－フェニルアラニン	1800	5-400	336
Ｌ－プロリン	4000	1-1000	600
Ｌ－ヒドロキシプロリン	100	1-45	15
Ｌ－セリン	800	1-250	162
Ｌ－トレオニン	2200	10-500	425
Ｌ－トリプトファン	440	2-110	82
Ｌ－チロシン	77	3-175	84
Ｌ－バリン	2400	5-500	454
チアミン	33	1-20	9
還元型グルタチオン	10	1-20	1.5
アスコルビン酸-2-PO_4（マグネシウム塩）	330	1-200	50
トランスフェリン（鉄飽和）	55	1-50	8
インスリン	100	1-100	10
亜セレン酸ナトリウム	0.07	0.000001-0.0001	0.00001
AlbuMAX(登録商標)I	83,000	5000-50,000	12,500

【０７４５】

いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約２６０～３５０ｍＯｓｍｏｌの間である。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約２８０～３１０ｍＯｓｍｏｌの間である。いくつかの実施形態では、合成培地は、最大約３．７ｇ／Ｌ、または約２．２ｇ／Ｌの重炭酸ナトリウムで補足される。合成培地には、Ｌ－グルタミン（最終濃度約２ｍＭ）、１つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ、最終濃度約１００μＭ）、２－メルカプトエタノール（最終濃度約１００μＭ）でさらに補足され得る。

【０７４６】

いくつかの実施形態では、Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ ａｌ．，"Ｅｘ ｖｉｖｏ ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ｏｆ ｈｕｍａｎ Ｔ ｃｅｌｌｓ ｆｏｒ ａｄｏｐｔｉｖｅ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｕｓｉｎｇ ｔｈｅ ｎｏｖｅｌ Ｘｅｎｏ－ｆｒｅｅ ＣＴＳ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ，"Ｃｌｉｎ Ｔｒａｎｓｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，４（１）２０１５（ｄｏｉ：１０．１０３８／ｃｔｉ．２０１４．３１）に記載の合成培地は、本発明において有用である。簡単に説明すると、ＲＰＭＩまたはＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒを基礎細胞培地として使用し、０、２％、５％、または１０％のＣＴＳ（商標）免疫細胞血清代替物で補足した。

【０７４７】

実施形態では、第１および／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ろ過されて

いない。ろ過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。実施形態では、第１および／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、βメルカプトエタノール（ＢＭＥまたはβＭＥ、２－メルカプトエタノールとしても知られる、ＣＡＳ６０－２４－２）を欠いている。

【０７４８】

実施形態では、第２の急速拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）が行われ、優れた腫瘍反応性のためにＴＩＬが選択されるステップをさらに含む。当該技術分野で知られている任意の選択方法を使用することができる。例えば、米国特許出願公開第２０１６／００１００５８Ａ１号に記載されている方法は、その開示が参照により本明細書に組み込まれ、優れた腫瘍反応性のためのＴＩＬの選択に使用することができる。

【０７４９】

任意に、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準的なアッセイを使用して、第２の急速拡張（ＲＥＰ拡張と称される拡張を含む）の後に行うことができる。例えば、トリパンブルー排除アッセイは、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするバルクＴＩＬの試料上で行うことができる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ試料は、Ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２自動セルカウンター（Ｎｅｘｃｅｌｏｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｌａｗｒｅｎｃｅ，ＭＡ）を使用してカウントされ、生存率が決定され得る。いくつかの実施形態では、生存率は、標準的なＣｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２　Ｉｍａｇｅ　Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ自動セルカウンタープロトコルに従って決定される。

【０７５０】

Ｔリンパ球およびＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた、但し多数の遺伝子セグメントの体細胞組み換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、およびＣ（一定）は、免疫グロブリンおよびＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性および下流への応用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって得られたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第２の拡張において得られたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性および／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、α、β、γ、およびδ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）αおよび／またはβの発現が増加している。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）αの発現が増加している。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）βの発現が増加している。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加している。

【０７５１】

いくつかの実施形態では、第２の急速拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地と称されることもある）は、以下でさらに詳細に考察されるように、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、ならびに抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。いくつかの実施形態では、第２の急速拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地と称されることもある）は、以下でさらに詳細に考察されるように、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、フラスコあたり３０ｕｇのＯＫＴ－３、ならびに７．５×１０^{8}抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。いくつかの実施形態では、第２の急速拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地と称されることもある）は、以下でさらに詳細に考察されるように、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、ならびに抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。いくつかの実施形態では、第２の急速拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地と称されることもある）は、以下でさらに詳細に考察されるように、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、フラスコあたり３０ｕｇのＯＫＴ－３、ならびに５×１０^{8}抗原提示フィー

ダー細胞（ＡＰＣ）を含む。

【０７５２】

いくつかの実施形態では、第２の急速拡張、例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）によるステップＤは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、ＴＩＬ拡張のために閉鎖系が用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターは、容器として用いられる。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００またはＧ－ＲＥＸ－５００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－５００である。

【０７５３】

１．フィーダー細胞および抗原提示細胞

実施形態では、本明細書に記載される第２の急速拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）のステップＤに記載されるような拡張、ならびにＲＥＰと称されるものを含む）は、ＲＥＰ　ＴＩＬ拡張中および／または第２の急速拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な献血者からの標準的な全血単位から得られる末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準的な方法を使用して得られる。

【０７５４】

一般に、同種異系ＰＢＭＣは、照射または熱処理のいずれかによって不活化され、実施例に記載されるように、ＲＥＰ手順で使用され、これは、照射された同種異系ＰＢＭＣの複製能力を評価するための例示的なプロトコルを提供する。

【０７５５】

いくつかの実施形態では、７日目または１４日目の生細胞の総数が、ＲＥＰの０日目および／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された最初の生細胞数よりも少ない場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。

【０７５６】

いくつかの実施形態では、７日目および１４日目のＯＫＴ３およびＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、ＲＥＰの０日目および／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された最初の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【０７５７】

いくつかの実施形態では、７日目および１４日目のＯＫＴ３およびＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、ＲＥＰの０日目および／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された最初の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および１０００～６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および２０００～５０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および２０００～４０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗

体および２５００～３５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【０７５８】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬ対抗原提示フィーダー細胞の比は、約１対１０、約１対２５、約１対５０、約１対１００、約１対１２５、約１対１５０、約１対１７５、約１対２００、約１対２２５、約１対２５０、約１対２７５、約１対３００、約１対３２５、約１対３５０、約１対３７５、約１対４００、または約１対５００である。実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬ対抗原提示フィーダー細胞の比は、１対５０～１対３００の間である。実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬ対抗原提示フィーダー細胞の比は、１対１００～１対２００の間である。

【０７５９】

実施形態では、本明細書に記載の第２の急速拡張手順は、約５×１０^{8}フィーダー細胞対約１００×１０^{6}ＴＩＬの比を必要とする。実施形態では、本明細書に記載の第２の急速拡張手順は、約７．５×１０^{8}フィーダー細胞対約１００×１０^{6}ＴＩＬの比を必要とする。別の実施形態では、本明細書に記載の第２の急速拡張手順は、約５×１０^{8}フィーダー細胞対約５０×１０^{6}ＴＩＬの比を必要とする。別の実施形態では、本明細書に記載の第２の急速拡張手順は、約７．５×１０^{8}フィーダー細胞対約５０×１０^{6}ＴＩＬの比を必要とする。さらに別の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約５×１０^{8}フィーダー細胞対約２５×１０^{6}ＴＩＬを必要とする。さらに別の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約７．５×１０^{8}フィーダー細胞対約２５×１０^{6}ＴＩＬを必要とする。さらに別の実施形態では、第２の急速拡張は、第２の急速拡張の２倍の数のフィーダー細胞を必要とする。さらに別の実施形態では、本明細書に記載の第１のプライミング拡張が、約２．５×１０^{8}フィーダー細胞を必要とする場合、第２の急速拡張は、約５×１０^{8}フィーダー細胞を必要とする。さらに別の実施形態では、本明細書に記載の第１のプライミング拡張が、約２．５×１０^{8}フィーダー細胞を必要とする場合、第２の急速拡張は、約７．５×１０^{8}フィーダー細胞を必要とする。さらに別の実施形態では、第２の急速拡張は、第１のプライミング拡張の２倍（２．０Ｘ）、２．５Ｘ、３．０Ｘ、３．５Ｘ、または４．０Ｘのフィーダー細胞の数を必要とする。

【０７６０】

実施形態では、本明細書に記載の第２の急速拡張手順は、第２の急速拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者からの標準的な全血単位から得られる末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準的な方法を使用して得られる。実施形態では、人工抗原提示（ａＡＰＣ）細胞が、ＰＢＭＣの代わりに使用される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、第１のプライミング拡張に加えられたＰＢＭＣの２倍の濃度で、第２の急速拡張に加えられる。

【０７６１】

一般に、同種異系ＰＢＭＣは、照射または熱処理のいずれかによって不活化され、図および実施例に記載される例示的な手順を含む、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順で使用される。

【０７６２】

実施形態では、人工抗原提示細胞は、ＰＢＭＣの代替として、またはＰＢＭＣと組み合わせて、第２の急速拡張において使用される。

【０７６３】

２．サイトカイン

本明細書に記載の第２の急速拡張方法は、一般に、当該技術分野で知られているように、高用量のサイトカイン、特にＩＬ－２を含む培養培地を使用する。

【０７６４】
代替的に、ＷＯ２０１５／１８９３５６およびＷＯ２０１５／１８９３５７（参照によりそれらの全体が本明細書に明示的に組み込まれる）に一般に概説されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせで、ＴＩＬの第２の急速拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することもさらに可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２およびＩＬ－１５、ＩＬ－２およびＩＬ－２１、ＩＬ－１５およびＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１が含まれ、後者は多くの実施形態では特定の用途を見出す。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようなＴ細胞の生成に特に有利に働く。
【０７６５】
Ｅ．ステップＥ：ＴＩＬを採取する
第２の急速拡張ステップ後、細胞を採取することができる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に提供されるように、１、２、３、４、またはそれ以上の拡張ステップ後に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に提供されるように、２つの拡張ステップ後に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、２つの拡張ステップ、例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に提供されるように、１回の第１のプライミング拡張および１回の第２の急速拡張の後に採取される。
【０７６６】
ＴＩＬは、任意の適切かつ無菌的な方法で、例えば、遠心分離によって採取され得る。ＴＩＬ採取のための方法は、当該技術分野で周知であり、かかる既知の方法は、本プロセスで用いることができる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、自動化されたシステムを使用して採取される。
【０７６７】
細胞採取機および／または細胞処理システムは、例えば、Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ Ｋａｂｉ、Ｔｏｍｔｅｃ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ、およびＩｎｏｔｅｃｈ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃを含む様々な供給源から市販されている。任意の細胞ベースの採取機を、本方法で用いることができる。いくつかの実施形態では、細胞採取機および／または細胞処理システムは、膜ベースの細胞採取機である。いくつかの実施形態では、細胞採取は、ＬＯＶＯシステム（Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ Ｋａｂｉによって製造された）などの細胞処理システムを介して行われる。「ＬＯＶＯ細胞処理システム」という用語はまた、細胞を含む溶液を、無菌および／または閉鎖系環境において、紡糸膜または紡糸フィルターなどの膜またはフィルターを通してポンプ輸送し、ペレット化せずに上清または細胞培養培地を除去するための連続フローおよび細胞処理を可能にする、任意のベンダーによって製造された任意の機器または装置を指す。いくつかの実施形態では、細胞採取機および／または細胞処理システムは、閉鎖された無菌システムにおいて、細胞分離、洗浄、流体交換、濃縮、および／または他の細胞処理ステップを行うことができる。
【０７６８】
いくつかの実施形態では、第２の急速拡張、例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）によるステップＤは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、ＴＩＬ拡張のために閉鎖系が用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターは、容器として用いられる。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００またはＧ－ＲＥＸ－５００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－５００である。
【０７６９】
いくつかの実施形態では、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）によるス

テップＥは、本明細書に記載のプロセスに従って行われる。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、システムの無菌性および閉鎖性を維持するために、無菌条件下で注射器を介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるような閉鎖系が用いられる。

【０７７０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の方法に従って採取される。いくつかの実施形態では、１４～１６日目の間のＴＩＬは、本明細書に記載の方法を使用して採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の方法を使用して１４日で採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の方法を使用して１５日で採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の方法を使用して１６日で採取される。

【０７７１】

Ｆ．ステップＦ：最終製剤／注入バッグへの移行

図８（特に、例えば図８Ｂ）に例示的な順序で提供され、上記および本明細書に詳細に概説されるステップＡ～Ｅが完了した後、細胞は、患者への投与に使用するために容器に移される。いくつかの実施形態では、治療上十分な数のＴＩＬが上記の拡張方法を使用して得られると、それらは、患者への投与に使用するために容器に移される。

【０７７２】

実施形態では、本開示の方法を使用して拡張されたＴＩＬは、薬学的組成物として患者に投与される。実施形態では、薬学的組成物は、無菌緩衝液中のＴＩＬの懸濁液である。本明細書に開示されるように拡張されたＴＩＬは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与することができる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、単一の動脈内または静脈内注入として投与され、これは好ましくは、およそ３０～６０分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、およびリンパ内が含まれる。

【０７７３】

Ｇ．ＰＢＭＣフィーダー細胞比

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用される培地（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）を参照）は、抗ＣＤ３抗体、例えばＯＫＴ－３を含む。ＩＬ－２と組み合わせた抗ＣＤ３抗体は、ＴＩＬ集団のＴ細胞活性化および細胞分裂を誘導する。この効果は、完全長抗体、ＦａｂおよびＦ（ａｂ′）２断片で見られ、前者が一般的に好まれる。例えば、Ｔｓｏｕｋａｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９８５，１３５，１７１９（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【０７７４】

実施形態では、ＰＢＭＣフィーダー層の数は、以下のように計算される：

Ａ．Ｔ細胞（１０μｍ直径）の体積：Ｖ＝（４／３）πr^3＝５２３．６μm^3

Ｂ．４０μｍ（４細胞）の高さを有するＧ－Ｒｅｘ　１００（Ｍ）のカラム：Ｖ＝（４／３）πr^3＝４×$10^{12}$$\mu m^3$

Ｃ．カラムＢを充填するために必要な細胞数：４×$10^{12}$$\mu m^3$／５２３．６$\mu m^3$＝７．６×$10^8$$\mu m^3$＊０．６４＝４．８６×$10^8$

Ｄ．４Ｄ空間で最適に活性化され得る細胞数：４．８６×10^8／２４＝２０．２５×10^6

Ｅ．Ｇ－Ｒｅｘ　５００に外挿されたフィーダーおよびＴＩＬの数：ＴＩＬ：１００×10^6およびフィーダー：２．５×10^9

この計算では、１００cm^2塩基を含む注射器中のＴＩＬの活性化のための二十面体の幾何学的形状を提供するために必要な単核細胞の数の近似値が使用される。計算は、ＮＣＩ実験データを密接に反映するＴ細胞の閾値活性化のための約５×10^8の実験結果を導出する。[1]（Ｃ）乗数（０．６４）は、１９９２年にＪａｅｇｅｒおよびＮａｇｅｌによって計算された等価球のランダムパッキング密度である[2]。（Ｄ）除数２４は、４次元空間内の同様のオブジェクトに接触する可能性のある等価球の数「ニュートン数」である

。(3)。

(1) Jin, Jianjian, et. al., Simplified Method of the Growth of Human Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) in Gas-Permeable Flasks to Numbers Needed for Patient Treatment. J Immunother. 2012 Apr;35(3):283-292。
(2) Jaeger HM, Nagel SR. Physics of the granular state. Science. 1992 Mar 20;255(5051):1523-31。
(3) O. R. Musin (2003). "The problem of the twenty-five spheres". Russ. Math. Surv. 58(4):794-795。

【0775】

実施形態では、第１のプライミング拡張中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞の数は、第２の急速拡張中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞の数のおよそ半分である。特定の実施形態では、この方法は、第２の急速拡張の細胞培養培地と比較しておよそ５０％少ない抗原提示細胞を含む細胞培養培地中で、第１のプライミング拡張を行うことを含む。

【0776】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）の数は、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数よりも多い。

【0777】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約１．１：１～約２０：１の範囲から選択される。

【0778】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約１．１：１～約１０：１の範囲から選択される。

【0779】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約１．１：１～約９：１の範囲から選択される。

【0780】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約１．１：１～約８：１の範囲から選択される。

【0781】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約１．１：１～約７：１の範囲から選択される。

【0782】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約１．１：１～約６：１の範囲から選択される。

【0783】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約１．１：１～約５：１の範囲から選択される。

【0784】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約１．１：１～約４：１の範囲から選択される。

【０７８５】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約１．１：１から約３：１の範囲から選択される。

【０７８６】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約１．１：１～約２．９：１の範囲から選択される。

【０７８７】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約１．１：１～約２．８：１の範囲から選択される。

【０７８８】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約１．１：１～約２．７：１の範囲から選択される。

【０７８９】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約１．１：１～約２．６：１の範囲から選択される。

【０７９０】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約１．１：１～約２．５：１の範囲から選択される。

【０７９１】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約１．１：１～約２．４：１の範囲から選択される。

【０７９２】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約１．１：１～約２．３：１の範囲から選択される。

【０７９３】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約１．１：１～約２．２：１の範囲から選択される。

【０７９４】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約１．１：１～約２．１：１の範囲から選択される。

【０７９５】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約１．１：１～約２：１の範囲から選択される。

【０７９６】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約２：１～約１０：１の範囲

から選択される。

【０７９７】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約２：１～約５：１の範囲から選択される。

【０７９８】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約２：１～約４：１の範囲から選択される。

【０７９９】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約２：１～約３：１の範囲から選択される。

【０８００】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約２：１～約２．９：１の範囲から選択される。

【０８０１】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約２：１～約２．８：１の範囲から選択される。

【０８０２】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約２：１～約２．７：１の範囲から選択される。

【０８０３】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約２：１～約２．６：１の範囲から選択される。

【０８０４】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約２：１～約２．５：１の範囲から選択される。

【０８０５】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約２：１～約２．４：１の範囲から選択される。

【０８０６】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約２：１～約２．３：１の範囲から選択される。

【０８０７】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約２：１から約２．２：１の範囲から選択される。

【０８０８】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約２：１～約２．１：１の範囲から選択される。

【０８０９】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約２：１である。

【０８１０】

別の実施形態では、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数と、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数との比は、約１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．１：１、２．２：１、２．３：１、２．４：１、２．５：１、２．６：１、２．７：１、２．８：１、２．９：１、３：１、３．１：１、３．２：１、３．３：１、３．４：１、３．５：１、３．６：１、３．７：１、３．８：１、３．９：１、４：１、４．１：１、４．２：１、４．３：１、４．４：１、４．５：１、４．６：１、４．７：１、４．８：１、４．９：１、または５：１である。

【０８１１】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、約1×10^{8}、1.1×10^{8}、1.2×10^{8}、1.3×10^{8}、1.4×10^{8}、1.5×10^{8}、1.6×10^{8}、1.7×10^{8}、1.8×10^{8}、1.9×10^{8}、2×10^{8}、2.1×10^{8}、2.2×10^{8}、2.3×10^{8}、2.4×10^{8}、2.5×10^{8}、2.6×10^{8}、2.7×10^{8}、2.8×10^{8}、2.9×10^{8}、3×10^{8}、3.1×10^{8}、3.2×10^{8}、3.3×10^{8}、3.4×10^{8}、または3.5×10^{8}ＡＰＣであり、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、約3.5×10^{8}、3.6×10^{8}、3.7×10^{8}、3.8×10^{8}、3.9×10^{8}、4×10^{8}、4.1×10^{8}、4.2×10^{8}、4.3×10^{8}、4.4×10^{8}、4.5×10^{8}、4.6×10^{8}、4.7×10^{8}、4.8×10^{8}、4.9×10^{8}、5×10^{8}、5.1×10^{8}、5.2×10^{8}、5.3×10^{8}、5.4×10^{8}、5.5×10^{8}、5.6×10^{8}、5.7×10^{8}、5.8×10^{8}、5.9×10^{8}、6×10^{8}、6.1×10^{8}、6.2×10^{8}、6.3×10^{8}、6.4×10^{8}、6.5×10^{8}、6.6×10^{8}、6.7×10^{8}、6.8×10^{8}、6.9×10^{8}、7×10^{8}、7.1×10^{8}、7.2×10^{8}、7.3×10^{8}、7.4×10^{8}、7.5×10^{8}、7.6×10^{8}、7.7×10^{8}、7.8×10^{8}、7.9×10^{8}、8×10^{8}、8.1×10^{8}、8.2×10^{8}、8.3×10^{8}、8.4×10^{8}、8.5×10^{8}、8.6×10^{8}、8.7×10^{8}、8.8×10^{8}、8.9×10^{8}、9×10^{8}、9.1×10^{8}、9.2×10^{8}、9.3×10^{8}、9.4×10^{8}、9.5×10^{8}、9.6×10^{8}、9.7×10^{8}、9.8×10^{8}、9.8×10^{8}または1×10^{9}ＡＰＣである。

【０８１２】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、約1.5×10^{8}ＡＰＣ～約3×10^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、約4×10^{8}ＡＰＣ～約7.5×10^{8}ＡＰＣの範囲から選択される。

【０８１３】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、約2×10^{8}ＡＰＣ～約2.5×10^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、約4.5×10^{8}ＡＰＣ～約5.5×10^{8}ＡＰＣの範囲から選択される。

【０８１４】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、約2.5×10^{8}ＡＰＣであり、第２の急速拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、約5×10^{8}ＡＰＣである。

【０８１５】

実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目に添加されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、第１のプライミング拡張の７日目（例えば、方法の７日目）に添加されるＰＢＭＣの数のおよそ半分である。特定の実施形態では、この方法は、第１のプライ

ミング拡張の０日目に抗原提示細胞を第１のＴＩＬ集団に添加することと、７日目に抗原提示細胞を第２のＴＩＬ集団に添加することとを含み、０日目に添加される抗原提示細胞の数は、第１のプライミング拡張の７日目（例えば、方法の７日目）に添加される抗原提示細胞の数のおよそ５０％である。

【０８１６】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数よりも多い。

【０８１７】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、約１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【０８１８】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【０８１９】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、約２×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約３×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【０８２０】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、約２×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。

【０８２１】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、約１．０×１０^{6}、１．１×１０^{6}、１．２×１０^{6}、１．３×１０^{6}、１．４×１０^{6}、１．５×１０^{6}、１．６×１０^{6}、１．７×１０^{6}、１．８×１０^{6}、１．９×１０^{6}、２×１０^{6}、２．１×１０^{6}、２．２×１０^{6}、２．３×１０^{6}、２．４×１０^{6}、２．５×１０^{6}、２．６×１０^{6}、２．７×１０^{6}、２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}、３×１０^{6}、３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}、４×１０^{6}、４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}、または４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。

【０８２２】

別の実施形態では、第２の急速拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【０８２３】

別の実施形態では、第２の急速拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約６．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【０８２４】

別の実施形態では、第２の急速拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【０８２５】

別の実施形態では、第２の急速拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【０８２６】

別の実施形態では、第２の急速拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、約２．５×

10^6ＡＰＣ／ｃｍ^2、２．６×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^2、２．７×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^2、２．８×10^6、２．９×10^6、３×10^6、３．１×10^6、３．２×10^6、３．３×10^6、３．４×10^6、３．５×10^6、３．６×10^6、３．７×10^6、３．８×10^6、３．９×10^6、４×10^6、４．１×10^6、４．２×10^6、４．３×10^6、４．４×10^6、４．５×10^6、４．６×10^6、４．７×10^6、４．８×10^6、４．９×10^6、５×10^6、５．１×10^6、５．２×10^6、５．３×10^6、５．４×10^6、５．５×10^6、５．６×10^6、５．７×10^6、５．８×10^6、５．９×10^6、６×10^6、６．１×10^6、６．２×10^6、６．３×10^6、６．４×10^6、６．５×10^6、６．６×10^6、６．７×10^6、６．８×10^6、６．９×10^6、７×10^6、７．１×10^6、７．２×10^6、７．３×10^6、７．４×10^6、または７．５×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。

【０８２７】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、約１．０×10^6、１．１×10^6、１．２×10^6、１．３×10^6、１．４×10^6、１．５×10^6、１．６×10^6、１．７×10^6、１．８×10^6、１．９×10^6、２×10^6、２．１×10^6、２．２×10^6、２．３×10^6、２．４×10^6、２．５×10^6、２．６×10^6、２．７×10^6、２．８×10^6、２．９×10^6、３×10^6、３．１×10^6、３．２×10^6、３．３×10^6、３．４×10^6、３．５×10^6、３．６×10^6、３．７×10^6、３．８×10^6、３．９×10^6、４×10^6、４．１×10^6、４．２×10^6、４．３×10^6、４．４×10^6、または４．５×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種され、第２の急速拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、約２．５×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^2、２．６×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^2、２．７×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^2、２．８×10^6、２．９×10^6、３×10^6、３．１×10^6、３．２×10^6、３．３×10^6、３．４×10^6、３．５×10^6、３．６×10^6、３．７×10^6、３．８×10^6、３．９×10^6、４×10^6、４．１×10^6、４．２×10^6、４．３×10^6、４．４×10^6、４．５×10^6、４．６×10^6、４．７×10^6、４．８×10^6、４．９×10^6、５×10^6、５．１×10^6、５．２×10^6、５．３×10^6、５．４×10^6、５．５×10^6、５．６×10^6、５．７×10^6、５．８×10^6、５．９×10^6、６×10^6、６．１×10^6、６．２×10^6、６．３×10^6、６．４×10^6、６．５×10^6、６．６×10^6、６．７×10^6、６．８×10^6、６．９×10^6、７×10^6、７．１×10^6、７．２×10^6、７．３×10^6、７．４×10^6、または７．５×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。

【０８２８】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、約１．０×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^2～約４．５×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、第２の急速拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、約２．５×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^2～約７．５×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【０８２９】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、約１．５×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^2～約３．５×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、第２の急速拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、約３．５×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^2～約６×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【０８３０】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、約２×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^2～約３×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、第２の急速拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、約４×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^2～約５．５×10^6ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【０８３１】
別の実施形態では、第１のプライミング拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、約２×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種され、第２の急速拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、約４×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。
【０８３２】
別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数との比は、約１．１：１～約２０：１の範囲から選択される。
【０８３３】
別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数との比は、約１．１：１～約１０：１の範囲から選択される。
【０８３４】
別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数との比は、約１．１：１～約９：１の範囲から選択される。
【０８３５】
別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約１．１：１～約８：１の範囲から選択される。
【０８３６】
別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約１．１：１～約７：１の範囲から選択される。
【０８３７】
別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約１．１：１～約６：１の範囲から選択される。
【０８３８】
別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約１．１：１～約５：１の範囲から選択される。
【０８３９】
別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約１．１：１～約４：１の範囲から選択される。
【０８４０】
別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約１．１：１～約３：１の範囲から選択される。
【０８４１】
別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約１．１：１～約２．９：１の範囲から選択される。
【０８４２】
別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約１．１：１～約２．８：１の範囲から選択さ

れる。

【０８４３】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約１．１：１～約２．７：１の範囲から選択される。

【０８４４】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約１．１：１～約２．６：１の範囲から選択される。

【０８４５】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約１．１：１～約２．５：１の範囲から選択される。

【０８４６】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約１．１：１～約２．４：１の範囲から選択される。

【０８４７】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約１．１：１～約２．３：１の範囲から選択される。

【０８４８】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約１．１：１～約２．２：１の範囲から選択される。

【０８４９】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約１．１：１～約２．１：１の範囲から選択される。

【０８５０】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約１．１：１～約２：１の範囲から選択される。

【０８５１】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約２：１～約１０：１の範囲から選択される。

【０８５２】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約２：１～約５：１の範囲から選択される。

【０８５３】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、Ｐ

ＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約２：１～約４：１の範囲から選択される。

【０８５４】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約２：１～約３：１の範囲から選択される。

【０８５５】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約２：１～約２．９：１の範囲から選択される。

【０８５６】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約２：１～約２．８：１の範囲から選択される。

【０８５７】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約２：１～約２．７：１の範囲から選択される。

【０８５８】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約２：１～約２．６：１の範囲から選択される。

【０８５９】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約２：１～約２．５：１の範囲から選択される。

【０８６０】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約２：１～約２．４：１の範囲から選択される。

【０８６１】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約２：１～約２．３：１の範囲から選択される。

【０８６２】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約２：１～約２．２：１の範囲から選択される。

【０８６３】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約２：１～約２．１：１の範囲から選択される。

【０８６４】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約２：１である。

【０８６５】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、約１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．

４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．１：１、２．２：１、２．３：１、２．４：１、２．５：１、２．６：１、２．７：１、２．８：１、２．９：１、３：１、３．１：１、３．２：１、３．３：１、３．４：１、３．５：１、３．６：１、３．７：１、３．８：１、３．９：１、４：１、４．１：１、４．２：１、４．３：１、４．４：１、４．５：１、４．６：１、４．７：１、４．８：１、４．９：１、または５：１である。

【０８６６】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、約1×10^{8}、1.1×10^{8}、1.2×10^{8}、1.3×10^{8}、1.4×10^{8}、1.5×10^{8}、1.6×10^{8}、1.7×10^{8}、1.8×10^{8}、1.9×10^{8}、2×10^{8}、2.1×10^{8}、2.2×10^{8}、2.3×10^{8}、2.4×10^{8}、2.5×10^{8}、2.6×10^{8}、2.7×10^{8}、2.8×10^{8}、2.9×10^{8}、3×10^{8}、3.1×10^{8}、3.2×10^{8}、3.3×10^{8}、3.4×10^{8}、または3.5×10^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）であり、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、約3.5×10^{8}、3.6×10^{8}、3.7×10^{8}、3.8×10^{8}、3.9×10^{8}、4×10^{8}、4.1×10^{8}、4.2×10^{8}、4.3×10^{8}、4.4×10^{8}、4.5×10^{8}、4.6×10^{8}、4.7×10^{8}、4.8×10^{8}、4.9×10^{8}、5×10^{8}、5.1×10^{8}、5.2×10^{8}、5.3×10^{8}、5.4×10^{8}、5.5×10^{8}、5.6×10^{8}、5.7×10^{8}、5.8×10^{8}、5.9×10^{8}、6×10^{8}、6.1×10^{8}、6.2×10^{8}、6.3×10^{8}、6.4×10^{8}、6.5×10^{8}、6.6×10^{8}、6.7×10^{8}、6.8×10^{8}、6.9×10^{8}、7×10^{8}、7.1×10^{8}、7.2×10^{8}、7.3×10^{8}、7.4×10^{8}、7.5×10^{8}、7.6×10^{8}、7.7×10^{8}、7.8×10^{8}、7.9×10^{8}、8×10^{8}、8.1×10^{8}、8.2×10^{8}、8.3×10^{8}、8.4×10^{8}、8.5×10^{8}、8.6×10^{8}、8.7×10^{8}、8.8×10^{8}、8.9×10^{8}、9×10^{8}、9.1×10^{8}、9.2×10^{8}、9.3×10^{8}、9.4×10^{8}、9.5×10^{8}、9.6×10^{8}、9.7×10^{8}、9.8×10^{8}、9.9×10^{8}、または1×10^{9}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）である。

【０８６７】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、約1×10^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～約3.5×10^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択され、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、約3.5×10^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～約1×10^{9}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択される。

【０８６８】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、約1.5×10^{8}ＡＰＣ～約3×10^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択され、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、約4×10^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～約7.5×10^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択される。

【０８６９】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、約2×10^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～約2.5×10^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択され、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、約4.5×10^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～約5.5×10^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択される。

【０８７０】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例

えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、約２．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）であり、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、約５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）である。

【０８７１】

実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目に添加されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の層の数は、第２の急速拡張の７日目に添加されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の層の数のおよそ半分である。特定の実施形態では、この方法は、第１のプライミング拡張の０日目に抗原提示細胞層を第１のＴＩＬ集団に添加することと、７日目に抗原提示細胞を第２のＴＩＬ集団に添加することとを含み、０日目に添加される抗原提示細胞層の数は、７日目に添加される抗原提示細胞層の数のおよそ５０％である。

【０８７２】

別の実施形態では、第２の急速拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の層の数は、第１のプライミング拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の層の数よりも多い。

【０８７３】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、約４細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【０８７４】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、約１細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、約３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【０８７５】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、約１．５細胞層～約２．５細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、約３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【０８７６】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、平均厚さが約１細胞層である層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、平均厚さが約２細胞層である層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【０８７７】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、約３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６、３．７、３．８、３．９、４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【０８７８】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、約１細胞層～約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、約３細胞層～約１０細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【０８７９】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、約２細胞層～約３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、約４細胞層～約８細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【０８８０】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、約４細胞層～約８細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【０８８１】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、約１、２、または３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【０８８２】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数とＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数との比は、約１：１．１～約１：１０の範囲から選択される。

【０８８３】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数とＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数との比は、約１：１．１～約１：８の範囲から選択される。

【０８８４】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数とＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数との比は、約１：１．１～約１：７の範囲から選択される。

【０８８５】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数とＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数との比は、約１：１．１～約１：６の範囲から選択される。

【０８８６】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む

）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数とＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数との比は、約１：１．１～約１：５の範囲から選択される。

【０８８７】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数とＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数との比は、約１：１．１～約１：４の範囲から選択される。

【０８８８】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数とＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数との比は、約１：１．１～約１：３の範囲から選択される。

【０８８９】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数とＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数との比は、約１：１．１～約１：２の範囲から選択される。

【０８９０】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数とＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数との比は、約１：１．２～約１：８の範囲から選択される。

【０８９１】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数とＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数との比は、約１：１．３～約１：７の範囲から選択される。

【０８９２】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数とＡＰＣ（例え

ば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数との比は、約１：１．４～約１：６の範囲から選択される。

【０８９３】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数とＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数との比は、約１：１．５～約１：５の範囲から選択される。

【０８９４】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数とＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数との比は、約１：１．６～約１：４の範囲から選択される。

【０８９５】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第３．５の急速拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数とＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数との比は、約１：１．７～約１：３．５の範囲から選択される。

【０８９６】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数とＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数との比は、約１：１．８～約１：３の範囲から選択される。

【０８９７】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数とＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数との比は、約１：１．９～約１：２．５の範囲から選択される。

【０８９８】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数とＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数との比は、約１：２である。

【０８９９】

別の実施形態では、第１のプライミング拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第２の急速拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数とＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数との比は、約１：１．１、１：１．２、１：１．３、１：１．４、１：１．５、１：１．６、１：１．７、１：１．８、１：１．９、１：２、１：２．１、１：２．２、１：２．３、１：２．４、１：２．５、１：２．６、１：２．７、１：２．８、１：２．９、１：３、１：３．１、１：３．２、１：３．３、１：３．４、１：３．５、１：３．６、１：３．７、１：３．８、１：３．９、１：４、１：４．１、１：４．２、１：４．３、１：４．４、１：４．５、１：４．６、１：４．７、１：４．８、１：４．９、１：５、１：５．１、１：５．２、１：５．３、１：５．４、１：５．５、１：５．６、１：５．７、１：５．８、１：５．９、１：６、１：６．１、１：６．２、１：６．３、１：６．４、１：６．５、１：６．６、１：６．７、１：６．８、１：６．９、１：７、１：７．１、１：７．２、１：７．３、１：７．４、１：７．５、１：７．６、１：７．７、１：７．８、１：７．９、１：８、１：８．１、１：８．２、１：８．３、１：８．４、１：８．５、１：８．６、１：８．７、１：８．８、１：８．９、１：９、１：９．１、１：９．２、１：９．３、１：９．４、１：９．５、１：９．６、１：９．７、１：９．８、１：９．９、または１：１０から選択される。

【０９００】

いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張におけるＡＰＣの数は、約１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択され、第２の急速拡張におけるＡＰＣの数は、約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される。

【０９０１】

いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張におけるＡＰＣの数は、約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択され、第２の急速拡張におけるＡＰＣの数は、約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約６．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される。

【０９０２】

いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張におけるＡＰＣの数は、約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約３．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択され、第２の急速拡張におけるＡＰＣの数は、約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される。

【０９０３】

Ｈ．任意の細胞培地成分

１．抗ＣＤ３抗体

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用される培地（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂ）を参照）は、抗ＣＤ３抗体を含む。ＩＬ－２と組み合わせた抗ＣＤ３抗体は、ＴＩＬ集団のＴ細胞活性化および細胞分裂を誘導する。この効果は、完全長抗体、ＦａｂおよびＦ（ａｂ′）２断片で見られ、前者が一般的に好まれる。例えば、Ｔｓｏｕｋａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９８５，１３５，１７１９（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【０９０４】

当業者によって理解されるように、マウス、ヒト、霊長類、ラット、およびイヌ抗体を含むがこれらに限定されない様々な哺乳動物からの抗ヒトＣＤ３ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を含む、本発明での使用が見出されるいくつかの好適な抗ヒトＣＤ３抗体が存在する。特定の実施形態では、ＯＫＴ３抗ＣＤ３抗体が使用される（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ，Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪまたはＭｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡから市販されている）。

【表２３】

表２１：ムロモナブのアミノ酸配列（例示的なＯＫＴ－３抗体）

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

【０９０５】

２．４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）アゴニスト

実施形態では、第１のプライミング拡張および／または第２の急速拡張の細胞培養培地は、ＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）アゴニストである。４－１ＢＢアゴニストは、当該技術分野で知られている任意の４－１ＢＢ結合分子であり得る。４－１ＢＢ結合分子は、ヒトまたは哺乳動物の４－１ＢＢに結合することができるモノクローナル抗体または融合タンパク質であり得る。４－１ＢＢアゴニストまたは４－１ＢＢ結合分子は、任意のアイソタイプ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、およびＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、およびＩｇＡ２）またはサブクラスの免疫グロブリン分子の免疫グロブリン重鎖を含み得る。４－１ＢＢアゴニストまたは４－１ＢＢ結合分子は、重鎖および軽鎖の両方を有し得る。本明細書で使用される場合、結合分子という用語はまた、抗体（完全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、および抗体断片、例えば、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ′）断片、Ｆａｂ発現ライブラリーによって産生された断片、上記のうちのいずれかのエピトープ結合断片、ならびに４－１ＢＢに結合する操作された形態の抗体、例えば、ｓｃＦｖ分子を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、完全なヒト抗体である抗原結合タンパク質である。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ヒト化抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ここに開示される方法および組成物において使用するための４－１ＢＢアゴニストには、抗４－１ＢＢ抗体、ヒト抗４－１ＢＢ抗体、マウス抗４－１ＢＢ抗体、哺乳動物抗４－１ＢＢ抗体、モノクローナル抗４－１ＢＢ抗体、ポリクローナル抗４－１ＢＢ抗体、キメラ抗４－１ＢＢ抗体、抗４－１ＢＢアドネクチン、抗４－１ＢＢドメイン抗体、一本鎖抗４－１ＢＢ断片、重鎖抗４－１ＢＢ断片、軽鎖抗４－１ＢＢ断片、抗４－１ＢＢ融合タンパク質、およびそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、多様体、またはバイオシミラーが含まれる。アゴニスト抗４－１ＢＢ抗体は、強力な免疫応答を誘導することが知られている。Ｌｅｅ，ｅｔ　ａｌ．，ＰＬＯＳ　Ｏｎｅ　２０１３，８，ｅ６９６７７。好ましい実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、アゴニスト、抗４－１ＢＢヒト化、または完全ヒトモノクローナル抗体（すなわち、単一の細胞株に由来する抗体）である。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＥＵ－１０１（Ｅｕｔｉｌｅｘ　Ｃｏ．Ｌｔｄ．）、ウトミルマブ、もしくはウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、多様体、もしくはバイオシミラーである。好ましい実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブもしくはウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、多様体、もしくはバイオシミラーである。

【０９０６】

好ましい実施形態では、４－１ＢＢアゴニストまたは４－１ＢＢ結合分子はまた、融合

タンパク質であり得る。好ましい実施形態では、三量体または六量体４－１ＢＢアゴニスト（３つまたは６つのリガンド結合ドメインを有する）などの多量体４－１ＢＢアゴニストは、典型的に２つのリガンド結合ドメインを有するアゴニストモノクローナル抗体と比較して、優れた受容体（４－１ＢＢＬ）クラスター化および内部細胞シグナル伝達複合体形成を誘導し得る。３つのＴＮＦＲＳＦ結合ドメインおよびＩｇＧ１－Ｆｃを含み、任意にこれらの融合タンパク質のうちの２つ以上をさらに結合する三量体（三価）または六量体（もしくは六価）またはそれ以上の融合タンパク質は、例えば、Ｇｉｅｆｆｅｒｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ２０１３，１２，２７３５－４７に記載されている。

【０９０７】

アゴニスト４－１ＢＢ抗体および融合タンパク質は、強い免疫応答を誘導することが知られている。好ましい実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、毒性を低減するのに十分な方法で４－１ＢＢ抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、抗体依存性細胞毒性（ＡＤＣＣ）、例えば、ＮＫ細胞細胞傷害を無効にするアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）を無効にするアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を無効にするアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、Ｆｃ領域機能性を無効にするアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。

【０９０８】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ヒト４－１ＢＢ（配列番号９）に高い親和性およびアゴニスト活性で結合することを特徴とする。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ヒト４－１ＢＢ（配列番号９）に結合する結合分子である。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、マウス４－１ＢＢ（配列番号１０）に結合する結合分子である。４－１ＢＢアゴニストまたは結合分子が結合する４－１ＢＢ抗原のアミノ酸配列を表２２に要約する。

【表２４】

表２２．４－１ＢＢ抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号９ ヒト4-1BB、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー9（ホモサピエンス）	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRFPEEEE GGCEL 255
配列番号10 マウス4-1BB、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー9（ハツカネズミ）	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 60 CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG 180 GHSLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKTT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGGYEL 256

【０９０９】
いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、および方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１００ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約７０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約６０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約５０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約４０ｐＭ以下のK_Dで結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約３０ｐＭ以下のK_Dで結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０９１０】
いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、および方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約7.5×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約7.5×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約8×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約8.5×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約9×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約9.5×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約1×10^{6}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０９１１】
いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、および方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約2×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約2.1×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約2.2×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約2.3×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約2.4×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約2.5×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約2.6×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約2.7×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約2.8×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約2.9×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約3×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０９１２】
いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、および方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１０ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約７ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約６ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約５ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約４ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約３ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０９１３】
好ましい実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＰＦ－０５０８２５６６もしくはＭＯＲ－７４８０としても知られるウトミルマブ、またはそれらの断片、誘導体、多様体、もしくはバイオシミラーである。ウトミルマブは、Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．から入手可能である。ウトミルマブは、免疫グロブリンＧ２－λ、抗［ホモサピエンスＴＮＦＲＳＦ９（腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーメンバー９、４－１ＢＢ、Ｔ細胞

抗原ＩＬＡ、ＣＤ１３７）］、ホモサピエンス（完全ヒト）モノクローナル抗体である。ウトミルマブのアミノ酸配列を表７に示す。ウトミルマブは、Ａｓｎ５９およびＡｓｎ２９２におけるグリコシル化部位、２２－９６位（V_H－V_L）、１４３－１９９位（C_H1－C_L）、２５６－３１６位（C_H2）、および３６２－４２０位（C_H3）における重鎖鎖内ジスルフィド架橋；２２′－８７′位（V_H－V_L）および１３６′－１９５′位（C_H1－C_L）における軽鎖鎖内ジスルフィド架橋；ＩｇＧ２Ａアイソフォーム２１８－２１８、２１９－２１９、２２２－２２２、および２２５－２２５位、ＩｇＧ２Ａ／Ｂアイソフォーム２１８－１３０、２１９－２１９、２２２－２２２、および２２５－２２５位における鎖間重鎖－重鎖ジスルフィド架橋；ならびにＩｇＧ２Ａアイソフォーム１３０－２１３′（２）位、ＩｇＧ２Ａ／Ｂアイソフォーム２１８－２１３′位および１３０－２１３′位、ならびにＩｇＧ２Ｂアイソフォーム２１８－２１３′（２）位における鎖間重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウトミルマブならびにその多様体および断片の調製および特性は、米国特許第８，８２１，８６７号、同第８，３３７，８５０号、および同第９，４６８，６７８号、ならびに国際特許出願公開第ＷＯ２０１２／０３２４３３Ａ１（これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。ウトミルマブの前臨床特徴は、Ｆｉｓｈｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇ．＆Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１２，６１，１７２１－３３に記載されている。様々な血液学的および固形腫瘍の適応症におけるウトミルマブの現在の臨床試験には、アメリカ国立衛生研究所のｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０２４４４７９３、ＮＣＴ０１３０７２６７、ＮＣＴ０２３１５０６６、およびＮＣＴ０２５５４８１２が含まれる。

【０９１４】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、配列番号１１によって与えられる重鎖および配列番号１２によって与えられる軽鎖を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号１１および配列番号１２に示される配列を有する重鎖および軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、多様体、もしくはコンジュゲートを含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１および配列番号１２に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１および配列番号１２に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１および配列番号１２に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１および配列番号１２に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１および配列番号１２に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖および軽鎖を含む。

【０９１５】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブの重鎖および軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１３に示される配列を含み、４－１ＢＢアゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１４に示される配列、およびその保存的アミノ酸置換を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１３および配列番号１４に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１３および配列番号１４に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１３および配列番号１４に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１３および配列番号１４に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１３および配列番号１４に示される配列と少なくとも９５％同

一であるＶ$_H$およびＶ$_L$領域を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、配列番号１３および配列番号１４に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶ$_H$およびＶ$_L$領域を含む、ｓｃＦｖ抗体を含む。

【０９１６】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号１５、配列番号１６、および配列番号１７に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１８、配列番号１９、および配列番号２０に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【０９１７】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブに関して薬物規制当局によって承認された４－１ＢＢアゴニストのバイオシミラーモノクローナル抗体である。実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、４－１ＢＢ抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、および切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された４－１ＢＢアゴニスト抗体であり、４－１ＢＢアゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。４－１ＢＢアゴニスト抗体は、米国ＦＤＡおよび／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。

【表２５】

表２３．ウトミルマブに関連する４－１ＢＢアゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 11　ウトミルマブの重鎖	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTNY 60 SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK 120 GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS 180 LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP 240 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV 300 LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL 360 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC 420 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G 441
配列番号 12　ウトミルマブの軽鎖	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF 120 PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL 180 SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS 214
配列番号 13　ウトミルマブの重鎖可変領域	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN 60 YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS 118
配列番号 14　ウトミルマブの軽鎖可変領域	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL 108
配列番号 15　ウトミルマブの重鎖 CDR1	STYWIS 6
配列番号 16　ウトミルマブの重鎖 CDR2	KIYPGDSYTN YSPSFQG 17
配列番号 17　ウトミルマブの重鎖 CDR3	RGYGIFDY 8
配列番号 18　ウトミルマブ用軽鎖 CDR1	SGDNIGDQYA H 11
配列番号 19　ウトミルマブ用軽鎖 CDR2	QDKNRPS 7
配列番号 20　ウトミルマブ用軽鎖 CDR3	ATYTGFGSLA V 11

【０９１８】

好ましい実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＢＭＳ－６６３５１３および２０Ｈ４．９．ｈ４ａとしても知られるモノクローナル抗体ウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、多様体、もしくはバイオシミラーである。ウレルマブは、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ，Ｉｎｃ．およびＣｒｅａｔｉｖｅ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｉｎｃ．から入手可能である。ウレルマブは、免疫グロブリンＧ４－κ、抗［ホモサピエンスＴＮＦＲＳＦ９（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー９、４－１ＢＢ、Ｔ細胞抗原ＩＬＡ、ＣＤ１３７）］、ホモサピエンス（完全ヒト）モノクローナル抗体である。ウレルマブのアミノ酸配列を表ＥＥに示す。ウレルマブは、２９８位（および２９８′′）にお

けるＮ－グリコシル化部位；２２－９５位（V_H－V_L）、１４８－２０４位（C_H1－C_L）、２６２－３２２位（C_H2）、および３６８－４２６位（C_H3）（２２′′－９５′′、１４８′′－２０４′′、２６２′′－３２２′′、および３６８′′－４２６′′位）における重鎖鎖内ジスルフィド架橋；２３′－８８′位（V_H－V_L）および１３６′－１９６′位（C_H1－C_L）（２３′′′－８８′′′および１３６′′′－１９６′′′位）における軽鎖鎖内ジスルフィド架橋；ならびに１３５－２１６′および１３５′′－２１６′′′における鎖間重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウレルマブならびにその多様体および断片の調製および特性は、米国特許第７，２８８，６３８号および第８，９６２，８０４号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ウレルマブの前臨床および臨床特徴は、Ｓｅｇａｌ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１６に記載されており、ｈｔｔｐ：／ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１５８／１０７８－０４３２．ＣＣＲ－１６－１２７２において入手可能である。様々な血液学的および固形腫瘍の適応症におけるウレルマブの現在の臨床試験には、アメリカ国立衛生研究所のｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０１７７５６３１、ＮＣＴ０２１１００８２、ＮＣＴ０２２５３９９２、およびＮＣＴ０１４７１２１０が含まれる。

【０９１９】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、配列番号２１によって与えられる重鎖および配列番号２２によって与えられる軽鎖を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号２１および配列番号２２に示される配列を有する重鎖および軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、多様体、もしくはコンジュゲートを含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号２１および配列番号２２に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号２１および配列番号２２に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号２１および配列番号２２に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号２１および配列番号２２に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号２１および配列番号２２に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖および軽鎖を含む。

【０９２０】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブの重鎖および軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号２３に示される配列を含み、４－１ＢＢアゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号２４に示される配列、およびその保存的アミノ酸置換を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号２３および配列番号２４に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号２３および配列番号２４に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号２３および配列番号２４に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号２３および配列番号２４に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号２３および配列番号２４に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、配列番号２３および配列番号２４に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む、ｓｃＦｖ抗体を含む。

【０９２１】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号２５、配列番号２６、お

よび配列番号２７に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２８、配列番号２９、および配列番号３０に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【０９２２】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブに関して薬物規制当局によって承認された４－１ＢＢアゴニストのバイオシミラーモノクローナル抗体である。実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、４－１ＢＢ抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、および切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された４－１ＢＢアゴニスト抗体であり、４－１ＢＢアゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。４－１ＢＢアゴニスト抗体は、米国ＦＤＡおよび／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。

【表２６】

表２４：ウレルマブに関連する４－１ＢＢアゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号21　ウレルマブの重鎖	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN 60 PSLESRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK 448
配列番号22　ウレルマブの軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF 120 PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST 180 LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC 216
配列番号23　ウレルマブの可変重鎖	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP 60 EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP 120
配列番号24　ウレルマブの可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP 60 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ 110
配列番号25　ウレルマブの重鎖CDR1	GYYWS 5
配列番号26　ウレルマブの重鎖CDR2	EINHGGYVTY NPSLES 16
配列番号27　ウレルマブの重鎖CDR3	DYGPGNYDWY FDL 13
配列番号28　ウレルマブの軽鎖CDR1	RASQSVSSYL A 11
配列番号29　ウレルマブの軽鎖CDR2	DASNRAT 7
配列番号30　ウレルマブの軽鎖CDR3	QQRSDWPPAL T 11

【０９２３】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、１Ｄ８、３Ｅｌｏｒ、４Ｂ４（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　３０９８０９）、Ｈ４－１ＢＢ－Ｍ１２７（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ　５５２５３２）、ＢＢＫ２（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　ＭＳ６２１ＰＡＢＸ）、１４５５０１（Ｌｅｉｎｃｏ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｂ５９１）、ＡＴＣＣ番号ＨＢ－１１２４８として寄託された細胞株によって産生され、米国特許第６，９７４，８６３号に開示される抗体、５Ｆ４（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　３１　１５０３）、Ｃ６５－４８５（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ　５５９４４６）、米国特許出願公開第ＵＳ２００５／００９５２４４号に開示される抗体、米国特許第７，２８８，６３８号に開示される抗体（例えば、２０Ｈ４．９－ＩｇＧｌ（ＢＭＳ－６６３０３１））、米国特許第６，８８７，６７３号に開示

される抗体（例えば、４Ｅ９もしくは$BMS-554271$）、米国特許第７，２１４，４９３号に開示される抗体、米国特許第６，３０３，１２１号に開示される抗体、米国特許第６，５６９，９９７号に開示される抗体、米国特許第６，９０５，６８５号に開示される抗体（例えば、４Ｅ９もしくは$BMS-554271$）、米国特許第６，３６２，３２５号に開示される抗体（例えば、１Ｄ８もしくは$BMS-469492$、３Ｈ３もしくは$BMS-469497$、または３Ｅｌ）、米国特許第６，９７４，８６３号に開示される抗体（例えば、５３Ａ２）、米国特許第６，２１０，６６９号に開示される抗体（例えば、１Ｄ８、３Ｂ８、もしくは３Ｅｌ）、米国特許第５，９２８，８９３号に開示される抗体、米国特許第６，３０３，１２１号に開示される抗体、米国特許第６，５６９，９９７号に開示される抗体、国際特許出願公開第ＷＯ２０１２／１７７７８８号、同第ＷＯ２０１５／１１９９２３号、および同第ＷＯ２０１０／０４２４３３号に開示される抗体、ならびにそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、多様体、またはバイオシミラーからなる群から選択され、前述の特許または特許出願公開の各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０９２４】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、国際特許出願公開第ＷＯ２００８／０２５５１６Ａ１号、同第ＷＯ２００９／００７１２０Ａ１号、同第ＷＯ２０１０／００３７６６Ａ１号、同第ＷＯ２０１０／０１００５１Ａ１号、および同第ＷＯ２０１０／０７８９６６Ａ１号；米国特許出願公開第ＵＳ２０１１／００２７２１８Ａ１号、同第ＵＳ２０１５／０１２６７０９Ａ１号、同第ＵＳ２０１１／０１１１４９４Ａ１号、同第ＵＳ２０１５／０１１０７３４Ａ１号、および同第ＵＳ２０１５／０１２６７１０Ａ１号；ならびに米国特許第９，３５９，４２０号、同第９，３４０，５９９号、同第８，９２１，５１９号、および同第８，４５０，４６０号に記載される４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質であり、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０９２５】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、構造Ｉ－Ａ（Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）もしくは構造Ｉ－Ｂ（Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）に示されるような４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質、またはそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、多様体、もしくはバイオシミラーである（図５０を参照）。構造Ｉ－ＡおよびＩ－Ｂにおいて、円筒は、個々のポリペプチド結合ドメインを指す。構造Ｉ－ＡおよびＩ－Ｂは、例えば、４－１ＢＢＬ（４－１ＢＢリガンド、ＣＤ１３７リガンド（ＣＤ１３７Ｌ）、もしくは腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー９（ＴＮＦＳＦ９））または４－１ＢＢに結合する抗体から誘導される３つの線形に結合したＴＮＦＲＳＦ結合ドメインを含み、これらを折り畳んで三価タンパク質を形成し、次いでこれをＩｇＧ１－Ｆｃ（C_H3およびC_H2ドメインを含む）によって第２の三価タンパク質に結合させ、次いでこれを使用して、三価タンパク質のうちの２つをジスルフィド結合（小さい長楕円）によって一緒に結合し、構造を安定化し、６つの受容体およびシグナル伝達タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを一緒にして、シグナル伝達複合体を形成することができるアゴニストを提供する。円筒として示されるＴＮＦＲＳＦ結合ドメインは、例えば、親水性残基および柔軟性のためのＧｌｙおよびＳｅｒ配列、ならびに溶解性のためのＧｌｕおよびＬｙｓを含み得るリンカーによって接続されたV_HおよびV_L鎖を含む、ｓｃＦｖドメインであり得る。ｄｅ Ｍａｒｃｏ，Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ｃｅｌｌ Ｆａｃｔｏｒｉｅｓ，２０１１，１０，４４、Ａｈｍａｄ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．＆Ｄｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２，９８０２５０、Ｍｏｎｎｉｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，２０１３，２，１９３－２０８、または本明細書の他の場所に組み込まれている参照文献に記載されるものなどの任意のｓｃＦｖドメイン設計を使用することができる。この形態の融合タンパク質構造は、米国特許第９，３５９，４２０号、第９，３４０，５９９号、第８，９２１，５１９号、および第８，４５０，４６０号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０９２６】

構造Ｉ－Ａの他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表９に示す。Ｆｃドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン（配列番号３１のアミノ酸１７～２３０）、完全なヒンジドメイン（配列番号３１のアミノ酸１～１６）、またはヒンジドメインの部分（例えば、配列番号３１のアミノ酸４～１６）を含む。Ｃ末端Ｆｃ抗体を接続するための好ましいリンカーは、追加のポリペプチドの融合に適したリンカーを含む、配列番号３２～配列番号４１に示される実施形態から選択され得る。

【表２７】

表２５：Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質設計（構造Ｉ－Ａ）を有する、４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質を含むＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号31　Fcドメイン	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 60 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS 120 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 180 LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 230
配列番号32　リンカー	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
配列番号33　リンカー	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
配列番号34　リンカー	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
配列番号35　リンカー	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
配列番号36　リンカー	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
配列番号37　リンカー	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
配列番号38　リンカー	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE 24
配列番号39　リンカー	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE 23
配列番号40　リンカー	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E 21
配列番号41　リンカー	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE 25

【０９２７】

構造Ｉ－Ｂの他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表１０に示す。Ｆｃ抗体断片が、構造Ｉ－ＢのようにＴＮＲＦＳＦ融合タンパク質のＮ末端に融合される場合、Ｆｃモジュールの配列は、好ましくは、配列番号４２に示されるものであり、リンカー配列は、好ましくは、配列番号４３～配列番号４５に示されるそれらの実施形態から選択される。

【表２８】

表２６：Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質設計（構造Ｉ－Ｂ）を有する、４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質を含むＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号42　Fcドメイン	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT 60 CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK 120 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE 180 WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS 240 LSLSPG 246
配列番号43　リンカー	SGSGSGSGSG S 11
配列番号44　リンカー	SSSSSSGSGS GS 12
配列番号45　リンカー	SSSSSSGSGS GSGSGS 16

【０９２８】

実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、ウトミルマブの可変重鎖および可変軽鎖、ウレルマブの可変重鎖および可変軽鎖、ウトミルマブの可変重鎖および可変軽鎖、表１０に記載の可変重鎖および可変軽鎖から選択される可変重鎖および可変軽鎖、前述の可変重鎖および可変軽鎖の任意の組み合わせ、ならびにそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、多様体、およびバイオシミラーからなる群から選択される１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。

【０９２９】

実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、４－１ＢＢＬ配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、配列番号４６による配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、可溶性４－１ＢＢＬ配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、配列番号４７による配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。

【０９３０】

実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号１３および配列番号１４に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、V_HおよびV_Lドメインは、リンカーによって接続されている。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号２３および配列番号２４に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、V_HおよびV_Lドメインは、リンカーによって接続されている。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、各々が表１１に示されるV_HおよびV_H配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、V_HおよびV_Lドメインが、リンカーによって接続されている。

【表２９】

表２７：融合タンパク質の４－１ＢＢ結合ドメインとしてまたはｓｃＦｖ　４－１ＢＢアゴニスト抗体として有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 46 4－1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA 60 SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL 120 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA 180 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV 240 TPEIPAGLPS PRSE 254
配列番号 47 4－1BBL 可溶性ドメイン	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ 60 LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL 120 SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE 168
配列番号 48 4B4－1－1 バージョン 1 の可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS 118
配列番号 49 4B4－1－1 バージョン 1 の可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK 107
配列番号 50 4B4－1－1 バージョン 2 の可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA 119
配列番号 51 4B4－1－1 バージョン 2 の可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR 108
配列番号 52 H39E3－2 の可変重鎖	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP 60 GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT 120
配列番号 53 H39E3－2 の可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL 60 WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA 110

【０９３１】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、（ｉ）第１の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、および（ｖ）第３の可溶性４－１ＢＢ結合ドメインを含む４－１ＢＢアゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端および／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインである。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、（ｉ）第１の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、および（ｖ）第３の可溶性４－１ＢＢ結合ドメインを含む４－１ＢＢアゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端および／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインで

あり、可溶性４－１ＢＢドメインの各々が、茎領域（三量体化に寄与し、細胞膜まで一定の距離を提供するが、４－１ＢＢ結合ドメインの一部ではない）を欠き、第１および第２のペプチドリンカーは、独立して、３～８アミノ酸の長さを有する。

【０９３２】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、（ｉ）第１の可溶性腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）スーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、および（ｖ）第３の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインを含む４－１ＢＢアゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインの各々は、茎領域を欠き、第１および第２のペプチドリンカーは、独立して、３～８アミノ酸の長さであり、各ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインは、４－１ＢＢ結合ドメインである。

【０９３３】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、前述のV_Lドメインのうちのいずれかに結合された前述のV_Hドメインのうちのいずれかを含む、４－１ＢＢアゴニストｓｃＦｖ抗体である。

【０９３４】

実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＢＰＳ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）から市販されているＢＰＳ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ ４－１ＢＢアゴニスト抗体カタログ番号７９０９７－２である。実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、Ｃｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ（Ｓｈｉｒｌｅｙ，ＮＹ，ＵＳＡ）から市販されているＣｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ ４－１ＢＢアゴニスト抗体カタログ番号ＭＯＭ－１８１７９である。

【０９３５】

３．ＯＸ４０（ＣＤ１３４）アゴニスト

実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、ＯＸ４０（ＣＤ１３４）アゴニストである。ＯＸ４０アゴニストは、当該技術分野で知られている任意のＯＸ４０結合分子であり得る。ＯＸ４０結合分子は、ヒトまたは哺乳動物のＯＸ４０に結合することができるモノクローナル抗体または融合タンパク質であり得る。ＯＸ４０アゴニストまたはＯＸ４０結合分子は、任意のアイソタイプ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、およびＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、およびＩｇＡ２）、またはサブクラスの免疫グロブリン分子の免疫グロブリン重鎖を含み得る。ＯＸ４０アゴニストまたはＯＸ４０結合分子は、重鎖および軽鎖の両方を有し得る。本明細書で使用される場合、結合分子という用語はまた、抗体（完全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、および抗体断片、例えば、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ′）断片、Ｆａｂ発現ライブラリーによって産生された断片、上記のうちのいずれかのエピトープ結合断片、ならびにＯＸ４０に結合する操作された形態の抗体、例えば、ｓｃＦｖ分子を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、完全なヒト抗体である抗原結合タンパク質である。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ヒト化抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ここで開示される方法および組成物において使用するためのＯＸ４０アゴニストには、抗ＯＸ４０抗体、ヒト抗ＯＸ４０抗体、マウス抗ＯＸ４０抗体、哺乳動物抗ＯＸ４０抗体、モノクローナル抗ＯＸ４０抗体、ポリクローナル抗ＯＸ４０抗体、キメラ抗ＯＸ４０抗体、抗ＯＸ４０アドネクチン、抗ＯＸ４０ドメイン抗体、一本鎖抗ＯＸ４０断片、重鎖抗ＯＸ４０断片、軽鎖抗ＯＸ４０断片、抗ＯＸ４０融合タンパク質、およびそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、多様体、またはバイオシミラーが含まれる。好ましい実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、アゴニスト、抗ＯＸ４０ヒト化、または完全ヒトモノクローナル抗体（すなわち、単一の細胞株に由来する抗体）である。

【０９３６】

好ましい実施形態では、ＯＸ４０アゴニストまたはＯＸ４０結合分子はまた、融合タンパク質であり得る。ＯＸ４０Ｌに融合されたＦｃドメインを含むＯＸ４０融合タンパク質は、例えば、Ｓａｄｕｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００９，１８２，１４８１－８９に記載されている。好ましい実施形態では、三量体または六量体ＯＸ４０アゴニスト（３つまたは６つのリガンド結合ドメインを有する）などの多量体ＯＸ４０アゴニストは、典型的に２つのリガンド結合ドメインを有するアゴニストモノクローナル抗体と比較して、優れた受容体（ＯＸ４０Ｌ）クラスター化および内部細胞シグナル伝達複合体形成を誘導し得る。３つのＴＮＦＲＳＦ結合ドメインおよびＩｇＧ１－Ｆｃを含み、任意にこれらの融合タンパク質のうちの２つ以上をさらに結合する三量体（三価）または六量体（もしくは六価）またはそれ以上の融合タンパク質は、例えば、Ｇｉｅｆｆｅｒｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ２０１３，１２，２７３５－４７に記載されている。

【０９３７】

アゴニストＯＸ４０抗体および融合タンパク質は、強い免疫応答を誘導することが知られている。Ｃｕｒｔｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１３，７３，７１８９－９８。好ましい実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、毒性を低減するのに十分な方法でＯＸ４０抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体依存性細胞毒性（ＡＤＣＣ）、例えば、ＮＫ細胞細胞傷害を無効にするアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）を無効にするアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を無効にするアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｆｃ領域機能性を無効にするアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。

【０９３８】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ヒトＯＸ４０（配列番号５４）に高い親和性およびアゴニスト活性で結合することを特徴とする。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ヒトＯＸ４０（配列番号５４）に結合する結合分子である。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、マウスＯＸ４０（配列番号５５）に結合する結合分子である。ＯＸ４０アゴニストまたは結合分子が結合するＯＸ４０抗原のアミノ酸配列を表１２に要約する。

【表３０】

表２８：ＯＸ４０抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 54　ヒト OX40（ホモサピエンス）	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ 60 NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK 120 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ 180 GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL 240 RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI 277
配列番号 55　マウス OX40（ハツカネズミ）	MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC 60 HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG 120 VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP 180 TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW 240 RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI 272

【０９３９】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、および方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１００ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約６０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約

５０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約４０ｐＭ以下のK_Dで結合する、またはヒトもしくはマウスＯＸ４０に約３０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【０９４０】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、および方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約7.5×10^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約7.5×10^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約8×10^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約8.5×10^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約9×10^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約9.5×10^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、またはヒトもしくはマウスＯＸ４０に約1×10^{6}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【０９４１】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、および方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約2×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約2.1×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約2.2×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約2.3×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約2.4×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約2.5×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約2.6×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、またはヒトもしくはマウスＯＸ４０に約2.7×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約2.8×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約2.9×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、またはヒトもしくはマウスＯＸ４０に約3×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【０９４２】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、および方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１０ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約６ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約５ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約４ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約３ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１ｎＭ以下のIC_{50}で結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【０９４３】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＭＥＤＩ０５６２またはＭＥＤＩ－０５６２としても知られるタボリキシズマブである。タボリキシズマブは、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ，Ｉｎｃ．の子会社であるＭｅｄＩｍｍｕｎｅから入手可能である。タボリキシズマブは、免疫グロブリンＧ１－κ、抗［ホモサピエンスＴＮＦＲＳＦ４（腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーメンバー４、ＯＸ４０、ＣＤ１３４）］、ヒト化およびキメラモノクローナル抗体である。タボリキシズマブのアミノ酸配列を表１３に示す。タボリキシズマブは、３０１および３０１′′位における、フコシル化複合体二分性ＣＨＯ型グリカンを有するＮ－グリコシル化部位；２２－９５位（V_H-V_L）、１４８－２０４位（C_H1-C_L）、２６５－３２５位（C_H2）、および３７１－４２９位（C_H3）（および２２′′－９５′′、１４８′′－２０４′′、２６５′′－３２５′′、および３７１′′－４２９′′位）における重鎖鎖内ジスルフィド架橋；２３′－８８′位（V_H-V_L）および１３４′－１９４′位（C_H1-C_L）（および２３′′′－

８８′′′および１３４′′′－１９４′′′位）における軽鎖鎖内ジスルフィド架橋；２３０－２３０”および２３３－２３３”位における重鎖鎖内ジスルフィド架橋；ならびに２２４－２１４′および２２４′′－２１４′′′における鎖間重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。様々な固形腫瘍の適応症におけるタボリキシズマブの現在の臨床試験には、アメリカ国立衛生研究所のｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０２３１８３９４およびＮＣＴ０２７０５４８２が含まれる。

【０９４４】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号５６によって与えられる重鎖および配列番号５７によって与えられる軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号５６および配列番号５７に示される配列を有する重鎖および軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、多様体、もしくはコンジュゲートを含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５６および配列番号５７に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５６および配列番号５７に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５６および配列番号５７に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５６および配列番号５７に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５６および配列番号５７に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖および軽鎖を含む。

【０９４５】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、タボリキシズマブの重鎖および軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号５８に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号５９に示される配列、およびその保存的アミノ酸置換を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５８および配列番号５９に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５８および配列番号５９に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５８および配列番号５９に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５８および配列番号５９に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５８および配列番号５９に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、配列番号５８および配列番号５９に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む、ｓｃＦｖ抗体を含む。

【０９４６】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号６０、配列番号６１、および配列番号６２に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号６３、配列番号６４、および配列番号６５に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【０９４７】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、タボリキシズマブに関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストのバイオシミラーモノクローナル抗体である。実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品

と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、および切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡおよび／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。

【表３１】

表２９：タボリキシズマブに関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 56　タボリキシズマブの重鎖	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
配列番号 57　タボリキシズマブの軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号 58　タボリキシズマブの重鎖可変領域	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT 118
配列番号 59　タボリキシズマブの軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR 108
配列番号 60　タボリキシズマブの重鎖 CDR1	GSFSSGYWN 9
配列番号 61　タボリキシズマブの重鎖 CDR2	YIGYISYNGI TYH 13
配列番号 62　タボリキシズマブの重鎖 CDR3	RYKYDYDGGH AMDY 14
配列番号 63　タボリキシズマブの軽鎖 CDR1	QDISNYLN 8
配列番号 64　タボリキシズマブの軽鎖 CDR2	LLIYYTSKLH S 11
配列番号 65　タボリキシズマブの軽鎖 CDR3	QQGSALPW 8

【０９４８】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．から入手可能な完全ヒト抗体である１１Ｄ４である。１１Ｄ４の調製および特性は、米国特許第７，９６０，５１５号、同第８，２３６，９３０号、および同第９，０２８，８２４号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。１１Ｄ４のアミノ酸配列を表１４に示す。

【０９４９】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号６６によって与えられる重鎖および配列番号６７によって与えられる軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それ

ぞれ、配列番号６６および配列番号６７に示される配列を有する重鎖および軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、多様体、もしくはコンジュゲートを含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号６６および配列番号６７に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号６６および配列番号６７に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号６６および配列番号６７に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号６６および配列番号６７に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号６６および配列番号６７に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖および軽鎖を含む。

【０９５０】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１１Ｄ４の重鎖および軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号６８に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号６９に示される配列、およびその保存的アミノ酸置換を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号６８および配列番号６９に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号６８および配列番号６９に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号６８および配列番号６９に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号６８および配列番号６９に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号６８および配列番号６９に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。

【０９５１】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号７０、配列番号７１、および配列番号７２に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号７３、配列番号７４、および配列番号７５に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【０９５２】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１１Ｄ４に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストのバイオシミラーモノクローナル抗体である。実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、１１Ｄ４である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、および切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、１１Ｄ４である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡおよび／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１１Ｄ４である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上

の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１１Ｄ４である。

【表３２】

表３０：１１Ｄ４に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 66 11D4 の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPPCPAP PVAGPSVFLF 240 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV 300 SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV 360 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF 420 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK 444
配列番号 67 11D4 の軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号 68 11D4 の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS 118
配列番号 69 11D4 の軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK 107
配列番号 70 11D4 の重鎖 CDR1	SYSMN 5
配列番号 71 11D4 の重鎖 CDR2	YISSSSSTID YADSVKG 17
配列番号 72 11D4 の重鎖 CDR3	ESGWYLFDY 9
配列番号 73 11D4 の軽鎖 CDR1	RASQGISSWL A 11
配列番号 74 11D4 の軽鎖 CDR2	AASSLQS 7
配列番号 75 11D4 の軽鎖 CDR3	QQYNSYPPT 9

【０９５３】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．から入手可能な完全ヒト抗体である１８Ｄ８である。１８Ｄ８の調製および特性は、米国特許第７，９６０，５１５号、同第８，２３６，９３０号、および同第９，０２８，８２４号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。１８Ｄ８のアミノ酸配列を表１５に示す。

【０９５４】
実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号７６によって与えられる重鎖および配列番号７７によって与えられる軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号７６および配列番号７７に示される配列を有する重鎖および軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、多様体、もしくはコンジュゲートを含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号７６および配列番号７７に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号７６および配列番号７７に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号７６および配列番号７７に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号７６および配列番号７７に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号７６および配列番号７７に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖および軽鎖を含む。

【０９５５】
実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１８Ｄ８の重鎖および軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号７８に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号７９に示される配列、およびその保存的アミノ酸置換を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号７８および配列番号７９に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号７８および配列番号７９に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号７８および配列番号７９に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号７８および配列番号７９に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号７８および配列番号７９に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。

【０９５６】
実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号８０、配列番号８１、および配列番号８２に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号８３、配列番号８４、および配列番号８５に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【０９５７】
実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１８Ｄ８に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストのバイオシミラーモノクローナル抗体である。実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、および切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡおよび／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以

上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。

【表３３】

表３１：１８Ｄ８に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 76 18D8 の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV 120 TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV 180 LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN 300 STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE 360 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
配列番号 77 18D8 の軽鎖	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213
配列番号 78 18D8 の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV 120 TVSS 124
配列番号 79 18D8 の軽鎖可変領域	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK 106
配列番号 80 18D8 の重鎖 CDR1	DYAMH 5
配列番号 81 18D8 の重鎖 CDR2	GISWNSGSIG YADSVKG 17
配列番号 82 18D8 の重鎖 CDR3	DQSTADYYFY YGMDV 15
配列番号 83 18D8 の軽鎖 CDR1	RASQSVSSYL A 11
配列番号 84 18D8 の軽鎖 CDR2	DASNRAT 7
配列番号 85 18D8 の軽鎖 CDR3	QQRSNWPT 8

【０９５８】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎ ｐｌｃ．から入手可能なヒト化抗体であるＨｕ１１９－１２２である。Ｈｕ１１９－１２２の調製および特性は、米国特許第９，００６，３９９号および同第９，１６３，０８５号

、ならびに国際特許公開第ＷＯ２０１２／０２７３２８号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。Ｈｕ１１９－１２２のアミノ酸配列を表１６に示す。

【０９５９】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１１９－１２２の重鎖および軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号８６に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号８７に示される配列、およびその保存的アミノ酸置換を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８６および配列番号８７に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８６および配列番号８７に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８６および配列番号８７に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８６および配列番号８７に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８６および配列番号８７に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。

【０９６０】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号８８、配列番号８９、および配列番号９０に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号９１、配列番号９２、および配列番号９３に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【０９６１】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１１９－１２２に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストのバイオシミラーモノクローナル抗体である。実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１１９－１２２である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、および切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１１９－１２２である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡおよび／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１１９－１２２である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１１９－１２２である。

【表３４】

表３２：Ｈｕ１１９－１２２に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 86 Hu119－122 の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS 120
配列番号 87 Hu119－122 の軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
配列番号 88 Hu119－122 の重鎖 CDR1	SHDMS 5
配列番号 89 Hu119－122 の重鎖 CDR2	AINSDGGSTY YPDTMER 17
配列番号 90 Hu119－122 の重鎖 CDR3	HYDDYYAWFA Y 11
配列番号 91 Hu119－122 の軽鎖 CDR1	RASKSVSTSG YSYMH 15
配列番号 92 Hu119－122 の軽鎖 CDR2	LASNLES 7
配列番号 93 Hu119－122 の軽鎖 CDR3	QHSRELPLT 9

【０９６２】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎ ｐｌｃ．から入手可能なヒト化抗体であるＨｕ１０６－２２２である。Ｈｕ１０６－２２２の調製および特性は、米国特許第９，００６，３９９号および同第９，１６３，０８５号、ならびに国際特許公開第ＷＯ２０１２／０２７３２８号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。Ｈｕ１０６－２２２のアミノ酸配列を表１７に示す。

【０９６３】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１０６－２２２の重鎖および軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号９４に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号９５に示される配列、およびその保存的アミノ酸置換を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９４および配列番号９５に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９４および配列番号９５に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９４および配列番号９５に示される配列と少なくとも９

７％同一であるＶ$_H$およびＶ$_L$領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９４および配列番号９５に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶ$_H$およびＶ$_L$領域を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９４および配列番号９５に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶ$_H$およびＶ$_L$領域を含む。

【０９６４】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号９６、配列番号９７、および配列番号９８に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号９９、配列番号１００、および配列番号１０１に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【０９６５】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１０６－２２２に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストのバイオシミラーモノクローナル抗体である。実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１０６－２２２である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、および切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１０６－２２２である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡおよび／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１０６－２２２である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１０６－２２２である。

【表３５】

表３３：Ｈｕ１０６－２２２に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 94 Hu106－222 の重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV 120 SS 122
配列番号 95 Hu106－222 の軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS 60 RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK 107
配列番号 96 Hu106－222 の重鎖 CDR1	DYSMH 5
配列番号 97 Hu106－222 の重鎖 CDR2	WINTETGEPT YADDFKG 17
配列番号 98 Hu106－222 の重鎖 CDR3	PYYDYVSYYA MDY 13
配列番号 99 Hu106－222 の軽鎖 CDR1	KASQDVSTAV A 11
配列番号 100 Hu106－222 の軽鎖 CDR2	SASYLYT 7
配列番号 101 Hu106－222 の軽鎖 CDR3	QQHYSTPRT 9

【０９６６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＭＥＤＩ６４６９（９Ｂ１２とも称される）である。ＭＥＤＩ６４６９は、マウスモノクローナル抗体である。Ｗｅｉｎｂｅｒｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００６，２９，５７５－５８５。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｗｅｉｎｂｅｒｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００６，２９，５７５－５８５に記載されているように、Ｂｉｏｖｅｓｔ Ｉｎｃ．（Ｍａｌｖｅｒｎ，ＭＡ，ＵＳＡ）に寄託された９Ｂ１２ハイブリドーマによって産生された抗体であり、その開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗体は、ＭＥＤＩ６４６９のＣＤＲ配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＭＥＤＩ６４６９の重鎖可変領域配列および／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０９６７】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｌ１０６ ＢＤ（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体Ｌ１０６（ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）のＣＤＲを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体Ｌ１０６（ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）の重鎖可変領域配列および／または軽鎖可変領域配列を含む。実施形態

では、ＯＸ４０アゴニストは、ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）のＣＤＲを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）の重鎖可変領域配列および／または軽鎖可変領域配列を含む。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＩｎＶｉｖｏＭＡｂ、ＢｉｏＸｃｅｌｌ Ｉｎｃ（Ｗｅｓｔ Ｌｅｂａｎｏｎ，ＮＨ）から市販されているマウスモノクローナル抗体抗ｍＣＤ１３４／ｍＯＸ４０（クローンＯＸ８６）である。

【０９６８】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、国際特許出願公開第ＷＯ９５／１２６７３号、同第ＷＯ９５／２１９２５号、同第ＷＯ２００６／１２１８１０号、同第ＷＯ２０１２／０２７３２８号、同第ＷＯ２０１３／０２８２３１号、同第ＷＯ２０１３／０３８１９１号、および同第ＷＯ２０１４／１４８８９５号；欧州特許出願第ＥＰ０６７２１４１号；米国特許出願公開第ＵＳ２０１０／１３６０３０号、同第ＵＳ２０１４／３７７２８４号、同第ＵＳ２０１５／１９０５０６号、および同第ＵＳ２０１５／１３２２８８号（クローン２０Ｅ５および１２Ｈ３を含む）；ならびに米国特許第７，５０４，１０１号、同第７，５５０，１４０号、同第７，６２２，４４４号、同第７，６９６，１７５号、同第７，９６０，５１５号、同第７，９６１，５１５号、同第８，１３３，９８３号、同第９，００６，３９９号、および同第９，１６３，０８５号（各々の開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるＯＸ４０アゴニストから選択される。

【０９６９】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、構造Ｉ－Ａ（Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）もしくは構造Ｉ－Ｂ（Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）に示されるようなＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質、またはそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、多様体、もしくはバイオシミラーである。構造Ｉ－ＡおよびＩ－Ｂの特性は、上記および米国特許第９，３５９，４２０号、第９，３４０，５９９号、第８，９２１，５１９号、および第８，４５０，４６０号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。構造Ｉ－Ａのポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表９に示す。Ｆｃドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン（配列番号３１のアミノ酸１７～２３０）、完全なヒンジドメイン（配列番号３１のアミノ酸１～１６）、またはヒンジドメインの部分（例えば、配列番号３１のアミノ酸４～１６）を含む。Ｃ末端Ｆｃ抗体を接続するための好ましいリンカーは、追加のポリペプチドの融合に適したリンカーを含む、配列番号３２～配列番号４１に示される実施形態から選択され得る。同様に、構造Ｉ－Ｂのポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表１０に示す。Ｆｃ抗体断片が、構造Ｉ－ＢのようにＴＮＲＦＳＦ融合タンパク質のＮ末端に融合される場合、Ｆｃモジュールの配列は、好ましくは、配列番号４２に示されるものであり、リンカー配列は、好ましくは、配列番号４３～配列番号４５に示されるそれらの実施形態から選択される。

【０９７０】

実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、タボリキシズマブの可変重鎖および可変軽鎖、１１Ｄ４の可変重鎖および可変軽鎖、１８Ｄ８の可変重鎖および可変軽鎖、Ｈｕ１１９－１２２の可変重鎖および可変軽鎖、Ｈｕ１０６－２２２の可変重鎖および可変軽鎖、表１７に記載の可変重鎖および可変軽鎖から選択される可変重鎖および可変軽鎖、前述の可変重鎖および可変軽鎖の任意の組み合わせ、ならびにそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、多様体、およびバイオシミラーからなる群から選択される１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。

【０９７１】

実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、ＯＸ４０Ｌ配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１０２による配列

を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、可溶性ＯＸ４０Ｌ配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１０３による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１０４による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。

【０９７２】

実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号５８および配列番号５９に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_HおよびV_Lドメインは、リンカーによって接続されている。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号６８および配列番号６９に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_HおよびV_Lドメインは、リンカーによって接続されている。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号７８および配列番号７９に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_HおよびV_Lドメインは、リンカーによって接続されている。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号８６および配列番号８７に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_HおよびV_Lドメインは、リンカーによって接続されている。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号９４および配列番号９５に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_HおよびV_Lドメインは、リンカーによって接続されている。実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が表１４に示されるV_HおよびV_L配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_HおよびV_Lドメインは、リンカーによって接続されている。

【表３６－１】

表３４：融合タンパク質（例えば、構造Ｉ－ＡおよびＩ－Ｂ）におけるＯＸ４０結合ドメインとしてまたはｓｃＦｖ　ＯＸ４０アゴニスト抗体ドメインとして有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 102 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ 60 SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ 120 KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF 180 CVL 183
配列番号 103 OX40L 可溶性ドメイン	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE 60 VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL 120 IHQNPGEFCV L 131
配列番号 104 OX40L 可溶性ドメイン（代替）	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI 60 SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ 120 NPGEFCVL 128
配列番号 105 008 の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS 120
配列番号 106 008 の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
配列番号 107 011 の可変重鎖	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD 60 SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA 120
配列番号 108 011 の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
配列番号 109 021 の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS 120
配列番号 110 021 の可変軽鎖	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK 108
配列番号 111 023 の可変重鎖	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA 60 DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS 120
配列番号 112 023 の可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR 108
配列番号 113　重鎖可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY 60 NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS 119
配列番号 114　軽鎖可変領域	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR 108
配列番号 115　重鎖可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY 60 NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS 120 P 121
配列番号 116　軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD 60 RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR 108
配列番号 117　ヒト化抗体の重鎖可変領域	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV 120 SS 122

【表３６－２】

配列番号 118　ヒト化抗体の重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV 120 SS 122
配列番号 119　ヒト化抗体の軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
配列番号 120　ヒト化抗体の軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
配列番号 121　ヒト化抗体の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA 120
配列番号 122　ヒト化抗体の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS 120
配列番号 123　ヒト化抗体の軽鎖可変領域	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K 111
配列番号 124　ヒト化抗体の軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
配列番号 125　重鎖可変領域	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP 60 EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG 120 EVFYFDYWGQ GTTLTVSS 138
配列番号 126　軽鎖可変領域	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP 60 GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG 120 TKLELK 126

【０９７３】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、（ｉ）第１の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、および（ｖ）第３の可溶性ＯＸ４０結合ドメインを含むＯＸ４０アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端および／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインである。実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、（ｉ）第１の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、および（ｖ）第３の可溶性ＯＸ４０結合ドメインを含むＯＸ４０アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端および／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインであり、可溶性ＯＸ４０ドメインの各々が、茎領域（三量体化に寄与し、細胞膜まで一定の距離を提供するが、ＯＸ４０結合ドメインの一部ではない）を欠き、第１および第２のペプチドリンカーは、独立して、３～８アミノ酸の長さを有する。

【０９７４】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、（ｉ）第１の可溶性腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）スーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、および（ｖ）第３の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインを

含むＯＸ４０アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインの各々は、茎領域を欠き、第１および第２のペプチドリンカーは、独立して、３～８アミノ酸の長さであり、ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインは、ＯＸ４０結合ドメインである。

【０９７５】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＭＥＤＩ６３８３である。ＭＥＤＩ６３８３は、ＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質であり、米国特許第６，３１２，７００号に記載されているように調製することができ、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０９７６】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、前述のV_Lドメインのうちのいずれかに結合された前述のV_Hドメインのうちのいずれかを含む、ＯＸ４０アゴニストｓｃＦｖ抗体である。

【０９７７】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｃｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｉｎｃ．（Ｓｈｉｒｌｅｙ，ＮＹ，ＵＳＡ）から市販されているＣｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体ＭＯＭ－１８４５５である。

【０９７８】

実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，Ｉｎｃ．（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）から市販されているＯＸ４０アゴニスト抗体クローンＢｅｒ－ＡＣＴ３５である。

【０９７９】

Ｉ．任意の細胞生存率分析

任意に、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準的なアッセイを使用して、第１のプライミング拡張（初期バルク拡張と称されることもある）の後に行うことができる。したがって、特定の実施形態では、この方法は、第１のプライミング拡張に続いて細胞生存率アッセイを行うことを含む。例えば、トリパンブルー排除アッセイは、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするバルクＴＩＬの試料上で行うことができる。生存率の試験に使用する他のアッセイには、アラマーブルーアッセイおよびＭＴＴアッセイが含まれるが、これらに限定されない。

【０９８０】

１．細胞数、生存率、フローサイトメトリー

いくつかの実施形態では、細胞数および／または生存率が測定される。ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、およびＣＤ５６などであるがこれらに限定されないマーカー、ならびに本明細書に開示または記載される任意の他のマーカーの発現は、例えば、ＢＤ Ｂｉｏ－ｓｃｉｅｎｃｅｓ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）から市販されているものに限定されない抗体を用いたフローサイトメトリーによって、ＦＡＣＳＣａｎｔｏ（商標）フローサイトメーター（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して測定することができる。細胞は、使い捨てのｃチップ血球計数器（ＶＷＲ，Ｂａｔａｖｉａ，ＩＬ）を使用して手動でカウントすることができ、生存率は、トリパンブルー染色を含むがこれに限定されない当該技術分野で知られている任意の方法を使用して評価することができる。細胞生存率はまた、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるＵＳＳＮ１５／８６３，６３４に基づいてアッセイすることができる。細胞生存率は、米国特許公開第２０１８／０２８０４３６号または国際特許公開第ＷＯ／２０１８／０８１４７３号（両方とも、あらゆる目的のためにそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に基づいてアッセイすることもできる。

【０９８１】

場合によっては、以下で考察されるプロトコルを使用して、バルクＴＩＬ集団を直ちに凍結保存することができる。代替的に、バルクＴＩＬ集団をＲＥＰに供し、以下で考察されるように凍結保存することができる。同様に、遺伝子改変ＴＩＬが治療に使用される場

合、バルクまたはＲＥＰ　ＴＩＬ集団は、好適な治療のために遺伝子改変を受け得る。

【０９８２】

２．細胞培養

実施形態では、上で考察され、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に例示されたものを含む、ＴＩＬを拡張するための方法は、約５，０００ｍＬ～約２５，０００ｍＬの細胞培地、約５，０００ｍＬ～約１０，０００ｍＬの細胞培地、または約５，８００ｍＬ～約８，７００ｍＬの細胞培地を使用することを含み得る。いくつかの実施形態では、培地は、無血清培地である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張における培地は、無血清である。いくつかの実施形態では、第２の拡張における培地は、無血清である。いくつかの実施形態では、第１のプライミング拡張および第２の拡張（第２の急速拡張とも呼ばれる）における培地は、両方とも無血清である。実施形態では、ＴＩＬの数を拡張することは、たった１種類の細胞培養培地を使用する。任意の好適な細胞培養培地、例えば、ＡＩＭ－Ｖ細胞培地（Ｌ－グルタミン、５０μＭの硫酸ストレプトマイシン、および１０μＭの硫酸ゲンタマイシン）細胞培養培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ　ＣＡ）を使用することができる。これに関して、本発明の方法は、ＴＩＬの数を拡張するために必要な培地の量および培地の種類の数を有利に低減する。実施形態では、ＴＩＬの数を拡張することは、３日または４日に１回以下の頻度で細胞にフィードすることを含み得る。ガス透過性容器内の細胞の数を拡張することは、細胞を拡張するために必要なフィーディング頻度を低減することによって、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化する。

【０９８３】

実施形態では、第１および／または第２のガス透過性容器内の細胞培養培地は、ろ過されていない。ろ過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。実施形態では、第１および／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、βメルカプトエタノール（ＢＭＥ）を欠いている。

【０９８４】

実施形態では、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、第１のプライミング拡張として約１～８日間、例えば約７日間、または第１のプライミング拡張として約８日間にわたってＩＬ－２、１Ｘ抗原提示フィーダー細胞、およびＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第１のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を培養することと、ＴＩＬを第２のガス透過性容器に移し、ＩＬ－２、２Ｘ抗原提示フィーダー細胞、およびＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第２のガス透過性容器内でＴＩＬの数を約７～９日間、例えば、約７日間、約８日間、または約９日間にわたって拡張することと、を含む方法の期間。

【０９８５】

実施形態では、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、第１のプライミング拡張として約１～７日間、例えば約７日間にわたってＩＬ－２、１Ｘ抗原提示フィーダー細胞、およびＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第１のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を培養することと、ＴＩＬを第２のガス透過性容器に移し、ＩＬ－２、２Ｘ抗原提示フィーダー細胞、およびＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第２のガス透過性容器内でＴＩＬの数を約７～９日間、例えば、約７日間、約８日間、または約９日間にわたって拡張することと、を含む方法の期間。

【０９８６】

実施形態では、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、第１のプライミング拡張として約１～７日間、例えば約７日間にわたってＩＬ－２、１Ｘ抗原提示フィーダー細胞、およびＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第１のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を培養することと、ＴＩＬを第２のガス透過性容器に移し、ＩＬ－２、２Ｘ抗原提示フィーダー細胞、およびＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第２のガス透過性容器内でＴＩＬの数を約７～１０日間、例えば、約７日間、約８日間、約９日間、または約１０日間にわたって拡張することと、を含む方法の期間。

【０９８７】

実施形態では、ＴＩＬは、ガス透過性容器内で拡張される。ガス透過性容器は、米国特許出願公開第２００５／０１０６７１７Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものを含む、当該技術分野で知られている方法、組成物、およびデバイスを使用し、ＰＢＭＣを使用してＴＩＬを拡張するために使用されてきた。実施形態では、ＴＩＬは、ガス透過性バッグ内で拡張される。実施形態では、ＴＩＬは、Ｘｕｒｉ細胞拡張システムＷ２５（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）などの、ガス透過性バッグ内のＴＩＬを拡張する細胞拡張システムを使用して拡張される。実施形態では、ＴＩＬは、Ｘｕｒｉ細胞拡張システムＷ５（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）としても知られるＷＡＶＥバイオリアクターシステムなどの、ガス透過性バッグ内でＴＩＬを拡張する細胞拡張システムを使用して拡張される。実施形態では、細胞拡張システムは、約１００ｍＬ、約２００ｍＬ、約３００ｍＬ、約４００ｍＬ、約５００ｍＬ、約６００ｍＬ、約７００ｍＬ、約８００ｍＬ、約９００ｍＬ、約１Ｌ、約２Ｌ、約３Ｌ、約４Ｌ、約５Ｌ、約６Ｌ、約７Ｌ、約８Ｌ、約９Ｌ、および約１０Ｌからなる群から選択される容量を有するガス透過性細胞バッグを含む。

【０９８８】

実施形態では、ＴＩＬは、Ｇ－Ｒｅｘフラスコ（Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ　Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇから市販されている）内で拡張することができる。かかる実施形態は、細胞集団が約５×１０^{5}細胞／ｃｍ^{2}～１０×１０^{6}～３０×１０^{6}細胞／ｃｍ^{2}の間まで拡張するのを可能にする。実施形態では、これは、フィーディングなしである。実施形態では、これは、培地がＧ－Ｒｅｘフラスコ内の約１０ｃｍの高さに存在する限り、フィーディングなしである。実施形態では、これは、フィーディングなしであるが、１つ以上のサイトカインの添加を伴う。実施形態では、サイトカインを培地と混合する必要なしに、サイトカインをボーラスとして添加することができる。かかる容器、装置、および方法は、当該技術分野で知られており、ＴＩＬを拡張するために使用されており、米国特許出願公開第ＵＳ２０１４／０３７７７３９Ａ１号、国際公開第ＷＯ２０１４／２１００３６Ａ１号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３／０１１５６１７Ａ１号、国際公開第ＷＯ２０１３／１８８４２７Ａ１、米国特許出願公開第ＵＳ２０１１／０１３６２２８Ａ１、米国特許第ＵＳ８，８０９，０５０Ｂ２号、国際公開第ＷＯ２０１１／０７２０８８Ａ２号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１６／０２０８２１６Ａ１号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１２／０２４４１３３Ａ１号、国際公開第ＷＯ２０１２／１２９２０１Ａ１号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３／０１０２０７５Ａ１号、米国特許第ＵＳ８，９５６，８６０Ｂ２号、国際公開第ＷＯ２０１３／１７３８３５Ａ１号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１５／０１７５９６６Ａ１号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものを含む。かかるプロセスはまた、Ｊｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，２０１２，３５：２８３－２９２に記載されている。

【０９８９】

Ｊ．ＴＩＬの任意の遺伝子操作

いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、タンパク質発現を一過的に変化させるために、各々本明細書で提供されるように、閉じた無菌製造プロセス中を含む、拡張ステップの前、最中、または後にさらに操作される。いくつかの実施形態では、一過的に変化したタンパク質発現は、一過性の遺伝子編集によるものである。いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、転写因子（ＴＦ）および／またはＴＩＬにおけるタンパク質発現を一過的に変化させることができる他の分子で処理される。いくつかの実施形態では、タンパク質発現を一過的に変化させることができるＴＦおよび／または他の分子は、腫瘍抗原の発現の変化および／またはＴＩＬの集団における腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の数の変化を提供する。

【０９９０】

特定の実施形態では、この方法は、ＴＩＬの集団を遺伝子編集することを含む。特定の実施形態では、この方法は、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、および／または第３のＴＩＬ集団を遺伝子編集することを含む。

【０９９１】
いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のタンパク質の発現の促進または１つ以上のタンパク質の発現の阻害、ならびに１つのタンパク質セットの促進および別のタンパク質セットの阻害の両方の同時の組み合わせのために、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）または低分子（もしくは短）干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）の、ＴＩＬの集団への挿入を含む、リボ核酸（ＲＮＡ）挿入などによるヌクレオチド挿入による遺伝子編集を含む。
【０９９２】
いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、タンパク質発現の一過性の変化を受ける。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８（特に図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に示されるようなステップＡから得られたＴＩＬ集団を含む、第１の拡張前のバルクＴＩＬ集団において起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８（例えば、図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に示されるように、例えば、ステップＢで拡張されたＴＩＬ集団におけるものを含む、第１の拡張中に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、第１の拡張と第２の拡張との間の移行中のＴＩＬ集団（例えば、本明細書に記載の第２のＴＩＬ集団）であって、例えば、図８に示されるように、ステップＢから得られ、ステップＣに含まれるＴＩＬ集団におけるものを含む、第１の拡張後に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＣから得られ、ステップＤにおけるその拡張前のＴＩＬ集団におけるものを含む、第２の拡張前のバルクＴＩＬ集団において起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８（例えば、第３のＴＩＬ集団）に示されるように、例えば、ステップＤで拡張されたＴＩＬ集団におけるものを含む、第２の拡張中に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＤにおける拡張から得られたＴＩＬ集団を含む、第２の拡張の後に起こる。
【０９９３】
実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、エレクトロポレーションのステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｔｓｏｎｇ，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．１９９１，６０，２９７－３０６および米国特許出願公開第２０１４／０２２７２３７Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。実施形態では、ＴＩＬの集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションのステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法（リン酸カルシウムＤＮＡ沈殿、細胞表面コーティング、およびエンドサイトーシス）は、当該技術分野で知られており、Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９７３，５２，４５６－４６７、Ｗｉｇｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１９７９，７６，１３７３－１３７６、およびＣｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｒｅａ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１９８７，７，２７４５－２７５２、ならびに米国特許第５，５９３，８７５号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リポソームトランスフェクションのステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えばカチオン性脂質Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－ｎ，ｎ，ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）およびジオレオイルホスホチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム製剤を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Ｒｏｓｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １９９１，１０，５２０－５２５およびＦｅｌｇｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８７，８４，７４１３－７４１７、ならびに米国特許第５，２７９，８３３号、同第５，９０８，６３５号、同第６，０５６，９３８号、同第６，１１０，４９０号、同第６，５３４，４８４号、および同第７，６８７，０７０号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。実施形

態では、ＴＩＬの集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、米国特許第５，７６６，９０２号、同第６，０２５，３３７号、同第６，４１０，５１７号、同第６，４７５，９９４号、および同第７，１８９，７０５号に記載されている方法を使用するトランスフェクションのステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０９９４】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、幹細胞メモリーＴ細胞（ＴＳＣＭ）の増加をもたらす。ＴＳＣＭは、抗原を経験したセントラルメモリーＴ細胞の初期の前駆細胞である。ＴＳＣＭは、一般に、幹細胞を定義する長期生存、自己複製、および多能性の能力を示し、一般に、効果的なＴＩＬ産物の生成に望ましいものである。ＴＳＣＭは、養子細胞移植のマウスモデルにおいて、他のＴ細胞サブセットと比較して抗腫瘍活性の強化を示している（Ｇａｔｔｉｎｏｎｉ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｍｅｄ ２００９，２０１１、Ｇａｔｔｉｎｏｎｉ，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖ．Ｃａｎｃｅｒ，２０１２、Ｃｉｅｒｉ ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ ２０１３）。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、高い割合のＴＳＣＭを含む組成物を有するＴＩＬ集団をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＳＣＭパーセンテージの少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＬ集団におけるＴＳＣＭの少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、または１０倍の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、少なくとも少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％のＴＳＣＭを有するＴＩＬ集団をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、少なくとも少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％のＴＳＣＭを有する治療的ＴＩＬ集団をもたらす。

【０９９５】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、抗原を経験したＴ細胞の若返りをもたらす。いくつかの実施形態では、若返りは、例えば、増加した増殖、増加したＴ細胞活性化、および／または増加した抗原認識を含む。

【０９９６】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のＴＣＲレパートリーを保存するために、Ｔ細胞の大部分における発現を変化させる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のＴＣＲレパートリーを変化させない。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のＴＣＲレパートリーを維持する。

【０９９７】

いくつかの実施形態では、タンパク質の一過性の変化は、特定の遺伝子の発現の変化をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１（ＰＤＣＤ１もしくはＣＣ２７９とも称される）、ＴＧＦＢＲ２、ＣＣＲ４／５、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）、ＣＩＳＨ、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ １／２ ＩＣＤ、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧ

Ｆβ、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＳＣＲ３、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、ＣＣＬ１７、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＶＨＬ、ＣＤ４４、ＰＩＫ３ＣＤ、ＳＯＣＳ１、および／またはｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）を含むが、これらに限定されない遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＴＧＦＢＲ２、ＣＣＲ４／５、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）、ＣＩＳＨ、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ １／２ ＩＣＤ、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβ、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＳＣＲ３、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、ＣＣＬ１７、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＶＨＬ、ＣＤ４４、ＰＩＫ３ＣＤ、ＳＯＣＳ１、および／またはｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）からなる群から円卓される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦＢＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ４／５を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－１２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－１５を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＮＯＴＣＨ１／２ ＩＣＤを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦβを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ４を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ５を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＲ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＳＣＲ３を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＬ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＬ８を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ２２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ１７を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＶＨＬを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ４４を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＩＫ３ＣＤを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＳＯＣＳ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）を標的とする。

【０９９８】
いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ケモカイン受容体の増加および／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、一過性タンパク質発現によって過剰発現されるケモカイン受容体は、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１、ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、および／またはＣＣＬ１７を含むがこれらに限定されないリガンドを有する受容体を含む。
【０９９９】
いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＭ－３、ＬＡＧ－３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβＲ２、および／またはＴＧＦβの発現の減少および／または低減をもたらす（例えば、ＴＧＦβ経路の遮断をもたらすことを含む）。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）の発現の減少および／または低減をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨの発現の減少および／または低減をもたらす。
【１０００】
いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、ＴＩＬ輸送または腫瘍部位への移動を改善するために、ケモカイン受容体の増加および／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）の増加および／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ１、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、および／またはＣＳＣＲ３からなる群から選択されるケモカイン受容体の増加および／または過剰発現をもたらす。
【１００１】
いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、インターロイキンの増加および／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、および／またはＩＬ－２１からなる群から選択されるインターロイキンの増加および／または過剰発現をもたらす。
【１００２】
いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤの増加および／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＶＨＬの増加および／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ４４の増加および／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＩＫ３ＣＤの増加および／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＳＯＣＳ１の増加および／または過剰発現をもたらす。
【１００３】
いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）の発現の減少および／または低減をもたらす。
【１００４】
いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の減少および／または低減をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される２つの分子の発現の減少および／または低減をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ならびにＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される１つの分子の発現の減少および／または低減をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は

、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、およびそれらの組み合わせの発現の減少および／または低減をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ならびにＬＡＧ３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、およびそれらの組み合わせのうちの１つの発現の減少および／または低減をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１およびＬＡＧ３の発現の減少および／または低減をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１およびＣＩＳＨの発現の減少および／または低減をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１およびＣＢＬＢの発現の減少および／または低減をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３およびＣＩＳＨの発現の減少および／または低減をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３およびＣＢＬＢの発現の減少および／または低減をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨおよびＣＢＬＢの発現の減少および／または低減をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３およびＰＤ－１の発現の減少および／または低減をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３およびＬＡＧ３の発現の減少および／または低減をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３およびＣＩＳＨの発現の減少および／または低減をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３およびＣＢＬＢの発現の減少および／または低減をもたらす。

【１００５】

いくつかの実施形態では、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される接着分子は、γレトロウイルスまたはレンチウイルス法によって、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団に挿入される（例えば、接着分子の発現が増加する）。

【１００６】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の減少および／または低減、ならびにＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、およびそれらの組み合わせの発現の増加および／または増強をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の減少および／または低減、ならびにＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、およびそれらの組み合わせの発現の増加および／または増強をもたらす。

【１００７】

いくつかの実施形態では、約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％の発現の低減がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％の発現の低減がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％の発現の低減がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％の発現の低減がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約８５％、約９０％、または約９５％の発現の低減がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約８０％の発現の低減がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約８５％の発現の低減がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約９０％の発現の低減がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約９５％の発現の低減がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約９９％の発現の低減がある。

【１００８】

いくつかの実施形態では、約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％の発現の増加がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％の発現の増加がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％の発現の増加がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％の発現の増加がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約８５％、約９０％、または約９５％の発現の増加がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約８０％の発現の増加がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約８５％の発現の増加がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約９０％の発現の増加がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約９５％の発現の増加がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約９９％の発現の増加がある。

【１００９】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、転写因子（ＴＦ）および／またはＴＩＬにおけるタンパク質発現を一過的に変化させることができる他の分子によるＴＩＬの処理によって誘導される。いくつかの実施形態では、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームは、転写因子（ＴＦ）および／またはタンパク質発現を一過的に変化させることができる他の分子の細胞内送達のために用いられる。転写因子を含むタンパク質を、Ｔ細胞を含む様々な一次ヒト細胞に送達する能力を実証する、かかる方法（Ｓｈａｒｅｉ ｅｔ ａｌ．ＰＮＡＳ ２０１３、ならびにＳｈａｒｅｉ ｅｔ ａｌ．ＰＬＯＳ ＯＮＥ ２０１５およびＧｒｅｉｓｂｅｃｋ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ｖｏｌ．１９５，２０１５）が記載されている。例えば、国際特許公開第ＷＯ２０１３／０５９３４３Ａ１号、同第ＷＯ２００７／８０８０６３Ａ１号、および同第ＷＯ２０１７／１２３６６３Ａ１号（これらはすべて参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。国際特許公開第ＷＯ２０１３／０５９３４３Ａ１号、同第ＷＯ２０１７／００８０６３Ａ１号、および同第ＷＯ２０１７／１２３６６３Ａ１号に記載されている、かかる方法は、ＴＩＬの集団を転写因子（ＴＦ）および／または一過性タンパク質発現を誘導することができる他の分子に曝露するために本発明で用いることができ、当該ＴＦおよび／または一過性タンパク質発現を誘導することができる他の分子は、腫瘍抗原の発現の増加および／またはＴＩＬ集団における腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の数の増加をもたらし、したがって、再プログラミングされていないＴＩＬ集団と比較して、ＴＩＬ集団の再プログラミングおよび再プログラミングされたＴＩＬ集団の治療効果の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、本明細書に記載されるように、ＴＩＬの開始または前の集団（すなわち、再プログラミング前の）集団と比較して、エフェクターＴ細胞および／またはセントラルメモリーＴ細胞の亜集団の増加をもたらす。

【１０１０】

いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＴＣＦ－１、ＮＯＴＣＨ１／２ ＩＣＤ、および／またはＭＹＢを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＴＣＦ－１である。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＮＯＴＣＨ１／２ ＩＣＤである。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＭＹＢである。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、追加のＴＩＬ再プログラミングを誘導するために、市販のＫＮＯＣＫＯＵＴ血清置換（Ｇｉｂｃｏ／ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）などの人工多能性幹細胞培養（ｉＰＳＣ）とともに投与される。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、追加のＴＩＬ再プログラミングを誘導するために、ｉＰＳＣカクテルとともに投与される。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ｉＰＳＣカクテルなしで投与される。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、ＴＳＣＭのパーセンテージの増加をもたらす。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、ＴＳＣＭのパーセンテージの約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約

３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％　ＴＳＣＭの増加をもたらす。

【１０１１】

いくつかの実施形態では、上記のようにタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法と組み合わせることができ、１つ以上のタンパク質の産生のための遺伝子の安定な組み込みのステップを含む。特定の実施形態では、この方法は、ＴＩＬの集団を遺伝子改変するステップを含む。特定の実施形態では、この方法は、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、および／または第３のＴＩＬ集団を遺伝子改変することを含む。実施形態では、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、レトロウイルス形質導入のステップを含む。実施形態では、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、レンチウイルス形質導入のステップを含む。レンチウイルス形質導入システムは、当該技術分野で知られており、例えば、Ｌｅｖｉｎｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ′ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．２００６，１０３，１７３７２－７７、Ｚｕｆｆｅｒｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９７，１５，８７１－７５、Ｄｕｌｌ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　１９９８，７２，８４６３－７１、および米国特許第６，６２７，４４２号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。実施形態では、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、γレトロウイルス形質導入のステップを含む。γレトロウイルス形質導入システムは、当該技術分野で知られており、例えば、Ｃｅｐｋｏ　ａｎｄ　Ｐｅａｒ，Ｃｕｒ．Ｐｒｏｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９６，９．９．１－９．９．１６に記載されており、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。実施形態では、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入のステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入系は、当該技術分野で知られており、トランスポザーゼが、ＤＮＡ発現ベクターとして、または発現可能なＲＮＡもしくはタンパク質として提供される系を含み、それによりトランスポザーゼ、例えばｍＲＮＡ（例えば、キャップおよびポリＡ尾部を含むｍＲＮＡ）として提供されるトランスポザーゼの長期発現が、トランスジェニック細胞で起こらないようにする。ＳＢ１０、ＳＢ１１、およびＳＢ１００ｘなどのサケ型Ｔｅｌ様トランスポザーゼ（ＳＢまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼ）を含む好適なトランスポゾン媒介遺伝子導入システム、ならびに増加した酵素活性を有する操作された酵素は、例えば、Ｈａｃｋｅｔｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ　２０１０，１８，６７４－８３および米国特許第６，４８９，４５８号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１０１２】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、自己送達ＲＮＡ干渉（ｓｄＲＮＡ）によって誘導される発現の低減であり、これは高パーセンテージの２′－ＯＨ置換（典型的にはフッ素または－ＯＣＨ$_3$）を有する化学的に合成された非対称ｓｉＲＮＡ二重鎖であり、これはテトラエチレングリコール（ＴＥＧ）リンカーを使用してその３′端においてコレステロールにコンジュゲートされた、２０ヌクレオチドアンチセンス（ガイド）鎖および１３～１５塩基センス（パッセンジャー）鎖を含む。いくつかの実施形態では、方法は、ＴＩＬの集団におけるタンパク質発現の一過性の変化を含み、これは、高パーセンテージの２′－ＯＨ置換（典型的にはフッ素または－ＯＣＨ$_3$）を有する化学的に合成された非対称ｓｉＲＮＡ二重鎖である、自己送達ＲＮＡ干渉（ｓｄＲＮＡ）の使用を含み、これはテトラエチレングリコール（ＴＥＧ）リンカーを使用してその３′端においてコレステロールにコンジュゲートされた、２０ヌクレオチドアンチセンス（ガイド）鎖および１３～１５塩基センス（パッセンジャー）鎖を含む。ｓｄＲＮＡを使用する方法は、Ｋｈｖｏｒｏｖａ　ａｎｄ　Ｗａｔｔｓ，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１７，３５，２３８－２４８、Ｂｙｒｎｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｏｃｕｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．２０１３，２９，８５５－８６４、およびＬｉｇｔｅｎｂｅｒｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１８（印刷中）に記載されており、これらの開示

は参照により本明細書に組み込まれる。実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達は、エレクトロポレーション、ＳＱＺ、または他の方法を使用せず、代わりに、ＴＩＬ集団が培地中１μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。特定の実施形態では、この方法は、ＴＩＬ集団を培地中１μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で１～３日の期間にわたってｓｄＲＮＡに曝露することを含む、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達を含む。実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中１０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中５０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中０．１μＭ／１０，０００ＴＩＬ～５０μＭ／１０，０００ＴＩＬの間の濃度でｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中０．１μＭ／１０，０００ＴＩＬ～５０μＭ／１０，０００ＴＩＬの間の濃度でｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成され、ｓｄＲＮＡへの曝露は、培地に新鮮なｓｄＲＮＡを添加することによって２、３、４、または５回行われる。他の好適なプロセスは、例えば、米国特許出願公開第ＵＳ２０１１／００３９９１４Ａ１号、同第ＵＳ２０１３／０１３１１４１Ａ１号、および同第ＵＳ２０１３／０１３１１４２Ａ１号、ならびに米国特許第９，０８０，１７１号に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１０１３】

いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡは、製造中にＴＩＬの集団に挿入される。いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡは、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤ、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４　ＴＩＭ－３、ＬＡＧ－３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβ、ＴＧＦＢＲ２、ｃＡＭＰプロテインキナーゼＡ（ＰＫＡ）、ＢＡＦＦ　ＢＲ３、ＣＩＳＨ、および／またはＣＢＬＢを干渉するＲＮＡをコードする。いくつかの実施形態では、発現の低減は、例えば、フローサイトメトリーおよび／またはｑＰＣＲによって評価されるように、遺伝子サイレンシングのパーセンテージに基づいて決定される。いくつかの実施形態では、約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％の発現の低減がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％の発現の低減がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％の発現の低減がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％の発現の低減がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約８５％、約９０％、または約９５％の発現の低減がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約８０％の発現の低減がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約８５％の発現の低減がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約９０％の発現の低減がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約９５％の発現の低減がある。いくつかの実施形態では、少なくとも約９９％の発現の低減がある。

【１０１４】

ｓｉＲＮＡの化学修飾に基づく自己送達可能なＲＮＡｉ技術を本発明の方法とともに用いて、本明細書に記載されるように、ｓｄＲＮＡをＴＩＬに首尾よく送達することができる。骨格修飾と非対称ｓｉＲＮＡ構造および疎水性リガンドとの組み合わせ（例えば、Ｌｉｇｔｅｎｂｅｒｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１８およびＵＳ２０１６／０３０４８７３を参照）により、ｓｄＲＮＡは、ｓｄＲＮＡのヌクレアーゼ安定性を利用する培養培地への単純な添加によって、追加の製剤および方法なしで、培養された哺乳動物細胞に浸透させることができる。この安定性により、単に培地中のｓｄＲＮＡの活性濃度を維持することによって、ＲＮＡｉを介した標的遺伝子活性の一定レベルの低減をサポートすることができる。理論に拘束されることはないが、ｓｄＲＮＡの骨格安定化は、非分裂細胞で数ヶ月続く可能性のある遺伝子発現効果の拡張された低減を提供する。

【１０１５】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬの９５％を超えるトランスフェクション効率および様々な特定のｓｄＲＮＡによる標的の発現の低減が起こる。いくつかの実施形態では、いくつかの未修飾リボース残基を含むｓｄＲＮＡは、ＲＮＡｉ効果の効力および／または寿命を増加させるために、完全に修飾された配列で置き換えられた。いくつかの実施形態では、発現効果の低減は、１２時間、２４時間、３６時間、４８時間、５日、６日、７ダイア、または８日以上維持される。いくつかの実施形態では、発現効果の低減は、ＴＩＬのｓｄＲＮＡ処理後１０日以上で減少する。いくつかの実施形態では、標的発現の発現の７０％を超える低減が維持される。いくつかの実施形態では、標的発現の発現の７０％を超える低減が維持されるＴＩＬ。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１経路における発現の低減は、ＴＩＬが、より強力なインビボ効果を示すことを可能にし、これはいくつかの実施形態では、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１経路の抑制効果の回避に起因する。いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡによるＰＤ－１の発現の低減は、ＴＩＬ増殖の増加をもたらす。

【１０１６】
短干渉ＲＮＡまたはサイレンシングＲＮＡとして知られることもある、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）は、一般に長さが１９～２５塩基対の二本鎖ＲＮＡ分子である。ｓｉＲＮＡは、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）において使用され、相補的なヌクレオチド配列を有する特定の遺伝子の発現を干渉する。

【１０１７】
二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＲＮＡ）は、一般に、ＲＮＡの相補鎖の対、一般にセンス（パッセンジャー）およびアンチセンス（ガイド）鎖を含む任意の分子を定義するために使用することができ、一本鎖オーバーハング領域を含み得る。ｓｉＲＮＡとは対照的に、ｄｓＲＮＡという用語は、一般に、ダイサーを含む切断酵素系の作用によってより大きなｄｓＲＮＡ分子から放出されるｓｉＲＮＡ分子の配列を含む前駆体分子を指す。

【１０１８】
ｓｄＲＮＡ（自己送達可能なＲＮＡ）は、共有結合で修飾された新しいクラスのＲＮＡｉ化合物であり、細胞に侵入するために送達媒体を必要とせず、従来のｓｉＲＮＡと比較して薬理学が改善されている。「自己送達可能なＲＮＡ」または「ｓｄＲＮＡ」は、疎水的に修飾されたＲＮＡ干渉－アンチセンスハイブリッドであり、一次細胞においてインビトロで、および局所投与時にインビボで非常に有効であることが実証されている。毒性のない強力な取り込みおよび／またはサイレンシングが実証されている。ｓｄＲＮＡは、一般に、最小限の二本鎖領域を有する非対称の化学修飾された核酸分子である。ｓｄＲＮＡ分子は、典型的に一本鎖領域および二本鎖領域を含み、分子の一本鎖領域および二本鎖領域の両方に様々な化学修飾を含むことができる。さらに、ｓｄＲＮＡ分子は、本明細書に記載されているように、従来の高度なステロール型分子などの疎水性コンジュゲートに結合することができる。ｓｄＲＮＡおよびかかるｓｄＲＮＡを作製するための関連する方法はまた、例えば、ＵＳ２０１６／０３０４８７３、ＷＯ２０１０／０３３２４６、ＷＯ２０１７／０７０１５１、ＷＯ２００９／１０２４２７、ＷＯ２０１１／１１９８８７、ＷＯ２０１０／０３３２４７Ａ２、ＷＯ２００９／０４５４５７、ＷＯ２０１１／１１９８５２に広く記載されており、これらはすべて、参照によりそれらの全体があらゆる目的で本明細書に組み込まれる。ｓｄＲＮＡ構造、化学的性質、標的位置、配列優先性などを最適化するために、独自のアルゴリズムが開発され、ｓｄＲＮＡの効力予測に利用されている（例えば、ＵＳ２０１６／０３０４８７３を参照）。これらの分析に基づいて、機能的なｓｄＲＮＡ配列は、一般に、１μＭの濃度で発現が７０％以上低減し、確率が４０％以上であると定義されている。

【１０１９】
いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の７０％低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の７５％低減を示す。

いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の８０％低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の８５％低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の９０％低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の９５％低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の９９％低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．２５μＭ～約４μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低減を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約４．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低減を示す。

【１０２０】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド剤は、治療剤の安定性および／または有効性を高め、治療される細胞または組織へのオリゴヌクレオチドの効率的な送達をもたらすための１つ以上の修飾を含む。かかる修飾には、２′－Ｏ－メチル修飾、２′－Ｏ－フルロ修飾、ジホスホロチオエート修飾、２′Ｆ修飾ヌクレオチド、２′－Ｏ－メチル修飾および／または２′デオキシヌクレオチドが含まれ得る。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、例えば、ステロール、コレステロール、ビタミンＤ、ナフチル、イソブチル、ベンジル、インドール、トリプトファン、および／またはフェニルを含む１つ以上の疎水性修飾を含むように修飾される。追加の特定の実施形態では、化学的に修飾されたヌクレオチドは、ホスホロチオエート、２′－Ｏ－メチル、２′デオキシ、疎水性修飾、およびホスホロチオエートの組み合わせである。いくつかの実施形態では、糖は修飾され得、修飾された糖には、Ｄ－リボース、２′－Ｏ－アルキル（２′－Ｏ－メチルおよび２′－Ｏ－エチルを含む）、すなわち、２′－アルコキシ、２′－アミノ、２′－Ｓ－アルキル、２′－ハロ（２′－フルオロを含む）、Ｔ－メトキシエトキシ、２′－アリルオキシ（－ＯＣＨ$_2$ＣＨ＝ＣＨ$_2$）、２′－プロパルギル、２′－プロピル、エチニル、エテニル、プロペニル、およびシアノなどが含まれ得るが、これらに限定されない。一実施

形態では、糖部分は、ヘキソースであり得、記載されているようにオリゴヌクレオチドに組み込まれ得る（Ａｕｇｕｓｔｙｎｓ，Ｋ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．１８：４７１１（１９９２））。

【１０２１】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖であり、すなわち、分子のいずれかの末端に一本鎖配列が突出しておらず、すなわち、平滑末端である。いくつかの実施形態では、個々の核酸分子は、異なる長さであり得る。言い換えれば、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖ではない。例えば、２つの別個の核酸分子が使用される場合、分子の１つ、例えば、アンチセンス配列を含む第１の分子は、それにハイブリダイズする（分子の一部を一本鎖のままにする）第２の分子より長くなり得る。いくつかの実施形態では、単一の核酸分子が使用される場合、いずれかの末端の分子の部分は、一本鎖のままであり得る。

【１０２２】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、ミスマッチおよび／またはループもしくはバルジを含むが、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約７０％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約８０％にわたって二本鎖である。別の実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約９０％～９５％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約９６％～９８％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくともまたは最大１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５のミスマッチを含む。

【１０２３】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、例えば、３′または５′結合を修飾することによって、ヌクレアーゼから実質的に保護され得る（例えば、米国特許第５，８４９，９０２号およびＷＯ９８／１３５２６）。例えば、オリゴヌクレオチドは、「ブロッキング基」を含めることによって耐性にすることができる。本明細書で使用される「ブロッキング基」という用語は、合成のための保護基またはカップリング基のいずれか（例えば、ＦＩＴＣ、プロピル（$CH_2-CH_2-CH_3$）、グリコール（$-O-CH_2-CH_2-O-$）ホスフェート（PO_3^{2-}）、ホスホン酸水素、またはホスホルアミダイト）としてオリゴヌクレオチドまたはヌクレオチドモノマーに結合され得る置換基（例えば、ＯＨ基以外）を指す。「ブロッキング基」はまた、修飾ヌクレオチドおよび非ヌクレオチドエキソヌクレアーゼ耐性構造を含む、オリゴヌクレオチドの５′および３′末端を保護する「末端ブロッキング基」または「エキソヌクレアーゼブロッキング基」を含み得る。

【１０２４】

いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡ内の隣接するポリヌクレオチドの少なくとも一部は、代替の結合、例えば、ホスホロチオエート結合によって結合されている。

【１０２５】

いくつかの実施形態では、化学修飾は、細胞取り込みの少なくとも１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００増大につながり得る。いくつかの実施形態では、ＣまたはＵ残基の少なくとも１つは、疎水性修飾を含む。いくつかの実施形態では、複数のＣおよびＵは、疎水性修飾を含む。いくつかの実施形態では、ＣおよびＵの少なくとも１０％、１５％、２０％、３０％、４０％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、または少なくとも９５％は、疎水性修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、ＣおよびＵのすべては

、疎水性修飾を含む。

【１０２６】

いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡまたはｓｄ－ｒｘＲＮＡは、プロトン化可能なアミンの組み込みを介して、ｓｄ－ｒｘＲＮＡ分子のエンドソーム放出の増大を示す。いくつかの実施形態では、プロトン化可能なアミンは、センス鎖（ＲＩＳＣ負荷後に廃棄される分子の一部）に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明のｓｄＲＮＡ化合物は、二重鎖領域（１０～１５塩基長の効率的なＲＩＳＣエントリーに必要）および４～１２ヌクレオチド長の一本鎖領域を含む非対称化合物を、１３ヌクレオチド二重鎖とともに含む。いくつかの実施形態では、６ヌクレオチドの一本鎖領域が用いられる。いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡの一本鎖領域は、２～１２個のホスホロチオエートインテムクレオチド結合（ホスホロチオエート修飾と称される）を含む。いくつかの実施形態では、６～８個のホスホロチオエートインテムクレオチド結合が用いられる。いくつかの実施形態では、本発明のｓｄＲＮＡ化合物はまた、安定性を提供し、ＲＩＳＣエントリーと互換性がある固有の化学修飾パターンを含む。

【１０２７】

例えば、ガイド鎖は、ＲＩＳＣ侵入を干渉することなく安定性を確認する任意の化学修飾によって修飾することもできる。いくつかの実施形態では、ガイド鎖における化学修飾パターンは、２′Ｆ修飾され、５′末端がリン酸化されているＣおよびＵヌクレオチドの大部分を含む。

【１０２８】

いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡまたはｓｄ－ｒｘＲＮＡのヌクレオチドの少なくとも３０％が修飾されている。いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡまたはｓｄ－ｒｘＲＮＡのヌクレオチドの少なくとも３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％が修飾されている。いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡまたはｓｄ－ｒｘＲＮＡのヌクレオチドの１００％が修飾されている。

【１０２９】

いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡ分子は、最小の二本鎖領域を有する。いくつかの実施形態では、二本鎖である分子の領域は、８～１５ヌクレオチド長の範囲である。いくつかの実施形態では、二本鎖である分子の領域は、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、二本鎖領域は、１３ヌクレオチド長である。ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に１００％の相補性がある場合もあれば、ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に１つ以上の不一致がある場合もある。いくつかの実施形態では、二本鎖分子の一端で、分子は平滑末端であるか、または１ヌクレオチドのオーバーハングを有するかのいずれかである。分子の一本鎖領域は、いくつかの実施形態では、４～１２ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２ヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施形態では、一本鎖領域はまた、４ヌクレオチド未満または１２ヌクレオチドを超える長さであり得る。特定の実施形態では、一本鎖領域は、６または７ヌクレオチド長である。

【１０３０】

いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡ分子は、増加した安定性を有する。場合によっては、化学修飾されたｓｄＲＮＡまたはｓｄ－ｒｘＲＮＡ分子は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、または２４時間以上（任意の中間値を含む）の培地中半減期を

有する。いくつかの実施形態では、ｓｄ－ｒｘＲＮＡは、１２時間より長い培地中半減期を有する。

【１０３１】

いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡは、効力の増加および／または毒性の低減のために最適化されている。いくつかの実施形態では、ガイド鎖および／もしくはパッセンジャー鎖のヌクレオチド長、ならびに／またはガイド鎖および／もしくはパッセンジャー鎖におけるホスホロチオエート修飾の数は、いくつかの態様において、ＲＮＡ分子の効力に影響を与え得るが、２′－フルオロ（２′Ｆ）修飾を２′－Ｏ－メチル（２′ＯＭｅ）修飾で置き換えることは、いくつかの態様において、分子の毒性に影響を与え得る。いくつかの実施形態では、分子の２′Ｆ含有量の低減は、分子の毒性を低減すると予測される。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ分子におけるホスホロチオエート修飾の数は、細胞への分子の取り込み、例えば、細胞への分子の受動的取り込みの効率に影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡは、２′Ｆ修飾を有しないが、それでも、細胞取り込みおよび組織浸透における同等の有効性を特徴とする。

【１０３２】

いくつかの実施形態では、ガイド鎖は、長さがおよそ１８～１９ヌクレオチドであり、およそ２～１４個のリン酸修飾を有する。例えば、ガイド鎖は、リン酸修飾された２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１４個より多くのヌクレオチドを含み得る。ガイド鎖には、ＲＩＳＣの侵入を干渉することなく安定性を高める１つ以上の修飾が含まれている場合がある。ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドなどのリン酸修飾ヌクレオチドは、３′末端、５′末端にあるか、またはガイド鎖全体に広がっている可能性がある。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の３′末端１０ヌクレオチドは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを含む。ガイド鎖はまた、分子全体に位置し得る２′Ｆおよび／または２′ＯＭｅ修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の１位のヌクレオチド（ガイド鎖の最５′位のヌクレオチド）は、２′ＯＭｅ修飾および／またはリン酸化されている。ガイド鎖内のＣおよびＵヌクレオチドは、２′Ｆ修飾され得る。例えば、１９ｎｔガイド鎖の２～１０位（または異なる長さのガイド鎖における対応する位置）のＣおよびＵヌクレオチドは、２′Ｆ修飾され得る。ガイド鎖内のＣおよびＵヌクレオチドはまた、２′ＯＭｅ修飾され得る。例えば、１９ｎｔガイド鎖の１１～１８位（または異なる長さのガイド鎖における対応する位置）のＣおよびＵヌクレオチドは、２′ＯＭｅ修飾され得る。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の最３′末端のヌクレオチドは修飾されていない。特定の実施形態では、ガイド鎖内のＣおよびＵの大部分は２′Ｆ修飾されており、ガイド鎖の５′末端はリン酸化されている。他の実施形態では、１位および１１～１８位のＣまたはＵは２′ＯＭｅ修飾されており、ガイド鎖の５′末端はリン酸化されている。他の実施形態では、位置１および位置１１～１８のＣｓまたはＵｓは２′ＯＭｅ修飾されており、ガイド鎖の５′末端はリン酸化されており、２～１０位のＣまたはＵは２′Ｆ修飾されている。

【１０３３】

自己送達可能なＲＮＡｉ技術は、追加の製剤または技法を必要とせずに、ＲＮＡｉ剤で細胞を直接トランスフェクトする方法を提供する。トランスフェクションが困難な細胞株をトランスフェクトする能力、高いインビボ活性、および使用の単純さは、従来のｓｉＲＮＡベースの技法に比べて重要な機能的利点を提示する組成物および方法の特徴であり、したがって、ｓｄＲＮＡ法は、本発明のＴＩＬにおける標的遺伝子の発現の低減の方法に関連するいくつかの実施形態で用いられる。ｓｄＲＮＡｉ法により、化学合成された化合物をエクスビボおよびインビボの両方で広範囲の一次細胞および組織に直接送達することができる。本明細書において本発明のいくつかの実施形態に記載されているｓｄＲＮＡは、Ａｄｖｉｒｎａ ＬＬＣ（Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ，ＭＡ，ＵＳＡ）から市販されている。

【１０３４】

ｓｄＲＮＡは、疎水的に修飾されたｓｉＲＮＡ－アンチセンスオリゴヌクレオチドハイブリッド構造として形成され、例えば、Ｂｙｒｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｄｅｃｅｍｂｅｒ ２

０１３，Ｊ．Ｏｃｕｌａｒ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，２９（１０）：８５５－８６４（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に開示されている。

【１０３５】

いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、無菌エレクトロポレーションを使用して、本明細書に記載されるＴＩＬに送達され得る。特定の実施形態では、この方法は、ｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドを送達するためのＴＩＬの集団の滅菌エレクトロポレーションを含む。

【１０３６】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、膜貫通送達システムと組み合わせて細胞に送達され得る。いくつかの実施形態では、この膜貫通送達システムは、脂質、ウイルスベクター等を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド剤は、自己送達ＲＮＡｉ剤であり、いかなる送達剤も必要としない。特定の実施形態では、この方法は、ｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドをＴＩＬの集団に送達するための膜貫通送達システムの使用を含む。

【１０３７】

オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド組成物は、ＴＩＬによる受動的取り込みを含む、本明細書に記載のＴＩＬと接触され（例えば、接触させられ、本明細書では投与または送達されるとも称される）、ＴＩＬによって取り込まれる。ｓｄＲＮＡは、第１の拡張中（例えば、ステップＢ）、第１の拡張後（例えば、ステップＣ中）、第２の拡張前または最中（例えば、ステップＤの前または最中）、ステップＤ後およびステップＥにおける採取前、ステップＦにおける採取中または採取後、ステップＦにおける最終製剤化および／または注入バッグへの移行前または最中、ならびにステップＦにおける任意の凍結保存ステップ前に、本明細書に記載のＴＩＬに添加され得る。さらに、ｓｄＲＮＡは、ステップＦにおける任意の凍結保存ステップから解凍した後に添加され得る。実施形態では、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、およびＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の遺伝子を標的とする１つ以上のｓｄＲＮＡを、１００ｎＭ～２０ｍＭ、２００ｎＭ～１０ｍＭ、５００ｎｍ～１ｍＭ、１μＭ～１００μＭ、および１μＭ～１００μＭからなる群から選択される濃度のＴＩＬおよび他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。実施形態では、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、およびＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の遺伝子を標的とする１つ以上のｓｄＲＮＡは、０．１μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬｓ／１００μＬ培地、０．５μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬｓ／１００μＬ培地、０．７５μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬｓ／１００μＬ培地、１μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬｓ／１００μＬ培地、１．２５μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬｓ／１００μＬ培地、１．５μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬｓ／１００μＬ培地、２μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬｓ／１００μＬ培地、５μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬｓ／１００μＬ培地、または１０μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬｓ／１００μＬ培地からなる群から選択される量でＴＩＬおよび他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。実施形態では、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、およびＣＢＬＢを含む、本明細書に記載される１つ以上のｓｄＲＮＡ標的遺伝子は、ｐｒｅ－ＲＥＰまたはＲＥＰステージ中に１日２回、１日１回、２日ごと、３日ごと、４日ごと、５日ごと、５日ごと、６日ごと、または７日ごとにＴＩＬ培養物に添加され得る。

【１０３８】

ｓｄＲＮＡを含む本発明のオリゴヌクレオチド組成物は、例えば、細胞培養培地に高濃度でｓｄＲＮＡを溶解し、受動的取り込みが起こるのに十分な時間を与えることによって、拡張プロセス中に本明細書に記載されるようにＴＩＬと接触させることができる。特定の実施形態では、本発明の方法は、ＴＩＬの集団を、本明細書に記載されるようなオリゴヌクレオチド組成物と接触させることを含む。特定の実施形態では、この方法は、オリゴヌクレオチド、例えばｓｄＲＮＡを細胞培養培地に溶解することと、細胞培養培地をＴＩ

Ｌの集団と接触させることとを含む。ＴＩＬは、本明細書に記載される第１の集団、第２の集団、および／または第３の集団であり得る。

【１０３９】

いくつかの実施形態では、細胞へのオリゴヌクレオチドの送達は、リン酸カルシウム、ＤＭＳＯ、グリセロールもしくはデキストラン、エレクトロポレーションを含む好適な当該技術分野で認められた方法によって、あるいはトランスフェクションによって、例えば、カチオン性、アニオン性、もしくは中性脂質組成物またはリポソームを使用し、当該技術分野において知られている方法を使用して強化され得る（例えば、ＷＯ９０／１４０７４、ＷＯ９１／１６０２４、ＷＯ９１／１７４２４、米国特許第４，８９７，３５５号、Ｂｅｒｇａｎ ｅｔ ａ １９９３．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ．２１：３５６７を参照）。

【１０４０】

いくつかの実施形態では、２つ以上のｓｄＲＮＡを使用して、標的遺伝子の発現を低減する。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、および／またはＣＩＳＨのうちの１つ以上を標的とするｓｄＲＮＡが一緒に使用される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１　ｓｄＲＮＡは、２つ以上の遺伝子標的の発現を低減するために、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、および／またはＣＩＳＨのうちの１つ以上とともに使用される。いくつかの実施形態では、ＬＡＧ３　ｓｄＲＮＡは、両方の標的の遺伝子発現を低減するために、ＣＩＳＨを標的とするｓｄＲＮＡと組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、本明細書におけるＰＤ－１、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、および／またはＣＩＳＨのうちの１つ以上を標的とするｓｄＲＮＡは、Ａｄｖｉｒｎａ ＬＬＣ（Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ，ＭＡ，ＵＳＡ）から市販されている。

【１０４１】

いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、別のｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、およびそれらの組み合わせから選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ならびにＬＡＧ３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３のうちの１つ、およびそれらの組み合わせから選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡはＰＤ－１を標的とし、１つのｓｄＲＮＡはＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡはＰＤ－１を標的とし、１つのｓｄＲＮＡはＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡはＰＤ－１を標的とし、１つのｓｄＲＮＡはＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡはＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｄＲＮＡはＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡはＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｄＲＮＡはＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡはＣＩＳＨを標的とし、１つのｓｄＲＮＡはＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡはＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｄＲＮＡはＰＤ－１を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡはＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｄＲＮＡはＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡはＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｄＲＮＡはＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡはＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｄＲＮＡはＣＢＬＢを標的とする。

【１０４２】

上で考察されたように、本発明の実施形態は、それらの治療効果を強化するために遺伝子編集を介して遺伝子改変された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を提供する。本発明の実施形態は、１つ以上のタンパク質の発現の促進および１つ以上のタンパク質の発現の阻害の両方、ならびにそれらの組み合わせのための、ＴＩＬの集団へのヌクレオチド挿入（ＲＮＡまたはＤＮＡ）による遺伝子編集を包含する。本発明の実施形態はまた、ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法を提供し、この方法は、ＴＩＬを遺伝子編集することを含む。ＴＩＬの集団を遺伝子改変するために使用され得るいくつかの遺伝子編集技術があり、それらは本発明による使用に適している。

【１０４３】

いくつかの実施形態では、この方法は、１つ以上のタンパク質の産生のための遺伝子の安定した組み込みのステップを含む、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法を含む。実施形態では、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、レトロウイルス形質導入のステップを含む。実施形態では、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、レンチウイルス形質導入のステップを含む。レンチウイルス形質導入システムは、当該技術分野で知られており、例えば、Ｌｅｖｉｎｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ′ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．２００６，１０３，１７３７２－７７、Ｚｕｆｆｅｒｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９７，１５，８７１－７５、Ｄｕｌｌ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９９８，７２，８４６３－７１、および米国特許第６，６２７，４４２号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。実施形態では、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、γレトロウイルス形質導入のステップを含む。γレトロウイルス形質導入システムは、当該技術分野で知られており、例えば、Ｃｅｐｋｏ ａｎｄ Ｐｅａｒ，Ｃｕｒ．Ｐｒｏｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９６，９．９．１－９．９．１６に記載されており、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。実施形態では、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入のステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入系は、当該技術分野で知られており、トランスポザーゼが、ＤＮＡ発現ベクターとして、または発現可能なＲＮＡもしくはタンパク質として提供される系を含み、それによりトランスポザーゼ、例えばｍＲＮＡ（例えば、キャップおよびポリＡ尾部を含むｍＲＮＡ）として提供されるトランスポザーゼの長期発現が、トランスジェニック細胞で起こらないようにする。ＳＢ１０、ＳＢ１１、およびＳＢ１００ｘなどのサケ型Ｔｅｌ様トランスポザーゼ（ＳＢまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼ）を含む好適なトランスポゾン媒介遺伝子導入システム、ならびに増加した酵素活性を有する操作された酵素は、例えば、Ｈａｃｋｅｔｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ ２０１０，１８，６７４－８３および米国特許第６，４８９，４５８号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１０４４】

実施形態では、この方法は、ＴＩＬの集団、例えば本明細書に記載される第１の集団、第２の集団、および／または第３の集団を遺伝子改変する方法を含む。実施形態では、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、１つ以上のタンパク質の産生または阻害（例えば、サイレンシング）のための遺伝子の安定した組み込みのステップを含む。実施形態では、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、エレクトロポレーションのステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｔｓｏｎｇ，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．１９９１，６０，２９７－３０６および米国特許出願公開第２０１４／０２２７２３７Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。米国特許第５，０１９，０３４号、同第５，１２８，２５７号、同第５，１３７，８１７号、同第５，１７３，１５８号、同第５，２３２，８５６号、同第５，２７３，５２５号、同第５，３０４，１２０号、同第５，３１８，５１４号、同第６，０１０，６１３号、および同第６，０７８，４９０号（これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどの、当該技術分野において知られている他のエレクトロポレーション法が使用され得る。実施形態では、エレクトロポレーション法は、無菌エレクトロポレーション法である。実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルスエレク

トロポレーション法である。実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルス電場でＴＩＬを処理して、ＴＩＬの定義され制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つは、パルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つは、パルス幅が互いに異なる、および（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔は、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルス電場でＴＩＬを処理して、ＴＩＬの定義され制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つは、パルス振幅が互いに異なる。実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルス電場でＴＩＬを処理して、ＴＩＬの定義され制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つは、パルス幅が互いに異なる。実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルス電場でＴＩＬを処理して、ＴＩＬの定義され制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つの第１のセットの第１のパルス間隔は、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルス電場でＴＩＬを処理して、ＴＩＬにおける細孔形成を誘導するステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つは、パルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つは、パルス幅が互いに異なる、および（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔は、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なり、それにより誘導された細孔は、比較的長期間にわたって持続され、ＴＩＬの生存性が維持される。実施形態では、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションのステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法（リン酸カルシウムＤＮＡ沈殿、細胞表面コーティング、およびエンドサイトーシス）は、当該技術分野で知られており、Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９７３，５２，４５６－４６７、Ｗｉｇｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１９７９，７６，１３７３－１３７６、およびＣｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｒｅａ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１９８７，７，２７４５－２７５２、ならびに米国特許第５，５９３，８７５号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。実施形態では、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、リポソームトランスフェクションのステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えばカチオン性脂質Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－ｎ，ｎ，ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）およびジオレオイルホスホチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム製剤を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Ｒｏ

ｓｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １９９１，１０，５２０－５２５およびＦｅｌｇｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８７，８４，７４１３－７４１７、ならびに米国特許第５，２７９，８３３号、同第５，９０８，６３５号、同第６，０５６，９３８号、同第６，１１０，４９０号、同第６，５３４，４８４号、および同第７，６８７，０７０号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。実施形態では、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、米国特許第５，７６６，９０２号、同第６，０２５，３３７号、同第６，４１０，５１７号、同第６，４７５，９９４号、および同第７，１８９，７０５号に記載されている方法を使用するトランスフェクションのステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＴＩＬは、本明細書に記載されるＴＩＬの第１の集団、第２の集団、および／または第３の集団であり得る。

【１０４５】

実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。かかるプログラム可能なヌクレアーゼは、特定のゲノム遺伝子座に切断を導入することによって正確なゲノム編集を可能にし、すなわち、ゲノム内の特定のＤＮＡ配列の認識に依存して、ヌクレアーゼドメインをこの位置に標的し、標的配列における二本鎖切断の生成を媒介する。ＤＮＡの二本鎖切断は、その後、内因性修復機構を切断部位に動員して、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）または相同性指向修復（ＨＤＲ）のいずれかによるゲノム編集を媒介する。したがって、切断の修復は、標的遺伝子産物を破壊する（例えば、サイレンス、抑制、または強化する）挿入／欠失突然変異の導入をもたらす可能性がある。

【１０４６】

部位特異的ゲノム編集を可能にするために開発されたヌクレアーゼの主要なクラスには、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写活性化因子様ヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、およびＣＲＩＳＰＲ関連ヌクレアーゼ（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９）が含まれる。これらのヌクレアーゼシステムは、ＤＮＡ認識のモードに基づいて大きく２つのカテゴリーに分類され得、ＺＦＮおよびＴＡＬＥＮは、タンパク質－ＤＮＡ相互作用を介して特定のＤＮＡ結合を達成するが、Ｃａｓ９などのＣＲＩＳＰＲシステムは、標的ＤＮＡと直接およびタンパク質－ＤＮＡ相互作用によって塩基対を形成する短いＲＮＡガイド分子によって特定のＤＮＡ配列を標的とする。例えば、Ｃｏｘ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２０１５，Ｖｏｌ．２１，Ｎｏ．２を参照されたい。

【１０４７】

本発明のＴＩＬ拡張法に従って使用することができる遺伝子編集法の非限定的な例には、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、およびＺＦＮ法が含まれ、これらは以下でより詳細に説明される。実施形態によれば、ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法の任意の実施形態（例えば、ＧＥＮ３プロセス）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、この方法は、強化された治療効果を提供することができるＴＩＬを生成するために、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはＺＦＮ法のうちの１つ以上によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。実施形態によれば、遺伝子編集されたＴＩＬは、それらをインビトロで非修飾ＴＩＬと比較することによって、例えば、非修飾ＴＩＬと比較してインビトロでエフェクター機能、サイトカインプロファイルなどを評価することによって、治療効果の改善について評価することができる。特定の実施形態では、この方法は、ＣＲＩＳＰＲ、ＴＡＬＥ、および／またはＺＦＮ法を使用してＴＩＬの集団を遺伝子編集することを含む。

【１０４８】

本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションは、ＣＲＩＳＰＲ、ＴＡＬＥＮ、およびＺＦＮシステムなどの遺伝子編集システムの送達のために使用される。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、フローエレクトロポ

レーションシステムである。本発明のいくつかの実施形態での使用に適した好適なフローエレクトロポレーションシステムの例は、市販のＭａｘＣｙｔｅ　ＳＴＸシステムである。本発明での使用に好適であり得る、ＢＴＸ－Ｈａｒｖａｒｄ　Ａｐｐａｒａｔｕｓから入手可能なＡｇｉｌｅＰｕｌｓｅシステムもしくはＥＣＭ８３０、Ｃｅｌｌａｘｅｓｓ　Ｅｌｅｋｔｒａ（Ｃｅｌｌｅｃｔｒｉｃｏｎ）、Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（Ｌｏｎｚａ／Ａｍａｘａ）、ＧｅｎｅＰｕｌｓｅｒ　ＭＸｃｅｌｌ（ＢＩＯＲＡＤ）、ｉＰｏｒａｔｏｒ－９６（Ｐｒｉｍａｘ）、またはｓｉＰＯＲＴｅｒ９６（Ａｍｂｉｏｎ）などのいくつかの代替の市販エレクトロポレーション器具が存在する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、ＴＩＬ拡張法の残りの部分とともに、閉じた無菌システムを形成する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、本明細書に記載されるようなパルスエレクトロポレーションシステムであり、ＴＩＬ拡張法の残りの部分とともに、閉じた無菌システムを形成する。

【１０４９】

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法の任意の実施形態（例えば、プロセスＧＥＮ３）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、この方法は、ＣＲＩＳＰＲ法（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１）によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣＲＩＳＰＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは低減させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣＲＩＳＰＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において強化させる。

【１０５０】

ＣＲＩＳＰＲは、「Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ　Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ　Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ　Ｓｈｏｒｔ　Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ　Ｒｅｐｅａｔｓ（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート）」の略である。遺伝子編集のためにＣＲＩＳＰＲシステムを使用する方法は、本明細書ではＣＲＩＳＰＲ法とも称される。ＲＮＡおよびＣａｓタンパク質を組み込み、本発明に従って使用することができるＣＲＩＳＰＲシステムには、３つのタイプ：タイプＩ、ＩＩ、およびＩＩＩがある。タイプＩＩ　ＣＲＩＳＰＲ（Ｃａｓ９によって例示される）は、最もよく特徴付けられているシステムのうちの１つである。

【１０５１】

ＣＲＩＳＰＲ技術は、細菌および古細菌（単細胞微生物のドメイン）の自然な防御機序から採用された。これらの生物は、ＣＲＩＳＰＲ由来のＲＮＡおよびＣａｓ９を含む様々なＣａｓタンパク質を使用して、外来侵入物のＤＮＡを切り刻んで破壊することにより、ウイルスおよび他の異物による攻撃を阻止する。ＣＲＩＳＰＲは、ヌクレオチド反復およびスペーサーの存在という２つの異なる特徴を有するＤＮＡの特殊な領域である。ヌクレオチドの反復配列は、ＣＲＩＳＰＲ領域全体に分布しており、外来ＤＮＡ（スペーサー）の短いセグメントが反復配列の間に散在している。タイプＩＩ　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムでは、スペーサーは、ＣＲＩＳＰＲゲノム遺伝子座内に統合され、転写されて短いＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）に処理される。これらのｃｒＲＮＡは、トランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）にアニーリングし、Ｃａｓタンパク質による病原性ＤＮＡの配列特異的な切断およびサイレンシングを指示する。Ｃａｓ９タンパク質による標的認識には、ｃｒＲＮＡ内の「シード」配列、およびｃｒＲＮＡ結合領域の上流にある保存されたジヌクレオチドを含むプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列が必要である。これにより、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムを再標的して、ｃｒＲＮＡを再設計することにより、事実上すべてのＤＮＡ配列を切断することができる。ネイティブシステムにおけるｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡは、遺伝子工学で使用するために、およそ１００ヌクレオチドの単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）に簡略化され得る。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼおよび必要なｃｒＲＮＡ成分を発現する

プラスミドを同時送達することによって、ヒト細胞に直接移動可能である。Ｃａｓタンパク質の異なる多様体（例えば、Ｃｐｆ１などのＣａｓ９のオルソログ）を使用して、標的の制限を低減することができる。

【１０５２】

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

【１０５３】

ＣＲＩＳＰＲ法を介してＴＩＬを永久的に遺伝子編集することによって強化され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ１２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１が含まれる。

【１０５４】

ＣＲＩＳＰＲ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用することができるシステム、方法、および組成物の例は、米国特許第８，６９７，３５９号、同第８，９９３，２３３号、同第８，７９５，９６５号、同第８，７７１，９４５号、同第８，８８９，３５６号、同第８，８６５，４０６号、同第８，９９９，６４１号、同第８，９４５，８３９号、同第８，９３２，８１４号、同第８，８７１，４４５号、同第８，９０６，６１６号、および同第８，８９５，３０８号に記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９およびＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１を発現するためのプラスミドなどのＣＲＩＳＰＲ法を実行するためのリソースは、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔなどの企業から市販されている。

【１０５５】

実施形態では、本明細書に記載のＴＩＬの集団の遺伝子改変は、米国特許第ＵＳ９７９０４９０号に記載されているＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１システムを使用して行うことができ、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１０５６】

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、この方法は、ＴＡＬＥ法によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは低減させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において強化させる。

【１０５７】

ＴＡＬＥは、ＴＡＬＥＮ（「転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ」）を含む、「Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ａｃｔｉｖａｔｏｒ－Ｌｉｋｅ Ｅｆｆｅｃｔｏｒ（転写活性化因子様エフェクター）」タンパク質の略である。遺伝子編集のためにＴＡＬＥシステムを使用する方法は、本明細書では、ＴＡＬＥ法とも称され得る。ＴＡＬＥは、植物病原菌Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ属の天然に存在するタンパク質であり、各々が単一の塩基対を認識する一連の３３～３５アミノ酸反復ドメインで構成されるＤＮＡ結合ドメインを含

む。ＴＡＬＥの特異性は、反復可変二残基（ＲＶＤ）として知られる２つの超可変アミノ酸によって決定される。モジュラーＴＡＬＥ反復は、隣接するＤＮＡ配列を認識するために一緒に結合される。ＤＮＡ結合ドメイン内の特定のＲＶＤは、標的遺伝子座の塩基を認識し、予測可能なＤＮＡ結合ドメインを組み立てるための構造的特徴を提供する。ＴＡＬＥのＤＮＡ結合ドメインは、ＩＩＳ型ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼの触媒ドメインに融合して、標的可能なＴＡＬＥヌクレアーゼを作製する。部位特異的突然変異を誘導するために、１４～２０塩基対のスペーサー領域によって分離された２つの個々のＴＡＬＥＮアームが、ＦｏｋＩモノマーを近接させて二量体化し、標的となる二本鎖切断を産生する。

【１０５８】

様々な組み立て方法を利用したいくつかの大規模で体系的な研究により、ＴＡＬＥ反復を組み合わせて、事実上すべてのユーザー定義配列を認識できることが示されている。カスタム設計されたＴＡＬＥアレイはまた、Ｃｅｌｌｅｃｔｉｓ Ｂｉｏｒｅｓｅａｒｃｈ（Ｐａｒｉｓ，Ｆｒａｎｃｅ）、Ｔｒａｎｓｐｏｓａｇｅｎ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ，ＫＹ，ＵＳＡ）、およびＬｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ，ＵＳＡ）から市販されている。本発明での使用に適したＴＡＬＥおよびＴＡＬＥＮ法は、米国特許公開第ＵＳ２０１１／０２０１１８Ａ１、ＵＳ２０１３／０１１７８６９Ａ１、ＵＳ２０１３／０３１５８８４Ａ１、ＵＳ２０１５／０２０３８７１Ａ１、およびＵＳ２０１６／０１２０９０６Ａ１に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１０５９】

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

【１０６０】

ＴＡＬＥ法を介してＴＩＬを永久的に遺伝子編集することによって強化され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ１２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１が含まれる。

【１０６１】

ＴＡＬＥ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用することができるシステム、方法、および組成物の例は、米国特許第８，５８６，５２６号に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【１０６２】

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法の任意の実施形態（例えば、プロセスＧＥＮ３）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、この方法は、ジンクフィンガーまたはジンクフィンガーヌクレアーゼ法によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは低減させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において強化させる。

【１０６３】
個々のジンクフィンガーは、保存されたββα構成でおよそ３０個のアミノ酸を含む。αらせんの表面上のいくつかのアミノ酸は、典型的に、異なる選択性のレベルでＤＮＡの主溝の３ｂｐに接触する。ジンクフィンガーは、２つのタンパク質ドメインを有する。第１のドメインは、ＤＮＡ結合ドメインであり、真核生物の転写因子を含み、ジンクフィンガーを含有する。第２のドメインは、ヌクレアーゼドメインであり、ＦｏｋＩ制限酵素を含み、ＤＮＡの触媒的切断を担っている。

【１０６４】
個々のＺＦＮのＤＮＡ結合ドメインは、典型的に、３～６個の個々のジンクフィンガー反復を含み、各々９～１８塩基対を認識することができる。ジンクフィンガードメインが目的の標的部位に特異的である場合、合計１８塩基対を認識する３フィンガーＺＦＮの対でさえ、理論的には、哺乳動物ゲノムの単一遺伝子座を標的とすることができる。新しいジンクフィンガーアレイを生成する１つの方法は、既知の特異性を持つより小さなジンクフィンガー「モジュール」を組み合わせることである。最も一般的なモジュラーアセンブリプロセスは、各々が３塩基対のＤＮＡ配列を認識できる３つの別個のジンクフィンガーを組み合わせて、９塩基対の標的部位を認識できる３フィンガーアレイを生成することを伴う。代替的に、オリゴマー化プールエンジニアリング（ＯＰＥＮ）などの選択ベースのアプローチを使用して、隣接するフィンガー間のコンテキスト依存的相互作用を考慮したランダム化ライブラリーから新しいジンクフィンガーアレイを選択することができる。設計されたジンクフィンガーは市販されており、Ｓａｎｇａｍｏ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｒｉｃｈｍｏｎｄ，ＣＡ，ＵＳＡ）は、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＵＳＡ）と共同で、ジンクフィンガー構築のための適切なプラットフォーム（ＣｏｍｐｏＺｒ（登録商標））を開発した。

【１０６５】
ジンクフィンガー法を介してＴＩＬを永久的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、およびＧＵＣＹ１Ｂ３が含まれる。

【１０６６】
ジンクフィンガー法を介してＴＩＬを永久的に遺伝子編集することによって強化され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ１２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１が含まれる。

【１０６７】
ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用することができるシステム、方法、および組成物の例は、米国特許第６，５３４，２６１号、同第６，６０７，８８２号、同第６，７４６，８３８号、同第６，７９４，１３６号、同第６，８２４，９７８号、同第６，８６６，９９７号、同第６，９３３，１１３号、同第６，９７９，５３９号、同第７，０１３，２１９号、同第７，０３０，２１５号、同第７，２２０，７１９号、同第７，２４１，５７３号、同第７，２４１，５７４号、同第７，５８５，８４９号、同第７，５９５，３７６号、同第６，９０３，１８５号、および同第６，４７９，６２６号に記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。

【１０６８】

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

【１０６９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、高親和性Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）、例えば、ＭＡＧＥ－１、ＨＥＲ２、もしくはＮＹ－ＥＳＯ－１などの腫瘍関連抗原で標的されるＴＣＲ、または腫瘍関連細胞表面分子（例えば、メソセリン）もしくは系統制限細胞表面分子（例えば、ＣＤ１９）に結合するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含むがこれらに限定されない追加の機能を含むように任意に遺伝子操作される。特定の実施形態では、この方法は、高親和性Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）、例えば、ＭＡＧＥ－１、ＨＥＲ２、もしくはＮＹ－ＥＳＯ－１などの腫瘍関連抗原で標的されるＴＣＲ、または腫瘍関連細胞表面分子（例えば、メソセリン）もしくは系統制限細胞表面分子（例えば、ＣＤ１９）に結合するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含むように、ＴＩＬの集団を遺伝子操作することを含む。適切には、ＴＩＬの集団は、本明細書に記載される第１の集団、第２の集団、および／または第３の集団であり得る。

【１０７０】

Ｋ．ＴＩＬ製造のための閉鎖系

本発明は、ＴＩＬ培養プロセス中の閉鎖系の使用を提供する。かかる閉鎖系は、微生物汚染の防止および／または低減を可能にし、より少ないフラスコの使用を可能にし、かつコスト削減を可能にする。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、２つの容器を使用する。

【１０７１】

かかる閉鎖系は当該技術分野でよく知られており、例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｆｄａ．ｇｏｖ／ｃｂｅｒ／ｇｕｉｄｅｌｉｎｅｓ．ｈｔｍおよびｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｆｄａ．ｇｏｖ／ＢｉｏｌｏｇｉｃｓＢｌｏｏｄＶａｃｃｉｎｅｓ／ＧｕｉｄａｎｃｅＣｏｍｐｌｉａｎｃｅＲｅｇｕｌａｔｏｒｙＩｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ／Ｇｕｉｄａｎｃｅｓ／Ｂｌｏｏｄ／ｕｃｍ０７６７７９．ｈｔｍで見出すことができる。

【１０７２】

無菌接続装置（ＳＴＣＤ）は、互換性のある２本の管の間の無菌溶接を行う。この手順により、様々な容器と管の直径を無菌接続することができる。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、例えば実施例Ｇに記載されるようなルアーロック系およびヒートシール系を含む。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、系の無菌性および閉鎖性を維持するために、無菌条件下で注射器を介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、実施例Ｇに記載されるような閉鎖系が用いられる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、実施例Ｇのセクション「最終製剤および充填」に記載される方法に従って、最終製品製剤容器に配合される。

【１０７３】

いくつかの実施形態では、閉鎖系は、腫瘍断片が得られてから、ＴＩＬが患者への投与または凍結保存の準備ができるまで、１つの容器を使用する。いくつかの実施形態では、２つの容器が使用される場合、第１の容器は閉じたＧ容器であり、ＴＩＬの集団は遠心分離され、第１の閉じたＧ容器を開かずに注入バッグに移される。いくつかの実施形態では、２つの容器が使用される場合、注入バッグは、ＨｙｐｏＴｈｅｒｍｏｓｏｌを含有する注入バッグである。閉鎖系または閉鎖ＴＩＬ細胞培養系は、腫瘍試料および／または腫瘍断片が追加されると、系が外部からしっかりと密閉され、細菌、真菌、および／またはいかなる他の微生物汚染も侵入しない閉鎖環境を形成することを特徴とする。

【１０７４】

いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％～約１００％の間である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％～約９５％の間である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％～約９０％の間である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約１０％～約９０％の間である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約１５％～約８５％の間である。いくつかの実施形態では、微生物汚

染の低減は、約５％、約１０％、約１５％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、約９７％、約９８％、約９９％、または約１００％である。

【１０７５】

閉鎖系は、微生物汚染がない状態で、および／または微生物汚染を大幅に低減して、ＴＩＬの成長を可能にする。

【１０７６】

さらに、ＴＩＬ細胞培養環境のｐＨ、二酸化炭素分圧、および酸素分圧は各々、細胞が培養されるにつれて変化する。したがって、細胞培養に適した培地を循環させても、ＴＩＬ増殖に最適な環境として常に閉鎖環境を一定に維持する必要がある。この目的のために、閉鎖環境の培養液内のｐＨ、二酸化炭素分圧、および酸素分圧の物理的要因をセンサーによって監視すること、そのシグナルを使用して、培養環境の入口に設置されたガス交換器を制御すること、および細胞培養環境を最適化するように、閉鎖環境のガス分圧を培養液の変化に応じてリアルタイムで調整することが望ましい。いくつかの実施形態では、本発明は、閉鎖環境への入口に、閉鎖環境のｐＨ、二酸化炭素分圧、および酸素分圧を測定するモニタリング装置を備えたガス交換器を組み込む閉鎖細胞培養システムを提供し、モニタリング装置からのシグナルに基づいてガス濃度を自動的に調整することによって、細胞培養環境を最適化する。

【１０７７】

いくつかの実施形態では、閉鎖環境内の圧力は、連続的または断続的に制御される。すなわち、閉鎖環境における圧力は、例えば、圧力維持装置によって変化させることができ、したがって、空間が正圧状態でのＴＩＬの成長に好適であることを保証するか、または負圧状態での流体の浸出を促進し、したがって、細胞増殖を促進する。さらに、断続的に陰圧を加えることにより、閉鎖環境の体積の一時的な収縮によって、閉鎖環境内の循環液体を均一かつ効率的に置き換えることが可能である。

【１０７８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの増殖のための最適な培養成分を置換または添加することができ、ＩＬ－２および／またはＯＫＴ３などの因子、ならびに組み合わせを添加することができる。

【１０７９】

Ｌ．ＴＩＬの任意の凍結保存

バルクＴＩＬ集団（例えば、第２のＴＩＬ集団）または拡張されたＴＩＬ集団（例えば、第３のＴＩＬ集団）のいずれかを、任意に凍結保存することができる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、治療的ＴＩＬ集団上で起こる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、第２の拡張後に採取されたＴＩＬ上で起こる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、図８の例示的なステップＦ（特に、例えば、図８Ｂおよび／または図８Ｃ）においてＴＩＬ上で起こる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、注入バッグ内で凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、注入バッグに入れる前に凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、凍結保存され、注入バッグに入っていない。いくつかの実施形態では、凍結保存は、凍結保存培地を使用して行われる。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含有する。これは一般に、ＴＩＬ集団を凍結溶液、例えば８５％補体不活化ＡＢ血清および１５％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に入れることによって達成される。溶液中の細胞を極低温バイアルに入れ、－８０℃で２４時間保存し、任意に、凍結保存のためにガス状窒素冷凍庫に移す。Ｓａｄｅｇｈｉ，ｅｔ ａｌ．，Ａｃｔａ Ｏｎｃｏｌｏｇｉｃａ ２０１３，５２，９７８－９８６を参照されたい。

【１０８０】

必要に応じて、細胞を冷凍庫から取り出し、溶液のおよそ５分の４が解凍されるまで、３７℃の水浴中で解凍する。細胞は、一般に完全培地に再懸濁され、任意に１回以上洗浄

される。いくつかの実施形態では、解凍されたＴＩＬは、当該技術分野で知られているようにカウントされ、生存率について評価することができる。

【１０８１】

好ましい実施形態では、ＴＩＬの集団は、ＣＳ１０凍結保存培地（ＣｒｙｏＳｔｏｒ１０、ＢｉｏＬｉｆｅ Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ）を使用して凍結保存される。好ましい実施形態では、ＴＩＬの集団は、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含有する凍結保存培地を使用して凍結保存される。好ましい実施形態では、ＴＩＬの集団は、１：１（体積：体積）比のＣＳ１０および細胞培養培地を使用して凍結保存される。好ましい実施形態では、ＴＩＬの集団は、約１：１（体積：体積）比のＣＳ１０および細胞培養培地を使用して凍結保存され、さらに追加のＩＬ－２を含む。

【１０８２】

上で考察されたように、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に示されるステップＡ～Ｅで例示されるように、凍結保存は、ＴＩＬ拡張プロセス全体の様々な時点で起こり得る。いくつかの実施形態では、第２の拡張後の拡張されたＴＩＬ集団（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）のステップＤに従って提供される）を、凍結保存することができる。凍結保存は、一般に、ＴＩＬ集団を凍結溶液、例えば８５％補体不活化ＡＢ血清および１５％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に入れることによって達成することができる。溶液中の細胞を極低温バイアルに入れ、－８０℃で２４時間保存し、任意に、凍結保存のためにガス状窒素冷凍庫に移す。Ｓａｄｅｇｈｉ，ｅｔａｌ．，Ａｃｔａ Ｏｎｃｏｌｏｇｉｃａ ２０１３，５２，９７８－９８６を参照されたい。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、５％ ＤＭＳＯ中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、５％ ＤＭＳＯを加えた細胞培養培地中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、実施例Ｄに提供される方法に従って凍結保存される。

【１０８３】

必要に応じて、細胞を冷凍庫から取り出し、溶液のおよそ５分の４が解凍されるまで、３７℃の水浴中で解凍する。細胞は、一般に完全培地に再懸濁され、任意に１回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍されたＴＩＬは、当該技術分野で知られているようにカウントされ、生存率について評価することができる。

【１０８４】

場合によっては、以下で考察されるプロトコルを使用して、ステップＢ ＴＩＬ集団を直ちに凍結保存することができる。代替的に、バルクＴＩＬ集団をステップＣおよびステップＤに供し、ステップＤの後に凍結保存することができる。同様に、遺伝子操作されたＴＩＬを治療に使用する場合、ステップＢまたはステップＤ ＴＩＬ集団を好適な治療のために遺伝子改変に供することができる。

【１０８５】

Ｍ．拡張ＴＩＬの表現型特徴

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書および実施例に記載されているものを含む、拡張後の多数の表現型マーカーの発現について分析される。実施形態では、１つ以上の表現型マーカーの発現が調べられる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、ステップＢにおける第１の拡張後に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、ステップＣにおける移行中に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、ステップＣによる移行中および凍結保存後に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、ステップＤによる第２の拡張後に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、ステップＤによる２回以上の拡張後に分析される。

【１０８６】

いくつかの実施形態では、マーカーは、ＣＤ８およびＣＤ２８からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＣＤ８の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、ＣＤ２８の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、ＣＤ８および／またはＣＤ２８の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ

）に提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に提供される２Ａプロセスと比較して、本発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、ＣＤ８の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば図８Ｂ）に提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に提供される２Ａプロセスと比較して、本発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、ＣＤ２８の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば図８Ａ）に提供される２Ａプロセスと比較して、本発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、高いＣＤ２８発現は、より若く、より永続的なＴＩＬ表現型を示す。実施形態では、１つ以上の調節マーカーの発現が測定される。

【１０８７】

実施形態では、ＣＤ８および／またはＣＤ２８に基づく第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、第３のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団の選択は、本明細書に記載される腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を拡張するための方法のいずれのステップの間も行われない。

【１０８８】

いくつかの実施形態では、セントラルメモリー細胞のパーセンテージは、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば図８Ａ）に提供される２Ａプロセスと比較して、本発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、セントラルメモリー細胞のメモリーマーカーは、ＣＣＲ７およびＣＤ６２Ｌからなる群から選択される。

【１０８９】

いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋および／またはＣＤ８＋ＴＩＬメモリーサブセットは、異なるメモリーサブセットに分割することができる。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋および／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、ナイーブ（ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＤ６２Ｌ＋）ＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋および／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、セントラルメモリー（ＣＭ、ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ６２Ｌ＋）ＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋および／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、エフェクターメモリー（ＥＭ、ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ６２Ｌ－）ＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋および／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、ＲＡ＋エフェクターメモリー／エフェクター（ＴＥＭＲＡ／ＴＥＦＦ、ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＤ６２Ｌ＋）ＴＩＬを含む。

【１０９０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、グランザイムＢ、パーフォリン、およびグラニュライシンからなる群から選択されるもう１つのマーカーを発現する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、グランザイムＢを発現する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、パーフォリンを発現する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、グラニュライシンを発現する。

【１０９１】

実施形態では、再刺激されたＴＩＬはまた、サイトカイン放出アッセイを使用して、サイトカイン放出について評価され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、インターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）分泌について評価され得る。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、ＥＬＩＳＡアッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、例えば、図８（特に、例えば、図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に提供されるように、ステップＤの後の第２の急速拡張ステップの後のＥＬＩＳＡアッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの健康は、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）分泌によって測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、活性なＴＩＬを示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ産生のための効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能に関する別の尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、ＣＤ３、ＣＤ２

８、およびＣＤ１３７／４－１ＢＢに対する抗体で刺激されたＴＩＬの培地中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することによって測定され得る。これらの刺激されたＴＩＬからの培地中のＩＦＮ－γレベルは、ＩＦＮ－γ放出を測定することによって決定され得る。いくつかの実施形態では、例えば図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）ＴＩＬに提供されるようなＧｅｎ３プロセスのステップＤにおけるＩＦＮ－γ産生の増加は、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ）に提供される２Ａプロセスは、ステップＤＴＩＬの細胞傷害能の増加を示している。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上に増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、２倍に増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、３倍に増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、４倍に増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、５倍に増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ ＥＬＩＳＡキットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、エクスビボでＴＩＬにおいて測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば図８Ｂの方法を含む、本発明の方法によって産生されたＴＩＬを含む、ＴＩＬにおいてエクスビボで測定される。

【１０９２】

いくつかの実施形態では、少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ｂおよび／または図８Ｃの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ｂおよび／または図８Ｃの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ｂおよび／または図８Ｃの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ｂおよび／または図８Ｃの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ｂおよび／または図８Ｃの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ｂおよび／または図８Ｃの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。

【１０９３】

Ｔリンパ球およびＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた、但し多数の遺伝子セグメントの体細胞組み換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、およびＣ（一定）は、免疫グロブリンおよびＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性および下流への応用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって得られたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって得られたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬおよび／または例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって得られたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬならびに／または図８（特に、例えば図８Ａ）に例示されるようにプロセス２Ａと称される方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第１の拡張において得られたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性および／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実

施形態では、多様性は、α、β、γ、およびδ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）αおよび／またはβの発現が増加している。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）αの発現が増加している。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）βの発現が増加している。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加している。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセス（例えば、Ｇｅｎ３プロセス）は、他のプロセス、例えば、試料内の固有のペプチドＣＤＲの数に基づいてＧｅｎ２と称されるプロセスと比較して、より高いクローン多様性を示す（例えば、図１２～１４を参照）。

【１０９４】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの活性化および疲弊は、１つ以上のマーカーを調べることによって決定することができる。いくつかの実施形態では、活性化および疲弊は、多色フローサイトメトリーを使用して決定することができる。いくつかの実施形態では、マーカーの活性化および疲弊は、ＣＤ３、ＰＤ－１、２Ｂ４／ＣＤ２４４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＢＴＬＡ、ＫＬＲＧ、ＴＩＭ－３、ＣＤ１９４／ＣＣＲ４、ＣＤ４、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ１８３、ＣＤ６９、ＣＤ９５、ＣＤ１２７、ＣＤ１０３、および／またはＬＡＧ－３）からなる群から選択される１つ以上のマーカーを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、マーカーの活性化および疲弊は、ＢＴＬＡ、ＣＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、Ｋｉ６７、ＬＡＧ－３、ＰＤ－１、ＴＩＧＩＴ、および／またはＴＩＭ－３からなる群から選択される１つ以上のマーカーを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、マーカーの活性化および疲弊は、ＢＴＬＡ、ＣＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、Ｋｉ６７、ＬＡＧ－３、ＣＤ１０３＋／ＣＤ６９＋、ＣＤ１０３＋／ＣＤ６９－、ＰＤ－１、ＴＩＧＩＴおよび／またはＴＩＭ－３からなる群から選択される１つ以上のマーカーを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞マーカー（活性化および疲弊マーカーを含む）は、Ｔ細胞の活性化、阻害、または機能を調べるために決定および／または分析され得る。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞マーカーは、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ３、ＦｏｘＰ３、Ｔｉｍ－３、ＰＤ－１、ＣＤ１０３、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＢＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、Ｋｉ６７、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ４５、ＣＤ４、および／またはＣＤ５９からなる群から選択される１つ以上のマーカーを含み得るが、これらに限定されない。

【１０９５】

いくつかの実施形態では、表現型の特徴付けは、凍結保存後に調べられる。

【１０９６】

Ｍ．追加のプロセスの実施形態

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法を提供し、（ａ）対象から得られた腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ることと、（ｂ）ＩＬ－２およびＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１のプライミング拡張を行うことであって、第１のプライミング拡張を約１～７日間または約１～８日間行って第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、第１のプライミング拡張を行うことと、（ｃ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、および外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地と接触させて第２の急速拡張を行って第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の急速拡張を約１～１１日間または約１～１０日間行って第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｄ）ステップ（ｃ）から得られた治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む。いくつかの実施形態では、第２の急速拡張のステップは、複数のステップに分割され、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の小規模培養において約３～４日または約２～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（２）小規模培養からの第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移すことによって培養のスケールアップを達成し

、第２の容器内で、小規模培養からの第２のＴＩＬ集団は、大規模培養において約４～７日または約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張のステップは、複数のステップに分割され、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ容器内の第１の小規模培養において約３～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（２）第１の小規模培養からの第２のＴＩＬ集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移し、配分することによって培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養からかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団は、第２の小規模培養において約４～７日または約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張のステップは、複数のステップに分割され、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の小規模培養において約３～４日または約２～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（２）第１の小規模培養からの第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移し、配分することによって培養のスケールアウトおよびスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養からかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の部分は、より大規模の培養において約４～７日または約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張のステップは、複数のステップに分割され、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ容器内の小規模培養において約３～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（２）第１の小規模培養からの第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ容器に移し、配分することによって培養のスケールアウトおよびスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養からかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の部分は、より大規模の培養において約５～７日間培養される。

【１０９７】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法を提供し、（ａ）対象から得られた腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ることと、（ｂ）ＩＬ－２およびＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１のプライミング拡張を行うことであって、第１のプライミング拡張を約１～８日間行って第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、第１のプライミング拡張を行うことと、（ｃ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、および外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地と接触させることによって第２の急速拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の急速拡張を約１～８日間行って第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｄ）ステップ（ｃ）から得られた治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む。いくつかの実施形態では、第２の急速拡張のステップは、複数のステップに分割され、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の小規模培養において約２～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（２）小規模培養からの第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移すことによって培養のスケールアップを達成し、第２の容器内で、小規模培養からの第２のＴＩＬ集団は、大規模培養において約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張のステップは、複数のステップに分割され、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の第１の小規模培養において約２～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（２）第１の小規模培養からの第２のＴＩＬ集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の

第２の容器に移し、配分することによって培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養からかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の部分は、第２の小規模培養において約４～６日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張のステップは、複数のステップに分割され、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の小規模培養において約２～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（２）第１の小規模培養からの第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移し、配分することによって培養のスケールアウトおよびスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養からかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の部分は、より大規模の培養において約４～６日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張のステップは、複数のステップに分割され、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の小規模培養において約３～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（２）第１の小規模培養からの第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移し、配分することによって培養のスケールアウトおよびスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養からかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の部分は、より大規模の培養において約４～５日間培養される。

【１０９８】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法を提供し、（ａ）対象から得られた腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ることと、（ｂ）ＩＬ－２およびＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１のプライミング拡張を行うことであって、第１のプライミング拡張を約１～７日間行って第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、第１のプライミング拡張を行うことと、（ｃ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、および外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地と接触させることによって第２の急速拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の急速拡張を約１～１１日間行って第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｄ）ステップ（ｃ）から得られた治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む。いくつかの実施形態では、第２の急速拡張のステップは、複数のステップに分割され、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の小規模培養において約３～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（２）小規模培養からの第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移すことによって培養のスケールアップを達成し、第２の容器内で、小規模培養からの第２のＴＩＬ集団は、大規模培養において約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張のステップは、複数のステップに分割され、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の第１の小規模培養において約３～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うことと、（２）第１の小規模培養からの第２のＴＩＬ集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移し、配分することによって培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養からかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の部分は、第２の小規模培養において約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張のステップは、複数のステップに分割され、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の小規模培養において約３～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うことと、（２）第１の小規模培養からの第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１

１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移し、配分することによって培養のスケールアウトおよびスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養からかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の部分は、より大規模の培養において約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張のステップは、複数のステップに分割され、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の小規模培養において約４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（２）第１の小規模培養からの第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移し、配分することによって培養のスケールアウトおよびスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養からかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の部分は、より大規模の培養において約５日間培養される。

【１０９９】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団を、外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）をさらに含む培養培地と接触させることによって第１の初期拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）の培養培地中のＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）の培養培地中のＡＰＣの数よりも多い。

【１１００】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において培養培地が追加の外因性ＡＰＣで補足されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１０１】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約１．１：１～約２０：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１０２】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約１．１：１～約１０：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１０３】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約１．１：１～約９：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１０４】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約１．１：１～約８：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１０５】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約１．１：１～約７：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１０６】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約１．１：１～約６：１の範囲から選

択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１０７】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約１．１：１～約５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１０８】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約１．１：１～約４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１０９】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約１．１：１～約３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１１０】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約１．１：１～約２．９：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１１１】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約１．１：１～約２．８：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１１２】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約１．１：１～約２．７：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１１３】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約１．１：１～約２．６：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１１４】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約１．１：１～約２．５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１１５】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約１．１：１～約２．４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１１６】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約１．１：１～約２．３：１の範囲か

ら選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１１７】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約１．１：１～約２．２：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１１８】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約１．１：１～約２．１：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１１９】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約１．１：１～約２：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１２０】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約２：１～約１０：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１２１】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約２：１～約５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１２２】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約２：１～約４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１２３】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約２：１～約３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１２４】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約２：１～約２．９：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１２５】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約２：１～約２．８：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１２６】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約２：１～約２．７：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１２７】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約２：１～約２．６：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１２８】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約２：１～約２．５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１２９】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約２：１～約２．４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１３０】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約２：１～約２．３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１３１】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約２：１～約２．２：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１３２】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されたＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数との比が、約２：１～約２．１：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１３３】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されるＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されるＡＰＣの数との比が、約２：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１３４】

別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張において添加されるＡＰＣの数とステップ（ｂ）において添加されるＡＰＣの数との比が、約１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．１：１、２．２：１、２．３：１、２．４：１、２．５：１、２．６：１、２．７：１、２．８：１、２．９：１、３：１、３．１：１、３．２：１、３．３：１、３．４：１、３．５：１、３．６：１、３．７：１、３．８：１、３．９：１、４：１、４．１：１、４．２：１、４．３：１、４．４：１、４．５：１、４．６：１、４．７：１、４．８：１、４．９：１、または５：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１３５】

別の実施形態では、本発明は、第１の初期拡張において添加されるＡＰＣの数が、約１×10^{8}、１．１×10^{8}、１．２×10^{8}、１．３×10^{8}、１．４×10^{8}、１．５×10^{8}、１．６×10^{8}、１．７×10^{8}、１．８×10^{8}、１．９×10^{8}、２×10^{8}、２．１×10^{8}、２．２×10^{8}、２．３×10^{8}、２．４×10^{8}、２．５×10^{8}、２．６×10^{8}、２．７×10^{8}、２．８×10^{8}、２．９×10^{8}、３×10^{8}、３．１×10^{8}、３．２×10^{8}、３．３×10^{8}、３．４×10^{8}、または３．５×10^{8}ＡＰ

Ｃであるように、また第２の急速拡張において添加されるＡＰＣの数が、約３．５×１０^{8}、３．６×１０^{8}、３．７×１０^{8}、３．８×１０^{8}、３．９×１０^{8}、４×１０^{8}、４．１×１０^{8}、４．２×１０^{8}、４．３×１０^{8}、４．４×１０^{8}、４．５×１０^{8}、４．６×１０^{8}、４．７×１０^{8}、４．８×１０^{8}、４．９×１０^{8}、５×１０^{8}、５．１×１０^{8}、５．２×１０^{8}、５．３×１０^{8}、５．４×１０^{8}、５．５×１０^{8}、５．６×１０^{8}、５．７×１０^{8}、５．８×１０^{8}、５．９×１０^{8}、６×１０^{8}、６．１×１０^{8}、６．２×１０^{8}、６．３×１０^{8}、６．４×１０^{8}、６．５×１０^{8}、６．６×１０^{8}、６．７×１０^{8}、６．８×１０^{8}、６．９×１０^{8}、７×１０^{8}、７．１×１０^{8}、７．２×１０^{8}、７．３×１０^{8}、７．４×１０^{8}、７．５×１０^{8}、７．６×１０^{8}、７．７×１０^{8}、７．８×１０^{8}、７．９×１０^{8}、８×１０^{8}、８．１×１０^{8}、８．２×１０^{8}、８．３×１０^{8}、８．４×１０^{8}、８．５×１０^{8}、８．６×１０^{8}、８．７×１０^{8}、８．８×１０^{8}、８．９×１０^{8}、９×１０^{8}、９．１×１０^{8}、９．２×１０^{8}、９．３×１０^{8}、９．４×１０^{8}、９．５×１０^{8}、９．６×１０^{8}、９．７×１０^{8}、９．８×１０^{8}、９．９×１０^{8}、または１×１０^{9}ＡＰＣであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１３６】

別の実施形態では、本発明は、第１の初期拡張において添加されるＡＰＣの数が、約１×１０^{8}ＡＰＣ～約３．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、第２の急速拡張において添加されるＡＰＣの数が、約３．５×１０^{8}ＡＰＣ～約１×１０^{9}ＡＰＣの範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１３７】

別の実施形態では、本発明は、第１の初期拡張において添加されるＡＰＣの数が、約１．５×１０^{8}ＡＰＣ～約３×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、第２の急速拡張において添加されるＡＰＣの数が、約４×１０^{8}ＡＰＣ～約７．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１３８】

別の実施形態では、本発明は、第１の初期拡張において添加されるＡＰＣの数が、約２×１０^{8}ＡＰＣ～約２．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、第２の急速拡張において添加されるＡＰＣの数が、約４．５×１０^{8}ＡＰＣ～約５．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１３９】

別の実施形態では、本発明は、約２．５×１０^{8}ＡＰＣが、第１の初期拡張に添加され、約５×１０^{8}ＡＰＣが、第２の急速拡張に添加されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１４０】

別の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１４１】

別の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍断片が複数の別個の容器に分配され、その別個の容器の各々において、第１のＴＩＬ集団がステップ（ａ）において得られ、第２のＴＩＬ集団がステップ（ｂ）において得られ、第３のＴＩＬ集団がステップ（ｃ）において得られ、ステップ（ｃ）の複数の容器からの治療的ＴＩＬ集団を複合して、ステップ（ｄ）から採取されたＴＩＬ集団を産生するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１４２】

別の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍が複数の別個の容器に均一に分布するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１４３】
別の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が少なくとも２個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１４４】
別の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～２０個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１４５】
別の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～１５個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１４６】
別の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～１０個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１４７】
別の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～５個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１４８】
別の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１４９】
別の実施形態では、本発明は、第１のプライミング拡張がステップ（ｂ）において第１のＴＩＬ集団で行われる各容器の場合、ステップ（ｃ）における第２の急速拡張が、同じ容器内でかかる第１のＴＩＬ集団から産生された第２のＴＩＬ集団で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１５０】
別の実施形態では、本発明は、別個の容器の各々が第１のガス透過性表面積を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１５１】
別の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍断片が単一の容器に分布するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１５２】
別の実施形態では、本発明は、単一の容器が第１のガス透過性表面積を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１５３】
別の実施形態では、ステップ（ｂ）において、第１の初期拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されるＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣは、第１のガス透過性表面積上に約１細胞層～約３細胞層の平均厚さで層状化される。
【１１５４】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、約１．５細胞層～約２．５細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１５５】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、約２細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１５６】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１５７】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、約３細胞層～約１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１５８】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、約４細胞層～約８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１５９】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１６０】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、約４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１６１】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のプライミング拡張が、第１のガス透過性表面積を含む第１の容器内で行われ、ステップ（ｃ）において、第２の急速拡張が、第２のガス透過性表面積を含む第２の容器内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１６２】

別の実施形態では、本発明は、第２の容器が、第１の容器よりも大きいように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１６３】

別の実施形態では、ステップ（ｂ）において、第１の初期拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されるＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣは、第１のガス透過性表面積上に約１細胞層～約３細胞層の平均厚さで層状化される。

【１１６４】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、約１．５細胞層～約２．５細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１６５】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、約２細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１６６】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、約１、１．１、１

．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１６７】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、約３細胞層～約１０細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１６８】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、約４細胞層～約８細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１６９】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１７０】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、約４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１７１】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のプライミング拡張が、第１のガス透過性表面積を含む第１の容器内で行われ、ステップ（ｃ）において、第２の急速拡張が、第１の容器内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１７２】

別の実施形態では、ステップ（ｂ）において、第１の初期拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されるＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣは、第１のガス透過性表面積上に約１細胞層～約３細胞層の平均厚さで層状化される。

【１１７３】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、約１．５細胞層～約２．５細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１７４】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、約２細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１７５】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１７６】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、約３細胞層～約１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１７７】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、約４細胞層～約８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１７８】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１７９】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、約４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１８０】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって第１の初期拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されたＡＰＣの平均層数とステップ（ｃ）において層状化されたＡＰＣの平均層数との比は、約１：１．１～約１：１０の範囲から選択される。
【１１８１】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって第１の初期拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されたＡＰＣの平均層数とステップ（ｃ）において層状化されたＡＰＣの平均層数との比は、約１：１．１～約１：９の範囲から選択される。
【１１８２】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって第１の初期拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されたＡＰＣの平均層数とステップ（ｃ）において層状化されたＡＰＣの平均層数との比は、約１：１．１～約１：８の範囲から選択される。
【１１８３】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって第１の初期拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されたＡＰＣの平均層数とステップ（ｃ

）において層状化されたＡＰＣの平均層数との比は、約１：１．１～約１：７の範囲から選択される。

【１１８４】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって第１の初期拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されたＡＰＣの平均層数とステップ（ｃ）において層状化されたＡＰＣの平均層数との比は、約１：１．１～約１：６の範囲から選択される。

【１１８５】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって第１の初期拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されたＡＰＣの平均層数とステップ（ｃ）において層状化されたＡＰＣの平均層数との比は、約１：１．１～約１：５の範囲から選択される。

【１１８６】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって第１の初期拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されたＡＰＣの平均層数とステップ（ｃ）において層状化されたＡＰＣの平均層数との比は、約１：１．１～約１：４の範囲から選択される。

【１１８７】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって第１の初期拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されたＡＰＣの平均層数とステップ（ｃ）において層状化されたＡＰＣの平均層数との比は、約１：１．１～約１：３の範囲から選択される。

【１１８８】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって第１の初期拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されたＡＰＣの平均層数とステップ（ｃ）において層状化されたＡＰＣの平均層数との比は、約１：１．１～約１：２の範囲から選択される。

【１１８９】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって第１の初期拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されたＡＰＣの平均層数とステップ（ｃ）において層状化されたＡＰＣの平均層数との比は、約１：１．２～約１：８の範囲から選択される。

【１１９０】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって第１の初期拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されたＡＰＣの平均層数とステップ（ｃ）において層状化されたＡＰＣの平均層数との比は、約１：１．３～約１：７の範囲から選択される。
【１１９１】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって第１の初期拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されたＡＰＣの平均層数とステップ（ｃ）において層状化されたＡＰＣの平均層数との比は、約１：１．４～約１：６の範囲から選択される。
【１１９２】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって第１の初期拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されたＡＰＣの平均層数とステップ（ｃ）において層状化されたＡＰＣの平均層数との比は、約１：１．５～約１：５の範囲から選択される。
【１１９３】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって第１の初期拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されたＡＰＣの平均層数とステップ（ｃ）において層状化されたＡＰＣの平均層数との比は、約１：１．６～約１：４の範囲から選択される。
【１１９４】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって第１の初期拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されたＡＰＣの平均層数とステップ（ｃ）において層状化されたＡＰＣの平均層数との比は、約１：１．７～約１：３．５の範囲から選択される。
【１１９５】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって第１の初期拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されたＡＰＣの平均層数とステップ（ｃ）において層状化されたＡＰＣの平均層数との比は、約１：１．８～約１：３の範囲から選択される。
【１１９６】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養

培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって第１の初期拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されたＡＰＣの平均層数とステップ（ｃ）において層状化されたＡＰＣの平均層数との比は、約１：１．９～約１：２．５の範囲から選択される。

【１１９７】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって第１の初期拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されたＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されたＡＰＣの平均層数とステップ（ｃ）において層状化されたＡＰＣの平均層数との比は、約１：２の範囲から選択される。

【１１９８】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１の初期拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補足することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、ステップ（ｃ）において添加されるＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）において添加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数と、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数との比は、約１：１．１、１：１．２、１：１．３、１：１．４、１：１．５、１：１．６、１：１．７、１：１．８、１：１．９、１：２、１：２．１、１：２．２、１：２．３、１：２．４、１：２．５、１：２．６、１：２．７、１：２．８、１：２．９、１：３、１：３．１、１：３．２、１：３．３、１：３．４、１：３．５、１：３．６、１：３．７、１：３．８、１：３．９、１：４、１：４．１、１：４．２、１：４．３、１：４．４、１：４．５、１：４．６、１：４．７、１：４．８、１：４．９、１：５、１：５．１、１：５．２、１：５．３、１：５．４、１：５．５、１：５．６、１：５．７、１：５．８、１：５．９、１：６、１：６．１、１：６．２、１：６．３、１：６．４、１：６．５、１：６．６、１：６．７、１：６．８、１：６．９、１：７、１：７．１、１：７．２、１：７．３、１：７．４、１：７．５、１：７．６、１：７．７、１：７．８、１：７．９、１：８、１：８．１、１：８．２、１：８．３、１：８．４、１：８．５、１：８．６、１：８．７、１：８．８、１：８．９、１：９、１：９．１、１：９．２、１：９．３、１：９．４、１：９．５、１：９．６、１：９．７、１：９．８、１：９．９、または１：１０から選択される。

【１１９９】

別の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数と第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数との比が、約１．５：１～約１００：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２００】

別の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数と第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数との比が、約５０：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２０１】

別の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数と第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数との比が、約２５：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２０２】

別の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数と第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数との比が、約２０：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２０３】
別の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数と第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数との比が、約１０：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２０４】
別の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が少なくともまたは約５０倍多いように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２０５】
別の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が少なくともまたは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、または５０倍多いように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２０６】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第２の期間の開始の約２日または約３日後に、細胞培養培地が追加のＩＬ－２で補足されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２０７】
別の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｄ）において採取されたＴＩＬ集団を凍結保存するステップをさらに含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２０８】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）の後に、（ｅ）ステップ（ｄ）から採取したＴＩＬ集団を、任意にＨｙｐｏＴｈｅｒｍｏｓｏｌを含有する注入バッグに移す追加のステップを行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２０９】
別の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｅ）において採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１０】
別の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスが、１：１の比の採取されたＴＩＬ集団および凍結保存培地を使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１１】
別の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１２】
別の実施形態では、本発明は、ＰＢＭＣが照射され同種異系であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１３】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において細胞培養に添加されるＡＰＣの総数が２．５×１０^{8}であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１４】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において細胞培養に添加されるＡＰＣの総数が５×１０^{8}であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２１５】
　別の実施形態では、本発明は、ＡＰＣがＰＢＭＣであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１６】
　別の実施形態では、本発明は、ＰＢＭＣが照射され同種異系であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１７】
　別の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が人工抗原提示細胞であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１８】
　別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）での採取が膜ベースの細胞処理システムを使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１９】
　別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）での採取がＬＯＶＯ細胞処理システムを使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２２０】
　別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が容器あたり約５～約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２２１】
　別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が容器あたり約１０～約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２２２】
　別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が容器あたり約１５～約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２２３】
　別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が容器あたり約２０～約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２２４】
　別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が容器あたり約２５～約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２２５】
　別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が容器あたり約３０～約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２２６】
　別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が容器あたり約３５～約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２２７】
　別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が容器あたり約４０～約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２２８】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が容器あたり約４５～約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２２９】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が容器あたり約５０～約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２３０】

別の実施形態では、本発明は、複数の断片が、ステップ（ｂ）において、容器あたり約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、または６０個の断片（複数可）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２３１】

別の実施形態では、本発明は、各断片が約２７ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２３２】

別の実施形態では、本発明は、各断片が約２０ｍｍ^3～約５０ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２３３】

別の実施形態では、本発明は、各断片が約２１ｍｍ^3～約３０ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２３４】

別の実施形態では、本発明は、各断片が約２２ｍｍ^3～約２９．５ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２３５】

別の実施形態では、本発明は、各断片が、約２３ｍｍ^3～約２９ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２３６】

別の実施形態では、本発明は、各断片が約２４ｍｍ^3～約２８．５ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２３７】

別の実施形態では、本発明は、各断片が約２５ｍｍ^3～約２８ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２３８】

別の実施形態では、本発明は、各断片が約２６．５ｍｍ^3～約２７．５ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２３９】

別の実施形態では、本発明は、各断片が約２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、または５０ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２４０】

別の実施形態では、本発明は、複数の断片が、約３０～約６０個の断片を含み、約１３００ｍｍ^3～約１５００ｍｍ^{3}の総体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２４１】

別の実施形態では、本発明は、複数の断片が約５０個の断片を含み、約１３５０ｍｍ^{3}の総体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２４２】

別の実施形態では、本発明は、複数の断片が約５０個の断片を含み、約１グラム～約１．５グラムの総質量を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２４３】

別の実施形態では、本発明は、細胞培養培地がＧ容器またはＸｕｒｉセルバッグである容器内に提供されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２４４】

別の実施形態では、本発明は、細胞培養培地中のＩＬ－２濃度が約１０，０００ＩＵ／ｍＬ～約５０００ＩＵ／ｍＬであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２４５】

別の実施形態では、本発明は、細胞培養培地中のＩＬ－２濃度が約６，０００ＩＵ／ｍＬであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２４６】

別の実施形態では、本発明は、凍結保存培地がジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２４７】

別の実施形態では、本発明は、凍結保存培地が７％～１０％のＤＭＳＯを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２４８】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の第１の期間が約１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日の期間内に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２４９】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）の第２の期間が約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間内に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２５０】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の第１の期間およびステップ（ｃ）の第２の期間が各々、約１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日の期間内に個々に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２５１】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の第１の期間およびステップ（ｃ）の第２の期間が各々、約５日、６日、または７日の期間内に個々に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２５２】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の第１の期間およびステップ（ｃ）の第２の期間が各々、約７日の期間内に個々に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２５３】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で約１４日～約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２５４】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で約１５日～約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２５５】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で約１６日～約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２５６】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で約１７日～約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２５７】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で約１４日～約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２５８】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で約１５日～約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２５９】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で約１６日～約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２６０】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で約１４日～約１６日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２６１】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で約１５日～約１６日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２６２】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で約１４日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２６３】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で約１５日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２６４】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で約１６日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２６５】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２６６】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２６７】
別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で約１４日以内に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２６８】
　別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で約１５日以内に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２６９】
　別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で約１６日以内に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２７０】
　別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で約１８日以内に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２７１】
　別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）で採取された治療的ＴＩＬ集団が、ＴＩＬの治療上有効な投与量に十分なＴＩＬを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２７２】
　別の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量に十分なＴＩＬの数が、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２７３】
　別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、増加した効力、増加したインターフェロンγ産生、および／または増加したポリクローン性を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２７４】
　別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して少なくとも１倍～５倍以上のインターフェロンγ産生を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２７５】
　別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して少なくとも１倍～５倍以上のインターフェロンγ産生を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２７６】
　別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して少なくとも１倍～５倍以上のインターフェロンγ産生を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２７７】
　別の実施形態では、本発明は、第３のＴＩＬ集団ステップ（ｃ）から得られたエフェクターＴ細胞および／またはセントラルメモリーＴ細胞が、第２の細胞集団ステップ（ｂ）から得られたエフェクターＴ細胞および／またはセントラルメモリーＴ細胞に対して増加したＣＤ８およびＣＤ２８の発現を示すように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２７８】
　別の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器が密閉容器であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２７９】
　別の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧ容器であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２８０】
　別の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧＲＥＸ－１０であるように

修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２８１】

別の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧＲＥＸ－１００であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２８２】

別の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧＲＥＸ－５００であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２８３】

別の実施形態では、本発明は、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法によって作製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供する。

【１２８４】

別の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ拡張が抗原提示細胞（ＡＰＣ）またはＯＫＴ３を添加せずに行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンγ産生、および／または増加した多クローン性を提供する。

【１２８５】

別の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ拡張が抗原提示細胞（ＡＰＣ）を添加せずに行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンγ産生、および／または増加した多クローン性を提供する。

【１２８６】

別の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ拡張がＯＫＴ３を添加せずに行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンγ産生、および／または増加した多クローン性を提供する。

【１２８７】

別の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ拡張が抗原提示細胞（ＡＰＣ）およびＯＫＴ３を添加せずに行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンγ産生、および／または増加した多クローン性を提供する。

【１２８８】

別の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、１６日より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンγ産生、および／または増加した多クローン性を提供する。

【１２８９】

別の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、１７日より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンγ産生、および／または増加した多クローン性を提供する。

【１２９０】

別の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、１８日より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンγ産生、および／または増加した多クローン性を提供する。

【１２９１】

別の実施形態では、本発明は、インターフェロンγ産生の増加を提供する、上記の該当

する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【１２９２】

別の実施形態では、本発明は、増加した多クローン性を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載された治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【１２９３】

別の実施形態では、本発明は、増加した有効性を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【１２９４】

別の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンγ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。別の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンγ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。別の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンγ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも１倍多いインターフェロンγ産生が可能になる。

【１２９５】

別の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンγ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。別の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンγ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。別の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンγ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも２倍多いインターフェロンγ産生が可能になる。

【１２９６】

別の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンγ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。別の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンγ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。別の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンγ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に示されているように）、本明細書に記

載される拡張プロセスに起因する少なくとも３倍多いインターフェロンγ産生が可能になる。

【１２９７】

別の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ拡張が、抗原提示細胞（ＡＰＣ）を添加せずに行われるプロセスによって調製されるＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンγ産生が可能である腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも１倍多いインターフェロンγ産生が可能になる。

【１２９８】

別の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ拡張が、ＯＫＴ３を添加せずに行われるプロセスによって調製されるＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンγ産生が可能である腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも１倍多いインターフェロンγ産生が可能になる。

【１２９９】

別の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ拡張が、ＡＰＣを添加せずに行われるプロセスによって調製されるＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンγ産生が可能であるＴＩＬの治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも２倍多いインターフェロンγ産生が可能になる。

【１３００】

別の実施形態では、本発明は、ＴＩＬの最初の拡張が、ＯＫＴ３を添加せずに行われるプロセスによって調製されるＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンγ産生が可能である治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも２倍多いインターフェロンγ産生が可能になる。

【１３０１】

別の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ拡張が、ＡＰＣを添加せずに行われるプロセスによって調製されるＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンγ産生が可能である治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも１倍多いインターフェロンγ産生が可能になる。

【１３０２】

別の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ拡張が、ＯＫＴ３を添加せずに行われるプロセスによって調製されるＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンγ産生が可能である治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ｂおよび／または図８Ｃ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも３倍多いインターフェロンγ産生が可能になる。

【１３０３】
別の実施形態では、本発明は、（ａ）第１のＴ細胞集団を培養することによって、ドナーから得られた第１のＴ細胞集団の第１のプライミング拡張を行って成長をもたらし、第１の細胞集団の活性化をプライミングすることと、（ｂ）ステップ（ａ）においてプライミングされた第１のＴ細胞集団の活性化が減衰し始めた後に、第１のＴ細胞集団を培養することによって第１のＴ細胞集団の第２の急速拡張を行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を得ることと、（ｃ）第２のＴ細胞集団を採取することと、を含む、Ｔ細胞を拡張する方法を提供する。別の実施形態では、第２の急速拡張のステップは、複数のステップに分割され、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の小規模培養において約３～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（ｂ）小規模培養からの第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移し、小規模培養からの第１のＴ細胞集団を、第２の容器内の大規模培養において約４～７日間培養することによって、培養のスケールアップを達成する。別の実施形態では、急速拡張のステップは、複数のステップに分割され、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の第１の小規模培養において３～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（ｂ）第１の小規模培養からの第１のＴ細胞集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移し、配分することによって培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された第１の小規模培養からの第１のＴ細胞集団の部分は、第２の小規模培養において約４～７日間培養される。別の実施形態では、急速拡張のステップは、複数のステップに分割され、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の小規模培養において約３～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（ｂ）小規模培養からの第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりも大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移し、配分することによって培養のスケールアウトおよびスケールアップを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された小規模培養からの第１のＴ細胞集団の部分は、より大規模の培養において約４～７日間培養される。別の実施形態では、急速拡張のステップは、複数のステップに分割され、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の小規模培養において約４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（ｂ）小規模培養からの第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりも大きい２、３、または４個の第２の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移し、配分することによって培養のスケールアウトおよびスケールアップを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された小規模培養からの第１のＴ細胞集団の部分は、より大規模の培養において約５日間培養される。

【１３０４】
別の実施形態では、本発明は、第２の急速拡張のステップが、複数のステップに分割され、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の小規模培養において約２～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（ｂ）小規模培養からの第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移し、小規模培養からの第１のＴ細胞集団を、第２の容器内の大規模培養において約５～７日間培養することによって、培養のスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３０５】
別の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分割され、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の第１の小規模培養において２～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで

（ｂ）第１の小規模培養からの第１のＴ細胞集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移し、配分することによって培養のスケールアウトを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された第１の小規模培養からの第１のＴ細胞集団の部分は、第２の小規模培養において約５～７日間培養される。

【１３０６】

別の実施形態では、急速拡張のステップが、複数のステップに分割され、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の小規模培養において約２～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（ｂ）小規模培養からの第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりも大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移し、配分することによって培養のスケールアウトおよびスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された小規模培養からの第１のＴ細胞集団の部分は、より大規模の培養において約５～７日間培養される。

【１３０７】

別の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分割され、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の小規模培養において約３～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（ｂ）小規模培養からの第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりも大きい２、３、または４個の第２の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移し、配分することによって培養のスケールアウトおよびスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された小規模培養からの第１のＴ細胞集団の部分は、より大規模の培養において約５～６日間培養される。

【１３０８】

別の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分割され、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の小規模培養において約３～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（ｂ）小規模培養からの第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりも大きい２、３、または４個の第２の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移し、配分することによって培養のスケールアウトおよびスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された小規模培養からの第１のＴ細胞集団の部分は、より大規模の培養において約５日間培養される。

【１３０９】

別の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分割され、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の小規模培養において約３～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（ｂ）小規模培養からの第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりも大きい２、３、または４個の第２の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移し、配分することによって培養のスケールアウトおよびスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された小規模培養からの第１のＴ細胞集団の部分は、より大規模の培養において約６日間培養される。

【１３１０】

別の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分割され、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳ容器内の小規模

培養において約３～４日間培養することによって第２の急速拡張を行うこと、次いで（ｂ）小規模培養からの第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりも大きい２、３、または４個の第２の容器、例えばＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ容器に移し、配分することによって培養のスケールアウトおよびスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された小規模培養からの第１のＴ細胞集団の部分は、より大規模の培養において約７日間培養される。

【１３１１】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）の第１のプライミング拡張が最大７日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３１２】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の第２の急速拡張が最大８日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３１３】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の第２の急速拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３１４】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の第２の急速拡張が最大１０日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３１５】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の第２の急速拡張が最大１１日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３１６】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）における第１のプライミング拡張が７日の期間中に行われ、ステップ（ｂ）の第２の急速拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３１７】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）における第１のプライミング拡張が７日の期間中に行われ、ステップ（ｂ）の第２の急速拡張が最大１０日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３１８】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）における第１のプライミング拡張が７日または８日の期間中に行われ、ステップ（ｂ）の第２の急速拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３１９】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）における第１のプライミング拡張が７日または８日の期間中に行われ、ステップ（ｂ）の第２の急速拡張が最大１０日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２０】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）における第１のプライミング拡張が８日の期間中に行われ、ステップ（ｂ）の第２の急速拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２１】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）における第１のプライミング拡張が８日の期間中に行われ、ステップ（ｂ）の第２の急速拡張が最大８日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２２】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団がＯＫＴ－３およびＩＬ－２を含む第１の培養培地中で培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２３】

別の実施形態では、本発明は、第１の培養培地が４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、およびＩＬ－２を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２４】

別の実施形態では、本発明は、第１の培養培地がＯＫＴ－３、ＩＬ－２、および抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２５】

別の実施形態では、本発明は、第１の培養培地が４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２、および抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２６】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団がＯＫＴ－３、ＩＬ－２、および抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の培養培地中で培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２７】

別の実施形態では、本発明は、第２の培養培地が４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２、および抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２８】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地において培養され（ここで、第１の培養培地は、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２、および第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団は、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団は、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地は、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２、および第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団は、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団は、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団は、第１のＡＰＣ集団よりも優れている）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２９】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地において培養され（ここで、第１の培養培地は、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２、および第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団は、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団は、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地は、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２、および第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団は、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団は、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団は、第１のＡＰＣ集団よりも優れている）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３３０】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地において培養され（ここで、第１の培養培地は、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２、および抗原提示細胞（ＡＰＣ）の第１の集団を含み、第１のＡＰＣ集団は、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団は、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地は、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２、および第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団は、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団は、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団は、第１のＡＰＣ集団よりも優れている）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３３１】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地において培養され（ここで、第１の培養培地は、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２、および第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団は、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団は、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地は、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２、および第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団は、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団は、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団は、第１のＡＰＣ集団よりも優れている）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３３２】

別の実施形態では、本発明は、第２のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数と第１のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数との比が、約２：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３３３】

別の実施形態では、本発明は、第１のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数が、約$２．５×１０^{８}$あり、第２のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数が、約$５×１０^{８}$であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３３４】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が、２層のＡＰＣの平均厚さで第１のガス透過性表面上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３３５】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が、４～８層のＡＰＣから選択される平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３３６】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において第１のガス透過性表面上に層状化されたＡＰＣの平均層数と、ステップ（ａ）において第１のガス透過性表面上に層状化されたＡＰＣの平均層数は、２：１である。

【１３３７】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が約$１．０×１０^{６}$ＡＰＣ／$ｃｍ^{２}$～約$４．５×１０^{６}$ＡＰＣ／$ｃｍ^{２}$の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３３８】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が約$１．５×１０^{６}$ＡＰＣ／$ｃｍ^{２}$～約$３．５×１０^{６}$ＡＰＣ／$ｃｍ^{２}$の範囲から選択される密度で第

１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３３９】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約３．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３４０】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３４１】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３４２】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約６．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３４３】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３４４】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３４５】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が約１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が、約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３４６】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が、約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約６．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３４７】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約３．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が、約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのい

ずれかに記載の方法を提供する。

【１３４８】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が、約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が、約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３４９】

別の実施形態では、本発明は、ＡＰＣが末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３５０】

別の実施形態では、本発明は、ＰＢＭＣが照射され、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３５１】

別の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞が腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３５２】

別の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞が骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３５３】

別の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞が末梢血リンパ球（ＰＢＬ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３５４】

別の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団がドナーの全血からの分離によって得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３５５】

別の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団がドナーのアフェレーシス産物からの分離によって得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３５６】

別の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、Ｔ細胞表現型の正または負の選択によってドナーの全血またはアフェレーシス産物から分離されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３５７】

別の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞表現型がＣＤ３＋およびＣＤ４５＋であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３５８】

別の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団の第１のプライミング拡張を行う前に、Ｔ細胞がＮＫ細胞から分離されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。別の実施形態では、Ｔ細胞は、第１のＴ細胞集団からのＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞の除去によって、第１のＴ細胞集団におけるＮＫ細胞から分離される。別の実施形態では、ＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞は、ＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞画分を除去し、陰性画分を回復するゲーティング戦略を使用して第１のＴ細胞集団を細胞選別に供することによって、第１のＴ細胞集団から除去される。別の実施形態では、前述の方法は、高いパーセンテージのＮＫ細胞を特徴とする第１のＴ細胞集団におけるＴ細胞の拡張のために利用される。別の実施形態では、前述の方法は、高いパーセンテージのＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞を特徴とする第１のＴ細胞集団におけるＴ細胞の拡張のために利用される。別の実施形態では、前述の方法は、多数のＮＫ細胞の存在を特徴とする腫瘍組織における

Ｔ細胞の拡張のために利用される。別の実施形態では、前述の方法は、多数のＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞を特徴とする腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。別の実施形態では、前述の方法は、多数のＮＫ細胞の存在を特徴とする腫瘍を患っている患者から得られた腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。別の実施形態では、前述の方法は、多数のＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞の存在を特徴とする腫瘍を患っている患者から得られた腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。別の実施形態では、前述の方法は、卵巣癌を患っている患者から得られた腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。

【１３５９】

別の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団からの約1×10^{7}Ｔ細胞を容器内に播種して、かかる容器内で第１の初期拡張を開始するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３６０】

別の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が複数の容器に分布し、各容器において、第１のＴ細胞集団からの約1×10^{7}Ｔ細胞を播種して、かかる容器内で第１の初期拡張を開始するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３６１】

別の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において採取された第２のＴ細胞集団が治療的ＴＩＬ集団であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３６２】

Ｖ．薬学的組成物、投与量、および投薬レジメン

実施形態では、本開示の方法を使用して拡張されたＴＩＬは、薬学的組成物として患者に投与される。実施形態では、薬学的組成物は、無菌緩衝液中のＴＩＬの懸濁液である。本開示のＰＢＭＣを使用して拡張されたＴＩＬは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与することができる。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、単一の動脈内または静脈内注入として投与され、これは好ましくは、およそ３０～６０分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、およびリンパ内投与が含まれる。

【１３６３】

任意の好適な用量のＴＩＬが投与され得る。いくつかの実施形態では、特に癌が黒色腫である場合、約2.3×10^{10}～約13.7×10^{10}ＴＩＬが投与され、平均は約7.8×10^{10}ＴＩＬである。実施形態では、約1.2×10^{10}～約4.3×10^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約3×10^{10}～約12×10^{10}ＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約4×10^{10}～約10×10^{10}ＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約5×10^{10}～約8×10^{10}ＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約6×10^{10}～約8×10^{10}ＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約7×10^{10}～約8×10^{10}ＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約2.3×10^{10}～約13.7×10^{10}である。いくつかの実施形態では、特に癌が黒色腫である場合、治療上有効な投与量は、約7.8×10^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約1.2×10^{10}～約4.3×10^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約3×10^{10}～約12×10^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約4×10^{10}～約10×10^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約5×10^{10}～約8×10^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約6×10^{10}～約8×10^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約7×10^{10}～約8×10^{10}ＴＩＬである。

【１３６４】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物において提供されるＴＩＬの数は、約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}

、８×１０^{6}、９×１０^{6}、１×１０^{7}、２×１０^{7}、３×１０^{7}、４×１０^{7}、５×１０^{7}、６×１０^{7}、７×１０^{7}、８×１０^{7}、９×１０^{7}、１×１０^{8}、２×１０^{8}、３×１０^{8}、４×１０^{8}、５×１０^{8}、６×１０^{8}、７×１０^{8}、８×１０^{8}、９×１０^{8}、１×１０^{9}、２×１０^{9}、３×１０^{9}、４×１０^{9}、５×１０^{9}、６×１０^{9}、７×１０^{9}、８×１０^{9}、９×１０^{9}、１×１０^{10}、２×１０^{10}、３×１０^{1}０、４×１０^{10}、５×１０^{10}、６×１０^{10}、７×１０^{10}、８×１０^{10}、９×１０^{10}、１×１０^{11}、２×１０^{11}、３×１０^{11}、４×１０^{11}、５×１０^{11}、６×１０^{11}、７×１０^{11}、８×１０^{11}、９×１０^{11}、１×１０^{12}、２×１０^{12}、３×１０^{12}、４×１０^{12}、５×１０^{12}、６×１０^{12}、７×１０^{12}、８×１０^{12}、９×１０^{12}、１×１０^{13}、２×１０^{13}、３×１０^{13}、４×１０^{13}、５×１０^{13}、６×１０^{13}、７×１０^{13}、８×１０^{13}、および９×１０^{13}である。実施形態では、本発明の薬学的組成物において提供されるＴＩＬの数は、１×１０^{6}～１×１０^{6}、５×１０^{6}～１×１０^{7}、１×１０^{7}～５×１０^{7}、５×１０^{7}～１×１０^{8}、１×１０^{8}～５×１０^{8}、５×１０^{8}～１×１０^{9}、１×１０^{9}～５×１０^{9}、５×１０^{9}～１×１０^{10}、１×１０^{10}～５×１０^{10}、５×１０^{10}～１×１０^{11}、５×１０^{11}～１×１０^{12}、１×１０^{12}～５×１０^{12}、および５×１０^{12}～１×１０^{13}の範囲内である。

【１３６５】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物において提供されるＴＩＬの濃度は、例えば、１００％、９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％未満のｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの薬学的組成物である。

【１３６６】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物において提供されるＴＩＬの濃度は、９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９．７５％、１９．５０％、１９．２５％、１９％、１８．７５％、１８．５０％、１８．２５％、１８％、１７．７５％、１７．５０％、１７．２５％、１７％、１６．７５％、１６．５０％、１６．２５％、１６％、１５．７５％、１５．５０％、１５．２５％、１５％、１４．７５％、１４．５０％、１４．２５％、１４％、１３．７５％、１３．５０％、１３．２５％、１３％、１２．７５％、１２．５０％、１２．２５％、１２％、１１．７５％、１１．５０％、１１．２５％、１１％、１０．７５％、１０．５０％、１０．２５％、１０％、９．７５％、９．５０％、９．２５％、９％、８．７５％、８．５０％、８．２５％、８％、７．７５％、７．５０％、７．２５％、７％、６．７５％、６．５０％、６．２５％、６％、５．７５％、５．５０％、５．２５％、５％、４．７５％、４．５０％、４．２５％、４％、３．７５％、３．５０％、３．２５％、３％、２．７５％、２．５０％、２．２５％、２％、１．７５％、１．５０％、１２５％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％超のｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの薬学的組成物である。

【１３６７】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物において提供されるＴＩＬの濃度は、約０．０００１％～約５０％、約０．００１％～約４０％、約０．０１％～約３０％、約

０．０２％～約２９％、約０．０３％～約２８％、約０．０４％～約２７％、約０．０５％～約２６％、約０．０６％～約２５％、約０．０７％～約２４％、約０．０８％～約２３％、約０．０９％～約２２％、約０．１％～約２１％、約０．２％～約２０％、約０．３％～約１９％、約０．４％～約１８％、約０．５％～約１７％、約０．６％～約１６％、約０．７％～約１５％、約０．８％～約１４％、約０．９％～約１２％、または約１％～約１０％のｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの薬学的組成物の範囲内である。

【１３６８】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物において提供されるＴＩＬの濃度は、約０．００１％～約１０％、約０．０１％～約５％、約０．０２％～約４．５％、約０．０３％～約４％、約０．０４％～約３．５％、約０．０５％～約３％、約０．０６％～約２．５％、約０．０７％～約２％、約０．０８％～約１．５％、約０．０９％～約１％、約０．１％～約０．９％のｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの薬学的組成物の範囲内である。

【１３６９】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物において提供されるＴＩＬの量は、１０ｇ、９．５ｇ、９．０ｇ、８．５ｇ、８．０ｇ、７．５ｇ、７．０ｇ、６．５ｇ、６．０ｇ、５．５ｇ、５．０ｇ、４．５ｇ、４．０ｇ、３．５ｇ、３．０ｇ、２．５ｇ、２．０ｇ、１．５ｇ、１．０ｇ、０．９５ｇ、０．９ｇ、０．８５ｇ、０．８ｇ、０．７５ｇ、０．７ｇ、０．６５ｇ、０．６ｇ、０．５５ｇ、０．５ｇ、０．４５ｇ、０．４ｇ、０．３５ｇ、０．３ｇ、０．２５ｇ、０．２ｇ、０．１５ｇ、０．１ｇ、０．０９ｇ、０．０８ｇ、０．０７ｇ、０．０６ｇ、０．０５ｇ、０．０４ｇ、０．０３ｇ、０．０２ｇ、０．０１ｇ、０．００９ｇ、０．００８ｇ、０．００７ｇ、０．００６ｇ、０．００５ｇ、０．００４ｇ、０．００３ｇ、０．００２ｇ、０．００１ｇ、０．０００９ｇ、０．０００８ｇ、０．０００７ｇ、０．０００６ｇ、０．０００５ｇ、０．０００４ｇ、０．０００３ｇ、０．０００２ｇ、または０．０００１ｇ以下である。

【１３７０】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物において提供されるＴＩＬの量は、０．０００１ｇ、０．０００２ｇ、０．０００３ｇ、０．０００４ｇ、０．０００５ｇ、０．０００６ｇ、０．０００７ｇ、０．０００８ｇ、０．０００９ｇ、０．００１ｇ、０．００１５ｇ、０．００２ｇ、０．００２５ｇ、０．００３ｇ、０．００３５ｇ、０．００４ｇ、０．００４５ｇ、０．００５ｇ、０．００５５ｇ、０．００６ｇ、０．００６５ｇ、０．００７ｇ、０．００７５ｇ、０．００８ｇ、０．００８５ｇ、０．００９ｇ、０．００９５ｇ、０．０１ｇ、０．０１５ｇ、０．０２ｇ、０．０２５ｇ、０．０３ｇ、０．０３５ｇ、０．０４ｇ、０．０４５ｇ、０．０５ｇ、０．０５５ｇ、０．０６ｇ、０．０６５ｇ、０．０７ｇ、０．０７５ｇ、０．０８ｇ、０．０８５ｇ、０．０９ｇ、０．０９５ｇ、０．１ｇ、０．１５ｇ、０．２ｇ、０．２５ｇ、０．３ｇ、０．３５ｇ、０．４ｇ、０．４５ｇ、０．５ｇ、０．５５ｇ、０．６ｇ、０．６５ｇ、０．７ｇ、０．７５ｇ、０．８ｇ、０．８５ｇ、０．９ｇ、０．９５ｇ、１ｇ、１．５ｇ、２ｇ、２．５、３ｇ、３．５、４ｇ、４．５ｇ、５ｇ、５．５ｇ、６ｇ、６．５ｇ、７ｇ、７．５ｇ、８ｇ、８．５ｇ、９ｇ、９．５ｇ、または１０ｇより多い。

【１３７１】

本発明の薬学的組成物で提供されるＴＩＬは、広い投与量囲にわたって有効である。正確な投与量は、投与経路、化合物が投与される形態、治療される対象の性別および年齢、治療される対象の体重、ならびに主治医の好みおよび経験に依存するであろう。必要に応じて、臨床的に確立されたＴＩＬの投与量を使用することもできる。ＴＩＬの投与量など、本明細書の方法を使用して投与される薬学的組成物の量は、治療されるヒトまたは哺乳動物、障害または状態の重症度、投与速度、医薬品有効成分の性質、および処方する医師の裁量に依存するであろう。

【１３７２】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、単一用量で投与され得る。かかる投与は、注射、例えば、静脈内注射によるものであり得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、複数用

量で投与され得る。投薬は、１年に１回、２回、３回、４回、５回、６回、または６回以上であり得る。投薬は、月１回、２週間に１回、週１回、または１日おきに１回であり得る。ＴＩＬの投与は、必要な限り継続することができる。

【１３７３】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}、8×10^{7}、9×10^{7}、1×10^{8}、2×10^{8}、3×10^{8}、4×10^{8}、5×10^{8}、6×10^{8}、7×10^{8}、8×10^{8}、9×10^{8}、1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}、および9×10^{13}である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効投与量は、1×10^{6}～1×10^{6}、5×10^{6}～1×10^{7}、1×10^{7}～5×10^{7}、5×10^{7}～1×10^{8}、1×10^{8}～5×10^{8}、5×10^{8}～1×10^{9}、1×10^{9}～5×10^{9}、5×10^{9}～1×10^{10}、1×10^{10}～5×10^{10}、5×10^{10}～1×10^{11}、5×10^{11}～1×10^{12}、1×10^{12}～5×10^{12}、および5×10^{12}～1×10^{13}の範囲内である。

【１３７４】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約４．３ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約３．２ｍｇ／ｋｇ、約０．３５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．３ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約１．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１ｍｇ／ｋｇ、約０．５５ｍｇ／ｋｇ～約０．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．６５ｍｇ／ｋｇ～約０．８ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約０．７５ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．８５ｍｇ／ｋｇ～約２ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約１．８５ｍｇ／ｋｇ、約１．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約１．３ｍｇ／ｋｇ～約１．６ｍｇ／ｋｇ、約１．３５ｍｇ／ｋｇ～約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約２．３ｍｇ／ｋｇ～約３．４ｍｇ／ｋｇ、約２．４ｍｇ／ｋｇ～約３．３ｍｇ／ｋｇ、約２．６ｍｇ／ｋｇ～約３．１５ｍｇ／ｋｇ、約２．７ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、約２．８ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、または約２．８５ｍｇ／ｋｇ～約２．９５ｍｇ／ｋｇの範囲内である。

【１３７５】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約１ｍｇ～約５００ｍｇ、約１０ｍｇ～約３００ｍｇ、約２０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約２５ｍｇ～約２００ｍｇ、約１ｍｇ～約５０ｍｇ、約５ｍｇ～約４５ｍｇ、約１０ｍｇ～約４０ｍｇ、約１５ｍｇ～約３５ｍｇ、約２０ｍｇ～約３０ｍｇ、約２３ｍｇ～約２８ｍｇ、約５０ｍｇ～約１５０ｍｇ、約６０ｍｇ～約１４０ｍｇ、約７０ｍｇ～約１３０ｍｇ、約８０ｍｇ～約１２０ｍｇ、約９０ｍｇ～約１１０ｍｇ、または約９５ｍｇ～約１０５ｍｇ、約９８ｍｇ～約１０２ｍｇ、約１５０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約１６０ｍｇ～約２４０ｍｇ、約１７０ｍｇ～約２３０ｍｇ、約１８０ｍｇ～約２２０ｍｇ、約１９０ｍｇ～約２１０ｍｇ、約１９５ｍｇ～約２０５ｍｇ、または約１９８～約２０７ｍｇの範囲内である。

【１３７６】

有効量のＴＩＬは、鼻腔内および経皮経路を含む、同様の有用性を有する薬剤の許容される投与様式のうちのいずれかによって、動脈内注射によって、静脈内、腹腔内、非経口

、筋肉内、皮下的、局所的、移植によって、または吸入によって、単一用量または複数用量のいずれかで投与することができる。

【１３７７】

別の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を含む注入バッグを提供する。

【１３７８】

別の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団および薬学的に許容される担体を含む腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）組成物を提供する。

【１３７９】

別の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を含む注入バッグを提供する。

【１３８０】

別の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団の凍結保存された調製物を提供する。

【１３８１】

別の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団および凍結保存された培地を含む腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）組成物を提供する。

【１３８２】

別の実施形態では、本発明は、凍結保存培地がＤＭＳＯを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。

【１３８３】

別の実施形態では、本発明は、凍結保存培地が７～１０％のＤＭＳＯを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。

【１３８４】

別の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物の凍結保存された調製物を提供する。

【１３８５】

ＶＩ．薬学的組成物、投与量、および投薬レジメン

実施形態では、本開示の方法を使用して拡張されたＴＩＬは、薬学的組成物として患者に投与される。実施形態では、薬学的組成物は、無菌緩衝液中のＴＩＬの懸濁液である。本開示のＰＢＭＣを使用して拡張されたＴＩＬは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与することができる。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、単一の動脈内または静脈内注入として投与され、これは好ましくは、およそ３０～６０分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、およびリンパ内投与が含まれる。

【１３８６】

任意の好適な用量のＴＩＬが投与され得る。いくつかの実施形態では、特に癌がＮＳＣＬＣである場合、約2.3×10^{10}～約13.7×10^{10}ＴＩＬが投与され、平均は約7.8×10^{10}ＴＩＬである。実施形態では、約1.2×10^{10}～約4.3×10^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約3×10^{10}～約12×10^{10}ＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約4×10^{10}～約10×10^{10}ＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約5×10^{10}～約8×10^{10}ＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約6×10^{10}～約8×10^{10}ＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約7×10^{10}～約8×10^{10}ＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約2.3×10^{10}～約13.7×10^{10}である。いくつかの実施形態では、特に癌がＮＳＣＬＣである場合、治療上有効な投与量は、約7.8×10^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約1.2×10^{10}～約4.3×10^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約3×10^{10}～約12×10^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約4×10^{10}～約10×10^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約5×10^{10}～約8×10^{10}ＴＩＬである。いくつか

の実施形態では、治療上有効な投与量は、約６×１０^{10}～約８×１０^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約７×１０^{10}～約８×１０^{10}ＴＩＬである。

【１３８７】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物において提供されるＴＩＬの数は、約１×１０^{6}、２×１０^{6}、３×１０^{6}、４×１０^{6}、５×１０^{6}、６×１０^{6}、７×１０^{6}、８×１０^{6}、９×１０^{6}、１×１０^{7}、２×１０^{7}、３×１０^{7}、４×１０^{7}、５×１０^{7}、６×１０^{7}、７×１０^{7}、８×１０^{7}、９×１０^{7}、１×１０^{8}、２×１０^{8}、３×１０^{8}、４×１０^{8}、５×１０^{8}、６×１０^{8}、７×１０^{8}、８×１０^{8}、９×１０^{8}、１×１０^{9}、２×１０^{9}、３×１０^{9}、４×１０^{9}、５×１０^{9}、６×１０^{9}、７×１０^{9}、８×１０^{9}、９×１０^{9}、１×１０^{10}、２×１０^{10}、３×１０^{10}、４×１０^{10}、５×１０^{10}、６×１０^{10}、７×１０^{10}、８×１０^{10}、９×１０^{10}、１×１０^{11}、２×１０^{11}、３×１０^{11}、４×１０^{11}、５×１０^{11}、６×１０^{11}、７×１０^{11}、８×１０^{11}、９×１０^{11}、１×１０^{12}、２×１０^{12}、３×１０^{12}、４×１０^{12}、５×１０^{12}、６×１０^{12}、７×１０^{12}、８×１０^{12}、９×１０^{12}、１×１０^{13}、２×１０^{13}、３×１０^{13}、４×１０^{13}、５×１０^{13}、６×１０^{13}、７×１０^{13}、８×１０^{13}、および９×１０^{13}である。実施形態では、本発明の薬学的組成物において提供されるＴＩＬの数は、１×１０^{6}～１×１０^{6}、５×１０^{6}～１×１０^{7}、１×１０^{7}～５×１０^{7}、５×１０^{7}～１×１０^{8}、１×１０^{8}～５×１０^{8}、５×１０^{8}～１×１０^{9}、１×１０^{9}～５×１０^{9}、５×１０^{9}～１×１０^{10}、１×１０^{10}～５×１０^{10}、５×１０^{10}～１×１０^{11}、５×１０^{11}～１×１０^{12}、１×１０^{12}～５×１０^{12}、および５×１０^{12}～１×１０^{13}の範囲内である。

【１３８８】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物において提供されるＴＩＬの濃度は、例えば、１００％、９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％未満のｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの薬学的組成物である。

【１３８９】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物において提供されるＴＩＬの濃度は、９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９．７５％、１９．５０％、１９．２５％、１９％、１８．７５％、１８．５０％、１８．２５％、１８％、１７．７５％、１７．５０％、１７．２５％、１７％、１６．７５％、１６．５０％、１６．２５％、１６％、１５．７５％、１５．５０％、１５．２５％、１５％、１４．７５％、１４．５０％、１４．２５％、１４％、１３．７５％、１３．５０％、１３．２５％、１３％、１２．７５％、１２．５０％、１２．２５％、１２％、１１．７５％、１１．５０％、１１．２５％、１１％、１０．７５％、１０．５０％、１０．２５％、１０％、９．７５％、９．５０％、９．２５％、９％、８．７５％、８．５０％、８．２５％、８％、７．７５％、７．５０％、７．２５％、７％、６．７５％、６．５０％、６．２５％、６％、５．７５％、５．５０％、５．２５％、５％、４．７５％、４．５０％、４．２５％、４％、３．７５％、３．５０％、３．２５％、３％、２．７５％、２．５０％、２．２５％、２％、１．７５％、１．５０％、１２５％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．

００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％超のｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの薬学的組成物である。

【１３９０】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物において提供されるＴＩＬの濃度は、約０．０００１％～約５０％、約０．００１％～約４０％、約０．０１％～約３０％、約０．０２％～約２９％、約０．０３％～約２８％、約０．０４％～約２７％、約０．０５％～約２６％、約０．０６％～約２５％、約０．０７％～約２４％、約０．０８％～約２３％、約０．０９％～約２２％、約０．１％～約２１％、約０．２％～約２０％、約０．３％～約１９％、約０．４％～約１８％、約０．５％～約１７％、約０．６％～約１６％、約０．７％～約１５％、約０．８％～約１４％、約０．９％～約１２％、または約１％～約１０％のｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの薬学的組成物の範囲内である。

【１３９１】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物において提供されるＴＩＬの濃度は、約０．００１％～約１０％、約０．０１％～約５％、約０．０２％～約４．５％、約０．０３％～約４％、約０．０４％～約３．５％、約０．０５％～約３％、約０．０６％～約２．５％、約０．０７％～約２％、約０．０８％～約１．５％、約０．０９％～約１％、約０．１％～約０．９％のｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの薬学的組成物の範囲内である。

【１３９２】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物において提供されるＴＩＬの量は、１０ｇ、９．５ｇ、９．０ｇ、８．５ｇ、８．０ｇ、７．５ｇ、７．０ｇ、６．５ｇ、６．０ｇ、５．５ｇ、５．０ｇ、４．５ｇ、４．０ｇ、３．５ｇ、３．０ｇ、２．５ｇ、２．０ｇ、１．５ｇ、１．０ｇ、０．９５ｇ、０．９ｇ、０．８５ｇ、０．８ｇ、０．７５ｇ、０．７ｇ、０．６５ｇ、０．６ｇ、０．５５ｇ、０．５ｇ、０．４５ｇ、０．４ｇ、０．３５ｇ、０．３ｇ、０．２５ｇ、０．２ｇ、０．１５ｇ、０．１ｇ、０．０９ｇ、０．０８ｇ、０．０７ｇ、０．０６ｇ、０．０５ｇ、０．０４ｇ、０．０３ｇ、０．０２ｇ、０．０１ｇ、０．００９ｇ、０．００８ｇ、０．００７ｇ、０．００６ｇ、０．００５ｇ、０．００４ｇ、０．００３ｇ、０．００２ｇ、０．００１ｇ、０．０００９ｇ、０．０００８ｇ、０．０００７ｇ、０．０００６ｇ、０．０００５ｇ、０．０００４ｇ、０．０００３ｇ、０．０００２ｇ、または０．０００１ｇ以下である。

【１３９３】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物において提供されるＴＩＬの量は、０．０００１ｇ、０．０００２ｇ、０．０００３ｇ、０．０００４ｇ、０．０００５ｇ、０．０００６ｇ、０．０００７ｇ、０．０００８ｇ、０．０００９ｇ、０．００１ｇ、０．００１５ｇ、０．００２ｇ、０．００２５ｇ、０．００３ｇ、０．００３５ｇ、０．００４ｇ、０．００４５ｇ、０．００５ｇ、０．００５５ｇ、０．００６ｇ、０．００６５ｇ、０．００７ｇ、０．００７５ｇ、０．００８ｇ、０．００８５ｇ、０．００９ｇ、０．００９５ｇ、０．０１ｇ、０．０１５ｇ、０．０２ｇ、０．０２５ｇ、０．０３ｇ、０．０３５ｇ、０．０４ｇ、０．０４５ｇ、０．０５ｇ、０．０５５ｇ、０．０６ｇ、０．０６５ｇ、０．０７ｇ、０．０７５ｇ、０．０８ｇ、０．０８５ｇ、０．０９ｇ、０．０９５ｇ、０．１ｇ、０．１５ｇ、０．２ｇ、０．２５ｇ、０．３ｇ、０．３５ｇ、０．４ｇ、０．４５ｇ、０．５ｇ、０．５５ｇ、０．６ｇ、０．６５ｇ、０．７ｇ、０．７５ｇ、０．８ｇ、０．８５ｇ、０．９ｇ、０．９５ｇ、１ｇ、１．５ｇ、２ｇ、２．５、３ｇ、３．５、４ｇ、４．５ｇ、５ｇ、５．５ｇ、６ｇ、６．５ｇ、７ｇ、７．５ｇ、８ｇ、８．５ｇ、９ｇ、９．５ｇ、または１０ｇより多い。

【１３９４】

本発明の薬学的組成物で提供されるＴＩＬは、広い投与量囲にわたって有効である。正確な投与量は、投与経路、化合物が投与される形態、治療される対象の性別および年齢、治療される対象の体重、ならびに主治医の好みおよび経験に依存するであろう。必要に応じて、臨床的に確立されたＴＩＬの投与量を使用することもできる。ＴＩＬの投与量など

、本明細書の方法を使用して投与される薬学的組成物の量は、治療されるヒトまたは哺乳動物、障害または状態の重症度、投与速度、医薬品有効成分の性質、および処方する医師の裁量に依存するであろう。

【１３９５】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、単一用量で投与され得る。かかる投与は、注射、例えば、静脈内注射によるものであり得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、複数用量で投与され得る。投薬は、１年に１回、２回、３回、４回、５回、６回、または６回以上であり得る。投薬は、月１回、２週間に１回、週１回、または１日おきに１回であり得る。ＴＩＬの投与は、必要な限り継続することができる。

【１３９６】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}、8×10^{7}、9×10^{7}、1×10^{8}、2×10^{8}、3×10^{8}、4×10^{8}、5×10^{8}、6×10^{8}、7×10^{8}、8×10^{8}、9×10^{8}、1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}、および9×10^{13}である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効投与量は、1×10^{6}～1×10^{6}、5×10^{6}～1×10^{7}、1×10^{7}～5×10^{7}、5×10^{7}～1×10^{8}、1×10^{8}～5×10^{8}、5×10^{8}～1×10^{9}、1×10^{9}～5×10^{9}、5×10^{9}～1×10^{10}、1×10^{10}～5×10^{10}、5×10^{10}～1×10^{11}、5×10^{11}～1×10^{12}、1×10^{12}～5×10^{12}、および5×10^{12}～1×10^{13}の範囲内である。

【１３９７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約４．３ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約３．２ｍｇ／ｋｇ、約０．３５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．３ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約１．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１ｍｇ／ｋｇ、約０．５５ｍｇ／ｋｇ～約０．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．６５ｍｇ／ｋｇ～約０．８ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約０．７５ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．８５ｍｇ／ｋｇ～約２ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約１．８５ｍｇ／ｋｇ、約１．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約１．３ｍｇ／ｋｇ～約１．６ｍｇ／ｋｇ、約１．３５ｍｇ／ｋｇ～約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約２．３ｍｇ／ｋｇ～約３．４ｍｇ／ｋｇ、約２．４ｍｇ／ｋｇ～約３．３ｍｇ／ｋｇ、約２．６ｍｇ／ｋｇ～約３．１５ｍｇ／ｋｇ、約２．７ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、約２．８ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、または約２．８５ｍｇ／ｋｇ～約２．９５ｍｇ／ｋｇの範囲内である。

【１３９８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約１ｍｇ～約５００ｍｇ、約１０ｍｇ～約３００ｍｇ、約２０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約２５ｍｇ～約２００ｍｇ、約１ｍｇ～約５０ｍｇ、約５ｍｇ～約４５ｍｇ、約１０ｍｇ～約４０ｍｇ、約１５ｍｇ～約３５ｍｇ、約２０ｍｇ～約３０ｍｇ、約２３ｍｇ～約２８ｍｇ、約５０ｍｇ～約１５０ｍｇ、約６０ｍｇ～約１４０ｍｇ、約７０ｍｇ～約１３０ｍｇ、約８０ｍｇ～約１２０ｍｇ、約９０ｍｇ～約１１０ｍｇ、または約９５ｍｇ～約１０５ｍｇ、約９８ｍｇ～約１０２ｍｇ、

約１５０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約１６０ｍｇ～約２４０ｍｇ、約１７０ｍｇ～約２３０ｍｇ、約１８０ｍｇ～約２２０ｍｇ、約１９０ｍｇ～約２１０ｍｇ、約１９５ｍｇ～約２０５ｍｇ、または約１９８～約２０７ｍｇの範囲内である。

【１３９９】

有効量のＴＩＬは、鼻腔内および経皮経路を含む、同様の有用性を有する薬剤の許容される投与様式のうちのいずれかによって、動脈内注射によって、静脈内、腹腔内、非経口、筋肉内、皮下的、局所的、移植によって、または吸入によって、単一用量または複数用量のいずれかで投与することができる。

【１４００】

ＶＩＩ．患者を治療する方法

治療の方法は、最初のＴＩＬ収集およびＴＩＬの培養から始まる。かかる方法は両方とも、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｊｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，２０１２，３５（３）：２８３－２９２によって当該技術分野で説明されている。治療方法の実施形態は、実施例を含む以下のセクション全体に記載されている。

【１４０１】

本明細書に記載の方法に従って、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また例えば、図１に示されるように）産生される拡張ＴＩＬは、癌を有する患者の治療における特定の用途を見出す（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｇｏｆｆ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２０１６，３４（２０）：２３８９－２３９、および補足内容に記載される）。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、以前に記載されたように、転移性黒色腫の切除された沈着物から増殖された（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００３，２６：３３２－３４２を参照）。新鮮な腫瘍は、無菌条件下で解剖することができる。代表的な試料は、正式な病理学的分析のために収集することができる。２ｍｍ^3～３ｍｍ^{3}の単一断片を使用することができる。いくつかの実施形態では、患者あたり５、１０、１５、２０、２５、または３０個の試料を取得する。いくつかの実施形態では、患者あたり２０、２５、または３０個の試料を取得する。いくつかの実施形態では、患者あたり２０、２２、２４、２６、または２８個の試料を取得する。いくつかの実施形態では、患者あたり２４個の試料を取得する。試料は、２４ウェルプレートの個々のウェルに入れ、高用量ＩＬ－２（６，０００ＩＵ／ｍＬ）を含む成長培地中で維持し、腫瘍の破壊および／またはＴＩＬの増殖をモニターすることができる。処理後に生細胞が残っている腫瘍は、本明細書に記載されるように、単一細胞懸濁液中に酵素的に消化され、凍結保存され得る。

【１４０２】

いくつかの実施形態では、成功裏に成長したＴＩＬは、表現型分析（ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、およびＣＤ５６）のためにサンプリングされ、利用可能な場合、自己腫瘍に対して試験され得る。一晩の共培養でインターフェロン－ガンマ（ＩＦＮ－γ）レベルが２００ｐｇ／ｍＬを超え、バックグラウンドの２倍になった場合、ＴＩＬは、反応性があるとみなすことができる。（Ｇｏｆｆ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２０１０，３３：８４０－８４７、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態では、自己反応性または十分な成長パターンの証拠を有する培養物は、急速拡張（ＲＥＰ）と称されることもある第２の拡張を含む、第２の拡張（例えば、図１のステップＤに従って提供される第２の拡張）のために選択され得る。いくつかの実施形態では、高い自己反応性（例えば、第２の拡張中の高い増殖）を有する拡張ＴＩＬが、追加の第２の拡張のために選択される。いくつかの実施形態では、高い自己反応性（例えば、図１のステップＤで提供されるような第２の拡張中の高い増殖）を有するＴＩＬが、図１のステップＤに従って、追加の第２の拡張のために選択される。

【１４０３】

注入バッグＴＩＬの凍結保存試料の細胞表現型は、表面マーカーＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ

８、ＣＣＲ７、およびＣＤ４５ＲＡ（ＢＤ ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ）のフローサイトメトリー（例えば、ＦｌｏｗＪｏ）、ならびに本明細書に記載の方法のうちのいずれかによって分析され得る。血清サイトカインは、標準的な酵素結合免疫吸着測定法を使用することによって測定された。血清ＩＦＮ－ｇの上昇は、＞１００ｐｇ／ｍＬおよび４３ベースラインレベルを超えると定義された。

【１４０４】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図１に例示される方法によって産生されるＴＩＬは、ＴＩＬの臨床効果の驚くべき改善を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図１に例示される方法によって産生されるＴＩＬは、例えば、図１に例示されるもの以外の方法を含む、本明細書に記載されるもの以外の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、増加した臨床効果を示す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるもの以外の方法は、プロセス１Ｃおよび／または第１世代（Ｇｅｎ１）と称される方法を含む。いくつかの実施形態では、効力の増加は、ＤＣＲ、ＯＲＲ、および／または他の臨床応答によって測定される。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図１に例示される方法によって産生されるＴＩＬＳは、例えば、図１に例示されるもの以外の方法、例えば、Ｇｅｎ１プロセスを含む、本明細書に記載されるもの以外の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、同様の応答時間および安全性プロファイルを示す。

【１４０５】

いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）は、治療効果および／または増加した臨床効果を示す。いくつかの実施形態では、ＴＩＬで治療された対象の血液中のＩＦＮ－γは、活性なＴＩＬを示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ産生のための効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能に関する別の尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、例えば図１に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のエクスビボでの血液、血清、またはＴＩＬ中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することによって測定することができる。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γの増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬで治療された患者における治療効果を示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、未治療の患者と比較して、および／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、および／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、および／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、および／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、３倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、および／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、４倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、および／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ ＥＬＩＳＡキットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば図１に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のエクスビボでのＴＩＬにおいて測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば図１に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象の血液において測定され

る。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば図１に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のＴＩＬ血清において測定される。

【１４０６】

いくつかの実施形態では、例えば図１に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されるＴＩＬは、例えばプロセス１Ｃ法と称される方法などの、図１に例示されていないものを含む他の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、増加したポリクローン性を示す。いくつかの実施形態では、有意に改善されたポリクローン性および／または増加したポリクローン性は、治療効果および／または増加した臨床効果を示す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、Ｔ細胞レパートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性の増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬの投与に関する治療効果を示すことができる。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、例えば図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、１倍、２倍、１０倍、１００倍、５００倍、または１０００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、および／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、および／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、および／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、および／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、および／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、および／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０００倍増加する。

【１４０７】

有効性の尺度は、当該技術分野で知られている、ならびに本明細書に記載されている、疾患制御率（ＤＣＲ）ならびに全応答率（ＯＲＲ）を含むことができる。

【１４０８】

１．ＮＳＣＬＣを治療する方法

本明細書に記載の組成物および方法は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を治療するための方法において使用することができ、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１抗体による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体には、例えば、ニボルマブ（ＢＭＳ－９３６５５８，Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ；Ｏｐｄｉｖｏ（登録商標））、ペムブロリズマブ（ラムブロリズマブ、ＭＫ０３４７５またはＭＫ－３４７５、Ｍｅｒｃｋ；Ｋｅｙｔｒｕｄａ（登録商標））、ヒト化抗ＰＤ－１抗体ＪＳ００１（ＳｈａｎｇＨａｉ ＪｕｎＳｈｉ）、モノクローナル抗ＰＤ－１抗体ＴＳＲ－０４２（Ｔｅｓａｒｏ，Ｉｎｃ．）、ピジリズマブ（抗ＰＤ－１ ｍＡｂ ＣＴ－０１１、Ｍｅｄｉｖａｔｉｏｎ）、抗ＰＤ－１モノクローナル抗体ＢＧＢ－Ａ３１７（ＢｅｉＧｅｎｅ）、および／または抗ＰＤ－１抗体ＳＨＲ－１２１０（ＳｈａｎｇＨａｉ ＨｅｎｇＲｕｉ）、ヒトモノクローナル抗体ＲＥＧＮ２８１０（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ）、ヒトモノクローナル抗体ＭＤＸ－１１０６（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ）、および／またはヒト化抗ＰＤ－１ ＩｇＧ４抗体ＰＤＲ００１（Ｎｏｖａｒｔｉｓ）が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１抗体はクローン：ＲＭＰ１－１４（ラ

ットＩｇＧ）－ＢｉｏＸｃｅｌｌカタログ番号ＢＰ０１４６に由来する。本明細書に記載のステップＡ～Ｆに従って産生されたＴＩＬとの同時投与方法での使用に適した他の好適な抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第８，００８，４４９号に開示された抗ＰＤ－１抗体である。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合部分は、ＰＤ－Ｌ１に特異的に結合し、ＰＤ－１との相互作用を阻害し、それにより免疫活性を増加させる。ＰＤ－Ｌ１に結合し、ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１との間の相互作用を破壊し、抗腫瘍ｉｍｍｕ２７４０２７４ｎｅ応答を刺激する当該技術分野で知られている任意の抗体が含まれる。例えば、ＰＤ－Ｌ１を標的とし、臨床試験中の抗体には、ＢＭＳ－９３６５５９（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ）およびＭＰＤＬ３２８０Ａ（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）が含まれる。ＰＤ－Ｌ１を標的とする他の好適な抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第７，９４３，７４３号に開示されている。ＰＤ－１またはＰＤ－Ｌ１に結合し、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１相互作用を破壊し、抗腫瘍免疫応答を刺激する任意の抗体が含まれることは、当業者には理解されるであろう。

【１４０９】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＣＴＬＡ－４および／または抗ＰＤ－１ならびに化学療法剤に対して不応性である。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＣＴＬＡ－４および／または抗ＰＤ－１ならびに化学療法に対して不応性であり、化学療法剤は、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、シスプラチンである。いくつかの実施形態では、イピリムマブ（Ｙｅｒｖｏｙ（登録商標））などの抗ＣＬＴＡ－４抗体。

【１４１０】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ＰＤ－１（例えば、ペムブロリズマブを含む）と化学療法剤との組み合わせによる治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、化学療法剤（複数可）は、白金ダブレット化学療法剤である。いくつかの実施形態では、白金ダブレット療法は、シスプラチンおよびカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤と、ビノレルビン、ゲムシタビン、およびタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはナブ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療法剤と、を含む。いくつかの実施形態では、白金ダブレット化学療法剤は、ペメトレキセドと組み合わされている。

【１４１１】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１および化学療法剤を含む併用治療または併用療法に対して不応性である。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ＪＳ００１、ＴＳＲ－０４２、ピジリズマブ、（ＢＧＢ－Ａ３１７、ＳＨＲ－１２１０、ＲＥＧＮ２８１０、ＭＤＸ－１１０６、ＰＤＲ００１、クローン由来の抗ＰＤ－１：ＲＭＰ１－１４、米国特許第８，００８，４４９号に開示されている抗ＰＤ－１抗体、デュルバルマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、ならびにそれらの断片、誘導体、多様体、およびバイオシミラーからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１は、ペムブロリズマブである。いくつかの実施形態では、化学療法剤は、白金ダブレット化学療法剤である。いくつかの実施形態では、化学療法剤は、ペメトレキセドと組み合わされている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、およびシスプラチンを含む併用療法に対して不応性である。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、シスプラチン、ニボルマブ、およびイピリムマブを含む併用療法に対して不応性である。

【１４１２】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１および白金ダブレット療法を含む併用療法に対して不応性であり、白金ダブレット療法は、

ｉ）シスプラチンおよびカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤と、

ｉｉ）ビノレルビン、ゲムシタビン、およびタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはｎａｂ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学

療法剤と、を含む。

【１４１３】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１、ペメトレキセド、および白金ダブレット療法を含む併用療法に対して不応性であり、白金ダブレット療法は、

ｉ）シスプラチンおよびカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤と、

ｉｉ）ビノレルビン、ゲムシタビン、およびタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはｎａｂ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療法剤と、を含む。

【１４１４】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１抗体で治療されている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で処理されている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ対象は、治療ナイーブである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、以前に化学療法剤で治療されている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、以前に化学療法剤で治療されているが、もはや化学療法剤で治療されていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ対象は、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ対象は、治療ナイーブのＮＳＣＬＣを有するか、または化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ対象は、治療ナイーブのＮＳＣＬＣまたは化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブであり、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ対象は、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。いくつかの実施形態では、対象は、ベースラインで巨大腫瘤病変を有し、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ対象は、治療ナイーブのＮＳＣＬＣまたは化学療法後（例えば、化学療法剤後）であるが、ＰＤ－Ｌ１の発現が低く、かつ／またはベースラインで巨大腫瘤病変を有する抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブである。いくつかの実施形態では、最大腫瘍直径が横方向または冠状面のいずれかで測定された７ｃｍより大きい場合、巨大腫瘤病変が示される。いくつかの実施形態では、巨大腫瘤病変は、２０ｍｍ以上の短軸直径を有する腫れたリンパ節がある場合に示される。いくつかの実施形態では、化学療法剤は、ＮＳＣＬＣの標準治療の治療薬を含む。

【１４１５】

いくつかの実施形態では、例えば図１に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されるＴＩＬは、例えばプロセス１Ｃ法と称される方法などの、図１に例示されていないものを含む他の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、増加したポリクローン性を示す。いくつかの実施形態では、有意に改善されたポリクローン性および／または増加したポリクローン性は、癌治療に対する治療効果および／または増加した臨床効果を示す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、Ｔ細胞レパートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性の増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬの投与に関する治療効果を示すことができる。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、例えば図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、１倍、２倍、１０倍、１００倍、５００倍、または１０００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、および／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、および／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、およ

び／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、および／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、および／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、および／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０００倍増加する。

【１４１６】

ａ．ＰＤ－１およびＰＤ－Ｌ１阻害剤

プログラム死１（ＰＤ－１）は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）Ｔ細胞、活性化単球、および樹状細胞によって発現される２８８アミノ酸の膜貫通免疫チェックポイント受容体タンパク質である。ＣＤ２７９としても知られるＰＤ－１は、ＣＤ２８ファミリーに属し、ヒトでは第２染色体上のＰｄｃｄ１遺伝子によってコードされる。ＰＤ－１は、１つの免疫グロブリン（Ｉｇ）スーパーファミリードメイン、膜貫通領域、ならびに免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ（ＩＴＩＭ）および免疫受容体チロシンベースのスイッチモチーフ（ＩＴＳＭ）を含む細胞内ドメインからなる。ＰＤ－１とそのリガンド（ＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２）は、Ｋｅｉｒ，ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００８，２６，６７７－７０４に記載されているように、免疫寛容において重要な役割を果たすことが知られている。ＰＤ－１は、Ｔ細胞の免疫応答を負に調節する阻害シグナルを提供する。ＰＤ－Ｌ１（Ｂ７－Ｈ１またはＣＤ２７４としても知られる）およびＰＤ－Ｌ２（Ｂ７－ＤＣまたはＣＤ２７３としても知られる）は、腫瘍細胞および間質細胞上に発現され、ＰＤ－１を発現する活性化Ｔ細胞が遭遇する可能性があり、Ｔ細胞の免疫抑制につながる。ＰＤ－Ｌ１は、ヒト第９染色体上のＣｄ２７４遺伝子によってコードされる２９０アミノ酸の膜貫通タンパク質である。例えば、Ｔｏｐａｌｉａｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｎ．Ｅｎｇ．Ｊ．Ｍｅｄ．２０１２，３６６，２４４３－５４に記載される最近の臨床研究で実証されているように、ＰＤ－１阻害剤、ＰＤ－Ｌ１阻害剤、および／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤の使用による、ＰＤ－１とそのリガンドＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２との間の相互作用をブロックすることで、免疫抵抗を克服することができる。ＰＤ－Ｌ１は、多くの腫瘍細胞株上で発現されるが、ＰＤ－Ｌ２は、主に樹状細胞およびいくつかの腫瘍株上で発現される発現される。Ｔ細胞（活性化後にＰＤ－１を誘導的に発現する）に加えて、ＰＤ－１は、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、活性化単球、樹状細胞上でも発現される。

【１４１７】

実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、当該技術分野で知られている任意のＰＤ－１阻害剤またはＰＤ－１遮断薬であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるＰＤ－１阻害剤または遮断薬のうちの１つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、および「遮断薬」という用語は、本明細書では、ＰＤ－１阻害剤に関して交換可能に使用される。誤解を避けるために、抗体であるＰＤ－１阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、多様体、コンジュゲート、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、ＰＤ－１阻害剤への本明細書での言及はまた、小分子化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【１４１８】

好ましい実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、抗体（すなわち、抗ＰＤ－１抗体）、Ｆａｂ断片を含むその断片、またはその一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ポリクローナル抗体である。好ましい実施形態では、ＰＤ

－１阻害剤は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ＰＤ－１との結合について競合し、かつ／またはＰＤ－１上のエピトープに結合する。実施形態では、抗体は、ＰＤ－１との結合について競合し、かつ／またはＰＤ－１上のエピトープに結合する。

【１４１９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ヒトＰＤ－１に約１００ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－１に約９０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－１に約８０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－１に約７０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－１に約６０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－１に約５０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－１に約４０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－１に約３０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－１に約２０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－１に約１０ｐＭ以下のK_Dで結合する、またはヒトＰＤ－１に約１ｐＭ以下のK_Dで結合するものである。

【１４２０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ヒトＰＤ－１に約7.5×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約7.5×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約8×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約8.5×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約9×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約9.5×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、またはヒトＰＤ－１に約1×10^{6}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合するものである。

【１４２１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ヒトＰＤ－１に約2×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.1×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.2×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.3×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.4×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.5×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.6×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、またはヒトＰＤ－１に約2.7×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.8×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.9×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、またはヒトＰＤ－１に約3×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合するものである。

【１４２２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、約１０ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約９ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約８ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約７ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約６ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約５ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約４ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約３ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約２ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、または約１ｎＭ以下のIC_{50}でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害するものである。

【１４２３】

実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブ（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ Ｃｏ．からＯＰＤＩＶＯとして市販されている）、またはそれらのバイオシミラー、抗原結合断片、コンジュゲート、もしくは多様体である。ニボルマブは、ＰＤ－１受容体を遮断する完全ヒトＩｇＧ４抗体である。実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、免疫グロブリンＧ４κ、抗（ヒトＣＤ２７４）抗体である。ニボルマブには、Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ａｂｓｔｒａｃｔｓ Ｓｅｒｖｉｃｅ（ＣＡＳ）登録番号９４６４１４－９４－４が割り当てられており、５Ｃ４、ＢＭＳ－９３６５５８、ＭＤＸ－１１０６、およびＯＮＯ－４５３８としても知られている。ニボルマブの調製および特性は、米国特許第８，００８，４４９号および国際特許公開第ＷＯ２００６／１２１１６８号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。様々な形態の癌におけるニボルマブの臨床的安全性および有効性は、Ｗａｎｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｒｅｓ．２０１４，２，８４６－５６；Ｐａｇｅ，ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．，２０１４，６５，１８５－２０２、およびＷｅｂｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２０１３，３１，４３１１－４３１８に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ニボルマブのアミノ酸配列を表４８に示す。ニボルマブは、２２－９６、１４０－１９６、２５４－３１４、３６０－４１８、２２′′－９６′′、１４０′′－１９６′′、２５４′′－３１４′′、および３６０′′－４１８′′における重鎖内ジスルフィド結合；２３′－８８′、１３４′－１９４′、２３′′′－８８′′′、および１３４′′′－１９４′′′における軽鎖内ジスルフィド結合；１２７－２１４′、１２７′′－２１４′′′における重鎖－軽鎖間ジスルフィド結合；２１９－２１９′′および２２２－２２２′′における重鎖－重鎖間ジスルフィド結合；ならびに２９０、２９０′′におけるＮ－グリコシル化部位（Ｈ ＣＨ$_{2}$８４．４）を有する。

【１４２４】

実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、配列番号４６３によって与えられる重鎖および配列番号４６４によって与えられる軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号４６３および配列番号４６４に示される配列を有する重鎖および軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、多様体、もしくはコンジュゲートを含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４６３および配列番号４６４に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４６３および配列番号４６４に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４６３および配列番号４６４に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４６３および配列番号４６４に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４６３および配列番号４６４に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖および軽鎖を含む。

【１４２５】

実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブの重鎖および軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤重鎖可変領域（Ｖ$_{H}$）は、配列番号４６５に示される配列を含み、ＰＤ－１阻害剤軽鎖可変領域（Ｖ$_{L}$）は、配列番号４６６に示される配列、およびその保存的アミノ酸置換を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４６５および配列番号４６６に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶ$_{H}$およびＶ$_{L}$領域を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４６５および配列番号４６６に示される配列と少なくとも９８％同一であるＶ$_{H}$およびＶ$_{L}$領域を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４６５および配列番号４６６に示される配列と少なくとも９７％同一であるＶ$_{H}$およびＶ$_{L}$領域を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４６５および配列番号４６６に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶ$_{H}$および

V_L領域を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４６５および配列番号４６６に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。

【１４２６】

実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号４６７、配列番号４６８、および配列番号４６９に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号４７０、配列番号４７１、および配列番号４７２に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、かつ／またはＰＤ－１上の同じエピトープに結合する。

【１４２７】

実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－１バイオシミラーモノクローナル抗体である。実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、および切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－１抗体であり、抗ＰＤ－１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。抗ＰＤ－１抗体は、米国ＦＤＡおよび／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。

【表３７】

表３５．ニボルマブに関連するＰＤ－１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 463 ニボルマブ重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSSASTKGPS 120 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS 180 VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP 240 KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT 300 VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC 360 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV 420 MHEALHNHYT QKSLSLSLGK 440
配列番号 464 ニボルマブ軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号 465 ニボルマブ可変重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSS 113
配列番号 466 ニボルマブ可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIK 107
配列番号 467 ニボルマブ重鎖 CDR1	NSGMH 5
配列番号 468 ニボルマブ重鎖 CDR2	VIWYDGSKRY YADSVKG 17
配列番号 469 ニボルマブ重鎖 CDR3	NDDY 4
配列番号 470 ニボルマブ軽鎖 CDR1	RASQSVSSYL A 11
配列番号 471 ニボルマブ軽鎖 CDR2	DASNRAT 7
配列番号 472 ニボルマブ軽鎖 CDR3	QQSSNWPRT 9

【１４２８】

別の実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブ（Ｍｅｒｃｋ＆Ｃｏ．，Ｉｎｃ（Ｋｅｎｉｌｗｏｒｔｈ，ＮＪ，ＵＳＡ）からＫＥＹＴＲＵＤＡとして市販されている）、またはそれらの抗原結合断片、コンジュゲート、もしくは多様体を含む。ペムブロリズマブには、ＣＡＳ登録番号１３７４８５３－９１－４が割り当てられており、ラムブロリズマブ、ＭＫ－３４７５、およびＳＣＨ－９００４７５としても知られている。ペムブロリズマブは、免疫グロブリンＧ４、抗（ヒトタンパク質ＰＤＣＤ１（プログラム細胞死１））（ヒト－ハツカネズミモノクローナル重鎖）、ヒト－ハツカネズミモノクローナル軽鎖、二量体構造を有するジスルフィドを有する。ペムブロリズマブの構造は、免疫グロ

ブリンＧ４、抗（ヒトプログラム細胞死１）；ヒト化マウスモノクローナルκ軽鎖二量体（２２６－２２６′′：２２９－２２９′′）－ビスジスルフィドを有するヒト化マウスモノクローナル［２２８－Ｌ－プロリン（Ｈ１０－Ｓ＞Ｐ）］γ４重鎖（１３４－２１８′）－ジスルフィドとしても記載され得る。ペムブロリズマブの特性、使用、および調製は、国際特許公開第ＷＯ２００８／１５６７１２Ａ１号、米国特許第８，３５４，５０９号、ならびに米国特許出願公開第ＵＳ２０１０／０２６６６１７Ａ１号、同第ＵＳ２０１３／０１０８６５１Ａ１号、および同第ＵＳ２０１３／０１０９８４３Ａ２に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。様々な形態の癌におけるペムブロリズマブの臨床的安全性および有効性は、Ｆｕｅｒｓｔ，Ｏｎｃｏｌｏｇｙ Ｔｉｍｅｓ，２０１４，３６，３５－３６、Ｒｏｂｅｒｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ，２０１４，３８４，１１０９－１７、およびＴｈｏｍａｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．，２０１４，１４，１０６１－１０６４に記載されている。ペムブロリズマブのアミノ酸配列を表４９に示す。ペムブロリズマブは、ジスルフィド架橋：２２－９６、２２′′－９６′′、２３′－９２′、２３′′′－９２′′′、１３４－２１８′、１３４′′－２１８′′′、１３８′－１９８′、１３８′′′－１９８′′′、１４７－２０３、１４７′′－２０３′′、２２６－２２６′′、２２９－２２９′′、２６１－３２１、２６１′′－３２１′′、３６７－４２５、および３６７′′－４２５′′、ならびにグリコシル化部位（Ｎ）：Ａｓｎ－２９７およびＡｓｎ－２９７′′を含む。ペムブロリズマブは、Ｆｃ領域に安定化Ｓ２２８Ｐ突然変異を有するＩｇＧ４／κアイソタイプであり、この突然変異をＩｇＧ４ヒンジ領域に挿入すると、ＩｇＧ４抗体で典型的に観察される半分子の形成が防止される。ペムブロリズマブは、各重鎖のＦｃドメイン内のＡｓｎ２９７で不均一にグリコシル化されており、無傷の抗体の分子量はおよそ１４９ｋＤａになる。ペムブロリズマブの優性グリコフォームは、フコシル化アガラクト二分性グリカンフォーム（Ｇ０Ｆ）である。

【１４２９】

実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、配列番号４７３によって与えられる重鎖および配列番号４７４によって与えられる軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号４７３および配列番号４７４に示される配列を有する重鎖および軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、多様体、もしくはコンジュゲートを含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４７３および配列番号４７４に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４７３および配列番号４７４に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４７３および配列番号４７４に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４７３および配列番号４７４に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４７３および配列番号４７４に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖および軽鎖を含む。

【１４３０】

実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブの重鎖および軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号４７５に示される配列を含み、ＰＤ－１阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号４７６に示される配列、およびその保存的アミノ酸置換を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４７５および配列番号４７６に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４７５および配列番号４７６に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４７５および配列番号４７６に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、

配列番号４７５および配列番号４７６に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶ$_H$およびＶ$_L$領域を含む。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４７５および配列番号４７６に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶ$_H$およびＶ$_L$領域を含む。

【１４３１】

実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号４７７、配列番号４７８、および配列番号４７９に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号４８０、配列番号４８１、および配列番号４８２に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、かつ／またはＰＤ－１上の同じエピトープに結合する。

【１４３２】

実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－１バイオシミラーモノクローナル抗体である。実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、および切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－１抗体であり、抗ＰＤ－１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。抗ＰＤ－１抗体は、米国ＦＤＡおよび／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。

【表３８】

表３６．ペムブロリズマブに関連するＰＤ－１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 473 ペムブロリズマブ重鎖	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF 60 NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS 120 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 180 GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV 240 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY 300 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK 360 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG 420 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK 447
配列番号 474 ペムブロリズマブ軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF 120 IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS 180 STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC 218
配列番号 475 ペムブロリズマブ可変重鎖	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF 60 NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS 120
配列番号 476 ペムブロリズマブ可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI K 111
配列番号 477 ペムブロリズマブ重鎖 CDR1	NYYMY 5
配列番号 478 ペムブロリズマブ重鎖 CDR2	GINPSNGGTN FNEKFK 16
配列番号 479 ペムブロリズマブ重鎖 CDR3	RDYRFDMGFD Y 11
配列番号 480 ペムブロリズマブ軽鎖 CDR1	RASKGVSTSG YSYLH 15
配列番号 481 ペムブロリズマブ軽鎖 CDR2	LASYLES 7
配列番号 482 ペムブロリズマブ軽鎖 CDR3	QHSRDLPLT 9

【１４３３】

実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、抗ｍ－ＰＤ－１クローンＪ４３（カタログ番号ＢＥ００３３－２）およびＲＭＰ１－１４（カタログ番号ＢＥ０１４６）（Ｂｉｏ Ｘ Ｃｅｌｌ，Ｉｎｃ．，Ｗｅｓｔ Ｌｅｂａｎｏｎ，ＮＨ ＵＳＡＳ）などの市販の抗ＰＤ－１モノクローナル抗体である。いくつかの市販の抗ＰＤ－１抗体が、当業者に知られている。

【１４３４】

実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，３５４，５０９号または米国特許出願公開第２０１０／０２６６６１７Ａ１号、同第２０１３／０１０８６５１Ａ１号、同第２０１３／０１０９８４３Ａ２号に開示されている抗体であり、それらの開示は参照によ

り本明細書に組み込まれる。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，２８７，８５６号、同第８，５８０，２４７号、および同第８，１６８，７５７号、ならびに米国特許出願公開第２００９／００２８８５７Ａ１号、同第２０１０／０２８５０１３Ａ１号、同第２０１３／００２２６００Ａ１号、および同第２０１１／０００８３６９Ａ１号に記載されている抗ＰＤ－１抗体であり、それらの教示は参照により本明細書に組み込まれる。別の実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，７３５，５５３Ｂ１号に開示されている抗ＰＤ－１抗体であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ＣＴ－０１１としても知られるピジリズマブであり、これは米国特許第８，６８６，１１９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１４３５】

実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，９０７，０５３号、同第９，０９６，６４２号、および同第９，０４４，４４２号、ならびに米国特許出願公開第ＵＳ２０１５／００８７５８１号に記載されるものなどの小分子またはペプチドもしくはペプチド誘導体；米国特許出願公開第２０１５／００７３０２４号に記載されるものなどの１，２，４－オキサジアゾール化合物および誘導体；米国特許出願公開第ＵＳ２０１５／００７３０４２号に記載されるものなどの環状ペプチド模倣化合物および誘導体；米国特許出願公開第ＵＳ２０１５／０１２５４９１号に記載されるものなどの環状化合物および誘導体；国際特許出願公開第ＷＯ２０１５／０３３３０１号に記載されるものなどの１，３，４－オキサジアゾールおよび１，３，４－チアジアゾール化合物ならびに誘導体；国際特許出願公開第ＷＯ２０１５／０３６９２７号およびＷＯ２０１５／０４４９０号に記載されるものなどのペプチド系化合物および誘導体、または米国特許出願公開第ＵＳ２０１４／０２９４８９８号に記載されるものなどの大環状ペプチド系化合物および誘導体であり得、各々の開示は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【１４３６】

実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、当該技術分野で知られている任意のＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２阻害剤、アンタゴニスト、または遮断薬であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２阻害剤、アンタゴニスト、または遮断薬のうちの１つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、および「遮断薬」という用語は、本明細書では、ＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２阻害剤に関して交換可能に使用される。誤解を避けるために、抗体であるＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、多様体、コンジュゲート、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【１４３７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物、プロセス、および方法は、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、小分子である。好ましい実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、抗体（すなわち、抗ＰＤ－１抗体）、Ｆａｂ断片を含むその断片、またはその一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ポリクローナル抗体である。好ましい実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２との結合について競合し、かつ／またはＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２上のエピトープに結合する。実施形態では、抗体は、ＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２との結合について競合し、かつ／またはＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２上のエピトープに結合する。

【１４３８】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＰＤ－Ｌ１阻害剤は、化合物が、ＰＤ－Ｌ２受容体を含む他の受容体と結合または相互作用するよりも実質的に低い濃度でＰＤ

－Ｌ１と結合または相互作用するという点で、ＰＤ－Ｌ１に対して選択的である。特定の実施形態では、化合物は、ＰＤ－Ｌ２受容体に対するより少なくとも約２倍高い濃度、約３倍高い濃度、約５倍高い濃度、約１０倍高い濃度、約２０倍高お濃度、約３０倍高い濃度、約５０倍高い濃度、約１００倍高い濃度、約２００倍高い濃度、約３００倍高い濃度、または約５００倍高い濃度である結合定数でＰＤ－Ｌ１受容体に結合する。

【１４３９】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＰＤ－Ｌ２阻害剤は、化合物が、ＰＤ－Ｌ１受容体を含む他の受容体と結合または相互作用するよりも実質的に低い濃度でＰＤ－Ｌ２と結合または相互作用するという点で、ＰＤ－Ｌ２に対して選択的である。特定の実施形態では、化合物は、ＰＤ－Ｌ１受容体に対するより少なくとも約２倍高い濃度、約３倍高い濃度、約５倍高い濃度、約１０倍高い濃度、約２０倍高お濃度、約３０倍高い濃度、約５０倍高い濃度、約１００倍高い濃度、約２００倍高い濃度、約３００倍高い濃度、または約５００倍高い濃度である結合定数でＰＤ－Ｌ２受容体に結合する。

【１４４０】

いかなる理論にも縛られることなく、腫瘍細胞はＰＤ－Ｌ１を発現し、Ｔ細胞はＰＤ－１を発現すると考えられている。しかしながら、腫瘍細胞によるＰＤ－Ｌ１の発現は、ＰＤ－１またはＰＤ－Ｌ１の阻害剤または遮断薬の有効性には必要とされない。実施形態では、腫瘍細胞は、ＰＤ－Ｌ１を発現する。別の実施形態では、腫瘍細胞は、ＰＤ－Ｌ１を発現しない。いくつかの実施形態では、方法は、ＴＩＬと組み合わせて、本明細書に記載されるものなどのＰＤ－１およびＰＤ－Ｌ１抗体の組み合わせを含むことができる。ＰＤ－１およびＰＤ－Ｌ１抗体とＴＩＬとの組み合わせの投与は、同時または連続的であり得る。

【１４４１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１および／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ヒトＰＤ－Ｌ１および／もしくはＰＤ－Ｌ２に約１００ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１および／もしくはＰＤ－Ｌ２に約９０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１および／もしくはＰＤ－Ｌ２に約８０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１および／もしくはＰＤ－Ｌ２に約７０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１および／もしくはＰＤ－Ｌ２に約６０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１および／もしくはＰＤ－Ｌ２に約５０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１および／もしくはＰＤ－Ｌ２に約４０ｐＭ以下のK_Dで結合する、またはヒトＰＤ－Ｌ１および／もしくはＰＤ－Ｌ２に約３０ｐＭ以下のＫＤで結合するものである。

【１４４２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１および／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ヒトＰＤ－Ｌ１および／もしくはＰＤ－Ｌ２に約7.5×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１および／もしくはＰＤ－Ｌ２に約8×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１および／もしくはＰＤ－Ｌ２に約8.5×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１および／もしくはＰＤ－Ｌ２に約9×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１および／もしくはＰＤ－Ｌ２に約9.5×10^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、またはヒトＰＤ－Ｌ１および／もしくはＰＤ－Ｌ２に約1×10^{6}ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合するものである。

【１４４３】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１および／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ヒトＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２に約2×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.1×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.2×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.3×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.4×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.5×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約2.6×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、

ヒトＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ１に約２．７×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋ$_{diss\,oc}$で結合する、またはヒトＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２に約３×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋ$_{diss\,oc}$で結合するものである。

【１４４４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１および／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、約１０ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約９ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約８ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約７ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約６ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約５ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約４ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約３ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約２ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、または約１ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断するものである。

【１４４５】

実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＭＥＤＩ４７３６としても知られるデュルバルマブ（これは、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ ｐｌｃ．の子会社であるＭｅｄｉｍｍｕｎｅ，ＬＬＣ（Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）から市販されている）、またはその抗原結合断片、コンジュゲート、もしくは多様体である。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許第８，７７９，１０８号または米国特許出願公開第２０１３／００３４５５９号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。デュルバルマブの臨床的有効性は、Ｐａｇｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．，２０１４，６５，１８５－２０２、Ｂｒａｈｍｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２０１４，３２，５ｓ（補足、要約８０２１）、およびＭｃＤｅｒｍｏｔｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ Ｒｅｖ．，２０１４，４０，１０５６－６４に記載されている。デュルバルマブの調製および特性は、米国特許第８，７７９，１０８号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。デュルバルマブのアミノ酸配列を表５０に示す。デュルバルマブモノクローナル抗体は、２２－９６、２２′′－９６′′、２３′－８９′、２３′′′－８９′′′、１３５′－１９５′、１３５′′′－１９５′′′、１４８－２０４、１４８′′－２０４′′、２１５′－２２４、２１５′′′－２２４′′′、２３０－２３０′′、２３３－２３３′′、２６５－３２５、２６５′′－３２５′′、３７１－４２９、および３７１′′－４２９′におけるジスルフィド結合、ならびにＡｓｎ－３０１およびＡｓｎ－３０１′′におけるＮ－グリコシル化部位を含む。

【１４４６】

実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、配列番号４８３によって与えられる重鎖および配列番号４８４によって与えられる軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号４８３および配列番号４８４に示される配列を有する重鎖および軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、多様体、もしくはコンジュゲートを含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４８３および配列番号４８４に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４８３および配列番号４８４に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４８３および配列番号４８４に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形

態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４８３および配列番号４８４に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４８３および配列番号４８４に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖および軽鎖を含む。

【１４４７】

実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、デュルバルマブの重鎖および軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号４８５に示される配列を含み、ＰＤ－Ｌ１阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号４８６に示される配列、およびその保存的アミノ酸置換を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４８５および配列番号４８６に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４８５および配列番号４８６に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４８５および配列番号４８６に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４８５および配列番号４８６に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４８５および配列番号４８６に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。

【１４４８】

実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号４８７、配列番号４８８、および配列番号４８９に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号４９０、配列番号４９１、および配列番号４９２に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、かつ／またはＰＤ－Ｌ１上の同じエピトープに結合する。

【１４４９】

実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ペムブロリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－Ｌ１バイオシミラーモノクローナル抗体である。実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－Ｌ１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、および切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－Ｌ１抗体であり、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、米国ＦＤＡおよび／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。

【表３９】

表３７．デュルバルマブに関連するＰＤ－Ｌ１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 483 デュルバルマブ重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY 60 VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEFEG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPASIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
配列番号 484 デュルバルマブ軽鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN EIVLTQSPGT 60 LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT 120 DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT 180 ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL TLSKADYEKH 240 KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC 265
配列番号 485 デュルバルマブ可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY 60 VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS 120 S 121
配列番号 486 デュルバルマブ可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIK 108
配列番号 487 デュルバルマブ重鎖 CDR1	RYWMS 5
配列番号 488 デュルバルマブ重鎖 CDR2	NIKQDGSEKY YVDSVKG 17
配列番号 489 デュルバルマブ重鎖 CDR3	EGGWFGELAF DY 12
配列番号 490 デュルバルマブ軽鎖 CDR1	RASQRVSSSY LA 12
配列番号 491 デュルバルマブ軽鎖 CDR2	DASSRAT 7
配列番号 492 デュルバルマブ軽鎖 CDR3	QQYGSLPWT 9

【１４５０】

実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＭＳＢ００１０７１８Ｃ（Ｍｅｒｃｋ　ＫＧａＡ／ＥＭＤ　Ｓｅｒｏｎｏから市販されている）としても知られるアベルマブ、またはその抗原結合断片、コンジュゲート、もしくは多様体である。アベルマブの調製および特性は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１４／０３４１９１７Ａ１号に記載されており、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。アベルマブのアミノ酸配列を表５１に示す。アベルマブは、２２－９６、１４７－２０３、２６４－３２４、３７０－４２８、２２′′－９６′′、１４７′′－２０３′′、２６４′′－３２４′′、および３７０′′－４２８′′における重鎖内ジスルフィド結合（Ｃ２３－Ｃ１０４）；２２′－９０′

、１３８′－１９７′、２２′′′－９０′′′、および１３８′′′－１９７′′′における軽鎖内ジスルフィド結合（Ｃ２３－Ｃ１０４）；２２３－２１５′および２２３′′－２１５′′′における重鎖－軽鎖内ジスルフィド結合（ｈ５－ＣＬ１２６）；２２９－２２９′′および２３２－２３２′′における重鎖－重鎖内ジスルフィド結合（ｈ１１、ｈ１４）；３００、３００′′におけるＮ－グリコシル化部位（Ｈ　ＣＨ$_2$　Ｎ８４．４）；フコシル化複合体二分性ＣＨＯ型グリカン；ならびに４５０および４５０′におけるＨ　ＣＨＳ　Ｋ２　Ｃ末端リジンクリッピングを有する。

【１４５１】

実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、配列番号４９３によって与えられる重鎖および配列番号４９４によって与えられる軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号４９３および配列番号４９４に示される配列を有する重鎖および軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、多様体、もしくはコンジュゲートを含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４９３および配列番号４９４に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４９３および配列番号４９４に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４９３および配列番号４９４に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４９３および配列番号４９４に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４９３および配列番号４９４に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖および軽鎖を含む。

【１４５２】

実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アベルマブの重鎖および軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤重鎖可変領域（Ｖ$_H$）は、配列番号４９５に示される配列を含み、ＰＤ－Ｌ１阻害剤軽鎖可変領域（Ｖ$_L$）は、配列番号４９６に示される配列、およびその保存的アミノ酸置換を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４９５および配列番号４９６に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶ$_H$およびＶ$_L$領域を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４９６および配列番号４９６に示される配列と少なくとも９８％同一であるＶ$_H$およびＶ$_L$領域を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４９５および配列番号４９６に示される配列と少なくとも９７％同一であるＶ$_H$およびＶ$_L$領域を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４９５および配列番号４９６に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶ$_H$およびＶ$_L$領域を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４９５および配列番号４９６に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶ$_H$およびＶ$_L$領域を含む。

【１４５３】

実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号４９７、配列番号４９８、および配列番号４９９に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号５００、配列番号５０１、および配列番号５０２に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、かつ／またはＰＤ－Ｌ１上の同じエピトープに結合する。

【１４５４】

実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アベルマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－Ｌ１バイオシミラーモノクローナル抗体である。実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミ

ノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－Ｌ１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、および切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－Ｌ１抗体であり、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、米国ＦＤＡおよび／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。

【表４０】

表３８．アベルマブに関連するＰＤ－Ｌ１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 493 アベルマブ重鎖	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY 60 ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS 120 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 180 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
配列番号 494 アベルマブ軽鎖	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV 60 SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL GQPKANPTVT 120 LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNNKYAASS 180 YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS 216
配列番号 495 アベルマブ可変重鎖	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY 60 ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS 120
配列番号 496 アベルマブ可変軽鎖	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV 60 SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL 110
配列番号 497 アベルマブ重鎖 CDR1	SYIMM 5
配列番号 498 アベルマブ重鎖 CDR2	SIYPSGGITF YADTVKG 17
配列番号 499 アベルマブ重鎖 CDR3	IKLGTVTTVD Y 11
配列番号 500 アベルマブ軽鎖 CDR1	TGTSSDVGGY NYVS 14
配列番号 501 アベルマブ軽鎖 CDR2	DVSNRPS 7
配列番号 502 アベルマブ軽鎖 CDR3	SSYTSSSTRV 10

【１４５５】

実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＭＰＤＬ３２８０ＡまたはＲＧ７４４６としても知られるアテゾリズマブ（Ｒｏｃｈｅ Ｈｏｌｄｉｎｇ ＡＧ（Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）の子会社であるＧｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．からＴＥＣＥＮＴＲＩＱとして市販されている）、またはその抗原結合断片、コンジュゲート、もしくは多様体である。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許第８，２１７，１４９号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許出願公開第２０１０／０２０３０５６Ａ１号、同第２０１３／００４５２００Ａ１号、同第２０１３／００４５２０１Ａ１号、同第２０１３／００

４５２０２Ａ１号、または同第２０１４／００６５１３５Ａ１号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。アテゾリズマブの調製および特性は、米国特許第８，２１７，１４９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。アテゾリズマブのアミノ酸配列を表５２に示す。アテゾリズマブは、２２－９６、１４５－２０１、２６２－３２２、３６８－４２６、２２′′－９６′′、１４５′′－２０１′′、２６２′′－３２２′′、および３６８′′－４２６′′における重鎖内ジスルフィド結合（Ｃ２３－Ｃ１０４）；２３′－８８′、１３４′－１９４′、２３′′′－８８′′′、および１３４′′′－１９４′′′における軽鎖内ジスルフィド結合（Ｃ２３－Ｃ１０４）；２２１－２１４′および２２１′′－２１４′′′における重鎖－軽鎖内ジスルフィド結合（ｈ５－ＣＬ１２６）；２２７－２２７′′および２３０－２３０′′における重鎖－重鎖内ジスルフィド結合（ｈ１１、ｈ１４）；ならびに２９８および２９８′におけるＮ－グリコシル化部位（Ｈ　CH_2　Ｎ８４．４＞Ａ）を有する。

【１４５６】

実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、配列番号５０３によって与えられる重鎖および配列番号５０４によって与えられる軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号５０３および配列番号５０４に示される配列を有する重鎖および軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、多様体、もしくはコンジュゲートを含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号５０３および配列番号５０４に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号５０３および配列番号５０４に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号５０３および配列番号５０４に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号５０３および配列番号５０４に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖および軽鎖を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号５０３および配列番号５０４に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖および軽鎖を含む。

【１４５７】

実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アテゾリズマブの重鎖および軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号５０５に示される配列を含み、ＰＤ－Ｌ１阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号５０６に示される配列、およびその保存的アミノ酸置換を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号５０５および配列番号５０６に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号５０５および配列番号５０６に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号５０５および配列番号５０６に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号５０５および配列番号５０６に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号５０５および配列番号５０６に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_HおよびV_L領域を含む。

【１４５８】

実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号５０７、配列番号５０８、および配列番号５０９に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号５１０、配列番号５１１、および配列番号５１２に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、かつ／またはＰＤ－Ｌ１上

の同じエピトープに結合する。

【１４５９】

実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、アテゾリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－Ｌ１バイオシミラーモノクローナル抗体である。実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－Ｌ１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、および切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－Ｌ１抗体であり、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、米国ＦＤＡおよび／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。

【表４１】

表３９．アテゾリズマブに関連するＰＤ－Ｌ１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 503 アテゾリズマブ重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYAST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
配列番号 504 アテゾリズマブ軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号 505 アテゾリズマブ可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSA 118
配列番号 506 アテゾリズマブ可変軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKR 108
配列番号 507 アテゾリズマブ重鎖 CDR1	GFTFSDSWIH 10
配列番号 508 アテゾリズマブ重鎖 CDR2	AWISPYGGST YYADSVKG 18
配列番号 509 アテゾリズマブ重鎖 CDR3	RHWPGGFDY 9
配列番号 510 アテゾリズマブ軽鎖 CDR1	RASQDVSTAV A 11
配列番号 511 アテゾリズマブ軽鎖 CDR2	SASFLYS 7
配列番号 512 アテゾリズマブ軽鎖 CDR3	QQYLYHPAT 9

【１４６０】

実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１４／０３４１９１７Ａ１号に記載されている抗体を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。別の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１への結合についてこれらの抗体のうちのいずれかと競合する抗体も含まれる。実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、ＢＭＳ－９３５５５９としても知られるＭＤＸ－１１０５であり、これは米国特許第７，９４３，７４３号に開示されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第７，９４３，７４３号に開示されている抗ＰＤ－Ｌ１抗体から選択される。

【１４６１】
実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＩＮＶＩＶＯＭＡＢ抗ｍ－ＰＤ－Ｌ１クローン１０Ｆ．９Ｇ２（カタログ番号ＢＥ０１０１、Ｂｉｏ Ｘ Ｃｅｌｌ，Ｉｎｃ．，Ｗｅｓｔ Ｌｅｂａｎｏｎ，ＮＨ，ＵＳＡ）などの市販のモノクローナル抗体である。実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、ＡＦＦＹＭＥＴＲＩＸ ＥＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥ（ＭＩＨ１）などの市販のモノクローナル抗体である。いくつかの市販の抗ＰＤ－Ｌ１抗体が、当業者に知られている。
【１４６２】
実施形態では、ＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ＢＩＯＬＥＧＥＮＤ ２４Ｆ．１０Ｃ１２マウスＩｇＧ２ａ、κアイソタイプ（カタログ番号３２９６０２ Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、ＳＩＧＭＡ抗ＰＤ－Ｌ２抗体（カタログ番号ＳＡＢ３５００３９５，Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｏ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）、または当業者に知られている他の市販のＰＤ－Ｌ２抗体などの市販のモノクローナル抗体である。
【１４６３】
２．患者の任意のリンパ球枯渇プレコンディショニング
実施形態では、本発明は、ＴＩＬの集団で癌を治療する方法を含み、患者は、本開示によるＴＩＬの注入の前に非骨髄破壊的化学療法で予め治療される。実施形態では、本発明は、非骨髄破壊的化学療法で前治療された患者の癌の治療に使用するためのＴＩＬの集団を含む。実施形態では、ＴＩＬの集団は、注入による投与用である。実施形態では、非骨髄破壊的化学療法は、シクロホスファミド６０ｍｇ／ｋｇ／日で２日間（ＴＩＬ注入の２７日前および２６日前）、ならびにフルダラビン２５ｍｇ／ｍ^{2}／ｄで５日間（ＴＩＬ注入の２７日前～２３日前）である。実施形態では、本開示による非骨髄破壊的化学療法およびＴＩＬ注入（０日目）の後、患者は、生理学的許容範囲まで８時間ごとに７２０，０００ＩＵ／ｋｇで静脈内的にＩＬ－２（ＰＲＯＬＥＵＫＩＮとして市販されている、アルデスロイキン）の静脈内注入を受ける。特定の実施形態では、ＴＩＬの集団は、ＩＬ－２と組み合わせて癌を治療する際に使用するためのものであり、ＩＬ－２は、ＴＩＬの集団の後に投与される。
【１４６４】
実験結果は、腫瘍特異的Ｔリンパ球の養子移入前のリンパ球枯渇が、調節性Ｔ細胞および免疫系の競合要素（「サイトカインシンク」）を排除することによって治療効果を高める上で重要な役割を果たすことを示している。したがって、本発明のいくつかの実施形態は、本発明のＴＩＬを導入する前に、患者に対してリンパ球枯渇ステップ（「免疫抑制コンディショニング」と称されることもある）を利用する。
【１４６５】
一般に、リンパ球枯渇は、フルダラビンまたはシクロホスファミド（活性型はマホスファミドと称される）およびそれらの組み合わせの投与を使用して達成される。かかる方法は、Ｇａｓｓｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１１，６０，７５－８５、Ｍｕｒａｎｓｋｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｌｉｎ．Ｐｒａｃｔ．Ｏｎｃｏｌ．，２００６，３，６６８－６８１、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００８，２６，５２３３－５２３９、およびＤｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００５，２３，２３４６－２３５７に記載されており、それらはすべて、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。
【１４６６】
いくつかの実施形態では、フルダラビンは、０．５μｇ／ｍＬ～１０μｇ／ｍＬのフルダラビンの濃度で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、１μｇ／ｍＬのフルダラビンの濃度で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日以上投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、１０ｍｇ／ｋｇ／日、１５ｍｇ／ｋｇ／日、２０ｍｇ／ｋｇ／日、

２５ｍｇ／ｋｇ／日、３０ｍｇ／ｋｇ／日、３５ｍｇ／ｋｇ／日、４０ｍｇ／ｋｇ／日、または４５ｍｇ／ｋｇ／日の投与量で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で２～７日間投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で４～５日間投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、２５ｍｇ／ｋｇ／日で４～５日間投与される。

【１４６７】

いくつかの実施形態では、シクロホスファミドの活性形態であるマホスファミドは、シクロホスファミドの投与により、０．５μｇ／ｍＬ～１０μｇ／ｍＬの濃度で得られる。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドの活性形態であるマホスファミドは、シクロホスファミドの投与によって１μｇ／ｍＬの濃度で得られる。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日以上投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、１００ｍｇ／ｍ^{2}／日、１５０ｍｇ／ｍ^{2}／日、１７５ｍｇ／ｍ^{2}／日、２００ｍｇ／ｍ^{2}／日、２２５ｍｇ／ｍ^{2}／日、２５０ｍｇ／ｍ^{2}／日、２７５ｍｇ／ｍ^{2}／日、または３００ｍｇ／ｍ^{2}／日の投与量で投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、静脈内に（すなわち、ｉ．ｖ．）投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で２～７日間投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、２５０ｍｇ／ｍ^{2}／日ｉ．ｖ．で４～５日間投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、２５０ｍｇ／ｍ^{2}／日で４日間投与される。

【１４６８】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、フルダラビンおよびシクロホスファミドを一緒に患者に投与することによって行われる。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、２５ｍｇ／ｍ^{2}／日ｉ．ｖ．で投与され、シクロホスファミドは、２５０ｍｇ／ｍ^{2}／日ｉ．ｖ．で４日間にわたって投与される。

【１４６９】

実施形態では、リンパ球枯渇は、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^{2}／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^{2}／日の用量で５日間投与することによって行われる。

【１４７０】

３．ＩＬ－２レジメン

実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、高用量ＩＬ－２レジメンを含み、高用量ＩＬ－２レジメンは、治療的ＴＩＬ集団の治療有効部分を投与した翌日から静脈内投与されるアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくは多様体を含み、アルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくは多様体が、０．０３７ｍｇ／ｋｇまたは０．０４４ｍｇ／ｋｇＩＵ／ｋｇ（患者の体重）の用量で、耐性まで８時間ごとに最大１４用量にわたって１５分のボーラス静脈内注入を使用して投与される。９日間の休止後、さらに１４用量、合計最大２８用量にわたってこのスケジュールを繰り返すことができる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、１、２、３、４、５、または６用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、最大６用量の最大投与量で投与される。

【１４７１】

実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、デクレッシェンドＩＬ－２レジメンを含む。デクレッシェンドＩＬ－２レジメンは、Ｏ’Ｄａｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．１９９９，１７，２７５２－６１、およびＥｔｏｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　２０００，８８，１７０３－９に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。実施形態では、デクレッシェンドＩＬ－２レジメンは、６時間にわたって静脈内投与される１８×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}、続いて１２時間にわたって静脈内投与される１８×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}、続いて２４時間にわたって静脈内投与される１８×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}、続いて７２時間かけて静脈内投与される４．５×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}を含む。この治療サイクルは、２８日ごとに最大４サイクル繰り返すことができる。いくつかの実施形態では、デクレッシェンドＩＬ－２レジメンは、１日目の１８，０００，０００ＩＵ／ｍ^{2}、２

日目の９，０００，０００ＩＵ／ｍ^2、３日目および４日目の４，５００，０００ＩＵ／ｍ^{2}を含む。

【１４７２】

別の実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４、または２１日ごとにペグ化ＩＬ－２を投与することを含む。

【１４７３】

４．追加の治療方法

別の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、癌を有する対象を治療するための方法を提供する。

【１４７４】

別の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、癌を有する対象を治療するための方法を提供する。

【１４７５】

別の実施形態では、本発明は、それぞれ治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団および上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を投与する前に、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の癌を有する対象を治療するための方法を提供する。

【１４７６】

別の実施形態では、本発明は、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンが、６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間のシクロホスファミドの投与に続いて、２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間のフルダラビンを投与するステップを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４７７】

別の実施形態では、本発明は、対象にＴＩＬ細胞を投与した翌日に開始する、高用量のＩＬ－２レジメンで対象を治療するステップをさらに含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の癌を有する対象を治療するための方法を提供する。

【１４７８】

別の実施形態では、本発明は、高用量ＩＬ－２レジメンが、許容範囲まで８時間ごとに１５分間のボーラス静脈内注入として投与される６００，０００または７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の癌を有する対象を治療するための方法を提供する。

【１４７９】

別の実施形態では、本発明は、癌が固形腫瘍であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の癌を有する対象を治療するための方法を提供する。

【１４８０】

別の実施形態では、本発明は、癌が黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭癌ウイルスによって引き起こされる癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、または腎細胞癌であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４８１】

別の実施形態では、本発明は、癌が黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌、ＮＳＣＬＣ、膠芽腫（ＧＢＭを含む）、および胃腸癌であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の癌を有する対象を治療するための方法を提供する。

【１４８２】

別の実施形態では、本発明は、癌が黒色腫であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の癌を有する対象を治療するための方法を提供する。

【１４８３】

別の実施形態では、本発明は、癌がＨＮＳＣＣであるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の癌を有する対象を治療するための方法を提供する。

【１４８４】

別の実施形態では、本発明は、癌が子宮頸癌であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の癌を有する対象を治療するための方法を提供する。

【１４８５】

別の実施形態では、本発明は、癌がＮＳＣＬＣであるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の癌を有する対象を治療するための方法を提供する。

【１４８６】

別の実施形態では、本発明は、癌が膠芽腫（ＧＢＭを含む）であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の癌を有する対象を治療するための方法を提供する。

【１４８７】

別の実施形態では、本発明は、癌が胃腸癌であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の癌を有する対象を治療するための方法を提供する。

【１４８８】

別の実施形態では、本発明は、癌が超変異癌であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の癌を有する対象を治療するための方法を提供する。

【１４８９】

別の実施形態では、本発明は、癌が小児の超変異癌であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の癌を有する対象を治療するための方法を提供する。

【１４９０】

別の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、癌を有する対象を治療するための方法で使用するための、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【１４９１】

別の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、癌を有する対象を治療するための方法で使用するための、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。

【１４９２】

別の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団または上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を対象に投与する前に、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団または上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。

【１４９３】

別の実施形態では、本発明は、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンが、６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間のシクロホスファミドの投与に続いて、２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間のフルダラビンを投与するステップを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【１４９４】

別の実施形態では、本発明は、ＴＩＬ細胞を患者に投与した翌日から開始する、高用量ＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【１４９５】

別の実施形態では、本発明は、高用量ＩＬ－２レジメンが、許容範囲まで８時間ごとに１５分間のボーラス静脈内注入として投与される６００，０００または７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【１４９６】

別の実施形態では、本発明は、癌が固形腫瘍であるように修正された、上記の前段落の

うちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【１４９７】

別の実施形態では、本発明は、癌が黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭癌ウイルスによって引き起こされる癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、または腎細胞癌であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【１４９８】

別の実施形態では、本発明は、癌が黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌、ＮＳＣＬＣ、神経膠芽腫（ＧＢＭを含む）、および胃腸癌であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【１４９９】

別の実施形態では、本発明は、癌が黒色腫であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【１５００】

別の実施形態では、本発明は、癌がＨＮＳＣＣであるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【１５０１】

別の実施形態では、本発明は、癌が子宮頸癌であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【１５０２】

別の実施形態では、本発明は、癌がＮＳＣＬＣであるように修正された上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【１５０３】

別の実施形態では、本発明は、癌が膠芽腫（ＧＢＭを含む）であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【１５０４】

別の実施形態では、本発明は、癌が胃腸癌であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【１５０５】

別の実施形態では、本発明は、癌が超変異癌であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【１５０６】

別の実施形態では、本発明は、癌が小児の超変異癌であるように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【１５０７】

別の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、対象の癌を治療する方法における上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団の使用を提供する。

【１５０８】

別の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、対象の癌を治療する方法における上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１５０９】

別の実施形態では、本発明は、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンを対象に投与すること、次いで治療上有効な投与量の、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団または上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を対象に投与することと、を含む、対象における癌を治療する方法における、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団または上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【実施例】
【１５１０】
本明細書に包含される実施形態は、ここで以下の実施例を参照して説明される。これらの実施例は、例示のみを目的として提供されており、本明細書に包含される開示は、決してこれらの実施例に限定されると解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書に提供される教示の結果として明らかになるすべての変形を包含すると解釈されるべきである。
【１５１１】
実施例１：ＰＲＥ－ＲＥＰおよびＲＥＰプロセス用の培地の調製
この実施例は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を含む様々な腫瘍タイプに由来する腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の培養を含むプロトコルで使用するための組織培養培地の調製手順を説明する。この培地は、本出願および実施例に記載されているＴＩＬのうちのいずれかの調製に使用することができる。
【１５１２】
ＣＭ１の調製
次の試薬を冷蔵から取り出し、３７℃の水浴中で温めた（ＲＰＭＩ１６４０、ヒトＡＢ血清、２００ｍＭ　Ｌ－グルタミン）。ろ過される容量に適した０．２ｕｍフィルターユニットの上部に各成分を添加することによって、以下の表１８に従ってＣＭ１培地を調製した。４℃で保存する。
【表４２】
表４０：ＣＭ１の調製

成分	最終濃度	最終容量 500mL	最終容量 IL
RPMI1640	NA	450mL	900mL
ﾋﾄ AB 血清､熱不活化 10%	50mL	100mL	
200mM L-グルタミン	2mM	5mL	10mL
55mM BME	55μM	0.5mL	1mL
50mg/mL 硫酸ゲンタマイシン	50μg/mL	0.5mL	1mL

【１５１３】
使用日に、３７℃の水浴中で必要量のＣＭ１を予熱し、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を添加した。
【１５１４】
表４１に従って必要に応じた追加の補足。
【表４３】
表４１：必要に応じたＣＭ１の追加補足。

補足	ストック濃度	希釈液	最終濃度
GlutaMAX(商標)	200mM	1:100	2mM
ペニシリン／ストレプトマイシン	10,000U/mL ペニシリン 10,000μg/mL ストレプトマイシン	1:100	100U/mL ペニシリン 100μg/mL ストレプトマイシン
アンホテリシン B	250μg/mL	1:100	2.5μg/mL

【１５１５】
ＣＭ２の調製
調製したＣＭ１を冷蔵庫から取り出すか、または上記のセクション７．３に従って新鮮なＣＭ１を調製する。ＡＩＭ－Ｖ（登録商標）を冷蔵庫から取り出し、調製したＣＭ１を無菌培地ボトル内で等量のＡＩＭ－Ｖ（登録商標）と混合することによって、必要な量の

ＣＭ２を調製した。使用日に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をＣＭ２培地に添加した。使用日に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む十分な量のＣＭ２を作製した。ＣＭ２培地ボトルにその名前、調製者のイニシャル、ろ過／調製日、２週間の有効期限をラベル付けし、組織培養に必要になるまで４℃で保存した。

【１５１６】

ＣＭ３の調製

使用が必要な日にＣＭ３を調製した。ＣＭ３は、ＡＩＭ－Ｖ（登録商標）培地と同じであり、使用日に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補足した。ＡＩＭ－Ｖのボトルまたはバッグに ＩＬ－２ストック溶液を直接添加することによって、実験のニーズに十分な量のＣＭ３を調製した。軽く振ってよく混ぜた。ＡＩＭ－Ｖに添加した直後に、ボトルに「３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２」のラベルを付ける。過剰のＣＭ３が存在する場合は、培地名、調製者のイニシャル、培地の調製日、およびその有効期限（調製後７日）のラベルを付けたボトル内で４℃で保存した。４℃で７日間保存した後、ＩＬ－２で補足された培地を廃棄した。

【１５１７】

ＣＭ４の調製

ＣＭ４は、ＣＭ３と同じであり、２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）（最終濃度）が追加で補足された。１ＬのＣＭ３ごとに、１０ｍＬの２００ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）を添加した。ＡＩＭ－Ｖのボトルまたはバッグに ＩＬ－２ストック溶液およびＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）ストック溶液を直接添加することによって、実験のニーズに十分な量のＣＭ４を調製した。軽く振ってよく混ぜた。ＡＩＭ－Ｖに添加した直後に、ボトルに「３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２およびＧｌｕｔａＭＡＸ」のラベルを付けた。過剰のＣＭ４が存在する場合は、培地名、「ＧｌｕｔａＭＡＸ」、およびその有効期限（調製後７日）のラベルを付けたボトル内で４℃で保存した。４℃で７日間保存した後、ＩＬ－２で補足された培地を廃棄した。

【１５１８】

実施例２：ＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１サイトカインカクテルの使用

この実施例は、実施例Ａ～ＧのＴＩＬプロセスと組み合わせた、追加のＴ細胞成長因子として機能するＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１サイトカインの使用を説明する。

【１５１９】

本明細書に記載のプロセスを使用して、ＴＩＬは、培養の開始時に、実験の一方のアームにおいてＩＬ－２の存在下で非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）腫瘍から、およびもう一方のアームではＩＬ－２の代わりにＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１の組み合わせから成長させることができる。ｐｒｅ－ＲＥＰの完了時に、培養物を拡張、表現型、機能（ＣＤ１０７ａ＋およびＩＦＮ－γ）ならびにＴＣＲ　Ｖβレパートリーについて評価した。ＩＬ－１５およびＩＬ－２１は、本明細書の他の場所に記載されており、Ｇｒｕｉｊｌ，ｅｔ　ａｌ．，において、ＩＬ－２１は、ＣＤ２７＋ＣＤ２８＋腫瘍浸潤リンパ球の拡張を促進し、細胞傷害能が高く、調節性Ｔ細胞の側副拡張が少ない、Ｓａｎｔｅｇｏｅｔｓ，Ｓ．Ｊ．，Ｊ　Ｔｒａｎｓｌ　Ｍｅｄ．，２０１３，１１：３７（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｐｍｃ／ａｒｔｉｃｌｅｓ／ＰＭＣ３６２６７９７／）。

【１５２０】

結果は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１処理条件でのＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$細胞の両方で、ＩＬ－２のみの条件と比較して増強したＴＩＬ拡張（＞２０％）が観察できることを示し得る。ＩＬ－２のみの培養物と比較して、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１で処理された培養物から得られたＴＩＬには、歪んだＴＣＲ　Ｖβレパートリーを伴う主にＣＤ８$^{+}$の集団への歪みがあった。ＩＦＮ－γおよびＣＤ１０７ａは、ＩＬ－２のみで処理されたＴＩＬと比較して、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１で処理されたＴＩＬで上昇した。

【１５２１】

実施例３：γ線を照射した末梢血単核細胞の個々のロットの適格性確認

この実施例は、本明細書に記載の例示的な方法において同種異系フィーダー細胞として使用するためのガンマ線照射末梢単核細胞（ＰＢＭＣ、ＭＮＣとしても知られる）の個々のロットを適格性確認するための新規の簡略化された手順を説明する。

【１５２２】

照射された各ＭＮＣフィーダーロットは、個々のドナーから調製した。各ロットまたはドナーは、精製された抗ＣＤ３（クローンＯＫＴ３）抗体およびインターロイキン－２（ＩＬ－２）の存在下でＲＥＰ内のＴＩＬを拡張する能力について個々にスクリーニングした。さらに、フィーダー細胞の各ロットを、ＴＩＬを添加せずに試験し、受けたγ線の線量がそれらを複製不全にするのに十分であることを確認した。

【１５２３】

背景

ＴＩＬのＲＥＰには、γ線を照射し、成長を停止させたＭＮＣフィーダー細胞が必要であった。フィーダーＭＮＣの膜受容体は、抗ＣＤ３（クローンＯＫＴ３）抗体に結合し、ＲＥＰフラスコ内のＴＩＬに架橋し、ＴＩＬを刺激して拡張させる。フィーダーロットは、個々のドナーから採取した全血の白血球アフェレーシスから調製した。白血球アフェレーシス産物を、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ上で遠心分離し、洗浄し、照射し、ＧＭＰ条件下で凍結保存した。

【１５２４】

ＴＩＬ療法を受けた患者には、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）を引き起こす可能性があるため、生存可能なフィーダー細胞を注入しないことが重要である。したがって、フィーダー細胞は、細胞にγ線を照射することによって成長を停止させ、再培養時に二本鎖ＤＮＡ切断が起こり、ＭＮＣ細胞の細胞生存性が喪失する。

【１５２５】

評価基準および実験準備

フィーダーロットを、１）共培養でＴＩＬを１００倍超拡張する能力、および２）複製不全の２つの基準で評価した。

【１５２６】

フィーダーロットを、直立したＴ２５組織培養フラスコ内で培養された２つの主要なｐｒｅ－ＲＥＰ　ＴＩＬ株を利用して、ｍｉｎｉ－ＲＥＰ形式で試験した。各ＴＩＬ株は、ＲＥＰでの活性化に応答して増殖する能力が独特であるため、フィーダーロットを、２つの異なるＴＩＬ株に対して試験した。対照として、上記の基準を満たすことが歴史的に示されている多くの照射されたＭＮＣフィーダー細胞を、試験ロットと並行して実行した。

【１５２７】

１回の実験で試験されたすべてのロットが同等の試験を受けることを保証するために、すべての条件およびすべてのフィーダーロットを試験するために、同じｐｒｅ－ＲＥＰ　ＴＩＬ株の十分なストックが利用可能であった。

【１５２８】

試験したフィーダー細胞の各ロットについて、Ｐｒｅ－ＲＥＰ　ＴＩＬ株番号１（２フラスコ）、Ｐｒｅ－ＲＥＰ　ＴＩＬ株番号２（２フラスコ）、およびフィーダー対照（２フラスコ）の合計６つのＴ２５フラスコがあった。ＴＩＬ株番号１および番号２を含むフラスコは、フィーダーロットがＴＩＬを拡張する能力を評価した。フィーダー対照フラスコは、フィーダーロットの複製不全を評価した。

実験プロトコル

－２／３日目、ＴＩＬ株の解凍

ＣＭ２培地を調製した。３７℃の水浴中でＣＭ２を温めた。３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補足された４０ｍＬのＣＭ２を調製した。使用まで保温する。ＩＬ－２を含まない２０ｍＬの予熱したＣＭ２を、使用したＴＩＬ株の名前がラベル付けされた２本の５０ｍＬ円錐管の各々に入れた。ＬＮ２ストレージから２つの指定されたｐｒｅ－ＲＥＰ　ＴＩＬ株を取り出し、バイアルを組織培養室に移した。少量の氷が残るまで、３７℃の水浴内の

密封されたジッパーストレージバッグ内にバイアルを入れて解凍した。

【１５２９】

無菌トランスファーピペットを使用して、バイアルの内容物を、調製され、ラベル付けされた５０ｍＬの円錐管内の２０ｍＬのＣＭ２にすぐに移した。細胞を洗浄するために、ＩＬ－２を含まないＣＭ２を使用してＱＳを４０ｍＬにする。４００×ＣＦで５分間遠心分離した。上清を吸引し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補足された５ｍＬの温かいＣＭ２に再懸濁した。

【１５３０】

自動セルカウンターを使用して細胞をカウントするために、少量のアリコート（２０μＬ）を重複して取り出した。カウントを記録する。カウントしながら、ＴＩＬ細胞を含む５０ｍＬの円錐管を、加湿した３７℃、５％　CO_2インキュベーターに入れ、ガス交換を可能にするためにキャップを緩めた。細胞濃度を決定し、ＴＩＬを、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補足されたＣＭ２中の１×10^6細胞／ｍＬに希釈した。

【１５３１】

ｍｉｎｉ－ＲＥＰの０日目まで、加湿した３７℃のインキュベーターで必要な数のウェルにおいて、２４ウェル組織培養プレートの１ウェルあたり２ｍＬで培養した。混乱および潜在的な相互汚染を避けるために、別々の２４ウェル組織培養プレートで異なるＴＩＬ株を培養した。

【１５３２】

０日目、Ｍｉｎｉ－ＲＥＰを開始する

試験されるフィーダーロットの数に十分なＣＭ２培地を調製した。（例えば、一度に４つのフィーダーロットを試験するために、８００ｍＬのＣＭ２培地を調製した）。上記で調製したＣＭ２の一部を分注し、それを細胞の培養のために３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補足した。（例えば、一度に４つのフィーダーロットを試験するために、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む５００ｍＬのＣＭ２培地を調製する）。

【１５３３】

相互汚染を防ぐために各ＴＩＬ株を別々に操作し、ＴＩＬ培養物を入れた２４ウェルプレートをインキュベーターから取り出し、ＢＳＣに移した。

【１５３４】

無菌トランスファーピペットまたは１００～１０００μＬピペッターおよびチップを使用して、約１ｍＬの培地を、使用されるＴＩＬの各ウェルから取り出し、２４ウェル組織培養プレートの未使用のウェルに入れる。

【１５３５】

新鮮な無菌トランスファーピペットまたは１００～１０００μＬピペッターおよびチップを使用して、残りの培地をウェル内のＴＩＬと混合して細胞を再懸濁し、次いで細胞懸濁液を、ＴＩＬ名のラベルが付いた５０ｍＬ円錐管に移し、容量を記録した。

【１５３６】

予備の培地でウェルを洗浄し、その容量を同じ５０ｍＬ円錐管に移した。細胞を４００×ＣＦで回転させて、細胞ペレットを収集する。培地上清を吸引除去し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含有する２～５ｍＬのＣＭ２培地に細胞ペレットを再懸濁し（採取したウェルの数およびペレットのサイズに基づいて使用される容量）、容量は、１．３×10^6細胞／ｍＬを超える濃度を保証するのに十分である必要がある。

【１５３７】

血清学的ピペットを使用して、細胞懸濁液を完全に混合し、容量を記録した。自動セルカウンターを使用して細胞をカウントするために、２００μＬを取り出した。カウントしながら、ＴＩＬ細胞を含む５０ｍＬの円錐管を、加湿した５％　CO_2、３７℃インキュベーターに入れ、ガス交換を可能にするためにキャップを緩めた。カウントを記録した。

【１５３８】

ＴＩＬ細胞を含有する５０ｍＬの円錐管をインキュベーターから取り出し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補足された温かいＣＭ２中、１．３×10^6細胞／ｍＬの濃度でそ

れらの細胞を再懸濁した。キャップを緩めた状態で、５０ｍＬの円錐管をインキュベーターに戻した。

【１５３９】

第２のＴＩＬ株について、上記のステップを繰り返した。

【１５４０】

ＴＩＬを実験用のＴ２５フラスコに入れる直前に、ＴＩＬを、以下の通り１：１０に希釈して１．３×１０^{5}細胞／ｍＬの最終濃度にした。

【１５４１】

ＭＡＣＳ　ＧＭＰ　ＣＤ３ピュア（ＯＫＴ３）作用溶液を調製する

ＯＫＴ３のストック溶液（１ｍｇ／ｍＬ）を４℃の冷蔵庫から取り出し、ＢＳＣに入れた。ｍｉｎｉ－ＲＥＰの培地では、最終濃度３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３を使用した。

【１５４２】

実験の各Ｔ２５フラスコ内の２０ｍＬに対して６００ｎｇのＯＫＴ３が必要であり、これは、２０ｍＬごとに６０μＬの１０μｇ／ｍＬ溶液、または各フィーダーロットについて試験した６つのフラスコすべてで３６０μＬに相当する。

【１５４３】

試験した各フィーダーロットについて、１０μｇ／ｍＬの作用濃度に対して１ｍｇ／ｍＬのＯＫＴ３の１：１００希釈液４００μＬを作製した（例えば、４つのフィーダーロットを一度に試験するために、１ｍｇ／ｍＬ　ＯＫＴ３：１６μＬの１ｍｇ／ｍＬ　ＯＫＴ３＋３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１．５８４ｍＬのＣＭ２培地の１：１００希釈液１６００μＬを作製する）。

【１５４４】

Ｔ２５フラスコを調製する

フィーダー細胞を調製する前に、各フラスコにラベルを付け、フラスコにＣＭ２培地を充填した。フラスコを３７℃の加湿した５％　CO_2インキュベーターに入れ、残りの成分を添加するのを待つ間、培地を保温した。一旦フィーダー細胞が調製されると、各フラスコ内のＣＭ２に成分が添加される。

【表４４】

表４２：溶液

構成要素	共培養フラスコ内の容量	対照（フィーダーのみ）フラスコ内の容量
CM2+3000IU/mL IL-2	18mL	19mL
MNC:CM2+3000IU IL-2 中 1.3×10^{7}/mL（最終濃度 1.3×10^{7}/フラスコ）	1mL	1mL
OKT3:CM2=3000IU IL-2 中 10μL/mL	60μL	60μL
TIL:3000IU の IL-2 を含む CM2 中 1.3×10^{5}/mL（最終濃度 1.3×10^{5}/フラスコ）	1mL	0

【１５４５】

フィーダー細胞を調製する

このプロトコルについて試験されたロットあたり７８×１０^{6}フィーダー細胞の最小値が必要であった。ＳＤＢＢによって凍結された各１ｍＬバイアルには、凍結時に１００×１０^{6}個の生細胞を有していた。ＬＮ２ストレージからの解凍時の５０％の回収率を仮定すると、ロットあたり少なくとも２つの１ｍＬバイアルのフィーダー細胞を解凍して、各ＲＥＰに推定１００×１０^{6}個の生細胞を与えることが推奨された。代替的に、１．８ｍＬバイアルで供給された場合、１つのバイアルだけで十分なフィーダー細胞が提供された。

【１５４６】

フィーダー細胞を解凍する前に、試験される各フィーダーロットにＩＬ－２を含まないおよそ５０ｍＬのＣＭ２を予熱した。指定されたフィーダーロットバイアルをＬＮ２ストレージから取り出し、ジッパーストレージバッグに入れ、氷上に置いた。３７℃の水浴に浸すことによって、閉じたジッパーストレージバッグ内のバイアルを解凍した。ジッパーバッグからバイアルを取り出し、７０％　ＥｔＯＨでスプレーまたはワイプし、バイアルをＢＳＣに移した。

【１５４７】

トランスファーピペットを使用して、フィーダーバイアルの内容物を５０ｍＬの円錐管内の３０ｍＬの温かいＣＭ２にすぐに移した。バイアルを少量のＣＭ２で洗浄して、バイアル内の残留細胞をすべて除去した。４００×ＣＦで５分間遠心分離した。上清を吸引し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を加えた４ｍＬの温かいＣＭ２に再懸濁した。自動セルカウンターを使用して細胞をカウントするために、２００μＬを取り出した。カウントを記録した。

【１５４８】

３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を加えた温かいＣＭ２中、１．３×１０^{7}細胞／ｍＬで細胞を再懸濁した。ＴＩＬ細胞を１．３×１０^{6}細胞／ｍＬから１．３×１０^{5}細胞／ｍＬに希釈した。

【１５４９】

共培養物を準備する

ＴＩＬ細胞を１．３×１０^{6}細胞／ｍＬから１．３×１０^{5}細胞／ｍＬに希釈した。４．５ｍＬのＣＭ２培地を１５ｍＬの円錐管に添加した。インキュベーターからＴＩＬ細胞を取り出し、１０ｍＬの血清ピペットを使用して十分に再懸濁した。１．３×１０^{6}細胞／ｍＬのＴＩＬ懸濁液から０．５ｍＬの細胞を取り出し、１５ｍＬの円錐管中の４．５ｍＬの培地に添加した。ＴＩＬストックバイアルをインキュベーターに戻した。よく混ぜた。第２のＴＩＬ株に対して繰り返した。

単一フィーダーロット用に予熱した培地を入れたフラスコを、インキュベーターからＢＳＣに移した。１ｍＬのピペットチップで数回上下にピペッティングすることによってフィーダー細胞を混合し、そのフィーダーロットの各フラスコに１ｍＬ（１．３×１０^{7}細胞）を移した。６０μＬのＯＫＴ３作用ストック（１０μｇ／ｍＬ）を各フラスコに添加した。２つの対照フラスコをインキュベーターに戻した。

【１５５０】

各ＴＩＬロットの１ｍＬ（１．３×１０^{5}）を、対応するラベルの付いたＴ２５フラスコに移した。フラスコをインキュベーターに戻し、直立させてインキュベートした。５日目まで乱さなかった。

【１５５１】

試験したすべてのフィーダーロットについて繰り返した。

５日目、培地変更

３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含むＣＭ２を調製した。各フラスコに１０ｍＬが必要である。１０ｍＬピペットを使用して、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１０ｍＬの温かいＣＭ２を各フラスコに移した。フラスコをインキュベーターに戻し、７日目まで直立させてインキュベートした。試験したすべてのフィーダーロットについて繰り返した。

【１５５２】

７日目、採取

インキュベーターからフラスコを取り出し、ＢＳＣに移し、フラスコの底部の細胞層を乱さないように注意する。フラスコの底部で成長する細胞を乱すことなく、各試験フラスコから１０ｍＬの培地を取り出し、各対照フラスコから１５ｍＬの培地を取り出した。

【１５５３】

１０ｍＬの血清ピペットを使用して、残りの培地に細胞を再懸濁し、よく混合して細胞の塊をすべて破壊した。ピペッティングすることによって細胞懸濁液を完全に混合した後、細胞カウントのために２００μＬを取り出した。自動セルカウンター装置とともに適切

な標準操作手順を使用して、ＴＩＬをカウントした。７日目にカウントを記録した。

【１５５４】

試験したすべてのフィーダーロットについて繰り返した。

【１５５５】

フィーダー対照フラスコは、複製不全について評価し、ＴＩＬを含むフラスコは、以下の表ＴＴに従って０日目からの倍率拡張について評価した。

【１５５６】

７日目、フィーダー対照フラスコの１４日目までの継続

フィーダー対照フラスコの７日目のカウントを完了した後、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５ｍＬの新鮮なＣＭ２培地を対照フラスコの各々に添加した。対照フラスコをインキュベーターに戻し、１４日目まで直立位置でインキュベートした。

【１５５７】

１４日目、フィーダー対照フラスコの長期非増殖

インキュベーターからフラスコを取り出し、ＢＳＣに移し、フラスコの底部の細胞層を乱さないように注意した。フラスコの底部で成長する細胞を乱すことなく、各対照フラスコからおよそ１７ｍＬの培地を除去した。５ｍＬの血清ピペットを使用して、残りの培地に細胞を再懸濁し、よく混合して細胞の塊をすべて破壊した。各フラスコの容量を記録した。

【１５５８】

ピペッティングすることによって細胞懸濁液を完全に混合した後、細胞カウントのために２００μＬを取り出した。自動セルカウンター装置とともに適切な標準操作手順を使用して、ＴＩＬをカウントした。カウントを記録した。

【１５５９】

試験したすべてのフィーダーロットについて繰り返した。

【１５６０】

結果および承認基準

結果

γ線照射の線量は、フィーダー細胞を複製不全にするのに十分であった。すべてのロットは、評価基準を満たすことが予想され、また０日目と比較して、ＲＥＰ培養の７日目に残っているフィーダー細胞の総有効数の低減を示した。

【１５６１】

すべてのフィーダーロットは、ＲＥＰ培養の７日目までのＴＩＬ成長の１００倍拡張の評価基準を満たすことが予想された。

【１５６２】

フィーダー対照フラスコの１４日目のカウントは、７日目に見られた非増殖傾向を継続すると予想された。

【１５６３】

承認基準

フィーダー細胞の各ロットについて試験された各複製ＴＩＬ株について、以下の承認基準が満たされた。

【１５６４】

承認は、次のように２つあった（以下の表２７に概説される）。

【表４５】

表４３：承認基準

試験	承認基準
MNC の照射／複製不全	7 日目および 14 日目に成長は観察されなかった
TIL 拡張	各ＴＩＬの少なくとも 100 倍の拡張（最低 1.3×10^7 個の生細胞）

【１５６５】

３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体および３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養した場合、放射線の線量がＭＮＣフィーダー細胞を複製不全にするのに十分であるかどうかを評価した。複製不全は、ＲＥＰの７日目および１４日目の自動細胞カウントによって決定された総生細胞数（ＴＶＣ）によって評価した。

【１５６６】

承認基準は、「成長なし」であり、これは、ＲＥＰの０日目に培養された最初の生細胞数から７日目および１４日目に総生細胞数が増加していないことを意味する。

【１５６７】

フィーダー細胞がＴＩＬ拡張をサポートする能力を評価した。ＴＩＬ成長は、ＲＥＰの０日目の培養開始からＲＥＰの７日目までの生細胞の倍率拡張の観点から測定された。自動細胞カウントによって評価されるように、７日目に、ＴＩＬ培養物は最低１００倍の拡張を達成した（すなわち、ＲＥＰ０日目に培養された生ＴＩＬ細胞の総数の１００倍以上）。

【１５６８】

承認基準を満たさないＭＮＣフィーダーロットの偶発性試験

ＭＮＣフィーダーロットが上で概説された承認基準のうちのいずれかを満たさなかった場合は、以下のステップを実行してロットを再試験し、単純な実験者エラーを原因として除外する。

【１５６９】

ロットの衛星試験バイアルが２つ以上残っている場合は、ロットを再試験した。ロットの衛星試験バイアルが１つ残っているか、まったく残っていない場合、上記の承認基準に従ってロットは失敗であった。

【１５７０】

適格となるには、問題のロットおよび対照ロットが、上記の承認基準を達成する必要があった。これらの基準を満たすと、ロットは使用のために放出された。

【１５７１】

実施例４：γ線を照射した末梢血単核細胞の個々のロットの適格性確認

この実施例は、本明細書に記載の例示的な方法において同種異系フィーダー細胞として使用するためのガンマ線照射末梢単核細胞（ＰＢＭＣ）の個々のロットを適格性確認するための新規の簡略化された手順を説明する。この実施例は、ＴＩＬの臨床ロットの産生に使用するための照射されたＰＢＭＣ細胞ロットの評価のためのプロトコルを提供する。照射された各ＰＢＭＣロットは、個々のドナーから調製した。１００以上の適格性確認プロトコルの過程で、すべての場合において、ＳＤＢＢ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ Ｂｌｏｏｄ Ｂａｎｋ）からの照射されたＰＢＭＣロットは、ＲＥＰの７日目にＴＩＬを１００倍より多く拡張することが示された。この修正された適格性確認プロトコルは、ＳＤＢＢから照射されたドナーＰＢＭＣロットに適用することを意図しており、これをさらに試験して、受け取ったガンマ線の線量がそれらを複製不全にするのに十分であることを検証した。１４日間にわたって複製不全が維持されたことが実証されると、ドナーＰＢＭＣロットは、ＴＩＬの臨床ロットを産生するための使用に「適格」であるとみなされた。

【１５７２】
背景
　ＴＩＬの現在の標準ＲＥＰには、γ線を照射し、成長を停止させたＰＢＭＣが必要であった。ＰＢＭＣの膜受容体は、抗ＣＤ３（クローンＯＫＴ３）抗体に結合し、培養中のＴＩＬに架橋し、ＴＩＬを刺激して拡張させる。ＰＢＭＣロットは、個々のドナーから採取した全血の白血球アフェレーシスから調製した。白血球アフェレーシス産物を、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ上で遠心分離し、洗浄し、照射し、ＧＭＰ条件下で凍結保存した。
【１５７３】
　ＴＩＬ療法を受けた患者には、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）を引き起こす可能性があるため、生きたＰＢＭＣを注入しないことが重要である。したがって、ドナーＰＢＭＣは、細胞にγ線を照射することによって成長を停止させ、再培養時に二本鎖ＤＮＡ切断が起こり、ＰＢＭＣの細胞生存性が喪失する。
【１５７４】
評価基準
　７．２．１照射されたＰＢＭＣロットの評価基準は、それらの複製不全であった。
【１５７５】
実験準備
　フィーダーロットは、直立したＴ２５組織培養フラスコを使用して、ＴＩＬと共培養するかのようにｍｉｎｉ－ＲＥＰ形式で試験した。対照ロット：７．２．１の基準を満たすことが歴史的に示されている照射ＰＢＭＣの１ロットを、対照として実験ロットと並行して実行した。試験した照射ドナーＰＢＭＣの各ロットについて、複製したフラスコを実行した。
【１５７６】
実験プロトコル
０日目
　試験されるドナーＰＢＭＣの各ロット用に約９０ｍＬのＣＭ２培地を調製した。ＣＭ２を３７℃の水浴中で保温した。６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２のアリコートを解凍した。ＣＭ２培地をＢＳＣに戻し、フードに入れる前に７０％　ＥｔＯＨで拭いた。試験したＰＢＭＣの各ロットについて、約６０ｍＬのＣＭ２を別々の無菌ボトルに取り出した。解凍した６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬストック溶液からのＩＬ－２をこの培地に添加し、最終濃度を３０００ＩＵ／ｍＬにした。このボトルに「ＣＭ２／ＩＬ２」（または同様のもの）のラベルを付けて、補足されていないＣＭ２と区別した。
【１５７７】
ＯＫＴ３を調製する
　抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）のストック溶液を４℃の冷蔵庫から取り出し、ＢＳＣに入れた。ｍｉｎｉ－ＲＥＰの培地では、最終濃度３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３を使用した。１ｍｇ／ｍＬのストック溶液から抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）の１０μｇ／ｍＬの作用溶液を調製した。必要になるまで冷蔵庫に入れた。
【１５７８】
　試験した各ＰＢＭＣロットについて、抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）ストックの１：１００希釈液１５０μＬを調製する。例えば、一度に４つのＰＢＭＣロットを試験するために、６μＬの１ｍｇ／ｍＬストック溶液を３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補足された５９４μＬのＣＭ２に添加することによって、６００μＬの１０μｇ／ｍＬ抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）を調製する。
【１５７９】
フラスコを調製する
　フラスコあたり１９ｍＬのＣＭ２／ＩＬ－２をラベル付けされたＴ２５フラスコに添加し、細胞を調製しながら３７℃の加湿した５％　CO_2インキュベーターにフラスコを入れた。
【１５８０】

照射ＰＢＭＣを調製する

ＬＮ２ストレージから試験されるＰＢＭＣロットのバイアルを取得した。これらを－８０℃に置くか、または解凍する前にドライアイス上で保持した。解凍される各ロットについて、３０ｍＬのＣＭ２（ＩＬ－２補足なし）を、５０ｍＬの円錐管に入れた。解凍されるＰＢＭＣの異なるロット番号で各管にラベルを付けた。管にキャップをしっかりと閉め、使用する前に３７℃の水浴に入れた。必要に応じて、５０ｍＬの円錐管をＢＳＣに戻し、フードに入れる前に７０％　ＥｔＯＨで拭いた。

【１５８１】

バイアルＰＢＭＣを冷蔵から取り出し、３７℃の水浴中のフローティングチューブラックに入れて解凍する。少量の氷がバイアルに残るまで解凍を進めた。無菌トランスファーピペットを使用して、バイアルの内容物を、５０ｍＬの円錐管内の３０ｍＬのＣＭ２にすぐに移した。約１ｍＬの培地を管から取り出してバイアルをすすぎ、すすぎ液を５０ｍＬの円錐管に戻した。キャップをしっかりと閉め、穏やかに回転させて細胞を洗浄した。

【１５８２】

４００×ｇで５分間、室温で遠心分離した。上清を吸引し、１０００μＬのピペットチップを使用して、細胞ペレットを１ｍＬの温かいＣＭ２／ＩＬ－２に再懸濁した。代替的に、培地を添加する前に、キャップをした管を空のチューブラックに沿って引きずることにより、細胞ペレットを再懸濁した。細胞ペレットを再懸濁した後、ＣＭ２／ＩＬ－２培地を使用して容量を４ｍＬにした。容量を記録した。

【１５８３】

自動セルカウンターを使用して細胞をカウントするために、少量のアリコート（例えば、１００μＬ）を取り出した。特定の自動セルカウンターＳＯＰに従って、重複してカウントを行った。細胞のカウントを行う前に、ＰＢＭＣの希釈を行う必要があった可能性が最も高い。推奨される開始希釈は１：１０であったが、これは使用するセルカウンターのタイプによって異なっていた。カウントを記録した。

【１５８４】

ＣＭ２／ＩＬ－２培地を使用して、１．３×１０^{7}細胞／ｍＬのＰＢＭＣの濃度を調整した。穏やかに回転させるか、または血清ピペットを使用して上下に穏やかに吸引することによってよく混ぜた。

【１５８５】

培養フラスコを準備する

２つのラベル付きＴ２５フラスコを、組織培養インキュベーターからＢＳＣに戻した。抗ＣＤ３／ＯＫＴ３の１０μｇ／ｍＬバイアルをＢＳＣに戻した。各フラスコに１ｍＬの１．３×１０^{7}ＰＢＭＣ細胞懸濁液を添加した。各フラスコに６０μＬの１０μｇ／ｍＬ抗ＣＤ３／ＯＫＴ３を添加した。キャップをしたフラスコを組織培養インキュベーターに戻し、乱すことなく１４日間成長させた。次のロットで必要になるまで、抗ＣＤ３／ＯＫＴ３バイアルを冷蔵庫に戻した。評価されるＰＢＭＣの各ロットについて繰り返した。

【１５８６】

１４日目、ＰＢＭＣの非増殖の測定

複製したＴ２５フラスコをＢＳＣに戻した。各フラスコについて、新鮮な１０ｍＬの血清ピペットを使用して、各フラスコから約１７ｍＬを取り出し、残りの培地を注意深く引き上げて、フラスコに残っている容量を測定した。容量を記録した。

【１５８７】

同じ血清ピペットを使用して上下にピペッティングすることによって、試料をよく混ぜた。

【１５８８】

カウントのために各フラスコから２００μＬの試料を取り出した。自動セルカウンターを使用して細胞をカウントした。評価されているＰＢＭＣの各ロットについて、ステップ７．４．２６～７．４．３１を繰り返した。

【１５８９】

結果および承認基準

結果

γ線照射の線量は、フィーダー細胞を複製不全にするのに十分であると予想された。すべてのロットは、評価基準を満たすことが予想され、０日目と比較して、ＲＥＰ培養の１４日目に残っているフィーダー細胞の総有効数の低減を示した。

【１５９０】

承認基準

試験された各照射ドナーＰＢＭＣロットについて、以下の承認基準が満たされた：「成長なし」－１４日目の生細胞の総数が、ＲＥＰの０日目に培養された最初の生細胞数よりも少なかったことを意味する。

【１５９１】

承認基準を満たさないＰＢＭＣロットの偶発性試験

照射ドナーＰＢＭＣロットが上記の承認基準を満たさなかった場合は、以下のステップを実行してロットを再試験し、単純な実験者エラーを失敗の原因として除外した。ロットの衛星試験バイアルが２つ以上残っている場合は、ロットを再試験した。ロットの衛星バイアルが１つ残っているか、まったく残っていない場合は、上記の承認基準に従ってロットが失敗した。

【１５９２】

適格となるために、偶発性試験を通過するＰＢＭＣロットは、対照ロットおよび問題のロットの両方の複製がともに承認基準を達成した。この基準を満たすと、ロットは使用のために放出された。

【１５９３】

実施例５：ＩＬ－２ストック溶液（ＣＥＬＬＧＥＮＩＸ）の調製

この実施例は、精製され、凍結乾燥された組み換えヒトインターロイキン－２を、本出願および実施例に記載されるものすべてを含む、さらなる組織培養プロトコルでの使用に適したストック試料に溶解するプロセスを記載し、ｒｈＩＬ－２を使用することを伴うものを含む。

【１５９４】

手順

０．２％酢酸溶液（ＨＡｃ）を調製した。２９ｍＬの無菌水を、５０ｍＬの円錐管に移した。５０ｍＬの円錐管に１ｍＬの１Ｎ酢酸を添加した。管を２～３回反転させてよく混ぜた。Ｓｔｅｒｉｆｌｉｐフィルターを使用したろ過によって、ＨＡｃ溶液を滅菌した

【１５９５】

ＰＢＳ中の１％　ＨＳＡを調製する。４ｍＬの２５％　ＨＳＡストック溶液を、１５０ｍＬの無菌フィルターユニット内の９６ｍＬのＰＢＳに添加した。溶液をろ過した。４℃で保存した。調製したｒｈＩＬ－２の各バイアルについて、フォームに記入する。

【１５９６】

ｒｈＩＬ－２ストック溶液を調製した（６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ最終濃度）。ｒｈＩＬ－２の各ロットは異なり、製造元の分析証明書（ＣＯＡ）に、１）バイアルあたりのｒｈＩＬ－２の質量（ｍｇ）、２）ｒｈＩＬ－２の比活性（ＩＵ／ｍｇ）、および３）推奨される０．２％　ＨＡｃ再構成量（ｍＬ）などの必要な情報が見出された。

【１５９７】

以下の式を使用して、ｒｈＩＬ－２ロットに必要な１％　ＨＳＡの量を計算した。

【数１】

$$\left(\frac{\text{バイアル質量（mg）}\times\text{生物活性}\left(\frac{IU}{mg}\right)}{6x10^{6}\ \frac{IU}{mL}}\right)-\text{HAcの量}(mL)=1\%\ \ \text{HSAの量}(mL)$$

【１５９８】
例えば、ＣｅｌｌＧｅｎｉｘのｒｈＩＬ－２ロット１０２００１２１　ＣＯＡによると、１ｍｇバイアルの比活性は、２５×１０^{6}ＩＵ／ｍｇである。ｒｈＩＬ－２を２ｍＬの０．２％　ＨＡｃ中で再構成することが推奨される。
【数２】

$$\left(\frac{1mg\ x\ 25x10^{6}\ \frac{IU}{mg}}{6x10^{6}\ \frac{IU}{mL}}\right) - 2mL = 2.167mL\ HSA$$

【１５９９】
ＩＬ－２バイアルのゴム栓をアルコールワイプで拭いた。３ｍＬ注射器に取り付けられた１６Ｇ針を使用して、推奨量の０．２％　ＨＡｃをバイアルに注入した。針を抜くときに栓が外れないように注意した。バイアルを３回反転させ、すべての粉末が溶解するまで回転させた。栓を慎重に取り外し、アルコールワイプの上に置いた。計算された量の１％ＨＳＡをバイアルに添加した。
【１６００】
ｒｈＩＬ－２溶液の保存。短期間保存（＜７２時間）の場合、バイアルを４℃で保存した。長期保存（＞７２時間）の場合、バイアルを小容量に等分し、使用する準備ができるまで－２０℃でクライオバイアル中で保存した。凍結／解凍サイクルを回避した。調製日から６ヶ月後に有効期限が切れた。Ｒｈ－ＩＬ－２ラベルには、ベンダー番号およびカタログ番号、ロット番号、有効期限、オペレーターのイニシャル、濃度、ならびにアリコートの量が含まれていた。
【１６０１】
実施例６：凍結保存プロセス
この実施例では、ＣｒｙｏＭｅｄ冷却速度制御フリーザー、モデル７４５４（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、実施例Ｇで説明した簡略化されたクローズド手順で調製されたＴＩＬの凍結保存プロセス方法について説明する。
【１６０２】
使用した機器は次の通りであった：アルミカセットホルダーラック（ＣＳ７５０フリーザーバッグに対応）、７５０ｍＬバッグ用低温保存カセット、低圧（２２ｐｓｉ）液体窒素タンク、冷蔵庫、熱電対センサー（バッグ用リボンタイプ）、およびＣｒｙｏＳｔｏｒｅ　ＣＳ７５０冷凍バッグ（ＯｒｉＧｅｎ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。
【１６０３】
凍結プロセスは、核形成から－２０℃まで０．５℃の速度、および－８０℃の終了温度まで毎分１℃の冷却速度を提供する。プログラムパラメータは次の通りである：ステップ１－４℃で待機する、ステップ２：－４℃まで１．０℃／分（試料温度）、ステップ３：－４５℃まで２０．０℃／分（チャンバー温度）、ステップ４：－１０．０℃１０℃．０℃／分（チャンバー温度）、ステップ５：－２０℃まで０．５℃／分（チャンバー温度）、およびステップ６：－８０℃まで１．０℃／分（試料温度）。
【１６０４】
実施例７：抗ＰＤ－１抗体によるＮＳＣＬＣ治療
患者集団：
治療ナイーブのＮＳＣＬＣまたは化学療法後であるが抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブ
【１６０５】
治療スケジュール：

腫瘍断片は、最大４用量の抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１で治療し、原発性不応性の患者を、凍結保存され、即時進行の際に使用する準備ができているＴＩＬ製品で治療する。原発性不応性の患者は、２用量後に進行した可能性がある。

【１６０６】

再発患者はまた、進行時に治療することもできる（タイミングは、数ヶ月から数年後まで異なる場合がある）。

【１６０７】

最大６用量の全強ＩＬ－２。

【１６０８】

前述の同じ製造順列でさらに検討する患者集団：

●治療ナイーブのＮＳＣＬＣまたは化学療法後であるが抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブ

●治療ナイーブのＮＳＣＬＣまたは化学療法後であるが、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブ

●治療ナイーブのＮＳＣＬＣまたは化学療法後であるが、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する、および／またはベースラインで巨大腫瘤病変を有する抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブ。（例えば、横断面または冠状面のいずれかで測定された最大腫瘍径が７ｃｍを超えるか、またはＣＴで短軸径が２０ｍｍ以上の膨れたリンパ節が巨大腫瘤として定義された場合、巨大腫瘤病変が示される。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Ｓａｍｅｊｉｍａ，Ｊ．，Ｊａｐａｎｅｓｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，４５（１１）：１０５０－１０５４１ ２０１５を参照）。

【１６０９】

実施例８：Ｇｅｎ３の例示的なプロセス

この実施例は、Ｇｅｎ２プロセスとＧｅｎ３プロセスとの比較を提供する。この実施例では、堅牢なＴＩＬ拡張プラットフォームの開発について説明する。Ｇｅｎ２プロセスの修正は、オペレーターの介入回数を低減することによってリスクを低減して製造プロセスを合理化し、試薬の使用を最適化し、商業規模でのハイスループット製造に適した柔軟な半閉鎖および半自動細胞産生プロセスを容易にする。

【１６１０】

プロセスＧｅｎ２およびＧｅｎ３ ＴＩＬは、腫瘍の外科的切除によって個々の患者に由来し、次いでエクスビボで拡張された自己ＴＩＬで構成されている。Ｇｅｎ３プロセスの第１のプライミング拡張ステップは、インターロイキン－２（ＩＬ－２）およびモノクローナル抗体ＯＫＴ３の存在下での細胞培養であり、照射された末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）の足場上のＴ細胞共受容体ＣＤ３を標的とする。

【１６１１】

Ｇｅｎ２ ＴＩＬ製品の製造は、２つの相：１）ｐｒｅ－急速拡張（Ｐｒｅ－ＲＥＰ）および２）急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）で構成されていた。Ｐｒｅ－ＲＥＰの間に、切除腫瘍を、各寸法が２～３ｍｍの５０個以下の断片に裁断し、血清含有培養培地（補足された１０％ ＨｕＳＡＢを含有するＲＰＭＩ１６４０培地）および６，０００ＩＵ／ｍＬのインターロイキン－２（ＩＬ－２）で１１日間培養した。１１日目にＴＩＬを採取し、大規模な二次ＲＥＰ拡張に導入した。ＲＥＰは、５日間の３０００ＩＵ／ｍＬのｒｈＩＬ－２で補足された５Ｌ量のＣＭ２中の１５０ｕｇのモノクローナル抗ＣＤ３抗体（ＯＫＴ３）を負荷した5×10^{9}個の照射された同種異系ＰＢＭＣフィーダー細胞の共培養において、ｐｒｅ－ＲＥＰからの200×10^{6}個以下の生細胞の活性化からなる。１６日目に、培養物を９０％減容し、細胞画分をフラスコあたり1×10^{9}個以上の生リンパ球で複数のＧ－ＲＥＸ－５００フラスコに分割し、ＣＭ４で５Ｌにする。ＴＩＬをさらに６日間インキュベートする。ＲＥＰは、２２日目に採取され、洗浄され、配合され、凍結保存された後、注入のための臨床現場に－１５０℃で出荷される。

【１６１２】

Ｇｅｎ３ ＴＩＬ製品の製造は、１）第１のプライミング拡張プロトコル、２）第２の急速拡張プロトコル（急速拡張相またはＲＥＰとも称される）、および３）継代培養分割

の３つの相で構成された。第１のプライミング拡張ＴＩＬの伝播を行うために、切除した腫瘍を、各寸法が２～３mm以下の１２０個以下の断片に裁断した。第１のプライミング拡張の０日目に、ＯＫＴ－３を負荷したおよそ２．５×１０^{8}個の同種異系の照射されたＰＢＭＣフィーダー細胞を、３つの１００ＭＣＳ容器の各々においておよそ１００ｃｍ^{2}の表面積上に確立した。腫瘍断片を、各々が５００ｍＬの血清含有ＣＭ１培養培地および６，０００ＩＵ／ｍＬのインターロイキン－２（ＩＬ－２）および１５ｕｇのＯＫＴ－３を含む３つの１００ＭＣＳ容器に分配し、その中で７日間培養した。７日目に、ＯＫＴ－３を負荷したおよそ５×１０^{8}個の同種異系の照射されたＰＢＭＣフィーダー細胞の追加のフィーダー細胞層を、３つの１００ＭＣＳ容器の各々において腫瘍断片化培養相に組み込み、５００ｍＬのＣＭ２培養培地および６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２および３０ｕｇのＯＫＴ－３で培養することによってＲＥＰを開始した。ＲＥＰの開始は、１００ＭＣＳ容器へのＯＫＴ３を負荷したフィーダー細胞の閉鎖系流体移送を使用して、同じ容器内の第１のプライミング拡張培養物全体を活性化することによって強化された。Ｇｅｎ３の場合、ＴＩＬのスケールアップまたは分割には、細胞培養物全体が閉鎖系の流体移送によってより大きな容器にスケーリングされ、移送され（１００Ｍフラスコから５００Ｍフラスコに）、追加の４ＬのＣＭ４培地が添加されるプロセスステップが含まれていた。ＲＥＰ細胞は、１６日目に採取され、洗浄され、配合され、凍結保存された後、注入のための臨床現場に－１５０℃で出荷される。

【１６１３】

全体として、Ｇｅｎ３プロセスは、より短く、よりスケーラブルで、簡単に修正可能な拡張プラットフォームであり、堅牢な製造およびプロセスの比較可能性に適するように適応する。

【表４６】

表４４：例示的なＧｅｎ２および例示的なＧｅｎ３製造プロセスの比較。

ステップ	プロセス(Gen2)	プロセス(Gen3)
Pre REP－0日目	最大 50 断片／1－G－Rex 100MCS－11 日 1L の CM1 培地 ＋IL－2（6000IU／mL）中	腫瘍全体で最大 120 個の断片を最大 3 つのフラスコに均等に分割した。1 フラスコ：1～60 断片 2 フラスコ：61～89 断片 3 フラスコ：90～120 断片 500mL の CM1 培地 ＋IL－2（6000IU／mL）中で 7 日間 2．5×10^8 個のフィーダー細胞／フラスコ 15ug OKT－3／フラスコ
REP 開始	REP に指向－11 日目－ 200e^6 個未満の TIL （1）5L CM2 培地中の G－Rex 500MCS IL－2（3000IU／mL） 5×10^9 個のフィーダー細胞 150ug OKT－3	REP に指向－7 日目－すべての細胞 TIL－同じ G－Rex 100MCS 500CM2 培地を添加する IL－2（6000IU／mL） 5×10^8 個のフィーダー細胞／フラスコ 30ug OKT－3／フラスコ
TIL の伝播またはスケールアップ	減容し、細胞画分を最大 5 つの G－REX 500MCS に分割する 4．5L CM4 培地＋IL－2（3000IU／mL） 1×10^9 個以上の TVC／フラスコ 16 日目に分割する	各 G－REX 100MCS（1L）は、1 つの G－REX 500MCS に移す 4L CM4 培地＋IL－2（3000IU／mL）を添加する 9～11 日目にスケールアップ
採取	採取 22 日目 LOVO－自動細胞洗浄機	採取 16 日目 LOVO－自動細胞洗浄機
最終製剤	凍結保存された製品 LN_2 中の 300IU／mL の IL2－CS10、複数のアリコート	凍結保存された製品 LN_2 中の 300IU／mL の IL－2－CS10 複数のアリコート
プロセス時間	22 日	16 日

【１６１４】

０日目に、両方のプロセスで、腫瘍を３回洗浄し、断片をランダム化して２つのプールに分割した（プロセスごとに１つのプール）。Ｇｅｎ２プロセスでは、断片を、６，０００ＩＵ／ｍＬのｒｈＩＬ－２を含有する１ＬのＣＭ１培地を含む１つのＧＲＥＸ　１００ＭＣＳフラスコに移した。Ｇｅｎ３プロセスでは、断片を、６，０００ＩＵ／ｍＬのｒｈＩＬ－２、１５ｕｇのＯＫＴ－３、および２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞を含有する５００ｍＬのＣＭ１を含む１つのＧＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコに移した。Ｒｅｐ開始日のＴＩＬの播種は、各プロセスに応じて異なる日に起こった。Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳフラスコを９０％減容したＧｅｎ２プロセスでは、収集した細胞懸濁液を新しいＧ－ＲＥ

Ｘ　５００ＭＣＳに移し、ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）＋５ｅ９フィーダー細胞およびＯＫＴ－３（３０ｎｇ／ｍＬ）を含有するＣＭ２培地中で１１日目にＲＥＰを開始した。細胞を拡張し、１６日目にプロトコルごとにＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）を含むＣＭ４培地を含む複数のＧＲＥＸ　５００ＭＣＳフラスコに分割した。次いで、培養物を採取し、プロトコルに従って２２日目に凍結保存した。Ｇｅｎ３プロセスの場合、ＲＥＰの開始は７日目に起こり、同じＧ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳがＲＥＰの開始に使用された。簡潔には、ＩＬ－２（６０００ＩＵ／ｍＬ）および５×１０^{8}個のフィーダー細胞を３０ｕｇのＯＫＴ－３とともに含有する５００ｍＬのＣＭ２培地を各フラスコに添加した。９～１１日目に、培養をスケールアップした。Ｇ－Ｒｅｘ　１００Ｍ（１Ｌ）の全量をＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳに移し、ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）を含有する４ＬのＣＭ４を添加した。フラスコを５日間インキュベートした。培養物を採取し、１６日目に凍結保存した。

【１６１５】

比較には、２つの肺腫瘍（Ｌ４０５４およびＬ４０５５）ならびに１つの黒色腫腫瘍（Ｍ１０８５Ｔ）の３つの異なる腫瘍が含まれていた。

【１６１６】

Ｌ４０５４およびＬ４０５５の場合、ＣＭ１（培養培地１）、ＣＭ２（培養培地２）、およびＣＭ４（培養培地４）培地を事前に調製し、４℃で保持した。ＣＭ１およびＣＭ２培地は、培地のろ過がある場合とない場合の細胞増殖を比較するために、ろ過せずに調製した。

【１６１７】

ＲＥＰの開始およびスケールアップ時にＬ４０５５腫瘍について、培地を３７℃で事前に最長２４時間温めた。

【１６１８】

結果の要約

達成された生細胞の総数について、Ｇｅｎ３はＧｅｎ２の３０％以内であった。Ｇｅｎ３の最終産物は、再刺激後にＩＮＦ－γのより高い産生を示した。Ｇｅｎ３の最終産物は、存在する固有のＣＤＲ３配列の合計によって測定されるように、クローンの多様性の増加を示した。Ｇｅｎ３の最終産物は、より長い平均テロメア長を示した。

【１６１９】

達成された結果

細胞数および生存率％：

Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３プロセスでのＰｒｅ　ＲＥＰおよびＲＥＰ拡張は、上記の詳細に従った。

【１６２０】

表４５：Ｐｒｅ－ＲＥＰ細胞数。各腫瘍について、２つのプールには同数の断片が含まれていた。腫瘍のサイズが小さいため、フラスコあたりの断片の最大数は達成されなかった。総ｐｒｅ－ＲＥＰ細胞（ＴＶＣ）を採取し、Ｇｅｎ２プロセスでは１１日目に、Ｇｅｎ３プロセスでは７日目にカウントした。２つのｐｒｅ－ＲＥＰアームを比較するために、細胞数を培養で提供された断片の数で割って、断片あたりの生細胞の平均を計算した。以下の表に示されるように、Ｇｅｎ２プロセスは、Ｇｅｎ３プロセスと比較して断片あたりより多くの細胞を一貫して成長させた。１１日目にＧｅｎ３プロセスで予想されるＴＶＣの数の外挿計算。これは、ｐｒｅ－ＲＥＰ　ＴＶＣを７で割り、次いで１１を掛けて計算した。

【表４７】

表４５：ｐｒｅ－ＲＥＰ細胞数

腫瘍ＩＤ	L4054		L4055*		M1085T	
プロセス	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
pre-REP TVC	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
断片数	21	21	24	24	16	16
pre-REP における断片あたりの平均 TVC	6.65E+06	2.06E+06	1.12E+06	5.75E+05	7.66E+05	2.18E+05
11 日目の pre REP における Gen3 外挿値	N/A	6.79E+07	N/A	2.17E+07	N/A	5.49E+06

＊Ｌ４０５５、フィルタリングされていない培地。

【１６２１】

表４６：ＴＩＬ最終産物の総生細胞数および倍率拡張：Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３プロセスでは、プロセス条件ごとにＴＶＣをカウントし、プロセスの各日について生存細胞の割合を生成した。採取時に、２２日目（Ｇｅｎ２）および１６日目（Ｇｅｎ３）の細胞を収集し、ＴＶＣカウントを確立した。次いで、ＴＶＣを０日目に提供された断片の数で割って、断片あたりの生細胞の平均を計算した。倍率拡張は、採取したＴＶＣをＲＥＰ開始ＴＶＣで割ることによって計算した。表に示されるように、Ｇｅｎ２とＧｅｎ３とを比較すると、倍率拡張はＬ４０５４でも同様であり、Ｌ４０５５の場合、倍率拡張はＧｅｎ２プロセスの方が高かった。具体的には、この場合、培地をＲＥＰ開始日の事前に最長２４温めた。Ｍ１０８５ＴのＧｅｎ３においても、より高い倍率拡張が観察された。２２日目にＧｅｎ３プロセスで予想されるＴＶＣの数の外挿計算、これは、ＲＥＰ　ＴＶＣを１６で割り、次いで２２を掛けて計算した。

【表４８】

表４６：ＴＩＬ最終産物の総生細胞数および倍率拡張

腫瘍ＩＤ	L4054		L4055		M1085T	
プロセス	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
断片数	21	21	24	24	16	16
ＴＶＣ／断片（採取時）	3.18E+09	8.77E+08	2.30E+09	3.65E+08	7.09E+08	4.80E+08
ＲＥＰ開始	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
スケールアップ	3.36E+09	9.35E+08	3.49E+09	8.44E+08	1.99E+09	3.25E+08
採取	6.67E+10	1.84E+10	5.52E+10	8.76E+09	1.13E+10	7.68E+09
倍率拡張　採取／ＲＥＰ開始	468.4	425.9	2056.8	634.6	925.0	2197.2
２２日目のＲＥＰ採取におけるＧｅｎ３外挿値	N/A	2.53E+10	N/A	1.20E+10	N/A	1.06E+10

＊Ｌ４０５５、フィルタリングされていない培地。

【１６２２】

表４７：ＴＩＬ最終産物の生存率％：採取時に、最終ＴＩＬ　ＲＥＰ産物を生存率％の放出基準と比較した。Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３プロセスのすべての条件は、７０％の生存率基準を超えており、プロセスおよび腫瘍間で同等であった。

【表４９】

表４７：ＲＥＰの生存率％

腫瘍 ID	L4054		L4055		M1085T	
プロセス	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
REP 開始	98.23%	97.97%	97.43%	92.03%	81.85%	68.27%
スケールアップ	94.00%	93.57%	90.50%	95.93%	78.55%	71.15%
採取	87.95%	89.85%	87.50%	86.70%	86.10%	87.45%

【１６２３】

表４８：Ｇｅｎ３プロセスの追加フラスコあたりの推定細胞数。フラスコあたりの断片の数が必要な最大数を下回っていたため、採取日の推定細胞数を各腫瘍について計算した。推定は、臨床腫瘍が０日目に２つまたは３つのフラスコに播種するのに十分な大きさであるという予想に基づいていた。

【表５０】

表４９：Ｇｅｎ３プロセスでのフルスケール２および３フラスコへの外挿推定細胞数計算

腫瘍 ID	L4054		L4055		M1085T	
Gen3 プロセス	2 フラスコ	3 フラスコ	2 フラスコ	3 フラスコ	2 フラスコ	3 フラスコ
推定採取	3.68E+10	5.52E+10	1.75E+10	2.63E+10	1.54E+10	2.30E+10

【１６２４】

免疫表現型解析：

ＴＩＬ最終産物の表現型マーカーの比較：

３つの腫瘍Ｌ４０５４、Ｌ４０５５、およびＭ１０８５Ｔは、Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３プロセスの両方でＴＩＬ拡張を受けた。採取時に、ＲＥＰ　ＴＩＬ最終産物をフローサイトメトリー分析にかけ、純度、分化、およびメモリーマーカーを試験した。すべての条件で、ＴＣＲ　ａ／ｂ＋細胞のパーセンテージは９０％超であった。

【１６２５】

Ｇｅｎ３プロセスから採取されたＴＩＬは、Ｇｅｎ２プロセスから採取されたＴＩＬと比較して、ＣＤ８およびＣＤ２８のより高い発現を示した。Ｇｅｎ２プロセスは、ＣＤ４＋のより高いパーセンテージを示した。図３（Ａ、Ｂ、Ｃ）を参照されたい。

【１６２６】

ＴＩＬ最終産物のメモリーマーカーの比較：

Ｇｅｎ３プロセスから採取されたＴＩＬは、Ｇｅｎ２プロセスからのＴＩＬと比較してセントラルメモリー区画でより高い発現を示した。図４（Ａ、Ｂ、Ｃ）を参照されたい。

【１６２７】

ＴＩＬ最終産物の活性化マーカーと疲弊マーカーとの比較：

活性化マーカーおよび疲弊マーカーは、２つの腫瘍Ｌ４０５４およびＬ４０５５からのＴＩＬで分析され、Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３のＴＩＬ拡張プロセスによる最終産物を比較した。活性化マーカーおよび疲弊マーカーは、Ｇｅｎ２とＧｅｎ３とのプロセス間で同等であった。図５（Ａ、Ｂ）、図６（Ａ、Ｂ）を参照されたい。

【１６２８】

再刺激時のインターフェロンγ分泌：

採取日、Ｇｅｎ２では２２日目、Ｇｅｎ３では１６日目に、ＴＩＬはＬ４０５４およびＬ４０５５用のコーティングされた抗ＣＤ３プレートで一晩再刺激を受けた。Ｍ１０８５Ｔでの再刺激は、抗ＣＤ３、ＣＤ２８、およびＣＤ１３７ビーズを使用して行った。すべ

ての条件で再刺激の２４時間後に上清を収集し、上清を凍結させた。ＥＬＩＳＡによるＩＦＮγ分析は、同じＥＬＩＳＡプレートを使用して両方のプロセスからの上清で同時に評価された。分析した３つの腫瘍で、Ｇｅｎ３プロセスからのＩＦＮγのより高い産生が観察された。図７（Ａ、Ｂ、Ｃ）を参照されたい。

【１６２９】

培養培地中のＩＬ－２レベルの測定：

Ｇｅｎ２プロセスとＧｅｎ３プロセスとの間のＩＬ－２消費量を比較するために、腫瘍Ｌ４０５４およびＬ４０５５で、ＲＥＰの開始、スケールアップ、および採取日に細胞上清を収集した。細胞培養上清中のＩＬ－２の量は、Ｒ＆Ｄからの定量化ＥＬＩＳＡキットによって測定した。一般的な傾向は、Ｇｅｎ２プロセスと比較した場合、Ｇｅｎ３プロセスではＩＬ－２濃度が高いままであることを示す。これは、プロセス全体での培地のキャリーオーバーと相まって、Ｇｅｎ３のＲＥＰ開始時のＩＬ－２の濃度が高い（６０００ＩＵ／ｍＬ）ことに起因する可能性がある。図８（Ａ、Ｂ）を参照されたい。

【１６３０】

代謝基質および代謝物分析

Ｄ－グルコースおよび Ｌ－グルタミンなどの代謝基質のレベルを、全体的な培地消費量の代用として測定した。乳酸およびアンモニアなどの相互代謝物を測定した。グルコースは、ミトコンドリアがＡＴＰの形でエネルギーを産生するために利用する培地中の単糖である。グルコースが酸化されると、乳酸が産生される（乳酸塩は乳酸のエステルである）。乳酸塩は、細胞の指数関数的成長相中に強く産生される。高レベルの乳酸塩は、細胞培養プロセスに悪影響を及ぼす。図９（Ａ、Ｂ）を参照されたい。

【１６３１】

Ｌ４０５４およびＬ４０５５の使用済み培地は、プロセスＧｅｎ２およびＧｅｎ３の両方について、ＲＥＰの開始、スケールアップ、および採取日に収集した。使用済み培地の収集は、Ｇｅｎの場合は１１日目、１６日目、および２２日目、Ｇｅｎ３の場合は７日目、１１日目、および１６日目であった。上清をＣＥＤＥＸバイオアナライザーでグルコース、乳酸、グルタミン、ｇｌｕｔａｍａｘ、およびアンモニアの濃度について分析した。

【１６３２】

Ｌ－グルタミンは、細胞培養培地の製剤に必要な不安定な必須アミノ酸である。グルタミンにはアミンが含まれており、このアミド構造基は、窒素を細胞に輸送して送達することができる。Ｌ－グルタミンが酸化すると、細胞によって有毒なアンモニア副産物が産生される。Ｌ－グルタミンの分解を打ち消すために、Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３プロセスの培地を、水溶液中でより安定であり、自発的に分解しないＧｌｕｔａｍａｘで補足した。２つの腫瘍株では、Ｇｅｎ３アームは、プロセス中のＬ－グルタミンおよびＧｌｕｔａｍａｘの減少、ならびにＲＥＰ全体でアンモニアの増加を示した。Ｇｅｎ２アームでは、Ｌ－グルタミンおよびＧｌｕｔａｍａｘの濃度が一定であり、アンモニア産生のわずかな増加が観察された。Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３のプロセスは、アンモニアについて採取日に同等であり、Ｌ－グルタミン分解にわずかな違いが見られた。図１０（Ａ、Ｂ、Ｃ）を参照されたい。

【１６３３】

ＦＬＯＷ－ＦＩＳＨによるテロメア反復：

Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨ技術を使用して、Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３プロセスでのＬ４０５４およびＬ４０５５のテロメア反復の平均長を測定した。相対テロメア長（ＲＴＬ）の決定は、ＤＡＫＯからのフローサイトメトリー分析用のテロメアＰＮＡキット／ＦＩＴＣを使用して計算した。Ｇｅｎ３は、Ｇｅｎ２と同等のテロメア長を示した。

【１６３４】

ＣＤ３分析

各プロセスで生成された細胞産物のクローン多様性を決定するために、Ｌ４０５４およびＬ４０５５について採取されたＴＩＬ最終産物をサンプリングし、Ｔ細胞受容体のＣＤＲ３部分の配列決定によるクローン多様性分析のためにアッセイした。

【１６３５】
表５０：採取されたＴＩＬ細胞産物のＬ４０５４で共有される固有のＣＤＲ３配列のパーセンテージに関するＧｅｎ２とＧｅｎ３との比較。１９９配列は、Ｇｅｎ３最終産物とＧｅｎ２最終産物との間で共有され、Ｇｅｎ３の最終産物と共有されるＧｅｎ２からの固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の９７．０７％に相当する。
【表５１】
表５０：Ｌ４０５４のＧｅｎ２プロセスとＧｅｎ３プロセスとの間で共有されるｕＣＤＲ３配列の比較。

uCDR3 数 (重複率%)	すべての uCDR3		上位 80%の uCDR3	
	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
Gen2-L4054	8915	4355(48.85%)	205	199(97.07%)
Gen3-L4054	-	18130	-	223

【１６３６】
表５１：採取されたＴＩＬ細胞産物のＬ４０５５で共有される固有のＣＤＲ３配列のパーセンテージに関するＧｅｎ２とＧｅｎ３との比較。１８３３配列は、Ｇｅｎ３最終産物とＧｅｎ２最終産物との間で共有され、Ｇｅｎ３の最終産物と共有されるＧｅｎ２からの固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の９９．４５％に相当する。
【表５２】
表５１：Ｌ４０５５のＧｅｎ２プロセスとＧｅｎ３プロセスとの間で共有されるｕＣＤＲ３配列の比較。

uCDR3 数 (重複率%)	すべての uCDR3		上位 80%の uCDR3	
	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
Gen2-L4055	12996	6599(50.77%)	1843	1833(99.45%)
Gen3-L4055	-	27246	-	2616

【１６３７】
ＣＭ１およびＣＭ２培地は、ろ過せずに事前に調製し、腫瘍Ｌ４０５５の場合、Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３プロセスで使用するまで４℃で保持した。
【１６３８】
Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３プロセスのＲＥＰ開始日に、腫瘍Ｌ４０５５の場合、培地を３７℃で事前に２４時間温めた。
【１６３９】
プロセスで収集された上清ではＬＤＨは測定されなかった。
【１６４０】
Ｍ１０８５Ｔ　ＴＩＬ細胞カウントは、Ｋ２セロメーターセルカウンターを使用して実施した。
【１６４１】
腫瘍Ｍ１０８５Ｔでは、代謝分析用の上清、活性化および疲弊マーカー分析用のＴＩＬ製品、テロメア長、およびＣＤ３－ＴＣＲｖｂ分析などの試料は利用できなかった。
【１６４２】
結論
この実施例では、３つの独立したドナー腫瘍組織を、機能的品質属性に加えて、拡張された表現型の特徴付け、ならびにＧｅｎ２およびＧｅｎ３プロセス間の培地消費の観点から比較する。
【１６４３】
Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３のｐｒｅ－ＲＥＰおよびＲＥＰ拡張の比較は、生成された全生

細胞および全有核細胞集団の生存率の観点から評価した。採取日のＴＶＣ細胞用量は、Ｇｅｎ２（２２日）とＧｅｎ３（１６日）との間で同等ではなかった。Ｇｅｎ３細胞用量は、採取時に収集された全生細胞の約４０％でＧｅｎ２よりも低かった。

【１６４４】

ｐｒｅ－ＲＥＰ採取は、７日目ではなく１１日目に起こり、ＲＥＰ採取は、１６日目ではなく２２日目に起こると仮定して、Ｇｅｎ３プロセスの外挿細胞数を計算した。どちらの場合も、Ｇｅｎ２プロセスと比較してＴＶＣの数値が近いことを示し、これは初期の活性化により、ＴＩＬの成長に対する全体的な性能が向上する可能性があることを示す。表４および５の下の行。

【１６４５】

Ｇｅｎ３プロセスでの追加フラスコ（２または３）の外挿値の場合、処理される腫瘍のサイズがより大きいと仮定し、記載されるようにプロセスごとに必要な断片の最大数に到達する。２２日目のＧｅｎ２プロセスと比較して、Ｇｅｎ３プロセスの１６日目の採取ではＴＶＣで同様の用量に到達可能であり得ることが観察された。この観察は重要であり、培養物の初期活性化が、より短い処理時間でＴＩＬのより良い性能を可能にし得ることを示す。

【１６４６】

Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３のｐｒｅ－ＲＥＰおよびＲＥＰ拡張の比較は、生成された全生細胞および全有核細胞集団の生存率の観点から評価した。採取日のＴＶＣ細胞用量は、Ｇｅｎ２（２２日）とＧｅｎ３（１６日）との間で同等ではなかった。Ｇｅｎ３細胞用量は、採取時に収集された全生細胞の約４０％でＧｅｎ２よりも低かった。

【１６４７】

表現型の特徴付けに関しては、Ｇｅｎ２プロセスと比較してＧｅｎ３プロセスの３つの腫瘍でより高いＣＤ８＋およびＣＤ２８＋発現が観察された。このデータは、Ｇｅｎ３プロセスが、Ｇｅｎ２と比較して最終的なＴＩＬ産物の属性を改善したことを示す。

【１６４８】

Ｇｅｎ３プロセスは、Ｇｅｎ２プロセスと比較してわずかに高いセントラルメモリー区画を示した。

【１６４９】

Ｇｅｎ２およびＧｅｎ３プロセスは、Ｇｅｎ３プロセスの期間が短いにもかかわらず、同等の活性化および疲弊マーカーを示した。

【１６５０】

ＩＦＮガンマ（ＩＦＮγ）の産生は、分析した３つの腫瘍において、Ｇｅｎ２と比較してＧｅｎ３最終産物で３倍高かった。このデータは、おそらくＧｅｎ３でのＣＤ８およびＣＤ２８の発現が高いために、Ｇｅｎ３プロセスが、Ｇｅｎ２プロセスと比較して高機能でより強力なＴＩＬ産物を生成したことを示す。表現型の特徴付けは、Ｇｅｎ２プロセスと比較して３つの腫瘍でＣＤ８＋、ＣＤ２８＋発現に向かうＧｅｎ３の正の傾向を示唆した。

【１６５１】

Ｇｅｎ２とＧｅｎ３との間のＴＩＬ最終産物のテロメア長は同等であった。

【１６５２】

グルコースおよび乳酸塩のレベルは、Ｇｅｎ２最終産物とＧｅｎ３最終産物との間で同等であり、Ｇｅｎ３プロセスの培地の栄養素レベルが、プロセスの各日に減容除去が実施されなかったこと、およびＧｅｎ２と比較してプロセスにおける培地全体の体積が少ないことに起因して、影響されなかったことを示唆する。

【１６５３】

全体として、Ｇｅｎ３プロセスは、Ｇｅｎ２プロセスと比較して処理時間のほぼ２倍の低減を示し、これにより、Ｇｅｎ３プロセスによって拡張されたＴＩＬ産物の売上原価（ＣＯＧ）の大幅低減をもたらした。

【１６５４】

ＩＬ－２消費は、Ｇｅｎ２プロセスでのＩＬ－２消費の一般的な傾向を示しており、Ｇｅｎ３プロセスでは、古い培地が除去されなかったため、ＩＬ－２が高くなった。

【１６５５】

Ｇｅｎ３プロセスは、ＣＤＲ３　ＴＣＲａｂ配列分析によって測定されたより高いクローン多様性を示した。

【１６５６】

ｐｒｅ－ＲＥＰの０日目でのフィーダーおよびＯＫＴ－３の添加は、Ｇｅｎ３プロセスを使用して、ＴＩＬの初期活性化および全体的なＴＩＬ性能の向上を可能にした。

【１６５７】

表５２は、現在のＧｅｎ２プロセスと比較したＧｅｎ３プロセスの様々な実施形態および成果を説明する。

【表５３】

表５２：例示的なＧｅｎ３プロセス。

ステップ	プロセス Gen2	プロセス Gen3－最適化
Pre REP－0日目	50 個以下の断片 1X G－Rex 100MCS 1L 培地 IL－2（6000IU／mL） 11 日	240 個以下の断片 60 個以下の断片／フラスコ 4 フラスコ以下 2L 以下の培地（500mL／フラスコ） IL－2（6000IU／mL） 2．5×10^8 個のフィーダー細胞／フラスコ 15ug OKT3／フラスコ
REP 開始	REP に指向された新鮮な TIL 11 日目 200e^6 個以下の生細胞 5×10^9 個のフィーダー細胞 G－Rex 500MCS 5L CM2 培地＋IL－2（3000IU／mL） 150ug OKT3	REP に指向された新鮮な TIL 7 日目 培養物全体を活性化する 5×10^8 個のフィーダー細胞 30ug OKT3／フラスコ G－Rex 100MCS 500mL 培地＋IL－2（6000IU／mL）
TIL 継代培養またはスケールアップ	5 つ以下の G－REX 500MCS 1×10 個以下の生細胞／フラスコ 5L／フラスコ 16 日目	4 つ以下の G－REX 500MCS 培養物全体をスケールアップする 4L／フラスコ 10～11 日目
採取	採取 22 日目 LOVO－自動細胞洗浄機 2 回の洗浄サイクル	採取 16 日目 LOVO－自動細胞洗浄機 5 回の洗浄サイクル
最終製剤	凍結保存された製品 LN_2 中の 300IU／mL の IL2－CS10、複数のアリコート	凍結保存された製品 LN_2 中の 300IU／mL の IL－2－CS10、複数のアリコート
プロセス時間	22 日	16 日

【１６５８】

実施例９：ＣＬＬ患者のＰＢＭＣからＰＢＬを選択および拡張することの例示的な実施形態。

ＰＢＭＣを患者から収集し、後に使用するために凍結されるか、または新鮮に使用される。十分な量の末梢血を収集して、本発明の方法における出発物質のために少なくとも約４００，０００，０００（４００×１０^{6}）個のＰＢＭＣを産生する。方法の０日目に、６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を新たに調製するかまたは解凍し、使用する準備ができるまで４℃または氷上で保存する。２００ｍＬのＣＭ２培地を、１００ｍＬのＣＭ１培地（ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標）を含有する）を複合し、次いでそれを１００ｍＬ（１：１）のＡＩＭ－Ｖで希釈してＣＭ２を作製することによって調製する。ＣＭ２を光から保護し、使用しないときはしっかりと密閉する。

【１６５９】

以下のステップのすべては、無菌細胞培養条件下で行われる。ＣＭ２のアリコートを、凍結したＰＢＭＣ試料の解凍および／または洗浄に使用するために、３７℃の水浴内の５０ｍＬ円錐管中で温める。凍結したＰＢＭＣ試料を使用する場合、試料を冷凍庫から取り出し、解凍する準備ができるまでドライアイス上に保管する。ＰＢＭＣクライオバイアルを解凍する準備ができたら、５ｍＬのＣＭ２培地を無菌の５０ｍＬ円錐管に入れる。ＰＢＭＣ試料クライオバイアルを、わずかな氷の結晶が残るまで３７℃の水浴に入れる。温めたＣＭ２培地を、１：１の容量比の試料：培地（約１ｍＬ）で試料バイアルに滴下添加する。内容物全体をクライオバイアルから取り出し、５０ｍＬの円錐管内の残りのＣＭ２培地に移す。追加の１～２ｍＬのＣＭ２培地を使用してクライオバイアルをすすぎ、クライオバイアルの内容物全体を取り出して５０ｍＬの円錐管に移す。次いで、円錐管内の容量を追加のＣＭ２培地で１５ｍＬに調整し、穏やかに回転させて細胞をすすぐ。次いで、円錐管を４００ｇで５分間、室温で遠心分離して、細胞ペレットを収集する。

【１６６０】

上清をペレットから除去し、円錐管にキャップをし、次いで、例えば、粗い表面に沿って管をこすることによって、細胞ペレットを破壊する。約１ｍＬのＣＭ２培地を細胞ペレットに添加し、ペレットおよび培地をピペットで５～１０回上下に吸引して細胞ペレットを破砕する。さらに３～５ｍＬのＣＭ２培地を管に添加し、ピペットで混合して細胞を懸濁する。この時点で、細胞懸濁液の量を記録する。自動セルカウンター、例えばＮｅｘｃｅｌｏｍ Ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ Ｋ２で細胞をカウントするために、１００ｕＬの細胞懸濁液を管から取り出す。試料中の生細胞の数を決定し、記録する。

【１６６１】

表現型解析および他の特徴付け実験のために、最低５×１０^{6}個の細胞を保存する。保存した細胞を室温で５分間、４００ｇで回転させ、細胞ペレットを収集する。細胞ペレットを凍結培地（２０％ ＤＭＳＯを含む無菌の熱不活化ＦＢＳ）に再懸濁する。保存した細胞の１つまたは２つのアリコートを凍結培地中で凍結し、－８０℃の冷凍庫内のセルフリーザー（Ｍｒ．Ｆｒｏｓｔｙ）でアリコートをゆっくりと凍結させる。－８０℃で最低２４時間後、液体窒素貯蔵庫に移す。

【１６６２】

以下のステップでは、予冷した溶液を使用し、素早く作業して細胞を冷たく保つ。次のステップは、ＰＢＭＣ試料のＴ細胞画分を精製することである。これは、Ｐａｎ Ｔ細胞単離キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ番号１３０－０９６－５３５）を使用して完了する。ＰＢＳ、０．５％ ＢＳＡ、および２ｍＭ ＥＤＴＡを含有するｐＨ７．２の無菌ろ過洗浄バッファーで細胞を洗浄することによって、精製用の細胞を調製する。ＰＢＭＣ試料を４００ｇで５分間遠心分離して、細胞ペレットを収集する。上清を吸引し、細胞ペレットを、１０^{7}個の細胞ごとに４０ｕＬの洗浄バッファー中に再懸濁される。１０^{7}個の細胞ごとに１０μＬのＰａｎ Ｔ細胞ビオチン抗体カクテルを添加する。よく混合し、冷蔵庫または氷上で５分間インキュベートする。１０^{7}個の細胞ごとに３０ｕＬの洗浄バッファーを添加する。１０^{7}個の細胞ごとに２０ｕＬのＰａｎ Ｔ細胞マイクロビーズカクテルを添加する。よく混合し、冷蔵庫または氷上で１０分間インキュベートする。ＬＳカ

ラムを調製し、マイクロビーズから細胞を磁気的に分離する。ＬＳカラムを、ＱｕａｄｒｏＭＡＣＳ磁場に配置する。ＬＳカラムを、３ｍＬの冷たい洗浄バッファーで洗浄し、洗浄液を収集して廃棄する。細胞懸濁液をカラムに適用し、フロースルー（非標識細胞）を収集する。このフロースルーは、濃縮されたＴ細胞画分（ＰＢＬ）である。３ｍＬの洗浄バッファーでカラムを洗浄し、最初のフロースルーと同じ管にフロースルーを収集する。管にキャップをして氷上に置く。これは、Ｔ細胞画分またはＰＢＬである。ＬＳカラムを磁場から取り除き、５ｍＬの洗浄バッファーでカラムを洗浄し、非Ｔ細胞画分（磁気標識された細胞）を別の管に収集する。両方の画分を４００ｇで５分間遠心分離し、細胞ペレットを収集する。上清を両方の試料から吸引し、ペレットを破砕し、各ペレットに対して３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補足された１ｍＬのＣＭ２培地中で細胞を再懸濁し、上下に５～１０回ピペットしてペレットを粉砕する。各試料に１～２ｍＬのＣＭ２を添加し、各試料をよく混合し、次のステップのために組織培養インキュベーターに保存する。各試料から約５０ｕＬのアリコートを取り出し、細胞をカウントし、数および生存率を記録する。

【１６６３】

次いで、Ｔ細胞（ＰＢＬ）をＤｕｎａｂｅａｄｓ（商標）ヒトＴ－ＥｘｐａｎｄｅｒＣＤ３／ＣＤ２８で培養する。Ｄｙｎａｂｅａｄｓのストックバイアルを、中速で３０秒間ボルテックスする。ビーズの必要なアリコートを、ストックバイアルから無菌１．５ｍＬの微細管に取り出す。ビーズを含む１．５ｍＬの微細管に１ｍＬのビーズ洗浄液を添加することによって、ビーズをビーズ洗浄液で洗浄する。穏やかに混合する。管をＤｙｎａＭａｇ（商標）－２磁石に置き、ビーズが磁石に向かって引き寄せられるまで３０分間放置する。ビーズから洗浄液を吸引し、磁石から管を取り外す。３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補足された１ｍＬのＣＭ２培地をビーズに添加する。微細管の内容物全体を、１５ｍＬまたは５０ｍＬの円錐管に移す。ＩＬ－２を含むＣＭ２培地を使用して、ビーズを約５００，０００／ｍＬの最終濃度にする。

【１６６４】

Ｔ細胞（ＰＢＬ）およびビーズを、次のように一緒に培養する。０日目：Ｇ－Ｒｅｘ２４ウェルプレートにおいて、１ウェルあたり合計７ｍＬで、５００，０００Ｔ細胞、５００，０００　ＣＤ３／ＣＤ２８　Ｄｙｎａｂｅａｄｓ、およびＩＬ－２で補足されたＣＭ２を添加する。プロセスの次のステップまで、Ｇ－Ｒｅｘプレートを加湿した３７℃、５％　CO_2インキュベーターに入れる（４日目）。残りの細胞を、Ｍｒ．Ｆｒｏｓｔｙセルフリーザーを使用してＣＳ１０凍結保存培地中で凍結させる。細胞の非Ｔ細胞画分を、Ｍｒ．Ｆｒｏｓｔｙセルフリーザーを使用してＣＳ１０凍結保存培地中で凍結させる。４日目に培地を交換する。培地の半分（約３．５ｍＬ）を、Ｇ－ｒｅｘプレートの各ウェルから取り出す。３７℃に温めた３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補足された十分な量（約３．５ｍＬ）のＣＭ４培地を添加して、各試料ウェルから取り出した培地を交換する。Ｇ－ｒｅｘプレートをインキュベーターに戻す。

【１６６５】

７日目に、細胞をＲＥＰによる拡張のために調製する。Ｇ－ｒｅｘプレートをインキュベーターから取り出し、培地の半分を各ウェルから取り出して廃棄する。細胞を残りの培地に再懸濁し、１５ｍＬの円錐管に移す。ウェルを、３７℃に温めた３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補足された各１ｍＬのＣＭ４で洗浄し、洗浄培地を細胞とともに同じ１５ｍＬ管に移す。細胞の代表的な試料を取り出し、自動セルカウンターを使用してカウントする。1×10^{6}個未満の生細胞が存在する場合、０日目にＤｙｎａｂｅａｄ拡張プロセスを繰り返す。残りの細胞は、バックアップの拡張または表現型解析および他の特徴付け研究のために凍結される。1×10^{6}個以上の生細胞が存在する場合、ＲＥＰ拡張は０日目からのプロトコルに従って複製で設定される。代替的に、十分な細胞を用いて、１フラスコあたり$10\sim15\times10^{6}$個のＰＢＬ、および３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補足された最終量１００ｍＬ／ウェルのＣＭ４培地中の１：１比のＤｙｎａｂｅａｄｓ：ＰＢＬを使用して、Ｇ－ｒｅｘ　１０Ｍ培養フラスコ内の拡張を設定することができる。プレー

トおよび／またはフラスコをインキュベーターに戻す。過剰なＰＢＬを等分し、－８０℃の冷凍庫内のＭｒ．Ｆｒｏｓｔｙセルフリーザーでゆっくりと凍結し、－８０℃で最低２４時間後に液体窒素貯蔵庫に移すことができる。これらのＰＢＬは、拡張のため、または表現型解析もしくは他の特徴付け研究のためのバックアップ試料として使用することができる。

【１６６６】

１１日目に培地を交換する。培地の半分をＧ－ｒｅｘプレートの各ウェルまたはフラスコのいずれかから取り出し、３７℃で３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補足された同量の新鮮なＣＭ４培地と交換する。

【１６６７】

１４日目に、ＰＢＬを採取する。Ｇ－ｒｅｘプレートを使用する場合、培地の約半分をプレートの各ウェルから取り出し、廃棄する。ＰＢＬおよびビーズを残りの培地に懸濁し、無菌の１５ｍＬ円錐管（管１）に移す。ウェルを３７℃に温めた１～２ｍＬの新鮮なＡＩＭ－Ｖ培地で洗浄し、洗浄液を管１に移す。管１にキャップをして、ＤｙｎａＭａｇ（商標）－１５　Ｍａｇｎｅｔに１分間入れ、ビーズが磁石に引き寄せられるようにする。細胞懸濁液を新しい１５ｍＬの管（管２）に移し、ビーズを３７℃で２ｍＬの新鮮なＡＩＭ－Ｖで洗浄する。管１をさらに１分間磁石に戻し、洗浄培地を管２に移す。最終洗浄ステップの後、必要に応じてウェルを組み合わせることができる。細胞の代表的な試料を取り出し、カウントし、数および生存率を記録する。カウント中、管をインキュベーターに入れることができる。細胞が非常に密に見える場合は、追加のＡＩＭ－Ｖ培地を管２に添加することができる。フラスコを使用する場合、フラスコ内の容量を約１０ｍＬに低減する必要がある。フラスコの内容物を混合し、１５ｍＬ円錐管（管Ａ）に移す。フラスコを上記のように２ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地で洗浄し、洗浄培地も管Ａに移す。管Ａにキャップをして、ＤｙｎａＭａｇ（商標）－１５　Ｍａｇｎｅｔに１分間入れ、ビーズが磁石に引き寄せられるようにする。細胞懸濁液を新しい１５ｍＬの管（管Ｂ）に移し、ビーズを３７℃で２ｍＬの新鮮なＡＩＭ－Ｖで洗浄する。管Ａをさらに１分間マグネットに戻し、洗浄培地を管Ｂに移す。最後の洗浄ステップの後、必要に応じてウェルを組み合わせることができる。細胞の代表的な試料を取り出し、カウントし、数および生存率を記録する。カウント中、管をインキュベーターに入れることができる。細胞が非常に密に見える場合は、追加のＡＩＭ－Ｖ培地を管Ｂに添加することができる。細胞は、新鮮な状態で使用することも、所望の濃度でＣＳ１０保存培地中で凍結させることもできる。

【１６６８】

実施例１０：固形腫瘍を有する患者における自己腫瘍浸潤リンパ球の第２相多施設研究

研究設計

概要

この実施例では、本出願ならびにこの実施例に記載されるように調製されたＴＩＬを使用して、ＴＩＬをペムブロリズマブと組み合わせて、またはＴＩＬを単剤療法として使用してＡＣＴを評価する、前向き、非盲検、マルチコホート、非ランダム化、多施設第２相試験について説明する。

【１６６９】

目的：

一次：

治験責任医師が評価した固形腫瘍の奏効評価基準（ＲＥＣＩＳＴ１．１）を使用して、客観的奏効率（ＯＲＲ）によって決定されるように、ＭＭ、ＨＮＳＣＣ、もしくはＮＳＣＬＣ患者におけるペムブロリズマブと組み合わせた自己ＴＩＬの有効性、またはＣＰＩによる治療中もしくは治療後に以前に進行した再発もしくは不応性（ｒ／ｒ）ＮＳＣＬＣ患者における単剤療法としてのＴＩＬの有効性を評価すること。

【１６７０】

グレード３以上の治療に起因する有害事象（ＴＥＡＥ）の発生率によって測定される、ＭＭ、ＨＮＳＣＣ、およびＮＳＣＬＣ患者におけるペムブロリズマブと組み合わせたＴＩ

Ｌの安全性プロファイル、またはｒ／ｒ　ＮＳＣＬＣ患者における単剤療法としてのＴＩＬの安全性プロファイルを特徴付けること。

【１６７１】

二次：

完全奏効（ＣＲ）率、奏効期間（ＤＯＲ）、疾患制御率（ＤＣＲ）、治験責任医師によって評価されたＲＥＣＩＳＴ　１．１を使用した無増悪生存期間（ＰＦＳ）、および全生存期間（ＯＳ）を使用して、ＭＭ、ＨＮＳＣＣ、およびＮＳＣＬＣ患者におけるペムブロリズマブと組み合わせた自己ＴＩＬの有効性、またはｒ／ｒ　ＮＳＣＬＣ患者における単剤療法としてのＴＩＬの有効性をさらに評価すること。

【１６７２】

コホート：

コホート１Ａ：免疫療法を除く３つ以下の全身療法を伴う、切除不能なステージＩＩＩＣもしくはステージＩＶ、またはＭＭの患者におけるペムブロリズマブと組み合わせたＴＩＬ療法。以前に治療を受けた場合、患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が記録されていなければならない。

【１６７３】

コホート２Ａ：免疫療法を除く３つ以下の全身療法を伴う、進行性、再発性、または転移性のＨＮＳＣＣ（例えば、ステージＴ１Ｎ１－Ｎ２Ｂ、Ｔ２－４Ｎ０－Ｎ２ｂ）の患者におけるペムブロリズマブと組み合わせたＴＩＬ療法。以前に治療を受けた場合、患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が記録されていなければならない。

【１６７４】

コホート３Ａ：免疫療法を除く３つ以下の全身療法を伴う、局所進行性または転移性（ステージＩＩＩ～ＩＶ）ＮＳＣＬＣ患者におけるペムブロリズマブと組み合わせたＴＩＬ療法。以前に治療を受けた場合、患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が記録されていなければならない。

【１６７５】

コホート３Ｂ：免疫療法を除く３つ以下の全身療法の一部として、ＣＰＩ（例えば、抗ＰＤ－１／抗ＰＤ－Ｌ１）による全身療法を以前に受けたことがあるステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ患者における単剤としてのＴＩＬ療法。以前に治療を受けた場合、患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が記録されていなければならない。

【１６７６】

有効な標的療法が利用可能な癌遺伝子駆動腫瘍を有するコホート３Ａおよび３Ｂ（ＮＳＣＬＣ）の患者は、少なくとも１つの標的療法を受けていなければならない。

【１６７７】

すべての患者は、シクロホスファミドおよびフルダラビンからなる非骨髄破壊的リンパ球枯渇（ＮＭＡ－ＬＤ）プレコンディショニングレジメンの前に、自己凍結保存ＴＩＬ療法（コホートの割り当てに応じて、ペムブロリズマブの有無にかかわらず）を受けた。ＴＩＬ注入後、最大６回のＩＶインターロイキン－２（ＩＬ－２）の最大用量が投与された。

【１６７８】

以下の一般的な研究期間は、特に明記されていない限り、４つのコホートすべてで行われた。

【１６７９】

スクリーニングおよび腫瘍切除：研究登録から最大４週間（２８日）、ＴＩＬ製品の製造：腫瘍切除からおよそ２２日以内、および以下で考察される治療期間。

【１６８０】

治療期間（コホート１Ａ、２Ａ、および３Ａ）：ＮＭＡ－ＬＤ（７日）、ＴＩＬ注入（１日）、続いてＩＬ－２投与（１～４日）を含む最大２年。患者は、ＴＩＬ産生のための腫瘍切除およびベースライン走査の完了後であるが、ＮＭＡ－ＬＤレジメンの開始前にペムブロリズマブの単回注入を受ける。ペムブロリズマブの次の用量は、ＩＬ－２の完了後

以降であり、その後２年（２４ヶ月）以内または疾患の進行もしくは許容できない毒性のいずれか早い方までＱ３Ｗ±３日間継続する。治療終了（ＥＯＴ）訪問は、ペムブロリズマブの最後の用量後３０日以内に起こった。該当する場合、この訪問は評価終了（ＥＯＡ）訪問と組み合わされ得る（例えば、ペムブロリズマブの中止は、疾患の進行時または新しい抗癌療法の開始時に起こった）。

【１６８１】

治療期間（コホート３Ｂ）：ＮＭＡ－ＬＤ（７日）、ＴＩＬ、注入（１日）、続いてＩＬ－２投与（１～４日）を含む最大１２日。ＥＯＴ訪問は、患者がＩＬ－２の最後の用量を受けたときに起こった。ＥＯＴ訪問は、治療中止後３０日以内に行われ、評価期間中にこの間隔内に起こる予定の任意の訪問と組み合わせることができる。

【１６８２】

評価期間：０日目のＴＩＬ注入後に開始し、疾患の進行時に終了し、新しい抗癌療法の開始、研究評価への同意の部分的撤回、または５年（６０ヶ月）のいずれか早い方。患者が疾患の進行に達するか、または新しい抗癌療法を開始すると、評価終了（ＥＯＡ）訪問が起こった。

【１６８３】

本明細書に記載されるように調製されたＴＩＬを用いたＴＩＬ自己療法は、以下のステップから構成されていた。

【１６８４】

１．ＴＩＬ細胞製品の供給源として機能する自己組織を提供するための腫瘍切除。

【１６８５】

２．中央の適正製造基準（ＧＭＰ）施設で産生されたＴＩＬ製品。

【１６８６】

３．７日間のＮＭＡ－ＬＤプレコンディショニングレジメン。

【１６８７】

４．コホート１Ａ、２Ａ、および３Ａ：患者は、ＴＩＬ産生のために腫瘍切除およびベースライン走査の完了後であるが、ＮＭＡ－ＬＤレジメンの開始前にペムブロリズマブの単回注入を受ける。ペムブロリズマブの次の用量は、ＩＬ－２の完了後以降であり、その後Ｑ３Ｗ±３日継続する。

【１６８８】

５．自己ＴＩＬ製品の注入（０日目）、ならびに

【１６８９】

６．最大６用量までのＩＶ　ＩＬ－２投与。

【１６９０】

コホート１Ａ、２Ａ、および３Ａでは、ペムブロリズマブの次の用量は、ＩＬ－２の完了後以降であり、その後２年（２４ヶ月）以内または疾患の進行もしくは許容できない毒性のいずれか早い方までＱ３Ｗ±３日間継続する。

【１６９１】

コホート１Ａ、２Ａ、および３Ａのフローチャートは、図７に見出すことができる。コホート３Ｂのフローチャートは、図８に見出すことができる。患者は、腫瘍の適応によって適切なコホートに割り当てられた。

【１６９２】

ＴＩＬ療法＋ペムブロリズマブ（コホート１Ａ、２Ａ、および３Ａ）

患者はスクリーニングされ、腫瘍切除のための手術が予定された。その後、患者は１つ以上の腫瘍病変を切除し、ＴＩＬ産生のために中央製造施設に送られた。

【１６９３】

次に、ＮＭＡ－ＬＤレジメンは模倣され、－７日目および－６日目にメスナ（部位ごとの標準治療またはＵＳＰＩ／ＳｍＰＣ）を含む２日間のＩＶシクロホスファミド（６０ｍｇ／ｋｇ）、ならびにその後５日間のＩＶフルダラビン（２５ｍｇ／ｍ２：－５日目～－１日目）で構成された。

【１６９４】
　コホート１Ａ、２Ａ、および３Ａの患者は、ＴＩＬ産生のために腫瘍切除の完了後にペムブロリズマブの単回注入を受け、ＮＭＡ－ＬＤレジメンの開始前にベースライン走査を受けた。６００，０００ＩＵ／ｋｇの用量でＩＶでのＩＬ－２投与は、０日目のＴＩＬ注入の完了の３時間後、ただし２４時間後までに開始された。追加のＩＬ－２投与は、最大６用量まで、およそ８～１２時間ごとに行われる。ペムブロリズマブの第２の用量は、ＩＬ－２の完了後以降であった。患者は、第２のペムブロリズマブ投与前に、すべてのＩＬ－２関連毒性（グレード≦２）から回復している必要がある。ペムブロリズマブは、その後２年以内（２４ヶ月）または疾患の進行もしくは許容できない毒性のいずれか早い方まで、Ｑ３Ｗ±３日間継続する。

【１６９５】
　単剤としてのＴＩＬ療法（コホート３Ｂ）
　患者はスクリーニングされ、腫瘍切除のための手術が予定された。その後、患者は１つ以上の腫瘍病変を切除し、ＴＩＬ産生のために中央製造施設に送られた。

【１６９６】
　次に、ＮＭＡ－ＬＤレジメンは、－７日目および－６日目にメスナ（部位ごとの標準治療またはＵＳＰＩ／ＳｍＰＣ）を含む２日間のＩＶシクロホスファミド（６０ｍｇ／ｋｇ）、ならびにその後５日間のＩＶフルダラビン（２５ｍｇ／ｍ２：－５日目～－１日目）で構成された。

【１６９７】
　腫瘍由来の自己ＴＩＬ製品の注入は、フルダラビンの最後の用量から２４時間以内に起こった。６００，０００ＩＵ／ｋｇの用量でＩＶでのＩＬ－２投与は、ＴＩＬ注入の完了後３時間後、ただし２４時間後までに開始された可能性がある。

【１６９８】
　追加のＩＬ－２投与は、最大６用量まで、およそ８～１２時間ごとに行われた。

【１６９９】
　腫瘍浸潤リンパ球の産生および拡張
　ＴＩＬ自己細胞製品は、患者の腫瘍／病変に由来する生存可能な細胞傷害性Ｔリンパ球で構成されており、中央のＧＭＰ施設でエクスビボで製造される。例えば、ＴＩＬ産生プロセスを示す例示的なフロー図を図９に示す。

【１７００】
　ＴＩＬ製造プロセスは、個々の患者ごとに直径１．５ｃｍ以上の原発性または続発性転移性腫瘍病変（複数可）を外科的に切除した後に臨床現場で開始された。様々な解剖学的位置からの複数の腫瘍病変を切除して、腫瘍組織の全凝集体をまとめることができるが、輸送ボトルに存在する生体保存培地の量が限られているため、凝集体は、直径４．０ｃｍ、または重量１０ｇを超えてはならない。

【１７０１】
　腫瘍病変（複数可）が生体保存輸送ボトルに入れられると、それは中央のＧＭＰ製造施設への速達宅配便を使用して２℃～８℃で出荷される。到着時に、腫瘍標本（複数可）を断片に解剖し、その後、ヒト組み換えＩＬ－２を用いたプレ急速拡張プロトコル（Ｐｒｅ－ＲＥＰ）において約１１日間培養した。

【１７０２】
　次いで、これらのｐｒｅ－ＲＥＰ細胞を、ＩＬ－２、ＯＫＴ３（［ムロモナブ－ＣＤ３］としても知られるヒトＣＤ３に対するマウスモノクローナル抗体）、およびフィーダー細胞としての照射された同種異系末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）の存在下で１１日間、急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）を使用してさらに拡張した。

【１７０３】
　次いで、拡張した細胞を採取し、洗浄し、配合し、凍結保存し、速達宅配便で臨床現場に出荷した。ＴＩＬ細胞製品の剤形は、ＴＩＬが由来する患者への注入の準備ができている凍結保存された自己の「生細胞懸濁液」であった。患者は、製品仕様あたり１×１０^{9}

～１５０×１０^{9}生細胞の間に含まれる、製造および放出された製品の全用量を受容することとした。臨床経験は、客観的な腫瘍応答がこの用量範囲全体で達成されたことを示し、これも安全であることが示されている（Ｒａｄｖａｎｙｉ Ｌ．Ｇ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１２；１８（２４）：６７５８－７０）。製品の全用量は、最大４つの注入バッグで提供された。

【１７０４】

ＴＩＬ細胞製品を受容する患者の準備

【１７０５】

この研究で使用されたＮＭＡ－ＬＤプレコンディショニングレジメン（すなわち、２日間のシクロホスファミドおよびメスナ、続いて５日間のフルダラビン）は、国立癌研究所によって開発および試験された方法に基づいていた（Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ Ｓ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１１；１７（１３）：４５５０－７、Ｒａｄｖａｎｙｉ Ｌ．Ｇ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１２；１８（２４）：６７５８－７０、Ｄｕｄｌｅｙ Ｍ．Ｅ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ．２００８；２６（３２）：５２３３－９、Ｐｉｌｏｎ－Ｔｈｏｍａｓ Ｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１２；３５（８）：６１５－２０、Ｄｕｄｌｅｙ Ｍ．Ｅ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ．２００５；２３（１０）：２３４６－５７、およびＤｕｄｌｅｙ Ｍ．Ｅ．，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２００２；２９８（５５９４）：８５０－４）。７日間のプレコンディショニングレジメンに続いて、患者にＴＩＬ細胞製品を注入した。

【１７０６】

ＴＩＬ注入後、８～１２時間ごとにＩＶ ＩＬ－２（６００，０００ＩＵ／ｋｇ）を投与し、最初の用量は、ＴＩＬ注入の完了後３～２４時間の間に投与し、最大６回まで継続した。施設の基準に従って、ＩＬ－２の用量は、実際の体重に基づいて計算することができる。

【１７０７】

患者集団の選択

コホート１Ａ：

患者は、切除不能なＭＭの確定診断を受けた（ステージＩＩＩＣまたはステージＩＶ、米国癌合同委員会［ＡＪＣＣ］病期分類システムに従って組織学的に確認された）。眼内黒色腫患者は除外された。患者は、以前に免疫腫瘍学を標的とした薬剤を受けていてはならない。ＢＲＡＦ突然変異が陽性の場合、患者は、以前にＢＲＡＦ／ＭＥＫ標的療法を受けていた可能性があった。

【１７０８】

コホート２Ａ：

患者は、進行性、再発性、および／または転移性のＨＮＳＣＣを有しており、治療ナイーブであり得、病理学レポートを介した原発腫瘍の組織学的診断が必要である。患者は、以前に免疫療法レジメンを受けていてはならない。

【１７０９】

コホート３Ａ：

患者は、ステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ（扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌）の確定診断を受けた。有効な標的療法が利用可能な癌遺伝子駆動腫瘍を有する患者は、少なくとも１つの標的療法を受けていた。

【１７１０】

コホート３Ｂ：

患者は、ステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ（扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌）の確定診断を受けており、以前にＣＰＩ（例えば、抗ＰＤ－１／抗ＰＤ－Ｌ１）による全身療法を受けていた。有効な標的療法が利用可能な癌遺伝子駆動腫瘍を有する患者は、少なくとも１つの標的療法を受けていた。

【１７１１】

コホート１Ａ、２Ａ、および３Ａの免疫療法を除き、すべての患者は、最大３つの全身抗癌療法を受けていた（以下の包含基準を参照）。以前に治療を受けた場合、患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が確認されていた。

【１７１２】

包含基準

【１７１３】

患者は、研究に参加するために以下の包含基準をすべて満たしている必要がある。

【１７１４】

１．すべての患者は、組織学的または病理学的にそれぞれの組織学的悪性腫瘍の確定診断を受けた。

○切除不能または転移性黒色腫（コホート１Ａ）

○頭頸部の進行性、再発性、または転移性扁平上皮癌（コホート２Ａ）

○ステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ（扁平上皮癌、非扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌）（コホート３Ａおよび３Ｂ）。

【１７１５】

２．コホート１Ａ、２Ａ、および３Ａのみ：患者は、免疫療法ナイーブであった。以前に治療された場合、患者は、最近の治療中または治療後に進行していた。コホート１Ａ、２Ａ、および３Ａは、最大３つの全身性抗癌療法を以前に受けている可能性があり、具体的には以下の通りである。

○コホート１Ａ：切除不能または転移性黒色腫（ステージＩＩＩＣまたはステージＩＶ）を有する患者。ＢＲＡＦ突然変異陽性の場合、患者は、ＢＲＡＦ阻害剤を投与されている可能性がある。

○コホート２Ａ：切除不能または転移性ＨＮＳＣＣの患者。最初の化学放射線療法を受けていた患者は許可された。

○コホート３Ａ：ステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ（扁平上皮癌、非扁平上皮癌、腺癌、または大細胞癌）を有し、免疫療法ナイーブであり、局所進行または転移の状況で３つ以下の以前の全身療法後に進行した患者。アジュバントもしくはネオアジュバントの設定で、または根治的化学放射線療法の一部として全身療法を受けた患者は適格であり、以前の全身療法の完了から１２ヶ月以内に疾患が進行した場合、１つの治療を受けたとみなされた。標的療法に感受性のある突然変異を有する既知の癌遺伝子ドライバー（例えば、ＥＧＦＲ、ＡＬＫ、ＲＯＳ）を有する患者は、少なくとも１つの標的療法の後に進行したに違いない。

【１７１６】

３．コホート３Ｂのみ：ステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ（扁平上皮癌、非扁平上皮癌、腺癌、または大細胞癌）を有し、３つ以下の全身療法の一部として、ＣＰＩ（例えば、抗ＰＤ－１／抗ＰＤ－Ｌ１）による全身療法を以前に受けていた患者。

○患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が確認されていた。

○アジュバントもしくはネオアジュバントの設定で、または根治的化学放射線療法の一部として全身療法を受けた患者は適格であり、以前の全身療法の完了から１２ヶ月以内に疾患が進行していた場合、１つの治療を受けたとみなされた。

○標的療法に感受性のある突然変異を有する既知の癌遺伝子ドライバー（例えば、ＥＧＦＲ、ＡＬＫ、ＲＯＳ）を有する患者は、少なくとも１つの標的療法の後に進行したに違いない。

【１７１７】

４．患者は、ＴＩＬ治験薬産生のために、切除後に最少直径１．５ｃｍの切除可能な病変（または凝集病変）を少なくとも１つ有していた。外科的切除が患者に追加のリスクをもたらさない限り、腫瘍組織を、複数の多様な転移性病変から得ることが奨励された。

○ＴＩＬ生成のために切除が検討されている病変が、以前に照射された領域内にある場合、その病変は、切除前にＸ線写真で進行を示している必要がある。

○患者は、プロトコルが必要とする検査に適正な組織病理標本を有していなければなら

ない。

【１７１８】

５．患者は、ＴＩＬ製造の腫瘍切除の後に、標準かつ周知のＲＥＣＩＳＴ １．１ガイドラインによって定義されているように、残留する測定可能な疾患を有していた（例えば、Ｅｉｓｅｎｈａｕｅｒ，Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ ４５：２２８－２４７（２００９）を参照、ｗｗｗ．ｐｒｏｊｅｃｔ．ｅｏｒｔｃ．ｏｒｇ／ｒｅｃｉｓｔ／ｗｐ－ｃｏｎｔｅｎｔ／ｕｐｌｏａｄｓ／ｓｉｔｅｓ／４／２０１５／０３／ＲＥＣＩＳＴＧｕｉｄｅｌｉｎｅｓ．ｐｄｆでも入手可能）。

○以前に照射された領域内の病変は、それらの病変で疾患の進行が示されていない限り、標的病変として選択されなかった。

○ＲＥＣＩＳＴごとに依然として測定可能なＴＩＬ生成のために部分的に切除された病変を、非標的病変として選択することができるが、応答評価の標的病変としては機能することができなかった。

【１７１９】

６．患者は、同意時に１８歳以上であった。

【１７２０】

７．患者の米国東海岸癌臨床試験グループ（Ｅａｓｔｅｒｎ Ｃｏｏｐｅｒａｔｉｖｅ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ Ｇｒｏｕｐ、ＥＣＯＧ）のパフォーマンスステータスは０または１であり、推定平均余命は３ヶ月以上であった。

【１７２１】

８．出産の可能性のある患者または出産の可能性のあるパートナーを持つ患者は、治療中に非常に効果的な承認された避妊方法を実践する意志があり、すべてのプロトコル関連療法を受けた後１２ヶ月間継続する必要があった（注記：生殖能力のある女性は、治療中、およびＩＬ－２の最後の用量後１２ヶ月間またはペムブロリズマブの最後の用量後４ヶ月のいずれか遅い方で、効果的な避妊を使用することとした。男性は、研究中または治療中止後１２ヶ月のいずれか遅い方で、精子を提供することができなかった。

【１７２２】

９．患者は、以下の血液学的パラメーターを有していた：

○絶対好中球数（ＡＮＣ）≧１０００／ｍｍ３、

○ヘモグロビン≧９．０ｇ／ｄＬ、

○血小板数≧１００，０００／ｍｍ３。

【１７２３】

１０．患者は、適正な臓器機能を有していた：

○血清アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）／血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ（ＳＧＰＴ）およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）／ＳＧＯＴが、正常上限（ＵＬＮ）の３倍以下、肝転移がＵＬＮの５倍以下の患者。

○スクリーニング時にコッククロフト・ゴールト式を使用して推定されたクレアチニンクリアランス≧４０ｍＬ／分。

○総ビリルビン≦２ｍｇ／ｄＬ。

○ジルベール症候群の患者は、総ビリルビン≦３ｍｇ／ｄＬでなければならない。

【１７２４】

１１．患者は、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ１およびＨＩＶ２）に対して血清陰性であった。Ｂ型肝炎ウイルス表面抗原（ＨＢｓＡｇ）、Ｂ型肝炎コア抗体（抗ＨＢｃ）、または急性もしくは慢性感染を示すＣ型肝炎ウイルス（抗ＨＣＶ）の血清学が陽性の患者は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）に基づくウイルス量および特定のウイルス曝露の局所有病率に応じて登録した。

【１７２５】

１２．患者は、最初の試験治療（すなわち、ＮＭＡ－ＬＤまたはペムブロリズマブの開始）の前に、以下に詳述されるように、最小期間の以前の抗癌療法（複数可）からのウォッシュアウト期間を有していた。

○標的療法：ウォッシュアウトが治療の開始の最低１４日前であれば、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）、ＭＥＫ、ＢＲＡＦ、ＡＬＫ、ＲＯＳ１または他の標的薬剤（例えば、エルロチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、オシメルチニブ、クリゾチニブ、セリチニブ、ロラチニブ）による以前の標的療法が許可された。

○化学療法：ウォッシュアウトが治療開始の最低２１日前であれば、アジュバント、ネオアジュバント、または根治的化学療法／化学放射線療法が許可された。

○コホート３Ｂのみの免疫療法、抗ＰＤ－１、他のｍＡｂ、またはワクチンによる以前のチェックポイント標的療法は、ＮＭＡ－ＬＤの開始前２１日以上のウォッシュアウト期間で許可された。

○緩和的放射線療法：脱毛症、皮膚色素沈着の変化、または他の臨床的に重要でない事象、例えば小領域放射線皮膚炎または直腸もしくは尿意切迫感を除いて、すべての放射線関連毒性がグレード１またはベースラインに解決された場合、以前の外部ビーム放射線療法が許可された

○ＲＥＣＩＳＴ１．１を介して応答のターゲットとして評価されている腫瘍病変（複数可）は、放射線ポータルの外側にあったが、ポータル内の場合は、進行が実証されていなければならない（上記の包含基準を参照）。

○手術／事前に計画された手順：創傷治癒が起こり、すべての合併症が解消され、腫瘍切除の前に少なくとも１４日が経過している場合（主要な手術手順の場合）、以前の外科的手順（複数可）が許可された。

【１７２６】

１３．患者は、コホートの割り当て前に、脱毛症または白斑を除いて、以前のすべての抗癌治療関連有害事象（ＴＲＡＥ）からグレード１以下（有害事象の一般用語基準［ＣＴＣＡＥ］による）に回復していた。

【１７２７】

１４．以前の抗癌療法から安定したグレード２以上の毒性を有する患者は、医療モニターと相談した後、ケースバイケースで検討された。

【１７２８】

１５．ペムブロリズマブによる治療によって悪化すると合理的に予想されない不可逆的毒性を有するコホート１Ａ、２Ａ、および３Ａの患者は、医療モニターとの協議後にのみ含まれた。コホート３Ｂの患者のみ、免疫チェックポイント阻害剤ＣＰＩ（複数可）による以前の治療の結果として、グレード２以上の下痢または大腸炎が記録されている患者は、少なくとも６ヶ月間無症候性であったか、または治療後腫瘍切除前の目視評価による結腸内視鏡検査で正常でなければならない。

【１７２９】

１６．患者は、保護された健康情報の使用および開示について、書面による承認を提供していなければならない。

【１７３０】

除外基準

以下の基準のうちのいずれかを満たす患者は、研究から除外した。

【１７３１】

１．ブドウ膜／眼起源の黒色腫を有する患者

【１７３２】

２．過去２０年以内に非骨髄破壊的または骨髄破壊的化学療法レジメンを含む、臓器同種移植または以前の細胞移植療法を受けていた患者。（注記：この基準は、以前のＴＩＬ治療で以前のＮＭＡ－ＬＤレジメンがあったことを除いて、ＴＩＬによる再治療を受けている患者に適用可能であった。）

【１７３３】

３．症候性および／または未治療の脳転移を有する患者。

○・脳転移が根治的に治療された患者は、治療開始前に患者が２週間以上にわたって臨床的に安定し、治療後の磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）による新たな脳病変がなく、患者が継

続的なコルチコステロイド治療を必要としない場合、メディカルモニターと話し合った後に登録が検討される。

【１７３４】

４．登録から２１日以内に全身ステロイド療法を受けている患者。

【１７３５】

５．妊娠中または授乳中の患者。

【１７３６】

６．治験責任医師の意見では、研究参加のリスクが高い、活動性の医学的疾患（複数可）、例えば全身性感染症（例えば、梅毒もしくは抗生物質を必要とする他の感染症）、凝固障害、または心臓血管系、呼吸器系、もしくは免疫系の他の活動性の主要な医学的疾患を有していた患者。

【１７３７】

７．患者は、活動性または以前に記録された自己免疫または炎症性障害（肺炎、炎症性腸疾患［例えば、大腸炎もしくはクローン病］、憩室炎［憩室症を除く］、全身性紅斑性狼瘡、サルコイドーシス症候群、またはウェゲナー症候群［多発血管炎を伴う肉芽腫症、グレイブス病、関節リウマチ、下垂体炎、ブドウ膜炎等］）を有しない場合がある。以下は、この基準の例外であった。

○白斑または脱毛症を有する患者。

○甲状腺機能低下症（例えば、橋本症候群に続く）が安定している患者

○ホルモン補充療法。

○全身療法を必要としない任意の慢性皮膚疾患。

○食事療法だけで制御されるセリアック病の患者。

【１７３８】

８．治療開始前２８日以内に生ワクチン接種または弱毒化ワクチン接種を受けていた患者。

【１７３９】

９．何らかの形態の原発性免疫不全症（重症複合免疫不全症［ＳＣＩＤ］および後天性免疫不全症候群［ＡＩＤＳ］など）を有していた患者。

【１７４０】

１０．治験薬のいずれかの成分に対する過敏症の病歴を有する患者。ＴＩＬは、以下のうちのいずれかを含むがこれらに限定されない、ＴＩＬ製品製剤のいずれかの成分に対する既知の過敏症を有する患者には投与されなかった。

○・ＮＭＡ－ＬＤ（シクロホスファミド、メスナ、およびフルダラビン）

○・Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ（登録商標）、アルデスロイキン、ＩＬ－２

○・アミノグリコシド系抗生物質（すなわち、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン［ゲンタマイシン過敏症の皮膚検査陰性者を除く］）

○・ジメチルスルホキシドを含むＴＩＬ製品製剤の任意の成分

○［ＤＭＳＯ］、ＨＳＡ、ＩＬ－２、およびデキストラン－４０

○・ペムブロリズマブ

【１７４１】

１１．左心室駆出率（ＬＶＥＦ）が４５％未満の患者、またはニューヨーク心臓協会クラスＩＩ以上の患者。６０歳以上の患者、あるいは虚血性心疾患、胸痛、または臨床的に重大な心房性および／もしくは心室性不整脈の病歴のある患者において、不可逆的な壁運動異常を示す心臓ストレス試験。

○スポンサーのメディカルモニターの承認を得て、駆出率および心臓病クリアランスが十分であれば、心臓ストレス試験に異常がある患者を登録することができた。

【１７４２】

１２．閉塞性または拘束性肺疾患があり、予測正常値の６０％以下のＦＥＶ１（１秒の強制呼気量）が記録されている患者。

○・患者が上気道の解剖学的構造の異常（すなわち、気管切開）のために信頼できる肺

活量測定を行うことができなかった場合は、６分間の歩行試験を使用して呼吸機能を評価した。年齢および性別に対して予測される少なくとも８０％の距離を歩くことができなかった患者、または試験中の任意の時点で低酸素症の証拠を示した患者（ＳｐＯ２＜９０％）は除外される。

【１７４３】

１３．過去３年以内に別の原発性悪性腫瘍があった患者（治療を必要としなかった、または１年以上前に治癒的に治療された患者を除き、治験責任医師の判断では、非黒色腫皮膚癌、ＤＣＩＳ、ＬＣＩＳ、前立腺癌グリーソンスコア≦６または膀胱癌を含むが、これらに限定されない重大な再発リスクをもたらさなかった）。

【１７４４】

１４．治療開始から２１日以内に治験薬を用いた別の臨床試験への参加。

【１７４５】

研究エンドポイントおよび計画された分析

一次エンドポイントおよび二次エンドポイントは、コホートによって別々に分析した。

【１７４６】

一次エンドポイント：

ＯＲＲは、有効性分析セットの中でＲＥＣＩＳＴ１．１に従って治験責任医師が評価した最良の応答として確認されたＰＲまたはＣＲのいずれかを達成した患者の割合として定義された。

【１７４７】

客観的反応を各疾患評価ごとに評価し、ＯＲＲは、対応する両側９０％　ＣＩを用いて二項比率として表された。各コホートの一次分析は、評価期間の早期に進行／期限切れまたは中止されない限り、コホートごとに治療を受けたすべての患者が１２ヶ月間追跡される機会があるときに行った。

【１７４８】

安全性一次エンドポイントは、各コホート内のグレード３以上のＴＥＡＥ発生率によって測定され、対応する両側９０％　ＣＩの二項比率として表された。

【１７４９】

二次エンドポイント：

有効性：

二次有効性エンドポイントは、次のように定義された。

治験責任医師によって評価された確認済みＣＲを達成した応答者に基づくＣＲ率。ＤＣＲは、確認されたＰＲ／ＣＲまたは持続的なＳＤ（少なくとも６週間）を達成した患者数の合計を、有効性分析セットの患者数で割り、１００％を掛けたものとして導き出された。ＣＲ率およびＤＣＲは、点推定およびその両側９０％　ＣＩを使用して要約した。

【１７５０】

ＤＯＲは、客観的な応答を達成した患者の間で定義された。再発性もしくは進行性疾患が客観的に記録された最初の日付、またはその後の抗癌療法の受容もしくは患者の死亡（最初に記録された方）まで、初回応答（ＰＲ／ＣＲ）基準が満たされていることから測定した。ＰＤを経験していない、またはデータカットもしくは最終データベースロックの時点より前に死亡していない患者は、腫瘍状態の適切な評価が行われた最終日に事象時間が打ち切られる。

【１７５１】

ＰＦＳは、リンパ球枯渇からＰＤまでの時間（月単位）、または何らかの原因による死亡のいずれか早い方の事象として定義された。ＰＤを経験していない、またはデータカットもしくは最終データベースロックの時点で死亡していない患者は、腫瘍状態の適切な評価が行われた最終日に事象時間が打ち切られた。

【１７５２】

ＯＳは、リンパ球枯渇の時点から何らかの原因による死亡までの時間（月単位）として定義された。データカットまたは最終的なデータベースロックの時点までに死亡していな

い患者は、既知の生存状態の最終日に事象時間が打ち切られた。

【１７５３】

ＤＯＲ、ＰＦＳ、およびＯＳは、右側打ち切りを受けた。カプラン・マイヤー法を使用して、事象までの時間の有効性エンドポイントを要約する。腫瘍評価のベースラインデータは、すべてのコホートのリンパ球枯渇前の最後の走査であった。

【１７５４】

上記の有効性パラメーターは、ベースラインの疾患特徴：ＢＲＡＦステータス（コホート１Ａのみ）、ＨＰＶステータス（コホート２Ａのみ）、扁平上皮または非扁平上皮肺疾患（コホート３Ａおよび３Ｂのみ）、ならびに抗ＰＤ－Ｌ１ステータスによって定義されたサブセットに適用可能なコホートについて推定される。

【１７５５】

実施例１１：０日目のＧＥＮ３拡張プラットフォームの例示的な実施形態

腫瘍洗浄培地を調製した。開始前に培地を温めた。５ｍＬのゲンタマイシン（５０ｍｇ／ｍＬ）を５００ｍＬボトルのＨＢＳＳに添加した。５ｍＬの腫瘍洗浄培地を、ＯＫＴ３希釈に使用される１５ｍＬ円錐管に添加した。室温（ＲＴ）で保管する

【１７５６】

フィーダー細胞バッグを調製した。フィーダー細胞をフィーダー細胞バッグに無菌で移し、使用または凍結させるまで３７℃で保存した。３７℃の場合、フィーダー細胞をカウントした。凍結させた場合、解凍した後にフィーダー細胞をカウントした。

【１７５７】

フィーダー細胞濃度についての最適範囲は、5×10^{4}～5×10^{6}細胞／ｍＬである。４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖを含む４本の円錐管を調製した。各細胞数に０．５ｍＬの細胞画分を添加した。

【１７５８】

生フィーダー細胞の総数が1×10^{9}細胞以上である場合、次のステップに進んでフィーダー細胞濃度を調整した。1×10^{9}細胞を第２のフィーダー細胞バッグに添加するために、フィーダー細胞の量を計算して、第１のフィーダー細胞バッグから取り出した。

【１７５９】

ｐ１０００マイクロピペットを使用して、９００μＬの腫瘍洗浄培地をＯＫＴ３アリコート（１００μＬ）に移した。注射器および無菌技法を使用して、０．６ｍＬのＯＫＴ３を吸引し、第２のフィーダー細胞バッグに添加した。培地量を合計量２Ｌに調整した。第２のフィーダー細胞バッグをインキュベーターに移した。

【１７６０】

ＯＫＴ３製剤の詳細：ＯＫＴ３を等分し、１００ｕＬのアリコートでバイアル（１ｍｇ／ｍＬ）から元のストック濃度で凍結させることができる。１ｍＬバイアルあたり約１０Ｘアリコート。－８０℃で保存した。０日目：１５ｕｇ／フラスコ、すなわち５００ｍＬ中３０ｎｇ／ｍＬ－最大６０ｕＬ約１アリコート。

【１７６１】

腫瘍試料を調製した。６ウェルプレートおよび１００ｍｍペトリ皿（合計４枚）を入手した。６ウェルプレートに「過剰腫瘍片」というラベルを付けた。４つの１００ｍｍペトリ皿の各々に「洗浄＿０１」、「洗浄＿０２」、「洗浄＿０３」、「洗浄＿０４」、および「保持」というラベルを付けた。

【１７６２】

５ｍＬの腫瘍洗浄培地を、過剰腫瘍片というラベルの付いた６ウェルプレートのすべてのウェルに添加した。解剖中に腫瘍を水和状態に保持する際にさらに使用するために、腫瘍洗浄培地を入手可能にした。

【１７６３】

５０ｍＬの腫瘍洗浄培地を、洗浄＿０１、洗浄＿０２、洗浄＿０３、および保持というラベルの付いた各１００ｍｍペトリ皿に添加した。マーカーを使用して、各ペトリ皿に解剖１～解剖４のラベルを付ける。腫瘍を洗浄＿０１で３分間以上、周囲温度でインキュベ

ートした。腫瘍を洗浄＿０２で３分間以上、周囲温度でインキュベートした。腫瘍を洗浄＿０３で３分間以上、周囲温度でインキュベートした。洗浄が完了した後、腫瘍を「保持」皿に移して、組織が水和したままであることを確認する。

【１７６４】

腫瘍の培養が進行中である間、１０ｍＬの腫瘍出荷培地を腫瘍出荷培地とラベル付けされた管に移した。１０ｍＬの腫瘍出荷培地を注射器に引き込み、嫌気性および好気性の各無菌ボトルに５ｍＬの腫瘍出荷培地を接種した。

【１７６５】

解剖プロセス全体を通して、ペトリ皿のキャップの下に定規を置いた。腫瘍の長さおよび断片の数を測定して記録した。腫瘍を４つの中間片に解剖するか、または同等の体積の４つのグループにグループ化し、各中間片の腫瘍構造を保存する。腫瘍片を水和させておく。

【１７６６】

組織を水和状態で保つために、活発に解剖されていない中間腫瘍片を保持皿に移した。

【１７６７】

解剖皿のキャップの下にある定規を参照として使用して、腫瘍を２７ｍｍ^{3}断片（３×３×３ｍｍ）に解剖した。６０断片に達するまで中間断片を解剖した。生成された最終断片の数に応じて、最終断片の総数をカウントし、Ｇ－Ｒｅｘ　１００ＭＣＳフラスコを調製した（一般に、フラスコあたり６０断片）。

【１７６８】

断片管１～断片管４としてラベル付けされた円錐管に良好な組織断片を保持した。管が起源とする断片の数に応じて、フィーダー細胞懸濁液を播種するＧ－Ｒｅｘ　１００ＭＣＳフラスコの数を計算した。

【１７６９】

インキュベーターからフィーダー細胞バッグを取り出し、Ｇ－Ｒｅｘ　１００ＭＣＳを播種する。Ｄ０（０日目）としてラベルを付ける。

【１７７０】

Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳでの腫瘍断片添加培養

無菌条件下で、腫瘍断片培養（Ｄ０）１というラベルが付いたＧ－Ｒｅｘ　１００ＭＣＳおよび断片管というラベルが付いた５０ｍＬの円錐管のキャップを緩めた。開いた断片管１を回転させ、同時にＧ－Ｒｅｘ　１００ＭＣＳのキャップをわずかに持ち上げた。断片を含む培地を、Ｇ－Ｒｅｘ　１００ＭＣＳに回転させながら添加した。Ｇ－Ｒｅｘ　１００ＭＣＳに転送された断片の数を記録した。

【１７７１】

断片がＧＲＥＸフラスコの底に配置されると、７ｍＬの培地を吸引し、７つの１ｍＬアリコートを作成した（拡張された特徴付け用に５ｍＬ、無菌試料用に２ｍＬ）。拡張された特徴付け用の５つのアリコート（最終断片培養上清）を、必要になるまで－２０℃で保存した。

【１７７２】

１本の嫌気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトルおよび１本の好気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトルに各々１ｍＬの最終断片培養上清を接種した。サンプリングしたフラスコごとに繰り返す。

【１７７３】

実施例１２：７～８日目のＥ　ＧＥＮ３拡張プラットフォームの例示的な実施形態

フィーダー細胞バッグを調製した。凍結時に３７℃の水浴中で３～５分間フィーダーバッグを解凍した。凍結されている場合はフィーダー細胞をカウントした。

【１７７４】

フィーダー細胞濃度についての最適範囲は、５×１０^4～５×１０^{6}細胞／ｍＬである。４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖを含む４本の円錐管を調製した。各細胞数に０．５ｍＬの細胞画分を、新しいクライオバイアル管に添加した。試料をよく混合し、細胞数をカウントし

た。

【１７７５】

生フィーダー細胞の総数が２×１０^{9}細胞以上である場合、次のステップに進んでフィーダー細胞濃度を調整した。２×１０^{9}細胞を第２のフィーダー細胞バッグに添加するために、フィーダー細胞の量を計算して、第１のフィーダー細胞バッグから取り出した。

【１７７６】

ｐ１０００マイクロピペットを使用して、９００μＬのＨＢＳＳを１００μＬのＯＫＴ３アリコートに移す。上下に３回ピペッティングして混合する。２つのアリコートを調製した。

【１７７７】

ＯＫＴ３製剤の詳細：ＯＫＴ３を等分し、１００ｕＬのアリコートでバイアル（１ｍｇ／ｍＬ）から元のストック濃度で凍結させることができる。１ｍＬバイアルあたり約１０Ｘアリコート。－８０℃で保存した。７／８日目：３０ｕｇ／フラスコ、すなわち５００ｍＬ中６０ｎｇ／ｍＬ－最大１２０ｕＬ約２アリコート。

【１７７８】

注射器および無菌技法を使用して、０．６ｍＬのＯＫＴ３を吸引し、フィーダー細胞バッグに添加して、すべてが添加されたことを確認する。培地量を合計量２Ｌに調整した。第２のＯＫＴ３アリコートで繰り返し、フィーダー細胞バッグに添加した。第２のフィーダー細胞バッグをインキュベーターに移した。

【１７７９】

フィーダー細胞懸濁液を含むＧ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳフラスコを調製する

０日目に生成されたＧ－Ｒｅｘフラスコの数に従って処理するＧ－Ｒｅｘ　１００ＭＣＳフラスコの数を記録した。インキュベーターからＧ－Ｒｅｘフラスコを取り外し、第２のフィーダー細胞バッグをインキュベーターから取り出した。

【１７８０】

フィーダー細胞懸濁液を添加する前の上清の除去：

１本の１０ｍＬ注射器をＧ－Ｒｅｘ　１００フラスコに接続し、５ｍＬの培地を吸引した。５つの１ｍＬアリコート（拡張された特徴付け用に５ｍＬ）を作成し、スポンサーからの要求があるまで、拡張された特徴付け用に５つのアリコート（最終断片培養上清）を－２０℃で保存した。各Ｇ－Ｒｅｘ　１００フラスコにラベルを付けて繰り返した。

【１７８１】

フラスコの数に応じた、特徴付け用の５～２０×１ｍＬ試料：

- ５ｍＬ＝１フラスコ
- １０ｍＬ＝２フラスコ
- １５ｍＬ＝３フラスコ
- ２０ｍＬ＝４フラスコ

【１７８２】

フィーダー細胞をＧ－Ｒｅｘ　１００ＭＣＳに播種し続け、Ｇ－Ｒｅｘ　１００ＭＣＳフラスコごとに繰り返した。無菌移送法を使用して、各Ｇ－Ｒｅｘ　１００ＭＣＳフラスコに重量で５００ｍＬの第２のフィーダー細胞バッグを重力移送し（１ｇ＝１ｍＬと想定）、量を記録した。７日目の培養としてラベルを付け、Ｇ－Ｒｅｘ　１００フラスコごとに繰り返した。Ｇ－Ｒｅｘ　１００ＭＣＳフラスコをインキュベーターに移した。

【１７８３】

実施例１３：１０～１１日目のＧＥＮ３拡張プラットフォームの例示的な実施形態

第１のＧ－Ｒｅｘ　１００ＭＣＳフラスコを取り外し、無菌条件を使用して、１０ｍＬ注射器を使用して７ｍＬの前処理培養上清を除去した。７つの１ｍＬアリコートを作成した（拡張された特徴付け用に５ｍＬ、無菌試料用に２ｍＬ）。

【１７８４】

フラスコを注意深く混合し、新しい１０ｍＬ注射器を使用して１０ｍＬの上清を取り出し、Ｄ１０／１１マイコプラズマ上清というラベルの付いた１５ｍＬ管に移す。

【１７８５】
　フラスコを注意深く混合し、新しい注射器を使用して、処理されるフラスコの数に応じて以下の量を除去した。
　●１フラスコ＝４０ｍＬ
　●２フラスコ＝２０ｍＬ／フラスコ
　●３フラスコ＝１３．３ｍＬ／フラスコ
　●４フラスコ＝１０ｍＬ／フラスコ
【１７８６】
　合計４０ｍＬをすべてのフラスコから取り出し、「１０／１１日目　ＱＣ試料」というラベルの付いた５０ｍＬ円錐管にプールし、必要になるまでインキュベーターに保管する必要がある。細胞カウントを行い、細胞を割り当てた。
【１７８７】
　必要になるまで－２０℃以下での拡張された特徴付けのために５つのアリコート（前処理培養上清）を保存した。１本の嫌気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトルと１本の好気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトルに各々１ｍＬの前処理培養上清を接種した。
【１７８８】
　細胞懸濁液をＧ－Ｒｅｘ　５００ＭＣＳに移し、Ｇ－Ｒｅｘ　１００ＭＣＳごとに繰り返した。無菌状態を使用して、各Ｇ－Ｒｅｘ　１００ＭＣＳの内容物をＧ－Ｒｅｘ　５００ＭＣＳに移し、一度に約１００ｍＬの液体移送を監視した。Ｇ－Ｒｅｘ　１００ＭＣＳの容量が５００ｍＬに低減したとき、移送を停止した。
【１７８９】
　移送ステップ中に、１０ｍＬ注射器を使用し、Ｇ－Ｒｅｘ　１００ＭＣＳから注射器に１０ｍＬの細胞懸濁液を吸引した。培養中のフラスコの数に従って指示に従った。フラスコが１つしかない場合：２つの注射器を使用して合計２０ｍＬを取り出した。２フラスコの場合：フラスコあたり１０ｍＬを取り出した。３フラスコの場合：フラスコあたり７ｍＬを取り出した。４フラスコの場合：フラスコあたり５ｍＬを取り出した。細胞懸濁液を１本の一般的な５０ｍＬ円錐管に移した。細胞カウントステップおよびＱＣ試料までインキュベーターに保管する。ＱＣに必要な細胞の総数は、約２０ｅ６細胞であった：４×０．５ｍＬ細胞数（細胞数は最初に未希釈であった）。
【１７９０】
　アッセイに必要な細胞：
　●ＩＦＮ－Ｇアッセイの場合、最小１０ｅ６細胞
　●マイコプラズマの場合、１ｅ６細胞
　●５ｅ６細胞フローＣＤ３＋／ＣＤ４５＋
【１７９１】
　Ｇ－Ｒｅｘ　５００ＭＣＳフラスコをインキュベーターに移した。
【１７９２】
ＱＣ試料を調製した
　少なくとも１５×１０^{8}個を必要とした。アッセイは、細胞数および生存率、マイコプラズマ（１×１０^{6}細胞／平均生存濃度）、フロー（５×１０^{6}細胞／平均生存濃度）、およびＩＦＮ－ｇアッセイ（５×１０^{6}細胞～１×１０^{6}細胞を含み、８～１０×１０^{6}細胞が、ＩＦＮ－γアッセイに必要である。
【１７９３】
　１０×１０^{6}細胞／ｍＬで凍結保存のための細胞画分の量を計算し、調製するバイアルの数を計算した。
【１７９４】
実施例１４：１６～１７日目のＧＥＮ３拡張プラットフォームの例示的な実施形態
洗浄バッファーの調製（１％　ＨＡＳ　ＰＬＡＳＭＡＬＹＴＥ　Ａ）
　ＨＡＳおよびＰＬａｓｍａｌｙｔｅを５Ｌバッグに移し、ＬＯＶＯ洗浄バッファーを作成した。滅菌条件を使用して、総量１２５ｍＬの２５％　ＨＳＡを５Ｌ袋に移した。室温

で保存した。

【１７９５】

１０ｍＬまたは４０ｍＬの洗浄バッファーを取り出して、「ＩＬ－２　６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ」管に移した（ＩＬ－２を事前に調製した場合は１０ｍＬ、ＩＬ－２を新たに調製した場合は４０ｍＬ）。

【１７９６】

Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅ＋１％　ＨＳＡに添加する再構成ＩＬ－２の量を計算した：再構成ＩＬ－２の量＝（ＩＬ－２の最終濃度×最終量）／ＩＬ－２の比活性（標準アッセイに基づく）。ＩＬ－２の最終濃度は、６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬであった。最終量は、４０ｍＬであった。

【１７９７】

再構成されたＩＬ－２の必要なＩＬ－２の計算された初期量を取り出し、「ＩＬ－２　６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ」管に移す。事前に調製されたアリコートから１００μＬのＩＬ－２　６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬを、１０ｍＬのＬＯＶＯ洗浄バッファーを含有する「ＩＬ－２　６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ」とラベル付けされた管に添加した。

【１７９８】

Ｇ－Ｒｅｘ　５００ＭＣＳフラスコから約４５００ｍＬの上清を取り出した。残りの上清を回転させ、細胞を細胞収集プールバッグに移した。すべてのＧ－Ｒｅｘ　５００ＭＣＳフラスコで繰り返した。

【１７９９】

６０ｍＬの上清を除去し、マイコプラズマ検出を含む品質制御アッセイのために上清管に添加する。＋２～８℃で保存した。

【１８００】

細胞収集

細胞をカウントした。４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖを含む４つの１５ｍＬ円錐管を調製した。これらは事前に調製することができる。最適な範囲は、５×１０^{4}および５×１０^{6}細胞／ｍＬの間である。（１：１０希釈が推奨された）。１：１０希釈の場合、あらかじめ調製した４５００μＬのＡＩＭ－Ｖに、５００μＬのＣＦを添加する。希釈因子を記録した。

【１８０１】

ＴＣ（総細胞）ＬＯＶＯ前（生＋死）を計算した＝

平均総細胞
濃度（ＴＣ濃度ＬＯＶＯ前）
（生＋死）
Ｘ
ソースバッグの容量

【１８０２】

ＴＶＣ（総生細胞）ＬＯＶＯ前（生）を計算した＝

平均総生細胞
濃度（ＴＶＣ　ＬＯＶＯ前）
（生）
Ｘ
ＬＯＶＯソースバッグの容量

【１８０３】

全細胞（ＴＣ）の数が５×１０^{9}超であった場合、５×１０^{8}細胞を取り出して、ＭＤＡ保持試料として凍結保存する。５×１０^{8}÷平均ＴＣ濃度（ステップ１４．４４）＝取り出す量

【１８０４】

全細胞（ＴＣ）の数が５×１０^{9}以下であった場合、４×１０^{6}細胞を取り出して、ＭＤＡ保持試料として凍結保存する。４×１０^{6}÷平均ＴＣ濃度＝取り出す量。

【１８０５】
適切なサイズの注射器を使用して、ＬＯＶＯソースバッグから必要な量を取り出した。凍結保存ステップまでインキュベーターに保持した。
【１８０６】
総細胞数を決定した場合、取り出す細胞の数は、１５０×１０^{9}生細胞の保持を可能にする必要がある。ＴＶＣ　ＬＯＶＯ前、５×１０^{8}または４×１０^{6}または該当なしを確認する。取り出す細胞の量を計算した。
【１８０７】
バッグに残っている残りの総細胞を計算した。ＴＣ（総細胞）ＬＯＶＯ前を計算した。
［平均総細胞濃度Ｘ残量＝ＴＣ　ＬＯＶＯ前残量］
【１８０８】
残りの細胞の総数に応じて、以下の表で対応するプロセスを選択した。
【表５４】

総細胞:	保持液(mL)
$0<$総細胞$\leqq 31\times10^{9}$	115
$31\times10^{9}<$総細胞$\leqq 71\times10^{9}$	165
$71\times10^{9}<$総細胞$\leqq 110\times10^{9}$	215
$110\times10^{9}<$総細胞$\leqq 115\times10^{9}$	265

【１８０９】
使用されるプロセスに対応して添加するＩＬ－２の量を選択する。次のように量を計算した：保持液の量×３００ＩＵ／ｍＬ＝必要なＩＬ－２のＩＵ。必要なＩＬ－２のＩＵ／６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ＝ＬＯＶＯ後バッグに添加するＩＬ－２の量。添加されたすべての量を記録した。さらなる分析のためにクライオバイアルで試料を取得した。
【１８１０】
細胞産物をよく混合した。該当する場合は凍結保存を含めたさらなる処理のためにすべてのバッグを密封した。
【１８１１】
得られたクライオバイアル試料に対して、必要に応じてエノドキソトン、ＩＦＮ－γ、無菌、および他のアッセイを行った。
【１８１２】
実施例１５：例示的なＧＥＮ３プロセス（ＧＥＮ３．１とも称される）
目的
この実施例では、「ＴＩＬ拡張のためのＧｅｎ２プロセスとＧｅｎ３プロセスとの間の比較可能性」に関するさらなる研究について説明する。Ｇｅｎ３プロセスは、表現型および機能プロファイルを以前に見られたように維持しながら、最終的な総生細胞（ＴＶＣ）出力をＧｅｎ２と同等（またはそれ以上）に増やすことを目的として、プロセスの初期に活性化ステップを含むように修正した。
【１８１３】
範囲
０日目に培養腫瘍断片に活性化ステップを導入することによりＴＶＣ出力を評価した。
【１８１４】
２つの独立した患者の腫瘍全体で、Ｇｅｎ３標準および対照アームとの機能的かつ拡張された表現型の特徴付けに関して比較可能性を実証した。
【１８１５】
処理パラメーターが生理学的条件で維持されたことを確認するために、培地消費および代謝産物産生を分析した。
【１８１６】

この実施例のすべての実行は、出発材料として市販のドナー腫瘍組織を使用して、本格的なプラットフォームで行った。

【１８１７】

情報

プロセスＧｅｎ３の実施形態は、さらなる実施形態として修正され、この実施例では本明細書においてＧｅｎ３．１と称される。

Ｇｅｎ３．１　ＴＩＬ製造コンセプトは、４つのオペレーター介入を有する。

１．腫瘍断片の単離および活性化：プロセスの０日目に腫瘍を解剖し、最終断片を各々約３×３mm（合計で最大２４０断片）を生成し、１～４つのＧ－Ｒｅｘ　１００ＭＣＳフラスコ内で培養した。各フラスコは、最大６０個の断片、６，０００ＩＵ　ｒｈＩＬ－２、１５μｇのＯＫＴ３、および２．５×１０^{8}個の照射された同種異系単核細胞で補足された５００ｍＬのＣＭ１またはＤＭ１培地を含んでいた。培養物を３７℃で６～８日間インキュベートした。

２．ＴＩＬ培養再活性化：７～８日目に、どちらの場合も６，０００ＩＵ　ｒｈＩＬ－２、３０μｇのＯＫＴ３、および５×１０^{8}個の照射された同種異系単核細胞で補足されたＣＭ２またはＤＭ１培地をゆっくり添加することによって、培養物を補足した。フラスコの底にある既存の細胞を乱さないように注意した。培養物を３７℃で３～４日間インキュベートした。

３．培養のスケールアップ：１０～１１日目に起こる。培養のスケールアップ中に、Ｇ－Ｒｅｘ　１００ＭＣＳの内容物全体を、どちらの場合も３，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補足された４ＬのＣＭ４またはＤＭ２を含むＧ－Ｒｅｘ　５００ＭＣＳフラスコに移した。フラスコを、採取まで３７℃で５～６日間インキュベートした。

４．採取／洗浄／配合：１６～１７日目に、フラスコを減容してプールする。細胞を濃縮し、１％　ＨＳＡを含有するＰｌａｓｍａＬｙｔｅ　Ａ　ｐＨ７．４で洗浄した。洗浄した細胞懸濁液を、ＣｒｙｏＳｔｏｒ１０と１：１の比で配合し、３００ＩＵ／ｍＬの最終濃度までｒｈＩＬ－２で補足した。

【１８１８】

ＤＰは、制御された速度の凍結で凍結保存され、気相液体窒素中に保存した。＊完全な標準ＴＩＬ培地１、２、または４（ＣＭ１、ＣＭ２、ＣＭ４）は、上記のように、合成培地（ＤＭ１またはＤＭ２）と称されるＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞無血清拡張培地の代用となり得た。プロセスの概要については、例えば、図７８および７９を参照されたい。

【１８１９】

プロセスの説明

０日目に、腫瘍を３回洗浄し、次いで３×３×３の最終断片に断片化した。腫瘍全体が断片化されると、最終的な断片を均等にランダム化し、３つのプールに分割した。１つのランダム化断片プールを各アームに導入し、３つの実験マトリックスごとに同じ数の断片を添加した。

【１８２０】

ＴＩＬ拡張プロセス全体で、腫瘍Ｌ４０６３拡張を標準培地を用いて行い、腫瘍Ｌ４０６４拡張を合成培地（ＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒ）を用いて行った。培地の構成要素を本明細書に記載する。

【１８２１】

ＣＭ１完全培地１：２ｍＭ　Ｇｌｕｔａｍａｘ、１０％ヒトＡＢ血清、ゲンタマイシン（５０ｕｇ／ｍＬ）、２－メルカプトエタノール（５５ｕＭ）で補足されたＲＰＭＩ＋グルタミン。６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補足された最終培地製剤

【１８２２】

ＣＭ２完全培地２：５０％　ＣＭ１培地＋５０％　ＡＩＭ－Ｖ培地。６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補足された最終培地製剤

【１８２３】

ＣＭ４完全培地４：Ｇｌｕｔａｍａｘ（２ｍＭ）で補足されたＡＩＭ－Ｖ。３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補足された最終培地製剤

【１８２４】

ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張サプリメント（２６ｍＬ／Ｌ）で補足されたＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒ　ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標Ｔ細胞拡張基礎培地

【１８２５】

ＤＭ１：ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張サプリメント（２６ｍＬ／Ｌ）、およびＣＴＳ（商標）免疫細胞ＳＲ（３％）、Ｇｌｕｔａｍａｘ（２ｍＭ）で補足されたＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張基礎培地。６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補足された最終製剤。

【１８２６】

ＤＭ２：ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張サプリメント（２６ｍＬ／Ｌ）、およびＣＴＳ（商標）免疫細胞ＳＲ（３％）、Ｇｌｕｔａｍａｘ（２ｍＭ）で補足されたＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張基礎培地。３，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補足された最終製剤。

【１８２７】

使用したすべてのタイプの培地、すなわち完全（ＣＭ）および定義（ＤＭ）培地を事前に調製し、使用前日まで４℃で保持し、処理日の前に事前に最長２４時間、インキュベーター内で３７℃で温めた。

【１８２８】

ＴＩＬ培養の再活性化は、両方の腫瘍で７日目に起こった。スケールアップは、Ｌ４０６３では１０日目、Ｌ４０６４では１１日目に起こった。両方の培養物を採取し、１６日目に凍結保存した。

【１８２９】

予想された結果

Ｇｅｎ３．１は、Ｇｅｎ３．０と比較して、１６～１７日目の採取時に高い総生細胞数に達する可能性がある。

【１８３０】

Ｇｅｎ３．１は、Ｇｅｎ３．０と比較して、再刺激後に同様のレベルのＩＦＮγを産生する可能性がある。

【１８３１】

Ｇｅｎ３．１およびＧｅｎ３．０は、最終ＴＩＬ産物中に存在する固有のＣＤＲ３配列の合計によって測定される、同様のクローン多様性を有する可能性がある。

【１８３２】

Ｇｅｎ３．１プロセスの表現型の特徴付けは、Ｇｅｎ３．０と同様である可能性がある。

【１８３３】

達成された結果

Ｇｅｎ３．０およびＧｅｎ３．１プロセスの細胞数および生存率％を測定した。すべての条件での拡張は、この実施例で説明されている詳細に従った。

【１８３４】

総生細胞数および倍率拡張

各腫瘍について、断片を同数の３つのプールに分割した。腫瘍のサイズが小さいため、フラスコあたりの断片の最大数は達成されなかった。３つの異なるプロセスについて、各条件で総生細胞および細胞生存率を評価した。細胞数は、再活性化のための７日目のＴＶＣ、スケールアップのための１０日目（Ｌ４０６４）または１１日目（Ｌ４０６３）のＴＶＣ、および１６／１７日目の採取時のＴＶＣとして決定された。

【１８３５】

７日目および１０／１１日目の細胞数をＦＩＯで測定した。倍率拡張は、１６／１７日目採取時のＴＶＣを７日目の再活性化日ＴＶＣで割ることによって計算した。３つのアー

ムを比較するために、採取日のＴＶＣを、０日目の培養で添加された断片の数で割って、断片あたりの生細胞の平均を計算した。

【１８３６】

Ｌ４０６３およびＬ４０６４について、細胞数および生存率アッセイを行った。図８９に示されるように、Ｇｅｎ３．１－試験プロセスは、両方の腫瘍でＧｅｎ３．０プロセスよりも多くの断片あたりの細胞数を産生した。

【１８３７】

図９０：総生細胞数および倍率拡張

【１８３８】

プロセス中の生存率％

再活性化時に、スケールアップして採取し、すべての条件で生存率％を行った。１６／１７日目の採取日に、最終ＴＶＣを生存率％の放出基準と比較した。図８２に示されるように、評価されたすべての条件は、７０％の生存率基準を超え、プロセスおよび腫瘍全体で同等であった。

【１８３９】

免疫表現解析

ＴＩＬ最終産物の表現型の特徴付け。

【１８４０】

最終産物をフローサイトメトリー分析にかけ、純度、分化、およびメモリーマーカーを試験した。集団の割合は、すべての条件でＴＣＲα／β、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋細胞で一貫していた。

【１８４１】

ＲＥＰ　ＴＩＬの拡張表現型分析を行った。ＴＩＬ産物は、両方の腫瘍でＧｅｎ３．０と比較してＧｅｎ３．１条件でＣＤ４＋細胞のパーセンテージが高く、両方の条件でＧｅｎ３．１条件と比較してＧｅｎ３．０でＣＤ８＋集団からのＣＤ２８＋細胞のパーセンテージが高いことを示した。

【１８４２】

Ｇｅｎ３．０およびＧｅｎ３．１プロセスから採取されたＴＩＬは、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋細胞でのＣＤ２７およびＣＤ５６発現、ならびにＣＤ４＋ゲート細胞集団での同等のＣＤ２８発現と同等の表現型マーカーを示した。図８３は、Ｇｅｎ３．０およびＧｅｎ３．１プロセスの最終ＴＩＬ産物の表現型マーカーを示す。図８３：Ｌ４０６３およびＬ４０６４の最終ＴＩＬ産物の表現型の特徴付け。

【１８４３】

ＴＩＬ最終産物のメモリーマーカーの比較：

図８４は、マルチカラーフローサイトメトリーによって決定されたＴＩＬ最終産物のメモリーマーカーを示す。１６日目に採取されたＴＩＬの凍結試料は、分析のために染色された。ＴＩＬメモリのステータスは、Ｇｅｎ３．０プロセスとＧｅｎ３．１プロセスとの間で同等であった。図８４：Ｌ４０６３およびＬ４０６４のＴＩＬ産物のメモリーマーカー分析。

【１８４４】

ＴＩＬ最終産物の活性化マーカーと疲弊マーカーとの比較：

図８５および８６は、マルチカラーフローサイトメトリーによって決定されたＴＩＬ最終産物の活性化および疲弊を示す。活性化および疲弊マーカーは、ＣＤ４＋（図８５）およびＣＤ８＋（図８６）細胞上でゲートされたＧｅｎ３．０とＧｅｎ３．１プロセスとの間で同等であった。図８５：Ｌ４０６３およびＬ４０６４のＣＤ４＋細胞上でゲートされた活性化および疲弊マーカー。図８６：Ｌ４０６３およびＬ４０６４のＣＤ８＋細胞上でゲートされた活性化および疲弊マーカー。

【１８４５】

再刺激時のインターフェロンγ分泌：

採取されたＴＩＬは、Ｌ４０６３およびＬ４０６４のためのコーティングされた抗ＣＤ

３プレートで一晩再刺激を受けた。Ｇｅｎ３．０プロセスと比較して、分析された２つの腫瘍では、Ｇｅｎ３．１プロセスからのＩＦＮγのより高い産生が観察された。各条件でのＩＦＮγ産生を図８７に示す。図８７：プロセスＧｅｎ３．０およびＧｅｎ３．１での最終産物のＩＦＮ－γ産生（ｐｇ／ｍＬ）。

【１８４６】

培養培地中のＩＬ－２レベルの測定

すべての条件とプロセスとの間でＩＬ－２消費のレベルを比較するために、７日目の再活性化の開始時、１０日目（Ｌ４０６４）／１１日目（Ｌ４０６３）のスケールアップ時、および１６／１７日目の採取および凍結時に細胞上清を収集した。続いて、上清を解凍して分析した。細胞培養上清中のＩＬ－２の量を、製造元のプロトコルによって測定した。データを図８８に示す。

【１８４７】

全体的なＧｅｎ３およびＧｅｎ３．１プロセスは、同じ培地条件で評価された完全なプロセス中のＩＬ－２消費に関して同等であった。図８８：Ｌ４０６３およびＬ４０６４用に収集された使用済み培地のＩＬ－２濃度（ｐｇ／ｍＬ）分析。

【１８４８】

代謝物分析

使用済み培地の上清を、７日目の再活性化開始時、１０日目（Ｌ４０６４）または１１日目（Ｌ４０６３）のスケールアップ時、および１６／１７日目の採取時にＬ４０６３およびＬ４０６４について、あらゆる条件でＬ４０６３およびＬ４０６４から収集した。上清をＣＥＤＥＸバイオアナライザーでグルコース、乳酸塩、グルタミン、ｇｌｕｔａｍａｘ、およびアンモニアの濃度について分析した。図８９は、Ｌ４０６３およびＬ４０６４腫瘍のＧｅｎ３．０およびＧｅｎ３．１プロセスで収集された使用済み培地中のグルコース濃度を示す。

【１８４９】

合成培地は、完全培地（２ｇ／Ｌ）と比較して４．５ｇ／Ｌの高いグルコース濃度を有する。全体として、グルコースの濃度および消費量は、各培地タイプ内のＧｅｎ３．０およびＧｅｎ３．１プロセスで同等であった。図８９：Ｌ４０６３およびＬ４０６４の使用済み培地中のグルコース濃度（ｇ／Ｌ）。

【１８５０】

すべての試験条件で、Ｌ４０６３とＬ４０６４の両方の腫瘍で乳酸塩の増加が観察された。乳酸の増加は、Ｇｅｎ３．０条件とＧｅｎ３．１条件との間、および再活性化の拡張に使用された２つの培地（Ｌ４０６３の完全培地とＬ４０６４の合成培地）間で同等であった。

【１８５１】

図９０は、腫瘍Ｌ４０６３およびＬ４０６４の両方のＧｅｎ３．０およびＧｅｎ３．１プロセス条件で収集された使用済み培地上の乳酸塩濃度を示す。図９０：Ｌ４０６３およびＬ４０６４の使用済み培地中の乳酸塩濃度（ｇ／Ｌ）。

【１８５２】

Ｌ４０６３の場合、標準基礎培地には、２ｍＭのＬ－グルタミンが含まれ、培養条件でのＬ－グルタミンのＬ－グルタミン酸塩およびアンモニアへの自然分解を補うために、２ｍＭのｇｌｕｔａｍａｘで補足された。

【１８５３】

Ｌ４０６４腫瘍の場合、使用した合成（無血清）培地は、基礎培地にＬ－グルタミンを含まず、最終濃度が２ｍＭになるまでｇｌｕｔａｍａｘのみで補足された。Ｇｌｕｔａｍａｘは、Ｌ－アラニンおよびＬ－グルタミンのジペプチドであり、水溶液中でＬ－グルタミンよりも安定しており、グルタミン酸塩およびおよびアンモニアに自然に分解しない。代わりに、ジペプチドは、徐々に個々のアミノ酸に解離し、それによって、強力な細胞成長を維持するために、より低いが十分な濃度のＬ－グルタミンを維持する。図９１および図９２は、腫瘍Ｌ４０６３およびＬ４０６４の両方のＧｅｎ３．０およびＧｅｎ３．１プ

ロセス条件で収集された使用済み培地上の、それぞれグルタミンおよびｇｌｕｔａｍａｘ濃度を示す。

【１８５４】

Ｌ４０６３の場合、グルタミンおよびｇｌｕｔａｍａｘの濃度は、スケールアップ日にわずかに減少したが、採取日には再活性化日と比較して同様またはより近いレベルへの増加を示した。Ｌ４０６４の場合、グルタミンとｇｌｕｔａｍａｘの濃度は、プロセス全体を通じて、異なる条件間で同様の速度でわずかな劣化を示した。図９１：Ｌ４０６３およびＬ４０６４の使用済み培地中のグルタミン濃度（ｍｍｏｌ／Ｌ）。図９２：Ｌ４０６３およびＬ４０６４の使用済み培地中のｇｌｕｔａｍａｘ濃度（ｍｍｏｌ／Ｌ）。

【１８５５】

図９３は、腫瘍Ｌ４０６３およびＬ４０６４の両方のＧｅｎ３．０およびＧｅｎ３．１プロセス条件で収集された使用済み培地上のアンモニア濃度を示す。予想通り、アンモニア濃度は、Ｌ４０６４（２ｍＭ　ｇｌｕｔａｍａｘを含む合成培地中で成長させた）よりもＬ４０６３（２ｍＭグルタミン＋２ｍＭ　ｇｌｕｔａｍａｘを含む標準培地中で成長させた）の方が高かった。さらに、予想通り、培養の過程でアンモニアの段階的増加または蓄積があった。３つの異なる試験条件間でアンモニア濃度に差はなかった。図９３：Ｌ４０６３およびＬ４０６４の使用済み培地中のアンモニア濃度（ｍｍｏｌ／Ｌ）。

【１８５６】

Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨによるテロメア反復：

Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨ技術を使用して、Ｇｅｎ３およびＧｅｎ３．１プロセスでのＬ４０６３およびＬ４０６４のテロメア反復の平均長を測定した。相対テロメア長（ＲＴＬ）の決定は、ＤＡＫＯからのフローサイトメトリー分析用のテロメアＰＮＡキット／ＦＩＴＣを使用して計算した。テロメアアッセイを行った。

【１８５７】

Ｌ４０６３およびＬ４０６４の試料のテロメア長を、対照細胞株（１３０１白血病）と比較した。対照細胞株は、長く安定したテロメアを有する四倍体細胞株であり、相対的なテロメア長の計算を可能にする。両方の腫瘍で評価されたＧｅｎ３およびＧｅｎ３．１プロセスは、図９４に示されるように同等のテロメア長を示した。図９４：対照（１３０１）細胞株と比較した相対テロメア長（ＲＴＬ）の要約。

【１８５８】

ＴＣＲ　Ｖβレパートリー分析

各プロセスで生成された細胞産物のクローン多様性を決定するために、ＴＩＬ最終産物をＴ細胞受容体のＣＤＲ３部分の配列決定によるクローン多様性分析のためにアッセイした。

【１８５９】

３つのパラメーターを３つの条件間で比較した。

●固有のＣＤＲ３（ｕＣＤＲ３）の多様性指数

●ｕＣＤＲ３共有率％

●ｕＣＤＲ３の上位８０％の場合：

○ｕＣＤＲ３コピーの共有率％を比較する

○固有のクロノタイプの頻度を比較する

【１８６０】

図９５：Ｌ４０６３およびＬ４０６４のＴＣＲ　Ｖβレパートリーの概要。ＴＣＲ　Ｖβレパートリーによって測定された、Ｇｅｎ３およびＧｅｎ３．１条件での腫瘍Ｌ４０６３およびＬ４０６４の最終ＴＩＬ産物に対するＴＩＬのクローン性について説明する。

【１８６１】

図９７：Ｇｅｎ３とＧｅｎ３．１対照およびＧｅｎ３．１試験との比較、採取されたＴＩＬ細胞産物のＬ４０６３で共有される固有のＣＤＲ３配列の共有パーセンテージ：９７５配列が、Ｇｅｎ３とＧｅｎ３．１試験最終産物との間で共有され、Ｇｅｎ３．１試験最終産物と共有されるＧｅｎ３からの固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の８８％に相当する。

【１８６２】
図９６：Ｇｅｎ３．０プロセスとＧｅｎ３．１プロセスとの間の採取されたＴＩＬ最終細胞産物の固有のＣＤＲ３配列のＬ４０６３頻度比較。
【１８６３】
図９８：Ｇｅｎ３とＧｅｎ３．１対照およびＧｅｎ３．１試験との比較、採取されたＴＩＬ細胞産物のＬ４０６４で共有される固有のＣＤＲ３配列の共有パーセンテージ：２１６３配列が、Ｇｅｎ３とＧｅｎ３．１試験最終産物との間で共有され、Ｇｅｎ３．１試験最終産物と共有されるＧｅｎ３からの固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の８７％に相当する。
【１８６４】
図９９：Ｇｅｎ３．０プロセスとＧｅｎ３．１プロセスとの間の採取されたＴＩＬ最終細胞産物の固有のＣＤＲ３配列のＬ４０６４頻度比較。
【１８６５】
異なるプロセスについて、１６日目の採取時に収集された１×１０^{6}個の細胞から同定された固有のＣＤ３配列の数。Ｇｅｎ３．１試験条件は、試料内の固有のペプチドＣＤＲの数に基づいて、Ｇｅｎ３．０と比較してわずかに高いクローン多様性を示した。
【１８６６】
シャノンエントロピー多様性指数は、比較のためのより信頼性の高い一般的なメトリックであり、両方の腫瘍に関するＧｅｎ３．１条件は、Ｇｅｎ３．１試験条件のＴＣＲ　Ｖβレパートリーが Ｇｅｎ３．０プロセスよりもポリクローナルであることを示唆する。
【１８６７】
さらに、Ｇｅｎ３．１試験条件のＴＣＲ　Ｖβレパートリーは、腫瘍Ｌ４０６３およびＬ４０６４の両方でＧｅｎ３．０プロセスの対応するレパートリーと８７％を超える重複を示した。
【１８６８】
追加情報
再活性化日のＧｅｎ３．１試験Ｌ４０６４の使用済み培地のＩＬ－２濃度の値は、期待値を下回った（Ｇｅｎ３．１対照およびＧｅｎ３．０条件と同様）。
【１８６９】
低い値はピペッティングエラーに起因し得るが、採取された試料が最小限であるため、アッセイを繰り返すことができなかった。
【１８７０】
試料Ｌ４０６４の１０／１１日目のスケールアップからの使用済み培地は収集されず、ＩＬ－２濃度の分析および上清の代謝物分析には含まれていなかった。
【１８７１】
結論
０日目のフィーダーおよびＯＫＴ－３を含むＧｅｎ３．１試験条件では、Ｇｅｎ３．０およびＧｅｎ３．１対照と比較して、１６日目の採取時の細胞用量のＴＶＣが高いことを示した。Ｇｅｎ３．１試験条件の最終産物のＴＶＣは、Ｇｅｎ３．０の約２．５倍高かった。
【１８７２】
腫瘍Ｌ４０６３およびＬ４０６４の両方について、０日目にＯＫＴ－３およびフィーダーを添加したＧｅｎ３．１試験条件は、採取時にフラスコの最大容量に達した。これらの条件下で、０日目に最大４つのフラスコが開始された場合、最終的細胞用量は、８０～１００Ｅ＋０９ＴＩＬであり得た。
【１８７３】
最終ＴＩＬ産物の純度、疲弊、活性化、およびメモリーマーカーを含む表現型の特徴付けなどのすべての品質属性が維持され、Ｇｅｎ３．１試験とＧｅｎ３．０プロセスとの間で同等であった。ＴＩＬ最終産物のテロメア長および使用済み培地のＩＬ－２消費量は、Ｇｅｎ３．０プロセスとＧｅｎ３．１プロセスとの間で同等であった。

【１８７４】
　最終ＴＩＬ産物でのＩＦＮγ産生は、分析した２つの腫瘍におけるＧｅｎ３．０と比較して、０日目にフィーダーおよびＯＫＴ－３を添加したＧｅｎ３．１で３倍高く、Ｇｅｎ３．１プロセスが強力なＴＩＬ産物を生成したことを示唆する。
【１８７５】
　試験条件間でグルコースまたは乳酸塩レベルに差は観察されなかった。培地条件全体で、Ｇｅｎ３．０プロセスとＧｅｎ３．１プロセスとの間でグルタミンおよびアンモニアに差は観察されなかった。培地上の低レベルのグルタミンは、細胞増殖を制限しておらず、培地にのみｇｌｕｔａｍａｘを添加することで、細胞を増殖させるのに必要な栄養素を与えるのに十分であることを示唆する。
【１８７６】
　Ｌ４０６３およびＬ４０６４のスケールアップ日は、それぞれ１１日目および１０日目であり、プロセスの採取日に到達した細胞数に関して大きな差を示さず、代謝物の消費量は、プロセス全体で両方の場合で同等であった。この観察結果は、Ｇｅｎ３．０に最適化されたプロセスが処理日に柔軟性を有し、それによって製造スケジュールの柔軟性を促進できることを示唆している。
【１８７７】
　０日目にフィーダーおよびＯＫＴ－３を添加したＧｅｎ３．１プロセスは、Ｇｅｎ３．０と比較してＣＤＲ３　ＴＣＲａｂ配列分析で測定されたクローン多様性が高いことを示した。
【１８７８】
　図１００は、Ｇｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３最適化プロセス）の実施形態を説明する。標準培地およびＣＴＳ　Ｏｐｔｉｍｉｚｅｒ無血清培地を、Ｇｅｎ３最適化プロセスのＴＩＬ拡張に使用することができる。ＣＴＳ　Ｏｐｔｉｍｉｚｅｒの場合、培地のｇｌｕｔａｍａｘを最終濃度４ｍＭに上げるために無血清培地が推奨される。
【１８７９】
実現可能性および比較可能性：
実現可能性：
　実現可能性を、すべての実験のすべての研究条件に対して確立した。すべての実験および条件にわたって、またドナー腫瘍組織間で、すべての実験を、ＩＬ－２、ヒト血清－ＡＢ、同種異系フィーダー細胞、ＯＫＴ－３などの同じロットの重要な原材料を利用して行った。
【１８８０】
比較可能性：
　比較可能性は、図１０１に概説されているように、凍結保存された２２日目のＬＦＰ－００２自己腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）に従って、臨床製品の放出基準を満たす研究の任意のアームの能力によって決定された。
【１８８１】
実施例１６：合成培地を用いた腫瘍拡張プロセス。
　実施例７～１５に開示されるプロセスは、ＣＭ１およびＣＭ２培地を、本発明による合成培地（例えば、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞拡張ＳＦＭ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、例えば、ＤＭ１およびＤＭ２を含む）で置き換えることによって行われる。
【１８８２】
実施例１７：固形腫瘍を有する患者における自己腫瘍浸潤リンパ球の第２相多施設研究
研究設計
　概要
　この実施例では、本出願ならびにこの実施例に記載されるように調製されたＴＩＬを使用して、ＴＩＬをペムブロリズマブと組み合わせて、またはＴＩＬを単剤療法として使用してＡＣＴを評価する、前向き、非盲検、マルチコホート、非ランダム化、多施設第２相

試験について説明する。

【１８８３】

目的：

一次：

治験責任医師が評価した固形腫瘍の奏効評価基準（ＲＥＣＩＳＴ　１．１）を使用して、客観的奏効率（ＯＲＲ）によって決定されるように、ＭＭ、ＨＮＳＣＣ、もしくはＮＳＣＬＣ患者におけるペムブロリズマブと組み合わせた自己ＴＩＬの有効性、またはＣＰＩによる治療中もしくは治療後に以前に進行した再発もしくは不応性（ｒ／ｒ）ＮＳＣＬＣ患者における単剤療法としてのＴＩＬの有効性を評価すること。

【１８８４】

グレード３以上の治療に起因する有害事象（ＴＥＡＥ）の発生率によって測定される、ＭＭ、ＨＮＳＣＣ、およびＮＳＣＬＣ患者におけるペムブロリズマブと組み合わせたＴＩＬの安全性プロファイル、またはｒ／ｒ　ＮＳＣＬＣ患者における単剤療法としてのＴＩＬの安全性プロファイルを特徴付けること。

【１８８５】

二次：

完全奏効（ＣＲ）率、奏効期間（ＤＯＲ）、疾患制御率（ＤＣＲ）、治験責任医師によって評価されたＲＥＣＩＳＴ　１．１を使用した無増悪生存期間（ＰＦＳ）、および全生存期間（ＯＳ）を使用して、ＭＭ、ＨＮＳＣＣ、およびＮＳＣＬＣ患者におけるペムブロリズマブと組み合わせた自己ＴＩＬの有効性、またはｒ／ｒ　ＮＳＣＬＣ患者における単剤療法としてのＴＩＬの有効性をさらに評価すること。

【１８８６】

コホート：

コホート１Ａ：免疫療法を除く３つ以下の全身療法を伴う、切除不能なステージＩＩＩＣもしくはステージＩＶ、またはＭＭの患者におけるペムブロリズマブと組み合わせたＴＩＬ療法。以前に治療を受けた場合、患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が記録されていなければならない。

【１８８７】

コホート２Ａ：免疫療法を除く３つ以下の全身療法を伴う、進行性、再発性、または転移性のＨＮＳＣＣ（例えば、ステージＴ１Ｎ１－Ｎ２Ｂ、Ｔ２－４Ｎ０－Ｎ２ｂ）の患者におけるペムブロリズマブと組み合わせたＴＩＬ療法。以前に治療を受けた場合、患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が記録されていなければならない。

【１８８８】

コホート３Ａ：免疫療法を除く３つ以下の全身療法を伴う、局所進行性または転移性（ステージＩＩＩ～ＩＶ）ＮＳＣＬＣ患者におけるペムブロリズマブと組み合わせたＴＩＬ療法。以前に治療を受けた場合、患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が記録されていなければならない。

【１８８９】

コホート３Ｂ：免疫療法を除く３つ以下の全身療法の一部として、ＣＰＩ（例えば、抗ＰＤ－１／抗ＰＤ－Ｌ１）による全身療法を以前に受けたことがあるステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ患者における単剤としてのＴＩＬ療法。以前に治療を受けた場合、患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が記録されていなければならない。

【１８９０】

有効な標的療法が利用可能な癌遺伝子駆動腫瘍を有するコホート３Ａおよび３Ｂ（ＮＳＣＬＣ）の患者は、少なくとも１つの標的療法を受けていなければならない。

【１８９１】

すべての患者は、シクロホスファミドおよびフルダラビンからなる非骨髄破壊的リンパ球枯渇（ＮＭＡ－ＬＤ）プレコンディショニングレジメンの前に、自己凍結保存ＴＩＬ療法（コホートの割り当てに応じて、ペムブロリズマブの有無にかかわらず）を受けた。Ｔ

ＩＬ注入後、最大６回のＩＶインターロイキン－２（ＩＬ－２）の最大用量が投与された。

【１８９２】

以下の一般的な研究期間は、特に明記されていない限り、４つのコホートすべてで行われた。

【１８９３】

スクリーニングおよび腫瘍切除：研究登録から最大４週間（２８日）、ＴＩＬ製品の製造：腫瘍切除からおよそ２２日以内、および以下で考察される治療期間。

【１８９４】

治療期間（コホート１Ａ、２Ａ、および３Ａ）：ＮＭＡ－ＬＤ（７日）、ＴＩＬ注入（１日）、続いてＩＬ－２投与（１～４日）を含む最大２年。患者は、ＴＩＬ産生のための腫瘍切除およびベースライン走査の完了後であるが、ＮＭＡ－ＬＤレジメンの開始前にペムブロリズマブの単回注入を受ける。ペムブロリズマブの次の用量は、ＩＬ－２の完了後以降であり、その後２年（２４ヶ月）以内または疾患の進行もしくは許容できない毒性のいずれか早い方までＱ３Ｗ±３日間継続する。治療終了（ＥＯＴ）訪問は、ペムブロリズマブの最後の用量後３０日以内に起こった。該当する場合、この訪問は評価終了（ＥＯＡ）訪問と組み合わされ得る（例えば、ペムブロリズマブの中止は、疾患の進行時または新しい抗癌療法の開始時に起こった）。

【１８９５】

治療期間（コホート３Ｂ）：ＮＭＡ－ＬＤ（７日）、ＴＩＬ、注入（１日）、続いてＩＬ－２投与（１～４日）を含む最大１２日。ＥＯＴ訪問は、患者がＩＬ－２の最後の用量を受けたときに起こった。ＥＯＴ訪問は、治療中止後３０日以内に行われ、評価期間中にこの間隔内に起こる予定の任意の訪問と組み合わせることができる。

【１８９６】

評価期間：０日目のＴＩＬ注入後に開始し、疾患の進行時に終了し、新しい抗癌療法の開始、研究評価への同意の部分的撤回、または５年（６０ヶ月）のいずれか早い方。患者が疾患の進行に達するか、または新しい抗癌療法を開始すると、評価終了（ＥＯＡ）訪問が起こった。

【１８９７】

本明細書に記載されるように調製されたＴＩＬを用いたＴＩＬ自己療法は、以下のステップから構成されていた。

【１８９８】

１．ＴＩＬ細胞製品の供給源として機能する自己組織を提供するための腫瘍切除。

【１８９９】

２．中央の適正製造基準（ＧＭＰ）施設で産生されたＴＩＬ製品。

【１９００】

３．７日間のＮＭＡ－ＬＤプレコンディショニングレジメン。

【１９０１】

４．コホート１Ａ、２Ａ、および３Ａ：患者は、ＴＩＬ産生のために腫瘍切除およびベースライン走査の完了後であるが、ＮＭＡ－ＬＤレジメンの開始前にペムブロリズマブの単回注入を受ける。ペムブロリズマブの次の用量は、ＩＬ－２の完了後以降であり、その後Ｑ３Ｗ±３日継続する。

【１９０２】

５．自己ＴＩＬ製品の注入（０日目）、ならびに

【１９０３】

６．最大６用量までのＩＶ　ＩＬ－２投与。

【１９０４】

コホート１Ａ、２Ａ、および３Ａでは、ペムブロリズマブの次の用量は、ＩＬ－２の完了後以降であり、その後２年（２４ヶ月）以内または疾患の進行もしくは許容できない毒性のいずれか早い方までＱ３Ｗ±３日間継続する。

【１９０５】

コホート１Ａ、２Ａ、および３Ａのフローチャートは、図７に見出すことができる。コホート３Ｂのフローチャートは、図８に見出すことができる。患者は、腫瘍の適応によって適切なコホートに割り当てられた。

【１９０６】

ＴＩＬ療法＋ペムブロリズマブ（コホート１Ａ、２Ａ、および３Ａ）

患者はスクリーニングされ、腫瘍切除のための手術が予定された。その後、患者は１つ以上の腫瘍病変を切除し、ＴＩＬ産生のために中央製造施設に送られた。

【１９０７】

次に、ＮＭＡ－ＬＤレジメンは模倣され、－７日目および－６日目にメスナ（部位ごとの標準治療またはＵＳＰＩ／ＳｍＰＣ）を含む２日間のＩＶシクロホスファミド（６０ｍｇ／ｋｇ）、ならびにその後５日間のＩＶフルダラビン（２５ｍｇ／ｍ２：－５日目～－１日目）で構成された。

【１９０８】

コホート１Ａ、２Ａ、および３Ａの患者は、ＴＩＬ産生のために腫瘍切除の完了後にペムブロリズマブの単回注入を受け、ＮＭＡ－ＬＤレジメンの開始前にベースライン走査を受けた。６００，０００ＩＵ／ｋｇの用量でＩＶでのＩＬ－２投与は、０日目のＴＩＬ注入の完了の３時間後、ただし２４時間後までに開始された。追加のＩＬ－２投与は、最大６用量まで、およそ８～１２時間ごとに行われる。ペムブロリズマブの第２の用量は、ＩＬ－２の完了後以降であった。患者は、第２のペムブロリズマブ投与前に、すべてのＩＬ－２関連毒性（グレード≦２）から回復している必要がある。ペムブロリズマブは、その後２年以内（２４ヶ月）または疾患の進行もしくは許容できない毒性のいずれか早い方まで、Ｑ３Ｗ±３日間継続する。

【１９０９】

単剤としてのＴＩＬ療法（コホート３Ｂ）

患者はスクリーニングされ、腫瘍切除のための手術が予定された。その後、患者は１つ以上の腫瘍病変を切除し、ＴＩＬ産生のために中央製造施設に送られた。

【１９１０】

次に、ＮＭＡ－ＬＤレジメンは、－７日目および－６日目にメスナ（部位ごとの標準治療またはＵＳＰＩ／ＳｍＰＣ）を含む２日間のＩＶシクロホスファミド（６０ｍｇ／ｋｇ）、ならびにその後５日間のＩＶフルダラビン（２５ｍｇ／ｍ２：－５日目～－１日目）で構成された。

【１９１１】

腫瘍由来の自己ＴＩＬ製品の注入は、フルダラビンの最後の用量から２４時間以内に起こった。６００，０００ＩＵ／ｋｇの用量でＩＶでのＩＬ－２投与は、ＴＩＬ注入の完了後３時間後、ただし２４時間後までに開始された可能性がある。

【１９１２】

追加のＩＬ－２投与は、最大６用量まで、およそ８～１２時間ごとに行われた。

【１９１３】

腫瘍浸潤リンパ球の産生および拡張

ＴＩＬ自己細胞製品は、患者の腫瘍／病変に由来する生存可能な細胞傷害性Ｔリンパ球で構成されており、中央のＧＭＰ施設でエクスビボで製造される。例えば、ＴＩＬ産生プロセスを示す例示的なフロー図を図９に示す。

【１９１４】

ＴＩＬ製造プロセスは、個々の患者ごとに直径１．５ｃｍ以上の原発性または続発性転移性腫瘍病変（複数可）を外科的に切除した後に臨床現場で開始された。様々な解剖学的位置からの複数の腫瘍病変を切除して、腫瘍組織の全凝集体をまとめることができるが、輸送ボトルに存在する生体保存培地の量が限られているため、凝集体は、直径４．０ｃｍ、または重量１０ｇを超えてはならない。

【１９１５】

腫瘍病変（複数可）が生体保存輸送ボトルに入れられると、それは中央のＧＭＰ製造施

設への速達宅配便を使用して２℃～８℃で出荷される。到着時に、腫瘍標本（複数可）を断片に解剖し、その後、ヒト組み換えＩＬ－２を用いたプレ急速拡張プロトコル（Ｐｒｅ－ＲＥＰ）において約１１日間培養した。

【１９１６】

次いで、これらのｐｒｅ－ＲＥＰ細胞を、ＩＬ－２、ＯＫＴ３（［ムロモナブ－ＣＤ３］としても知られるヒトＣＤ３に対するマウスモノクローナル抗体）、およびフィーダー細胞としての照射された同種異系末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）の存在下で１１日間、急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）を使用してさらに拡張した。

【１９１７】

次いで、拡張した細胞を採取し、洗浄し、配合し、凍結保存し、速達宅配便で臨床現場に出荷した。ＴＩＬ細胞製品の剤形は、ＴＩＬが由来する患者への注入の準備ができている凍結保存された自己の「生細胞懸濁液」であった。患者は、製品仕様あたり1×10^{9}～150×10^{9}生細胞の間に含まれる、製造および放出された製品の全用量を受容することとした。臨床経験は、客観的な腫瘍応答がこの用量範囲全体で達成されたことを示し、これも安全であることが示されている（Ｒａｄｖａｎｙｉ Ｌ．Ｇ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１２；１８（２４）：６７５８－７０）。製品の全用量は、最大４つの注入バッグで提供された。

【１９１８】

ＴＩＬ細胞製品を受容する患者の準備

この研究で使用されたＮＭＡ－ＬＤプレコンディショニングレジメン（すなわち、２日間のシクロホスファミドおよびメスナ、続いて５日間のフルダラビン）は、国立癌研究所によって開発および試験された方法に基づいていた（Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ Ｓ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１１；１７（１３）：４５５０－７、Ｒａｄｖａｎｙｉ Ｌ．Ｇ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１２；１８（２４）：６７５８－７０、Ｄｕｄｌｅｙ Ｍ．Ｅ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ．２００８；２６（３２）：５２３３－９、Ｐｉｌｏｎ－Ｔｈｏｍａｓ Ｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１２；３５（８）：６１５－２０、Ｄｕｄｌｅｙ Ｍ．Ｅ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ．２００５；２３（１０）：２３４６－５７、およびＤｕｄｌｅｙ Ｍ．Ｅ．，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２００２；２９８（５５９４）：８５０－４）。７日間のプレコンディショニングレジメンに続いて、患者にＴＩＬ細胞製品を注入した。

【１９１９】

ＴＩＬ注入後、８～１２時間ごとにＩＶ ＩＬ－２（６００，０００ＩＵ／ｋｇ）を投与し、最初の用量は、ＴＩＬ注入の完了後３～２４時間の間に投与し、最大６回まで継続した。施設の基準に従って、ＩＬ－２の用量は、実際の体重に基づいて計算することができる。

【１９２０】

患者集団の選択

コホート１Ａ：

患者は、切除不能なＭＭの確定診断を受けた（ステージＩＩＩＣまたはステージＩＶ、米国癌合同委員会［ＡＪＣＣ］病期分類システムに従って組織学的に確認された）。眼内黒色腫患者は除外された。患者は、以前に免疫腫瘍学を標的とした薬剤を受けていてはならない。ＢＲＡＦ突然変異が陽性の場合、患者は、以前にＢＲＡＦ／ＭＥＫ標的療法を受けていた可能性があった。

【１９２１】

コホート２Ａ：

患者は、進行性、再発性、および／または転移性のＨＮＳＣＣを有しており、治療ナイーブであり得、病理学レポートを介した原発腫瘍の組織学的診断が必要である。患者は、以前に免疫療法レジメンを受けていてはならない。

【１９２２】

コホート３Ａ：

患者は、ステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ（扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌）の確定診断を受けた。有効な標的療法が利用可能な癌遺伝子駆動腫瘍を有する患者は、少なくとも１つの標的療法を受けていた。

【１９２３】

コホート３Ｂ：

患者は、ステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ（扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌）の確定診断を受けており、以前にＣＰＩ（例えば、抗ＰＤ－１／抗ＰＤ－Ｌ１）による全身療法を受けていた。有効な標的療法が利用可能な癌遺伝子駆動腫瘍を有する患者は、少なくとも１つの標的療法を受けていた。

【１９２４】

コホート１Ａ、２Ａ、および３Ａの免疫療法を除き、すべての患者は、最大３つの全身抗癌療法を受けていた（以下の包含基準を参照）。以前に治療を受けた場合、患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が確認されていた。

【１９２５】

包含基準

患者は、研究に参加するために以下の包含基準をすべて満たしている必要がある。

【１９２６】

１．すべての患者は、組織学的または病理学的にそれぞれの組織学的悪性腫瘍の確定診断を受けた。

○切除不能または転移性黒色腫（コホート１Ａ）

○頭頸部の進行性、再発性、または転移性扁平上皮癌（コホート２Ａ）

○ステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ（扁平上皮癌、非扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌）（コホート３Ａおよび３Ｂ）。

【１９２７】

２．コホート１Ａ、２Ａ、および３Ａのみ：患者は、免疫療法ナイーブであった。以前に治療された場合、患者は、最近の治療中または治療後に進行していた。コホート１Ａ、２Ａ、および３Ａは、最大３つの全身性抗癌療法を以前に受けている可能性があり、具体的には以下の通りである。

○コホート１Ａ：切除不能または転移性黒色腫（ステージＩＩＩＣまたはステージＩＶ）を有する患者。ＢＲＡＦ突然変異陽性の場合、患者は、ＢＲＡＦ阻害剤を投与されている可能性がある。

○コホート２Ａ：切除不能または転移性ＨＮＳＣＣの患者。最初の化学放射線療法を受けていた患者は許可された。

○コホート３Ａ：ステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ（扁平上皮癌、非扁平上皮癌、腺癌、または大細胞癌）を有し、免疫療法ナイーブであり、局所進行または転移の状況で３つ以下の以前の全身療法後に進行した患者。アジュバントもしくはネオアジュバントの設定で、または根治的化学放射線療法の一部として全身療法を受けた患者は適格であり、以前の全身療法の完了から１２ヶ月以内に疾患が進行した場合、１つの治療を受けたとみなされた。標的療法に感受性のある突然変異を有する既知の癌遺伝子ドライバー（例えば、ＥＧＦＲ、ＡＬＫ、ＲＯＳ）を有する患者は、少なくとも１つの標的療法の後に進行したに違いない。

【１９２８】

３．コホート３Ｂのみ：ステージＩＩＩまたはステージＩＶのＮＳＣＬＣ（扁平上皮癌、非扁平上皮癌、腺癌、または大細胞癌）を有し、３つ以下の全身療法の一部として、ＣＰＩ（例えば、抗ＰＤ－１／抗ＰＤ－Ｌ１）による全身療法を以前に受けていた患者。

○患者は、最近の治療中または治療後にＸ線写真で進行が確認されていた。

○アジュバントもしくはネオアジュバントの設定で、または根治的化学放射線療法の一部として全身療法を受けた患者は適格であり、以前の全身療法の完了から１２ヶ月以内に疾患が進行していた場合、１つの治療を受けたとみなされた。

○標的療法に感受性のある突然変異を有する既知の癌遺伝子ドライバー（例えば、ＥＧＦＲ、ＡＬＫ、ＲＯＳ）を有する患者は、少なくとも１つの標的療法の後に進行したに違いない。

【１９２９】

４．患者は、ＴＩＬ治験薬産生のために、切除後に最少直径１．５ｃｍの切除可能な病変（または凝集病変）を少なくとも１つ有していた。外科的切除が患者に追加のリスクをもたらさない限り、腫瘍組織を、複数の多様な転移性病変から得ることが奨励された。

○ＴＩＬ生成のために切除が検討されている病変が、以前に照射された領域内にある場合、その病変は、切除前にＸ線写真で進行を示している必要がある。

○患者は、プロトコルが必要とする検査に適正な組織病理標本を有していなければならない。

【１９３０】

５．患者は、ＴＩＬ製造の腫瘍切除の後に、標準かつ周知のＲＥＣＩＳＴ １．１ガイドラインによって定義されているように、残留する測定可能な疾患を有していた（例えば、Ｅｉｓｅｎｈａｕｅｒ，Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ ４５：２２８－２４７（２００９）を参照、ｗｗｗ．ｐｒｏｊｅｃｔ．ｅｏｒｔｃ．ｏｒｇ／ｒｅｃｉｓｔ／ｗｐ－ｃｏｎｔｅｎｔ／ｕｐｌｏａｄｓ／ｓｉｔｅｓ／４／２０１５／０３／ＲＥＣＩＳＴＧｕｉｄｅｌｉｎｅｓ．ｐｄｆでも入手可能）。

○以前に照射された領域内の病変は、それらの病変で疾患の進行が示されていない限り、標的病変として選択されなかった。

○ＲＥＣＩＳＴごとに依然として測定可能なＴＩＬ生成のために部分的に切除された病変を、非標的病変として選択することができるが、応答評価の標的病変としては機能することができなかった。

【１９３１】

６．患者は、同意時に１８歳以上であった。

【１９３２】

７．患者の米国東海岸癌臨床試験グループ（Ｅａｓｔｅｒｎ Ｃｏｏｐｅｒａｔｉｖｅ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ Ｇｒｏｕｐ、ＥＣＯＧ）のパフォーマンスステータスは０または１であり、推定平均余命は３ヶ月以上であった。

【１９３３】

８．出産の可能性のある患者または出産の可能性のあるパートナーを持つ患者は、治療中に非常に効果的な承認された避妊方法を実践する意志があり、すべてのプロトコル関連療法を受けた後１２ヶ月間継続する必要があった（注記：生殖能力のある女性は、治療中、およびＩＬ－２の最後の用量後１２ヶ月間またはペムブロリズマブの最後の用量後４ヶ月のいずれか遅い方で、効果的な避妊を使用することとした。男性は、研究中または治療中止後１２ヶ月のいずれか遅い方で、精子を提供することができなかった。

【１９３４】

９．患者は、以下の血液学的パラメーターを有していた：

○絶対好中球数（ＡＮＣ）≧１０００／ｍｍ３、

○ヘモグロビン≧９．０ｇ／ｄＬ、

○血小板数≧１００，０００／ｍｍ３。

【１９３５】

１０．患者は、適正な臓器機能を有していた：

○血清アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）／血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ（ＳＧＰＴ）およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）／ＳＧＯＴが、正常上限（ＵＬＮ）の３倍以下、肝転移がＵＬＮの５倍以下の患者。

○スクリーニング時にコッククロフト・ゴールト式を使用して推定されたクレアチニンクリアランス≧４０ｍＬ／分。

○総ビリルビン≦２ｍｇ／ｄＬ。

○ジルベール症候群の患者は、総ビリルビン≦３ｍｇ／ｄＬでなければならない。

【１９３６】
　１１．患者は、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ１およびＨＩＶ２）に対して血清陰性であった。Ｂ型肝炎ウイルス表面抗原（ＨＢｓＡｇ）、Ｂ型肝炎コア抗体（抗ＨＢｃ）、または急性もしくは慢性感染を示すＣ型肝炎ウイルス（抗ＨＣＶ）の血清学が陽性の患者は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）に基づくウイルス量および特定のウイルス曝露の局所有病率に応じて登録した。
【１９３７】
　１２．患者は、最初の試験治療（すなわち、ＮＭＡ－ＬＤまたはペムブロリズマブの開始）の前に、以下に詳述されるように、最小期間の以前の抗癌療法（複数可）からのウォッシュアウト期間を有していた。
　○標的療法：ウォッシュアウトが治療の開始の最低１４日前であれば、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）、ＭＥＫ、ＢＲＡＦ、ＡＬＫ、ＲＯＳ１または他の標的薬剤（例えば、エルロチニブ、アファチニブ、ダコミチニブ、オシメルチニブ、クリゾチニブ、セリチニブ、ロラチニブ）による以前の標的療法が許可された。
　○化学療法：ウォッシュアウトが治療開始の最低２１日前であれば、アジュバント、ネオアジュバント、または根治的化学療法／化学放射線療法が許可された。
　○コホート３Ｂのみの免疫療法、抗ＰＤ－１、他のｍＡｂ、またはワクチンによる以前のチェックポイント標的療法は、ＮＭＡ－ＬＤの開始前２１日以上のウォッシュアウト期間で許可された。
　○緩和的放射線療法：脱毛症、皮膚色素沈着の変化、または他の臨床的に重要でない事象、例えば小領域放射線皮膚炎または直腸もしくは尿意切迫感を除いて、すべての放射線関連毒性がグレード１またはベースラインに解決された場合、以前の外部ビーム放射線療法が許可された
　○ＲＥＣＩＳＴ　１．１を介して応答のターゲットとして評価されている腫瘍病変（複数可）は、放射線ポータルの外側にあったが、ポータル内の場合は、進行が実証されていなければならない（上記の包含基準を参照）。
　○手術／事前に計画された手順：創傷治癒が起こり、すべての合併症が解消され、腫瘍切除の前に少なくとも１４日が経過している場合（主要な手術手順の場合）、以前の外科的手順（複数可）が許可された。
【１９３８】
　１３．患者は、コホートの割り当て前に、脱毛症または白斑を除いて、以前のすべての抗癌治療関連有害事象（ＴＲＡＥ）からグレード１以下（有害事象の一般用語基準［ＣＴＣＡＥ］による）に回復していた。
【１９３９】
　１４．以前の抗癌療法から安定したグレード２以上の毒性を有する患者は、医療モニターと相談した後、ケースバイケースで検討された。
【１９４０】
　１５．ペムブロリズマブによる治療によって悪化すると合理的に予想されない不可逆的毒性を有するコホート１Ａ、２Ａ、および３Ａの患者は、医療モニターとの協議後にのみ含まれた。コホート３Ｂの患者のみ、免疫チェックポイント阻害剤ＣＰＩ（複数可）による以前の治療の結果として、グレード２以上の下痢または大腸炎が記録されている患者は、少なくとも６ヶ月間無症候性であったか、または治療後腫瘍切除前の目視評価による結腸内視鏡検査で正常でなければならない。
【１９４１】
　１６．患者は、保護された健康情報の使用および開示について、書面による承認を提供していなければならない。
【１９４２】
　除外基準
　以下の基準のうちのいずれかを満たす患者は、研究から除外した。
【１９４３】

１．ブドウ膜／眼起源の黒色腫を有する患者

【１９４４】

２．過去２０年以内に非骨髄破壊的または骨髄破壊的化学療法レジメンを含む、臓器同種移植または以前の細胞移植療法を受けていた患者。（注記：この基準は、以前のＴＩＬ治療で以前のＮＭＡ－ＬＤレジメンがあったことを除いて、ＴＩＬによる再治療を受けている患者に適用可能であった。）

【１９４５】

３．症候性および／または未治療の脳転移を有する患者。

○・脳転移が根治的に治療された患者は、治療開始前に患者が２週間以上にわたって臨床的に安定し、治療後の磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）による新たな脳病変がなく、患者が継続的なコルチコステロイド治療を必要としない場合、メディカルモニターと話し合った後に登録が検討される。

【１９４６】

４．登録から２１日以内に全身ステロイド療法を受けている患者。

【１９４７】

５．妊娠中または授乳中の患者。

【１９４８】

６．治験責任医師の意見では、研究参加のリスクが高い、活動性の医学的疾患（複数可）、例えば全身性感染症（例えば、梅毒もしくは抗生物質を必要とする他の感染症）、凝固障害、または心臓血管系、呼吸器系、もしくは免疫系の他の活動性の主要な医学的疾患を有していた患者。

【１９４９】

７．患者は、活動性または以前に記録された自己免疫または炎症性障害（肺炎、炎症性腸疾患［例えば、大腸炎もしくはクローン病］、憩室炎［憩室症を除く］、全身性紅斑性狼瘡、サルコイドーシス症候群、またはウェゲナー症候群［多発血管炎を伴う肉芽腫症、グレイブス病、関節リウマチ、下垂体炎、ブドウ膜炎等］）を有しない場合がある。以下は、この基準の例外であった。

○白斑または脱毛症を有する患者。

○甲状腺機能低下症（例えば、橋本症候群に続く）が安定している患者

○ホルモン補充療法。

○全身療法を必要としない任意の慢性皮膚疾患。

○食事療法だけで制御されるセリアック病の患者。

【１９５０】

８．治療開始前２８日以内に生ワクチン接種または弱毒化ワクチン接種を受けていた患者。

【１９５１】

９．何らかの形態の原発性免疫不全症（重症複合免疫不全症［ＳＣＩＤ］および後天性免疫不全症候群［ＡＩＤＳ］など）を有していた患者。

【１９５２】

１０．治験薬のいずれかの成分に対する過敏症の病歴を有する患者。ＴＩＬは、以下のうちのいずれかを含むがこれらに限定されない、ＴＩＬ製品製剤のいずれかの成分に対する既知の過敏症を有する患者には投与されなかった。

○・ＮＭＡ－ＬＤ（シクロホスファミド、メスナ、およびフルダラビン）

○・Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ（登録商標）、アルデスロイキン、ＩＬ－２

○・アミノグリコシド系抗生物質（すなわち、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン［ゲンタマイシン過敏症の皮膚検査陰性者を除く］）

○・ジメチルスルホキシドを含むＴＩＬ製品製剤の任意の成分

○［ＤＭＳＯ］、ＨＳＡ、ＩＬ－２、およびデキストラン－４０

○・ペムブロリズマブ

【１９５３】

１１．左心室駆出率（ＬＶＥＦ）が４５％未満の患者、またはニューヨーク心臓協会クラスＩＩ以上の患者。６０歳以上の患者、あるいは虚血性心疾患、胸痛、または臨床的に重大な心房性および／もしくは心室性不整脈の病歴のある患者において、不可逆的な壁運動異常を示す心臓ストレス試験。

○スポンサーのメディカルモニターの承認を得て、駆出率および心臓病クリアランスが十分であれば、心臓ストレス試験に異常がある患者を登録することができた。

【１９５４】

１２．閉塞性または拘束性肺疾患があり、予測正常値の６０％以下のＦＥＶ１（１秒の強制呼気量）が記録されている患者。

○・患者が上気道の解剖学的構造の異常（すなわち、気管切開）のために信頼できる肺活量測定を行うことができなかった場合は、６分間の歩行試験を使用して呼吸機能を評価した。年齢および性別に対して予測される少なくとも８０％の距離を歩くことができなかった患者、または試験中の任意の時点で低酸素症の証拠を示した患者（ＳｐＯ２＜９０％）は除外される。

【１９５５】

１３．過去３年以内に別の原発性悪性腫瘍があった患者（治療を必要としなかった、または１年以上前に治癒的に治療された患者を除き、治験責任医師の判断では、非黒色腫皮膚癌、ＤＣＩＳ、ＬＣＩＳ、前立腺癌グリーソンスコア≦６または膀胱癌を含むが、これらに限定されない重大な再発リスクをもたらさなかった）。

【１９５６】

１４．治療開始から２１日以内に治験薬を用いた別の臨床試験への参加。

【１９５７】

研究エンドポイントおよび計画された分析

一次エンドポイントおよび二次エンドポイントは、コホートによって別々に分析した。

【１９５８】

一次エンドポイント：

ＯＲＲは、有効性分析セットの中でＲＥＣＩＳＴ１．１に従って治験責任医師が評価した最良の応答として確認されたＰＲまたはＣＲのいずれかを達成した患者の割合として定義された。

【１９５９】

客観的反応を各疾患評価ごとに評価し、ＯＲＲは、対応する両側９０％　ＣＩを用いて二項比率として表された。各コホートの一次分析は、評価期間の早期に進行／期限切れまたは中止されない限り、コホートごとに治療を受けたすべての患者が１２ヶ月間追跡される機会があるときに行った。

【１９６０】

安全性一次エンドポイントは、各コホート内のグレード３以上のＴＥＡＥ発生率によって測定され、対応する両側９０％　ＣＩの二項比率として表された。

【１９６１】

二次エンドポイント：

有効性：

二次有効性エンドポイントは、次のように定義された。

治験責任医師によって評価された確認済みＣＲを達成した応答者に基づくＣＲ率。ＤＣＲは、確認されたＰＲ／ＣＲまたは持続的なＳＤ（少なくとも６週間）を達成した患者数の合計を、有効性分析セットの患者数で割り、１００％を掛けたものとして導き出された。ＣＲ率およびＤＣＲは、点推定およびその両側９０％　ＣＩを使用して要約した。

【１９６２】

ＤＯＲは、客観的な応答を達成した患者の間で定義された。再発性もしくは進行性疾患が客観的に記録された最初の日付、またはその後の抗癌療法の受容もしくは患者の死亡（最初に記録された方）まで、初回応答（ＰＲ／ＣＲ）基準が満たされていることから測定した。ＰＤを経験していない、またはデータカットもしくは最終データベースロックの時

点より前に死亡していない患者は、腫瘍状態の適切な評価が行われた最終日に事象時間が打ち切られる。

【１９６３】

ＰＦＳは、リンパ球枯渇からＰＤまでの時間（月単位）、または何らかの原因による死亡のいずれか早い方の事象として定義された。ＰＤを経験していない、またはデータカットもしくは最終データベースロックの時点で死亡していない患者は、腫瘍状態の適切な評価が行われた最終日に事象時間が打ち切られた。

【１９６４】

ＯＳは、リンパ球枯渇の時点から何らかの原因による死亡までの時間（月単位）として定義された。データカットまたは最終的なデータベースロックの時点までに死亡していない患者は、既知の生存状態の最終日に事象時間が打ち切られた。

【１９６５】

ＤＯＲ、ＰＦＳ、およびＯＳは、右側打ち切りを受けた。カプラン・マイヤー法を使用して、事象までの時間の有効性エンドポイントを要約する。腫瘍評価のベースラインデータは、すべてのコホートのリンパ球枯渇前の最後の走査であった。

【１９６６】

上記の有効性パラメーターは、ベースラインの疾患特徴：ＢＲＡＦステータス（コホート１Ａのみ）、ＨＰＶステータス（コホート２Ａのみ）、扁平上皮または非扁平上皮肺疾患（コホート３Ａおよび３Ｂのみ）、ならびに抗ＰＤ－Ｌ１ステータスによって定義されたサブセットに適用可能なコホートについて推定される。

【１９６７】

実施例１８：固形腫瘍を有する患者における自己腫瘍浸潤リンパ球の第２相多施設研究

この実施例の研究は、選択された固形腫瘍（転移性黒色腫、頭頸部扁平上皮癌、および非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ））の患者における自己腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の第２相多施設グローバル非盲検研究である。この実施例は、実施例１０～１７を含む本明細書の実施例に従って製造され、本出願全体を通して説明され、凍結保存されるＴＩＬ産物を使用し、２２日間の製造プロセスを有する。患者がシクロホスファミド（６０ｍｇ／ｋｇ×２日）およびフルダラビン（２５ｍｇ^{2}／ｍ×５日）による非骨髄破壊的リンパ球枯渇の調製レジメンを完了した後、ＴＩＬ産物の単回注入を行った。以下に説明されるように、４つの患者コホートが存在する。

●コホート１Ａ（併用コホート）：免疫療法ナイーブであり、以前の全身療法が３つ以下である、ＩＩＩＣ期またはＩＶ期の切除不能または転移性黒色腫の患者。これらの患者は、ペムブロリズマブと合わせてＴＩＬ製品を受容する。

●コホート２Ａ（併用コホート）：免疫療法ナイーブであり、以前の全身療法が３つ以下である、進行性、再発性、または転移性の頭頸部扁平上皮癌患者。これらの患者は、ペムブロリズマブと合わせてＴＩＬ製品を受容する。

●コホート３Ａ（併用コホート）：免疫療法ナイーブであり、以前の全身療法が３つ以下である、局所進行性または転移性（ステージＩＩＩ－ＩＶ）のＮＳＣＬＣ患者。これらの患者は、ペムブロリズマブと合わせてＴＩＬ製品を受容する。

●コホート３Ｂ：３つ以下の全身療法の一部として、チェックポイント阻害剤（抗ＰＤ－１／抗ＰＤ－Ｌ１）による全身療法を以前に受けたことがある、ステージＩＩＩ－ＩＶのＮＳＣＬＣ患者。これらの患者は、単剤としてＴＩＬ製品を受容する。

【１９６８】

２人のＮＳＣＬＣ患者がコホート３Ｂ（免疫チェックポイント阻害剤後のＴＩＬ単独）に登録され、４２日目に最初の反応評価訪問を完了した）を以下に説明する。

【１９６９】

患者Ａは、ステージＩＶＡ肺腺癌と診断された６３歳の女性である。彼女は、ペムブロリズマブ、カルボプラチン／ベバシズマブ、およびビノレルビンを含む３つの以前の全身療法を受けていた。以前のペムブロリズマブ療法に対する彼女の最良の応答は、進行性疾患であり、カルボプラチン／ベバシズマブに対する応答は、部分応答であり、彼女のビノ

レルビン応答は、評価できなかった（彼女は応答評価の前に中止した）。彼女は、ＴＩＬの生成のために下葉肺切除術を受け、ＴＩＬ製品の３．７５×１０^{9}個の細胞を注入した。患者は、最初の応答評価（４２日目）のために訪問し、そこでのコンピューター断層撮影（ＣＴ）走査は、ベースライン走査と比較して腫瘍量の４％低減を示し、これはＲＥＣＩＳＴ１．１による安定した疾患応答である。

【１９７０】

患者Ｂは、ステージＩＶＢの基底細胞扁平上皮癌と診断された７０歳の女性である。彼女は、カルボプラチン／アブラキサン、ニボルマブ、およびシスプラチン／ゲムシタビンを含む３つの以前の治療を受けていた。以前のカルボ／アブラキサンに対する彼女の最良の応答は評価できなかった（毒性のために治療が中止された）、ニボルマブに対する応答は、進行性疾患であり、シスプラチン／ゲムシタビンは部分応答であった。彼女は、ＴＩＬの生成のために脾臓病変切除を受け、ＴＩＬ製品の３９×１０^{9}個の細胞を注入した。患者は、最初の応答評価（４２日目）のために訪問し、そこでのＣＴ走査は、ベースライン走査と比較して腫瘍量の４４％低減を示し、これはＲＥＣＩＳＴ１．１による部分応答である。

【１９７１】

上記の実施例は、当業者に本発明の組成物、システム、および方法の実施形態をどのように作製および使用するかについての完全な開示および説明を与えるために提供されており、本発明者らがそれらの発明とみなすものの範囲を限定することは意図されていない。当業者に明らかである本発明を実施するための上に記載される様式の修正は、以下の特許請求の範囲の範囲内にあることが意図される。本明細書中で言及されているすべての特許および刊行物は、本発明が関係する当業者の技術水準を示している。

【１９７２】

すべての見出しおよびセクションの指定は、明確さおよび参照目的のためだけに使用されているにすぎず、決して限定的であるとみなされるべきではない。例えば、当業者は、本明細書に記載される本発明の趣旨および範囲に従って、必要に応じて異なる見出しおよびセクションからの様々な態様を組み合わせることの有用性を認識するであろう。

【１９７３】

本明細書に引用されたすべての参考文献は、あたかも各個々の刊行物または特許または特許出願がすべての目的のためにその全体が参照により組み込まれるように具体的かつ個別に示されるのと同程度までそれらの全体がすべての目的のために本明細書に参照により組み込まれる。

【１９７４】

当業者には明らかなように、本出願の趣旨および範囲から逸脱することなく、本出願の多くの修正および変形をなすことができる。本明細書に記載された特定の実施形態および実施例は例としてのみ提供され、特許請求の範囲が権利を与えられる同等物の全範囲とともに、添付の特許請求の範囲の用語によってのみ限定されるべきである。

【図面】

【図１】

プロセス２Ａ：ステップＡ～Ｅから約２２日

1. ステップＡ

患者の腫瘍試料を取得する

2. ステップＢ

断片化および第１の拡張
３日～１４日

3. ステップＣ

第１の拡張から第２の拡張への移行
保存なしおよび閉鎖系

4. ステップＤ

第２の拡張
ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、および抗原提示フィーダー細胞
閉鎖系

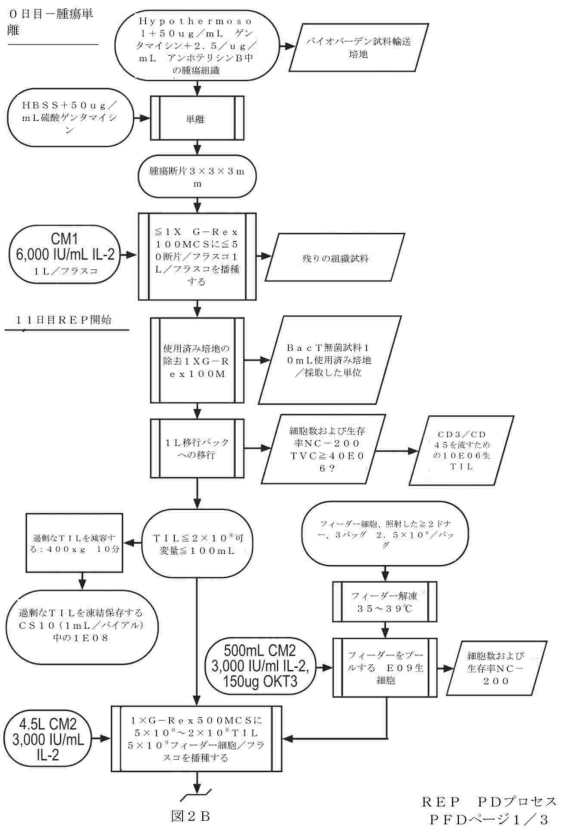
5. ステップＥ

ステップＤからのＴＩＬを採取する
閉鎖系

6. ステップＦ

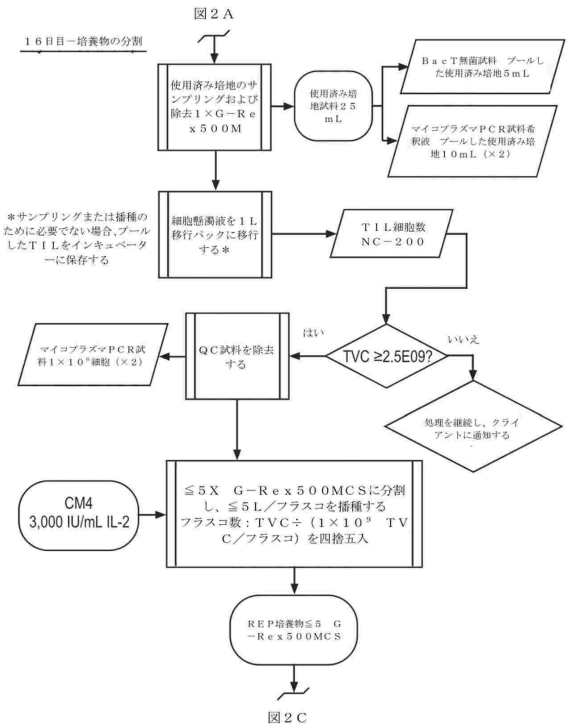
最終製剤および／または注入バッグへの移行
（任意に凍結保存する）

【図２Ａ】



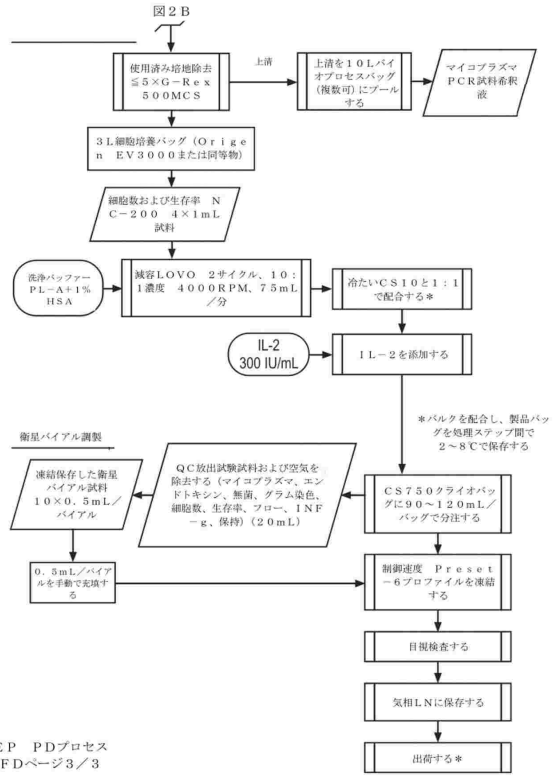
ＲＥＰ　ＰＤプロセス
ＰＦＤページ１／３

【図２Ｂ】



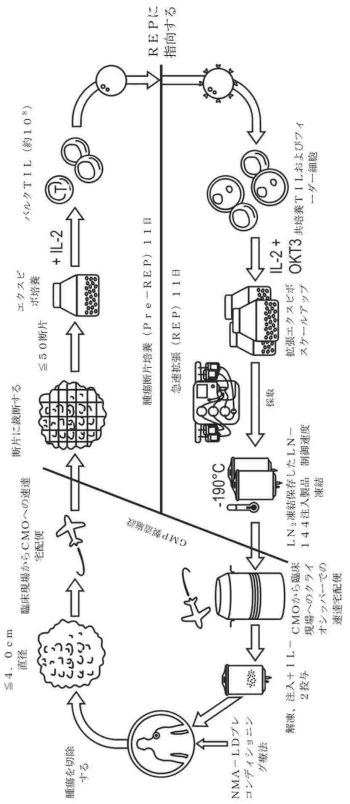
ＲＥＰ　ＰＤプロセス
ＰＦＤページ２／３

【図２Ｃ】

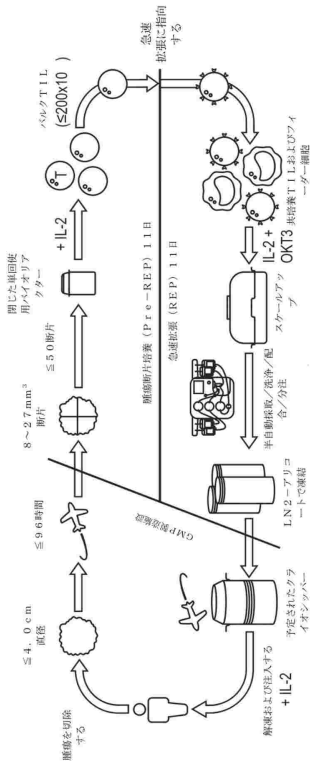


ＲＥＰ　ＰＤプロセス
ＰＦＤページ３／３

【図３】



【図４】



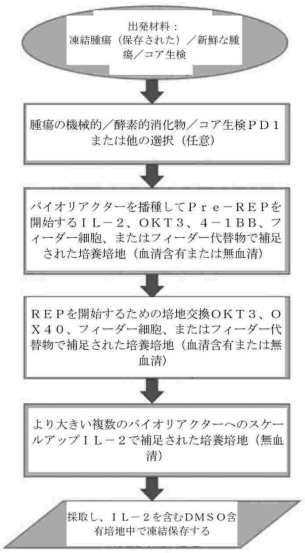
【図５】

プロセス１Ｃ：ステップＡ～Ｅの場合４３～５５日	プロセス２Ａ：ステップＡ～Ｅから約２２日
1. ステップＡ 患者の腫瘍試料を取得する	**1.** ステップＡ 患者の腫瘍試料を取得する
2. ステップＢ 断片化および第１の拡張 １１日～２１日	**2.** ステップＢ 断片化および第１の拡張 ３日～１４日
3. ステップＣ 第１の拡張から第２の拡張への移行 選択まで任意の保存	**3.** ステップＣ 第１の拡張から第２の拡張への移行 保存なしおよび閉鎖系
4. ステップＤ 第２の拡張 ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、および抗原提示フィーダー細胞 任意に１回以上繰り返す	**4.** ステップＤ 第２の拡張 ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、および抗原提示フィーダー細胞 閉鎖系
5. ステップＥ ステップＤからのＴＩＬを採取する	**5.** ステップＥ ステップＤからのＴＩＬを採取する 閉鎖系
6. ステップＦ 最終製剤および／または注入バッグへの移行	**6.** ステップＦ 最終製剤および／または注入バッグへの移行 （任意に凍結保存する）

【図６】

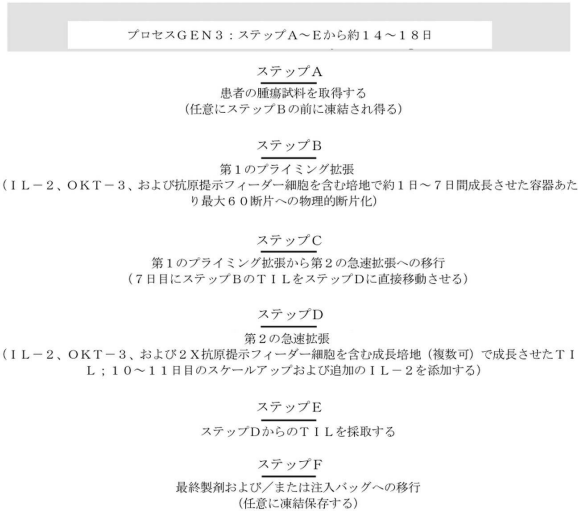
プロセスステップ	プロセス１Ｃ実施形態	プロセス２Ａ実施形態	利点
Pre-REP	• １０ＧＲＥＸ－１０フラスコあたり４断片 • １１～２１日の期間	• １ＧＲＥＸ－１００Ｍフラスコあたり４０断片 • １１日の期間	• フラスコあたりの増加した腫瘍断片 • 短縮された培養時間 • 低減したステップ数 • 閉鎖系に適している
Ｐｒｅ－ＲＥＰからＲＥＰへの移行	• 表現型選択までＰｒｅ－ＲＥＰ ＴＩＬを凍結し、次いで解凍してＲＥＰに進行する（約３０日目） • ＲＥＰは４０×１０⁶個を超えるＴＩＬを必要とする	• Ｐｒｅ－ＲＥＰ ＴＩＬを１１日目にＲＥＰに直接移動させる • ＲＥＰは２５～２００×１０⁶個のＴＩＬを必要	• 短縮されたｐｒｅ－ＲＥＰ～ＲＥＰプロセス • 低減したステップ数 • 排除した表現型選択 • 閉鎖系に適している
REP	• ＲＥＰの０日目の６つのＧＲＥＸ－１００Ｍフラスコ • ＲＥＰの０日目のフラスコあたり５×１０⁶個のＴＩＬおよび５×１０⁸個のＰＢＭＣフィーダー • ＲＥＰの７日目に１８～３６フラスコに分割する • １４日の期間	• １１日目の１つのＧＲＥＸ－５００Ｍフラス • １１日目の２５～２００×１０⁶個のＴＩＬおよび５×１０⁸個のＰＢＭＣフィーダー • １６日目に６つ以下のＧＲＥＸ－５００Ｍフラスコに分割する • １１日の期間	• 低減したステップ数 • より短いＲＥＰ期間 • フラスコ間でのＴＩＬの閉鎖系移行 • 閉鎖系培地交換
採取	• 遠心分離により採取されたＴＩＬ	• ＬＯＶＯ自動細胞洗浄システムにより採取されたＴＩＬ	• 低減したステップ数 • 自動化細胞洗浄 • 閉鎖系 • 低減した洗浄中の産物喪失
最終製剤	• Ｈｙｐｏｔｈｅｒｍｏｓｏｌ中の新鮮な製品 • 単回注入バッグ • 制限された出荷安定性	• ＰｌａｓｍａＬｙｔｅ－Ａ＋１％ ＨＳＡ中の凍結保存された製品およびLN_2中に保存されたＣＳ１０ • 複数のアリコート • より長い出荷安定性	• 出荷の柔軟性 • 柔軟な患者スケジューリング • より適時の放出試験
全体推定処理時間	• ４３～５５日	• ２２日	• 患者へのより速いターンアラウンド

【図７】

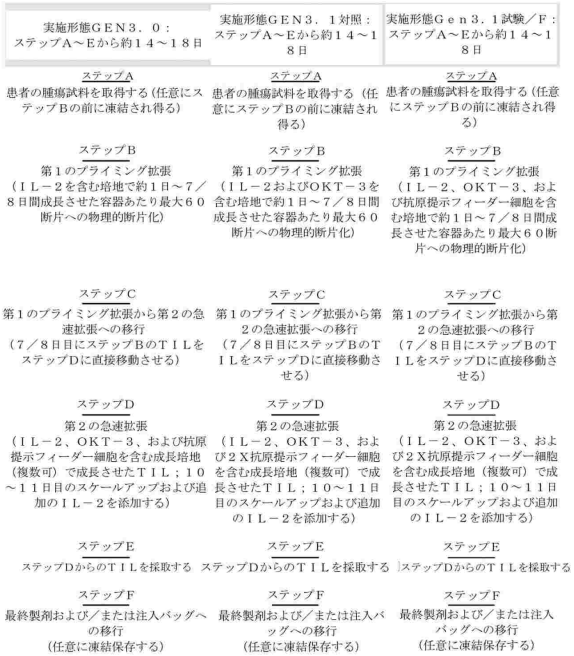


【図８Ａ】

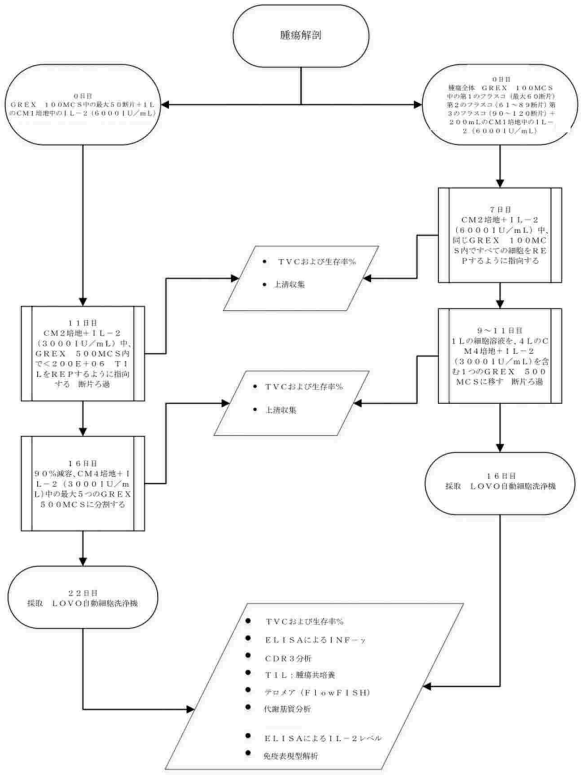
【図８Ｂ】



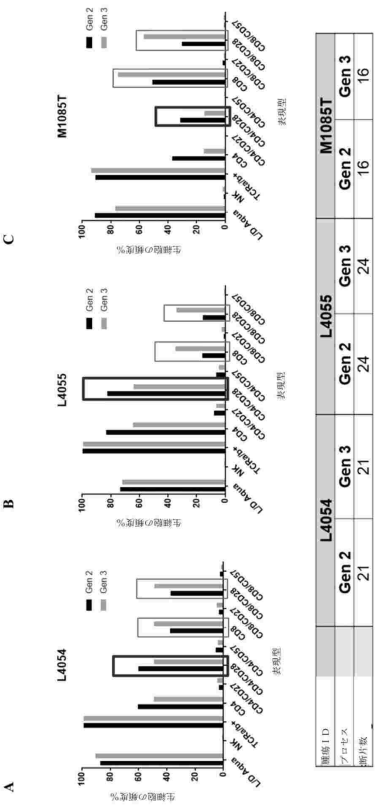
【図８Ｃ】



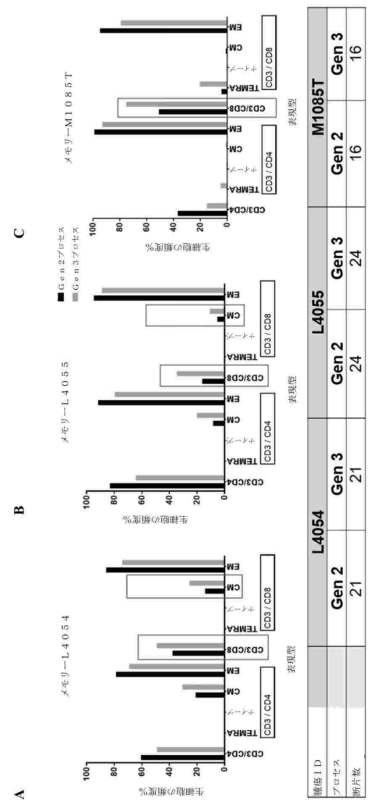
【図９】



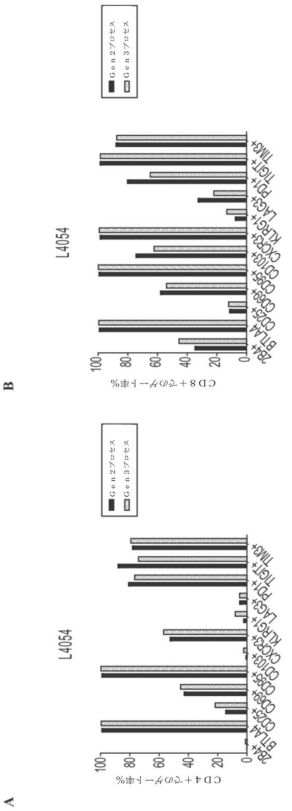
【図１０】



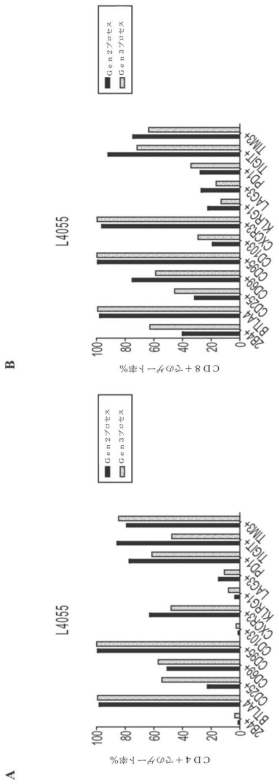
【図１１】



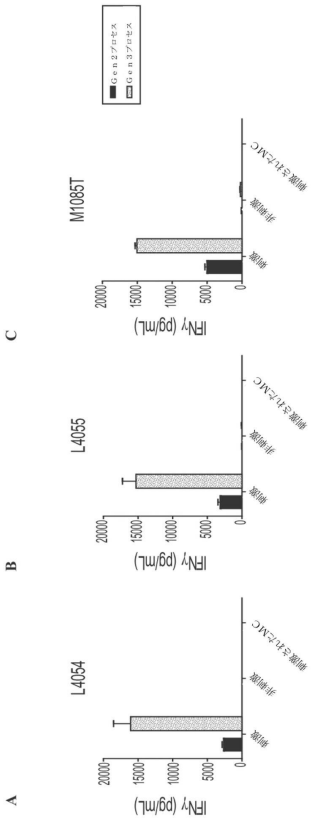
【図１２】



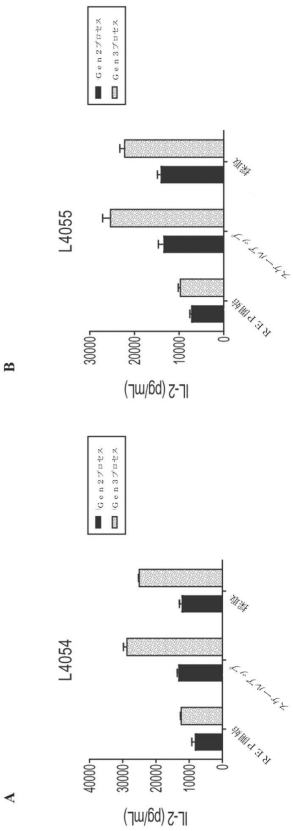
【図１３】



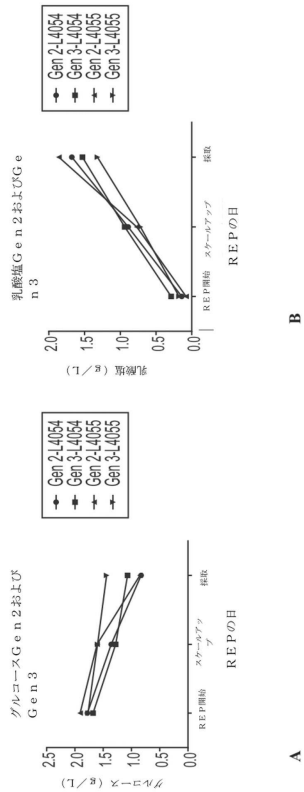
【図１４】



【図１５】

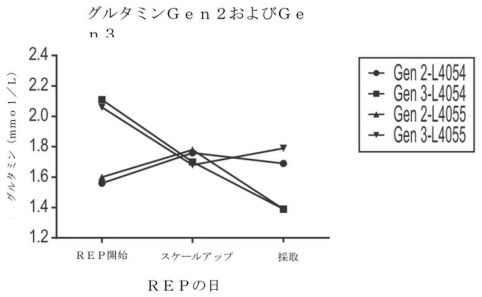


【図１６】



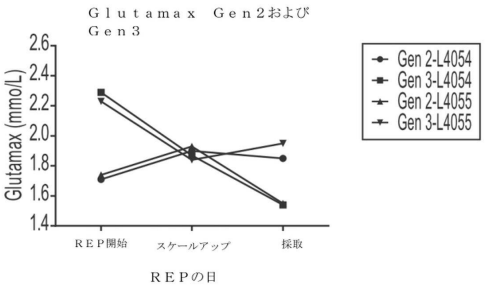
【図１７Ａ】

A



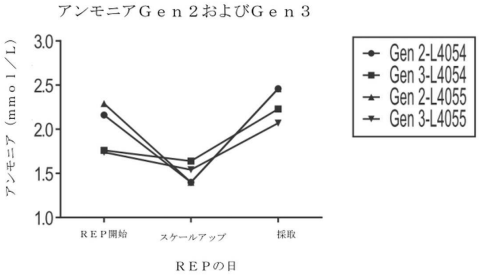
【図１７Ｂ】

B

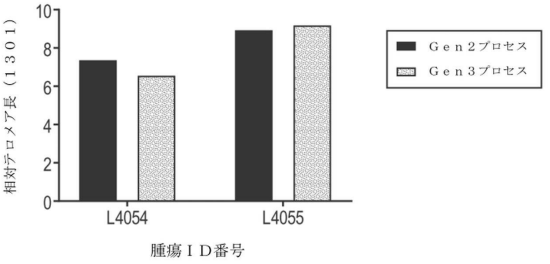


【図１７Ｃ】

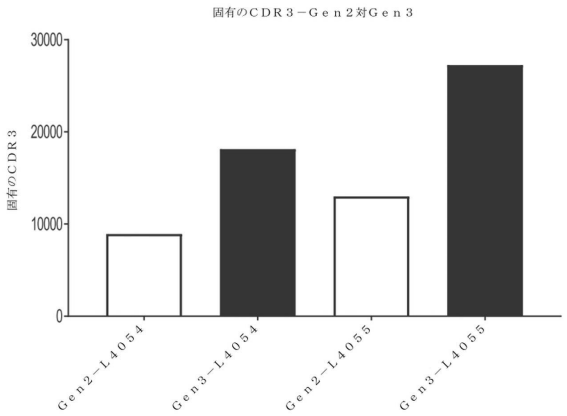
C



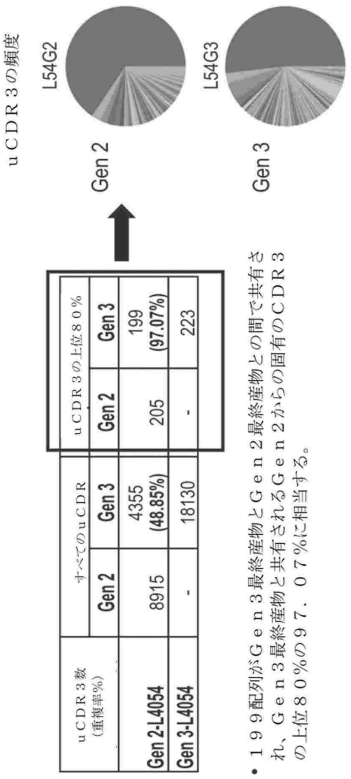
【図１８】



【図１９】



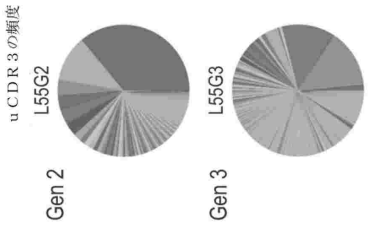
【図２０】



ｕＣＤＲ３数（重複率%）	すべてのｕＣＤＲ		ｕＣＤＲ３の上位８０%	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4054	8915	4355 (48.85%)	205	199 (97.07%)
Gen 3-L4054	-	18130	-	223

• １９９配列がＧｅｎ３最終産物とＧｅｎ２最終産物との間で共有され、Ｇｅｎ３最終産物と共有されるＧｅｎ２からの固有のＣＤＲ３の上位８０%の９７．０７%に相当する。

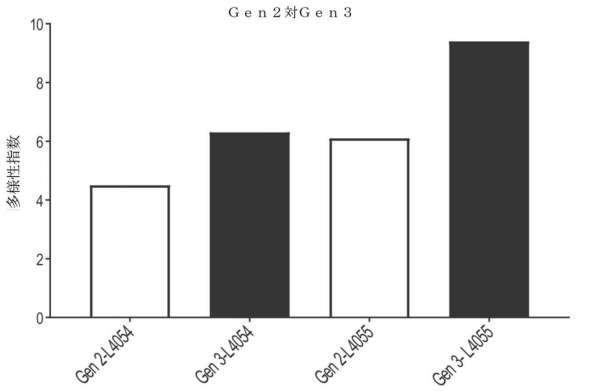
【図２１】



ｕＣＤＲ３数（重複率%）	すべてのｕＣＤＲ３		ｕＣＤＲ３の上位８０%	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4055	12996	6599 (50.77%)	1843	1833 (99.45%)
Gen 3-L4055	-	27246	-	2616

• １８３３配列がＧｅｎ３最終産物とＧｅｎ２最終産物との間で共有され、Ｇｅｎ３最終産物と共有されるＧｅｎ２からの固有のＣＤＲ３の上位８０%の９９．４５%に相当する。

【図２２】



【図２３】

細胞数　７日目－Ｇｅｎ３　ＲＥＰ開始

量（ｍＬ）		カウント１（細胞／ｍＬ）	カウント２（細胞／ｍＬ）	カウント３（細胞／ｍＬ）	平均（細胞／ｍＬ）	総細胞平均＊量
188	合計	2.46E+05	2.28E+05	2.31E+05	2.35E+05	4.42E+07
	生	2.37E+05	2.27E+05	2.26E+05	2.30E+05	4.32E+07
	死	9.26E+03	7.03E+02	4.63E+03	4.86E+03	9.14E+05
	生存率%	96.20%	99.70%	98.00%	97.97%	
188	合計	8.26E+04	8.00E+04	7.66E+04	7.97E+04	1.50E+07
	生	7.60E+04	7.54E+04	6.89E+04	7.34E+04	1.38E+07
	死	6.61E+03	4.63E+03	7.73E+03	6.32E+03	1.19E+06
	生存率%	92.00%	94.20%	89.90%	92.03%	
200	合計	2.44E+04	4.20E+04	1.05E+04	2.56E+04	5.13E+06
	生	1.74E+04	2.80E+04	7.03E+03	1.75E+04	3.50E+06
	死	7.03E+03	1.40E+04	3.48E+03	8.17E+03	1.63E+06
	生存率%	71.20%	66.70%	66.90%	68.27%	

【図２４】

［０００１］細胞数　１１日目－Ｇｅｎ２　ＲＥＰ開始およびＧｅｎ３スケールアップ

ID	量（ｍＬ）		カウント１（細胞／ｍＬ）	カウント３（細胞／ｍＬ）	カウント２（細胞／ｍＬ）	平均（細胞／ｍＬ）	総細胞平均＊量
Ｇｅｎ３　＃Ｌ４０５４　１回目	1000	合計	9.11E+05	1.01E+06	1.08E+06	1.00E+06	1.00E+09
		生	8.60E+05	9.34E+05	1.01E+06	9.35E+05	9.35E+08
		死	5.09E+04	7.49E+04	6.74E+04	6.44E+04	6.44E+07
		生存率%	94.40%	92.60%	93.70%	93.57%	
Ｇｅｎ３　＃Ｌ４０５５　２回目	1000	合計	8.56E+05	9.04E+05	8.81E+05	8.80E+05	8.80E+08
		生	8.24E+05	8.67E+05	8.42E+05	8.44E+05	8.44E+08
		死	3.17E+04	3.70E+04	3.87E+04	3.58E+04	3.58E+07
		生存率%	96.30%	95.90%	95.60%	95.93%	
Ｇｅｎ３　＃Ｍ１０８５Ｔ	200	合計	2.32E+06	2.25E+06		2.29E+06	4.57E+08
		生	1.68E+06	1.57E+06		1.63E+06	3.25E+08
		死	6.41E+05	6.79E+05		6.60E+05	1.32E+08
		生存率%	72.40%	69.90%		71.15%	
Ｇｅｎ２　＃Ｌ４０５４　１回目	142	合計	1.08E+06	9.84E+05	1.00E+06	1.02E+06	1.45E+08
		生	1.06E+06	9.71E+05	9.79E+05	1.00E+06	1.42E+08
		死	2.05E+04	1.26E+04	2.12E+04	1.81E+04	2.57E+06
		生存率%	98.10%	98.70%	97.90%	98.23%	
Ｇｅｎ２　＃Ｌ４０５５　２回目	96	合計	2.93E+05	3.05E+05	2.64E+05	2.87E+05	2.76E+07
		生	2.88E+05	2.96E+05	2.55E+05	2.80E+05	2.68E+07
		死	4.72E+03	9.14E+03	8.26E+03	7.37E+03	7.08E+05
		生存率%	98.40%	97.00%	96.90%	97.43%	
Ｇｅｎ２　＃Ｍ１０８５Ｔ	200	合計	9.10E+04	5.60E+04		7.35E+04	1.47E+07
		生	8.05E+04	4.21E+04		6.13E+04	1.23E+07
		死	1.04E+04	1.39E+04		1.22E+04	2.43E+06
		生存率%	88.50%	75.20%		81.85%	

【図２５】

[0002] 細胞数　１６日目－Ｇｅｎ２スケールアップおよびＧｅｎ３採取

ID	量（ｍＬ）		カウント１（細胞／ｍＬ）	カウント２（細胞／ｍＬ）	カウント３（細胞／ｍＬ）	平均（細胞／ｍＬ）	総細胞平均＊量
Ｇｅｎ３　＃Ｌ４０５４　１回目－ＬＯＶＯ前	1243.1	合計	1.40E+07	1.46E+07		1.43E+07	1.78E+10
		生	1.32E+07	1.35E+07		1.34E+07	1.66E+10
		死	8.47E+05	1.12E+06		9.84E+05	1.22E+09
		生存率%	94.00%	92.40%		93.20%	
Ｇｅｎ３　＃Ｌ４０５４　１回目－ＬＯＶＯ後	330	合計	6.35E+07	6.07E+07		6.21E+07	2.05E+10
		生	5.72E+07	5.44E+07		5.58E+07	1.84E+10
		死	6.35E+06	6.27E+06		6.31E+06	2.08E+09
		生存率%	90.00%	89.70%		89.85%	

ID	量（ｍＬ）		カウント１（細胞／ｍＬ）	カウント２（細胞／ｍＬ）	カウント３（細胞／ｍＬ）	平均（細胞／ｍＬ）	総細胞平均＊量
Ｇｅｎ３　＃Ｌ４０５５　２回目－ＬＯＶＯ前	1032.6	合計	9.49E+06	1.05E+07		1.00E+07	1.03E+10
		生	8.90E+06	9.79E+06		9.35E+06	9.65E+09
		死	5.85E+05	6.75E+05		6.30E+05	6.51E+08
		生存率%	93.80%	93.60%		93.70%	
Ｇｅｎ３　＃Ｌ４０５５　２回目－ＬＯＶＯ後	330	合計	3.31E+07	2.82E+07	3.18E+07	3.07E+07	1.01E+10
		生	2.85E+07	2.46E+07	2.77E+07	2.66E+07	8.76E+09
		死	4.56E+06	3.61E+06	4.12E+06	4.09E+06	1.35E+09
		生存率%	86.20%	87.20%	87.10%	86.70%	

ID	量（ｍＬ）		カウント１（細胞／ｍＬ）	カウント２（細胞／ｍＬ）	カウント３（細胞／ｍＬ）	平均（細胞／ｍＬ）	総細胞平均＊量
Ｇｅｎ３　＃Ｍ１０８５　ＬＯＶＯ前	5000	合計	2.26E+06	2.64E+06		2.45E+06	1.23E+10
		生	1.97E+06	2.31E+06		2.14E+06	1.07E+10
		死	2.85E+05	3.30E+05		3.08E+05	1.54E+09
		生存率%	87.40%	87.50%		87.45%	
Ｇｅｎ３　＃１０８５Ｔ－ＬＯＶＯ後、ＣＳ１０前の添加	150	合計	6.27E+07	5.44E+07		5.86E+07	8.78E+09
		生	5.50E+07	4.74E+07		5.12E+07	7.68E+09
		死	7.70E+06	6.96E+06		7.33E+06	1.10E+09
		生存率%	87.70%	87.20%		87.45%	

ID	量（ｍＬ）		カウント１（細胞／ｍＬ）	カウント２（細胞／ｍＬ）	カウント３（細胞／ｍＬ）	平均（細胞／ｍＬ）	総細胞平均＊量
Ｇｅｎ２　＃Ｌ４０５４　１回目	913	合計	3.53E+06	4.30E+06		3.92E+06	3.57E+09
		生	3.35E+06	4.00E+06		3.68E+06	3.36E+09
		死	1.75E+05	3.03E+05		2.39E+05	2.18E+08
		生存率%	95.00%	93.00%		94.00%	
Ｇｅｎ２　＃Ｌ４０５５　２回目	292	合計	1.29E+07	1.36E+07		1.33E+07	3.87E+09
		生	1.16E+07	1.23E+07		1.20E+07	3.49E+09
		死	1.27E+06	1.23E+06		1.25E+06	3.65E+08
		生存率%	90.10%	90.90%		90.50%	
Ｇｅｎ２　＃Ｍ１０８５Ｔ	369	合計	6.75E+06	6.98E+06		6.87E+06	2.53E+09
		生	5.22E+06	5.58E+06		5.40E+06	1.99E+09
		死	1.54E+06	1.40E+06		1.47E+06	5.42E+08
		生存率%	77.20%	79.90%		78.55%	

【図２６】

[0003] 細胞数　２２日目－Ｇｅｎ２採取

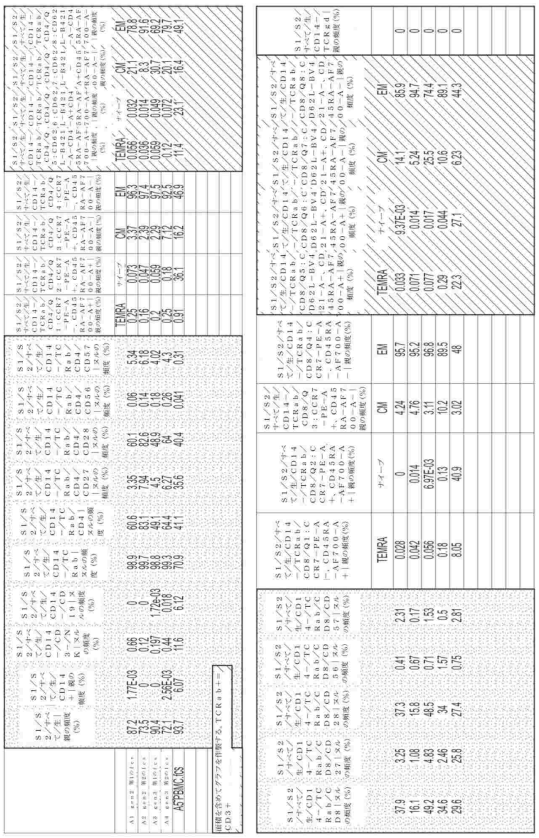
ID	量（ｍＬ）		カウント１（細胞／ｍＬ）	カウント２（細胞／ｍＬ）	カウント３（細胞／ｍＬ）	平均（細胞／ｍＬ）	総細胞平均＊量
Ｇｅｎ２　＃Ｌ４０５４　１回目－ＬＯＶＯ前	1385.7	合計	3.55E+07	4.12E+07	4.03E+07	3.90E+07	5.40E+10
		生	3.26E+07	3.73E+07	3.67E+07	3.55E+07	4.92E+10
		死	2.93E+06	3.87E+06	3.59E+06	3.46E+06	4.80E+09
		生存率%	91.70%	90.60%	91.10%	91.13%	
Ｇｅｎ３　＃Ｌ４０５４　１回目－ＬＯＶＯ後	330	合計	1.70E+08	1.79E+08	1.68E+08	1.72E+08	5.69E+10
		生	1.49E+08	1.58E+08	1.48E+08	1.52E+08	5.01E+10
		死	2.16E+07	2.04E+07	2.00E+07	2.07E+07	6.82E+09
		生存率%	87.30%	88.60%	88.10%	87.95%	

ID	量（ｍＬ）		カウント１（細胞／ｍＬ）	カウント２（細胞／ｍＬ）	カウント３（細胞／ｍＬ）	平均（細胞／ｍＬ）	総細胞平均＊量
Ｇｅｎ２　＃Ｌ４０５５　１回目－ＬＯＶＯ前	1968.2	合計	3.15E+07	2.51E+07	2.97E+07	2.88E+07	5.66E+10
		生	2.89E+07	2.25E+07	2.72E+07	2.62E+07	5.16E+10
		死	2.57E+06	2.61E+06	2.52E+06	2.57E+06	5.05E+09
		生存率%	91.80%	89.60%	91.50%	90.97%	
Ｇｅｎ２　＃Ｌ４０５５　１回目－ＬＯＶＯ後	330	合計	2.33E+08	1.89E+08	1.53E+08	1.92E+08	6.33E+10
		生	2.03E+08	1.66E+08	1.33E+08	1.67E+08	5.52E+10
		死	3.00E+07	2.24E+07	1.94E+07	2.39E+07	7.90E+09
		生存率%	87.10%	88.10%	87.30%	87.50%	

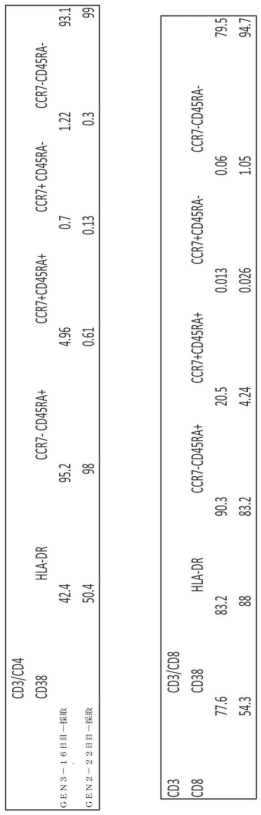
ID	量（ｍＬ）		カウント１（細胞／ｍＬ）	カウント２（細胞／ｍＬ）	カウント３（細胞／ｍＬ）	平均（細胞／ｍＬ）	総細胞平均＊量
Ｇｅｎ２　＃Ｍ１０８５Ｔ－ＬＯＶＯ前	Ｎ／Ａ	合計				#DIV/0!	#DIV/0!
		生				#DIV/0!	#DIV/0!
		死				#DIV/0!	#DIV/0!
		生存率%				#DIV/0!	
Ｇｅｎ２　＃１０８５Ｔ－ＬＯＶＯ後、ＣＳ１０前の添加	150	合計	8.51E+07	9.05E+07		8.78E+07	1.32E+10
		生	7.33E+07	7.79E+07		7.56E+07	1.13E+10
		死	1.18E+07	1.26E+07		1.22E+07	1.83E+09
		生存率%	86.10%	86.10%		86.10%	

Ｌ４０５４　Ｇｅｎ２の場合、研究の総数であったため、ＬＯＶＯ後のカウントを４つのフラスコに外挿した。１つのフラスコが汚染され、合計＝６．６７Ｅ＋１０について外挿を行った

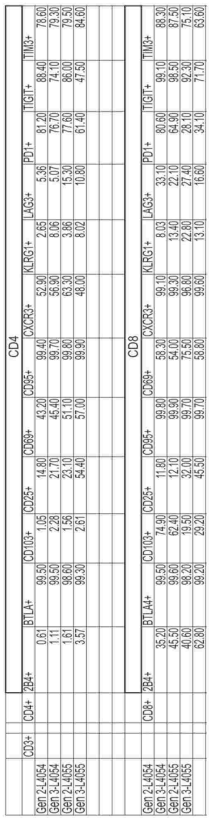
【図２７】



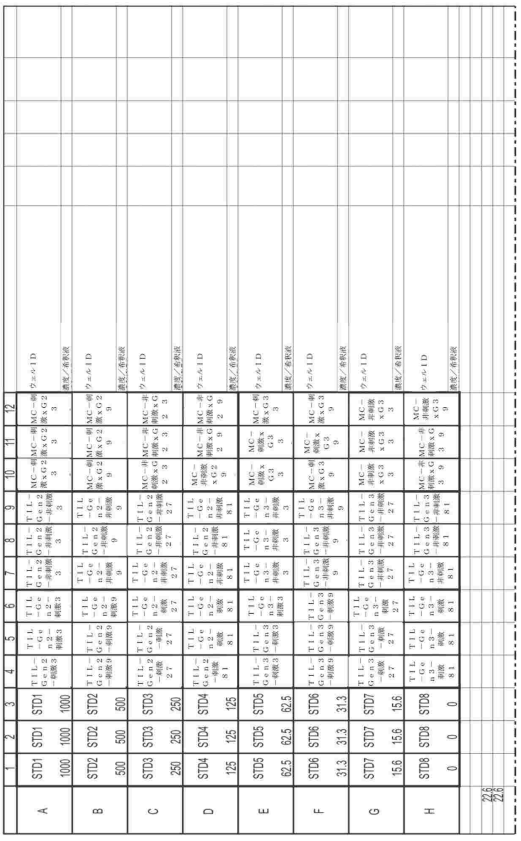
【図２８】



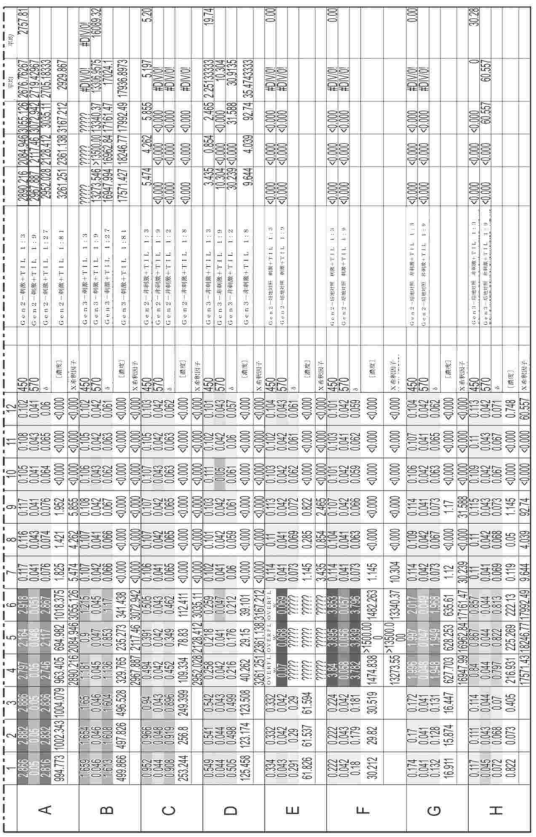
【図２９】



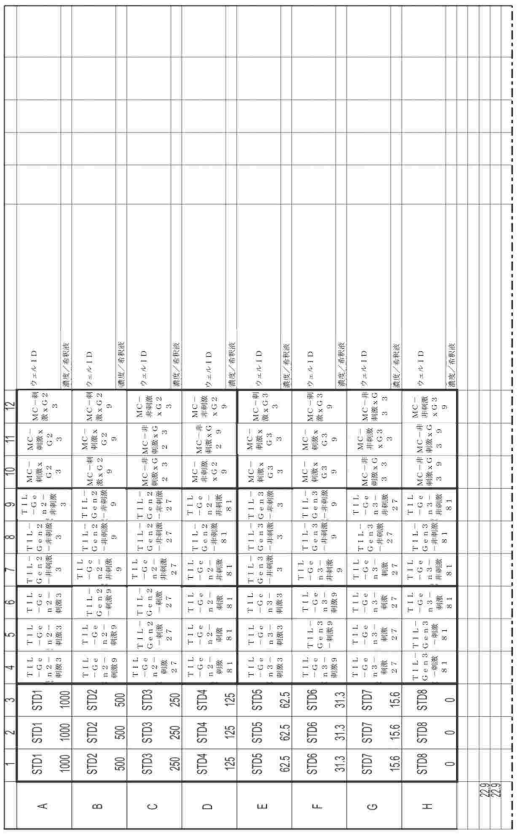
【図３０Ａ】



【図３０Ｂ】

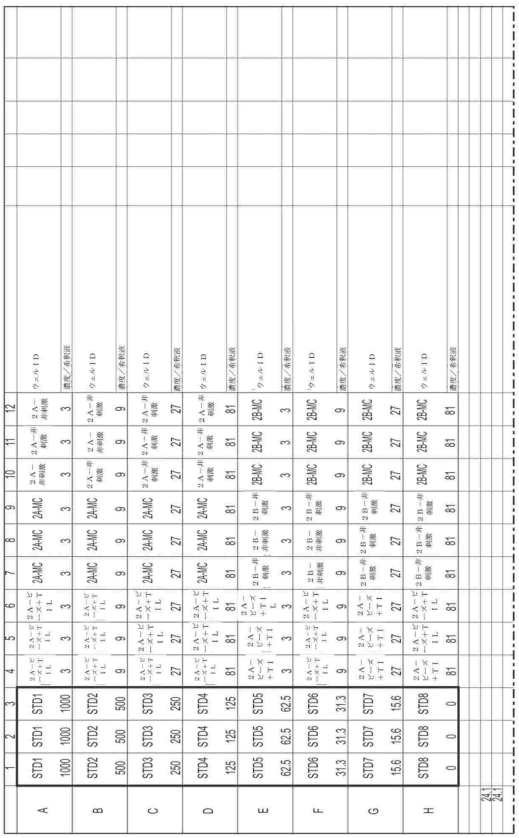


【図３１Ａ】

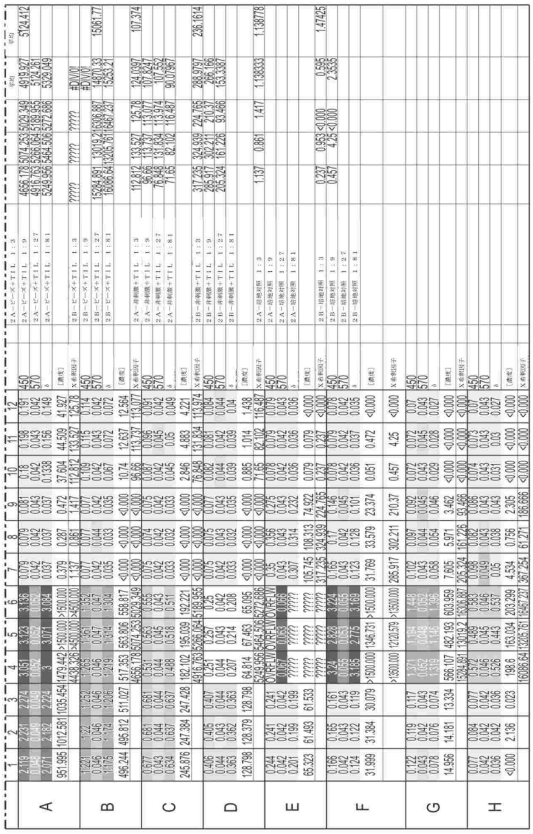


【図３１Ｂ】

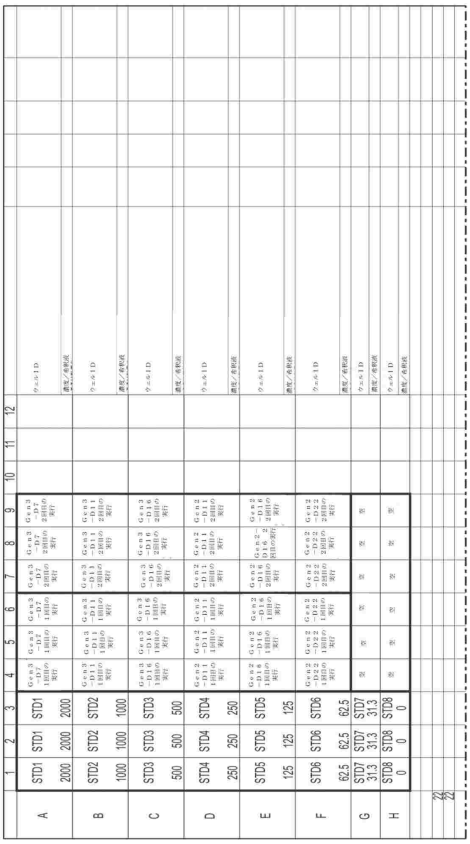
【図３２Ａ】



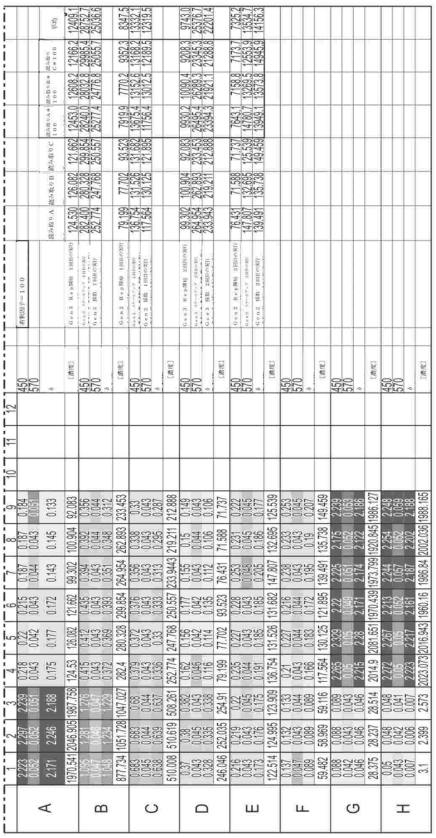
【図３２Ｂ】



【図３３Ａ】



【図３３Ｂ】



【図３４】

試料番号#	説明	グルコース (g／L)	乳酸塩 (g／L)	アンモニア (mmol／L)	グルタミン (mmol／L)	Glutamax (mmol／L)	Glutamax x−グルタミン (mmol／L)
1	Gen2−Rep開始 1回目の実行#L4054	1.78	0.14	2.16	1.56	1.71	0.16
2	Gen2−スケールアップ 1回目の実行#L4054	1.36	0.89	1.40	1.76	1.90	0.15
3	Gen2−採取 1回目の実行#L4054	0.83	1.68	2.46	1.69	1.85	0.17
4	Gen3−REP開始 1回目の実行#L4054	1.68	0.29	1.76	2.11	2.29	0.18
5	Gen3−スケールアップ 1回目の実行#L4054	1.28	0.94	1.64	1.70	1.87	0.16
6	Gen3−採取 1回目の実行#L4054	1.07	1.53	2.23	1.39	1.54	0.14
7	Gen2−Rep開始 2回目の実行#L405	1.91	0.08	2.29	1.60	1.74	0.14
8	Gen2−スケールアップ 2回目の実行#L4055	1.61	0.77	1.40	1.78	1.93	0.15
9	Gen2−採取 2回目の実行#L4055	0.85	1.86	2.46	1.39	1.55	0.16
10	Gen3−REP開始 2回目の実行#L4055	1.77	0.18	1.74	2.06	2.23	0.17
11	Gen3−スケールアップ 2回目の実行#L4055	1.60	0.72	1.54	1.68	1.84	0.15
12	Gen3−採取 2回目の実行#L4055	1.44	1.32	2.07	1.79	1.95	0.16

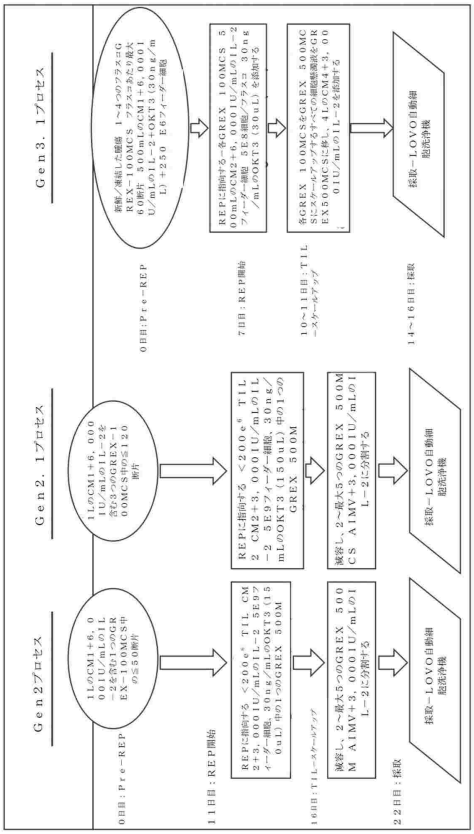
【図３５】

	$FIL	S／L／１３０１幾何	S／L／Pt幾何平均（FL03−A）
A1 gen2L 4054 neg	A1 gen2L4054 neg.fcs	34.5	3.24
A2 gen2L 4054 neg	A2 gen2L4054 neg.fcs	34	3.19
A3 gen2L 4054 pos	A3 gen2L4054 pos.fcs	1834	70.6
A4 gen2L 4054 pos	A4 gen2L4054 pos.fcs	1872	70.3
A5 gen2L 4055 neg	A5 gen2L4055 neg.fcs	31.9	4.23
A6 gen2L 4055 neg	A6 gen2L4055 neg.fcs	32.4	4.87
A7 gen2L 4055 pos	A7 gen2L4055 pos.fcs	1941	88.7
A8 gen2L 4055 pos	A8 gen2L4055 pos.fcs	1933	91.1
B1 gen3L 4054 neg	B1 gen3L4054 neg.fcs	31.2	3.45
B2 gen3L 4054 neg	B2 gen3L4054 neg.fcs	31.9	3.39
B3 gen3L 4054 pos	B3 gen3L4054 pos.fcs	2016	61.3
B4 gen3L 4054 pos	B4 gen3L4054 pos.fcs	2014	76.2
B5 gen3L 4055 neg	B5 gen3L4055 neg.fcs	33.7	6.76
B6 gen3L 4055 neg	B6 gen3L4055 neg.fcs	35.4	6.7
B7 gen3L 4055 pos	B7 gen3L4055 pos.fcs	2158	99.4
B8 gen3L 4055 pos	B8 gen3L4055 pos.fcs	1938	99.5
平均	−	998	43.3
標準偏差	−	999	41.3

【図３６】

研究	試料	試料ID	種	組	読み取り値	CDR3	固有のCDR3	D50
20180511_研究1_FCA	Gen2−L4054	59990	TRB	h	1181732	1181732	8915	0
20180511_研究1_FCA	Gen3−L4054	59991	TRB	h	1145697	1145697	18130	0
20180511_研究1_FCA	Gen2−L4055	59987	TRB	h	1166465	1166465	12996	0.1
20180511_研究1_FCA	Gen3−L4055	59982	TRB	h	1059985	1059985	27246	0.9

【図３７】



【図３８】

ステップ	Gen2	Gen2．1	Gen3．0最適化
Pre REP−0日目	≦50断片／1G−Rex 100MCS−11日	≦180断片／3G−Rex，事前に配合されたCM1加温培地100MCS−11日	新鮮または凍結した腫瘍 1G−Rexあたり≦30断片〜最大60断片を有する 全腫瘍 100MCS（最大4つのG−Rex），事前に配合された加温培地−7BPreREP，フィーダー2．5 E8細胞+OKT−3（30ng/mL）
REP開始	REPに指向する−11日目−<200E6 TIL 1G−Rex 500MCS	REPに指向する−11日目−1つのG−Rex 500MCS中の<200e6 TIL 事前に配合されたCM2加温培地	REPに指向する−7日目−すべての細胞 TIL−同じG−Rex 100MCS（100MCS、最大4つのGREX）、標準培地または合成培地（無血清）フィーダー−5E8細胞+OKT−3（30ng/mL）を添加する
TIL増殖またはスケールアップ	1〜5つのG−REX 500MCS 16日に分割する	2〜5つのG−REX 500MCS事前に配合されたCM4加温培地	G−REX 100MCSからTIL懸濁液をG−REX 500MCSに移す、最大4つのGREX 500MCS−16日目に分割する 標準培地または合成培地（無血清） 10または11日目にスケールアップする
採取	22日目に採取する、LOVO−自動細胞洗浄機	22日目に採取する、LOVO−自動細胞洗浄機（5洗浄サイクル）	14または16日目に採取する LOVO−自動細胞洗浄機（5洗浄サイクル）
最終製剤	凍結保存した製品 LN2複数アリコート中の300IU/mL IL−2−CS10	凍結保存した製品 LN2複数アリコート中の300IU/mL IL−2−CS10	凍結保存した製品 LN2複数アリコート中の300IU/mL 1L−2−CS10
プロセス時間	22日	22日	16日

【図３９】

プロセス日	条件	Gen 3.1
０日目－ｐｒｅＲＥＰ開始	培地ＣＭ１	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	OKT-3 (30ng/mL)	+
	フィーダー（２５０Ｅ＋０６）	+

プロセス日	条件	Gen 3.1
７日目－ＲＥＰ開始	培地ＣＭ２	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	７日目に添加されたＯＫＴ－３（３０ｎｇ／ｍＬ）	+
	７日目に添加されたフィーダー	500 E06
	日目の総フィーダー	750 E+06

プロセス日	条件	Gen 3.1
９～１１日目－スケールアップ	Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳからＴＩＬ懸濁液を１つのＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ（最大３つのＧＲＥＸ　５００ＭＣＳ）に移す	はい
１６日目－採取	ＬＯＶＯ自動細胞洗浄機	はい

【図４０】

プロセス比較	重要なプロセス変更	利点：
Ｇｅｎ２：Ｇｅｎ２．１	・１つのフラスコの代わりに２つのフラスコでプロセスを開始する ・ＲＥＰ開始フィーダー層を２つのＧ－Ｒｅｘ５００ＭＣＳフラスコに分割する ・培地を事前に配合し、使用前に温める	・ＴＩＬレパートリーの増加に伴う最終細胞数（用量）の潜在的な倍増 ・プロセス全体のプロセス冗長
Ｇｅｎ２．１：Ｇｅｎ３．１	・新鮮または凍結した腫瘍 ・１４～１６日プロセス（２２日から） ・プロセス上の総フィーダー層を低減する ・０日目に存在するフィーダー層およびＯＫＴ３ ・ＲＥＰを断片で開始した ・１００ＭＣＳを５００ＭＣＳにスケールする ・複数のｐｒｅ－ＲＥＰフラスコにスケールする ・標準培地または合成培地（無血清）	・増加した効力 ・改善した表現型 ・減少したプロセス時間 ・低減した試薬試験 ・減少したプロセス可変性 ・定義された試薬 ・増加したレパートリー ・不純物を低減する（フィーダー） ・同等または上り高い用量

【図４１】

プロセス比較	重要なプロセス変更	所望の改善	成功基準	成果
Ｇｅｎ２：Ｇｅｎ３．０	・１４～１６日 ・最大４つのフラスコで断片によりＲＥＰを開始する ・１００ＭＣＳを５００ＭＣＳにスケールする	・増加した効力 ・改善した表現型 ・減少したプロセス時間	・ＩＮＦ－ｇによって測定される効力を増加させる✓ ・同等の表現型✓ ・同等の用量✓ ・同等の純度✓（フィーダー細胞） ・クローン多様性を維持する✓	・Ｇｅｎ２を超えて増加した効力 ・改善したＣＤ８細胞上のＣＤ２８の発現 ・Ｇｅｎ３．１上で１６日目までに到達したフラスコの最大能力 ・低減したフィーダー細胞用途 ・増加した多様性

【図４２】

プロセス	Gen 3	Gen 3.1 control	Gen 3.1
L4063	標準培地	標準培地	標準培地
L4064	合成培地	合成培地	合成培地

合成培地：

プロセスの各日におけるＣＴＳ　Ｏｐｔｉｍｉｚｅｒ（無血清培地）

プロセス	Gen 2	Gen 3
L4054	標準培地	標準培地
L4055	標準培地	標準培地
M1085T	標準培地	標準培地

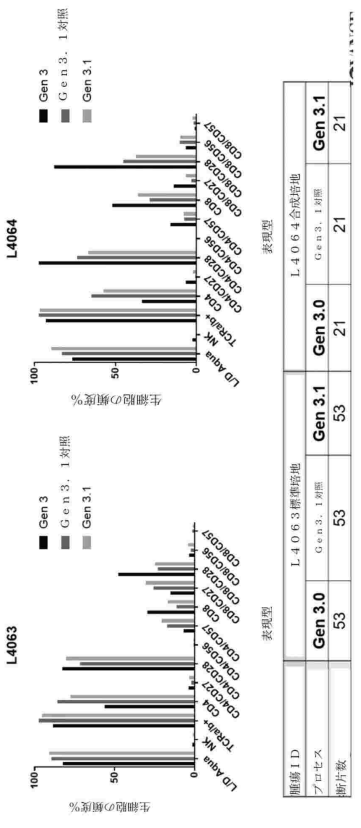
標準培地：

Pre REP: CM1

ＲＥＰ開始：ＣＭ２

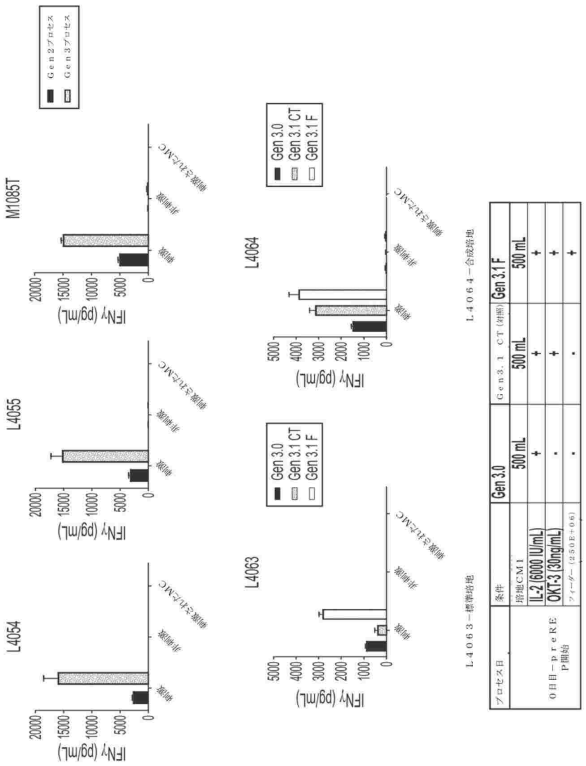
分割またはスケールアップ：ＣＭ４

【図４３】

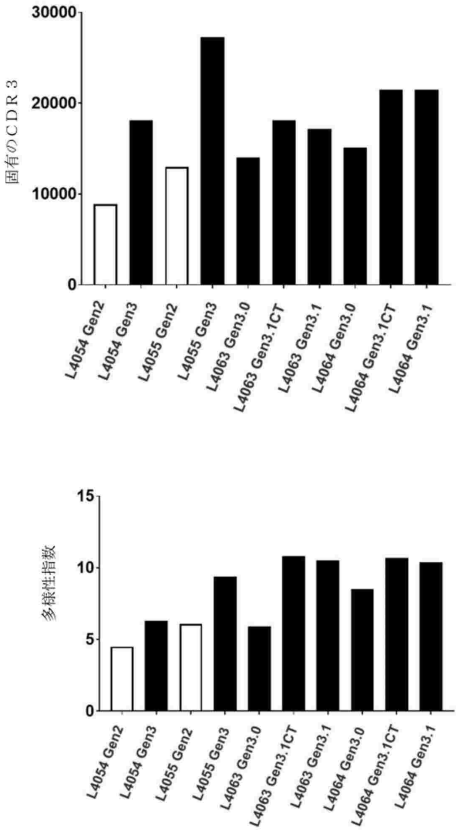


細胞ＩＤ	Ｌ４０６３標準培地			Ｌ４０６４合成培地		
プロセス	Gen 3.0	Ｇｅｎ３．１対照	Gen 3.1	Gen 3.0	Ｇｅｎ３．１対照	Gen 3.1
断片数	53	53	53	21	21	21

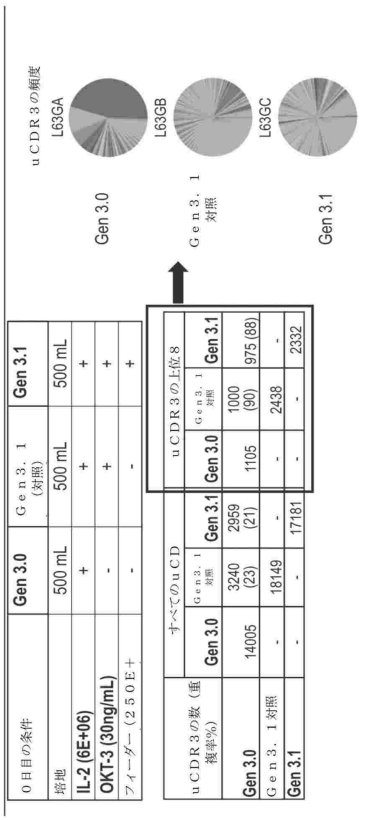
【図４４】



【図４５】



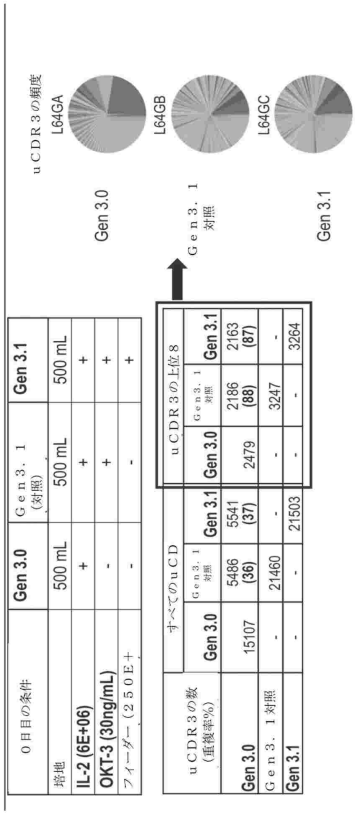
【図４６】



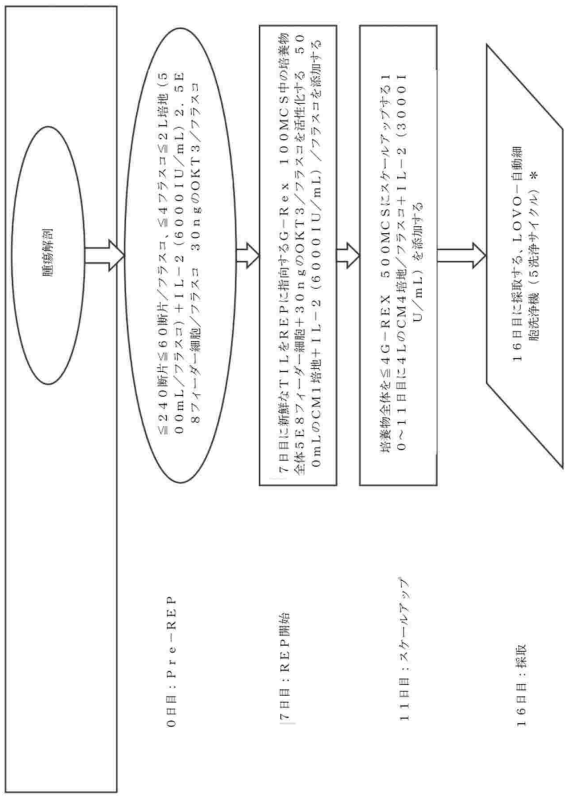
０日目の条件	Gen 3.0	Ｇｅｎ３．１（対照）	Gen 3.1
培地	500 mL	500 mL	500 mL
IL-2 (6E+06)	+	+	+
OKT-3 (30ng/mL)	-	+	+
フィーダー（２５０Ｅ＋	-	-	+

ｕＣＤＲ３の数（重複率%）	すべてのｕＣＤ			ｕＣＤＲ３の上位８		
	Gen 3.0	Ｇｅｎ３．１対照	Gen 3.1	Gen 3.0	Ｇｅｎ３．１対照	Gen 3.1
Gen 3.0	14005	3240 (23)	2959 (21)	1105	1000 (90)	975 (88)
Ｇｅｎ３．１対照	-	18149	-	-	2438	-
Gen 3.1	-	-	17181	-	-	2332

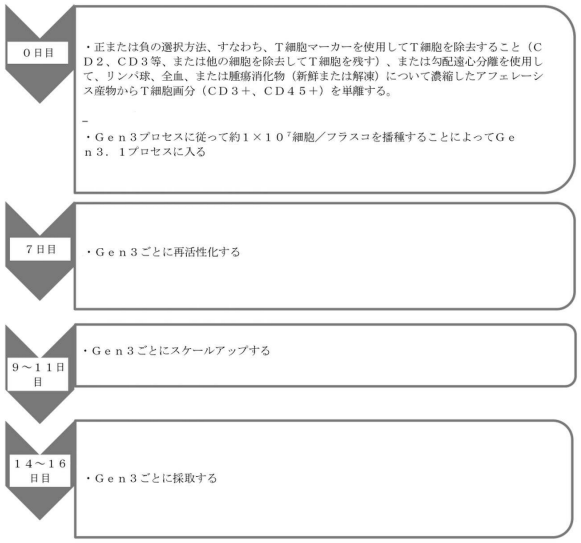
【図４７】



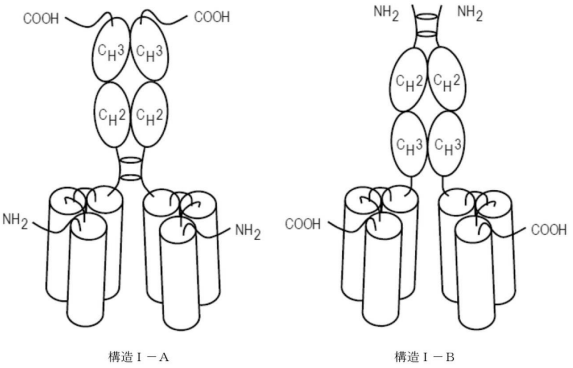
【図４８】



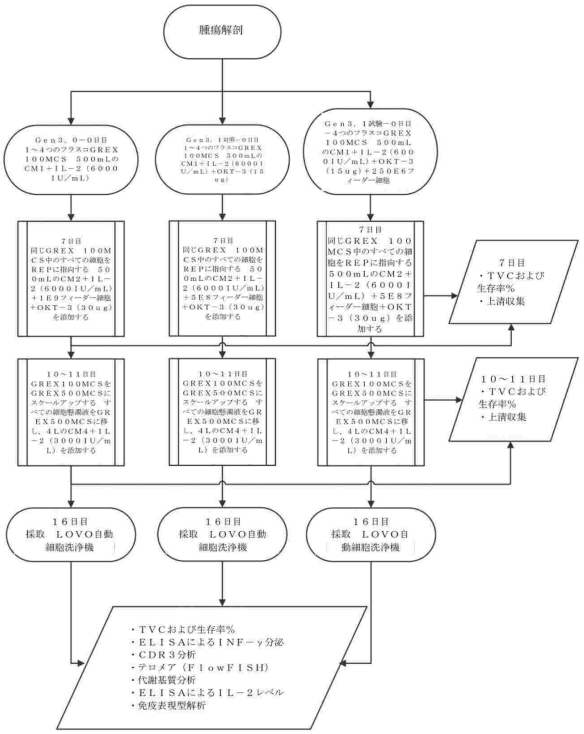
【図４９】



【図５０】



【図５１】



【図５２】

プロセス日	条件	Ｇｅｎ３．１試験
０日目−ｐｒｅＲＥＰ開始	培地ＣＭ１	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	OKT-3 (15 ug)	+
	フィーダー（２５０Ｅ＋０６）	+

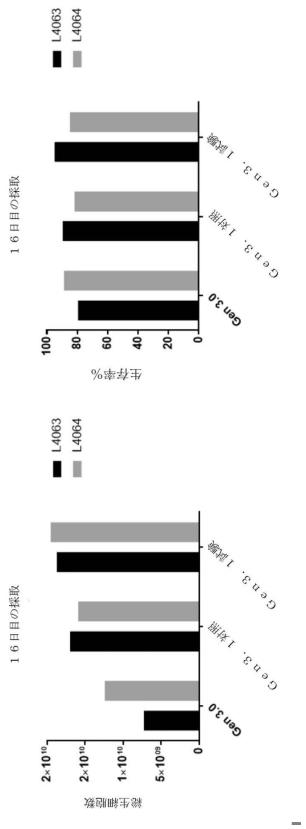
プロセス日	条件	Ｇｅｎ３．１試験
７日目−ＲＥＰ開始	培地ＣＭ２	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	７日目に添加されたＯＫＴ−３（３０ｎｇ／ｍＬ）	+
	７日目に添加されたフィーダー	500 E06
	目の総フィーダー	750 E+06

プロセス日	条件	Ｇｅｎ３．１試験
９〜１１日目−スケールアップ	Ｇ−ＲＥＸ１００ＭＣＳからＴＩＬ懸濁液を１つのＧ−ＲＥＸ ５００ＭＣＳ（成大３つのＧＲＥＸ ５００ＭＣＳ）に移す	はい
１６日目−採取	ＬＯＶＯ自動細胞洗浄機	はい

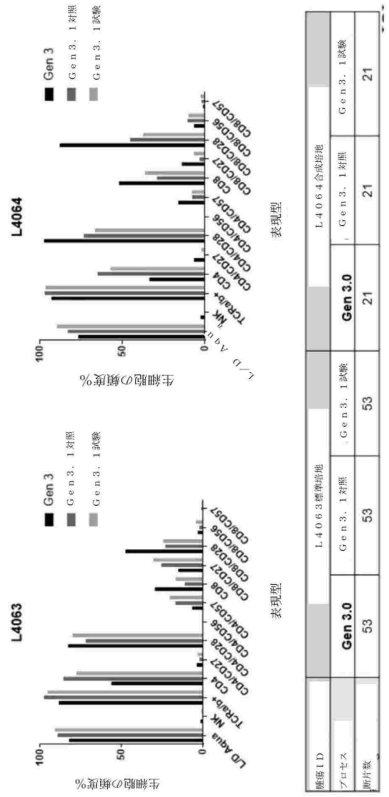
【図５３】

腫瘍ＩＤ	標準培地中のＬ４０６３			ＣＴＳ Ｏｐｔｉｍｉｚｅｒ培地中のＬ４０６４		
プロセス	Gen 3.0	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験	Gen 3.0	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
断片の数	53	53	53	21	21	21
断片あたりの平均ＴＶＣ	1.37E+08	3.19E+08	3.53E+08	5.90E+08	7.57E+08	9.29E+08
採取の生存率％	79.53%	89.43%	94.80%	88.80%	81.90%	84.90%
ＴＶＣ採取	7.26E+09	1.69E+10	1.87E+10 *	1.24E+10	1.59E+10	1.95E+10 *

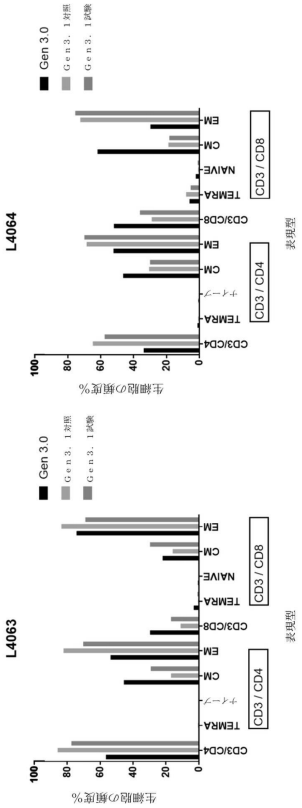
【図５４】



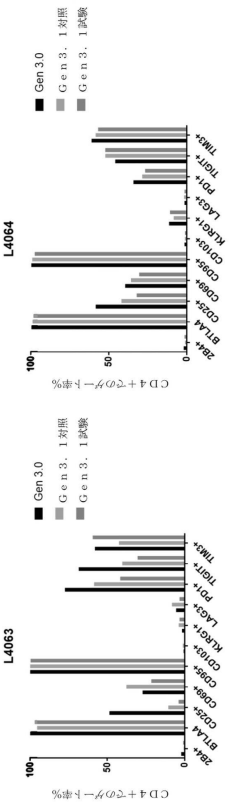
【図５５】



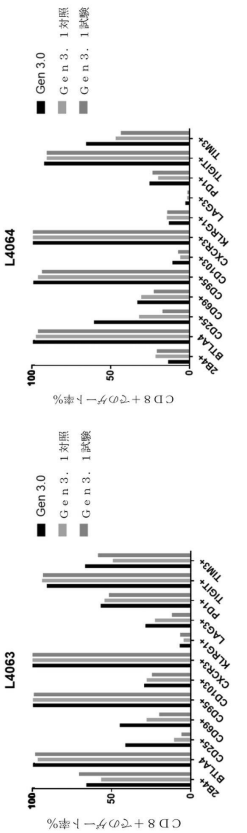
【図５６】



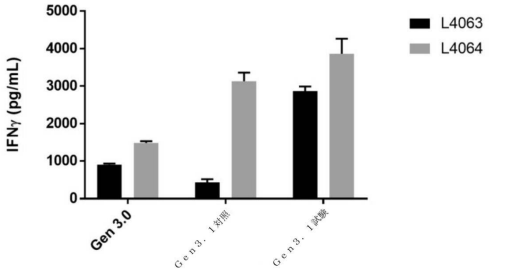
【図５７】



【図５８】

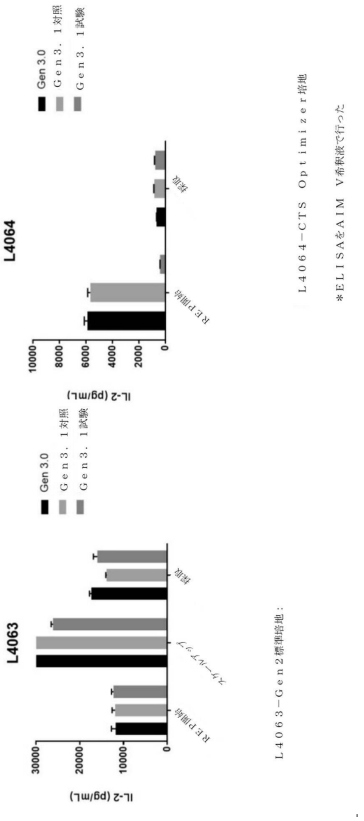


【図５９】

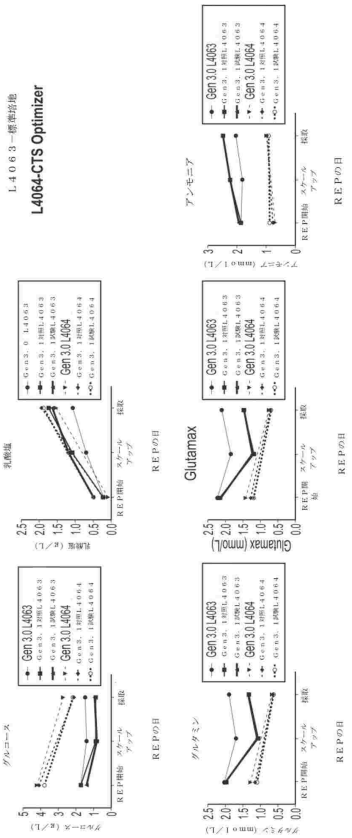


プロセス日	条件	Gen 3.0	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
０日目－ｐｒｅＲＥＰ開始	培地ＣＭ１	500 mL	500 mL	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+	+	+
	OKT-3 (30ng/mL)	-	+	+
	フィーダー（２５０Ｅ＋０６）	-	-	+

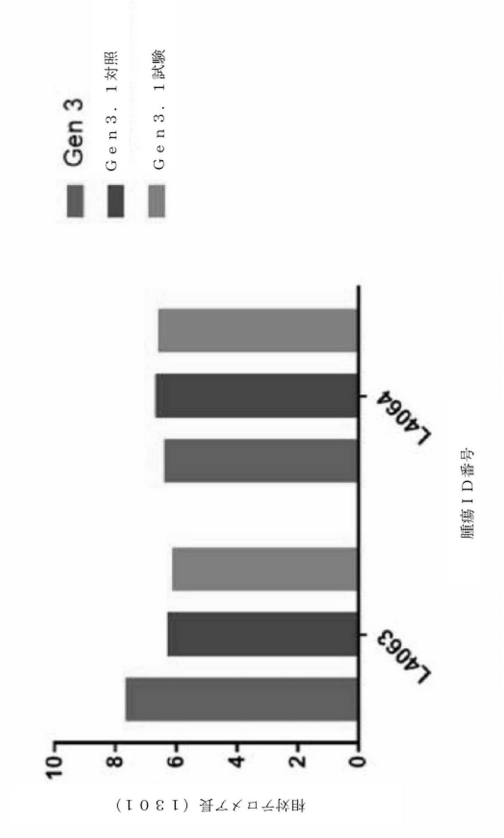
【図６０】



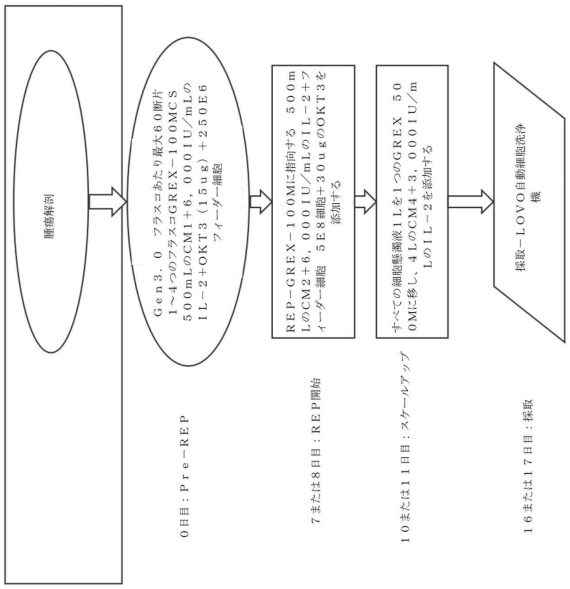
【図６１】



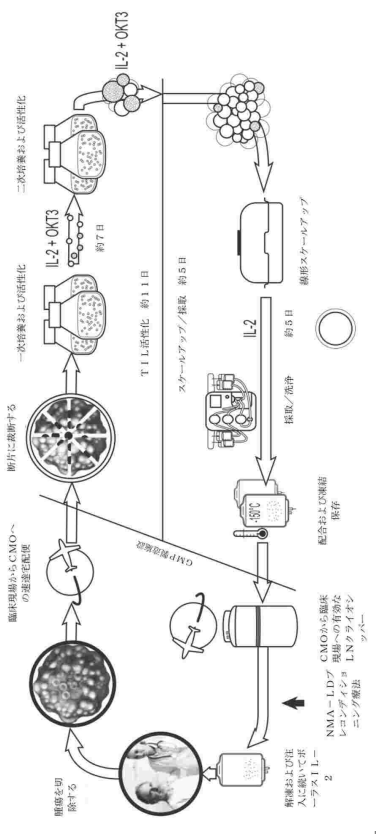
【図６２】



【図６３】



【図６４】



【図６５Ａ】

	Ｇｅｎ２	Ｇｅｎ３
総培養時間	２２日	１６～１７日
Ｐｒｅ－ＲＥＰ		
断片／フラスコ	１フラスコ中≦６０断片	最大４つのフラスコ中≦６０断片／フラスコ
培地量	１Ｌ－単回添加	１Ｌ－２×５００ｍＬ添加
標的ｐｒｅＲＥＰ細胞数	≦２００ｅ６　ＴＩＬ	連続プロセスを通じて選ばれるすべての細胞
スクリーニング	スクリーニングなし	スクリーニングなし
フラスコの選択	選択なし	Ｂａｃ－下無菌、汚染物質について目視確認
ＲＥＰ／スケールアップ		
フィーダー	≧４０％低減した	≧４０％低減した
培地	ＨＳＡＢを含有する	従来通り
スケールアップ	プールした培養物 ５日目に５００ｍＬに減容し、最大５つのフラスコに分割する（２５００ｃｍ２）	最終にスケールされ、サプランポーネントとして低 閉じたフラスコ
ＯＫＴ３	１５０ｕｇ	最大スケールで≦１８０ｕｇ
ＩＬ２	高用量	高用量
フラスコの数	１～５	１～４
採取－減容	閉鎖１０：１	閉鎖１０：１
濃縮／洗浄	ＬＯＶＯ　１００：１	ＬＯＶＯ　１０００：１
配合	１：１　ＣＳ１０（５％　ＤＭＳＯ）	１：１　ＣＳ１０（５％　ＤＭＳＯ）
出荷	気相ＬＮ	気相ＬＮ
注入	解凍したＩＶ重力	解凍したＩＶ重力

【図６５Ｂ】

	Ｇｅｎ２	Ｇｅｎ３
総培養時間	２２日	１６
断片培養		
断片／フラスコ	１フラスコ中≦６０断片	最大４つのフラスコ中≦６０断片／フラスコ
培地量	１Ｌ－単回添加	１Ｌ－２×５００ｍＬ添加
標的ｐｒｅＲＥＰ細胞数	≦２００ｅ６　ＴＩＬ	連続プロセスを通じて選ばれるすべての細胞
スクリーニング	スクリーニングなし	スクリーニングなし
フラスコの選択	選択なし	Ｂａｃ－下無菌、汚染物質について目視確認
ＲＥＰ／スケールアップ		
フィーダー	≧４０％低減した	≧４０％低減した
培地	ＨＳＡＢを含有する	従来通り
スケールアップ	プールした培養物 ５日目に５００ｍＬに減容し、最大５つのフラスコに分割する（２５００ｃｍ２）	最終にスケールされ、サプランポーネントとして低 閉じたフラスコ
ＯＫＴ３	１５０ｕｇ	最大スケールで≦１８０ｕｇ
ＩＬ２	高用量	高用量
フラスコの数	１～５	１～４
採取－減容	閉鎖１０：１	閉鎖１０：１
濃縮／洗浄	ＬＯＶＯ　１００：１	ＬＯＶＯ　１０００：１
配合	１：１　ＣＳ１０（５％　ＤＭＳＯ）	１：１　ＣＳ１０（５％　ＤＭＳＯ）
出荷	気相ＬＮ	気相ＬＮ
注入	解凍したＩＶ重力	解凍したＩＶ重力

【図６６】

【図６７】

【図６８】

16／17日目の試験のデータ要約

試験パラメーター	1回目の操作的実行　17日目　2019年3月10日	2回目の操作的実行　17日目　2019年3月11日	3回目の操作的実行　17日目　2019年3月25日	Gen 2 (n=47)		
				平均	中央値	標準偏差
LOVO前のTVC	17.3E+09	46.1E+09				
LOVO前の生存率%	90.5%	94.3%				
LOVO後のTVC	17.9E+09	59.4E+09	48.2E+09			
LOVO後の生存率%	85.3%	90.7%	89%			
TVC　LOVO後の回収率%	103.5%	128.9%				
%CD45+/CD3+	88.0%	98.3%				
IFNγ (pg/mL)	11,618	19,235		10,005	9,637	5,128
GzB (pg/mL)	11,326	27,441		19,929	16,040	
無菌	係属中（＊）	係属中（＊）				
エンドトキシン（総EU単位）	154.2 EU	195.9 EU				
マイコプラズマ	陰性	陰性				
グラム染色	生物は検出されなかった	生物は検出されなかった				

【図６９】

＊最大でTIL試料全体を添加する（100%生、CD14－、単球を除く）

特徴	操作的実行＃1	操作的実行＃2
NK細胞（CD3－CD56＋）（%）	10.9	1.5
B細胞（CD3－CD19＋）（%）	0.2	0.2
単球（CD14＋）（%）	0.0	0.0
TCRαβ (%)	87.1	96.3
TCRγδ (%)	1.2	1.6
合計	99.4	99.6

＊最大100%までTCRαβを添加する

特徴	操作的実行＃1	操作的実行＃2
ナイーブ：CCR7+CD45RA+（%）	0.0	0.1
T-EM: CCR7-CD45RA-(%)	92.2	84.4
T-CM: CCR7+CD45RA-(%)	7.7	15.5
T-EFF/TEMRA: CCR7-CD45RA+(%)	0.1	0.1
合計	100.0	100.0

＊最大100%までCD14－を添加する

特徴	操作的実行＃1	操作的実行＃2
TCRαβ+ CD4+ (%)	89.6	71.8
TCRαβ+ CD8+ (%)	10.0	27.8
合計	99.6	99.6

【図７０】

＊最大でＴＩＬ試料全体を添加する（１００％生、ＣＤ１４－、単球を除く）

特徴	ＰＤ実行＃１　Ｌ４０６３	ＰＤ実行＃２　Ｌ４０６４
ＮＫ細胞（ＣＤ３－ＣＤ５６＋）（%）	1.04	0.52
Ｂ細胞（ＣＤ３－ＣＤ１９＋）（%）	0.0076	0.013
単球（ＣＤ１４＋）（%）	0.032	0.043
TCRαβ (%)	95.5	96.7
TCRγδ (%)	2	1.86
合計	98.6	99.14

＊最大１００％までＴＣＲａｂを添加する

特徴	ＰＤ実行＃１　Ｌ４０６３	ＰＤ実行＃２　Ｌ４０６４
ナイーブ：ＣＣＲ７＋ＣＤ４５ＲＡ＋（%）	0.35	0.07
T-EM: CCR7-CD45RA-(%)	97.4	96.7
T-CM: CCR7+CD45RA-(%)	1.39	2.78
T-EFF/TEMRA: CCR7-CD45RA+(%)	0.88	0.44
合計	100.0	100.0

特徴	ＰＤ実行＃１　Ｌ４０６３	ＰＤ実行＃２　Ｌ４０６４
TCRαβ$^+$ CD4$^+$ (%)	77.5	57.4
TCRαβ$^+$ CD8$^+$ (%)	16.8	36.1
合計	94.3	93.5

【図７１】

特徴	OV-8025			OV-8026			OV-8028			OV-8022		
	FRER*	Gen 2^{Y}	Gen 3.1	FRER^{Y}	Gen 2	Gen 3.1	FRER	Gen 2^{Y}	Gen 3.1	FRER	Gen 2^{Y}	Gen 3.1*
純度												
Ｔ細胞（ＣＤ４５＋ＣＤ３＋）（%）	-	-	99.2	-	75.1	97.5	97	-	97.6	53.6	16.4	-
ＮＫ細胞（ＣＤ３$^-$ＣＤ５６$^+$）（%）	-	-	0.2	-	8.4	1.1	0.4	-	0.1	44.6	81.1	-
Ｂ細胞（ＣＤ３－ＣＤ１９＋）（%）	-	-	0	-	2.1	0	0	-	0	1.3	3.3	-
単球（ＣＤ１４＋）（%）	-	-	0	-	0.2	0	0	-	0	2	0.1	-
同一性Ｔ細胞												
TCR αβ (%)	-	-	98.8	-	71.9	96.4	98.7	-	99.4	52.2	12.4	-
TCR γδ (%)	-	-	0.3	-	0.8	0.6	0	-	0.1	0.1	0	-
CD3$^+$ CD4$^+$ (%)	-	-	85.7	-	53.1	81.5	81.8	-	92.3	77.3	48.6	-
CD3$^+$ CD8$^+$ (%)	-	-	12	-	23	14.4	15.5	-	5.2	16.6	26.1	-
メモリー表現型－ＴＣＲαβ＋												
ナイーブ：ＣＣＲ７＋ＣＤ４５ＲＡ＋（%）	-	-	0	-	0.4	0	2.1	-	0	0	0.1	-
T-EM: CCR7-CD45RA-(%)	-	-	98.5	-	88.7	97.5	93.6	-	97.1	89.1	93.8	-
T-CM: CCR7+CD45RA-(%)	-	-	1	-	7.5	0.6	1.9	-	2.5	0.1	0	-
T-EFF/TEMRA: CCR7-CD45RA+(%)	-	-	0.4	-	3.4	1.8	2.4	-	0.3	10.8	6.1	-

ＦＲ　ＥＲ、凍結腫瘍、初期ＲＥＰ

*、試験されない条件

^{Y}、サンプリング問題、低ＴＶＣ数または解凍時の非生細胞

【図７２】

特徴	階層	操作的実行＃１	操作的実行＃２
ＮＫ細胞（ＣＤ３－ＣＤ５６＋）（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＣＤ３－／ＮＫ｜ヌルの頻度（%）	10.9	1.5
Ｂ細胞（ＣＤ３－ＣＤ１９＋）（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＣＤ１９｜ヌルの頻度（%）	0.2	0.2
単球（ＣＤ１４＋）（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４＋｜親の頻度（%）	0.0	0.0
TCRαβ (%)	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ｜ヌルの頻度（%）	87.1	96.3
TCRγδ (%)	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ｜ヌルの頻度（%）	1.2	1.6
TCRαβ+CD4+ (%)	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ４｜親の頻度（%）	89.6	71.8
TCRαβ+CD8+ (%)	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ８｜親の頻度（%）	10.0	27.8
ナイーブ、ＣＣＲ７＋ＣＤ４５ＲＡ＋（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／Ｑ２：ＣＣＲ７＋、ＣＤ４５ＲＡ＋｜親の頻度（%）	0.0	0.1
T-EM: CCR7-CD45RA-(%)	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／Ｑ４：ＣＣＲ７－、ＣＤ４５ＲＡ－｜親の頻度（%）	92.2	84.4
T-CM: CCR7+CD45RA-(%)	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／Ｑ３：ＣＣＲ７＋、ＣＤ４５ＲＡ－｜親の頻度（%）	7.7	15.5
T-EFF/TEMRA: CCR7-CD45RA+(%)	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／Ｑ１：ＣＣＲ７－、ＣＤ４５ＲＡ＋｜親の頻度（%）	0.1	0.1
ナイーブ：ＣＤ６２Ｌ＋ＣＤ４５ＲＡ＋（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／Ｑ６：ＣＤ６２Ｌ＋、ＣＤ４５ＲＡ＋｜親の頻度（%）	0.2	0.1
T-EM: CD62L-CD45RA-(%)	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／Ｑ８：ＣＤ６２Ｌ－、ＣＤ４５ＲＡ－｜親の頻度（%）	47.7	49.5
T-CM: CD62L+CD45RA-(%)	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／Ｑ７：ＣＤ６２Ｌ＋、ＣＤ４５ＲＡ－｜親の頻度（%）	52.1	50.4
T-EFF/TEMRA: CD62L-CD45RA+(%)	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／Ｑ５：ＣＤ６２Ｌ－、ＣＤ４５ＲＡ＋｜親の頻度（%）	0.1	0.0

＊最大ＣＤ３＋ＣＤ４５＋%を添加する

特徴	操作的実行＃１	操作的実行＃２
TCRαβ (%)	87.1	96.3
TCRγδ (%)	1.2	1.6
合計	88.3	97.9

【図７３】

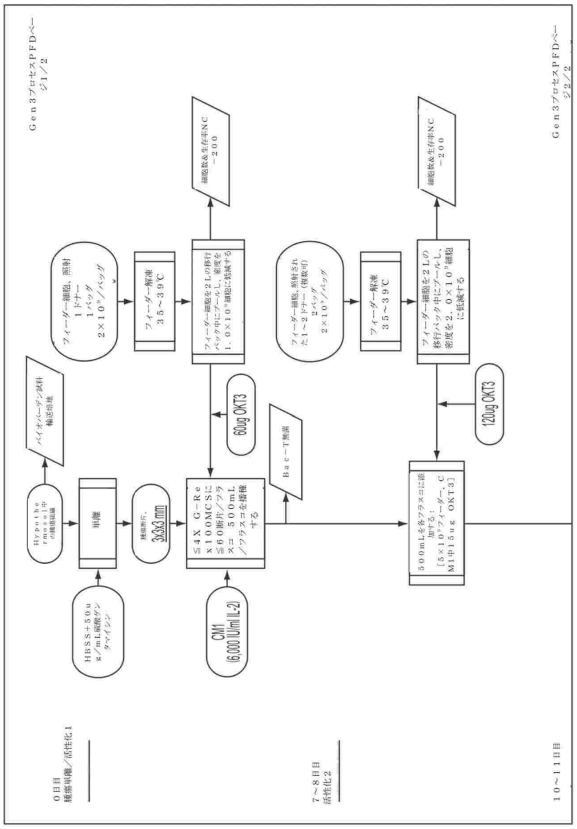
特徴	階層	CD4+		CD8+	
		操作的実行＃１	操作的実行＃２	操作的実行＃１	操作的実行＃２
CD27+ (%)	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ４またはＣＤ８／ＣＤ４＋／８＋ＣＤ２７＋｜親の頻度（%）	0.7	2.0	2.1	12.7
CD28+ (%)	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ４またはＣＤ８／ＣＤ４＋／８＋ＣＤ２８＋｜親の頻度（%）	41.2	50.1	3.6	13.9
CD57+ (%)	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ４＋／８＋ＣＤ５７＋｜親の頻度（%）	1.0	6.9	0.1	3.7
2B4+ (%)	Ｓ／Ｓ／生／ＣＤ３／ＣＤ４またはＣＤ８／ｈｔｉａ｜親の頻度（%）	4.5	5.5	69.1	55.7
BTLA4+ (%)	Ｓ／Ｓ／生／ＣＤ３／ＣＤ４またはＣＤ８／２ｂ４｜親の頻度（%）	67.5	86.1	79.6	89.1
CCR4+ (%)	Ｓ／Ｓ／生／ＣＤ３／ＣＤ４またはＣＤ８／ＣＣＲ４＋｜親の頻度（%）	94.1	93.6	84.2	96.6
CD25+ (%)	Ｓ／Ｓ／生／ＣＤ３／ＣＤ４またはＣＤ８／ＣＤ２５｜親の頻度（%）	63.1	61.0	47.5	51.8
CD69+ (%)	Ｓ／Ｓ／生／ＣＤ３／ＣＤ４またはＣＤ８／ＣＤ６９｜親の頻度（%）	47.0	22.8	45.4	25.8
CD95+ (%)	Ｓ／Ｓ／生／ＣＤ３／ＣＤ４またはＣＤ８／ＣＤ９５｜親の頻度（%）	99.2	98.1	99.1	97.6
CD103+ (%)	Ｓ／Ｓ／生／ＣＤ３／ＣＤ４またはＣＤ８／ＣＤ１０３｜親の頻度（%）	4.2	10.7	25.0	36.9
CXCR3+ (%)	Ｓ／Ｓ／生／ＣＤ３／ＣＤ４またはＣＤ８／ＣＸＣＲ３｜親の頻度（%）	58.1	76.7	89.3	88.3
KLRG1+ (%)	Ｓ／Ｓ／生／ＣＤ３／ＣＤ４またはＣＤ８／ＫＬＲＧ１｜親の頻度（%）	0.3	8.9	3.1	35.8
LAG3+ (%)	Ｓ／Ｓ／生／ＣＤ３／ＣＤ４またはＣＤ８／Ｌａｇ３｜親の頻度（%）	5.0	3.3	19.4	21.2
PD1+ (%)	Ｓ／Ｓ／生／ＣＤ３／ＣＤ４またはＣＤ８／ＰＤ１｜親の頻度（%）	29.3	22.1	11.2	7.2
TIGIT+ (%)	Ｓ／Ｓ／生／ＣＤ３／ＣＤ４またはＣＤ８／Ｔｉｇｉｔ｜親の頻度（%）	68.1	53.2	74.9	65.8
TIM3+ (%)	Ｓ／Ｓ／生／ＣＤ３／ＣＤ４またはＣＤ８／ＴＩＭ３｜親の頻度（%）	93.6	81.8	91.2	84.4

【図７４】

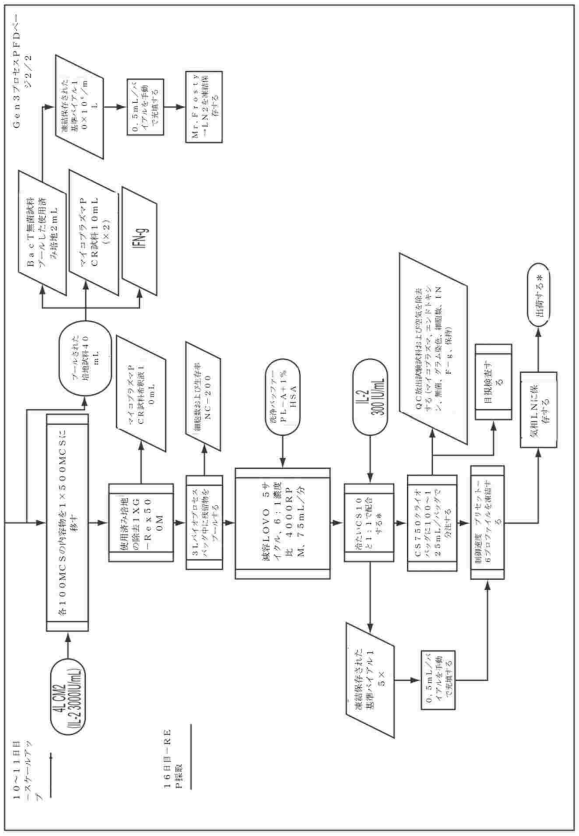
試料	1:100 刺激/1:50 非刺激 1	2	3	1:200 刺激/1:100 非刺激 4	5	6	1:400 刺激/1:200 非刺激 7	8	9	平均	刺激－非刺激	倍率誘導
Eng1 刺激	13001.49	16033.00	14083.24	11008.85	15254.59	12534.24	9985.83	14237.22	11669.82	13089.81	11325.97	7.42
Eng1 非刺激	2155.31	2445.64	2108.37	1727.43	1982.96	1566.52	1119.057	1611.132	1158.179	1763.84		
Eng1 刺激対照	26491.92	31766.20	31601.13	26385.05	30852.42	29752.34	26175.43	33462.43	29728.52	29579.49	13486.52	1.84
Eng1 非刺激対照	16209.90	16478.69	16936.51	15659.69	16385.60	17083.36	15419.07	15683.49	14980.40	16092.97		

試料	1:100 刺激/1:50 非刺激 1	2	3	1:200 刺激/1:100 非刺激 4	5	6	1:400 刺激/1:200 非刺激 7	8	9	平均	刺激－非刺激	倍率誘導
Eng2 刺激	31509.54	30435.33	33822.81	27299.28	29091.87	29432.13	29027.45	30685.94	31138.70	30271.45	27441.29	10.70
Eng2 非刺激	3236.50	3442.58	3630.97	2764.12	2839.66	2892.96	2047.795	2291.994	2324.838	2830.16		
Eng2 刺激対照	21515.93	20346.31	19425.54	18299.25	17398.91	18131.38	18825.27	18412.15	18278.94	18959.30	6189.32	1.48
Eng2 非刺激対照	13716.23	13445.80	13563.89	12782.28	12678.37	13122.65	11898.75	11675.48	12046.29	12769.97		

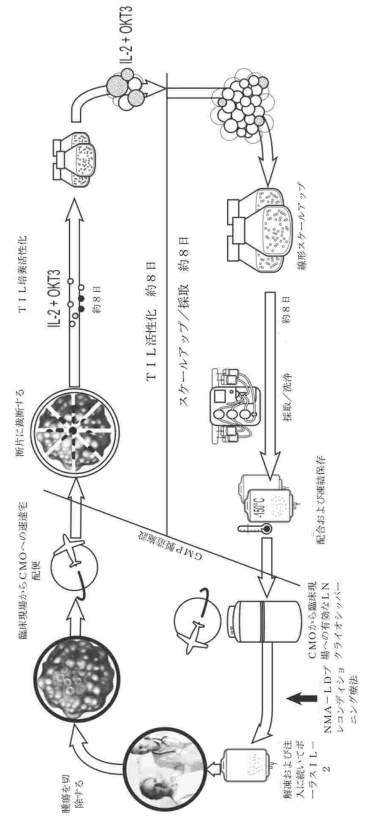
【図７５Ａ】



【図７５Ｂ】



【図７６】



【図７７】

ステップ	Ｇｅｎ２	Ｇｅｎ２．１	Ｇｅｎ３．０
ＰｒｅＲＥＰ－０日目	≤５０断片／１Ｇ－Ｒｅｘ １００ＭＣＳ－１１日	≤１８０断片／３Ｇ－Ｒｅｘ、事前に配合されたＣＭ１加温培地１００ＭＣＳ－１１日	新鮮または凍結した腫瘍 １Ｇ－Ｒｅｘあたり≤３０断片～最大６０断片を有する全腫瘍 １００ＭＣＳ（最大４つのＧ－Ｒｅｘ）、事前に配合された加温培地－７日ＰｒｅＲＥＰ、フィーダー２５０ｅ６細胞＋ＯＫＴ－３（１５ｕｇ）
ＲＥＰ開始	ＲＥＰに指向する－１１日目－１つのＧ－Ｒｅｘ　５００ＭＣＳ中の＜２００ｅ^{6}　ＴＩＬ　１　－＜２００ｅ^{6}　ＴＩＬ　事前に配合されたＣＭ２加温培地	ＲＥＰに指向する－１１日目－１つのＧ－Ｒｅｘ　５００ＭＣＳ中の＜最大４つのＧＲＥＸ）、事前に配合されたＣＭ２加温培地	ＲＥＰに指向する－７日目－すべての細胞　ＴＩＬ－同じＧ－Ｒｅｘ　１００ＭＣＳ（１００ＭＣＳ、最大４つのＧＲＥＸ）、標準培地または合成培地（無血清）フィーダー５００ｅ６細胞＋ＯＫＴ－３（３０ｕｇ）を添加する
ＴＩＬ増殖またはスケールアップ	１～５つのＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ　１６日目に分割する	２～５つのＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ中の＜事前に配合されたＣＭ４加温培地　１６日目に分割する	Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳからＴＩＬ懸濁液をＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳに移す、最大４つのＧＲＥＸ５００ＭＣＳ－標準培地または合成培地（無血清）１０または１１日目にスケールアップする
採取	２２日目に採取する、ＬＯＶＯ－自動細胞洗浄機	２２日目に採取する、ＬＯＶＯ－自動細胞洗浄機（５洗浄サイクル）	１４または１６日目に採取する ＬＯＶＯ－自動細胞洗浄機（５洗浄サイクル）
最終製剤	凍結保存した製品　ＬＮ$_2$複数アリコート中の３００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２－ＣＳ１０	凍結保存した製品　ＬＮ$_2$複数アリコート中の３００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２－ＣＳ１０	凍結保存した製品 ＬＮ$_2$複数アリコート中の３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ２－ＣＳ１０
プロセス時間	２２日	２２日	１６日

【図７８】

プロセス比較	プロセス変更	相違点
Gen 2 : Gen 2.1	・１つのフラスコの代わりに２つのフラスコでプロセスを開始する ・ＲＥＰ開始フィーダー層を２つのＧ－Ｒｅｘ５００ＭＣＳフラスコに分割する ・培地を事前に配合し、使用前に温める	・ＴＩＬレパートリーの増加に伴う最終細胞数（用量）の潜在的な倍増 ・プロセス全体のプロセス冗長
Gen 2.1 : Gen 3.1	・新鮮または凍結した腫瘍 ・１４～１６日プロセス（２２日から） ・プロセス上の総フィーダー層を低減する ・０日目に存在するフィーダー層およびＯＫＴ３ ・ＲＥＰを断片で開始した ・１００ＭＣＳをＳ００ＭＣＳにスケールする ・複数のＰｒｅ－ＲＥＰフラスコにスケールする ・標準培地または合成培地（無血清）	・増加した効力 ・改善した表現型 ・減少したプロセス時間 ・低減した試薬試験 ・減少したプロセス可変性 ・定義された試薬 ・増加したレパートリー ・不純物を低減する（フィーダー） ・同等またはより高い用量

【図７９】

表２．遺伝子最適化条件の説明

プロセス日	条件	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
０日目：腫瘍断片の単離および活性化	培地（＊）	５００ｍＬ	５００ｍＬ	５００ｍＬ
	ＩＬ－２	６０００ＩＵ／ｍＬ	６０００ＩＵ／ｍＬ	６０００ＩＵ／ｍＬ
	ＯＫＴ－３	－	１５ｕｇ	１５ｕｇ
	フィーダー	－	－	２．５Ｅ＋０６
プロセス日	条件	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
７～８日目：ＴＩＬ培養再活性化	培地（＊）	５００ｍＬ	５００ｍＬ	５００ｍＬ
	ＩＬ－２	６０００ＩＵ／ｍＬ	６０００ＩＵ／ｍＬ	６０００ＩＵ／ｍＬ
	ＯＫＴ－３	３０ｕｇ	３０ｕｇ	３０ｕｇ
	フィーダー	１Ｅ＋０９	５００Ｅ＋０６	５００Ｅ＋０６
	７日目を通して添加された総フィーダー	１Ｅ＋０９	５００Ｅ＋０６	７５０Ｅ＋０６
プロセス日	条件	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
１０～１１日目：培養スケールアップ	ＧＲＥＸ１００から全ＴＩＬ懸濁液をＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）を含む４Ｌ培地を含有する１つのＧＲＥＸ　５００Ｌに移す			
プロセス日	条件	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
１６～１７日目：採取／洗浄／配合	ＬＯＶＯ－自動細胞洗浄機およびＣＳ１０での凍結保存			

（＊）培地は標準培地またはＣＴＳ無血清培地であり得る

【図８０】

【図８１】

プロセス日	標準培地中のＬ４０６３			無血清培地中のＬ４０６４		
	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
断片の数	53	53	53	21	21	21
断片あたりの採取時の平均ＴＶＣ	1.37E+08	3.19E+08	3.53E+08	5.90E+08	7.57E+08	9.29E+08
７日目のＴＶＣ（＊）	2.59E+07	6.43E+07	1.45E+08	7.35E+06	9.28E+07	1.39E+08
目のＴＶＣ（＊）	6.07E+08	1.66E+09	1.83E+09	7.48E+08	1.28E+09	1.72E+09
目のＴＶＣ採取	7.26E+09	1.69E+10	1.87E+10	1.24E+10	1.59E+10	1.95E+10
倍率拡張（１０または１１日目／７日目）	23.4	25.8	12.6	101.8	13.8	12.4
倍率拡張（１６日目／７日目の採取）	280.3	262.8	129.0	1687.1	171.3	140.3

（＊）７日目および１０／１１日目の細胞数を数えたＦＩＯ。プロセスの設計に基づいて、減容なしにその内容物をかき混ぜた後に試料を各フラスコから直接引き出した。そのようなものとして、これらの試料からの細胞数データ分析および結論は、サンプリング方法論の性質によって制限される。

【図８２】

プロセス日	標準培地中のＬ４０６３			ＣＴＳ無血清培地中のＬ４０６４		
	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
再活性化	74.6%	92.1%	88.7%	88.0%	92.8%	95.0%
スケールアップ	92.1%	95.4%	94.0%	90.4%	94.3%	95.1%
採取	79.5%	89.4%	94.8%	88.8%	81.9%	84.9%

【図８３】

腫瘍ＩＤ	標準培地中のＬ４０６３			ＣＴＳ無血清培地中のＬ４０６４		
マーカー	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
Ｌ／Ｄ Ａｑｕａ	82.2	89.4	91.0	76.6	83.1	89.5
ＮＫ	1.3	0.4	1.0	2.5	0.2	0.5
ＴＣＲａ／ｂ＋	88.6	97.5	95.5	93.0	97.3	96.7
ＣＤ４	56.4	85.8	77.5	33.8	64.8	57.4
ＣＤ４／Ｃ２７	3.8	2.1	3.4	6.7	0.7	2.2
ＣＤ４／ＣＤ２８	82.7	71.8	80.2	97.5	73.5	66.8
ＣＤ４／ＣＤ５６	0.4	0.5	0.7	0.5	0.5	0.3
ＣＤ４／ＣＤ５７	6.7	17.0	20.5	16.0	7.6	8.0
ＣＤ８	29.6	11.2	16.8	51.9	28.9	36.1
ＣＤ８／ＣＤ２７	15.0	25.6	30.5	14.1	3.3	6.7
ＣＤ８／ＣＤ２８	47.5	23.0	24.5	88.0	45.1	37.3
ＣＤ８／ＣＤ５６	3.3	2.3	4.2	6.6	10.3	10.0
ＣＤ８／ＣＤ５７	0.3	1.2	1.1	1.3	2.0	2.5

【図８４】

腫瘍ＩＤ	標準培地中のＬ４０６３			ＣＴＳ無血清培地中のＬ４０６４		
マーカー	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
ＣＤ３／ＣＤ４	56.4	85.8	77.5	33.8	64.8	57.4
ＣＤ４のＴＥＭＲＡ	0.4	0.7	0.4	1.1	0.7	0.2
ＣＤ４のナイーブ	0.3	0.2	0.2	0.5	0.1	0.0
ＣＤ４のＣＭ	45.6	16.8	29.3	46.3	30.6	29.9
ＣＤ４のＥＭ	53.7	82.3	70.2	52.1	68.6	69.9
ＣＤ３／ＣＤ８	29.6	11.2	16.8	51.9	28.9	36.1
ＣＤ８のＴＥＭＲＡ	3.1	0.5	0.9	6.1	8.0	5.4
ＣＤ８のナイーブ	0.7	0.1	0.4	2.2	0.7	1.0
ＣＤ８のＣＭ	22.0	15.8	29.7	61.9	18.9	18.2
ＣＤ８のＥＭ	74.3	83.5	69.0	29.8	72.4	72.5

【図８５】

腫瘍ＩＤ	標準培地中のＬ４０６３			ＣＴＳ無血清培地中のＬ４０６４		
マーカー	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
２Ｂ４＋	2.1	0.6	1.0	2.0	1.2	1.3
ＢＴＬＡ４	99.7	95.4	96.9	99.5	98.8	98.1
ＣＤ２５＋	48.6	10.5	3.9	58.2	41.7	32.1
ＣＤ６９＋	27.1	37.7	21.5	39.4	35.6	30.5
ＣＤ９５＋	99.9	99.9	99.5	99.6	99.0	97.3
ＣＤ１０３＋	0.7	1.2	0.4	1.4	1.3	1.2
ＫＬＲＧ１＋	1.6	3.7	3.3	11.4	8.3	10.7
ＬＡＧ３＋	5.6	8.2	3.3	1.5	1.6	1.4
ＰＤ１＋	77.4	58.4	41.6	34.1	28.4	26.7
ＴＩＧＩＴ＋	68.5	40.3	30.3	45.8	52.1	52.2
ＴＩＭ３＋	58.0	42.4	59.4	61.0	58.4	56.8

【図８６】

腫瘍ＩＤ	標準培地中のＬ４０６３			ＣＴＳ無血清培地中のＬ４０６４		
マーカー	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
２Ｂ４＋	65.8	56.6	70.5	13.6	21.5	20.7
ＢＴＬＡ４	99.5	96.6	98.2	99.3	97.4	96.1
ＣＤ２５＋	41.4	10.5	5.9	60.6	32.0	17.1
ＣＤ６９＋	44.9	28.0	20.0	33.2	30.6	22.7
ＣＤ９５＋	9.66	99.6	98.9	98.9	96.1	93.5
ＣＤ１０３＋	29.4	27.9	24.5	10.9	6.0	7.3
ＣＸＣＲ３＋	99.9	99.9	99.8	99.3	99.2	99.2
ＫＬＲＧ１＋	7.1	4.6	6.7	13.2	14.5	14.1
ＬＡＧ３＋	28.6	22.5	11.9	2.8	1.6	1.4
ＰＤ１＋	56.9	54.5	51.7	25.4	20.0	23.6
ＴＩＧＩＴ＋	90.8	93.7	93.3	92.1	90.4	90.5
ＴＩＭ３＋	66.7	49.1	58.6	65.6	46.8	43.6

【図８７】

ＴＩＬの特徴付け	標準培地中のＬ４０６３			ＣＴＳ無血清培地中のＬ４０６４		
	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
ＩＦＮγ（ｐｇ／ｍＬ）	907	428	2863	1485	3130	3863

１つの代表的な実験からの三重試料の平均として結果を報告する

【図８８】

プロセス日	標準培地中のＬ４０６３			ＣＴＳ無血清培地中のＬ４０６４		
	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
再活性化	12319.6	11928.7	11786.7	5891.6	5671.8	389.4(1)
スケールアップ	32095.1	30368.6	26145.0	＊	＊	＊
採取	17309.3	13828.4	16019.2	656.0	826.2	768.9

１つの代表的な実験からの三重試料の平均として結果を報告する

（＊）Ｌ４０６４上の１０／１１日目からの使用済み培地は、実験の実行中に収集されなかった。

（１）再活性化日のＧｅｎ３．１試験Ｌ４０６４のデータは、Ｇｅｎ３．１対照およびＧｅｎ３．０条件の対応する値を著しく下回った。採取された試料が少量であったため、アッセイを繰り返してこの数の正確性を検証することはできなかった。

【図８９】

グルコース（ｇ／Ｌ）						
	標準培地中のＬ４０６３			ＣＴＳ無血清培地中のＬ４０６４		
プロセス日	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
再活性化	1.8	1.7	1.4	4.3	4.1	3.8
スケールアップ	1.4	0.9	0.8	＊	＊	＊
採取	1.5	0.9	1.0	2.8	2.1	2.2

（＊）Ｌ４０６４上の１０／１１日目からの使用済み培地は、実験の実行中に収集されなかった。

【図９０】

乳酸塩（ｇ／Ｌ）						
	標準培地中のＬ４０６３			ＣＴＳ無血清培地中のＬ４０６４		
プロセス日	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
再活性化	0.2	0.2	0.5	0.1	0.2	0.5
スケールアップ	0.7	1.1	1.2	＊	＊	＊
採取	1.1	1.7	1.6	1.5	2.0	1.9

（＊）Ｌ４０６４上の１０／１１日目からの使用済み培地は、実験の実行中に収集されなかった。

【図９１】

グルタミン（ｍｍｏｌ／Ｌ）						
	標準培地中のＬ４０６３			ＣＴＳ無血清培地中のＬ４０６４		
プロセス日	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
再活性化	2.0	2.0	2.0	1.3	1.2	1.1
スケールアップ	1.7	1.1	1.1	＊	＊	＊
採取	1.9	1.3	1.3	0.7	0.6	0.6

（＊）Ｌ４０６４上の１０／１１日目からの使用済み培地は、実験の実行中に収集されなかった。

【図９２】

Ｇｌｕｔａｍａｘ（ｍｍｏｌ／Ｌ）						
	標準培地中のＬ４０６３			ＣＴＳ無血清培地中のＬ４０６４		
プロセス日	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
再活性化	2.2	2.2	2.2	1.4	1.3	1.2
スケールアップ	1.9	1.2	1.2	＊	＊	＊
採取	2.1	1.5	1.5	0.8	0.7	0.7

（＊）Ｌ４０６４上の１０／１１日目からの使用済み培地は、実験の実行中に収集されなかった。

【図９３】

アンモニア（ｍｍｏｌ／Ｌ）						
	標準培地中のＬ４０６３			ＣＴＳ無血清培地中のＬ４０６４		
プロセス日	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
再活性化	1.9	1.9	2.0	0.7	8.0	0.9
スケールアップ	1.8	2.2	2.3	＊	＊	＊
採取	2.1	2.5	2.5	1.0	1.0	0.9

（＊）Ｌ４０６４上の１０／１１日目からの使用済み培地は、実験の実行中に収集されなかった。

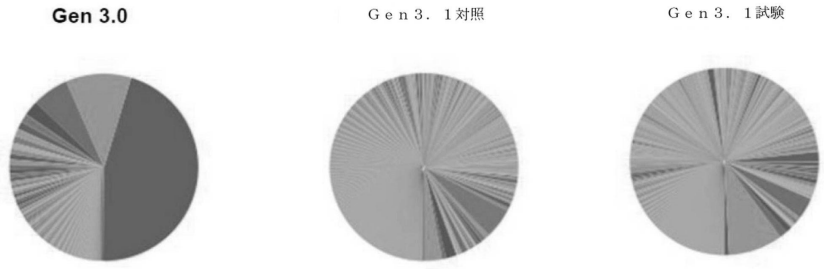
【図９４】

ＴＩＬの特徴付け	標準培地中のＬ４０６３			ＣＴＳ無血清培地中のＬ４０６４		
	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
相対テロメア長	7.7	6.3	6.1	6.4	6.7	6.6

【図９５】

ＴＩＬの特徴付け	標準培地中のＬ４０６３			ＣＴＳ無血清培地中のＬ４０６４		
	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
ｕＣＤ３	14005.0	18149.0	17181.0	15107.0	21460.0	21503.0
シャノンエントロピー指数	5.9	10.8	10.5	8.5	10.7	10.4

【図９６】



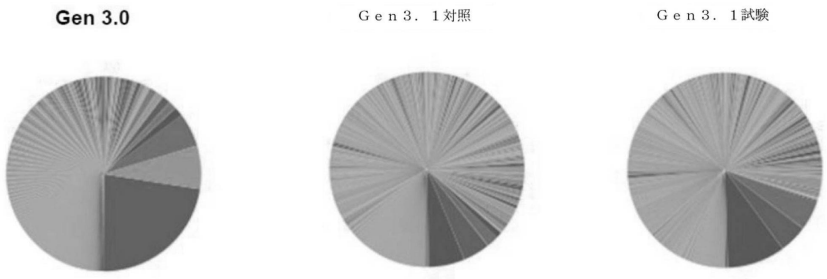
【図９７】

ｕＣＤＲ３の数（重複率%）Ｌ４０６３	すべてのｕＣＤＲ３			ｕＣＤＲ３の上位８０％		
	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
Ｇｅｎ３．０	14005	3240 (23%)	2959 (21%)	1104	1000 (90 %)	975 (88%)
Ｇｅｎ３．１対照	–	18149	–	–	2437	–
Ｇｅｎ３．１試験	–	–	17181	–	–	2331

【図９８】

ｕＣＤＲ３の数（重複率%）Ｌ４０６４	すべてのｕＣＤＲ３			ｕＣＤＲ３の上位８０％		
	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験	Ｇｅｎ３．０	Ｇｅｎ３．１対照	Ｇｅｎ３．１試験
Ｇｅｎ３．０	15107	5486 (36%)	5541 (36%)	2478	2186 (88%)	2163 (87%)
Ｇｅｎ３．１対照	–	21460	–	–	3246	–
Ｇｅｎ３．１試験	–	–	21503	–	–	3263

【図９９】



【図１００】

ステップ	プロセスＧｅｎ３－最適化
０日目 腫瘍単離および活性化	≦２４０断片 ≦６０断片／フラスコ ≦４フラスコ ≦２Ｌ培地（５００ｍＬ／フラスコ） ＩＬ－２（６０００ＩＵ／ｍＬ） ２．５×１０^{8}フィーダー細胞／フラスコ １５ｕｇ　ＯＫＴ３／フラスコ
７～８日目　再活性化	新鮮なＴＩＬをＲＥＰに指向する 培養物全体を活性化する ５×１０^{8}フィーダー細胞 ３０ｕｇ　ＯＫＴ３／フラスコ Ｇ－Ｒｅｘ　１００ＭＣＳ ５００ｍＬ中央値＋ＩＬ－２（６０００ＩＵ／ｍＬ）を添加する
１０～１１日目 スケールアップまたはＴＩＬ部分培養	≦４Ｇ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ ＧＲＥＸ　１００ＭＣＳからＧＲＥＸ　５００ＭＣＳに１Ｌを移して培養物全体をスケールアップし、 ４Ｌの培地＋ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）／フラスコを添加する
１６～１７日目 採取	採取 ＬＯＶＯ自動細胞洗浄機 Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅ　１％　ＨＳＡ上で凍結保存：ＣＳ１０

【図１０１】

試験	承認基準	Ｇｅｎ３．１試験対Ｇｅｎ３．０プロセス
細胞数（ＴＶＣ）	Ｇｅｎ３．１＞３０％対プロセスＧｅｎ３．０	Ｍｅｔ
生存率％	≧７０％生存率	Ｍｅｔ
免疫表現型解析（％ＣＤ３＋／％ＣＤ４５＋）	Ｇｅｎ３．１とＧｅｎ３．０プロセスとの間の≦５％差	Ｍｅｔ
ＩＦＮγ 分泌	Ｇｅｎ３．１≧対プロセスＧｅｎ３．０	Ｍｅｔ

【図１０２】

細胞数　再活性化日

ＩＤ	量（ｍＬ）		カウント１（細胞／ｍＬ）	カウント２（細胞／ｍＬ）	カウント３（細胞／ｍＬ）	平均（細胞／ｍＬ）	総細胞平均＊量
Ｇｅｎ３．０（Ａ）Ｌ４０６３	500	合計	7.10E+04	6.81E+04		6.96E+04	3.48E+07
		生	5.27E+04	5.09E+04		5.18E+04	2.59E+07
		死	1.83E+04	1.72E+04		1.78E+04	8.88E+06
		生存率%	74.30%	74.80%		74.55%	
Ｇｅｎ３．１対照Ｌ４０６３	500	合計	1.41E+05	1.38E+05		1.40E+05	6.98E+07
		生	1.31E+05	1.26E+05		1.29E+05	6.43E+07
		死	9.84E+03	1.21E+04		1.10E+04	5.49E+06
		生存率%	93.00%	91.20%		92.10%	
Ｇｅｎ３．１試験Ｌ４０６３	500	合計	3.26E+05	3.28E+05		3.27E+05	1.64E+08
		生	2.83E+05	2.96E+05		2.90E+05	1.45E+08
		死	4.25E+04	3.16E+04		3.71E+04	1.85E+07
		生存率%	87.00%	90.30%		88.65%	
Ｇｅｎ３．０（Ａ）Ｌ４０６４	500	合計	1.59E+04	1.75E+04		1.67E+04	8.35E+06
		生	1.39E+04	1.55E+04		1.47E+04	7.35E+06
		死	1.98E+03	2.02E+03		2.00E+03	1.00E+06
		生存率%	87.50%	88.50%		88.00%	
Ｇｅｎ３．１対照Ｌ４０６４	500	合計	2.02E+05	1.98E+05		2.00E+05	1.00E+08
		生	1.88E+05	1.83E+05		1.86E+05	9.28E+07
		死	1.38E+04	1.51E+04		1.45E+04	7.23E+06
		生存率%	93.20%	92.40%		92.80%	
Ｇｅｎ３．１試験Ｌ４０６４	500	合計	2.70E+05	3.15E+05		2.93E+05	1.46E+08
		生	2.55E+05	3.01E+05		2.78E+05	1.39E+08
		死	1.51E+04	1.38E+04		1.45E+04	7.23E+06
		生存率%	94.40%	95.60%		95.00%	

【図１０３】

細胞数　スケールアップ日

ＩＤ	量（ｍＬ）		カウント１（細胞／ｍＬ）	カウント３（細胞／ｍＬ）	カウント２（細胞／ｍＬ）	平均（細胞／ｍＬ）	総細胞平均＊量
Ｇｅｎ３．０（Ａ）Ｌ４０６３	1000	合計	6.57E+05	6.61E+05		6.59E+05	6.59E+08
		生	6.00E+05	6.14E+05		6.07E+05	6.07E+08
		死	5.71E+04	4.68E+04		5.20E+04	5.20E+07
		生存率%	91.30%	92.90%		92.10%	
Ｇｅｎ３．１対照Ｌ４０６３	1000	合計	1.66E+06	1.82E+06		1.74E+06	1.74E+09
		生	1.59E+06	1.72E+06		1.66E+06	1.66E+09
		死	7.17E+04	9.07E+04		8.12E+04	8.12E+07
		生存率%	95.70%	95.00%		95.35%	
Ｇｅｎ３．１試験Ｌ４０６３	1000	合計	1.88E+06	2.00E+06		1.94E+06	1.94E+09
		生	1.76E+06	1.89E+06		1.83E+06	1.83E+09
		死	1.20E+05	1.15E+05		1.18E+05	1.18E+08
		生存率%	93.60%	94.30%		93.95%	
Ｇｅｎ３．０（Ａ）Ｌ４０６４	1000	合計	7.95E+05	8.58E+05		8.27E+05	8.27E+08
		生	7.17E+05	7.78E+05		7.48E+05	7.48E+08
		死	7.85E+04	8.05E+04		7.95E+04	7.95E+07
		生存率%	90.10%	90.60%		90.35%	
Ｇｅｎ３．１対照Ｌ４０６４	1000	合計	1.38E+06	1.32E+06		1.35E+06	1.35E+09
		生	1.31E+06	1.24E+06		1.28E+06	1.28E+09
		死	7.20E+04	8.13E+04		7.67E+04	7.67E+07
		生存率%	94.80%	93.80%		94.30%	
Ｇｅｎ３．１試験Ｌ４０６４	1000	合計	1.85E+06	1.76E+06		1.81E+06	1.81E+09
		生	1.76E+06	1.67E+06		1.72E+06	1.72E+09
		死	8.62E+04	8.95E+04		8.79E+04	8.79E+07
		生存率%	95.30%	94.90%		95.10%	

【図１０４】

細胞数　採取Ｌ４０６３

ＩＤ	量（ｍＬ）		カウント１（細胞／ｍＬ）	カウント２（細胞／ｍＬ）	カウント３（細胞／ｍＬ）	平均（細胞／ｍＬ）	総細胞平均＊量
Ｇｅｎ３．０（Ａ）Ｌ４０６３　ＬＯＶＯ前	602.4	合計	1.68E+07	1.70E+07		1.69E+07	1.02E+10
		生	1.52E+07	1.54E+07		1.53E+07	9.22E+09
		死	1.60E+06	1.65E+06		1.63E+06	9.79E+08
		生存率%	90.50%	90.30%		90.40%	
Ｇｅｎ３．１対照Ｌ４０６３　ＬＯＶＯ前	497.1	合計	3.39E+07	3.90E+07		3.65E+07	1.81E+10
		生	3.25E+07	3.73E+07		3.49E+07	1.73E+10
		死	1.41E+06	1.63E+06		1.52E+06	7.56E+08
		生存率%	95.80%	95.80%		95.80%	
Ｇｅｎ３．１試験Ｌ４０６３ＬＯＶＯ前	552.3	合計	3.71E+07	3.62E+07		3.67E+07	2.02E+10
		生	3.56E+07	3.51E+07		3.54E+07	1.95E+10
		死	1.50E+06	1.09E+06		1.30E+06	7.15E+08
		生存率%	96.00%	97.00%		96.50%	
Ｇｅｎ３．０（Ａ）Ｌ４０６３　ＬＯＶＯ後	165	合計	5.37E+07	5.73E+07	5.50E+07	5.53E+07	9.13E+09
		生	4.32E+07	4.52E+07	4.36E+07	4.40E+07	7.26E+09
		死	1.04E+07	1.21E+07	1.14E+07	1.13E+07	1.86E+09
		生存率%	80.50%	78.80%	79.30%	79.53%	
Ｇｅｎ３．１対照Ｌ４０６３　ＬＯＶＯ後	165	合計	1.21E+08	1.01E+08	1.22E+08	1.15E+08	1.89E+10
		生	1.10E+08	8.85E+07	1.09E+08	1.03E+08	1.69E+10
		死	1.11E+07	1.23E+07	1.27E+07	1.20E+07	1.99E+09
		生存率%	90.90%	87.80%	89.60%	89.43%	
Ｇｅｎ３．１試験Ｌ４０６３ＬＯＶＯ後	175	合計	1.05E+08	1.20E+08		1.13E+08	1.97E+10
		生	9.93E+07	1.14E+08		1.07E+08	1.87E+10
		死	5.51E+06	6.14E+06		5.83E+06	1.02E+09
		生存率%	94.70%	94.90%		94.80%	

【図１０５】

細胞数　採取Ｌ４０６４

ID	量（ｍＬ）		カウント１（細胞／ｍＬ）	カウント２（細胞／ｍＬ）	カウント３（細胞／ｍＬ）	平均（細胞／ｍＬ）	総細胞平均＊量
Ｇｅｎ３．０（Ａ）Ｌ４０６４　ＬＯＶＯ前	641.3	合計	1.99E+07	1.94E+07		1.97E+07	1.26E+10
		生	1.83E+07	1.94E+07		1.89E+07	1.21E+10
		死	1.60E+06	1.68E+06		1.64E+06	1.05E+09
		生存率%	92.00%	92.00%		92.00%	
Ｇｅｎ３．１対照Ｌ４０６４　ＬＯＶＯ前	493.4	合計	3.98E+07	3.87E+07		3.93E+07	1.94E+10
		生	3.65E+07	3.55E+07		3.60E+07	1.78E+10
		死	3.31E+06	3.22E+06		3.27E+06	1.61E+09
		生存率%	91.70%	91.70%		91.70%	
Ｇｅｎ３．１試験Ｌ４０６４　ＬＯＶＯ前	593.4	合計	3.92E+07	3.79E+07		3.86E+07	2.29E+10
		生	3.67E+07	3.54E+07		3.61E+07	2.14E+10
		死	2.55E+06	2.50E+06		2.53E+06	1.50E+09
		生存率%	93.50%	93.40%		93.45%	
Ｇｅｎ３．０（Ａ）Ｌ４０６４　ＬＯＶＯ後	165	合計	8.58E+07	8.34E+07		8.46E+07	1.40E+10
		生	7.56E+07	7.46E+07		7.51E+07	1.24E+10
		死	1.02E+07	8.79E+06		9.50E+06	1.57E+09
		生存率%	88.10%	89.50%		88.80%	
Ｇｅｎ３．１対照Ｌ４０６４　ＬＯＶＯ後	165	合計	1.13E+08	1.22E+08	1.15E+08	1.18E+08	1.94E+10
		生	9.21E+07	1.01E+08	9.45E+07	9.66E+07	1.59E+10
		死	2.14E+07	2.13E+07	2.07E+07	2.14E+07	3.52E+09
		生存率%	81.20%	82.60%	82.10%	81.90%	
Ｇｅｎ３．１試験Ｌ４０６４　ＬＯＶＯ後	165	合計	1.33E+08	1.45E+08		1.39E+08	2.29E+10
		生	1.14E+08	1.22E+08		1.18E+08	1.95E+10
		死	1.94E+07	2.26E+07		2.10E+07	3.47E+09
		生存率%	85.40%	84.40%		84.90%	

【図１０６】

	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ４／ＣＤ２７|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ４／ＣＤ２８|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ４／ＣＤ５６|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ４／ＣＤ５７|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ８／ＣＤ２７|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ８／ＣＤ２８|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ８／ＣＤ５６|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ８／ＣＤ５７|親の頻度（%）
	ＣＤ４＋／ＣＤ２７	ＣＤ４＋／ＣＤ２８	ＣＤ４＋／ＣＤ５６	ＣＤ４＋／ＣＤ５７	ＣＤ８＋／ＣＤ２７	ＣＤ８＋／ＣＤ２８	ＣＤ８＋／ＣＤ５６	ＣＤ８＋／ＣＤ５７
Ｌ４０６３－Ｇｅｎ３．０	3.8	82.7	0.42	6.7	15	47.5	3.29	0.28
Ｌ４０６３－Ｇｅｎ３．１　ＣＴ	2.08	71.8	0.53	17	25.6	23	2.33	1.18
Ｌ４０６３－Ｇｅｎ３．１＋フィーダー	3.35	80.2	0.69	20.5	30.5	24.5	4.19	1.07
Ｌ４０６４－Ｇｅｎ３．０	6.66	97.5	0.54	16	14.1	88	6.62	1.29
Ｌ４０６４－Ｇｅｎ３．１　ＣＴ	0.72	73.5	0.54	7.58	3.3	45.1	10.3	1.95
Ｌ４０６３－Ｇｅｎ３．１＋フィーダー	2.24	66.8	0.34	7.98	6.69	37.3	9.98	2.54

【図１０７】

		Ｓ１／Ｓ２／すべて／生|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／ＣＤ１４－／ＣＤ８－／ＮＫ|ヌルの頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１９|ヌルの頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ|ヌルの頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ４|ヌルの頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ２７|ヌルの頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ２８|ヌルの頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ５６|ヌルの頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ５７|ヌルの頻度（%）
		ＬＤ	ＣＤ34+	ＮＫ	ＣＤ19	ＴＣＲａｂ/+	ＴＣＲａｂ/ＣＤ4+	ＴＣＲａｂ/ＣＤ27+	ＴＣＲａｂ/ＣＤ4+/ＣＤ28+	ＴＣＲａｂ/ＣＤ4+/ＣＤ56+	ＴＣＲａｂ/ＣＤ4+/ＣＤ57+
Ｌ４０６３-Ｇｅｎ３.０	C10 10.fcs	82.2	0.13	1.3	0.083	88.6	56.4	2.34	46.6	0.24	3.78
Ｌ４０６３-Ｇｅｎ３.１ＣＴ	C11 11.fcs	83.4	0.035	0.15	0.033	97.5	82.8	1.78	61.6	0.46	14.6
Ｌ４０６３-Ｇｅｎ３.１＋フィーダー	C12 12.fcs	91	0.052	1.04	0.0075	95.5	77.5	2.9	62.1	0.54	15.9
Ｌ４０６４-Ｇｅｎ３.０	D1 13.fcs	76.6	0.18	2.45	0.11	93	33.8	2.22	32.9	0.18	5.4
Ｌ４０６４-Ｇｅｎ３.１ＣＴ	D2 14.fcs	83.1	0.068	0.23	0.011	97.3	64.8	0.46	47.6	0.35	4.91
Ｌ４０６４-Ｇｅｎ３.１＋フィーダー	D3 15.fcs	89.9	0.043	0.52	0.023	96.7	57.4	1.28	38.4	0.2	4.58

	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ４／ＱＴ：ＣＣＲＴ－ＰＥ－Ａ－，ＣＤ４５ＲＡ－ＡＦ７００－Ａ＋|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ４／ＱＴ：ＣＣＲＴ－ＰＥ－Ａ＋，ＣＤ４５ＲＡ－ＡＦ７００－Ａ＋|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ４／ＱＴ：ＣＣＲＴ－ＰＥ－Ａ－，ＣＤ４５ＲＡ－ＡＦ７００－Ａ－|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ４／ＱＴ：ＣＣＲＴ－ＰＥ－Ａ－，ＣＤ４５ＲＡ－ＡＦ７００－Ａ－|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ４／ＱＴ：ＣＣＲＴ－ＰＥ－Ａ－，ＣＤ４５ＲＡ－ＡＦ７００－Ａ－|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ４／ＱＴ：ＣＣＲＴ－ＰＥ－Ａ－，ＣＤ４５ＲＡ－ＡＦ７００－Ａ－|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ４／ＱＴ：ＣＣＲＴ－ＰＥ－Ａ－，ＣＤ４５ＲＡ－ＡＦ７００－Ａ－|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ４／ＱＴ：ＣＣＲＴ－ＰＥ－Ａ－，ＣＤ４５ＲＡ－ＡＦ７００－Ａ－|親の頻度（%）
	ＴＥＭＲＡ	ナイーブ	ＣＭ	ＥＭ	ＴＥＭＲＡ	ナイーブ	ＣＭ	ＥＭ
Ｌ４０６３-Ｇｅｎ３.０	0.58	0.77	11.2	87.4	0.36	0.26	45.6	53.7
Ｌ４０６３-Ｇｅｎ３.１ＣＴ	1.22	0.8	1.56	94.4	0.66	0.22	16.8	82.3
Ｌ４０６３-Ｇｅｎ３.１＋フィーダー	0.88	0.35	1.39	97.4	0.36	0.17	29.3	70.2
Ｌ４０６４-Ｇｅｎ３.０	1.47	1.3	14.2	83	1.09	0.53	46.3	52.1
Ｌ４０６４-Ｇｅｎ３.１ＣＴ	0.41	0.096	5.28	94.2	0.73	0.11	30.6	68.6
Ｌ４０６４-Ｇｅｎ３.１＋フィーダー	0.44	0.07	2.78	95.7	0.37	0.035	29.9	69.9

	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ８／Ｑ１：ＣＣＲＴ－ＰＥ－Ａ－，ＣＤ４５ＲＡ－ＡＦ７００－Ａ＋|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ８／Ｑ２：ＣＣＲＴ－ＰＥ－Ａ＋，ＣＤ４５ＲＡ－ＡＦ７００－Ａ＋|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ８／Ｑ３：ＣＣＲＴ－ＰＥ－Ａ－，ＣＤ４５ＲＡ－ＡＦ７００－Ａ－|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ８／Ｑ４：ＣＣＲＴ－ＰＥ－Ａ－，ＣＤ４５ＲＡ－ＡＦ７００－Ａ－|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ８／Ｑ５：ＣＤ６２Ｌ－ＤＶ４２１－Ａ＋，ＣＤ４５ＲＡ－ＡＦ７００－Ａ＋|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ８／Ｑ６：ＣＤ６２Ｌ－ＤＶ４２１－Ａ＋，ＣＤ４５ＲＡ－ＡＦ７００－Ａ＋|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ８／Ｑ７：ＣＤ６２Ｌ－ＤＶ４２１－Ａ＋，ＣＤ４５ＲＡ－ＡＦ７００－Ａ＋|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲａｂ／ＣＤ８／Ｑ８：ＣＤ６２Ｌ－ＤＶ４２１－Ａ－，ＣＤ４５ＲＡ－ＡＦ７００－Ａ－|親の頻度（%）	Ｓ１／Ｓ２／すべて／生／ＣＤ１４－／ＴＣＲｇｄ|親の頻度（%）
	ＴＥＭＲＡ	ナイーブ	ＣＭ	ＥＭ	ＴＥＭＲＡ	ナイーブ	ＣＭ	ＥＭ			
Ｌ４０６３-Ｇｅｎ３.０	1.72	1.54	18.1	79.1	3.06	0.67	32	74.3	6.47		
Ｌ４０６３-Ｇｅｎ３.１ＣＴ	1.65	0.62	3.39	94.3	0.52	0.097	15.8	83.5	1.11		
Ｌ４０６３-Ｇｅｎ３.１＋フィーダー	2.65	0.73	1.66	95	0.89	0.41	29.7	769	2		
Ｌ４０６４-Ｇｅｎ３.０	6.49	4.31	10.9	70.3	6.05	3.31	61.9	39.8	2.36		
Ｌ４０６４-Ｇｅｎ３.１ＣＴ	6.3	0.59	7.15	86	8	0.72	18.9	72.4	1.68		
Ｌ４０６４-Ｇｅｎ３.１＋フィーダー	5.83	0.22	3.17	90.8	5.38	0.96	18.2	75.5	1.86		

【図１０８】

		Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ４／２８４|親の頻度（%）	Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＢＴＬＡ|親の頻度（%）	Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ４／ＣＤ２５|親の頻度（%）	Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ４／ＣＤ６９|親の頻度（%）	Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ４／ＣＤ９５|親の頻度（%）	Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ４／ＣＤ１０３|親の頻度（%）	Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ４／ＫＬＲＧ１＋|親の頻度（%）	Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ４／ＬＡＧ３|親の頻度（%）	Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ４／ＰＤ１|親の頻度（%）
						ＣＤ４					
		284+	BTLA	CD25+	CD69+	CD95+	CD103+	KLRG1+	LAG3+	PD1+
Ｌ４０６３-Ｇｅｎ３.０	G10 10.fcs	2.1	99.7	48.6	27.1	99.9	0.69	1.61	5.57	77.4
Ｌ４０６３-Ｇｅｎ３.１ＣＴ	G11 11.fcs	0.62	95.4	10.5	37.7	99.9	1.15	3.7	8.24	58.4
Ｌ４０６３-Ｇｅｎ３.１＋フィーダー	G12 12.fcs	0.95	96.9	3.89	21.5	99.5	0.43	3.32	3.28	41.6
Ｌ４０６４-Ｇｅｎ３.０	H1 13.fcs	2	99.5	58.2	39.4	99.6	1.44	11.4	1.49	34.1
Ｌ４０６４-Ｇｅｎ３.１ＣＴ	H2 14.fcs	1.18	98.8	41.7	35.6	99	1.25	8.3	1.6	28.4
Ｌ４０６４-Ｇｅｎ３.１＋フィーダー	H3 15.fcs	1.26	98.1	32.1	30.5	97.3	1.19	10.7	1.42	26.7

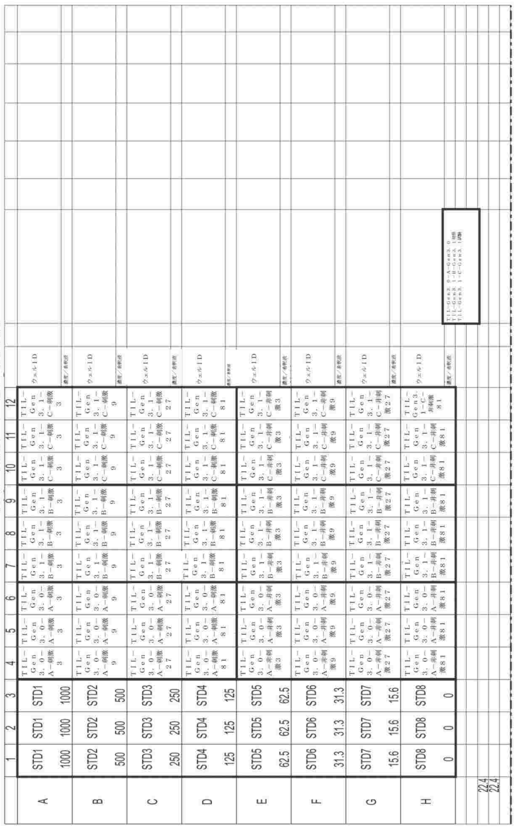
Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ４／ｔｉｇｉｔ|親の頻度（%）	Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ４／ｔｉｇｉｔ|親の頻度（%）
ＣＤ４+	ＣＤ４+
ＴＩＧＩＴ+	ＴＩＭ３+
68.5	58
40.3	42.4
30.3	59.4
45.8	61
52.1	58.4
52.2	56.8

【図１０９】

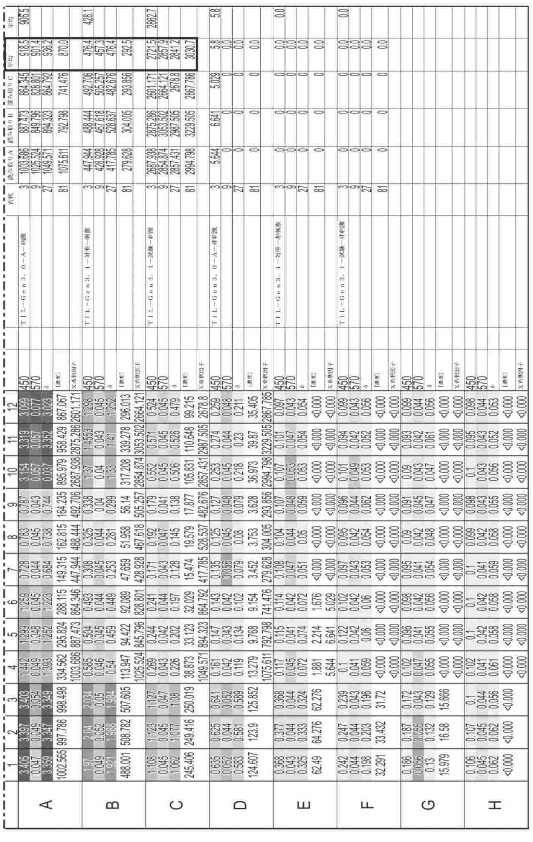
Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ８／２８４｜親の頻度（％）	Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ８／ＢＴＬＡ｜親の頻度（％）	Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ８／ＣＤ２５｜親の頻度（％）	Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ８／ＣＤ６９｜親の頻度（％）	Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ８／ＣＤ９５｜親の頻度（％）	Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ８／ＣＤ１０３｜親の頻度（％）	Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ８／ＣＸＣＲ３＋｜親の頻度（％）	Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ８／ＫＬＲＧ１＋｜親の頻度（％）	Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ８／ＬＡＧ３＋｜親の頻度（％）	Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ８／ＰＤ１｜親の頻度（％）
CD8+									
284+	BTLA	CD25+	CD69+	CD95+	CD103+	CXCR3	KLRG1	LAG3	PD1
2.1	2.1	99.7	48.6	27.1	99.9	0.69	1.61	5.57	77.4
0.62	0.62	95.4	10.5	37.7	99.9	1.15	3.7	8.24	58.4
0.95	0.95	96.9	3.89	21.5	99.5	0.43	3.32	3.28	41.6
2	2	99.5	58.2	39.4	99.6	1.44	11.4	1.49	34.1
1.18	1.18	98.8	41.7	35.6	99	1.25	8.3	1.6	28.4
1.26	1.26	98.1	32.1	30.5	97.3	1.19	10.7	1.42	26.7

Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ８／ｔｉｇｉｔ｜親の頻度（％）	Ｓ／Ｓ／すべて／生／ＣＤ３／ＣＤ８／ｔｉｍ３｜親の頻度（％）
CD8	CD8
TIGIT	TIM3
90.8	66.7
93.7	49.1
93.3	58.6
92.1	65.6
90.4	46.8
90.5	43.6

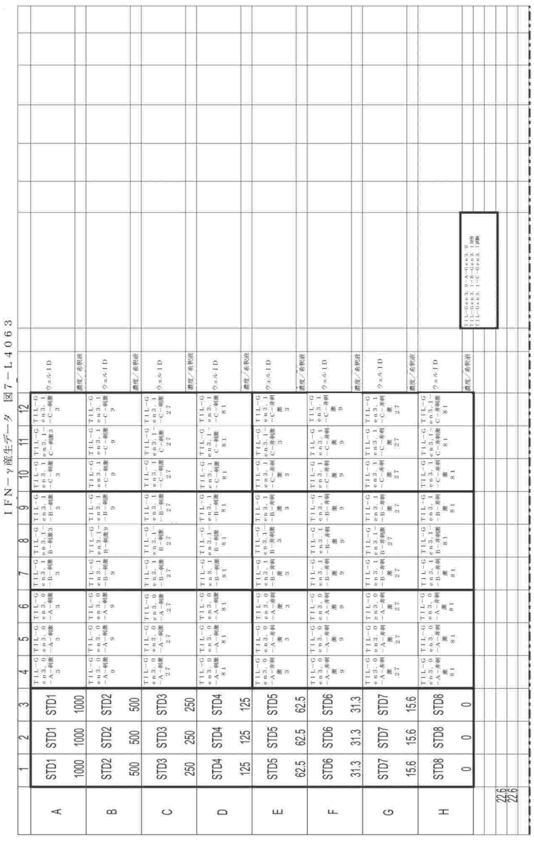
【図１１０Ａ】



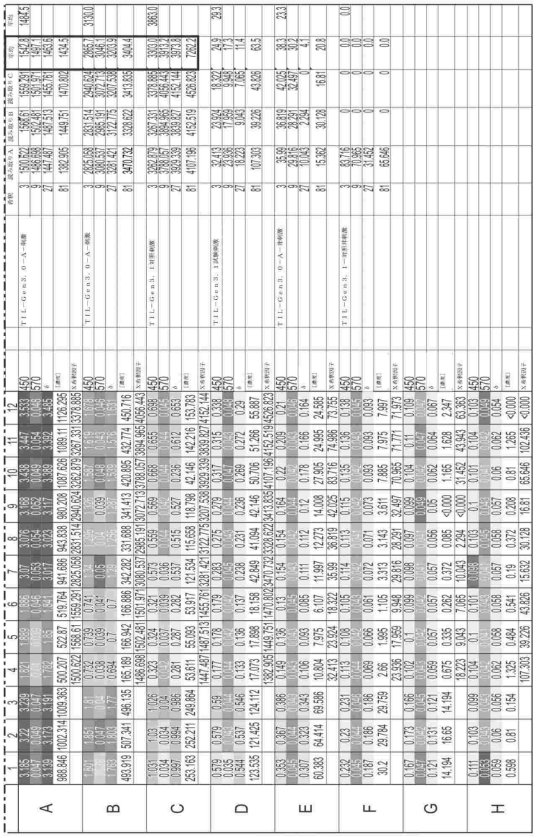
【図１１０Ｂ】



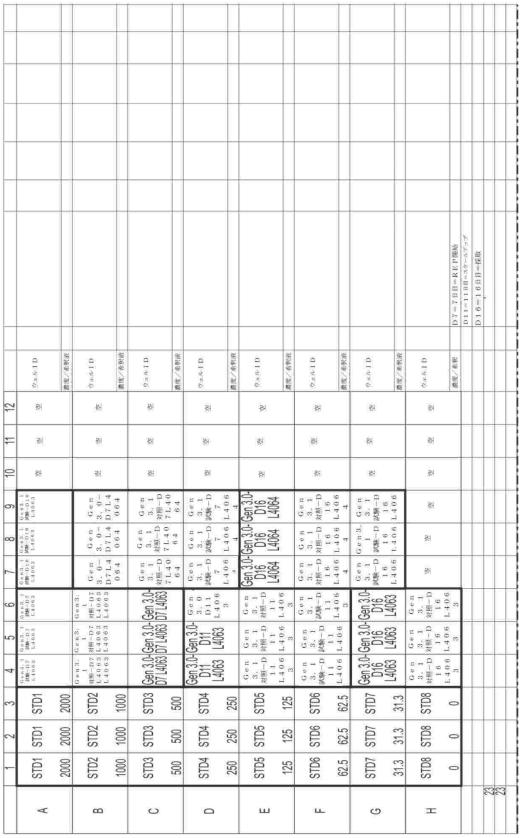
【図１１１Ａ】



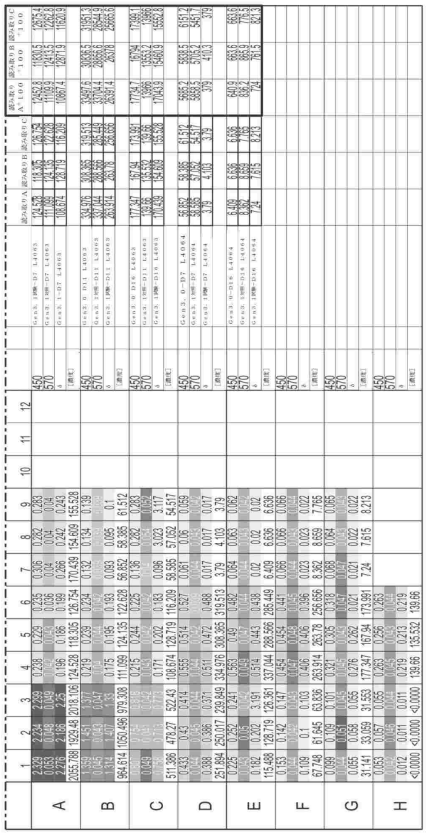
【図１１１Ｂ】



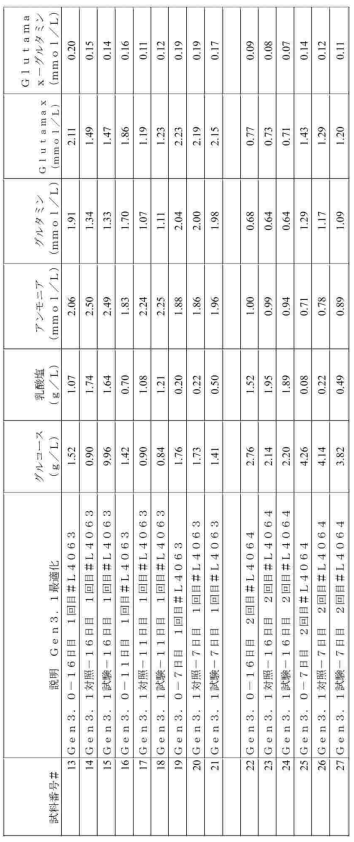
【図１１２Ａ】



【図１１２Ｂ】



【図１１３】



【図１１４】

順序	名称		幾何的平均プローブ－ｆｉｔｃ－Ａ	幾何的平均プローブ－ｆｉｔｃ－Ａ	平均１３０１	平均T	１３０１に対する長さ
A 1	Gen3. 0−L4063	A1 10.1.fcs	86	42.5			
A 2		A2 10.2.fcs	85.4	42.3	85.7	42.4	
A 3		A3 10.3.fcs	4585	207	4487	211.5	7.684093
A 4		A4 10.4fcs	4389	216			
A 5	Gen3. 1対照−L4063	A5 11.1.fcs	82.7	33.3			
A 6		A6 11.2.fcs	86	32.9	84.35	33.1	
A 7		A7 11.3.fcs	4696	180			
A 8		A8 11.4.fcs	4641	175	4668.5	177.5	6.299968
B 1	Gen3. 1試験−L4063	B1 12.1.fcs	95.1	28.8			
B 2		B2 12.2.fcs	84.7	26.7	89.9	27.75	
B 3		B3 12.3.fcs	4764	169			
B 4		B4 12.4.fcs	4800	174	4782	171.5	6.12732
B 5	Gen3. 0−L4064	B5 13.1.fcs	101	40.3			
B 6		B6 13.2.fcs	89.6	34.1	95.3	37.2	
B 7		B7 13.3.fcs	4300	174			
B 8		B8 13.4.fcs	4367	172	4333.5	173	6.408381
C 1	Gen3. 1対照−L4064	C1 14.1.fcs	92.1	31.1			
C 2		C2 14.2.fcs	88.6	29.6	90.35	30.35	
C 3		C3 14.3.fcs	4111	169			
C 4		C4 14.4.fcs	4443	172	4277	170.5	6.69509
C 5	Gen3. 1試験−L4064	C5 15.1.fcs	89.7	25.7			
C 6		C6 15.2.fcs	85.7	24.7	87.7	25.2	
C 7		C7 15.3.fcs	4342	172			
C 8		C8 15.4.fcs	4560	166	4451	169	6.591341

【図１１５】

共有される頻度

対象	元の試料	uCDR３数	比較される試料	uCDR３数	共有されるuCDR３数	uCDR３数
L４０６３	L６３GA	14005	L６３GB	18149	3240	23.13459479
L４０６３	L６３GA	14005	L６３GC	17181	2959	21.12816851
L４０６３	L６３GA	15107	L６４GB	21460	5486	36.31429139
L４０６３	L６３GA	15107	L６４GC	21503	5541	36.67836102

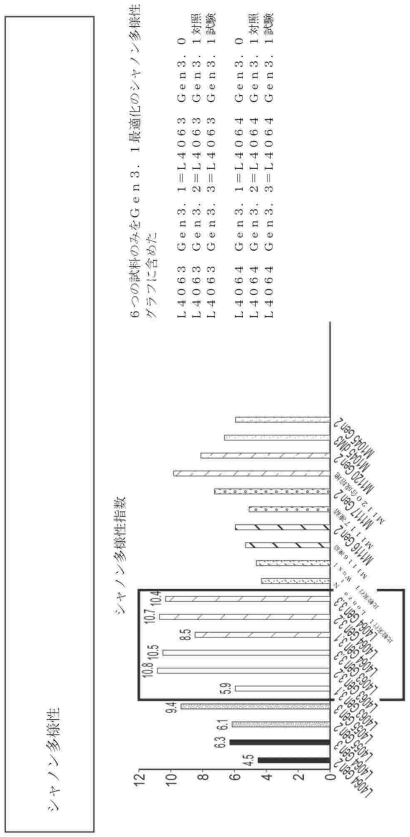
コード：
L63GA=L4063 Gen3. 0
L63GB=L4063 Gen3. 1対照
L63GC=L4063 Gen3. 1試験
L64GA=L4064 Gen3. 0
L64GB=L4064 Gen3. 1対照
L64GC=L4064 Gen3. 1試験

上位８０％

対象	試料１	uCDR３数	試料２	uCDR３数	共有されるuCDR３数	col Bの共有%
L４０６３	L６３GA	1104	L６３GB	2437	1000	90.57971
L４０６３	L６３GA	1104	L６３GC	2331	975	88.31522
L４０６４	L６４GA	2478	L６４GB	3246	2186	88.2163
L４０６４	L６４GA	2478	L６４GC	3263	2163	87.28814

コード：
L63GA=L4063 Gen3. 0
L63GB=L4063 Gen3. 1対照
L63GC=L4063 Gen3. 1試験
L64GA=L4064 Gen3. 0
L64GB=L4064 Gen3. 1対照
L64GC=L4064 Gen3. 1試験

【図１１６】



【配列表】
0007688575000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		FI		
Ａ６１Ｋ	*31/7076(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7076	
Ａ６１Ｋ	*38/20 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/20	
Ｃ０７Ｋ	*16/28 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/28	ＺＮＡ
Ｃ１２Ｎ	*5/078(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/078	
Ｃ０７Ｋ	*14/55 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/55	
Ａ６１Ｋ	*39/395 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ
		Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ
		Ａ６１Ｋ	39/395	Ｅ
		Ａ６１Ｋ	39/395	Ｔ

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者 ナタラジャン，アーヴィンド

アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０７０，サン カルロス，アバディーン ドライブ １０５

ナタラジャン，アーヴィンド

アメリカ合衆国，ニュージャージー州 ０７９２０，バスキング リッジ，スモーク ライズ ロード １７４

審査官 西村 亜希子

(56)参考文献 国際公開第２０１８／１８２８１７（ＷＯ，Ａ１）

Cancer Immunology, Immunotherapy，2018年05月29日，67，1221-1230

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)

Ａ６１Ｋ

ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）

ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）