(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115427438 A
(43)申请公布日 2022.12.02

(21)申请号 202180030269.2

(22)申请日 2021.03.01

(30)优先权数据
62/982,704 2020.02.27 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.10.21

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/020320 2021.03.01

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/174208 EN 2021.09.02

(71)申请人 迈斯特治疗公司
地址 美国纽约

(72)发明人 T·J·兰格 B·J·迈尔斯

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51)Int.Cl.
C07K 14/54(2006.01)
A61K 35/17(2006.01)
C07K 14/55(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)
C07K 14/725(2006.01)
C07K 14/73(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)

权利要求书10页 说明书163页
序列表7页 附图98页

(54)发明名称

肿瘤反应性T细胞的离体富集和扩增的方法及其相关组合物

(57)摘要

本文提供用于制造肿瘤反应性T细胞的方法，所述方法包括以下细胞的离体富集和扩增：分泌趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)的细胞；对C-X-C趋化因子受体5型(CXCR5)呈表面阳性的细胞；和/或对CD39、PD-1和TIGIT中的一种或多种呈表面阳性的细胞。还提供通过本文所述的方法产生的T细胞的群体及其药物组合物。



CN 115427438 A

1.一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括:

a.从来自患有肿瘤的受试者的包含T细胞的输入样品选择对激活标记PD-1、CD39和TIGIT呈表面阳性的细胞,以获得从所述样品选择的细胞;以及

b.通过将所选择的细胞与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的群体的条件下一起培养来进行扩增。

2.一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括:

a.从来自患有肿瘤的受试者的包含T细胞的输入样品选择对来自由PD-1、CD39和TIGIT组成的组的至少两种激活标记呈表面阳性的细胞,以获得从所述样品选择的细胞;以及

b.通过将所选择的细胞与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的群体的条件下一起培养来进行扩增。

3.根据权利要求1所述的方法,其中所述选择还包括选择对选自以下的一种或多种其他标记呈表面阳性的细胞:CD107a、CD39、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD36、CD38、CD30、CD154(CD40L)、CD134(OX40)、CD152(CTLA-4)、CD160、CXCR5(CD195)、CD244、CD258(LIGHT)、CD256(APRIL)、CD272(BTLA-4)、PD-1、TIM-3、LAG-3或TIGIT,其中所述选择对所述激活标记呈表面阳性的细胞以及所述选择对所述其他标记呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以获得所选择的细胞。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,所述方法还包括选择、任选地通过阳性选择或阴性选择来选择对选自CD3、CD4或CD8的T细胞标记呈表面阳性的T细胞,其中所述选择对所述T细胞标记呈表面阳性的细胞以及所述选择对所述激活标记呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以获得所选择的细胞。

5.根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中包含T细胞的所述输入样品来自外周血或来自肿瘤。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述输入样品包含肿瘤浸润淋巴细胞。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中包含T细胞的所述输入样品源自切除的肿瘤。

8.根据权利要求7所述的方法,其中包含T细胞的所述输入样品是通过来自所述切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片的匀浆化和/或酶消化处理的单细胞悬浮液。

9.根据权利要求7或权利要求8所述的方法,其中包含T细胞的所述输入样品是通过来自所述切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片的匀浆化和酶消化处理的单细胞悬浮液。

10.根据权利要求8和权利要求9所述的方法,其中所述酶消化是通过与胶原酶、任选地胶原酶IV或胶原酶I/II一起孵育来进行。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述输入样品包含为或约$10x10^6$个T细胞/克来自所述受试者的肿瘤样品至为或约$100x10^6$个T细胞/克来自所述受试者的肿瘤样品。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述扩增的T细胞群体用作治疗性细胞组合物。

13.根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中进行所述扩增以产生扩增的T细胞群体持续7至35天。

14.根据权利要求1-13中任一项所述的方法,其中进行所述扩增以产生扩增的T细胞群

体持续7至28天，任选地14天至28天。

15.根据权利要求1-13中任一项所述的方法，其中进行所述扩增以产生扩增的T细胞群体持续7至21天，任选地7至14天。

16.根据权利要求1-15中任一项所述的方法，其中所述一种或多种T细胞刺激剂是一种或多种第一T细胞刺激剂并且所述进行扩增是第一扩增，其中所述方法还包括通过将所述第一扩增的T细胞群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增，其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

17.根据权利要求16所述的方法，其中所述第一扩增的一种或多种T细胞刺激剂与所述第二扩增的一种或多种T细胞刺激剂是相同的。

18.根据权利要求16或权利要求17所述的方法，其中进行所述第一扩增持续7至21天，任选地7至14天。

19.根据权利要求16-18中任一项所述的方法，其中进行所述第二扩增持续7至21天，任选地7至14天。

20.根据权利要求1-19中任一项所述的方法，其中淋巴细胞的所述一种或多种T细胞刺激剂是抗CD3剂(例如OKT3)和/或选自IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25、IL-23、IL-27和IL-35中的一种或多种的重组细胞因子。

21.根据权利要求1-20中任一项所述的方法，其中所述一种或多种T细胞刺激剂中的至少一种是重组IL-2。

22.根据权利要求1-21中任一项所述的方法，其中与所述一种或多种T细胞刺激剂一起培养还包括细胞凋亡抑制剂。

23.一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法，所述方法包括：

a.处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品；

b.通过将包含T细胞的所述样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增；

c.从扩增的细胞的所述第一群体选择对激活标记PD-1、CD39和TIGIT呈表面阳性的细胞，以产生选择的群体；以及

d.通过将所选择的群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增，其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

24.一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法，所述方法包括：

a.处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品；

b.通过将包含T细胞的所述样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增；

c.从扩增的细胞的所述第一群体选择对来自由PD-1、CD39和TIGIT组成的组的至少两种激活标记呈表面阳性的细胞，以产生选择的群体；以及

d.通过将所选择的群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增，其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组

合物。

25.一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括:

a.处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品;

b.通过将包含T细胞的所述样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增;

c.从扩增的细胞的所述第一群体选择对激活标记PD-1、CD39和TIGIT呈表面阳性的细胞,以产生选择的细胞群体;以及

d.在将一种或多种非天然肽呈递于主要组织相容性复合体(MHC)上的抗原呈递细胞的存在下共培养所选择的细胞群体以产生反应性T细胞群体,所述一种或多种非天然肽是与受试者肿瘤中相关的非同义体细胞突变对应的肽,所述反应性T细胞群体含有包含对所述肿瘤的突变编码肽具有反应性的内源T细胞受体的T细胞;

e.通过将所述反应性T细胞群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增,其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

26.一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括:

a.处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品;

b.通过将包含T细胞的所述样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增;

c.在将一种或多种非天然肽呈递于主要组织相容性复合体(MHC)上的抗原呈递细胞的存在下共培养扩增的细胞的所述第一群体以产生反应性T细胞群体,所述一种或多种非天然肽是与受试者肿瘤中相关的非同义体细胞突变对应的肽,所述反应性T细胞群体含有包含对所述肿瘤的突变编码肽具有反应性的内源T细胞受体的T细胞;

d.从所述反应性T细胞群体选择对激活标记PD-1、CD39和TIGIT呈表面阳性的细胞,以产生选择的细胞群体;以及

e.通过将所选择的细胞群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增,其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

27.根据权利要求23-26中任一项所述的方法,其中所述选择还包括选择对选自以下的一种或多种其他标记呈表面阳性的细胞:CD107a、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD36、CD38、CD30、CD154(CD40L)、CD134(OX40)、CD152(CTLA-4)、CD160、CXCR5(CD195)、CD244、CD258(LIGHT)、CD256(APRIL)、CD272(BTLA-4)、TIM-3或LAG-3,其中所述选择对所述激活标记呈表面阳性的细胞以及所述选择对所述其他标记呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以产生所选择的细胞群体。

28.根据权利要求23-27中任一项所述的方法,所述方法还包括选择、任选地通过阳性选择或阴性选择来选择对选自CD3、CD4或CD8的T细胞标记呈表面阳性的T细胞,其中所述选择对所述T细胞标记呈表面阳性的细胞以及所述选择对所述激活标记呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以产生所选择的细胞群体。

29.根据权利要求23-28中任一项所述的方法,其中所述生物样品是外周血样品或肿瘤样品。

30.根据权利要求23-29中任一项所述的方法,其中包含T细胞的所述输入样品包含肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

31.根据权利要求23-30中任一项所述的方法,其中包含T细胞的所述输入样品源自切除的肿瘤。

32.根据权利要求23-31中任一项所述的方法,其中所述生物样品是来自所述受试者的切除的肿瘤,并且包含T细胞的所述输入样品是来自所述切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片。

33.根据权利要求32所述的方法,其中所述一个或多个肿瘤碎片的直径为1-8mm。

34.根据权利要求32或权利要求33所述的方法,其中以约1个肿瘤碎片/2cm2接种所述一个或多个肿瘤碎片用于所述第一扩增。

35.根据权利要求23-31中任一项所述的方法,其中包含T细胞的所述输入样品是通过来自所述切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片的匀浆化和/或酶消化处理的单细胞悬浮液。

36.根据权利要求23-31中任一项所述的方法,其中包含T细胞的所述输入样品是通过来自切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片的匀浆化和酶消化处理的单细胞悬浮液。

37.根据权利要求35和权利要求36所述的方法,其中所述酶消化是通过与胶原酶、任选地胶原酶IV或胶原酶I/II一起孵育来进行。

38.根据权利要求23-37中任一项所述的方法,其中所述输入样品包含为或约$10x10^6$个T细胞/克来自所述受试者的肿瘤样品至为或约$100x10^6$个T细胞/克来自所述受试者的肿瘤样品。

39.根据权利要求8-11和35-38中任一项所述的方法,其中以约5x105至为或约2x106个总细胞/2cm2接种包含T细胞的所述输入样品用于扩增。

40.根据权利要求23-39中任一项所述的方法,其中进行所述第一扩增持续1至14天。

41.根据权利要求23-40中任一项所述的方法,其中进行所述第一扩增持续为或约1天、为或约2天、为或约3天、为或约4天、为或约5天、为或约6天、为或约7天、为或约8天、为或约9天、为或约10天、为或约11天、为或约12天、为或约13天或者为或约14天。

42.根据权利要求23-41中任一项所述的方法,其中进行所述第二扩增持续7至35天。

43.根据权利要求23-42中任一项所述的方法,其中进行所述第二扩增持续7至21天,任选地7至14天。

44.根据权利要求23-43中任一项所述的方法,其中所述第一扩增的一种或多种T细胞刺激剂与所述第二扩增的一种或多种T细胞刺激剂是相同的。

45.根据权利要求23-44中任一项所述的方法,其中用于所述第一扩增的淋巴细胞的所述一种或多种第一T细胞刺激剂是选自IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25、IL-23、IL-27和IL-35中的一种或多种的重组细胞因子。

46.根据权利要求23-45中任一项所述的方法,其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂中的至少一种是重组IL-2。

47.根据权利要求23-46中任一项所述的方法,其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂不包括抗CD3抗体(例如OKT3)。

48.根据权利要求23-47中任一项所述的方法，其中与所述一种或多种第一T细胞刺激剂一起培养的还包括细胞凋亡抑制剂。

49.根据权利要求23-48中任一项所述的方法，其中淋巴细胞的所述一种或多种第二T细胞刺激剂是抗CD3剂和/或选自IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25、IL-23、IL-27和IL-35中的一种或多种的重组细胞因子。

50.根据权利要求23-49中任一项所述的方法，其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂中的至少一种是重组IL-2。

51.根据权利要求20、21、45、46、49和50中任一项所述的方法，其中重组IL-2的浓度为100IU/mL至6000IU/mL。

52.根据权利要求20、21、45、46和49-51中任一项所述的方法，其中重组IL-2的浓度为300IU/mL至1000IU/mL，任选地其中重组IL-2的浓度是为或约300IU/mL。

53.根据权利要求20、21、45、46和49-52中任一项所述的方法，其中重组IL-2的浓度是为或约300IU/mL。

54.根据权利要求20、21、45、46和49-52中任一项所述的方法，其中重组IL-2的浓度是为或约1000IU/mL。

55.根据权利要求23-54中任一项所述的方法，其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂包括抗CD3抗体，任选地OKT3，任选地其中所述抗CD3抗体的浓度是为或约50ng/mL。

56.根据权利要求23-55中任一项所述的方法，其中与所述一种或多种第二T细胞刺激剂一起培养的还包括细胞凋亡抑制剂。

57.根据权利要求22、权利要求48或权利要求56所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂减少由CD95(Fas)诱导的细胞凋亡，任选地其中所述细胞凋亡抑制剂特异性结合CD95(Fas)或CD95配体(Fas配体)。

58.根据权利要求57所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂是抗体或抗原结合片段，任选地其中所述细胞凋亡抑制剂是抗Fas抗体或抗Fas配体抗体。

59.根据权利要求57所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂是融合蛋白，其包含与Fc免疫球蛋白结构域融合的与CD95配体(Fas配体)结合的CD95(Fas)的细胞外结构域或其特异性结合片段，任选地其中所述细胞凋亡抑制剂是APG101或CAN008。

60.根据权利要求22、权利要求48或权利要求56所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂抑制半胱天冬酶激活或活性，任选地其中所述半胱天冬酶是半胱天冬酶2、半胱天冬酶8、半胱天冬酶9、半胱天冬酶10、半胱天冬酶3、半胱天冬酶6或半胱天冬酶7，任选地其中所述半胱天冬酶是半胱天冬酶3。

61.根据权利要求22、48、56或60中任一项所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂选自恩利卡生(IDN-6556、PF-03491390)、NAIP(神经元细胞凋亡抑制蛋白;BIRC1)、cIAP1和cIAP2(细胞凋亡抑制蛋白1和2;分别为BIRC2和BIRC3)、XIAP(X染色体结合IAP;BIRC4)、存活蛋白(BIRC5)、BRUCE(Apollon;BIRC6)、生存蛋白(BIRC7)和Ts-IAP(睾丸特异性IAP;BIRC8)、蟛蜞菊内酯、NS3694、NSCI和Z-氟甲基酮Z-VAD-FMK或其氟甲基酮变体。

62.根据权利要求22、48、56、60和61中任一项所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂是恩利卡生。

63.根据权利要求22、48、56和60-62中任一项所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂是

抑制两种或更多种半胱天冬酶的激活或活性的泛半胱天冬酶抑制剂。

64.根据权利要求22、48、56和60-63中任一项所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂是Z-VAD-FMK、Z-FA-FMK、Z-VAD(OH)-FMK、Z-DEVD-FMK、Z-VAD(OM2)-FMK或Z-VDVAD-FMK。

65.根据权利要求22、48和56-64中任一项所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂的浓度在为和约0.5μM与为或约50μM之间、在为或约0.5μM与为或约25μM之间、在为或约0.5μM与为或约10μM之间、在为或约0.5μM与为或约5μM之间、在为或约0.5μM与为或约1μM之间、在为或约1μM与为或约100μM之间、在为或约1μM与为或约50μM之间、在为或约1μM与为或约25μM之间、在为或约1μM与为或约10μM之间、在为或约1μM与为或约5μM之间、在为或约5μM与为或约100μM之间、在为或约5μM与为或约50μM之间、在为或约5μM与为或约25μM之间、在为或约5μM与为或约10μM之间、在为或约10μM与为或约100μM之间、在为或约10μM与为或约50μM之间、在为或约10μM与为或约25μM之间、在为或约25μM与为或约100μM之间、在为或约25μM与为或约50μM之间或者在为或约50μM与为或约100μM之间，每个都包含端值。

66.根据权利要求25-65中任一项所述的方法，其中所述抗原呈递细胞是树突细胞、单核巨噬细胞、B淋巴细胞、内皮细胞或胸腺上皮。

67.根据权利要求25-66中任一项所述的方法，其中所述抗原呈递细胞是树突细胞。

68.根据权利要求25-67中任一项所述的方法，其中所述抗原呈递细胞对于所述受试者是自体的。

69.根据权利要求25-68中任一项所述的方法，其中所述一种或多种非天然肽包括单独肽或肽库。

70.根据权利要求25-69中任一项所述的方法，其中通过串联编码所述一种或多种非天然肽的体外转录合成的小基因构建体的转染在抗原呈递细胞上加载所述一种或多种非天然肽，其中所转录的小基因构建体生成单独肽。

71.根据权利要求25-70中任一项所述的方法，其中通过肽脉冲，任选地通过电穿孔在抗原呈递细胞上加载所述一种或多种非天然肽。

72.根据权利要求71所述的方法，其中所述一种或多种非天然肽的长度为5-30个氨基酸，任选地12-25个氨基酸，任选地为或约25个氨基酸。

73.根据权利要求71或权利要求72所述的方法，其中：

所述一种或多种非天然肽是肽库，并且用于所述肽脉冲的肽库中的肽浓度为在为或约0.001μg/mL与为或约40μg/mL之间、0.01μg/mL与为或约40μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约40μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约40μg/mL之间、为或约0.01μg/mL与为或约10μg/mL之间或者为或约1μg/mL与为或约10μg/mL之间；或者

所述一种或多种非天然肽是单独肽，并且用于所述肽脉冲的单独肽的浓度为在为或约0.00001μg/mL与为或约1μg/mL之间、为或约0.00001μg/mL与为或约0.1μg/mL之间、为或约0.00001μg/mL与为或约0.01μg/mL之间、为或约0.0001μg/mL与为或约1μg/mL之间、为或约0.0001μg/mL与为或约0.1μg/mL之间、为或约0.0001μg/mL与为或约0.1μg/mL之间或者为或约0.0001μg/mL与为或约0.01μg/mL之间。

74.根据权利要求71-73中任一项所述的方法，其中所述一种或多种非天然肽的单独肽的浓度平均地是为或约0.00001μg/mL至为或约0.01μg/mL。

75.根据权利要求71-74中任一项所述的方法，其中所述一种或多种非天然肽的单独肽

的浓度平均地是为或约0.0001μg/mL和为或约0.001μg/mL。

76.根据权利要求25-75中任一项所述的方法，其中抗原呈递细胞与T细胞的共培养比率为在20:1与1:1之间、在15:1与1:1之间、在10:1与1:1之间、在5:1与1:1之间、在2.5:1与1:1之间、在1:20与1:1之间、在1:15与1:1之间、在1:10与1:1之间、在1:5与1:1之间或者在1:2.5与1:1之间。

77.根据权利要求25-76中任一项所述的方法，其中树突细胞与T细胞的共培养比率为在5:1与1:5之间或为在3:1与1:3之间，任选地为或为约1:1。

78.根据权利要求25-77中任一项所述的方法，其中抗原呈递细胞与T细胞的共培养比率为或为约1:1。

79.根据权利要求25-78中任一项所述的方法，其中所述共培养持续2小时至24小时。

80.根据权利要求25-79中任一项所述的方法，其中所述共培养持续为或约6小时。

81.根据权利要求1-80中任一项所述的方法，其中所述选择细胞是使用基于荧光的细胞分选仪来进行。

82.根据权利要求81所述的方法，其中所述基于荧光的细胞分选仪是自动化高通量流式细胞术分选仪，任选地FX500细胞分选仪或MiltenyiTyto细胞分选仪。

83.根据权利要求81或权利要求82所述的方法，其中所述选择是通过所述基于荧光的细胞分选仪运行1次、2次、3次或4次。

84.根据权利要求81-83中任一项所述的方法，其中所述选择是使用基于荧光的一次性流控细胞分选仪以在10,000与100,000个细胞/秒之间的速率来进行。

85.根据权利要求1-22中任一项所述的方法，其中进行所述扩增是在封闭系统中使用透气性膜来进行。

86.根据权利要求1-22中任一项所述的方法，其中进行所述扩增是在封闭系统中使用生物反应器来进行。

87.根据权利要求16-84中任一项所述的方法，其中进行所述第一扩增是在封闭系统中使用透气性培养器皿来进行。

88.根据权利要求16-84中任一项所述的方法，其中进行所述第一扩增是在封闭系统中使用生物反应器来进行。

89.根据权利要求16-88中任一项所述的方法，其中进行所述第二扩增是在透气性培养器皿中进行。

90.根据权利要求16-88中任一项所述的方法，其中进行所述第二扩增是使用生物反应器来进行。

91.根据权利要求1-90中任一项所述的方法，其中所述肿瘤是上皮癌的肿瘤。

92.根据权利要求1-91中任一项所述的方法，其中所述肿瘤是以下的肿瘤：黑色素瘤、肺鳞癌、肺腺癌、膀胱癌、肺小细胞癌、食道癌、结直肠癌(CRC)、宫颈癌、头颈癌、胃癌或子宫癌。

93.根据权利要求1-92中任一项所述的方法，其中所述肿瘤是黑色素瘤。

94.根据权利要求1-93中任一项所述的方法，其中所述肿瘤是结直肠癌(CRC)。

95.根据权利要求1-94中任一项所述的方法，其中所述肿瘤是以下的肿瘤：非小细胞肺癌(NSCLC)、CRC、卵巢癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆管细胞癌、子宫内膜癌，任选地其

中所述乳腺癌是HR+/Her2-乳腺癌、三阴性乳腺癌(TNBC)或HER2+乳腺癌。

96.根据权利要求1-95中任一项所述的方法,其中所述方法导致来自所述输入样品的T细胞的倍数扩增或肿瘤反应性T细胞的倍数扩增,所述扩增倍数为至少或至少约2倍、至少或至少约5倍、至少或至少约10倍、至少或至少约25倍、至少或至少约50倍、至少或至少约100倍、至少或至少约250倍、至少或至少约500倍、至少或至少约750倍、至少或至少约1000倍、至少或至少约1500倍、至少或至少约2000倍、至少或至少约2500倍或者至少或至少约3000倍。

97.根据权利要求1-96中任一项所述的方法,其中通过所述方法产生的肿瘤反应性细胞的组合物能够在抗原特异性刺激后产生浓度大于为或约30pg/mL、任选地大于为或约60pg/mL的IFNγ。

98.根据权利要求1-97中任一项所述的方法,所述方法还包括收获通过所述方法产生的细胞以用于配制为治疗性组合物。

99.根据权利要求98所述的方法,所述方法包括用冷冻保护剂配制所收获的细胞。

100.一种组合物,其包含通过根据权利要求1-99中任一项所述的方法产生的肿瘤反应性T细胞。

101.根据权利要求100所述的组合物,其中所述组合物包含冷冻保护剂。

102.根据权利要求100或权利要求101所述的组合物,其中所述T细胞是CD3+T细胞或者包括CD4+T细胞和/或CD8+T细胞。

103.根据权利要求100-102中任一项所述的组合物,其中所述T细胞包括CD4+T细胞和CD8+T细胞,其中CD8+T细胞与CD4+T细胞的比率为在为或约1:100与为或约100:1之间、在为或约1:50与为或约50:1之间、在为或约1:25与为或约25:1之间、在为或约1:10与为或约10:1之间、在为或约1:5与为或约5:1之间或者在为或约1:2.5与为或约2.5:1之间。

104.根据权利要求100-103中任一项所述的组合物,其中所述组合物中肿瘤反应性T细胞或其活细胞的数量为在为或约$0.5x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在$0.5x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$15x10^8$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$8x10^8$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$3.5x10^8$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$1x10^8$之间、在$1x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在$1x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$15x10^8$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$8x10^8$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$3.5x10^8$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$15x10^8$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$8x10^8$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$15x10^8$之间、在为或约$15x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$15x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在为或约$15x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$15x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$60x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$60x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在为或约$60x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$12x10^9$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$12x10^9$与为或约$30x10^9$之间或者在为或约$30x10^9$与为或约$60x10^9$之间,每个都包含端值。

105.根据权利要求100-104中任一项所述的组合物，其中所述组合物中肿瘤反应性T细胞或其活细胞的数量为至少或至少约$5x10^8$。

106.根据权利要求100-104中任一项所述的组合物，其中所述组合物中肿瘤反应性T细胞或其活细胞的数量为至少或至少约$1x10^9$。

107.根据权利要求100-104中任一项所述的组合物，其中所述组合物中肿瘤反应性T细胞或其活细胞的数量为至少或至少约$10x10^9$。

108.根据权利要求100-107中任一项所述的组合物，其包含药学上可接受的赋形剂。

109.一种治疗方法，所述治疗方法包括将根据权利要求100-108中任一项所述的组合物施用于患有癌症的受试者。

110.根据权利要求109所述的方法，其中所施用的组合物的细胞对于所述受试者是自体的。

111.根据权利要求109或权利要求110所述的方法，其中所述治疗有效剂量为在$1x10^8$与$10x10^9$个T细胞或其活细胞之间。

112.根据权利要求109或权利要求110所述的方法，其中所述治疗有效剂量为在$5x10^8$与$10x10^9$个T细胞或其活细胞之间。

113.根据权利要求109或权利要求110所述的方法，其中所述治疗有效剂量为在$5x10^8$与$1x10^9$个T细胞或其活细胞之间。

114.根据权利要求109-113中任一项所述的方法，其中所述癌症是上皮癌。

115.根据权利要求109-114中任一项所述的方法，其中所述癌症是黑色素瘤、肺鳞癌、肺腺癌、膀胱癌、肺小细胞癌、食道癌、结直肠癌、宫颈癌、头颈癌、胃癌或子宫癌。

116.根据权利要求109-115中任一项所述的方法，其中所述癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)、CRC、卵巢癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆管细胞癌、子宫内膜癌，任选地其中所述乳腺癌是HR+/Her2-乳腺癌、三阴性乳腺癌(TNBC)或HER2+乳腺癌。

117.根据权利要求100-108中任一项所述的组合物，其用于治疗患有癌症的受试者。

118.根据权利要求100-108中任一项所述的组合物用于制造用于治疗患有癌症的受试者的药物的用途。

119.根据权利要求117所述的用于所述用途的组合物或根据权利要求118所述的用途，其中所施用的组合物的细胞对于所述受试者是自体的。

120.根据权利要求117-119中任一项所述的用于所述用途的组合物或根据权利要求117-119中任一项所述的用途，其中所述治疗有效剂量为在$1x10^8$与$10x10^9$个T细胞或其活细胞之间。

121.根据权利要求117-119中任一项所述的用于所述用途的组合物或根据权利要求117-119中任一项所述的用途，其中所述治疗有效剂量为在$5x10^8$与$10x10^9$个T细胞或其活细胞之间。

122.根据权利要求117-119中任一项所述的用于所述用途的组合物或根据权利要求117-119中任一项所述的用途，其中所述治疗有效剂量为在$5x10^8$与$1x10^9$个T细胞或其活细胞之间。

123.根据权利要求117-122中任一项所述的用于所述用途的组合物或根据权利要求117-122中任一项所述的用途，其中所述癌症是上皮癌。

124.根据权利要求117-122中任一项所述的用于所述用途的组合物或根据权利要求117-122中任一项所述的用途，其中所述癌症是黑色素瘤、肺鳞癌、肺腺癌、膀胱癌、肺小细胞癌、食道癌、结直肠癌、宫颈癌、头颈癌、胃癌或子宫癌。

125.根据权利要求117-124中任一项所述的用于所述用途的组合物或根据权利要求117-124中任一项所述的用途，其中所述癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)、CRC、卵巢癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆管细胞癌、子宫内膜癌，任选地其中所述乳腺癌是HR+/Her2-乳腺癌、三阴性乳腺癌(TNBC)或HER2+乳腺癌。

肿瘤反应性T细胞的离体富集和扩增的方法及其相关组合物

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2020年2月27日提交的标题为“肿瘤反应性T细胞的离体富集和扩增的方法及其相关组合物(METHODS FOR EX VIVO ENRICHMENT AND EXPANSION OF TUMOR REACTIVE T CELLS AND RELATED COMPOSITIONS THEREOF)”的美国临时专利申请号62/982,704的优先权,所述申请的内容通过引用以其整体并入。

通过引用并入序列表

[0002] 本申请是与电子格式的序列表一起提交的。序列表以2021年3月1日创建的名为16517_2000840_SEQLIST.txt的文件提供,其大小为12,537字节。将在电子格式的序列表中的信息通过引用以其整体并入。

技术领域

[0003] 本公开文本提供用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括以下细胞的离体富集和扩增:分泌趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)的细胞;对C-X-C趋化因子受体5型(CXCR5)呈表面阳性的细胞;和/或对CD39、PD-1和TIGIT中的一种或多种呈表面阳性的细胞。本公开文本还提供通过本文所述的方法产生的T细胞的群体及其药物组合物。

背景技术

[0004] 临床研究已经证实,从手术切除的肿瘤分离的T细胞具有识别新生抗原的T细胞受体(TCR),并且扩增这些新生抗原反应性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体并将它们再输注至患者体内在一些情形中可以产生显著的临床益处。然而,这样的细胞在细胞疗法中应用的主要障碍是难以获得这样的细胞。例如,用于产生用于癌症中的TIL疗法的现有方法过长,涉及的反应性细胞的数量低,并且不适合于商业应用。需要改进的方法来获得和制造用于治疗性用途的含有肿瘤反应性T细胞的细胞组合物。本文提供符合这样的需要的实施方案。

发明内容

[0005] 根据本文所述的某些实施方案,提供用于制造肿瘤反应性T细胞的方法。这样的方法包括但不限于以下步骤:(a)从来自患有肿瘤的受试者的包含T细胞的输入样品选择分泌趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)的细胞和/或对C-X-C趋化因子受体5型(CXCR5)呈表面阳性的细胞,以获得从所述样品选择的细胞;以及(b)通过将所选择的细胞与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的群体的条件下一起培养来进行扩增。本文还提供通过本文所述的方法产生的T细胞的群体及其药物组合物。

[0006] 本文提供一种制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括(a)从来自患有肿瘤的受试者的包含T细胞的输入样品选择分泌趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)的细胞和/或对C-X-C趋化因子受体5型(CXCR5)呈表面阳性的细胞,以获得从所述样品选择的细胞;以及(b)通过将所选择的细胞与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的群体的条件下一起培养来进行扩增。

[0007] 在一些任何实施方案中,所述方法包括选择分泌CXCL13的细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述方法包括选择对CXCR5呈表面阳性的细胞。

[0008] 在一些任何所提供的实施方案中,所述选择还包括选择对选自以下的一种或多种其他标记呈表面阳性的细胞:CD107a、CD39、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD36、CD38、CD30、CD154(CD40L)、CD134(OX40)、CD152(CTLA-4)、CD160、CXCR5(CD195)、CD244、CD258(LIGHT)、CD256(APRIL)、CD272(BTLA-4)、PD-1、TIM-3、LAG-3或TIGIT,其中所述选择分泌CXCL13的细胞和/或对CXCR5呈表面阳性的细胞以及所述选择对所述一种或多种其他标记呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以获得所选择的细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述一种或多种其他标记是PD-1、CD39和/或TIGIT。

[0009] 在一些任何所提供的实施方案中,所述方法还包括选择对选自CD3、CD4或CD8的T细胞标记呈表面阳性的T细胞,其中所述选择对所述T细胞标记呈表面阳性的细胞以及所述选择分泌CXCL13的细胞和/或对CXCR5呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以获得所选择的细胞。任选地,通过阳性或阴性选择进行选择。

[0010] 本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括(a)从来自患有肿瘤的受试者的包含T细胞的输入样品选择对激活标记PD-1、CD39和TIGIT呈表面阳性的细胞,以获得从所述样品选择的细胞;以及(b)通过将所选择的细胞与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的群体的条件下一起培养来进行扩增。本文还提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括从来自患有肿瘤的受试者的包含T细胞的输入样品选择对来自由PD-1、CD39和TIGIT组成的组的至少两种激活标记呈表面阳性的细胞,以获得从所述样品选择的细胞;以及通过将所选择的细胞与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的群体的条件下一起培养来进行扩增。

[0011] 本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括(a)从来自患有肿瘤的受试者的包含T细胞的输入样品选择对PD-1、CD39和TIGIT呈表面阳性的细胞,以获得从所述样品选择的细胞;以及(b)通过将所选择的细胞与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的群体的条件下一起培养来进行扩增。在一些任何所提供的实施方案中,所述选择还包括选择对选自以下的一种或多种其他标记呈表面阳性的细胞:CD107a、CD39、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD36、CD38、CD30、CD154(CD40L)、CD134(OX40)、CD152(CTLA-4)、CD160、CXCR5(CD195)、CD244、CD258(LIGHT)、CD256(APRIL)、CD272(BTLA-4)、PD-1、TIM-3、LAG-3或TIGIT,其中所述选择对PD-1/CD39/TIGIT呈表面阳性的细胞以及所述选择对所述其他标记呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以获得所选择的细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述选择还包括选择对选自以下的一种或多种其他标记呈表面阳性的细胞:CD107a、CD39、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD36、CD38、CD30、CD154(CD40L)、CD134(OX40)、CD152(CTLA-4)、CD160、CXCR5(CD195)、CD244、CD258(LIGHT)、CD256(APRIL)、CD272(BTLA-4)、PD-1、TIM-3、LAG-3或TIGIT,其中所述选择对所述激活标记呈表面阳性的细胞以及所述选择对所述其他标记呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以获得所选择的细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述选择还包括选择分泌趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)的细胞,其中所述选择对PD-1/CD39/TIGIT呈表面阳性的细胞以及所述选择分泌CXCL13的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以获得所选择的细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述选择还包括对选自CD3、CD4或

CD8的T细胞标记呈表面阳性的T细胞，其中所述选择对所述T细胞标记呈表面阳性的细胞以及所述选择对PD-1/CD39/TIGIT呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行，以获得所选择的细胞。在一些任何所提供的实施方案中，所述选择还包括对选自CD3、CD4或CD8的T细胞标记呈表面阳性的T细胞，其中所述选择对所述T细胞标记呈表面阳性的细胞以及所述选择对所述激活标记呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行，以获得所选择的细胞。任选地，通过阳性或阴性选择进行选择。

[0012] 在一些任何所提供的实施方案中，包含T细胞的所述输入样品来自外周血或来自肿瘤。在一些任何所提供的实施方案中，所述输入样品包含肿瘤浸润淋巴细胞。在一些任何所提供的实施方案中，包含T细胞的所述输入样品源自切除的肿瘤。在一些任何所提供的实施方案中，包含T细胞的所述输入样品是通过来自所述切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片的匀浆化和/或酶消化处理的单细胞悬浮液。在一些任何所提供的实施方案中，包含T细胞的所述输入样品是通过来自所述切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片的匀浆化和酶消化处理的单细胞悬浮液。

[0013] 在一些任何所提供的实施方案中，所述酶消化是通过与胶原酶、任选地胶原酶IV或胶原酶I/II一起孵育来进行。

[0014] 在一些任何所提供的实施方案中，所述输入样品包含为或约$10x10^6$个T细胞/克来自所述受试者的肿瘤样品至为或约$100x10^6$个T细胞/克来自所述受试者的肿瘤样品。在一些任何所提供的实施方案中，所述扩增的T细胞群体用作治疗性细胞组合物。在一些任何所提供的实施方案中，进行所述扩增以产生扩增的T细胞群体持续7至35天。在一些任何所提供的实施方案中，进行所述扩增以产生扩增的T细胞群体持续7至28天，任选地14天至28天。在一些任何所提供的实施方案中，进行所述扩增以产生扩增的T细胞群体持续7至21天，任选地7至14天。

[0015] 在一些任何所提供的实施方案中，淋巴细胞的所述一种或多种T细胞刺激剂是抗CD3剂和/或选自IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25和IL-23中的一种或多种的重组细胞因子。在一些任何所提供的实施方案中，淋巴细胞的所述一种或多种T细胞刺激剂是抗CD3剂(例如OKT3)和/或选自IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25、IL-23、IL-27和IL-35中的一种或多种的重组细胞因子。在一些任何所提供的实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂中的至少一种是重组IL-2。在一些任何所提供的实施方案中，与所述一种或多种T细胞刺激剂一起培养还包括细胞凋亡抑制剂。在一些任何所提供的实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂是一种或多种第一T细胞刺激剂并且所述进行扩增是第一扩增，其中所述方法还包括通过将所述第一扩增的T细胞群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增，其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

[0016] 在一些任何所提供的实施方案中，所述第一扩增的一种或多种T细胞刺激剂与所述第二扩增的一种或多种T细胞刺激剂是相同的。在一些任何所提供的实施方案中，进行所述第一扩增持续7至21天，任选地7至14天。在一些任何所提供的实施方案中，进行所述第二扩增持续7至21天，任选地7至14天。

[0017] 在一些任何所提供的方法中，所述一种或多种T细胞刺激剂是一种或多种第一T细胞刺激剂并且所述进行扩增是第一扩增，其中所述方法还包括(c)在将一种或多种非天然

肽呈递于主要组织相容性复合体(MHC)上的抗原呈递细胞的存在下共培养所述第一扩增的T细胞群体以产生反应性T细胞群体,所述一种或多种非天然肽是与受试者肿瘤中相关的非同义体细胞突变对应的肽,所述反应性T细胞群体含有包含对所述肿瘤的突变编码肽具有反应性的内源T细胞受体的T细胞;以及(d)通过将所述反应性T细胞群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第二群体的条件下一起培养来进行第二扩增,其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

[0018] 在一些任何所提供的方法中,所述一种或多种T细胞刺激剂是一种或多种第一T细胞刺激剂并且所述进行扩增是第一扩增,其中所述方法还包括(c)在将一种或多种非天然肽呈递于主要组织相容性复合体(MHC)上的抗原呈递细胞的存在下共培养所述第一扩增的T细胞群体以产生反应性T细胞群体,所述一种或多种非天然肽是与受试者肿瘤中相关的非同义体细胞突变对应的肽,所述反应性T细胞群体含有包含对所述肿瘤的突变编码肽具有反应性的内源T细胞受体的T细胞;(d)从所述反应性T细胞群体选择对与包含对所述肿瘤的突变编码肽具有反应性的天然T细胞受体的反应性T细胞相关的一种或多种标记呈阳性的细胞,以产生所述反应性T细胞的富集群体;以及(e)通过将所述反应性T细胞的富集群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第二群体的条件下一起培养来进行第二扩增,其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

[0019] 在一些任何所提供的实施方案中,所述一种或多种标记是T细胞耗竭标记的标记。在一些任何所提供的实施方案中,所述一种或多种标记是细胞表面CD107a、CD39、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD36、CD38、CD30、CD154(CD40L)、CD134(OX40)、CD152(CTLA-4)、CD160、CXCR5(CD195)、CD244、CD258(LIGHT)、CD256(APRIL)、CD272(BTLA-4)、PD-1、TIM-3、LAG-3或TIGIT。在一些任何所提供的实施方案中,所述一种或多种标记是PD-1、CD39和TIGIT。在一些任何所提供的实施方案中,所述一种或多种标记是分泌的CXCL13。

[0020] 在一些任何所提供的方法中,所述方法还包括选择、任选地通过阳性选择或阴性选择来选择对选自CD3、CD4或CD8的T细胞标记呈表面阳性的T细胞,其中所述选择对所述T细胞标记呈表面阳性的细胞以及所述选择对与反应性T细胞相关的标记呈阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以获得所述反应性T细胞的富集群体。

[0021] 本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品,(b)通过将包含T细胞的所述输入样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增,(c)从扩增的细胞的所述第一群体选择分泌趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)的细胞和/或对C-X-C趋化因子受体5型(CXCR5)呈表面阳性的细胞,以产生选择的群体,以及(d)通过将所选择的群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增,其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

[0022] 本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品,(b)通过将包含T细胞的所述输入样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增,(c)从扩增的细胞的所述第一群体选择分泌趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)的细胞和/或对C-X-C趋化因子受体5型(CXCR5)呈表

面阳性的细胞,以产生选择的群体,(d)在将一种或多种非天然肽呈递于主要组织相容性复合体(MHC)上的抗原呈递细胞的存在下共培养所选择的群体以产生反应性T细胞群体,所述一种或多种非天然肽是与受试者肿瘤中相关的非同义体细胞突变对应的肽,所述反应性T细胞群体含有包含对所述肿瘤的突变编码肽具有反应性的内源T细胞受体的T细胞,以及(e)通过将所述反应性T细胞群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增,其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

[0023] 本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品,(b)通过将包含T细胞的所述输入样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增,(c)在将一种或多种非天然肽呈递于主要组织相容性复合体(MHC)上的抗原呈递细胞的存在下共培养扩增的细胞的所述第一群体以产生反应性T细胞群体,所述一种或多种非天然肽是与受试者肿瘤中相关的非同义体细胞突变对应的肽,所述反应性T细胞群体含有包含对所述肿瘤的突变编码肽具有反应性的内源T细胞受体的T细胞,(d)从所述反应性T细胞群体选择分泌趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)的细胞和/或对C-X-C趋化因子受体5型(CXCR5)呈表面阳性的细胞,以产生选择的群体;以及(e)通过将所选择的群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增,其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

[0024] 在一些任何所提供的实施方案中,所述方法包括选择分泌CXCL13的细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述方法包括选择对CXCR5呈表面阳性的细胞。

[0025] 在一些任何所提供的实施方案中,所述选择还包括选择对选自以下的一种或多种其他标记呈表面阳性的细胞:CD107a、CD39、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD36、CD38、CD30、CD154(CD40L)、CD134(OX40)、CD152(CTLA-4)、CD160、CXCR5(CD195)、CD244、CD258(LIGHT)、CD256(APRIL)、CD272(BTLA-4)、PD-1、TIM-3、LAG-3或TIGIT,其中所述选择分泌CXCL13的细胞和/或对CXCR5呈表面阳性的细胞以及所述选择对所述一种或多种其他标记呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以产生所选择的群体。在一些任何所提供的实施方案中,所述一种或多种其他标记是PD-1、CD39和/或TIGIT。在一些所提供的实施方案中,所述一种或多种其他标记是PD-1、CD39和TIGIT。

[0026] 在一些任何所提供的方法中,所述方法还包括选择、任选地通过阳性选择或阴性选择来选择对选自CD3、CD4或CD8的T细胞标记呈表面阳性的T细胞,其中所述选择对所述T细胞标记呈表面阳性的细胞以及所述选择分泌CXCL13的细胞和/或对CXCR5呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以产生所选择的细胞群体。

[0027] 本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品,(b)通过将包含T细胞的所述样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增,(c)从扩增的细胞的所述第一群体选择对激活标记PD-1、CD39和TIGIT呈表面阳性的细胞,以产生选择的群体;以及(d)通过将所选择的群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第

二扩增,其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

[0028] 本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品(b)通过将包含T细胞的所述样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增;(c)从扩增的细胞的所述第一群体选择对来自由PD-1、CD39和TIGIT组成的组的至少两种激活标记呈表面阳性的细胞,以产生选择的群体;以及(d)通过将所选择的群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增,其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

[0029] 本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品,(b)通过将包含T细胞的所述样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增,(c)从扩增的细胞的所述第一群体选择对激活标记PD-1、CD39和TIGIT呈表面阳性的细胞,以产生选择的细胞群体,(d)在将一种或多种非天然肽呈递于主要组织相容性复合体(MHC)上的抗原呈递细胞的存在下共培养所选择的细胞群体以产生反应性T细胞群体,所述一种或多种非天然肽是与受试者肿瘤中相关的非同义体细胞突变对应的肽,所述反应性T细胞群体含有包含对所述肿瘤的突变编码肽具有反应性的内源T细胞受体的T细胞,以及(e)通过将所述反应性T细胞群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增,其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

[0030] 本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品,(b)通过将包含T细胞的所述样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增,(c)在将一种或多种非天然肽呈递于主要组织相容性复合体(MHC)上的抗原呈递细胞的存在下共培养扩增的细胞的所述第一群体以产生反应性T细胞群体,所述一种或多种非天然肽是与受试者肿瘤中相关的非同义体细胞突变对应的肽,所述反应性T细胞群体含有包含对所述肿瘤的突变编码肽具有反应性的内源T细胞受体的T细胞,(d)从所述反应性T细胞群体选择对激活标记PD-1、CD39和TIGIT呈表面阳性的细胞,以产生选择的细胞群体;以及(e)通过将所选择的细胞群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增,其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

[0031] 在一些任何所提供的实施方案中,所述选择还包括选择对选自以下的一种或多种其他标记呈表面阳性的细胞:CD107a、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD36、CD38、CD30、CD154(CD40L)、CD134(OX40)、CD152(CTLA-4)、CD160、CXCR5(CD195)、CD244、CD258(LIGHT)、CD256(APRIL)、CD272(BTLA-4)、TIM-3或LAG-3,其中所述选择对PD-1/CD39/TIGIT呈表面阳性的细胞以及所述选择对所述其他标记呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以产生所选择的细胞群体。在一些任何所提供的实施方案中,所述选择还包括选择分泌趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)的细胞,其中所述选择对PD-1/CD39/TIGIT呈表面阳性的细胞以及所述选择对所述其他标记呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以产生所选择的细胞群体。在一些任何所提供的实施方案中,所述选择还包括选择对选自以

下的一种或多种其他标记呈表面阳性的细胞:CD107a、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD36、CD38、CD30、CD154(CD40L)、CD134(OX40)、CD152(CTLA-4)、CD160、CXCR5(CD195)、CD244、CD258(LIGHT)、CD256(APRIL)、CD272(BTLA-4)、TIM-3或LAG-3,其中所述选择对所述激活标记呈表面阳性的细胞以及所述选择对所述其他标记呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以产生所选择的细胞群体。

[0032] 在一些任何所提供的实施方案中,所述选择还包括选择分泌趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)的细胞,其中所述选择对PD-1/CD39/TIGIT呈表面阳性的细胞以及所述选择对所述其他标记呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以产生所选择的细胞群体。在一些任何所提供的方法中,还包括选择、任选地通过阳性选择或阴性选择来选择对选自CD3、CD4或CD8的T细胞标记呈表面阳性的T细胞,其中所述选择对所述T细胞标记呈表面阳性的细胞以及所述选择对PD-1/CD39/TIGIT呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以产生所选择的细胞群体。

[0033] 在一些任何所提供的实施方案中,所述生物样品是外周血样品或肿瘤样品。在一些所提供的实施方案中,包含T细胞的所述输入样品包含肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

[0034] 在一些任何所提供的实施方案中,包含T细胞的所述输入样品源自切除的肿瘤。在一些任何所提供的实施方案中,所述一个或多个肿瘤碎片的直径为1-8mm。在一些任何所提供的实施方案中,以约1个肿瘤碎片/2cm^{2}接种所述一个或多个肿瘤碎片用于所述第一扩增。

[0035] 在一些任何所提供的实施方案中,包含T细胞的所述输入样品是通过来自所述切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片的匀浆化和/或酶消化处理的单细胞悬浮液。在一些任何所提供的实施方案中,包含T细胞的所述输入样品是通过来自切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片的匀浆化和酶消化处理的单细胞悬浮液。在一些任何所提供的实施方案中,所述酶消化是通过与胶原酶、任选地胶原酶IV或胶原酶I/II一起孵育来进行。

[0036] 在一些任何所提供的实施方案中,所述输入样品包含为或约10x10^{6}个T细胞/克来自所述受试者的肿瘤样品至为或约100x10^{6}个T细胞/克来自所述受试者的肿瘤样品。

[0037] 在一些任何所提供的实施方案中,以约5x10^{5}至为或约2x10^{6}个总细胞/2cm^{2}接种包含T细胞的所述输入样品用于扩增。

[0038] 在一些任何所提供的实施方案中,进行所述第一扩增持续1至14天。在一些任何所提供的实施方案中,进行所述第一扩增持续为或约1天、为或约2天、为或约3天、为或约4天、为或约5天、为或约6天、为或约7天、为或约8天、为或约9天、为或约10天、为或约11天、为或约12天、为或约13天或者为或约14天。在一些任何所提供的实施方案中,进行所述第二扩增持续7至35天。在一些任何所提供的实施方案中,进行所述第二扩增持续7至21天,任选地7至14天。

[0039] 在一些任何所提供的实施方案中,所述第一扩增的一种或多种T细胞刺激剂与所述第二扩增的一种或多种T细胞刺激剂是相同的。

[0040] 在一些任何所提供的实施方案中,淋巴细胞的所述一种或多种第一T细胞刺激剂是抗CD3剂和/或选自IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25和IL-23中的一种或多种的重组细胞因子。在一些任何所提供的实施方案中,用于所述第一扩增的淋巴细胞的所述一种或多种第一T细胞刺激剂是选自IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25、IL-23、IL-27和IL-35中的一种或

多种的重组细胞因子。在一些任何所提供的实施方案中，所述一种或多种第一T细胞刺激剂中的至少一种是重组IL-2。

[0041] 在一些任何所提供的实施方案中，所述一种或多种第一T细胞刺激剂包括抗CD3抗体，任选地OKT3。在一些任何所提供的实施方案中，所述一种或多种第一T细胞刺激剂不包括抗CD3抗体。任选地，其中所述抗CD3抗体的浓度是为或约50ng/mL。在一些任何所提供的实施方案中，所述一种或多种第一T细胞刺激剂还包括细胞凋亡抑制剂。在一些任何所提供的实施方案中，与所述一种或多种第一T细胞刺激剂一起培养的还包括细胞凋亡抑制剂。在一些任何所提供的实施方案中，淋巴细胞的所述一种或多种第二T细胞刺激剂是抗CD3剂和/或选自IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25和IL-23中的一种或多种的重组细胞因子。在一些任何所提供的实施方案中，淋巴细胞的所述一种或多种第二T细胞刺激剂是抗CD3剂和/或是选自IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25、IL-23、IL-27和IL-35中的一种或多种的重组细胞因子。

[0042] 在一些任何所提供的实施方案中，所述一种或多种第二T细胞刺激剂中的至少一种是重组IL-2。在一些任何所提供的实施方案中，重组IL-2的浓度为100IU/mL至6000IU/mL。在一些任何所提供的实施方案中，重组IL-2的浓度为300IU/mL至1000IU/mL，任选地其中重组IL-2的浓度是为或约300IU/mL。在一些任何所提供的实施方案中，重组IL-2的浓度是为或约1000IU/mL。

[0043] 在一些任何所提供的实施方案中，所述一种或多种第二T细胞刺激剂包括抗CD3抗体，任选地OKT3，任选地其中所述抗CD3抗体的浓度是为或约50ng/mL。

在一些任何所提供的实施方案中，所述一种或多种第二T细胞刺激剂还包括细胞凋亡抑制剂。在一些任何所提供的实施方案中，与所述一种或多种第二T细胞刺激剂一起培养的还包括细胞凋亡抑制剂。在一些任何所提供的实施方案中，所述细胞凋亡抑制剂减少由CD95(Fas)诱导的细胞凋亡，任选地其中所述细胞凋亡抑制剂特异性结合CD95(Fas)或CD95配体(Fas配体)。在一些任何所提供的实施方案中，所述细胞凋亡抑制剂是抗体或抗原结合片段。任选地，其中所述细胞凋亡抑制剂是抗Fas抗体或抗Fas配体抗体。在一些任何所提供的实施方案中，所述细胞凋亡抑制剂是融合蛋白，其包含与Fc免疫球蛋白结构域融合的与CD95配体(Fas配体)结合的CD95(Fas)的细胞外结构域或其特异性结合片段。任选地，其中所述细胞凋亡抑制剂是APG101或CAN008。在一些任何所提供的实施方案中，所述细胞凋亡抑制剂抑制半胱天冬酶激活或活性，任选地其中所述半胱天冬酶是半胱天冬酶2、半胱天冬酶8、半胱天冬酶9、半胱天冬酶10、半胱天冬酶3、半胱天冬酶6或半胱天冬酶7，任选地其中所述半胱天冬酶是半胱天冬酶3。在一些任何所提供的实施方案中，所述细胞凋亡抑制剂选自NAIP(神经元细胞凋亡抑制蛋白;BIRC1)、cIAP1和cIAP2(细胞凋亡抑制蛋白1和2;分别为BIRC2和BIRC3)、XIAP(X染色体结合IAP;BIRC4)、存活蛋白(BIRC5)、BRUCE(Apollon;BIRC6)、生存蛋白(BIRC7)和Ts-IAP(睾丸特异性IAP;BIRC8)。在一些任何所提供的实施方案中，所述细胞凋亡抑制剂是恩利卡生。在一些任何所提供的实施方案中，所述细胞凋亡抑制剂选自恩利卡生(IDN-6556、PF-03491390)、NAIP(神经元细胞凋亡抑制蛋白;BIRC1)、cIAP1和cIAP2(细胞凋亡抑制蛋白1和2;分别为BIRC2和BIRC3)、XIAP(X染色体结合IAP;BIRC4)、存活蛋白(BIRC5)、BRUCE(Apollon;BIRC6)、生存蛋白(BIRC7)和Ts-IAP(睾丸特异性IAP;BIRC8)、蟛蜞菊内酯、NS3694、NSCI和Z-氟甲基酮Z-VAD-FMK或其氟甲基酮变体。在一

些任何所提供的实施方案中，所述细胞凋亡抑制剂是抑制两种或更多种半胱天冬酶的激活或活性的泛半胱天冬酶抑制剂。在一些任何所提供的实施方案中，所述细胞凋亡抑制剂是Z-VAD-FMK、Z-FA-FMK、Z-VAD(OH)-FMK、Z-DEVD-FMK、Z-VAD(OM2)-FMK或Z-VDVAD-FMK。

[0044] 在一些任何所提供的实施方案中，所述细胞凋亡抑制剂的浓度为在为和约0.5μM与为或约50μM之间、在为或约0.5μM与为或约25μM之间、在为或约0.5μM与为或约10μM之间、在为或约0.5μM与为或约5μM之间、在为或约0.5μM与为或约1μM之间、在为或约1μM与为或约100μM之间、在为或约1μM与为或约50μM之间、在为或约1μM与为或约25μM之间、在为或约1μM与为或约10μM之间、在为或约1μM与为或约5μM之间、在为或约5μM与为或约100μM之间、在为或约5μM与为或约50μM之间、在为或约5μM与为或约25μM之间、在为或约5μM与为或约10μM之间、在为或约10μM与为或约100μM之间、在为或约10μM与为或约50μM之间、在为或约10μM与为或约25μM之间、在为或约25μM与为或约100μM之间、在为或约25μM与为或约50μM之间或者在为或约50μM与为或约100μM之间，每个都包含端值。

[0045] 在一些任何所提供的实施方案中，所述抗原呈递细胞是树突细胞、单核巨噬细胞、B淋巴细胞、内皮细胞或胸腺上皮。在一些任何所提供的实施方案中，所述抗原呈递细胞是树突细胞。在一些任何所提供的实施方案中，所述抗原呈递细胞对于所述受试者是自体的。

[0046] 在一些任何所提供的实施方案中，所述一种或多种非天然肽包括单独肽或肽库。在一些任何所提供的实施方案中，通过串联编码所述一种或多种非天然肽的体外转录合成的小基因构建体的转染在抗原呈递细胞上加载所述一种或多种非天然肽，其中所转录的小基因构建体生成单独肽。在一些任何所提供的实施方案中，通过肽脉冲，任选地通过电穿孔在抗原呈递细胞上加载所述一种或多种非天然肽。在一些任何所提供的实施方案中，所述一种或多种非天然肽的长度为5-30个氨基酸，任选地12-25个氨基酸，任选地为或约25个氨基酸。

[0047] 在一些任何所提供的实施方案中，所述一种或多种非天然肽是肽库，并且用于所述肽脉冲的肽库中的肽浓度为在为或约0.001μg/mL与为或约40μg/mL之间、0.01μg/mL与为或约40μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约40μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约40μg/mL之间、为或约0.01μg/mL与为或约10μg/mL之间或者为或约1μg/mL与为或约10μg/mL之间；或者所述一种或多种非天然肽是单独肽，并且用于所述肽脉冲的单独肽的浓度为在为或约0.00001μg/mL与为或约1μg/mL之间、为或约0.00001μg/mL与为或约0.1μg/mL之间、为或约0.00001μg/mL与为或约0.01μg/mL之间、为或约0.0001μg/mL与为或约1μg/mL之间、为或约0.0001μg/mL与为或约0.1μg/mL之间、为或约0.0001μg/mL与为或约0.1μg/mL之间或者为或约0.0001μg/mL与为或约0.01μg/mL之间。

[0048] 在一些任何所提供的实施方案中，所述一种或多种非天然肽的单独肽的浓度平均地是为或约0.00001μg/mL至为或约0.01μg/mL。在一些任何所提供的实施方案中，所述一种或多种非天然肽的单独肽的浓度平均地是为或约0.0001μg/mL和为或约0.001μg/mL。

[0049] 在一些任何所提供的实施方案中，其中抗原呈递细胞与T细胞的共培养比率为在20:1与1:1之间、在15:1与1:1之间、在10:1与1:1之间、在5:1与1:1之间、在2.5:1与1:1之间、在1:20与1:1之间、在1:15与1:1之间、在1:10与1:1之间、在1:5与1:1之间或者在1:2.5与1:1之间。在一些任何所提供的实施方案中，树突细胞与T细胞的共培养比率为在5:1与1:5之间或为在3:1与1:3之间，任选地为或为约1:1。在一些任何所提供的实施方案中，抗原呈

递细胞与T细胞的共培养比率为或为约1:1。

[0050] 在一些任何所提供的实施方案中,所述共培养持续2小时至24小时。在一些任何所提供的实施方案中,所述共培养持续为或约6小时。

[0051] 在一些任何所提供的实施方案中,所述选择细胞是使用基于荧光的细胞分选仪来进行。在一些任何所提供的实施方案中,所述基于荧光的细胞分选仪是自动化高通量流式细胞术分选仪。任选地,FX500细胞分选仪或Miltenyi Tyto细胞分选仪。在一些任何所提供的实施方案中,所述选择是通过所述基于荧光的细胞分选仪运行1次、2次、3次或4次。在一些任何所提供的实施方案中,所述选择是使用基于荧光的一次性流控细胞分选仪以在10,000与100,000个细胞/秒之间的速率来进行。

[0052] 在一些任何所提供的实施方案中,用于扩增的培养持续7至35天。在一些任何所提供的实施方案中,用于扩增的培养持续7至21天,任选地7至14天。在一些任何所提供的实施方案中,所述培养是在封闭系统中进行。在一些任何所提供的实施方案中,用于所述第一扩增的培养持续7至21天,任选地7至14天。

[0053] 在一些任何所提供的实施方案中,用于所述第一扩增的培养是在封闭系统中使用透气性培养器皿来进行。在一些任何所提供的实施方案中,用于所述第一扩增的培养是在封闭系统中使用生物反应器来进行。.在一些任何所提供的实施方案中,进行所述第一扩增是在封闭系统中使用生物反应器来进行。在一些任何所提供的实施方案中,用于所述第二扩增的培养持续7至21天,任选地7至14天。在一些任何所提供的实施方案中,用于所述第二扩增的培养是在透气性培养器皿中进行。在一些任何所提供的实施方案中,用于所述第二扩增的培养是使用生物反应器来进行。在一些任何所提供的实施方案中,所述进行第二扩增是在透气性培养器皿中进行。在一些任何所提供的实施方案中,所述进行第二扩增是使用生物反应器来进行。

[0054] 在一些任何所提供的实施方案中,所述肿瘤是上皮癌的肿瘤。在一些任何所提供的实施方案中,所述肿瘤是以下的肿瘤:黑色素瘤、肺鳞癌、肺腺癌、膀胱癌、肺小细胞癌、食道癌、结直肠癌(CRC)、宫颈癌、头颈癌、胃癌或子宫癌。在一些任何所提供的实施方案中,所述肿瘤是黑色素瘤。在一些任何所提供的实施方案中,所述肿瘤是结直肠癌(CRC)。在一些任何所提供的实施方案中,所述肿瘤是以下的肿瘤:非小细胞肺癌(NSCLC)、CRC、卵巢癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆管细胞癌、子宫内膜癌,任选地其中所述乳腺癌是HR+/Her2-乳腺癌、三阴性乳腺癌(TNBC)或HER2+乳腺癌。

[0055] 在一些任何所提供的实施方案中,所述方法导致来自所述输入样品的T细胞的倍数扩增或导致肿瘤反应性T细胞的倍数扩增,所述扩增倍数为至少或至少约2倍、至少或至少约5倍、至少或至少约10倍、至少或至少约25倍、至少或至少约50倍、至少或至少约100倍、至少或至少约250倍、至少或至少约500倍、至少或至少约750倍、至少或至少约1000倍、至少或至少约1500倍、至少或至少约2000倍、至少或至少约2500倍或者至少或至少约3000倍。

[0056] 在一些任何所提供的实施方案中,通过所述方法产生的肿瘤反应性细胞的组合物能够在抗原特异性刺激之后产生浓度大于为或约30pg/mL、任选地大于为或约60pg/mL的IFNγ。

[0057] 在一些任何所提供的方法中,还包括收获通过所述方法产生的细胞以用于配制为治疗性组合物。在一些任何所提供的方法中,所述方法包括用冷冻保护剂配制所收获的细

胞。

[0058] 本文提供一种组合物，其包含通过任何所提供的方法产生的肿瘤反应性T细胞。在一些任何所提供的实施方案中，其中所述组合物包含冷冻保护剂。

[0059] 在一些任何所提供的实施方案中，所述T细胞是CD3+T细胞或者包括CD4+T细胞和/或CD8+T细胞。在一些任何所提供的实施方案中，所述T细胞包括CD4+T细胞和CD8+T细胞，其中CD8+T细胞与CD4+T细胞的比率为在为或约1:100与为或约100:1之间、在为或约1:50与为或约50:1之间、在为或约1:25与为或约25:1之间、在为或约1:10与为或约10:1之间、在为或约1:5与为或约5:1之间或者在为或约1:2.5与为或约2.5:1之间。

[0060] 在一些任何所提供的实施方案中，所述组合物中肿瘤反应性T细胞或其活细胞的数量为在为或约$0.5x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在$0.5x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$15x10^8$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$8x10^8$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$3.5x10^8$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$1x10^8$之间、在$1x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在$1x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$15x10^8$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$8x10^8$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$3.5x10^8$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约15x108之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$8x10^8$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$8x10^8$与为或约60x108之间、在为或约$8x10^8$与为或约$15x10^8$之间、在为或约$15x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$15x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在为或约$15x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$15x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$60x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$60x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在为或约$60x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$12x10^9$与为或约$50x10^9$之间、在为或约12x109与为或约$30x10^9$之间或者在为或约$30x10^9$与为或约$60x10^9$之间，每个都包含端值。

[0061] 在一些任何所提供的实施方案中，所述组合物中肿瘤反应性T细胞或其活细胞的数量为至少或至少约$5x10^8$。在一些任何所提供的实施方案中，所述组合物中肿瘤反应性T细胞或其活细胞的数量为至少或至少约$1x10^9$。在一些任何所提供的实施方案中，所述组合物中肿瘤反应性T细胞或其活细胞的数量为至少或至少约$10x10^9$。在一些任何所提供的实施方案中，所提供的组合物包含药学上可接受的赋形剂。本文提供一种治疗方法，其包括将任何所提供的组合物施用于患有癌症的受试者。在一些任何所提供的实施方案中，所施用的组合物的细胞对于所述受试者是自体的。

[0062] 在一些任何所提供的实施方案中，治疗有效剂量为在$1x10^8$与$10x10^9$个T细胞或其活细胞之间。在一些任何所提供的实施方案中，治疗有效剂量为在$5x10^8$与$10x10^9$个T细胞或其活细胞之间。在一些任何所提供的实施方案中，治疗有效剂量为在$5x10^8$与$1x10^9$个T细胞或其活细胞之间。

[0063] 在一些任何所提供的实施方案中，所述癌症是上皮癌。在一些任何所提供的实施方案中，所述癌症是黑色素瘤、肺鳞癌、肺腺癌、膀胱癌、肺小细胞癌、食道癌、结直肠癌、宫颈癌、头颈癌、胃癌或子宫癌。在一些任何所提供的实施方案中，所述癌症是非小细胞肺癌

(NSCLC)、CRC、卵巢癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆管细胞癌、子宫内膜癌，任选地其中所述乳腺癌是HR+/Her2-乳腺癌、三阴性乳腺癌(TNBC)或HER2+乳腺癌。

[0064] 本文提供一种组合物，其用于治疗患有癌症的受试者。本文还提供任何所提供的组合物用于制造用于治疗患有癌症的受试者的药物的用途。

[0065] 在一些任何所提供的实施方案中，在一些任何所提供的实施方案中，所施用的组合物的细胞对于所述受试者是自体的。

[0066] 在一些任何所提供的实施方案中，治疗有效剂量为在$1x10^8$与$10x10^9$个T细胞或其活细胞之间。在一些任何所提供的实施方案中，治疗有效剂量为在$5x10^8$与$10x10^9$个T细胞或其活细胞之间。在一些任何所提供的实施方案中，治疗有效剂量为在$5x10^8$与$1x10^9$个T细胞或其活细胞之间。

[0067] 在一些任何所提供的实施方案中，所述癌症是上皮癌。在一些任何所提供的实施方案中，所述癌症是黑色素瘤、肺鳞癌、肺腺癌、膀胱癌、肺小细胞癌、食道癌、结直肠癌、宫颈癌、头颈癌、胃癌或子宫癌。在一些任何所提供的实施方案中，所述癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)、CRC、卵巢癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆管细胞癌、子宫内膜癌，任选地其中所述乳腺癌是HR+/Her2-乳腺癌、三阴性乳腺癌(TNBC)或HER2+乳腺癌。

附图说明

[0068] 图1A和图1B是说明根据本文所述的某些实施方案的T细胞制造过程的简图。

[0069] 图1A描绘用于根据所提供的方法制造T细胞治疗性组合物的示例性过程的示意图。在示例性过程中，从患者获得肿瘤样品用于鉴定和生成肽，所述肽用于与从同一受试者获得的自体T细胞的共培养方法中。在一些情形中，将来自患者的T细胞群体(例如含有肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)或外周血淋巴细胞(PBL))在扩增所述细胞的条件下进行刺激，之后将其与已经接触或暴露于用于在主要组织相容性复合体上呈递的肽新表位的抗原呈递细胞共培养。在抗原呈递细胞于主要组织相容性复合体的背景中呈递肽的条件下共培养之后，可以根据所提供的方法选择肿瘤反应性T细胞或对与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种T细胞激活标记(例如CD39、PD-1和/或TIGIT)呈表面阳性的T细胞并在用于扩增的条件下培养，如与一种或多种T细胞刺激剂(例如IL-2和/或抗CD3/抗CD28)一起孵育。在所提供的方法的一些实施方案中，对肿瘤反应性T细胞的选择直接来自肿瘤样品或其经历初始(例如最小)扩增的消化样品，其中这样的方法不包括与呈递肽新表位的抗原呈递细胞共培养的步骤。所述步骤可以包括根据所提供的方法与T细胞刺激剂和/或其他T细胞佐剂一起孵育。所述培养可以在一种或多种重组细胞因子(例如IL-2)的存在下进行以支持细胞的增殖和扩增。所述过程可以在含有营养素的无血清培养基的存在下进行。一个或多个或所有所述步骤可以在封闭系统中进行，如使细胞不暴露于环境。在达到细胞的治疗剂量或阈值数量后，可以收获并配制细胞，在一些情形中进行浓缩或冷冻保存，并且用于施用于受试者，如通过输注来施用。

[0070] 图1B描绘用于根据所提供的方法制造T细胞治疗性组合物的示例性过程的示意图。在示例性过程中，使用含有T细胞的生物样品作为所述方法的细胞来源。所述生物样品可以包括肿瘤浸润淋巴细胞、外周血单个核细胞(例如单采术)或淋巴来源的淋巴细胞。可以根据所提供的方法直接从所述样品选择肿瘤反应性T细胞或对与肿瘤反应性T细胞相关

的一种或多种T细胞激活标记(例如CD39、PD-1和/或TIGIT)呈表面阳性的T细胞,并且在用于扩增的条件下培养,包括根据所提供的方法与T细胞刺激剂和/或T细胞佐剂一起孵育。所述培养可以在一种或多种重组细胞因子(例如IL-2)的存在下进行以支持细胞的增殖和扩增。所述过程可以在含有营养素的无血清培养基的存在下进行。一个或多个或所有所述步骤可以在封闭系统中进行,如使细胞不暴露于环境。在达到细胞的治疗剂量或阈值数量后,可以收获并配制细胞,在一些情形中进行浓缩或冷冻保存,并且用于施用于受试者,如通过输注来施用。图1C描绘用于生成患者特有的肿瘤来源的浸润T细胞的群体的完整过程流程图。

[0071] 图2A描绘典型TIL扩增过程中的示例性动力学和T细胞新生抗原反应性,所述典型TIL扩增过程涉及具有第一初始扩增和第二快速扩增的T细胞的大量扩增(bulk expansion),其中在整个过程期间(包括在最终产物内)反应性保持较低。图2B进一步描绘如本文所提供的TIL扩增过程的示例性动力学,所述TIL扩增过程涉及第一初始扩增,之后通过与呈递新生抗原肽的抗原呈递细胞共培养来富集肿瘤反应性T细胞,针对T细胞激活(上调)标记选择肿瘤反应性细胞,并进行富集的反应性细胞的第二扩增。

[0072] 图3A描绘使用碎片培养、酶匀浆化和无酶匀浆化从患者来源的CRC肿瘤组织生成总活群体1细胞。用酶消化和无酶消化都产生比从碎片培养更多的总细胞。这些细胞的活力百分比显示于图3B中。从碎片生成并用酶消化的培养物的活力高于使用无酶匀浆化得到的那些。

[0073] 图4A描绘使用碎片培养或酶匀浆化或无酶匀浆化从患者来源的黑色素瘤肿瘤组织生成群体1细胞。碎片培养产生比从单细胞悬浮液开始的培养更多的总细胞。这些细胞的活力百分比显示于图4B中。从碎片生成的群体显示比来自单细胞悬浮液的细胞更高的活力。

[0074] 图5描绘源自原发性CRC肿瘤的群体2细胞在常规6孔培养板或24孔透气性培养板中的生长曲线(图5A)以及扩增倍数(图5B)。图5还描绘源自原发性CRC肿瘤的群体2细胞的总细胞数量(图5C)以及扩增倍数(图5D),按细胞提取方法(碎片培养或单细胞悬浮液培养)对比。

[0075] 图6描绘源自原发性黑色素瘤肿瘤的群体2细胞在6孔培养板或24孔透气性培养板中的生长曲线(图6A)以及扩增倍数(图6B)。

[0076] 图7描绘使用补充有5%人血清的无血清OpTmizer或RPMI培养基,源自原发性CRC肿瘤的群体2细胞的总细胞数量(图7A)以及扩增倍数(图7B)。类似地,图8描绘使用补充有5%人血清的无血清OpTmizer或RPMI培养基,源自原发性黑色素瘤肿瘤的群体2细胞的总细胞数量(图8A)以及扩增倍数(图8B)。

[0077] 图9描绘源自CRC肿瘤且在补充有低浓度(300IU/mL)或高浓度(6000IU/mL)重组人IL-2的培养基中培养的群体2细胞的总细胞数量(图9A)以及扩增倍数(图9B)。黑色素瘤肿瘤来源的细胞的这些数据类似地描绘于图10A-图10B中。观察到高浓度的IL-2不是细胞扩增必需的。

[0078] 图11A描绘来自黑色素瘤来源的细胞培养物的群体2总细胞数量并且图11B描绘扩增倍数,所述细胞培养物未被刺激或用抗CD3单克隆抗体OKT3刺激,观察到在很大程度上是类似的。

[0079] 图12A-图12C描绘CD8+T细胞上的激活标记CD38和CD39(图12A)、CD134和CD137(图12B)以及CD69和CD90(图12C)在用OKT3激活后0与48小时之间的上调百分比。

[0080] 图13A-图13C描绘CD4+T细胞上的激活标记CD38和CD39(图13A)、CD134和CD137(图13B)和CD69和CD90(图13C)在用OKT3激活后0与48小时之间的上调百分比。

[0081] 图14描绘选择的示例性标记在第0天从CRC肿瘤生成的单细胞悬浮培养物中的表达。

[0082] 图15A-图15E描绘作为群体1细胞的百分比的CD3+细胞纯度。图15A描绘在无酶匀浆化、用1mg/ml(低)酶匀浆化和用5mg/ml(高)酶匀浆化后,来自CRC肿瘤的第0天SCS的细胞的纯度。黑色素瘤来源的培养物的这些数据类似地显示于图15B中。图15C描绘来自在存在或不存在OKT3刺激的情况下培养的碎片的第0天(基线SCS)和第6天的CD3+群体1细胞的纯度。图15D显示使用在补充有6000IU/mL(高)或300IU/mL(低)重组IL-2的培养基中培养的碎片在第11天来自CRC供体的CD3+细胞的相对纯度。图15E描绘来自在具有OKT3刺激和/或高或低浓度IL-2的无血清OpTmizer培养基或RPMI中培养的碎片的群体1细胞(第9天)。这些观察结果支持,来自CRC患者的肿瘤活检的SCS可能比从肿瘤碎片培养获得的细胞更能够提供更大数量的T细胞用于扩增。

[0083] 图16描绘作为在高和低IL-2浓度下用含有血清的RPMI培养基或无血清OpTmizer培养的第9天的碎片培养物,源自黑色素瘤患者的CD3+群体1细胞的纯度。

[0084] 图17A描绘在与加载有浓度为0.1ng/mL至20ng/mL的肽的树突细胞共培养后,群体3细胞的生成。图17B描绘相同实验中相对于与无加载的树突细胞共培养的T细胞的增加倍数(图17B)。

[0085] 图18A比较用一种肽或两种肽进行的刺激,报告为41BB/OX40表达%。图18B描绘用一种肽或两种肽进行的刺激,报告为相对于未激活的T细胞的增加倍数。

[0086] 图19A比较T细胞与树突细胞的两个比率,即1:1和1:2,报告为41BB/OX40表达%。图19B比较T细胞与树突细胞的两个比率,即1:1和1:2,报告为相对于未激活的T细胞的增加倍数。

[0087] 图20A描绘在将源自三名健康供体的外周血的T细胞与自体新生抗原肽共培养并分选之前和之后,新生抗原反应性TCR的百分比。图20B描绘在CD8+细胞的共培养和分选之前和之后的平均I类反应性。

[0088] 图21A和图21B描绘使用Sony FX500的细胞分选的回收,描绘为两次独立运行的总细胞输入和输出二者(图21A)以及回收百分比(图21B)。

[0089] 图22描绘来自使用Sony FX500的细胞分选的CD4+群体的纯度和门控。结果显示在对上调标记呈阳性的细胞的选择和分选之后细胞的高回收率。

[0090] 图23A-图23C描绘分选后肿瘤浸润T淋巴细胞的扩增。图23A描绘在与或不与加载有野生型肽、肿瘤相关肽或无肽的树突细胞共培养后,源自群体4细胞的群体5细胞的总细胞数量,并且图23B描绘扩增倍数。在分选后不同细胞回收数量下将群体4细胞扩增为群体5细胞后预计的细胞数量显示于图23C中。

[0091] 图24A描绘在用来自卵巢癌患者的突变体(mut)肽或正常的野生型(WT)肽刺激后,在大量共培养物、来自大量共培养细胞的依据CD137和/或CD134的表达阳性分选的(选择的)群体(富集的)或者来自大量共培养细胞的阴性分选的(未选择的)群体内测量的IFN-γ

分泌。图24B描绘与大量未分选的T细胞相比，在阳性分选和阴性分选中肿瘤反应性特异性细胞的新生抗原特异性群体的富集。图24C描绘存在于未选择的和选择的群体中的TCR克隆型的数量并且证实，在未分选的T细胞群体中输入性TCR的多样性高，并且在选择的群体中存在独特TCR克隆的富集。图24D描绘来自样品A的分选前和分选后细胞群体，观察到它们含有CD4+和CD8+细胞，表明在富集群体中存在I类和II类反应性细胞。

[0092] 图25A描绘在用来自结直肠癌患者的抗CD3(OKT3)刺激后，在大量共培养物、来自大量共培养细胞的依据CD137和/或CD134的表达阳性分选的(选择的)群体(富集的)或者来自大量共培养细胞的阴性分选的(未选择的)群体内测量的IFN-γ分泌。图25B描绘与大量未分选的T细胞相比，在阳性分选和阴性分选中肿瘤反应性特异性细胞的新生抗原特异性群体的富集。图25C描绘在未选择的和选择的群体中存在的TCR克隆性谱。图25D描绘分选前和分选后细胞群体，观察到它们含有CD4+和CD8+细胞，表明在富集群体中存在I类和II类反应性细胞。

[0093] 图26A描绘在大量共培养物、来自大量共培养细胞的依据CD137和/或CD134的表达阳性分选的(选择的)群体(富集的)或者来自大量共培养细胞的阴性分选的(未选择的)群体中，肿瘤反应性特异性细胞的新生抗原特异性群体的富集。图26B描绘在未选择的和选择的群体中存在的TCR克隆性谱。图26C描绘分选前(大量)和分选后细胞群体，观察到它们含有CD4+I类反应性和CD8+II类反应性细胞。

[0094] 图27A-图27C显示在多种T细胞佐剂的存在下在补充性OKT3刺激的情况下生长的细胞的总活CD3+细胞计数。所示结果针对以下佐剂：10μg/mL的他佛利珠单抗、奥塞芦单抗、伊匹单抗、托珠单抗、乌瑞鲁单抗、帕博利珠单抗、伐立鲁单抗、抗GITR MK-1248、抗人FasL；25μM的Z-VAD-FMK泛半胱天冬酶抑制剂；250nM的HSP抑制剂NVP-HSP990；以及1000IU/mL的细胞因子(IL-7、IL-15、IL-21、IL-23、IL-25、IL-27或IL-35)。

[0095] 图28A-图28C显示在多种T细胞佐剂的存在下在没有补充性OKT3刺激的情况下生长的细胞的总活CD3+细胞计数。所示结果针对以下佐剂：10μg/mL的他佛利珠单抗、奥塞芦单抗、伊匹单抗、托珠单抗、乌瑞鲁单抗、帕博利珠单抗、伐立鲁单抗、抗GITR MK-1248、抗人FasL；25μM的Z-VAD-FMK泛半胱天冬酶抑制剂；250nM的HSP抑制剂NVP-HSP990；以及1000IU/mL的细胞因子(IL-7、IL-15、IL-21、IL-23、IL-25、IL-27或IL-35)。

[0096] 图29显示IL-7(图29A)和IL-15(图29B)的剂量反应曲线。

[0097] 图30A-图30B-图32A-图32B显示源自三名健康供体中的每一名并且在实验条件下生长的细胞的总细胞数量和细胞活力。观察到，尽管存在固有的供体差异性，但是在连续半胱天冬酶抑制的存在下生长的细胞显示更优异的生长。

[0098] 图33A-图33B-图36A-图36B显示对于两名供体在用抗CD3/抗CD28(瞬时激活)处理组连续激活或瞬时激活后的细胞效应。对于两名供体用抗CD3/抗CD28(瞬时激活)处理组单一激活的细胞活力显示于图33A-图33B中，并且相同处理的总细胞数量显示于图34A-图34B中。对于两名供体用抗CD3/抗CD28处理组连续激活的细胞活力显示于图35A-图35B中，并且相同处理的总细胞数量显示于图36A-图36B中。

[0099] 图37A-图37C显示在存在或不存在泛半胱天冬酶抑制剂Z-VAD-FMK的情况下生长的SCS和肿瘤碎片来源的培养物二者的扩增倍数(图37A)、总活细胞(图37B)和活力百分比(图37C)。

[0100] 图38A-图38D-图40A-图40D显示在与各种T细胞佐剂一起孵育后,T细胞的T细胞表型。显示在不同浓度的伊匹单抗(抗CTLA4)、帕博利珠单抗(抗PD1)、他佛利珠单抗(抗TNFRSF4)、乌瑞鲁单抗(抗CD137)和伐立鲁单抗(抗CD27)的存在下生长的CD3+(图38A-图38D)、CD4+(图39A-图39D)和CD8+(图40A-图40D)细胞的T细胞表型。

[0101] 图41A-图49A显示在IL-2和另外的调节细胞因子或其他T细胞佐剂的存在下生长的细胞的总活CD3+细胞计数。所示结果针对三种浓度的以下佐剂:奥塞芦单抗(图48A)、抗GITR MK-1248(图47A)、Z-VAD-FMK泛半胱天冬酶抑制剂(图49A);并且针对细胞因子IL-23、IL-21、IL-35、IL-27、IL-15、IL-7(图41A、图42A、图43A、图44A、图45A和图46A)。

[0102] 图41B-图49B描绘在三种浓度的奥塞芦单抗(图48B)、抗GITR MK-1248(图47B)、Z-VAD-FMK泛半胱天冬酶抑制剂(图49B)以及细胞因子IL-23、IL-21、IL-35、IL-27、IL-15、IL-7(图41B、图42B、图43B、图44B、图45B和图46B)的存在下生长的细胞中,随幼稚和中枢记忆细胞群体而变化的T细胞表型。

[0103] 图50A-图50C显示在IL-2和另外的调节细胞因子或其他T细胞佐剂的存在下生长的来自代表性健康供体的细胞的培养后的CD4+/CD8+细胞比率,如在培养期结束时通过流式细胞术所评估。相对于仅用IL-2时观察到的,所测试的抗体(图50A)、细胞因子(图50B)和其他调节剂(图50C)都没有显著改变CD4+/CD8+T细胞比率。

具体实施方式

[0104] 本文提供用于制造T细胞的方法。这样的方法包括但不限于以下步骤:(1)从得自供体受试者的含有T淋巴细胞的细胞群体选择对趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)呈阳性的细胞和/或对来自PD-1、CD39和/或TIGIT中的耗竭标记呈阳性的细胞;以及(2)通过将选择的细胞与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂一起孵育或培养来刺激所述群体,以产生扩增的T细胞的群体。在一些实施方案中,用于选择和/或刺激的方法是在封闭系统中进行。在一些实施方案中,在所述方法中仅进行单一扩增步骤。在一些实施方案中,在选择细胞之前进行初始扩增(例如第一扩增)。在一些实施方案中,所提供的方法还可以包括次级刺激以进一步扩增细胞,其中进一步刺激是通过与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育或培养来进行。在一些实施方案中,在第一刺激(第一扩增)后且在第二刺激(第二扩增)前,所述方法还可以包括:(i)在呈递一种或多种MHC相关非天然肽的抗原呈递细胞的存在下共培养T细胞群体;(4)在封闭系统中分离抗原呈递细胞与所述T细胞群体,如通过选择含有对所述APC上存在的肽具有反应性的内源TCR的T细胞来分离,如基于将所述T细胞与所述APC/肽共培养之后所述T细胞上的上调标记或激活标记来选择。在一些实施方案中,一个或多个所述步骤是在封闭系统中进行。在一些实施方案中,所有所述步骤是在封闭系统中进行。

[0105] 根据本文的实施方案,提供用于制造T细胞制剂的方法或过程,其可用于治疗患有病理性疾病或病症的患者。与已知的生产方法相比,本文所述的方法和过程可以在显著更短的时间内完成,并且回收更高数量的内源TCR表达T细胞,从而为使细胞以治疗剂量进入临床提供显著优势。本文还提供通过本文所述的方法产生的T细胞的群体及其药物组合物。

[0106] 所提供的方法涉及产生对肿瘤相关抗原(如新生抗原)具有反应性的T细胞疗法。作为肿瘤发生过程的一部分,癌细胞累积许多不同的DNA突变。这些突变可能引起蛋白质编码区中的氨基酸变化。对于要被免疫系统识别的突变,蛋白质需要在细胞内被处理并且用

主要组织相容性复合体(MHC)呈递在表面上。肽新生抗原(本文中也称为新表位或肽新表位)是由MHC复合体呈递的突变体肽,其可以被T细胞经由TCR结合来识别。为了使免疫系统识别所述突变,所述突变必须在癌细胞表面上经由MHC复合体来表达,并且T细胞必须具有识别突变的肽的TCR。这些新生抗原可以分别由MHC I类和MHC II类呈递,并且分别由CD8+和CD4+T细胞识别。

[0107] 在一些实施方案中,所述方法可以用于制造表达细胞表面受体的T细胞。所述细胞表面受体可以是T细胞受体(TCR)或TCR的新型组。在所提供的方法的特定实施方案中,T细胞群体是或包括表达细胞表面受体(如T细胞受体(TCR))的反应性T细胞,所述细胞表面受体能够识别靶细胞表面上的肽抗原。具体而言,对于要被免疫系统识别的抗原,蛋白质需要在细胞内被处理成肽片段,然后将所述肽片段用主要组织相容性复合体(MHC)呈递在表面上。TCR具有两条蛋白质链,它们被设计为与某些细胞表面上由主要组织相容性复合体(MHC)蛋白呈递的特定肽结合。由于TCR识别在靶细胞表面上表达的MHC分子背景中的肽,TCR具有不仅识别直接在靶细胞(例如癌细胞)表面上呈递的抗原,还识别由抗原呈递细胞呈递(如存在于肿瘤、炎性和感染微环境中,以及在次级淋巴器官中)的抗原的潜力。表达这样的细胞表面受体的反应性T细胞可以用于靶向并杀伤任何靶细胞,包括但不限于感染的细胞、受损的细胞或功能障碍的细胞。因此,根据本文所述的实施方案,所制造的表达所述细胞表面受体的T细胞可以用于靶向并杀伤任何靶细胞,包括但不限于感染的细胞、受损的细胞或功能障碍的细胞。这样的靶细胞的例子可以包括癌细胞、病毒感染的细胞、细菌感染的细胞、功能障碍性激活的炎性细胞(例如,炎性内皮细胞)以及功能障碍的免疫应答中涉及的细胞(例如,自身免疫性疾病中涉及的细胞)。

[0108] 在一些实施方案中,“T细胞受体”或“TCR”是如下分子,所述分子含有可变α和β链(也分别称为TCRα和TCRβ)或可变γ和δ链(也分别称为TCRγ和TCRδ)或其抗原结合部分,并且所述分子能够与结合至MHC分子的肽特异性结合。在一些实施方案中,TCR呈αβ形式。通常,以αβ和γδ形式存在的TCR在结构上大体类似,但是表达它们的T细胞可能具有不同的解剖学位置或功能。可以在T细胞(或T淋巴细胞)的表面上发现TCR,在此处TCR通常负责识别结合至主要组织相容性复合体(MHC)分子的抗原。

[0109] 在一些方面,反应性T细胞是识别癌症新生抗原的肿瘤反应性T细胞。大多数新生抗原源自乘客突变(passenger mutation),意味着它们不暗示对癌细胞的任何生长优势。少数突变积极促进肿瘤生长,这些称为驱动突变(driver mutation)。乘客突变可能会产生为每名患者独有的新生抗原,并且可能存在于所有癌细胞的子集中。驱动突变产生可能存在于个体的所有肿瘤细胞中的新生抗原,并且可能被共享。在所提供的方法的一些实施方案中,T细胞群含有可以识别含有乘客突变和/或驱动突变的新生抗原的肿瘤反应性T细胞。

[0110] 在特定方面,所提供的方法可以用于离体产生T细胞疗法,包括例如离体扩增自体肿瘤反应性T细胞。在一些方面,新生抗原是免疫疗法的理想靶标,因为它们代表疾病特有的靶标。例如,这样的抗原在癌症发生之前通常不存在于体内,并且是真正的癌症特异性的,不在正常细胞上表达并且不受脱靶免疫毒性的影响。因此,患者特有的新生抗原的独特库可以引发对癌细胞具有特异性的强免疫应答,从而避开正常细胞。与其他可能不是疾病特异性靶标的细胞疗法靶标相比,这是一个优势,因为在靶向常见抗原的工程化疗法的背景下,即使正常细胞上的靶抗原水平低,也会导致严重的致命性自身免疫毒性。例如,黑色

素瘤患者中的抗MAGE-A3-TCR程序由于研究相关死亡而被停止，所述死亡归因于与类似靶标MAGE-A12的交叉反应性，所述MAGE-A12以低水平在脑中表达。癌症免疫疗法中的重大挑战一直是鉴定癌症靶标。

[0111] 最近的临床研究已经证明，从经手术切除的肿瘤分离的T细胞具有识别新生抗原的TCR，并且在一些情形中，扩增这些新生抗原反应性TIL群体并将其再输注到患者体内可以产生显著的临床益处。此个性化疗法已经在某些患有常见上皮肿瘤的患者中产生显著的临床反应。

[0112] 用于获得和生成肿瘤反应性T细胞的现有方法并不完全令人满意。例如，在没有扩增的情况下从受试者直接分离肿瘤反应性T细胞是不可行的，因为无法获得治疗有效量的这样的细胞。作为替代方案，已经尝试鉴定对所需新生抗原具有特异性的TCR，以将所述TCR重组工程化到T细胞中，用于在过继细胞治疗方法中使用。然而，这样的方法仅产生针对特定新生抗原的单一TCR，因此缺少多样性而无法识别更广泛的多种肿瘤特有的突变库。其他方法涉及大量扩增来自肿瘤来源的T细胞，这有扩增对肿瘤抗原无反应性的T细胞和/或扩增可能包括许多可展现出抑制活性的旁邻细胞在内的T细胞的风险。例如，肿瘤调节T细胞(Treg)是$CD4^+$T细胞的子群体，其特化于抑制免疫应答并且可以限制T细胞产物的反应性。这些试图离体扩增肿瘤反应性T细胞的另外的方法不是选择性的，使得培养物中的非反应性T细胞可相对于反应性T细胞优先扩增，导致最终产物缺乏令人满意的反应性和/或其中肿瘤反应性T细胞的数量仍然不足。需要产生用于疗法的肿瘤反应性T细胞的方法。

[0113] 所提供的实施方案涉及用于鉴定和离体扩增T细胞(包括肿瘤反应性T细胞)以用于T细胞疗法的改进方法。在一些实施方案中，所提供的方法改进或增加T细胞(如肿瘤反应性T细胞)在体外的生长和存活。在特定实施方案中，与非反应性T细胞相比，所述方法富集以扩增反应性T细胞并促进它们在离体培养物中的存活和生长。在一些实施方案中，所得方法可以在封闭系统中进行。在一些实施方案中，所述方法以自动化或部分自动化的方式进行。

[0114] 所提供的方法产生对患者特有突变具有反应性的T细胞的富集群体，如基于呈递突变体抗原后对上调标记的选择和/或基于在与呈递肽新表位的抗原呈递细胞共培养后针对肿瘤反应性T细胞富集的T细胞的扩增。例如，培养细胞的方法包括使细胞增殖和扩增的方法，特别地涉及富集以供增殖和扩增肿瘤反应性T细胞的步骤，如通过选择这样的细胞来富集，或者基于与肿瘤反应性T细胞相关或指示肿瘤反应性T细胞的某些选择标记来富集。

[0115] 所提供的方法中用于选择或富集肿瘤反应性T细胞的示例性标记包括CXCL13和/或一种或多种耗竭标记，如PD-1、CD39和TIGIT中的一种或多种。

[0116] 趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)，也称为B淋巴细胞化学引诱物(BLC)或B细胞吸引趋化因子1(BCA-1)，是一种在人体中由CXCL13基因编码的蛋白质配体。CXCL13是一种属于CXC趋化因子家族的小趋化因子。顾名思义，这种趋化因子对属于B-1子集和B-2子集二者的B细胞具有选择趋化性，并且通过与趋化因子受体CXCR5相互作用来引发其效应。CXCL13及其受体CXCR5控制淋巴组织的滤泡内B细胞的机化，并且在人的肝、脾、淋巴结和肠中高度表达。CXCL13的基因位于人染色体4上其他CXC趋化因子的簇中。在T淋巴细胞中，CXCL13表达被认为反映T细胞、特别是称为T滤泡辅助细胞(或TFH细胞)的T细胞子集的生发中心起源。因此，CXCL13在T细胞淋巴瘤(如血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤)中的表达可能

反映肿瘤T细胞的生发中心起源。

[0117] 证据还表明,CXCL13与其受体CXCR5经由CXCL13:CXCR5轴的作用协调了调节肿瘤微环境内的淋巴细胞浸润的细胞间相互作用,从而决定对细胞毒性和免疫靶向疗法的反应性。在一项研究中,将具有增加的肿瘤识别能力的来自非小细胞肺癌的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)子集表征为具有高PD-1表达和组成型CXCL13分泌,其可以介导将免疫细胞募集至三级淋巴结构(Thommen等人,Proceedings of the Fourth CRI-CIMT-EATI-AACR International Cancer Immunotherapy Conference:Translating Science into Survival的摘要;2018年9月30日-10月3日;纽约,纽约州.费城(PA):AACR;Cancer Immunol Res 2019;7(2增刊):Abstract nr B050;Thommen等人(2018)Nature Medicine,24:994-1004)。CXCL13可以从某些TIL子群体、如TGFβ依赖性CD103+CD8+子群体表达和产生(Workel等人(2019)Cancer Immunology Research,7(5):784-796)。

[0118] PD-1、CD39和TIGIT各自是检查点分子,它们还可以表示耗竭的T细胞的标记。它们也是作为激活标记或上调标记的标记,因为它们的表达在肿瘤反应性后增加,这是对宿主免疫应答的免疫抑制的天然机制。例如,免疫系统被设计为关闭自身以避免过度活跃的免疫应答,以避免炎性和自身免疫应答。以这种方式,首先针对癌症产生免疫应答,但是这可能受到某些检查点分子如PD-1、CD39和TIGIT的上调的阻碍,从而可能抑制免疫应答。因为这些是在产生免疫应答的细胞中上调的标记,所提供的方法考虑到,这样的标记用作特异性富集表达针对肿瘤抗原或新表位的TCR的肿瘤反应性T细胞的强力标记。通过基于这些激活标记特异性选择肿瘤反应性细胞,所提供的方法避免对来自会包括多种不具有肿瘤反应性或者可能展现抑制活性的旁邻细胞(如Treg)的肿瘤来源的T细胞进行大量扩增。

[0119] 所提供的方法考虑到,在用于制造肿瘤反应性T细胞的离体过程的一个或多个步骤期间基于分泌的CXCL13和/或基于一种或多种耗竭标记PD-1、CD39和/或TIGIT的表达来选择细胞将导致用于治疗某些癌症的改进的TIL疗法,所述TIL疗法富含具有用于针对新生抗原的治疗功效的高潜力的肿瘤反应性T细胞。所提供的方法产生含有肿瘤反应性T细胞的产物,所述肿瘤反应性T细胞可以靶向许多突变和/或含有对不同肿瘤抗原具有反应性的数百种TCR。因此,与转导细胞以表达单一新表位反应性TCR的现有方法相比,这样的肿瘤反应性T细胞具有优势。

[0120] 在一些实施方案中,将紧接在肿瘤解离之后,即在肿瘤碎片培养的终点或者紧接在从肿瘤碎片机械/酶产生单细胞悬浮液之后,使用CXCL13分泌和/或一种或多种PD-1、CD39和/或TIGIT的表达来富集TIL。在一些实施方案中,将从肿瘤碎片培养物或通过酶消化生成的单细胞悬浮液分离产生CXCL13的细胞。在一些实施方案中,将从肿瘤碎片培养物或通过酶消化生成的单细胞悬浮液分离表达PD-1、CD39和/或TIGIT的细胞。在一些方面,将基于CXCL13产生以及PD1、TIGIT和CD39富集或其任何组合来选择TIL。在所提供的方法的方面,在选择后,选择的细胞(例如对CXCL13分泌呈阳性或者对PD1、TIGIT和CD39中的一种或多种呈表面阳性(例如PD1+/CD39+/TIGIT+)的细胞)可以在一种或多种T细胞刺激剂的存在下进行扩增。在一些实施方案中,所述T细胞刺激剂可以包括任何一种或多种重组细胞因子IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25、IL-23、IL-27或IL-25,如通常至少IL-2或IL-15。在一些实施方案中,所述T细胞刺激剂还可以包括抗CD3抗体(例如OKT3)。在一些实施方案中,所述T细胞刺激剂包括抗CD3抗体(OKT3)和/或重组细胞因子如IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25、

IL-23。在一些实施方案中，对所述细胞的刺激或者任何培养或孵育可以进一步用细胞凋亡抑制剂来进行，所述细胞凋亡抑制剂如Fas诱饵或半胱天冬酶抑制剂或其任何组合。

[0121] 在所提供的方法的一些实施方案中，在包括扩增对肿瘤新生抗原肽具有反应性的T细胞的过程中使用潜在肿瘤肽的来源来鉴定对新生抗原具有反应性的TCR。所提供的方法包括离体共培养方法，其中在已经与新生抗原肽接触或被使得呈递新生抗原肽的抗原呈递细胞的存在下孵育已经从存在于或来自生物样品(例如肿瘤碎片或外周血或其他T细胞来源)的T细胞扩增的T细胞群体。在特定方面，所述T细胞和抗原呈递细胞对于从其鉴定出所述肽的荷瘤受试者是自体的。所提供的方法还包括从共培养物分离、富集和/或选择肿瘤反应性T细胞的步骤，所述步骤在所述肿瘤反应性T细胞的进一步离体扩增之前进行或与所述进一步离体扩增结合进行。

[0122] 在一些实施方案中，可以将扩增的未富集的TIL与抗原呈递细胞(APC)如自体树突细胞共培养，所述抗原呈递细胞用通过全外显子组测序鉴定的新生抗原(突变的)肽库进行脉冲处理。然后可以基于CXCL13分泌和/或一种或多种PD-1、CD39和/或TIGIT的表达来富集激活的新生抗原特异性TIL。在一些方面，在与呈递新生抗原(突变的)肽的APC共培养后，可以基于CXCL13产生来选择或富集肿瘤反应性细胞群体。在一些方面，在与呈递新生抗原(突变的)肽的APC共培养后，可以基于PD-1、TIGIT和/或CD39的表面上调或表达来选择或富集肿瘤反应性细胞群体。在一些方面，在与呈递新生抗原(突变的)肽的APC共培养后，可以基于CXCL13产生以及PD1、TIGIT和CD39富集或其任何组合来选择肿瘤反应性细胞群体。在所提供的方法的方面，选择、富集的新生抗原反应性TIL(例如对CXCL13分泌呈阳性或者对PD1、TIGIT和CD39中的一种或多种呈表面阳性(例如PD1+/CD39+/TIGIT+)的细胞)可以在一种或多种T细胞刺激剂(如抗CD3抗体(OKT3)和/或重组细胞因子如IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25、IL-23)的存在下进行扩增。在一些实施方案中，对所述细胞的刺激或者任何培养或孵育可以进一步用细胞凋亡抑制剂来进行，所述细胞凋亡抑制剂如Fas诱饵或半胱天冬酶抑制剂或其任何组合。

[0123] 此外，所提供的方法包括减少或限制所得产物中旁邻细胞的存在和/或富集肿瘤反应性T细胞的步骤。在特定方面，使用调节细胞因子(如重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35中的一种或多种)和/或免疫抑制阻断剂(例如针对TGFβ或IDO)可以帮助促进T细胞功能性，同时破坏或降低不需要的细胞(如抑制性Treg细胞)的活性。在一些方面，由于肿瘤微环境中的抑制因子，这样的调节细胞因子和/或免疫抑制阻断剂在从肿瘤分离TIL期间可能特别有利。在一些方面，在分离或富集以及与APC/肽新表位共培养之后扩增肿瘤反应性T细胞期间，也可以包括所提供的这样的调节细胞因子和/或免疫抑制阻断剂的使用。例如，在一些实施方案中，在TIL的初始刺激和扩增以及分离的或富集的新生抗原肿瘤反应性T细胞的扩增期间，可以在肿瘤培养中证实调节细胞因子(如重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27和/或重组IL-35中的一种或多种)和/或免疫抑制阻断剂(例如针对TGFβ或IDO1)是有益的。在其他例子中，在来自抑制性肿瘤微环境的TIL的初始刺激和扩增期间以及在用刺激剂(如IL-2)进行扩增期间防止新生抗原肿瘤反应性T细胞的免疫抑制期间，可以证实调节细胞因子(如重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或IL-35中的一种或多种)和/或免疫抑制阻断剂(例如针对TGFβ或IDO1)是有益的。在另外的例子中，这样的调节细胞因子和/或免疫抑制阻断剂的存在可以优化在肿瘤细胞培养期间在初始刺激和扩增期间的TIL回收。

[0124] 图1A描绘用于根据所提供的方法制造T细胞治疗性组合物的示例性过程的示意图。在所述示例性过程中，从患者获得肿瘤样品用于鉴定和生成肽，所述肽用于与呈递所述肽的抗原呈递细胞(APC)和从同一受试者获得的自体抗原T细胞的共培养方法中。在一些情形中，通过选择对与肿瘤反应性细胞相关的一种或多种标记(下文中的“选择标记”)(如CXCL13和/或耗竭标记(如PD-1/CD39/TIGIT))呈阳性的细胞，从样品富集TIL。在一些情形中，在扩增细胞的条件下刺激来自患者的T细胞群体(例如含有肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)或富集TIL)，之后将其与已经接触或暴露于用于在主要组织相容性复合体上呈递的肽新表位的抗原呈递细胞共培养。在抗原呈递细胞于主要组织相容性复合体的背景中呈递肽的条件下共培养之后，可以根据所提供的方法选择肿瘤反应性T细胞或者对与肿瘤反应性细胞相关的一种或多种标记(下文中的“选择标记”)(如CXCL13、耗竭标记(如PD-1/CD39/TIGIT)和/或T细胞激活标记(例如CD137和/或CD134))呈阳性的T细胞，并在用于扩增的条件下培养，如与一种或多种T细胞刺激剂(例如重组IL-2、抗CD3)一起孵育。所述培养可以在一种或多种重组细胞因子(例如IL-2)的存在下进行以支持细胞的增殖和扩增。所述过程可以在含有营养素的无血清培养基的存在下进行。一个或多个或所有所述步骤可以在封闭系统中进行，如使细胞不暴露于环境。在达到细胞的治疗剂量或阈值数量后，可以收获并配制细胞，在一些情形中进行浓缩或冷冻保存，并且用于施用于受试者，如通过输注来施用。图1B描绘示例性过程，其中可以在一个或多个所述步骤之后进行冷冻保存步骤。

[0125] 在如所述的一些实施方案中，所提供的方法在没有如下共培养步骤的情况下进行，所述共培养步骤涉及呈递肿瘤肽的抗原呈递细胞(APC)和从同一受试者获得的自体抗原T细胞的孵育。

[0126] 对于产生和扩增TIL，与现有方法相比，所提供的方法具有优势，因为所提供的方法涉及富集肿瘤反应性细胞的步骤，如通过选择可能或怀疑富含肿瘤反应性T细胞的T细胞来富集。在一些情形中，所述方法还可以通过与肽呈递APC共培养的步骤以及之后选择已经上调与这样的细胞相关的一种或多种选择标记的反应性T细胞克隆来富集肿瘤反应性T细胞。凭借这个过程，使从生物样品(例如肿瘤)扩增的肿瘤反应性T细胞的初始小群体富集作为或可能作为肿瘤反应性细胞的细胞，之后进行后续第二扩增步骤，从而促进目的细胞的保存和扩增并限制对肿瘤抗原没有反应性和/或可能包括展现抑制活性的细胞的旁邻T细胞的扩增(图2A)。这与涉及大量T细胞的被动扩增的现有方法形成对比，在所述现有方法中，使来自肿瘤的所有T细胞经历第一初始扩增(例如，在高IL-2浓度下)，之后进行在所述初始扩增后存在的T细胞的第二快速扩增。在这样的其他方法中，尽管通过这些替代性过程可以显著扩大总活细胞(TVC)，但是没有积极确保主要繁殖肿瘤反应性T细胞的步骤(图2B)。此外，进行所提供的方法以最大化可以收集的肿瘤反应性细胞的数量，例如通过以下方式来实现：将在第一扩增后繁殖的所有细胞与肽呈递APC共培养，然后在所述共培养之后从所有大量细胞选择对一种或多种激活标记呈阳性的细胞，之后进行后续第二扩增。在所提供的方法的方面，所述方法的所有步骤都是在封闭系统中进行。

[0127] 所提供的方法包括一个或多个特征，所述特征提供或涉及用于离体产生肿瘤反应性T细胞治疗性组合物的改进的、更有效的和/或更稳健的方法。特定地，本公开文本涉及如下方法，其提供优于用于产生TIL治疗性细胞组合物的可用方法的优势。这样的优势包括例如降低成本、流线型化、改进治疗性组合物中肿瘤反应性T细胞的富集以及增加治疗性组合

物的功效,包括在不同受试者和肿瘤条件之间。

[0128] 在所提供的方法的方面,在一个或两个扩增步骤期间,可以以相对较低浓度的重组IL-2成功进行扩增。许多现有方法使用6000IU/mL高浓度的IL-2用于TIL的T细胞扩增。然而,高IL-2浓度可能增加过程的成本并且可能具有限制性。在一些情形中,高IL-2浓度可能因驱使效应T细胞分化超过在治疗性T细胞组合物中可能更期望的早期记忆T细胞而导致对T细胞分化的负面影响。所提供的方法可以用数倍低于6000IU/mL的浓度,如低于或低于约1000IU/mL,例如为或为约300IU/mL至为或约1000IU/mL的浓度来进行。在特定实施方案中,IL-2的浓度是为或约300IU/mL。

[0129] 在所提供的方法的实施方案中,所述T细胞群体是从已知含有T细胞的生物样品获得。在一些实施方案中,所述T细胞群体是从受试者、特别是人类受试者的生物样品富集。所述生物样品可以是含有T细胞的大量群体的任何样品。在一些实施方案中,所述生物样品是或包括外周血单个核细胞。在一些实施方案中,所述生物样品是外周血或血清样品。在一些实施方案中,所述生物样品是淋巴结样品。在一些实施方案中,所述生物样品是肿瘤样品。在一些方面,所述大量T细胞可以包括肿瘤浸润T细胞(TIL)。在一些实施方案中,所述受试者是人类受试者。在一些实施方案中,所述受试者是患有癌症、病毒感染、细菌感染的受试者,或者是患有炎性病症的受试者。在特定实施方案中,所述受试者患有癌症。

[0130] 在所提供的方法的方面,所述方法中细胞的起始来源(输入样品)可以是肿瘤碎片(例如1-8mm直径片段),或者可以是来自肿瘤碎片的酶消化的单细胞悬浮液制剂。尽管某些来源对于一些肿瘤类型可能更优越,但是碎片和单细胞悬浮液二者都可以支持肿瘤反应性T细胞的T细胞扩增和富集。在一些情形中,肿瘤细胞来源可以根据肿瘤类型或癌症来选择,例如以优化或增加来自肿瘤的肿瘤反应性T细胞的扩增和富集。在一个例子中,所述癌症是黑色素瘤并且淋巴细胞的起始群体是肿瘤碎片,如来自切除的肿瘤。在另一个例子中,所述癌症是结直肠癌并且淋巴细胞的起始群体是通过肿瘤碎片的酶消化(例如胶原酶)获得的单细胞悬浮液。

[0131] 在一些实施方案中,所述方法包括将初始扩增的T细胞与已经加载有肽的自体抗原呈递细胞共培养的步骤。在所述方法的方面,相对低浓度的肽或肽库(含有多种肽,例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100或更多种,或者前述任一项之间的任何值)(如在每种单独肽低于20ng/mL,并且甚至低至0.1ng/mL的情况下)可以导致培养期间的T细胞激活增加。在一些实施方案中,这可以导致在通过从共培养物选择来富集细胞之前,改进所述共培养物中肿瘤反应性T细胞的富集。在一些实施方案中,所提供的方法中的共培养步骤包括为或约1:5至为或约5:1、如1:3至为或约3:1、例如为或约1:1的含有T细胞的肿瘤来源的细胞与自体APC(例如树突细胞)的比率,并且涉及用单独肽或肽库加载APC。在一些实施方案中,向APC加载一定浓度的肽或肽库,其中单独肽或肽库的单独肽平均低于为或约20ng/mL,如为或约0.1ng/mL至为或约1ng/mL,例如为或约0.1ng/mL。

[0132] 在一些实施方案中,所提供的方法包括进一步基于在反应性或激活的T细胞上的表达上调(例如与静息或未激活T细胞相比)或者为反应性或激活的T细胞特有的一种或多种标记(下文中的“反应性T细胞标记”或T细胞激活标记),富集T细胞,如CD3+T细胞或其CD4和/或CD8子集。在反应性T细胞的内源TCR识别靶细胞或组织上的抗原时,如在TCR识别肿瘤上的新生抗原时,所述反应性T细胞将表达某些反应性标记。示例性反应性T细胞标记包括

以下中的一种或多种，如两种、三种、四种或更多种：CD107、CD107a、CD39、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD38、CD30、CD154、CD252、CD134(OX40)、CD258、CD256、PD-1、TIM-3或LAG-3。对反应性或激活的T细胞上的一种或多种这样的上调标记呈阳性的细胞的富集或选择可以在扩增方法的一个或多个步骤之前或期间进行。在特定实施方案中，所提供的方法包括在通过与肽呈递APC(例如DC)共培养孵育来激活T细胞群体后，富集或选择对反应性或激活的T细胞上的一种或多种上调标记呈阳性的细胞。在一些实施方案中，从共培养物选择对反应性或激活的T细胞上的一种或多种上调标记呈阳性的细胞的步骤可以导致2倍或更高的抗原特异性肿瘤反应性T细胞的富集和/或TCR克隆性的显著降低，从而证实TCR克隆型的富集与肿瘤反应性T细胞的富集一致。此外，与来自共培养物的未选择的T细胞或大量T细胞相比，这样的富集的T细胞可以展现改进的在抗原特异性刺激后产生IFN-γ的能力。

[0133] 在一些实施方案中，所述方法产生或扩增T细胞用于治疗疾病或病症的过继细胞疗法，其中已知或怀疑与所述疾病或病症相关的细胞或组织表达由所述T细胞识别的抗原靶标。在一些实施方案中，所述T细胞疗法对于受试者是自体的。在一些实施方案中，所述T细胞疗法对于受试者是同种异体的。

[0134] 将在本申请中提及的所有出版物(包括专利文献、科学文章和数据库)出于所有目的通过引用以其整体并入，其并入程度如同将每个单独出版物通过引用单独并入一般。如果本文所述的定义与通过引用并入本文的专利、申请、公开的申请和其他出版物中所述的定义矛盾或以其他方式不一致，则本文所述的定义优先于通过引用并入本文的定义。

[0135] 本文所用的章节标题仅用于组织目的，而不应解释为限制所描述的主题。I.肿瘤反应性T细胞的离体扩增

[0136] 所提供的方法涉及T细胞治疗性组合物的离体扩增和产生，所述组合物特别地用于与治疗癌症结合使用。在一些实施方案中，制造方法涉及患者细胞在体外的生长和操纵。在特定实施方案中，所述方法涉及扩增含有对肿瘤相关抗原具有特异性的内源TCR的T细胞(下文中的“肿瘤反应性T细胞”)的方法。出于本公开文本的目的，提及肿瘤反应性T细胞时包括展现对肿瘤抗原的反应性的T细胞，或由于在T细胞上表达的蛋白质(仅当T细胞内源TCR识别由APC表达的肽时才会表达，例如T细胞激活标记)的上调或阳性表面表达而可能或怀疑是肿瘤反应性T细胞的T细胞。在一些方面，这些细胞的频率可能较低，并且为了将这些细胞扩增至治疗剂量，必须采用离体富集和扩增方法。

[0137] 所提供的实施方案涉及用于制备富集肿瘤反应性T细胞的治疗性TIL组合物的方法，所述方法涉及直接选择细胞以产生肿瘤反应性细胞群体，对所述肿瘤反应性细胞群体进行进一步扩增。在所提供的方法中，获得含有或预期含有肿瘤反应性T细胞(例如第一群体)的TIL肿瘤样品。在一个实施方案中，可以通过消化处理该群体以产生单细胞悬浮液(例如第二群体)。在一些实施方案中，分选此第二群体以选择富集肿瘤反应性T细胞的细胞(例如基于对PD-1、CD39和/或TIGIT呈阳性的细胞的选择)，以产生选择的或分选的细胞群体(例如第三群体)，然后可以扩增所述群体以产生含有扩增的肿瘤特异性反应性细胞群体(例如第四群体)的治疗性组合物。在其他实施方案中，将所述第一群体处理为碎片或消化以产生单细胞悬浮液(例如第二群体)，然后首先使此第二群体经历初始扩增(例如在1-14天之间的最小扩增)，其中以产生要针对肿瘤反应性T细胞进行分选/选择的初始细胞群体(例如第三群体)。在这样的实施方案中，分选此第三群体以选择富集肿瘤反应性T细胞的细

胞(例如基于对PD-1、CD39和/或TIGIT呈阳性的细胞的选择),以产生选择的或分选的细胞群体(例如第四群体),然后可以扩增所述群体以产生含有扩增的肿瘤特异性反应性细胞群体(例如第五群体)的治疗性组合物。

[0138] 在一些实施方案中,所述分选和选择是针对肿瘤上调激活标记CD39、PD1或TIGIT或其任何组合来进行。含有识别肿瘤的反应性T细胞的所述肿瘤上调激活标记,如CD39、PD1和TIGIT。在所提供的方法中,在肿瘤消化后或在短期细胞培养后针对对CD39、PD1和TIGIT呈表面阳性的细胞直接分选所述T细胞,以产生肿瘤新生抗原反应性T细胞的群体。此过程去除了非反应性和抑制性的"旁邻"细胞,得到富含新生抗原反应性T细胞的T细胞产物。然后将细胞扩增为临床相关数量的肿瘤特异性T细胞。在一些实施方案中,用冷冻保护剂配制最终扩增的治疗性组合物以供冷冻保存。

[0139] 在所提供的方法的一个方面,在肿瘤消化后直接分选肿瘤反应性T细胞,并且仅进行单一扩增步骤,其中收获扩增的T细胞的群体作为治疗性TIL组合物。在这样的例子中,将肿瘤碎片消化为单细胞悬浮液并且提供为输入样品,用于其肿瘤反应性T细胞的分选/选择。然后,扩增选择的细胞并收获作为治疗性TIL组合物。在一些实施方案中,所述扩增进行一定时间段以实现治疗剂量。在一些实施方案中,进行所述扩增以实现所述细胞为或约200倍至为或约3000倍的扩增倍数。在一些实施方案中,进行所述扩增以实现为或约或大于或大于约5亿个总细胞的治疗剂量。在一些实施方案中,所述扩增进行1-28天,如为或约7至28天、7至21天、7至14天,如为或约7天、8天、9天、10天、11天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天或28天。

[0140] 在一些实施方案中,本文提供一种制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括(a)从来自患有肿瘤的受试者的包含T细胞的输入样品选择分泌趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)的细胞和/或对C-X-C趋化因子受体5型(CXCR5)呈表面阳性的细胞,以获得从所述样品选择的细胞;以及(b)通过将所选择的细胞与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的群体的条件下一起培养来进行扩增。在一些实施方案中,所述方法包括收获通过所述方法产生的扩增的T细胞的所述群体以用于配制为治疗性组合物。

[0141] 在一些实施方案中,本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括(a)从来自患有肿瘤的受试者的包含T细胞的输入样品选择对PD-1、CD39和/或TIGIT呈表面阳性的细胞,以获得从所述样品选择的细胞;以及(b)通过将所选择的细胞与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的群体的条件下一起培养来进行扩增。在一些实施方案中,所述方法包括收获通过所述方法产生的扩增的T细胞的所述群体以用于配制为治疗性组合物。

[0142] 在一些实施方案中,本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括(a)从来自患有肿瘤的受试者的包含T细胞的输入样品选择对PD-1和CD39呈表面阳性的细胞,以获得从所述样品选择的细胞;以及(b)通过将所选择的细胞与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的群体的条件下一起培养来进行扩增。在一些实施方案中,所述方法包括收获通过所述方法产生的扩增的T细胞的所述群体以用于配制为治疗性组合物。

[0143] 在一些实施方案中,本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括(a)从来自患有肿瘤的受试者的包含T细胞的输入样品选择对PD-1和TIGIT呈表面阳性的

细胞,以获得从所述样品选择的细胞;以及(b)通过将所选择的细胞与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的群体的条件下一起培养来进行扩增。在一些实施方案中,所述方法包括收获通过所述方法产生的扩增的T细胞的所述群体以用于配制为治疗性组合物。

[0144] 在一些实施方案中,本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括(a)从来自患有肿瘤的受试者的包含T细胞的输入样品选择对CD39和TIGIT呈表面阳性的细胞,以获得从所述样品选择的细胞;以及(b)通过将所选择的细胞与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的群体的条件下一起培养来进行扩增。在一些实施方案中,所述方法包括收获通过所述方法产生的扩增的T细胞的所述群体以用于配制为治疗性组合物。

[0145] 在一些实施方案中,本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括(a)从来自患有肿瘤的受试者的包含T细胞的输入样品选择对PD-1、CD39和TIGIT呈表面阳性的细胞,以获得从所述样品选择的细胞;以及(b)通过将所选择的细胞与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的群体的条件下一起培养来进行扩增。在一些实施方案中,所述方法包括收获通过所述方法产生的扩增的T细胞的所述群体以用于配制为治疗性组合物。

[0146] 在所提供的方法的另一个方面,进行至少两个单独的扩增步骤,其中两个扩增是在针对肿瘤反应性T细胞(例如针对对PD-1、CD39和/或TIGIT呈表面阳性的细胞)选择或分选细胞后进行。因此,将用于扩增和收获的孵育分为两个扩增。例如,所提供的方法包括选择对肿瘤反应性T细胞的标记呈表面阳性的细胞(例如对PD-1、CD39和/或TIGIT呈表面阳性的细胞),然后涉及选择的细胞的第一扩增以产生扩增的细胞的第一群体,然后进行扩增的细胞的所述第一群体的进一步(第二)扩增以产生扩增的细胞的第二群体。在这样的例子中,收获扩增的T细胞的所述第二群体作为治疗性TIL组合物。在一些实施方案中,所述第一和第二扩增一起进行一定时间段以实现治疗剂量。在一些实施方案中,进行所述第一扩增以实现所述细胞为或约2倍至为或约20倍的扩增倍数。在一些实施方案中,所述第一扩增进行1-14天,如为或约或不超过1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天。在一些实施方案中,进行所述第二扩增以实现所述细胞为或约100倍至为或约3000倍的扩增倍数。在一些实施方案中,所述第二扩增进行为或约7天至21天,如大约14天。在一些实施方案中,进行所述第一和第二扩增以实现为或约或大于或大于约5亿个总细胞的治疗剂量。

[0147] 在一些实施方案中,本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括(a)从来自患有肿瘤的受试者的包含T细胞的输入样品选择对PD-1、CD39和/或TIGIT呈表面阳性的细胞,以获得从所述样品选择的细胞;(b)通过将所选择的细胞与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增,以及(c)通过将扩增的细胞的所述第一群体与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第二群体的条件下一起培养来进行第二扩增。在一些实施方案中,所述方法包括收获通过所述方法产生的扩增的T细胞的所述第二群体以用于配制为治疗性组合物。

[0148] 在一些实施方案中,本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括(a)从来自患有肿瘤的受试者的包含T细胞的输入样品选择对PD-1和CD39呈表面阳性的

细胞，以获得从所述样品选择的细胞；(b)通过将所选择的细胞与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增，以及(c)通过将扩增的细胞的所述第一群体与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第二群体的条件下一起培养来进行第二扩增。在一些实施方案中，所述方法包括收获通过所述方法产生的扩增的T细胞的所述第二群体以用于配制为治疗性组合物。

[0149] 在一些实施方案中，本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法，所述方法包括(a)从来自患有肿瘤的受试者的包含T细胞的输入样品选择对PD-1和TIGIT呈表面阳性的细胞，以获得从所述样品选择的细胞；(b)通过将所选择的细胞与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增，以及(c)通过将扩增的细胞的所述第一群体与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第二群体的条件下一起培养来进行第二扩增。在一些实施方案中，所述方法包括收获通过所述方法产生的扩增的T细胞的所述第二群体以用于配制为治疗性组合物。

[0150] 在一些实施方案中，本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法，所述方法包括(a)从来自患有肿瘤的受试者的包含T细胞的输入样品选择对CD39和TIGIT呈表面阳性的细胞，以获得从所述样品选择的细胞；(b)通过将所选择的细胞与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增，以及(c)通过将扩增的细胞的所述第一群体与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第二群体的条件下一起培养来进行第二扩增。在一些实施方案中，所述方法包括收获通过所述方法产生的扩增的T细胞的所述第二群体以用于配制为治疗性组合物。

[0151] 在一些实施方案中，本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法，所述方法包括(a)从来自患有肿瘤的受试者的包含T细胞的输入样品选择对PD-1、CD39和TIGIT呈表面阳性的细胞，以获得从所述样品选择的细胞；(b)通过将所选择的细胞与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增，以及(c)通过将扩增的细胞的所述第一群体与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第二群体的条件下一起培养来进行第二扩增。在一些实施方案中，所述方法包括收获通过所述方法产生的扩增的T细胞的所述第二群体以用于配制为治疗性组合物。

[0152] 在所提供的方法的另一个方面，在针对肿瘤反应性标记选择或分选细胞之前进行第一扩增。在一些实施方案中，所述第一扩增是最小扩增，其是在一定条件下进行一定时间段，使得在收集的肿瘤样品的细胞上上调的激活标记(例如PD-1、CD39和/或TIGIT)在分选步骤期间仍然存在，并且在第一扩增期间尚未下调。在一些实施方案中，所述初始扩增进行1-14天，如为或约或不超过1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天。在这样的实施方案中，所述方法涉及从初始扩增的T细胞的群体分选或选择细胞。在分选肿瘤反应性T细胞(例如对PD-1、CD39和/或TIGIT呈表面阳性的细胞)的选择后，将选择的细胞群体在第二扩增中进一步扩增，以产生扩增的细胞的第二群体。在这样的例子中，收获扩增的T细胞的所述第二群体作为治疗性TIL组合物。在一些实施方案中，所述第二扩增进行一定时间段以实现治疗剂量。在一些实施方案中，进行所述第二扩增以实现所述细胞为或约500倍至为或约1000倍、如为或约750倍的扩增倍数。在一些实施方案中，所述第二扩增进行为或约7天至21天，如大约14天。在一些实施方案中，进行所述第二扩增以实现为或约或大于或大于约5亿个总细胞的治疗剂量。

[0153] 在一些实施方案中，本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法，所述方法包括(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品，(b)通过将包含T细胞的所述输入样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增，(c)从扩增的细胞的所述第一群体选择分泌趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)的细胞和/或对C-X-C趋化因子受体5型(CXCR5)呈表面阳性的细胞，以产生选择的群体，以及(d)通过将所选择的群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增，其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。在一些实施方案中，所述方法包括收获通过所述方法产生的扩增的T细胞的所述第二群体以用于配制为治疗性组合物。

[0154] 在一些实施方案中，本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法，所述方法包括(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品，(b)通过将包含T细胞的所述样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增，(c)从扩增的细胞的所述第一群体选择对PD-1、CD39和/或TIGIT呈表面阳性的细胞，以产生选择的群体；以及(d)通过将所选择的群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增，其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。在一些实施方案中，所述方法包括收获通过所述方法产生的扩增的T细胞的所述第二群体以用于配制为治疗性组合物。

[0155] 在一些实施方案中，本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法，所述方法包括(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品，(b)通过将包含T细胞的所述样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增，(c)从扩增的细胞的所述第一群体选择对PD-1和CD39呈表面阳性的细胞，以产生选择的群体；以及(d)通过将所选择的群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增，其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。在一些实施方案中，所述方法包括收获通过所述方法产生的扩增的T细胞的所述第二群体以用于配制为治疗性组合物。

[0156] 在一些实施方案中，本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法，所述方法包括(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品，(b)通过将包含T细胞的所述样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增，(c)从扩增的细胞的所述第一群体选择对PD-1和TIGIT呈表面阳性的细胞，以产生选择的群体；以及(d)通过将所选择的群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增，其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。在一些实施方案中，所述方法包括收获通过所述方法产生的扩增的T细胞的所述第二群体以用于配制为治疗性组合物。

[0157] 在一些实施方案中，本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法，所述方法包括(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品，(b)通过将包含T细胞的所述样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生

扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增，(c)从扩增的细胞的所述第一群体选择对CD39和TIGIT呈表面阳性的细胞，以产生选择的群体；以及(d)通过将所选择的群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增，其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。在一些实施方案中，所述方法包括收获通过所述方法产生的扩增的T细胞的所述第二群体以用于配制为治疗性组合物。

[0158] 在一些实施方案中，本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法，所述方法包括(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品，(b)通过将包含T细胞的所述样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增，(c)从扩增的细胞的所述第一群体选择对PD-1、CD39和TIGIT呈表面阳性的细胞，以产生选择的群体；以及(d)通过将所选择的群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增，其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。在一些实施方案中，所述方法包括收获通过所述方法产生的扩增的T细胞的所述第二群体以用于配制为治疗性组合物。

[0159] 在所提供的方法的一些方面，所述方法不包括将肿瘤反应性T细胞的群体与呈递一种或多种新生抗原肽的抗原呈递细胞共培养的步骤，所述新生抗原肽与受试者的肿瘤中相关的非同义体细胞突变相对应。

[0160] 在所提供的方法的其他方面，所述方法包括将肿瘤反应性T细胞的群体与呈递一种或多种新生抗原肽的抗原呈递细胞共培养的步骤，所述新生抗原肽与受试者的肿瘤中相关的非同义体细胞突变相对应。在所提供的方法的这样的另一方面，所述方法包括在将一种或多种非天然肽呈递于主要组织相容性复合体(MHC)上的抗原呈递细胞的存在下共培养直接从来自受试者的肿瘤碎片消化(或者在来自其的细胞的初始扩增(例如最小扩增)后)的T细胞，所述一种或多种非天然肽是与受试者肿瘤中相关的非同义体细胞突变对应的肽。在一些实施方案中，在共培养之前，可以对肿瘤反应性T细胞进行富集或选择(例如基于对PD-1、CD39和/或TIGIT呈阳性的细胞的选择)，并且将选择的T细胞群体与呈递肽表位的抗原呈递细胞共培养。然后，扩增来自所述培养物的细胞以产生含有扩增的肿瘤特异性反应性细胞群体的治疗性组合物。在其他实施方案中，在共培养之后，可以直接从共培养物对肿瘤反应性T细胞进行富集或选择(例如基于对PD-1、CD39和/或TIGIT呈阳性的细胞的选择)，并且扩增选择的细胞以产生含有扩增的肿瘤特异性反应性细胞群体的治疗性组合物。

[0161] 在一些实施方案中，本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法，所述方法包括(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品，(b)通过将包含T细胞的所述输入样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增，(c)从扩增的细胞的所述第一群体选择分泌趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)的细胞和/或对C-X-C趋化因子受体5型(CXCR5)呈表面阳性的细胞，以产生选择的群体，(d)在将一种或多种非天然肽呈递于主要组织相容性复合体(MHC)上的抗原呈递细胞的存在下共培养所选择的群体以产生反应性T细胞群体，所述一种或多种非天然肽是与受试者肿瘤中相关的非同义体细胞突变对应的肽，所述反应性T细胞群体含有包含对所述肿瘤的突变编码肽具有反应性的内源T细胞受

体的T细胞，以及(e)通过将所述反应性T细胞群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增，其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。在一些实施方案中，所述方法包括收获通过所述方法产生的扩增的T细胞的所述第二群体以用于配制为治疗性组合物。

[0162] 在一些实施方案中，本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法，所述方法包括(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品，(b)通过将包含T细胞的所述输入样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增，(c)在将一种或多种非天然肽呈递于主要组织相容性复合体(MHC)上的抗原呈递细胞的存在下共培养扩增的细胞的所述第一群体以产生反应性T细胞群体，所述一种或多种非天然肽是与受试者肿瘤中相关的非同义体细胞突变对应的肽，所述反应性T细胞群体含有包含对所述肿瘤的突变编码肽具有反应性的内源T细胞受体的T细胞，(d)从所述反应性T细胞群体选择分泌趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)的细胞和/或对C-X-C趋化因子受体5型(CXCR5)呈表面阳性的细胞，以产生选择的群体；以及(e)通过将所选择的群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增，其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。在一些实施方案中，所述方法包括收获通过所述方法产生的扩增的T细胞的所述第二群体以用于配制为治疗性组合物。

[0163] 本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法，所述方法包括(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品，(b)通过将包含T细胞的所述样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增，(c)从扩增的细胞的所述第一群体选择对PD-1、CD39和/或TIGIT(如PD-1、CD39和TIGIT)呈表面阳性的细胞，以产生选择的细胞群体，(d)在将一种或多种非天然肽呈递于主要组织相容性复合体(MHC)上的抗原呈递细胞的存在下共培养所选择的细胞群体以产生反应性T细胞群体，所述一种或多种非天然肽是与受试者肿瘤中相关的非同义体细胞突变对应的肽，所述反应性T细胞群体含有包含对所述肿瘤的突变编码肽具有反应性的内源T细胞受体的T细胞，以及(e)通过将所述反应性T细胞群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增，其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。在一些实施方案中，所述方法包括收获通过所述方法产生的扩增的T细胞的所述第二群体以用于配制为治疗性组合物。

[0164] 本文提供一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法，所述方法包括(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品，(b)通过将包含T细胞的所述样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增，(c)在将一种或多种非天然肽呈递于主要组织相容性复合体(MHC)上的抗原呈递细胞的存在下共培养扩增的细胞的所述第一群体以产生反应性T细胞群体，所述一种或多种非天然肽是与受试者肿瘤中相关的非同义体细胞突变对应的肽，所述反应性T细胞群体含有包含对所述肿瘤的突变编码肽具有反应性的内源T细胞受体的T细胞，(d)从所述反应性T细胞群体选择对PD-1、CD39和/或TIGIT(如PD-1、CD39和TIGIT)呈表面阳性的细胞，以产生选择的细胞群体；以及(e)通过将所选择的细胞群体与一

种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增,其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。在一些实施方案中,所述方法包括收获通过所述方法产生的扩增的T细胞的所述第二群体以用于配制为治疗性组合物。

[0165] 在一些实施方案中,所述T细胞刺激剂包括抗CD3(例如抗CD3抗体,如OKT3)、抗CD28试剂(例如抗CD28抗体)(如抗CD3抗体(例如OKT3)和抗CD28抗体)和/或一种或多种重组细胞因子(例如IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15)。在特定实施方案中,T细胞的孵育或培养也用含有营养素的培养基进行,使得细胞可以在体外存活。

[0166] 在一些情形中,所述方法包括与重组IL-2一起孵育,所述重组IL-2是单独的或者与一种或多种其他重组细胞因子(例如IL-7、IL-21和/或IL-15)以及在一些情形中一种或多种其他T细胞刺激剂组合,以向细胞提供初级和次级(共刺激)信号。用于培养T细胞以向细胞提供初级和次级(共刺激)信号的标准方法涉及与由抗CD3(例如OKT3)和抗CD28试剂提供的T细胞刺激剂一起孵育。在一些实施方案中,所述T细胞刺激剂包括抗CD3抗体(例如OKT3)和抗CD28抗体。通常,这样的刺激还包括一种或多种另外的重组细胞因子(例如IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15)以及含有营养素的培养基,使得细胞可以在体外存活。

[0167] 用于扩增肿瘤反应性T细胞的提供的方法涉及第一扩增,所述第一扩增涉及将含有T细胞的选择的或分离的群体(即T细胞的第一群体)与来自(例如IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15)中的一种或多种的重组细胞因子(典型地通常包括重组IL-2)一起培养。在一些情形中,一种或多种T细胞刺激剂还向细胞提供初级和次级(共刺激)信号,如通过抗CD3(例如OKT3)和抗CD28试剂(如抗CD3抗体(例如OKT3)和抗CD28抗体)来提供。由于第一群体中存在的T细胞的扩增或增殖,初始或第一扩增得到富集T细胞的T细胞的第二群体。

[0168] 在所提供的方法中,通过一个或多个其他步骤从第一步骤中扩增的刺激的T细胞鉴定或富集肿瘤反应性T细胞,所述一个或多个其他步骤包括将刺激的T细胞(T细胞的第二群体)与抗原呈递细胞(APC)以及包括肿瘤抗原新表位的一种或多种肽(APC/肽新表位)离体共培养。在一些实施方案中,所提供的方法包括离体共培养,其中将T细胞的第二群体与已经暴露于或接触一种或多种肽(例如合成肽)的APC(如自体APC或人工抗原呈递细胞(aAPC))在APC已经被诱导以呈递来自肿瘤相关抗原的一种或多种肽的条件下一起孵育。在一些实施方案中,T细胞的所述群体是来自患有肿瘤的受试者的自体T细胞,并且合成肽的来源是来自同一受试者的肿瘤抗原的肿瘤抗原肽。在一些实施方案中,来自离体共培养的细胞是如下细胞群体(第三群体),所述细胞群体包括识别在培养物中的APC的MHC上呈递的肽或者被所述肽激活的肿瘤反应性T细胞。在一些实施方案中,来自离体共培养的细胞表示富集肿瘤反应性T细胞的细胞来源。

[0169] 在特定实施方案中,对从共培养物富集或分离的T细胞进行第二扩增,如在分离或选择肿瘤反应性T细胞或者对与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种T细胞激活标记呈表面阳性的T细胞之后进行。所述第二扩增涉及与一种或多种T细胞刺激剂(如抗CD3抗体(例如OKT3)、抗CD28抗体和一种或多种重组细胞因子(例如IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15))一起孵育以进一步刺激T细胞。允许所述T细胞(如肿瘤反应性T细胞或对与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种T细胞激活标记呈表面阳性的T细胞)视需要扩增某一天数和/或直至达到治疗剂量或收获剂量。然后可以收获并配制扩增的T细胞的组合物以供施用于受试者用于

治疗所述受试者的癌症。

[0170] 在所提供的方法的实施方案中，一个或多个所述步骤可以在无血清培养基中进行。在一个实施方案中，所述无血清培养基是OpTmizer CTS(LifeTech)、Immunocult XF(Stemcell technologies)、CellGro(CellGenix)、TexMacs(Miltenyi)、Stemline(Sigma)、Xvivo15(Lonza)、PrimeXV(Irvine Scientific)或Stem XVivo(RandD systems)。所述无血清培养基可以补充有血清代用品，如来自LifeTech的ICSR(免疫细胞血清替代物)。血清代用品(例如，ICSR)的水平可以是例如高达5％，例如，约1％、2％、3％、4％或5％。在一些实施方案中，所述无血清培养基含有0.5mM至5mM的二肽形式的L-谷氨酰胺，如L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(Glutamax™)。在一些实施方案中，二肽形式的L-谷氨酰胺(如L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度为从或从约0.5mM至5mM、0.5mM至4mM、0.5mM至3mM、0.5mM至2mM、0.5mM至1mM、1mM至5mM、1mM至4mM、1mM至3mM、1mM至2mM、2mM至5mM、2mM至4mM、2mM至3mM、3mM至5mM、3mM至4mM或4mM至5mM，每个都包含端值。在一些实施方案中，二肽形式的L-谷氨酰胺(如L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度为或为约2mM。

[0171] 与所提供的方法结合，所述方法导致含有对肿瘤相关抗原具有特异性的内源TCR的T细胞的富集，以使所需治疗性细胞的扩增最大化。允许T细胞(如肿瘤反应性T细胞或者对与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种T细胞上调标记或激活标记呈表面阳性的T细胞)视需要扩增某一天数和/或直至达到治疗剂量或收获剂量。然后可以收获并配制扩增的T细胞的组合物以供施用于受试者用于治疗所述受试者的癌症。

A.通过刺激T细胞群体进行的T细胞的扩增，例如第一扩增

[0172] 所提供的方法包括从生物样品获得并富集T细胞群体，用作含有T细胞的第一或输入样品。在一些情形中，T细胞的所述第一或输入样品是已知或可能含有对肿瘤抗原具有反应性的T细胞或者能够对肿瘤抗原具有反应性(如在与肿瘤抗原的自体来源离体共培养之后)的样品。例如，通常T细胞的所述第一或输入样品来自肿瘤的生物样品或者已知或可能患有肿瘤的受试者的生物样品。在特定实施方案中，将T细胞的所述第一或输入样品用一种或多种T细胞刺激剂(例如一种或多种重组细胞因子，如IL-2)进一步刺激，以产生T细胞的第二或刺激的群体，所述第二或刺激的群体含有在所述刺激后膨胀的T细胞。

[0173] 在一些实施方案中，与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育是直接对从受试者的生物样品(例如来自受试者的自体T细胞)选择或获得的T细胞的输入或第一样品进行的，其中将T细胞的所述输入或第一样品与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育。在其他实施方案中，T细胞的所述输入或第一样品包括可能是或怀疑是肿瘤反应性T细胞的T细胞，其中首先通过选择对与反应性T细胞相关的标记(如章节I.C中所述的一种或多种标记)呈阳性的细胞而在从受试者的生物样品选择的T细胞群体中选择这样的细胞。在这样的实施方案中，与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育是在富集包含肿瘤反应性T细胞的T细胞群体之后进行的。在所提供的实施方案中，与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育是在将这样的T细胞与APC/肽新表位共培养之前进行的。

[0174] 在一些情形中，用于通过与一种或多种T细胞刺激剂一起培养来刺激T细胞的条件导致细胞的激活以及存在于T细胞的所述第一或输入样品中的T细胞的扩增或长出(outgrowth)。在一些实施方案中，用于用一种或多种T细胞刺激剂刺激T细胞的条件可以包括在导致T细胞大量扩增的条件下培养T细胞。

[0175] 在所提供的方法中，然后将T细胞的刺激的或扩增的组合物(如第一扩增群体)用于富集和扩增肿瘤反应性T细胞的后续下游步骤中，包括如下步骤，所述步骤包括将刺激的T细胞与抗原呈递细胞(APC)在T细胞新表位(突变的)肽抗原的存在下共培养，以产生、得到或挑出作为肿瘤反应性T细胞的T细胞。在特定实施方案中，所提供的方法还可以包括用于在将T细胞与APC/肽新表位共培养后选择或富集对肿瘤抗原具有反应性的T细胞(肿瘤反应性T细胞)的步骤，例如通过选择对与反应性T细胞相关的标记(如章节I.C中所述的一种或多种标记)呈阳性的细胞来进行。可以在用于扩增的条件下培养肿瘤反应性T细胞群体，例如以产生治疗性T细胞组合物。

[0176] 在任何所提供的方法的方面，在一种或多种T细胞刺激剂的存在下孵育T细胞的输入或第一样品。在特定实施方案中，所述孵育是在一种或多种T细胞刺激剂激活或刺激细胞或者促进存在于T细胞的输入或第一群体中的T细胞扩增的条件下进行。

[0177] 在一些实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂包括重组T细胞刺激细胞因子，如IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25和/或IL-23。在一些实施方案中，所述T细胞刺激细胞因子包括IL-2，所述IL-2是单独的或与来自IL-7、IL-15、IL-21、IL-25和/或IL-23的另一种细胞因子组合。在一些实施方案中，所述T细胞刺激细胞因子是IL-2、IL-7、IL-15和IL-21中的一种、两种、三种或更多种。在一些实施方案中，所述T细胞刺激细胞因子是IL-7和IL-15。

[0178] 在一些实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂可以包括接合CD3的一种或多种药剂。所述一种或多种T细胞刺激剂可以包括抗CD3抗体，如OKT3。在一些实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂可以另外包括接合CD3的药剂，如抗CD28剂(由APC呈递或作为可溶抗体)。例如，所述一种或多种T细胞刺激剂可以包括抗CD3抗体(例如OKT3)和抗CD28抗体。因此，在所提供的方法的方面，将T细胞的第一或输入样品与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂(例如但不限于抗CD3抗体(例如OKT3)和抗CD28(由APC呈递或作为可溶抗体))一起孵育，以产生包括激活的或刺激的T细胞的T细胞的第二群体。在一些方面，这样的刺激可以在APC和新表位(突变的)肽的存在下共培养之前进行。在特定实施方案中，一种或多种重组细胞因子还在孵育期间作为另外的T细胞刺激剂存在。

[0179] 在一些实施方案中，与一种或多种T细胞刺激剂(如抗CD3和/或重组细胞因子，例如IL-2)一起孵育可以持续足以激活或刺激细胞的时间段。在一些实施方案中，与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育进行为或约1天，如通常为或约2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天，或者前述任一项之间的任何时间范围。在一些实施方案中，所述孵育进行7-10天。在一些实施方案中，所述孵育持续为或约7天。在一些实施方案中，所述孵育持续为或约8天。在一些实施方案中，所述孵育持续为或约9天。在一些实施方案中，所述孵育持续为或约10天。在一些实施方案中，与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育持续12小时至96小时，如24小时至48小时，并且通常为或约48小时。

[0180] 在一些实施方案中，在培养期间将细胞洗涤一次或多次以去除在孵育或培养期间存在的药剂和/或向培养基补充一种或多种另外的药剂。在一些实施方案中，在孵育或培养期间洗涤细胞以在完成培养之前减少或去除一种或多种T细胞刺激剂。

[0181] 在一些实施方案中，本文提供的刺激T细胞的方法包括在适合于人T淋巴细胞生长的温度(例如，至少约25摄氏度，通常至少约30度，且通常为或约37摄氏度)下与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育。在一些实施方案中，培养或孵育的方法是在无血清培养基中进行。

1.含有T细胞的样品

[0182] 所提供的方法包括从生物样品选择或获得T细胞的输入样品，所述输入样品可以用作T细胞的来源或输入以供用一种或多种T细胞刺激剂(例如重组IL-2或其他T细胞刺激细胞因子和/或抗CD3)进行刺激。在一些实施方案中，T细胞来自受试者的已知或可能含有肿瘤反应性T细胞的生物样品。所收集的生物样品含有或怀疑含有具有对肿瘤上存在的突变具有反应性的内源TCR的淋巴细胞。

[0183] 在任何所提供的实施方案的方面，获得来自受试者、如来自目的患者(即怀疑患有或已知患有癌症的患者)的合适的生物样品。在一些实施方案中，所述样品是已知或怀疑含有T细胞的样品，所述T细胞如可以或可能表达对肿瘤相关抗原具有特异性、结合肿瘤相关抗原或识别肿瘤相关抗原的内源T细胞受体(TCR)的T细胞。生物样品可能源自会含有或怀疑含有这样的T细胞的任何初始来源。在一些方面，目的生物样品来源包括但不限于许多不同的生理来源，例如组织来源的样品(例如匀浆物)以及血液或其衍生物。

[0184] 多种生物样品中的任一种可以用作潜在反应性T细胞的来源。尽管肿瘤和下游淋巴结可能具有最高频率的反应性T细胞(Powell等人，Clin.Cancer.Res.，2014)，但是也可以使用其他样品来源。在一些情形中，所述样品是肿瘤样品、三级淋巴部位、引流淋巴结、外周血或骨髓。在一些实施方案中，所述生物样品是肿瘤样品。在一些实施方案中，所述生物样品是淋巴样品。在一些实施方案中，所述生物样品是外周血样品。

[0185] 生物样品包括直接取自受试者以获得输入样品的组织、流体和其他样品，或者可以经历一个或多个处理步骤，如分离(例如选择或富集)、离心、洗涤和/或孵育，以获得或产生输入样品。含有T细胞的输入样品可以是直接从生物来源获得的样品或者处理的样品。生物样品包括但不限于体液(如血液、血浆、血清、脑脊液、滑液、尿液和汗液)、组织和器官样品(包括源自其的处理的样品)。

[0186] 在一些方面，样品是血液或血液源样品，或者是或源自单采术或白细胞单采术产物。示例性样品包括全血、外周血单个核细胞(PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠相关淋巴组织、粘膜相关淋巴组织、脾脏、其他淋巴组织、肝脏、肺、胃、肠、结肠、肾脏、胰腺、乳房、骨、前列腺、宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其他器官和/或源自它们的细胞。在细胞疗法(例如，过继细胞疗法)的情况下，样品包括来自自体和同种异体来源的样品。

[0187] 在许多实施方案中，样品可以源自其中至少怀疑存在目的T细胞的流体。在许多实施方案中，样品的合适的初始来源是血液。在一些实施方案中，生物样品是血液源样品。血液源样品可以源自全血或其部分，例如血清、血浆等，其中在许多实施方案中，样品源自从全血收获的血细胞。在一些方面，样品来源含有单个核细胞。例如，生物样品是或含有外周血单个核细胞(PBMC)，或者源自PBMC。

[0188] 在样品是PBMC源样品的一些实施方案中，样品通常是流体PBMC源样品。可以采用用于产生流体PBMC样品的任何便捷方法。在许多实施方案中，通过从全血分离PBMC(即，收集PBMC)来制备流体PBMC源样品，例如，通过离心来分离(如通过Ficoll-Hypaque密度梯度离心，其中用于这样的分离程序的代表性方案披露于WO98/15646和美国专利号5,985,565中)。

[0189] 在一些实施方案中，样品是肿瘤样品，并且由此提供肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的来

源。在一些方面，TIL是已经离开受试者的血流并且移动至肿瘤中或浸润肿瘤的T细胞。在特定方面，TIL对肿瘤抗原具有反应性。

[0190] 可以通过多种方法中的任何一种获得患者肿瘤样品，其中所述方法获得含有肿瘤和TIL细胞的混合物的样品。在一些实施方案中，通过手术切除获得肿瘤样品。在一些实施方案中，通过针刺活检获得肿瘤样品。通常，肿瘤样品可以来自任何实体瘤，包括原发性肿瘤、侵袭性肿瘤或转移肿瘤。肿瘤样品也可以是液体瘤，如从血液恶性肿瘤获得的肿瘤。实体瘤可以属于任何癌症类型，包括但不限于乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、结直肠癌、肺癌、脑癌、肾癌、胃癌(胃肠癌)和皮肤癌(包括但不限于鳞状细胞癌、基底细胞癌和黑色素瘤)。在特定实施方案中，肿瘤是如章节IV中描述的任何一种。在一些实施方案中，肿瘤样品来自与用于鉴定用于制备肽新表位的新生抗原相同的肿瘤来源。

[0191] 在所提供的实施方案中，将所获得的肿瘤样品破碎成小块，其大小在为或约1mm^{3}与为或约8mm^{3}之间，如在为或约1mm^{3}与为或约6mm^{3}之间、在为或约1mm^{3}与为或约4mm^{3}之间、在为或约1mm^{3}与为或约2mm^{3}之间。在一些实施方案中，所述肿瘤碎片为约2-3mm^3。在一些实施方案中，所述肿瘤碎片为约1-2mm^3。在一些实施方案中，所述肿瘤碎片是通过物理破碎(如通过剥离)来获得。在一些实施方案中，所述肿瘤碎片是通过锐性剥离来获得。

[0192] 在一些任何所提供的实施方案中，将所获得的肿瘤样品破碎成小块，其直径在为或约1mm与为或约8mm之间，如直径在为或约1mm与为或约6mm之间、直径在为或约1mm与为或约4mm之间、直径在为或约1mm与为或约2mm之间。在一些实施方案中，所述肿瘤碎片的直径为约2-3mm。在一些实施方案中，所述肿瘤碎片的直径为约1-2mm。在一些实施方案中，所述肿瘤碎片是通过物理破碎(如通过剥离)来获得。在一些实施方案中，所述肿瘤碎片是通过锐性剥离来获得。

[0193] 在一些实施方案中，在破碎前将肿瘤样品冷冻保存。在一些实施方案中，将肿瘤碎片冷冻保存。

[0194] 在一些实施方案中，在所提供的方法中将所获得的肿瘤碎片直接用作T细胞的输入样品。在一些实施方案中，将所获得的肿瘤碎片置入在介导T细胞激活和/或维持T细胞扩增的条件下且具有适当营养素的培养基中，所述条件如下文小节I.A.2中针对T细胞刺激描述的任何条件。在一些实施方案中，将1至500个肿瘤碎片(例如大小各自为1-8mm)在用于扩增的条件下置于适当培养器皿中。在一些实施方案中，在用于扩增的条件下培养10、20、30、40、50或更多个碎片。所述培养器皿可以是微孔、烧瓶、管、袋、板或其他封闭系统装置。在一些实施方案中，培养器皿是提供透气性表面区域的封闭容器，如透气性烧瓶。提供透气性表面区域的示例性培养器皿包括G-Rex板或烧瓶。在一些实施方案中，对于培养器皿的每个约2cm^{2}区域，放置1个肿瘤碎片(直径为约1-8mm)。可以基于可用肿瘤碎片的数量和/或所需细胞产量来选择特定培养器皿。培养器皿(例如G-Rex)的选择可以通过线性缩放接种至培养器皿的表面区域的碎片数量来选择。在一些实施方案中，培养器皿的表面区域为约2cm^2(例如G-Rex 24孔板)，并且将约1个肿瘤碎片(直径为约1-8mm)置于所述培养器皿中。在一些实施方案中，培养器皿的表面区域为约10cm^2(例如G-Rex 10或G-Rex 10M)，并且将约5个肿瘤碎片(直径各自为约1-8mm)置于所述培养器皿中。在一些实施方案中，培养器皿的表面区域为约100cm^2(例如G-Rex 100M/100M-CS)，并且将约50个肿瘤碎片(直径各自为约1-8mm)置于所述培养器皿中。在一些实施方案中，培养器皿的表面区域为约500cm^2(例如G-Rex

500M/500M-CS)，并且将约250个肿瘤碎片(直径各自为约1-8mm)置于所述培养器皿中。在所提供的方法的方面，如与涉及更小培养器皿和/或每个器皿更少碎片的方法相比，增加培养器皿的大小且因此增加每个器皿中的肿瘤碎片数量可以降低差异性，如通过合并更大数量的碎片以使碎片之间的肿瘤间差异性降至最低。

[0195] 在一些实施方案中，将肿瘤碎片置于培养基中，用于使用下文小节I.A.2中描述的任何条件来刺激细胞。在一些实施方案中，所述培养基是无血清培养基，其含有来自IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21的重组细胞因子，如重组IL-12或重组IL-7和IL-15。重组细胞因子的浓度可以包括如所述的任何浓度。在特定实施方案中，所述培养基是无血清培养基，其含有重组IL-2，如为或约300IU/mL至为或约1000IU/mL，例如为或约300IU/mL。在一些实施方案中，所述培养基是无血清培养基，其含有抗CD3抗体和/或CD28靶向剂(例如抗CD28抗体)以及一种或多种重组细胞因子(例如IL-2)。

[0196] 在一些实施方案中，在所提供的方法中使用肿瘤碎片作为来源以制备单细胞悬浮液用作T细胞的输入样品。在一些实施方案中，所提供的方法涉及从肿瘤碎片获得细胞，如通过肿瘤碎片的酶消化以获得TIL。酶消化可以使用胶原酶(如IV型胶原酶或I/II型胶原酶)来进行。酶(如胶原酶)可以以如下浓度存在于培养基中用于酶消化：为或约1mg/mL至为或约5mg/mL，如为或约1mg/mL、为或约2mg/mL、为或约3mg/mL、为或约4mg/mL或者为或约5mg/mL，或者前述任一项之间的任何值。在一些实施方案中，酶消化是用包括IV型胶原酶(如为或约1mg/mL至为或约5mg/mL)的培养基来进行。在一些实施方案中，酶消化是用包括I/II型胶原酶(如为或约1mg/mL至为或约5mg/mL)的培养基来进行。在一些实施方案中，如果需要更温和的消化，则使用为或约1mg/mL胶原酶。在一些实施方案中，如果需要更完全的消化，则使用更高浓度的胶原酶，如为或约5mg/mL胶原酶。在其他实施方案中，可以使用来自Miltenyi人肿瘤解离试剂盒的酶(例如目录号130-095-929;Miltenyi Biotec)。含有所述酶的酶培养基可以是无血清培养基，如所述的任一种。在特定实施方案中，酶培养基包括胶原酶，例如，Roswell Park Memorial Institute(RPMI)1640缓冲液、2mM谷氨酸盐(例如GlutaMAX)、10mg/mL庆大霉素、30个单位/mL的DNA酶和1.0mg/mL胶原酶)。在一些实施方案中，酶培养基包括无血清培养基(例如OpTmizer)，其含有2mM谷氨酸盐(例如GlutaMAX)、10μg/mL庆大霉素、免疫细胞血清替代物(例如CTS免疫细胞血清替代物)和1.0mg/mL至5.0mg/mL胶原酶。在一些实施方案中，所述胶原酶是IV型胶原酶。在一些实施方案中，所述胶原酶是I/II型胶原酶。

[0197] 然后例如使用组织解离器将肿瘤碎片机械剥离以解离TIL。组织解离器的例子是GentleMACs™(Miltenyi Biotec)，用于匀浆化组织。可以通过如下方式产生肿瘤消化物：将肿瘤置于酶培养基中并机械解离肿瘤大约1分钟，之后在37℃下在5％ CO_2中孵育30分钟，之后在前述条件下重复机械解离和孵育循环，直至只有小组织块存在。在此过程结束时，如果细胞悬浮液含有大量红细胞或死细胞，可以使用FICOLL进行密度梯度分离以去除这些细胞。在一些情况下，可以通过离心来实现分离，在这种情况下，可以将细胞沉淀重新悬浮并通过例如70μm过滤器过滤以去除碎屑。可以使用本领域已知的替代方法，如美国专利申请公开号2012/0244133A1中描述的那些方法，将其公开内容通过引用并入本文。任何前述方法都可以用于本文所述的用于获得用于在所提供的方法中使用的TIL的方法的任何实施方案中。

[0198] 在一些实施方案中，用作T细胞的输入样品的单细胞悬浮液包含为或约$1x10^6$个T细胞/克来自受试者的肿瘤样品至为或约$1000x10^6$个T细胞/克来自受试者的肿瘤样品，如$1x10^6$至$500x10^6$个T细胞/克来自受试者的肿瘤样品、$1x10^6$至$100x10^6$个T细胞/克来自受试者的肿瘤样品、$1x10^6$至$50x10^6$个T细胞/克来自受试者的肿瘤样品、$1x10^6$至$10x10^6$个T细胞/克来自受试者的肿瘤样品、$10x10^6$至$1000x10^6$个T细胞/克来自受试者的肿瘤样品、$10x10^6$至$100x10^6$个T细胞/克来自受试者的肿瘤样品、$10x10^6$至$500x10^6$个T细胞/克来自受试者的肿瘤样品、$10x10^6$至$50x10^6$个T细胞/克来自受试者的肿瘤样品、$50x10^6$至$1000x10^6$个T细胞/克来自受试者的肿瘤样品、$50x10^6$至$500x10^6$个T细胞/克来自受试者的肿瘤样品、$50x10^6$至$100x10^6$个T细胞/克来自受试者的肿瘤样品、$100x10^6$至$1000x10^6$个T细胞/克来自受试者的肿瘤样品、$100x10^6$至$500x10^6$个T细胞/克来自受试者的肿瘤样品或者$500x10^6$至$1000x10^6$个T细胞/克来自受试者的肿瘤样品。在一些实施方案中，用作T细胞的输入样品的单细胞悬浮液包含每克来自受试者的肿瘤样品为或约或者至少或至少约$10x10^6$个T细胞、$20x10^6$个T细胞、$30x10^6$个T细胞、$40x10^6$个T细胞、$50x10^6$个T细胞、$60x10^6$个T细胞、$70x10^6$个T细胞、$80x10^6$个T细胞、$90x10^6$个T细胞、$100x10^6$个T细胞。在一些实施方案中，用作T细胞的输入样品的单细胞悬浮液包含为或约$10x10^6$个T细胞/克来自所述受试者的肿瘤样品至为或约$100x10^6$个T细胞/克来自所述受试者的肿瘤样品。

[0199] 在一些实施方案中，将来自肿瘤碎片的消化的细胞作为单细胞悬浮液置入在介导T细胞激活和/或维持T细胞扩增的条件下且具有适当营养素的培养基中，所述条件如下文小节I.A.2针对T细胞的刺激所述的任何条件。以适合于特定培养器皿的特定密度接种所述细胞。培养器皿可以是微孔、烧瓶、管、袋或其他封闭系统装置。在一些实施方案中，培养器皿是提供透气性表面区域的封闭容器，如透气性烧瓶。提供透气性表面区域的示例性培养器皿包括G-Rex板或烧瓶。在一些实施方案中，对于培养器皿的每个约$2cm^2$区域，接种酶消化的单细胞悬浮液的大约$5x10^5$至$2x10^6$个细胞。可以基于可用细胞的数量和/或所需的细胞产量来选择特定培养器皿。培养器皿的选择(例如G-Rex)可以通过线性缩放接种至培养器皿的表面区域的细胞数量来选择。在一些实施方案中，培养器皿的表面区域为约$2cm^2$(例如G-Rex 24孔板)，并且将酶消化的单细胞悬浮液的约$5x10^5$至$2x10^6$个细胞置于所述培养器皿中。在一些实施方案中，培养器皿的表面区域为约$10cm^2$(例如G-Rex 10或G-Rex 10M)，并且将酶消化的单细胞悬浮液的约$2.5x10^6$至$1x10^7$个细胞置于所述培养器皿中。在一些实施方案中，培养器皿的表面区域为约$100cm^2$(例如G-Rex 100M/100M-CS)，并且将酶消化的单细胞悬浮液的约$2.5x10^7$至$1x10^8$个细胞置于所述培养器皿中。在一些实施方案中，培养器皿的表面区域为约$500cm^2$(例如G-Rex 500M/500M-CS)，并且将酶消化的单细胞悬浮液的约$1.25x10^8$至$5x10^8$个细胞置于所述培养器皿中。

[0200] 在一些实施方案中，所述培养基是含有重组IL-2的无血清培养基。在一些实施方案中，还可以包括一种或多种另外的T细胞刺激剂。在一些实施方案中，所述培养基是无血清培养基，其含有抗CD3抗体和/或CD28靶向剂(例如抗CD28抗体)以及一种或多种重组细胞因子(例如IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21)。

[0201] 可以从多个不同的受试者/患者/宿主获得样品。通常，这样的宿主是“哺乳动物(mammal)”或“哺乳动物(mammalian)”，其中这些术语被广泛用于描述哺乳纲内的生物，包括食肉目(例如，狗和猫)、啮齿目(例如，小鼠、豚鼠和大鼠)和灵长目(例如，人、黑猩猩和

猴)。在许多实施方案中,宿主将是人。

[0202] 在一些方面,受试者是人。因此,在一些实施方案中,细胞是原代细胞,例如,原代人细胞。在一些实施方案中,样品对于要治疗的受试者是自体的,所述受试者如作为需要特定治疗干预(如根据所提供的方法分离、处理和/或扩增细胞所用于的过继细胞疗法)的患者的受试者。在一些实施方案中,样品对于要治疗的受试者是同种异体的。

[0203] 在任何所提供的实施方案的一些中,生物样品是淋巴来源的样品或肿瘤来源的样品,并且其中:培养开始时的细胞数量在为或约$10x10^6$与$100x10^6$个总活细胞之间、$20x10^6$与$100x10^6$个总活细胞之间、或$12x10^6$与$43x10^6$个总活细胞之间;或者是为或约$10x10^6$个总活细胞、为或约$12x10^6$个总活细胞、$20x10^6$个总活细胞、$40x10^6$个总活细胞、$60x10^6$个总活细胞、或$100x10^6$个总活细胞,或者前述任一项之间的任何值。在一些实施方案中,在培养开始时肿瘤反应性T细胞的百分比在为或约1%与为或约90%之间、为或约1%与为或约75%之间、为或约1%与为或约50%之间、为或约1%与为或约25%之间或者为或约1%与为或约14%之间。

2.用于初始扩增的T细胞刺激

[0204] 在所提供的方法的方面,在一种或多种T细胞刺激剂的存在下在用于刺激T细胞(如用于扩增T细胞)的条件下孵育或培养来自输入样品(T细胞的输入或第一群体,如存在于切除的肿瘤碎片或来自肿瘤碎片的单细胞悬浮液中)的T细胞。在一些实施方案中,与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育或培养导致选择的T细胞或其所需子集或亚型或其活细胞的扩增(第一扩增)或长出,用于所提供的方法的后续步骤中。一种或多种T细胞刺激剂以及用于孵育或培养的条件的非限制性例子描述于本文中。

[0205] 因此,所提供的方法包括培养T细胞用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,其中在T细胞刺激剂的存在下在扩增T细胞的条件下培养或孵育T细胞。

[0206] 在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂包括重组T细胞刺激细胞因子,如IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25、IL-23、IL-27和/或IL-35。在一些实施方案中,所述T细胞刺激细胞因子包括IL-2,所述IL-2是单独的或者与来自IL-7、IL-15、IL-21、IL-25、IL-23、IL-27和/或IL-35的另一种细胞因子组合。在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂包括重组T细胞刺激细胞因子,如IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25和/或IL-23。在一些实施方案中,所述T细胞刺激细胞因子包括IL-2,所述IL-2是单独的或与来自IL-7、IL-15、IL-21、IL-25和/或IL-23的另一种细胞因子组合。在一些实施方案中,所述T细胞刺激细胞因子是IL-2、IL-7、IL-15和IL-21中的一种、两种、三种或更多种。在一些实施方案中,所述T细胞刺激细胞因子包括IL-2,所述IL-2是单独的或者与来自IL-7、IL-15和/或IL-21的另一种细胞因子组合。在一些实施方案中,所述T细胞刺激细胞因子包括IL-2,所述IL-2是单独的或者与来自IL-25、IL-23、IL-27和/或IL-35另一种细胞因子组合。在一些实施方案中,所述T细胞刺激细胞因子是IL-7和IL-15。

[0207] 在一些实施方案中,技术人员可以熟练地选择细胞因子或细胞因子组合,只要所述一种或多种细胞因子提供活性刺激T细胞扩增。刺激肿瘤反应性T细胞的活性可以是直接的或间接的。在一些实施方案中,一种或多种细胞因子直接刺激肿瘤反应性T细胞扩增或增殖。在一些实施方案中,一种或多种细胞因子抑制T调节T细胞,从而间接刺激或增强所需肿瘤反应性T细胞的增殖。

[0208] 在一些实施方案中，用于初始扩增的与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育不包括与接合CD3和共刺激分子(如CD28)的一种或多种药剂一起孵育。在一些实施方案中，用于初始扩增的与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育不包括与抗CD3抗体(如OKT3)一起孵育。在一些实施方案中，用于初始扩增的与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育不包括与由APC呈递的、固定在固体表面(例如珠)上的或作为可溶抗体的抗CD3(例如OKT3)/抗CD28抗体一起孵育。在一些实施方案中，用于初始扩增的与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育不包括与可溶抗CD3(如OKT3)一起孵育。在一些实施方案中，用于初始扩增的与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育不包括与抗CD3/抗CD28(包括固定在珠上的这样的试剂，例如如由Dynabeads所提供)一起孵育。在一些实施方案中，用于初始扩增的与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育不包括与APC(如辐照的APC)一起孵育。在一些实施方案中，用于初始扩增的与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育不包括与非分裂PBMC(如辐照的PBMC)一起孵育。

[0209] 在一些任何所提供的实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂选自启动TCR/CD3细胞内信号传导的药剂和启动经由共刺激受体的信号传导的药剂。在一些任何所提供的实施方案中，启动TCR/CD3细胞内信号传导的药剂是抗CD3抗体，如OKT3。在一些任何所提供的实施方案中，启动经由共刺激受体的信号传导的药剂包含外周血单个核细胞(PBMC)，任选地非分裂或辐照的PBMC。在一些任何所提供的实施方案中，启动经由共刺激受体的信号传导的药剂是抗CD28抗体。在一些任何所提供的实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂是各自可溶的抗CD3抗体和抗CD28抗体。在特定实施方案中，一种或多种重组细胞因子还在孵育期间作为另外的T细胞刺激剂存在。在一些实施方案中，与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育包括与至少一种T细胞刺激重组细胞因子(例如重组IL-2、IL-7、IL-21、IL-15、IL-25、IL-23、IL-27和/或IL-35)以及接合T细胞上的CD3和/或共刺激分子(例如CD28)的一种或多种其他T细胞刺激剂一起孵育。

[0210] 在所提供的方法的实施方案中，刺激条件包括一种或多种药剂(例如，配体)，所述药剂开启或启动T细胞中的TCR/CD3细胞内信号传导级联和/或T细胞中的共刺激信号。这样的药剂可以包括抗体，如对TCR组分具有特异性的那些(例如，抗CD3)和/或共刺激受体(例如抗CD28或抗4-1BB)。在一些实施方案中，将这样的药剂作为可溶抗体添加至培养基。在其他实施方案中，将这样的药剂与固体支持物如珠结合。在一些实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂包括抗CD3/CD28缀合的磁珠(例如，DYNABEADS®M-450CD3/CD28 T细胞扩增器)。

[0211] 抗CD3抗体可以包括针对或可以特异性结合T细胞表面上的CD3受体(通常是人T细胞上的人CD3)的任何抗体。抗CD3抗体包括OKT3，也称为莫罗单抗。抗CD3抗体还包括UHCTI克隆，也称为T3和CD3E。其他抗CD3抗体包括例如奥昔珠单抗、替利珠单抗和维西珠单抗。抗CD3抗体可以作为可溶试剂或以与珠结合的形式来添加。在特定实施方案中，抗CD3抗体是可溶的。

[0212] 在特定实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂包括抗CD3抗体，将其在孵育期间添加至细胞培养基中。在一些实施方案中，抗CD3抗体是以范围如下的浓度来添加：在为或约0.1ng/mL与50ng/mL之间，如在为或约0.5ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.5ng/mL与为或约30ng/mL之间、在为或约0.5ng/mL与为或约15ng/mL之间、在为或约0.5ng/mL与为或约5ng/mL之间、在为或约0.5ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约1ng/mL

与为或约50ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约30ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约15ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约5ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约30ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约15ng/mL之间、在为或约15ng/mL与为或50ng/mL之间、在为或约15ng/mL与为或约30ng/mL之间或者在为或约30ng/mL与为或约50ng/mL之间，每个都包含端值。

[0213] 在特定实施方案中，抗CD3抗体是OKT3。在一个实施方案中，细胞培养基包含约0.1ng/mL、约0.5ng/mL、约1ng/mL、约2.5ng/mL、约5ng/mL、约7.5ng/mL、约10ng/mL、约15ng/mL、约20ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200ng/mL、约500ng/mL和约1μg/mL的OKT3抗体。在一个实施方案中，细胞培养基包含在0.1ng/mL与1ng/mL之间、在1ng/mL与5ng/mL之间、在5ng/mL与10ng/mL之间、在10ng/mL与20ng/mL之间、在20ng/mL与30ng/mL之间、在30ng/mL与40ng/mL之间、在40ng/mL与50ng/mL之间以及在50ng/mL与100ng/mL之间的OKT3抗体。

[0214] 在一些实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂包括与抗CD3抗体一起孵育以及与另一药剂一起孵育，所述另一药剂与CD28特异性结合或者刺激或诱导细胞中CD28介导的信号。在一些实施方案中，CD28介导的信号可以由抗CD28抗体或其抗原结合片段启动或提供。在一些实施方案中，CD28介导的信号可以由抗原呈递饲养细胞(APC)(如外周血单个核细胞(PBMC))提供。

[0215] 在一些实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂可以包括向T细胞群体添加饲养细胞，如非分裂外周血单个核细胞(PBMC)。在一些方面，非分裂饲养细胞可以包含γ辐照的PBMC饲养细胞。在一些实施方案中，将PBMC用范围为约3000至3600拉德的γ射线辐照，以防止细胞分裂。在一些方面，在添加T细胞群之前将饲养细胞添加至培养基中。在一些实施方案中，对于要扩增的初始群体中的每个T淋巴细胞，所得细胞群体含有至少约5、10、20或40或更多个PBMC饲养细胞。在一些实施方案中，T细胞与PBMC和/或抗原呈递细胞的比率为约1至25、约1至50、约1至100、约1至125、约1至150、约1至175、约1至200、约1至225、约1至250、约1至275、约1至300、约1至325、约1至350、约1至375、约1至400或者约1至500。

[0216] 在一些实施方案中，刺激不包括与PBMC或其他饲养细胞(如非分裂的或辐照的PBMC或其他非分裂或辐照的饲养细胞)一起孵育。

[0217] 在一些实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂可以包括向细胞群体添加抗CD28抗体或其抗原结合片段。抗CD28抗体可以包括针对或可以特异性结合T细胞表面上的CD28受体的任何抗体。抗CD28抗体的非限制性例子包括NA/LE(例如BD Pharmingen)、IM1376(例如Beckman Coulter)或15E8(例如Miltenyi Biotec)。抗CD28抗体可以作为可溶试剂或以与珠结合的形式来添加。在特定实施方案中，抗CD3抗体是可溶的。在一些实施方案中，抗CD28抗体是以范围如下的浓度来添加：在为或约1ng/mL与1000ng/mL之间、在为或约1ng/mL与500ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间或者在为或约500ng/mL与为或约1000ng/mL之间。

[0218] 在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂包括一种或多种重组细胞因子。在一些实施方案中,细胞因子被添加至培养基中或者对于培养基是外源的。因此,在一些实施方案中,在培养期间还包括一种或多种其他重组细胞因子。在一些实施方案中,重组细胞因子可以包括IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25、IL-23、IL-27和/或IL-35中的一种或多种。在一些实施方案中,重组细胞因子可以包括IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25和/或IL-23中的一种或多种。在一些实施方案中,培养和孵育是在重组IL-2、IL-15和IL-7的存在下进行。在一些实施方案中,培养是在IL-2的存在下进行。在一些实施方案中,培养是在IL-15和IL-17的存在下进行,其在一些方面不另外包括IL-2。在特定实施方案中,所述一种或多种重组细胞因子是人细胞因子。

[0219] 重组细胞因子通常是重组人蛋白。在特定实施方案中,重组细胞因子在孵育期间以以下浓度存在于细胞培养基中:至少或至少约0.5IU/mL、至少或至少约1.0IU/mL、至少或至少约5IU/mL、至少或至少约或者为或约10IU/mL、至少或至少约或者为或约100IU/mL、至少或至少约或者为或约1000IU/mL、至少或至少约或者为或约1500IU/mL、至少或至少约或者为或约2000IU/mL、至少或至少约或者为或约2500IU/mL、至少或至少约或者为或约3000IU/mL、至少或至少约或者为或约3500IU/mL、至少或至少约或者为或约4000IU/mL、至少或至少约或者为或约4500IU/mL、至少或至少约或者为或约5000IU/mL、至少或至少约或者为或约5500IU/mL、至少或至少约或者为或约6000IU/mL、至少或至少约或者为或约6500IU/mL、至少或至少约或者为或约7000IU/mL、至少或至少约或者为或约7500IU/mL,或者至少或至少约或者为或约8000IU/mL。在一个实施方案中,细胞培养基包含在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间、为或约100IU/mL与为或约1000IU/mL之间、为或约1000与为或约2000IU/mL之间、在为或约2000与为或约3000IU/mL之间、在为或约3000与为或约4000IU/mL之间、在为或约4000与为或约5000IU/mL之间、在为或约5000与为或约6000IU/mL之间、在为或约6000与为或约7000IU/mL之间、在为或约7000与为或约8000IU/mL之间,每个都包含端值。

[0220] 在一些实施方案中,重组IL-2存在于细胞培养基中。在一些方面,IL-2是添加至培养的唯一重组细胞因子。在一些方面,将重组IL-2和来自IL-7、IL-15、IL-21、IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的另一种重组调节细胞因子添加至培养。IL-2是支持T细胞回收和增殖的细胞因子。IL-2还支持T细胞的稳态,从而支持其表型、分化状态和免疫记忆。在一些情形中,在肿瘤微环境中诱导调节T细胞可能导致IL-2的低生物利用度。重组IL-2已经经常在多种背景下用于T细胞的广泛扩增。重组IL-2是市售的。在特定实施方案中,重组IL-2是GMP级的(例如MACS GMP重组人IL-2,Miltenyi Biotec)。

[0221] 在所提供的过程的各个阶段期间可以在细胞培养基中包括重组IL-2。在一些情形中,可以在初始T细胞扩增(第一扩增)中包括重组IL-2,如以促进TIL长出并允许其从实体瘤增殖。还可以如章节I.B.2中所述在抗原呈递细胞共培养中包括IL-2,例如以允许在新生抗原反应性T的分离或选择之前对其进行峰值激活。在一些情形中,还可以在第二扩增期期间在扩增肿瘤反应性T细胞的培养中包括重组IL-2,如章节I.D中所述。

[0222] 在一些实施方案中,重组IL-2是以以下浓度被添加至培养基:在为或约10IU/mL与为或约1000IU/mL之间,如在为或约10IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约

100IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约600IU/mL之间或者在为或约600IU/mL与为或约1000IU/mL之间。在一些实施方案中，重组IL-2是以在50与400IU/mL之间的量存在。

[0223] 在一些实施方案中，初始扩增是在以在200IU/mL与为或约1000IU/mL之间的浓度添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，重组IL-2是以以下浓度被添加至培养基：为或约200IU/mL、为或约300IU/mL、为或约400IU/mL、为或约500IU/mL、为或约600IU/mL、为或约700IU/mL、为或约800IU/mL、为或约900IU/mL、为或约1000IU/mL，或者前述任一项之间的任何浓度。在一些实施方案中，重组IL-2是以为或约300IU/mL的浓度被添加至培养基。在一些实施方案中，重组IL-2是以为或约600IU/mL的浓度被添加至培养基。在一些实施方案中，重组IL-2是以为或约1000IU/mL的浓度被添加至培养基。在一些实施方案中，将来自IL-7、IL-15、IL-21、IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基。

[0224] 在一些实施方案中，孵育是用更高剂量IL-2来进行。在一些方面，IL-2是添加至培养的唯一重组细胞因子。

[0225] 在一些实施方案中，重组IL-2是以以下浓度被添加至培养基：在为或约1000IU/mL与为或约8000IU/mL之间，如在为或约1000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、2000IU/mL为或约8000IU/mL、在为或约2000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、4000IU/mL为或约8000IU/mL、在为或约4000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约4000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约4000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约5000IU/mL与为或约8000IU/mL之间、在为或约5000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约5000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约6000IU/mL与为或约8000IU/mL之间、在为或约6000IU/mL与为或约7000IU/mL之间或者在为或约7000IU/mL与为或约8000IU/mL之间。在一些实施方案中，重组IL-2是以为或为约6000IU/mL的量存在。

[0226] 在一些实施方案中，重组IL-15存在于细胞培养基中。IL-15是参与记忆T细胞稳态和激活的细胞因子。在一些情形中，IL-15可以在不存在抗原的情况下促进经历过抗原的T细胞的效应子功能，并且防止它们分化为耗竭的表型。IL-15在T细胞增殖中也起作用。重组IL-15是市售的。在特定实施方案中，重组IL-15是GMP级(例如MACS GMP重组人IL-15，Miltenyi Biotec)。

[0227] 在所提供的过程的各个阶段期间可以在细胞培养基中包括重组IL-15。在一些情

形中，可以在初始T细胞扩增(第一扩增)中包括重组IL-15，如以促进TIL扩增，以促进其长出并允许其增殖和/或稳定来自实体瘤的表型。还可以如章节I.B.2中所述在抗原呈递细胞共培养中包括重组IL-15，例如以允许在新生抗原反应性T的分离或选择之前对其进行峰值激活。在一些情形中，还可以在第二扩增期期间在扩增肿瘤反应性T细胞的培养中包括重组IL-15，如章节I.D中所述。在一些情形中，可以在所提供的方法中将重组IL-15与重组IL-7组合以提供肿瘤反应性T细胞的激活、存活和/或扩增。在一些这样的实施方案中，重组IL-7和IL-15的组合是在培养中使用重组IL-2的替代方案，并且培养基不另外含有重组IL-2。

[0228] 在一些实施方案中，重组IL-15是以以下浓度被添加至培养基：在为或约10IU/mL与500IU/mL之间，如在为或约10IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约70IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约30IU/mL之间、在为或约30IU/mL与500IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约70IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约70IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约300IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间或者在为或约400IU/mL与为或约500IU/mL之间。在一些实施方案中，将IL-15以在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间的量添加至培养基。在一些实施方案中，将IL-15以为或约180IU/mL添加至培养基。

[0229] 在一些实施方案中，孵育是用更高剂量IL-15来进行。

[0230] 在一些实施方案中，重组IL-15是以以下浓度被添加至培养基：在为或约500IU/mL与为或约5000IU/mL之间，如在为或约500IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约750IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约5000IU/mL之间，如在为或约2000IU/mL与为或约4000IU/mL之间或

者在为或约4000IU/mL与为或约5000IU/mL之间。在一些实施方案中，重组IL-15是以以下浓度被添加至细胞培养基：为或约500IU/mL、为或约600IU/mL、为或约700IU/mL、为或约800IU/mL、为或约900IU/mL、为或约1000IU/mL、为或约1100IU/mL、为或约1200IU/mL、为或约1300IU/mL、为或约1400IU/mL、为或约1500IU/mL、为或约1600IU/mL、为或约1700IU/mL、为或约1800IU/mL、为或约1900IU/mL或者为或约2000IU/mL，或者前述任一项之间的任何浓度。在一些实施方案中，IL-15是以为或约1000IU/mL的浓度被添加至培养基。

[0231] 在一些实施方案中，初始扩增(例如第一扩增)是在以500IU/mL至2000IU/mL(例如为或约1000IU/mL)的浓度添加的重组IL-15的存在下进行。在一些实施方案中，初始扩增(例如第一扩增)是在以为或约1000IU/mL的浓度添加的重组IL-15的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-2、IL-7、IL-21、IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基。

[0232] 在一些实施方案中，将重组IL-15和IL-2添加至培养基。在一些实施方案中，重组IL-15是以500IU/mL至2000IU/mL(例如为或约1000IU/mL)的浓度添加，并且重组IL-2是以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加。在一些实施方案中，初始扩增(例如第一扩增)是在以1000IU/mL添加的重组IL-15和以300IU/mL添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-7、IL-21、IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基。

[0233] 在一些实施方案中，将重组IL-7添加至培养基。在一些方面，将重组IL-7与IL-2或IL-15中的一种或两种一起添加至培养基。在一些方面，将重组IL-7和重组IL-2添加至培养基。在一些方面，将重组IL-7和重组IL-15添加至培养基。在一些方面，将重组IL-7(例如与IL-2和IL-15中的一种或两种组合)和来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的另一种重组调节细胞因子添加至培养基。IL-7是参与促进T细胞维持和稳态的细胞因子。在一些情形中，IL-7可以加强记忆T细胞存活和增殖，特别是中枢记忆区室。重组IL-7是市售的。在特定实施方案中，重组IL-7是GMP级(例如MACS GMP重组人IL-7，Miltenyi Biotec)。

[0234] 在所提供的过程的各个阶段期间可以在细胞培养基中包括重组IL-7。在一些情形中，可以在初始T细胞扩增(第一扩增)中包括重组IL-7，如以促进TIL扩增，以促进其长出并允许其增殖和/或稳定来自实体瘤的表型。还可以如章节I.B.2中所述在抗原呈递细胞共培养中包括IL-7，例如以允许在新生抗原反应性T的分离或选择之前对其进行峰值激活。在一些情形中，还可以在第二扩增期期间在扩增肿瘤反应性T细胞的培养中包括重组IL-7，如章节I.D中所述。在过程中包括重组IL-7可以维持或支持所述过程中记忆T细胞子集的扩增。在一些情形中，可以在所提供的方法中将重组IL-7与重组IL-15组合以提供肿瘤反应性T细胞的激活、存活和/或扩增。在一些这样的实施方案中，重组IL-7和IL-15的组合是在培养中使用重组IL-2的替代方案，并且培养基不另外含有重组IL-2。

[0235] 在一些实施方案中，重组IL-7是以以下浓度被添加至培养基：在为或约100IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或

约800IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约800IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约800IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约800IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约2000IU/mL之间。在一些实施方案中，将IL-7以在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间的量添加至培养基。在一些实施方案中，将IL-7以为或约600IU/mL添加至培养基。在一些实施方案中，将IL-7以为或约1000IU/mL添加至培养基。

[0236] 在一些实施方案中，将重组IL-7和IL-2添加至培养基。在一些实施方案中，重组IL-7是以400IU/mL至2000IU/mL(例如为或约600IU/mL或1000IU/mL)的浓度添加，并且重组IL-2是以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加。在一些实施方案中，初始扩增(例如第一扩增)是在以1000IU/mL添加的重组IL-7和以300IU/mL添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，第一次扩增在以600IU/mL添加的重组IL-7和以300IU/mL添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-15、IL-21、IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基。

[0237] 在一些实施方案中，将重组IL-15和IL-7添加至培养基。在一些实施方案中，重组IL-15是以500IU/mL至2000IU/mL(例如为或约1000IU/mL)的浓度添加，并且重组IL-7是以400IU/mL至2000IU/mL(例如为或约600IU/mL或1000IU/mL)的浓度添加。在一些实施方案中，初始扩增(例如第一扩增)是在以1000IU/mL添加的重组IL-15和以1000IU/mL添加的重组IL-7的存在下进行。在一些实施方案中，第一次扩增在以1000IU/mL添加的重组IL-15和以600IU/mL添加的重组IL-7的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-2、IL-21、IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基。

[0238] 在一些实施方案中，将重组IL-21添加至培养基。在一些方面，将重组IL-21与IL-2、IL-7或IL-15中的一种或两种一起添加至培养基。在一些方面，将重组IL-21和重组IL-2添加至培养基。在一些方面，将重组IL-21和重组IL-15添加至培养基。在一些方面，将重组IL-21(例如与一种或多种IL-2、IL-7和IL-15组合)和来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的另一种重组调节细胞因子添加至培养基。IL-21是在不增加调节T细胞信号传导的情况下支持宽范围的T细胞激活的细胞因子。在一些情形中，IL-21可以支持记忆细胞稳定、效应子功能以及经历过抗原的T细胞的增殖。IL-21可以诱导CD4和CD8 T细胞二者中效应分子的上调。重组IL-21是市售的。在特定实施方案中，重组IL-21是GMP级(例如MACS GMP重组人IL-21，Miltenyi Biotec)。

[0239] 在所提供的过程的各个阶段期间可以在细胞培养基中包括重组IL-21。在一些情形中，在初始T细胞扩增(第一扩增)中可以包括重组IL-21，如以促进来自实体瘤的TIL长出，包括通过稳定记忆T细胞激活、功能和/或增殖。在一些方面，IL-21的存在允许改进TIL的回收。还可以如章节I.B.2中所述在抗原呈递细胞共培养中包括重组IL-21，如由于刺激T

细胞激活标记的表达(包括新生抗原反应性TIL上的激活标记的表达)的能力所致。在一些情形中,还可以在第二扩增期期间在扩增肿瘤反应性T细胞的培养中包括重组IL-21,如章节I.D中所述,例如以支持记忆表型的增殖和稳定。

[0240] 在一些实施方案中,重组IL-21是以以下浓度被添加至培养基:在为或约0.5IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约5IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约2.5IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约1IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约5IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约2.5IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约5IU/mL之间、在为或约5IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约5IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约5IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约15IU/mL之间或者在为或约15IU/mL与为或约20IU/mL之间。在一些实施方案中,将IL-21以在为或约0.5IU/mL与为或约2.5IU/mL之间的量添加至培养基。在一些实施方案中,将IL-21以为或约1IU/mL添加至培养基。

[0241] 在一些实施方案中,孵育是用更高剂量IL-21来进行。

[0242] 在一些实施方案中,重组IL-21是以以下浓度被添加至培养基:在为或约500IU/mL与为或约5000IU/mL之间,如在为或约500IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约750IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约5000IU/mL之间,如在为或约2000IU/mL与为或约4000IU/mL之间或者在为或约4000IU/mL与为或约5000IU/mL之间。在一些实施方案中,重组IL-21是以以下浓度被添加至细胞培养基:为或约500IU/mL、为或约600IU/mL、为或约700IU/mL、为或约800IU/mL、为或约900IU/mL、为或约1000IU/mL、为或约1100IU/mL、为或约1200IU/mL、为或约1300IU/mL、为或约1400IU/mL、为或约1500IU/mL、为或约1600IU/mL、为或约1700IU/mL、为或约1800IU/mL、为或约1900IU/mL或者为或约2000IU/mL,或者前述任一项之间的任何浓度。在一些实施方案中,IL-21是以为或约1000IU/mL的浓度被添加至培养基。

[0243] 在一些实施方案中,将重组IL-21和IL-2添加至培养基。在一些实施方案中,重组IL-21是以500IU/mL至2000IU/mL(例如为或约1000IU/mL)的浓度添加,并且重组IL-2是以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加。在一些实施方案中,初始扩增(例如第一扩增)是在以1000IU/mL添加的重组IL-21和以300IU/mL添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中,将来自IL-7、IL-15、IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其

他重组调节细胞因子添加至培养基。

[0244] 在一些实施方案中，重组IL-23存在于细胞培养基中。IL-23是一种经由IL-23受体发信号的细胞因子，所述IL-23受体通常在激活的记忆T细胞上上调。IL-23结合导致JAK/STAT途径(即JAK2和STAT3)的激活。JAK信号传导导致NF-kB p50/p65的激活，所述NF-kB p50/p65结合IL17启动子并上调其表达。STAT3激活导致IL-17启动子以及RORγT的直接结合。在一些方面，此双重机制导致有效且持续的IL-17产生，以维持Th17细胞子集。IL-23在炎症性T细胞反应中起作用，并且是许多自身免疫性疾病治疗干预的靶标。在一些方面，IL-23作为已知作用于记忆T细胞的促炎细胞因子的活性可以用于激活和扩增经历过抗原的T细胞。

[0245] IL-23含有两个通过二硫键连接的亚基，即P19(IL23a)亚基和P40(IL12b)亚基。人IL-23的示例性序列如下所示：

P19(UniProt Q9NPF7 20-189;SEQ ID NO:1)

RAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLAWSAHPLVGHMDLREEGDEETTNDVPHIQCGDGCDPQGLRDNSQFCLQRIHQGLIFYEKLLGSDIFTGEPSLLPDSPVGQLHASLLGLSQLLQPEGHHWETQQIPSLSPSQPWQRLLLRFKILRSLQAFVAVAARVFAHGAATLSP

P40(UniProt P29460 23-328;SEQ ID NO:2)

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

[0246] 在一些实施方案中，重组IL-23是异二聚体，其含有具有与SEQ ID NO:1中所示序列的至少或至少约85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性以及与SEQ ID NO:2中所示序列的至少或至少约85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的氨基酸序列，其中所述异二聚体的两个亚基通过二硫键连接，并且所述序列展现重组IL-23的活性，如结合经由IL-23受体并介导经由IL-23受体的信号传导的能力。在一些实施方案中，重组IL-23具有通过二硫键连接的SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2中所示的序列。SEQ ID NO的示例不应解释为限制性的。例如，重组IL-23的特定序列或其单独亚基可以在N末端或C末端中的一个或两个处比相应SEQ ID NO:1和/或2所示的氨基酸序列长或短几个氨基酸，长或短如1-10个，例如1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。在一些实施方案中，重组IL-23是人序列。在特定实施方案中，IL-23是GMP级试剂。

[0247] 在所提供的过程的各个阶段期间可以在细胞培养基中包括重组IL-23。在一些情形中，可以在初始T细胞扩增(第一扩增)中包括重组IL-23，如在实体瘤培养或者已知或预期含有肿瘤反应性T细胞或TIL的其他样品中，以促进经历过抗原的T细胞的优先激活和回收，从而导致从大量T细胞分离的新生抗原反应性细胞的频率增加。在一些情形中，还可以在第二扩增期期间在扩增选择的肿瘤反应性T细胞的培养中包括重组IL-23，如章节I.D中所述，这可以在扩增过程期间加强它们的持续活性和增殖。

[0248] 在一些实施方案中，重组IL-23是以以下浓度被添加至培养基：在为或约1nM与为

或约500nM之间，如在为或约1nM与为或约400nM之间、在为或约1nM与为或约300nM之间、在为或约1nM与为或约200nM之间、在为或约1nM与为或约100nM之间、在为或约1nM与为或约50nM之间、在为或约1nM与为或约25nM之间、在为或约1nM与为或约10nM之间、在为或约1nM与为或约5nM之间、在为或约5nM与为或约500nM之间、在为或约5nM与为或约400nM之间、在为或约5nM与为或约300nM之间、在为或约5nM与为或约200nM之间、在为或约5nM与为或约100nM之间、在为或约5nM与为或约50nM之间、在为或约5nM与为或约25nM之间、在为或约5nM与为或约10nM之间、在为或约10nM与为或约500nM之间、在为或约10nM与为或约400nM之间、在为或约10nM与为或约300nM之间、在为或约10nM与为或约200nM之间、在为或约10nM与为或约100nM之间、在为或约10nM与为或约50nM之间、在为或约10nM与为或约25nM之间、在为或约25nM与为或约500nM之间、在为或约25nM与为或约400nM之间、在为或约25nM与为或约300nM之间、在为或约25nM与为或约200nM之间、在为或约25nM与为或约100nM之间、在为或约25nM与为或约50nM之间、在为或约50nM与为或约500nM之间、在为或约50nM与为或约400nM之间、在为或约50nM与为或约300nM之间、在为或约50nM与为或约200nM之间、在为或约50nM与为或约100nM之间、在为或约100nM与为或约500nM之间、在为或约100nM与为或约400nM之间、在为或约100nM与为或约300nM之间、在为或约100nM与为或约200nM之间、在为或约200nM与为或约500nM之间、在为或约200nM与为或约400nM之间、在为或约200nM与为或约300nM之间、在为或约300nM与为或约500nM之间、在为或约300nM与为或约400nM之间或者在为或约400nM与为或约500nM之间。在一些实施方案中，重组IL-23是以以下浓度被添加至培养基：为或约5nM、为或约10nM、为或约20nM、为或约30nM、为或约40nM、为或约50nM、为或约60nM、为或约70nM、为或约80nM、为或约90nM或者为或约100nM，或者前述任一项之间的任何值。

[0249] 在一些实施方案中，重组IL-23是以在为或约0.1ng/mL与为或约2000ng/mL之间的浓度被添加至培养基。在一些实施方案中，重组IL-23是以以下浓度被添加至培养基：在为或约0.1ng/mL与为或约1000ng/mL之间，如在为或约0.1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约500ng/mL之间或者在为或约500ng/mL与为或约1000ng/mL之间。

[0250] 在一些实施方案中，重组IL-23是以以下浓度被添加至培养基：为或约1ng/mL、为或约5ng/mL、为或约10ng/mL、为或约20ng/mL、为或约30ng/mL、为或约40ng/mL、为或约

50ng/mL、为或约60ng/mL、为或约70ng/mL、为或约80ng/mL、为或约90ng/mL或者为或约100ng/mL，或者前述任一项之间的任何值。

[0251] 在一些实施方案中，重组IL-23是以以下浓度被添加至培养基：为或约200ng/mL、为或约300ng/mL、为或约400ng/mL、为或约500ng/mL、为或约600ng/mL、为或约700ng/mL、为或约800ng/mL、为或约900ng/mL、为或约1000ng/mL、为或约1200ng/mL、为或约1400ng/mL或者为或约1600ng/mL、为或约1800ng/mL或者为或约2000ng/mL，或者前述任一项之间的任何值。

[0252] 在一些实施方案中，将重组IL-2和重组IL-23添加至培养基。在一些实施方案中，重组IL-2是以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加，并且重组IL-23是以100ng/mL至2000ng/mL(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加。在一些实施方案中，初始扩增是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以在100ng/mL与2000ng/mL之间(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加的重组IL-23的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-7、IL-21、IL-15、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基。

[0253] 在一些实施方案中，重组IL-25存在于细胞培养基中。IL-25属于IL-17家族，并且也称为IL-17E。IL-25结合由两个亚基IL-17RA和IL-17RB构成的异二聚受体。IL-25是一种炎性细胞因子，其通常支持Th2细胞发育。已经显示IL-25可减少IFN_{γ}产生，并且使免疫应答偏离Th1/Th17反应。还已经显示IL-25刺激NFkB活性，这可以广泛地激活细胞。

[0254] 人IL-25的示例性序列如下所示：

(UniProt Q9H293 33-177;SEQ ID NO:3)

YSHWPSCCPSKGQDTSEELLRWSTVPVPPLEPARPNRHPESCRASEDGPLNSRAISPWRYELDRDLNRLPQDLYHARCLCPHCVSLQTGSHMDPRGNSELLYHNQTVFYRRPCHGEKGTHKGYCLERRLYRVSLACVCVRPRVMG

[0255] 在一些实施方案中，重组IL-25具有与SEQ ID NO:3中所示序列具有至少或至少约85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的氨基酸序列，其中所述序列展现重组IL-25的活性，如与其异二聚受体的亚基结合并介导经由IL-25(IL-17RA/IL-17RB)受体的信号传导的能力。在一些实施方案中，重组IL-25具有SEQ ID NO:3中所示的序列。SEQ ID NO的示例不应解释为限制性的。例如，重组IL-25的特定序列或其单独亚基可以在N末端或C末端中的一个或两个处比相应SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列长或短几个氨基酸，长或短如1-10个，例如1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。在一些实施方案中，重组IL-25是人序列。在特定实施方案中，IL-25是GMP级试剂。

[0256] 在一些实施方案中，重组IL-25是以在为或约0.001nM与为或约10nM之间的浓度被添加至培养基，如以下浓度：在为或约0.001nM与为或约5nM之间、在为或约0.001nM与为或约2.5nM之间、在为或约0.001nM与为或约1nM之间、在为或约0.001nM与为或约0.5nM之间、在为或约0.001nM与为或约0.1nM之间、在为或约0.001nM与为或约0.05nM之间、在为或约0.001nM与为或约0.01nM之间、在为或约0.001nM与为或约0.005nM之间、在为或约0.005nM与为或约10nM之间、在为或约0.005nM与为或约5nM之间、在为或约0.005nM与为或约2.5nM之间、在为或约0.005nM与为或约1nM之间、在为或约0.005nM与为或约0.5nM之间、在为或约

0.005nM与为或约0.1nM之间、在为或约0.005nM与为或约0.05nM之间、在为或约0.005nM与为或约0.01nM之间、在为或约0.01nM与为或约10nM之间、在为或约0.01nM与为或约5nM之间、在为或约0.01nM与为或约2.5nM之间、在为或约0.01nM与为或约1nM之间、在为或约0.01nM与为或约0.5nM之间、在为或约0.01nM与为或约0.1nM之间、在为或约0.01nM与为或约0.05nM之间、在为或约0.05nM与为或约10nM之间、在为或约0.05nM与为或约5nM之间、在为或约0.05nM与为或约2.5nM之间、在为或约0.05nM与为或约1nM之间、在为或约0.05nM与为或约0.5nM之间、在为或约0.05nM与为或约0.1nM之间、在为或约0.1nM与为或约10nM之间、在为或约0.1nM与为或约5nM之间、在为或约0.1nM与为或约2.5nM之间、在为或约0.1nM与为或约1nM之间、在为或约0.1nM与为或约0.5nM之间、在为或约0.5nM与为或约10nM之间、在为或约0.5nM与为或约5nM之间、在为或约0.5nM与为或约2.5nM之间、在为或约0.5nM与为或约1nM之间、在为或约1nM与为或约10nM之间、在为或约1nM与为或约5nM之间、在为或约1nM与为或约2.5nM之间、在为或约2.5nM与为或约10nM之间、在为或约2.5nM与为或约5nM之间或者在为或约5nM与为或约10nM之间。在一些实施方案中，重组IL-25是以以下浓度被添加至培养基：为或约0.01nM、0.02nM、0.03nM、0.04nM、0.05nM、0.06nM、0.07nM、0.08nM、0.09nM或1nM、1.5nM或2nM，或者前述任一项之间的任何值。

[0257] 在一些实施方案中，重组IL-25是以以下浓度被添加至培养基：在为或约0.01ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约20ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约5ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约0.05ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约20ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约5ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约20ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约5ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约20ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约20ng/mL之间、在为或约20ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约20ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约20ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约20ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约250ng/mL之间或者在为或约250ng/mL与为或约500ng/mL之间。在一些实施方案中，重组IL-25是以以下浓度被添加至培养基：为或约1ng/mL、为或约2ng/mL、为或约3ng/mL、为或约4ng/mL、为或约5ng/mL、为或约6ng/mL、为或约7ng/mL、为或

约8ng/mL、为或约9ng/mL、为或约10ng/mL、为或约15ng/mL或者为或约20ng/mL，或者前述任一项之间的任何值。

[0258] 在所提供的过程的各个阶段期间可以在细胞培养基中包括重组IL-25。在一些情形中，可以在初始T细胞扩增(第一扩增)中包括重组IL-25，如在从实体组织分离和扩增TIL期间，以支持Th2 CD4 T细胞的保存和扩增。在一些情形中，可以在第二扩增期期间在扩增选择的肿瘤反应性T细胞的培养中包括重组IL-25，如章节I.D中所述。例如，可以在TIL扩增期间在第9天-第16天培养基中包括IL-25以促进CD4/CD8平衡和/或维持T细胞激活率。IL-25的使用可以有助于驱动T细胞增殖以及促进NFkB活性并增强T细胞扩增和激活。

[0259] 在一些实施方案中，重组IL-25是以以下浓度被添加至培养基：在为或约0.1ng/mL与为或约2000ng/mL之间，如在为或约0.1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约500ng/mL之间或者在为或约500ng/mL与为或约1000ng/mL之间。

[0260] 在一些实施方案中，重组IL-25是以以下浓度被添加至培养基：为或约1ng/mL、为或约5ng/mL、为或约10ng/mL、为或约20ng/mL、为或约30ng/mL、为或约40ng/mL、为或约50ng/mL、为或约60ng/mL、为或约70ng/mL、为或约80ng/mL、为或约90ng/mL或者为或约100ng/mL，或者前述任一项之间的任何值。

[0261] 在一些实施方案中，重组IL-25是以以下浓度被添加至培养基：为或约200ng/mL、为或约300ng/mL、为或约400ng/mL、为或约500ng/mL、为或约600ng/mL、为或约700ng/mL、为或约800ng/mL、为或约900ng/mL、为或约1000ng/mL、为或约1200ng/mL、为或约1400ng/mL或者为或约1600ng/mL、为或约1800ng/mL或者为或约2000ng/mL，或者前述任一项之间的任何值。

[0262] 在一些实施方案中，将重组IL-2和重组IL-25添加至培养基。在一些实施方案中，重组IL-2是以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加，并且重组IL-25是以100ng/mL至2000ng/mL(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加。在一些实施方案中，初始扩增是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以在100ng/mL与2000ng/mL之间(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加的重组IL-25的存在下进行。在一些实施方案

中，将来自IL-7、IL-21、IL-15、IL-23、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基。

[0263] 在一些实施方案中，重组IL-27存在于细胞培养基中。IL-27是一种细胞因子，其经由IL-27受体发信号，从而启动包括JAK-STAT和p38 MAPK在内的信号途径的激活。在一些情形中，IL-27可以诱导或抑制Treg以及在一些情形中其他T细胞子集，如TH1细胞。IL-27可以调节Treg应答，并且将效应T细胞编程为干细胞样记忆效应细胞，这可以增强T细胞在肿瘤微环境中的存活。

[0264] IL-27是2条链IL27A(IL27p28)和IL27B(EBI3)的异二聚体。人IL-27的示例性序列如下所示：

P28：

FPRPPGRPQL SLQELRREFT VSLHLARKLL SEVRGQAHRF AESHLPGVNL YLLPLGEQLP DVSLTFQAWR RLSDPERLCF ISTTLQPFHA LLGGLGTQGR WTNMERMQLW AMRLDLRDLQ RHLRFQVLAA GFNLPEEEEE EEEEEEEERK GLLPGALGSA LQGPAQVSWP QLLSTYRLLH SLELVLSRAV RELLLLSKAG HSVWPLGFPT LSPQP(SEQ ID NO:4)

EB13

RKGPP AALTLPRVQC RASRYPIAVD CSWTLPPAPN STSPVSFIAT YRLGMAARGH SWPCLQQTPT STSCTITDVQ LFSMAPYVLN VTAVHPWGSS SSFVPFITEH IIKPDPPEGV RLSPLAERQL QVQWEPPGSW PFPEIFSLKY WIRYKRQGAA RFHRVGPIEA TSFILRAVRP RARYYVQVAA QDLTDYGELS DWSLPATATM SLGK(SEQ ID NO:5)

[0265] 在一些实施方案中，重组IL-27是异二聚体，其含有具有与SEQ ID NO:4中所示序列的至少或至少约85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性以及与SEQ ID NO:5中所示序列的至少或至少约85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的氨基酸序列，其中所述异二聚体展现重组IL-27的活性，如结合IL-27受体并介导经由IL-27受体的信号传导的能力。在一些实施方案中，重组IL-27具有作为异二聚体连接的SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5中所示的序列。SEQ ID NO的示例不应解释为限制性的。例如，重组IL-27的特定序列或其单独亚基可以在N末端或C末端中的一个或两个处比相应SEQ ID NO:4和/或5所示的氨基酸序列长或短几个氨基酸，长或短如1-10个，例如1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。在一些实施方案中，重组IL-27是人序列。在特定实施方案中，IL-27是GMP级试剂。

[0266] 在所提供的过程的各个阶段期间可以在细胞培养基中包括重组IL-27。在一些情形中，可以在初始T细胞扩增(第一扩增)中包括重组IL-27，如在实体瘤培养或者已知或预期含有肿瘤反应性T细胞或TIL的其他样品中，以促进经历过抗原的T细胞的优先激活和回收，从而导致从大量T细胞分离的新生抗原反应性细胞的频率增加。在一些情形中，还可以在最终扩增(例如第二扩增)期期间在扩增选择的肿瘤反应性T细胞的培养中包括重组IL-27，如章节I.D中所述，这可以在扩增过程期间加强它们的持续活性和增殖。

[0267] 在一些实施方案中，重组IL-27是以以下浓度被添加至培养基：在为或约0.1ng/mL与为或约2000ng/mL之间，如在为或约0.1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL

与为或约100ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约500ng/mL之间或者在为或约500ng/mL与为或约1000ng/mL之间。在一些实施方案中，所述浓度是在400ng/mL与500ng/mL之间。

[0268] 在一些实施方案中，重组IL-27是以以下浓度被添加至培养基：为或约200ng/mL、为或约300ng/mL、为或约400ng/mL、为或约500ng/mL、为或约600ng/mL、为或约700ng/mL、为或约800ng/mL、为或约900ng/mL、为或约1000ng/mL、为或约1200ng/mL、为或约1400ng/mL或者为或约1600ng/mL、为或约1800ng/mL或者为或约2000ng/mL，或者前述任一项之间的任何值。

[0269] 在一些实施方案中，将重组IL-2和重组IL-27添加至培养基。在一些实施方案中，重组IL-2是以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加，并且重组IL-27是以100ng/mL至2000ng/mL(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加。在一些实施方案中，初始扩增是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以在100ng/mL与2000ng/mL之间(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加的重组IL-27的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-7、IL-21、IL-15、IL-23、IL-25或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基。

[0270] 在一些实施方案中，重组IL-35存在于细胞培养基中。IL-35是一种细胞因子，其在一些情形中可以抑制炎症反应。IL-35还对不同的T细胞子集具有选择性活性。在T细胞中，IL-35结合gp130和IL-12Rβ2，以经由gp130/IL-12Rβ2异二聚体或每个亚基的同二聚体发信号。IL-35与受体的接合引发STAT激活和信号传导，如经由JAK-STAT介导的途径。

[0271] IL-35是一种异二聚蛋白，其含有来自IL-12的p35亚基(IL-12α)和来自IL-27的β亚基(EBI3)。

P35

RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNAS(SEQ ID NO:6)

EB13

RKGPP AALTLPRVQC RASRYPIAVD CSWTLPPAPN STSPVSFIAT YRLGMAARGH SWPCLQQTPT STSCTITDVQ LFSMAPYVLN VTAVHPWGSS SSFVPFITEH IIKPDPPEGV RLSPLAERQL QVQWEPPGSW PFPEIFSLKY WIRYKRQGAA RFHRVGPIEA TSFILRAVRP RARYYVQVAA QDLTDYGELS DWSLPATATM SLGK(SEQ ID NO:5)

[0272] 在一些实施方案中，重组IL-35是异二聚体，其含有具有与SEQ ID NO:6中所示序列的至少或至少约85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性以及与SEQ ID NO:5中所示序列的至少或至少约85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的氨基酸序列，其中所述异二聚体展现重组IL-35的活性，如结合IL-35受体(例如gp130和IL-12Rβ2亚基)并介导经由IL-35受体的信号传导的能力。在一些实施方案中，重组IL-35具有作为异二聚体连接的SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:5中所示的序列。SEQ ID NO的示例不应解释为限制性的。例如，重组IL-35的特定序列或其单独亚基可以在N末端或C末端中的一个或两个处比相应SEQ ID NO:4和/或5所示的氨基酸序列长或短几个氨基酸，长或短如1-10个，例如1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。在一些实施方案中，重组IL-35是人序列。在特定实施方案中，IL-35是GMP级试剂。

[0273] 在所提供的过程的各个阶段期间可以在细胞培养基中包括重组IL-35。在一些情形中，可以在初始T细胞扩增(第一扩增)中包括重组IL-35，如在实体瘤培养或者已知或预期含有肿瘤反应性T细胞或TIL的其他样品中，以促进经历过抗原的T细胞的优先激活和回收，从而导致从大量T细胞分离的新生抗原反应性细胞的频率增加。在一些情形中，还可以在在最终扩增(例如第二扩增)期期间在扩增选择的肿瘤反应性T细胞的培养中包括重组IL-35，如章节I.D中所述，这可以在扩增过程加强它们的持续活性和增殖。

[0274] 在一些实施方案中，重组IL-35是以以下浓度被添加至培养基：在为或约0.1ng/mL与为或约2000ng/mL之间，如在为或约0.1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约500ng/mL之间或者在为或约500ng/mL与为或约1000ng/mL之间。在一些实施方案中，所述浓度是在400ng/mL与500ng/mL之间。

[0275] 在一些实施方案中，重组IL-35是以以下浓度被添加至培养基：为或约200ng/mL、为或约300ng/mL、为或约400ng/mL、为或约500ng/mL、为或约600ng/mL、为或约700ng/mL、为

或约800ng/mL、为或约900ng/mL、为或约1000ng/mL、为或约1200ng/mL、为或约1400ng/mL或者为或约1600ng/mL、为或约1800ng/mL或者为或约2000ng/mL，或者前述任一项之间的任何值。

[0276] 在一些实施方案中，将重组IL-2和重组IL-35添加至培养基。在一些实施方案中，重组IL-2是以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加，并且重组IL-35是以100ng/mL至2000ng/mL(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加。在一些实施方案中，初始扩增是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以在100ng/mL与2000ng/mL之间(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加的重组IL-35的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-7、IL-21、IL-15、IL-23、IL-25或IL-27的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基。

[0277] 在特定实施方案中，在孵育(如用于细胞的扩增)期间存在的一种或多种T细胞刺激剂含有重组IL-2。在一些实施方案中，可以包括一种或多种其他刺激剂，如来自IL-7、IL-15、IL-21、IL-25和/或IL-23的一种或多种其他重组细胞因子或者抗CD3抗体(例如OKT-3)。在抗CD3抗体(例如OKT-3)的一些情形中，一种或多种T细胞刺激剂还可以包括共刺激剂，如由抗原呈递饲养细胞(如PBMC)或者可溶抗CD28抗体所提供。

[0278] 在特定实施方案中，在孵育(如用于细胞的扩增)期间存在的一种或多种T细胞刺激剂含有重组IL-2和抗CD3抗体。

[0279] 在特定实施方案中，在孵育(如用于细胞的扩增)期间存在的一种或多种T细胞刺激剂含有重组IL-2、抗CD3抗体(例如OKT-3)和抗原呈递饲养细胞(如PBMC)。

[0280] 在特定实施方案中，在孵育(如用于细胞的扩增)期间存在的一种或多种T细胞刺激剂含有重组IL-2、抗CD3抗体(例如OKT-3)和抗CD28抗体。在一些实施方案中，抗CD3抗体和/或抗CD28抗体是可溶的。在一些实施方案中，抗CD3抗体和抗CD28抗体中的一种或两种结合至固体表面，如珠(例如，DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T细胞扩增器)。

[0281] 在特定实施方案中，在孵育(如用于细胞的扩增)期间存在的一种或多种T细胞刺激剂含有重组IL-2、重组IL-15、重组IL-7、抗CD3抗体(例如OKT-3)和抗原呈递饲养细胞(如PBMC)。

[0282] 在特定实施方案中，在孵育(如用于细胞的扩增)期间存在的一种或多种T细胞刺激剂含有重组IL-2、重组IL-15、重组IL-7、抗CD3抗体(例如OKT-3)和抗CD28抗体。在一些实施方案中，抗CD3抗体和/或抗CD28抗体是可溶的。在一些实施方案中，抗CD3抗体和抗CD28抗体中的一种或两种结合至固体表面，如珠(例如，DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T细胞扩增器)。

[0283] 在特定实施方案中，在孵育(如用于细胞的扩增)期间存在的一种或多种T细胞刺激剂含有重组IL-15和重组IL-7、抗CD3抗体(例如OKT-3)和抗原呈递饲养细胞(如PBMC)。

[0284] 在特定实施方案中，在孵育(如用于细胞的扩增)期间存在的一种或多种T细胞刺激剂含有重组IL-15和重组IL-7、抗CD3抗体(例如OKT-3)和抗CD28抗体。在一些实施方案中，抗CD3抗体和/或抗CD28抗体是可溶的。在一些实施方案中，抗CD3抗体和抗CD28抗体中的一种或两种结合至固体表面，如珠(例如，DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T细胞扩增

器)。

[0285] 在一些实施方案中,与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育是在用于来自生物样品的T细胞的初始扩增的条件下进行。在一些实施方案中,在约37℃和约5% CO_2下培养细胞。含有一种或多种T细胞刺激剂的培养基可以是无血清培养基。

[0286] 在一些实施方案中,与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育进行为或约1天,如通常为或约2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天,或者前述任一项之间的任何时间范围。在一些实施方案中,与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育进行7至21天,如7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天或21天,或者前述任一项之间的任何值。在一些实施方案中,所述孵育进行7-14天。在一些实施方案中,所述孵育进行7-10天。在一些实施方案中,所述孵育持续为或约7天。在一些实施方案中,所述孵育持续为或约8天。在一些实施方案中,所述孵育持续为或约9天。在一些实施方案中,所述孵育持续为或约10天。

[0287] 在一些实施方案中,与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育是最小扩增,使得其不导致T细胞激活标记(例如PD-1、CD39和/或TIGIT)的下调。例如,在初始扩增中与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育是短期培养,使得标记CD39、PD1和/或TIGIT在分选步骤期间仍然存在,并且细胞尚未下调那些标记。

[0288] 在一些实施方案中,与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育(如用于输入样品中的T细胞的初始扩增)进行为或约1天。在一些实施方案中,与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育(如用于输入样品中的T细胞的初始扩增)进行为或约2天。在一些实施方案中,与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育(如用于输入样品中的T细胞的初始扩增)进行为或约3天。在一些实施方案中,与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育(如用于输入样品中的T细胞的初始扩增)进行为或约4天。在一些实施方案中,与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育(如用于输入样品中的T细胞的初始扩增)进行为或约5天。在一些实施方案中,与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育(如用于输入样品中的T细胞的初始扩增)进行为或约6天。在一些实施方案中,与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育(如用于输入样品中的T细胞的初始扩增)进行为或约7天。

[0289] 孵育(如用于输入样品中的T细胞的初始扩增)可以在GMP条件下进行。在一些实施方案中,孵育是在封闭系统中进行,所述封闭系统在一些方面可以是封闭的自动化系统。在一些实施方案中,含有一种或多种T细胞刺激剂的培养基可以是无血清培养基。在一些实施方案中,孵育是在封闭的自动化系统中用无血清培养基进行。

[0290] 在一些实施方案中,细胞在一种或多种刺激条件下的初始扩增是在适合于细胞扩增的培养器皿中进行。在一些实施方案中,所述培养器皿是透气性培养器皿,如G-Rex系统(例如G-Rex 10、G-Rex 10M、G-Rex 100M/100M-CS或G-Rex 500M/500M-CS)。在一些实施方案中,所述培养器皿是微量板、烧瓶、棒或适合于在封闭系统中扩增细胞的其他培养器皿。在一些实施方案中,扩增可以在生物反应器中进行。在一些实施方案中,初始扩增可以使用细胞扩增系统通过将细胞转移至透气性袋中来进行,如与生物反应器(例如Xuri细胞扩增系统W25(GE Healthcare))结合。在一个实施方案中,细胞扩增系统包括培养器皿,如袋,例如透气性细胞袋,其容积为约50mL、约100mL、约200mL、约300mL、约400mL、约500mL、约600mL、约700mL、约800mL、约900mL、约1L、约2L、约3L、约4L、约5L、约6L、约7L、约8L、约9L和约10L,或者前述任一项之间的任何值。在一些实施方案中,所述过程是自动化的或半自动

化的。用于自动化灌注扩增的合适生物反应器的例子包括但不限于GE Xuri W25、GE Xuri W5、Sartorius BioSTAT RM 20|50、Finesse SmartRocker生物反应器系统和Pall XRS生物反应器系统或Miltenyi Prodigy。在一些方面，扩增培养是在静态条件下进行。在一些实施方案中，扩增培养是在摇摆条件下进行。培养基可以以推注来添加或者可以按灌注时间表来添加。在一些实施方案中，生物反应器将温度维持在为或接近37℃，并且将CO2水平维持在为或接近5％，且将稳定气流维持在为、为约或至少0.01L/min、0.05L/min、0.1L/min、0.2L/min、0.3L/min、0.4L/min、0.5L/min、1.0L/min、1.5L/min或2.0L/min或大于2.0L/min。在某些实施方案中，培养的至少一部分用灌注进行，如速率为290ml/天、580ml/天和/或1160ml/天。

[0291] 在一些实施方案中，将细胞以0.5x10^{6}个细胞/mL至1.5x10^{6}个细胞/mL的密度接种于适当培养器皿(例如透气性袋)中。在一些实施方案中，所述密度是为或约0.5x10^{6}个细胞/mL、0.75x10^{6}个细胞/mL、1x10^{6}个细胞/mL、1.25x10^{6}个细胞/mL或1.5x10^{6}个细胞/mL，或者前述任一项之间的任何值。

[0292] 在一些方面，在灌注启用的自动化封闭扩增系统中扩增细胞。灌注可以将培养基连续添加至细胞中，以确保实现最佳生长速率。

[0293] 扩增方法可以在GMP条件下进行，包括在封闭的自动化系统中且使用无血清培养基。在一些实施方案中，所述方法的任何一个或多个步骤可以在封闭系统中或者在GMP条件下进行。在某些实施方案中，所有过程操作都是在GMP套件中进行。在一些实施方案中，使用封闭系统进行用于制造、生成或产生细胞疗法的方法的一个或多个其他处理步骤。在一些实施方案中，一个或多个或者所有处理步骤(例如，分离、选择和/或富集、处理、培养步骤，包括与细胞扩增结合的孵育)以及配制步骤使用集成式或自容式系统中的系统、装置或设备，和/或以自动化或可编程方式来进行。在一些方面，所述系统或设备包括与所述系统或设备通信的计算机和/或计算机程序，其允许用户对处理、分离、工程化和配制步骤的各个方面进行编程、控制、结果评估和/或调整。

[0294] 在一些实施方案中，在孵育后，可以立即收集刺激的细胞用于随后与APC共培养，如根据下文章节I.B.2中描述的方法。

[0295] 在一些实施方案中，收集并低温冷冻刺激的细胞。在初始扩增期后提供通过冷冻保存进行的中间保持步骤可以用于使时机与新表位鉴定和肽生成(如章节I.B.1中所述)和/或APC的生成(如章节I.B.2中所述)相配合。在一些实施方案中，对于冷冻保存，将刺激的细胞用冷冻保护剂配制为组合物。在一些实施方案中，冷冻保护剂是或包括DMSO和/或甘油。在一些实施方案中，可以将配制用于冷冻保存的组合物储存在低温(如超低温)下，例如，储存温度的范围为-40℃至-150℃，如为或约80℃±6.0℃。

[0296] 在一些实施方案中，将冷冻保存的细胞通过解冻准备用于后续步骤。在一些情况下，可以将细胞在一个或多个洗涤步骤后解冻后立即准备好用于后续与APC和肽一起进行培养。

B.新生抗原鉴定以及T细胞与APC的共培养

[0297] 在所提供的方法的某些实施方案中，所述方法可以包括将肿瘤反应性T细胞的群体与呈递一种或多种新生抗原肽的抗原呈递细胞共培养的步骤，所述新生抗原肽与受试者的肿瘤中相关的非同义体细胞突变相对应。在所提供的方法的这样的另一方面，所述共培

养步骤进一步富集肿瘤反应性T细胞，因为识别源自患者肿瘤的测序数据的新生抗原肽的T细胞可能被激活。用于共培养的方法可以包括用于新表位的鉴定和肽的生成的方法，之后使所述肽与抗原呈递细胞接触以供呈递至已知或怀疑含有肿瘤反应性T细胞的T细胞群体。

[0298] 在一些实施方案中，在共培养步骤后，可以针对激活标记的上调进行选择。在一些情形中，所述选择可以针对对如本文所述的任何上调标记(例如PD-1、CD39和/或TIGIT或其他上调标记)呈阳性的细胞。然后，扩增来自所述培养物的细胞以产生含有扩增的肿瘤特异性反应性细胞群体的治疗性组合物。

[0299] 在其他情形中，在共培养后对细胞的选择可以是用于富集和扩增肿瘤反应性T细胞的过程中的第二选择。例如，在一些实施方案中，对直接从受试者的肿瘤碎片消化(或者在来自其的细胞的初始扩增(例如最小扩增)后)的细胞进行富集或选择(例如基于对PD-1、CD39和/或TIGIT呈阳性的细胞的选择)，并且将选择的T细胞群体与呈递肽表位的抗原呈递细胞共培养。在共培养孵育后，可以针对肿瘤反应性T细胞进一步富集来自共培养的细胞，如通过选择本文所述的任何上调标记或其组合，例如4-1BB(CD137)或OX40(CD134)或4-1BB(CD137)和OX40(CD134)双阳性细胞。然后，扩增来自所述培养物的细胞以产生含有扩增的肿瘤特异性反应性细胞群体的治疗性组合物。

1.新表位鉴定和肽生成

[0300] 在一些方面，所提供的方法包括在电脑中生成或鉴定含有至少一个癌症特有的癌症新表位的多种肽(也称为“P”或“n聚体”)的步骤，以及在电脑中过滤所述肽从而获得新表位序列的子集的另一步骤。在一些实施方案中，使用来自新表位序列子集的序列信息制备至少一种合成肽，然后将合成肽用于根据所提供的方法富集肿瘤反应性T细胞的方法中。

[0301] 在一些实施方案中，所述癌症特有的癌症新表位是通过从来自受试者的癌细胞鉴定或分离肿瘤相关抗原或其肽序列确定的。癌细胞可以从含有或预期含有肿瘤或癌细胞的源自患者的任何身体样品获得。所述身体样品可以是任何组织样品，如血液、从原发性肿瘤或肿瘤转移物获得的组织样品、淋巴结样品或者含有肿瘤或癌细胞的任何其他样品。

[0302] 在一些实施方案中，所述肿瘤是血液肿瘤。血液肿瘤的非限制性例子包括白血病(包括急性白血病(如l lq23阳性急性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓系白血病、急性髓细胞性白血病以及成髓细胞白血病、早幼粒细胞白血病、髓单核细胞白血病、单核细胞白血病和红白血病)、慢性白血病(如慢性粒细胞(myelocytic/granulocytic)白血病、慢性髓细胞性白血病和慢性淋巴细胞白血病))、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤(惰性和高分级形式)、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链疾病、骨髓增生异常综合征、毛细胞白血病和脊髓发育不良。

[0303] 在一些实施方案中，所述肿瘤是实体瘤。实体瘤(如肉瘤和癌)的非限制性例子包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨性肉瘤和其他肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌(包括基底乳腺癌、导管癌和小叶乳腺癌)、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髓样癌、乳头状甲状腺癌、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓样癌、支气管原癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、肾母细胞瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、精原细胞瘤、膀胱癌和CNS肿瘤(如神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤

和视网膜母细胞瘤)。在几个例子中,肿瘤是黑色素瘤、肺癌、淋巴瘤、乳腺癌或结肠癌。

[0304] 在一些实施方案中,癌症是涉及胃肠道(GI道)癌症的胃肠癌,包括上消化道或下消化道或附属消化器官(如食道、胃、胆管系统、胰腺、小肠、大肠、直肠或肛门)的癌症。在一些实施方案中,癌症是食道癌、胃(stomach/gastric)癌、胰腺癌、肝癌(肝细胞癌)、胆囊癌、粘膜相关淋巴组织的癌症(MALT淋巴瘤)、胆管树的癌症、结直肠癌(包括结肠癌、直肠癌或两者)、肛门癌或胃肠类癌瘤。在特定实施方案中,所述癌症是结直肠癌。

[0305] 在一些实施方案中,所述肿瘤来自乳腺癌,如导管癌或小叶癌。在一些实施方案中,所述肿瘤来自前列腺癌。在一些实施方案中,肿瘤来自皮肤癌,如基底细胞癌、鳞状细胞癌、卡波西肉瘤或黑色素瘤。在一些实施方案中,所述肿瘤来自肺癌,如腺癌、支气管肺泡癌、大细胞癌或小细胞癌。在一些实施方案中,所述肿瘤来自脑癌,如胶质母细胞瘤或脑膜瘤。在一些实施方案中,所述肿瘤来自胃肠癌,如上文所述的任何一种。在一些实施方案中,所述肿瘤来自结肠癌。在一些实施方案中,所述肿瘤来自肝癌,如肝细胞癌。在一些实施方案中,所述肿瘤来自胰腺癌。在一些实施方案中,所述肿瘤来自肾癌,如肾细胞癌。在一些实施方案中,所述肿瘤来自睾丸癌。

[0306] 在一些实施方案中,所述癌症不是黑色素瘤。黑色素瘤是一种通常具有高突变率的癌症。高肿瘤突变负荷被认为是与使用靶向肿瘤新生抗原的免疫疗法的治疗相关的特别期望的成功预后标记(Simpson等人,Journal of Clinical Oncology 2017,35:15_增刊,9567-9567;McGranahan等人Science 2016,351:1463-1469)。在一些实施方案中,所提供的方法可以用于具有较低肿瘤突变负荷的癌症中,因为所述方法的进行主动地(如与被动地相反)富集肿瘤反应性T细胞。

[0307] 在一些实施方案中,受试者是具有小于8个突变的肿瘤突变负荷(TMB)的受试者。TMB包括每个肿瘤的非同义突变的数量。在一些实施方案中,可以通过以下方式来计算TMB:计数横跨0.8兆碱基至1.2兆碱基(Mb)区域的同义和非同义突变的数量,并且将结果报告为突变/Mb。在一些实施方案中,可以通过对肿瘤组织样品进行下一代测序(NGS)来确定TMB。在一些情形中,可以使用全外显子组测序,或者可以使用计算机种系状态过滤(Chalmers等人Genome Med 2017 9:34)。在一些实施方案中,受试者的TMB是小于为或约60个突变/Mb,如小于为或约55个突变/Mb、小于为或约50个突变/Mb、小于为或约45个突变/Mb、小于为或约40个突变/Mb、小于为或约30个突变/Mb、小于为或约25个突变/Mb或者小于为或约20个突变/Mb,或者前述任一项之间的任何值。在一些实施方案中,受试者的TMB是小于为或约41个突变/Mb、小于为或约40个突变/Mb、小于为或约39个突变/Mb、小于为或约38个突变/Mb、小于为或约37个突变/Mb或者更小。

[0308] 在一些实施方案中,肽(P)是源自癌前病症的肿瘤相关抗原,所述癌前病症如原位癌变体、或外阴上皮内瘤变、宫颈上皮内瘤变或阴道上皮内瘤变。

[0309] 在一些方面,获得来自肿瘤或癌症的这样的细胞的核酸并进行测序。在实施方案中,获得基因组中基因的蛋白质编码区,如通过组学分析,如通过全基因组测序数据、外显子组测序数据和/或转录组数据的分析。为了鉴定肿瘤特异性序列,可以将测序数据与参考测序数据(如从同一受试者的正常细胞或非癌细胞获得的数据)进行比较。在一些实施方案中,使用下一代测序(NGS)方法。

[0310] 在一些实施方案中,所述方法包括使用肿瘤的匹配的正常组学数据的步骤。在这

样的方法中，在电脑中分析涉及组学分析以鉴定肿瘤中相对于同一患者的正常组织(如同一患者的未患病组织)的突变。通常考虑到，匹配的正常组学数据是全基因组测序数据、外显子组测序数据和/或转录组数据，并且将匹配的正常组学数据针对治疗患者前的正常情况进行匹配。在特定实施方案中，对健康组织和患病组织进行全外显子组测序，以鉴定与肿瘤相关的体细胞突变。

[0311] 在一些实施方案中，遵循标准组织处理方案和测序方案从一个或多个患者活检样品获得组学数据。在特定实施方案中，所述数据是患者匹配的肿瘤数据(例如，肿瘤相比于同一患者正常情况)。在一些情形中，相比于其他参考(例如，先前同一患者正常情况或先前同一患者肿瘤，或同类统计资料(homo statisticus))的不匹配或匹配也被认为适用于本文中。组学数据可以是最新的组学数据或从先前程序(或甚至不同患者)获得的组学数据。例如，可以在第一步骤中通过对肿瘤活检(或淋巴活检或转移部位的活检)和匹配的正常组织(即，来自同一患者的未患病组织，如外周血)的全基因组和/或外显子组分析从患者肿瘤鉴定新表位。在一些实施方案中，基因组分析可以经由对如此获得的组学信息进行位置指导的同步比较来处理。

[0312] 基因组分析可以通过许多分析方法来进行。在特定实施方案中，所述方法包括使用下一代测序(如大规模平行测序方法、离子激流测序、焦磷酸测序)对肿瘤和匹配的正常样品两者的WGS(全基因组测序)和外显子组测序。对序列数据的计算分析可以以多种方式来进行。在一些实施方案中，数据格式呈SAM、BAM、GAR或VCF格式。作为例子，可以在电脑中通过对肿瘤和正常样品的位置指导的同步比对进行分析，如例如在使用BAM文件和BAM服务器的US 2012/0059670 A1和US 2012/0066001 A1中披露的。还考虑了用于序列分析的替代文件格式(例如，SAM、GAR、FASTA等)。

[0313] 在一些任何实施方案中，包含源自错义突变的新生抗原的肽(P)涵盖由一个或多个核苷酸多态性编码的氨基酸变化。包含源自移码突变、剪接位点变体、插入、倒置和缺失的新生抗原的肽(P)应涵盖新型肽序列以及新型肽序列的接点。包含具有新型翻译后修饰的新生抗原的肽(P)应涵盖携带一个或多个翻译后修饰(如磷酸酯或聚糖)的氨基酸。

[0314] 一旦鉴定出这些突变，则鉴定出新表位。新表位是被患者的T细胞识别的突变体肽。这些新表位必须由肿瘤或抗原呈递细胞通过MHC复合体呈递，然后由T细胞上的TCR识别。在一些实施方案中，所提供的方法包括计算一个或多个新表位以定义为肿瘤和患者所特有的新表位的步骤。因此，应认识到，可以在仅电脑环境中从组学信息鉴定患者和癌症特有的新表位，从而最终预测为患者和肿瘤类型所独有的潜在表位。在特定方面，如此鉴定的癌症新表位是患者以及患者中的特定癌症所独有的(例如，在被诊断为患有相同癌症的癌症患者群体中，频率占所有新表位的小于0.1％，并且更通常地小于0.01％)，并且如此鉴定的癌症新表位具有在肿瘤中被呈递的高可能性。

[0315] 在一些任何实施方案中，肽(P)的长度取决于具体应用，并且通常在约5至约50个氨基酸之间。在优选实施方案中，肽(P)为约7至35个氨基酸之间，例如，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或35个氨基酸。在一些方面，所述方法可以用单独肽进行，所述单独肽包括氨基酸序列的一个或多个变化(例如突变)。在一些方面，所述方法可以用肽库进行，其中所述库中的肽含有氨基酸序列的一个或多个变化(例如突变)。所述肽库可以包括数十种至数百种单独肽。在一些情形中，

所述肽库包括2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100种或更多种单独肽，或者前述任一项之间的任何值。所述肽库可以表示一种新生抗原或者可以表示几种新生抗原。在一些情形中，肽库可以包括同一新生抗原的多个重叠的肽。因此，对肿瘤相关抗原，可以将所述抗原分为7至35个氨基酸(例如，25个氨基酸)的肽(P)，其中每个肽(P)含有独特的氨基酸组成；或者，所述肽(P)可以是重叠肽库，其中将抗原分为设定数量的具有重叠序列的7至35个氨基酸(例如，25个氨基酸)的肽(P)。在一些情况下，重叠抗原库的肽各自可偏移一定数量的氨基酸残基，如5、6、7、8、9、10、11、12、13、15或15个氨基酸。在一些实施方案中，重叠抗原库的肽各自偏移10个氨基酸。在一些实施方案中，重叠抗原库的肽各自偏移12个氨基酸。例如，可以将构成100个氨基酸的抗原的重叠肽库分为八个25个氨基酸的肽(P)，每个肽偏移12个氨基酸(即，构成100个氨基酸的肽序列的每个后一个25个氨基酸的肽始于前一个肽的第13个氨基酸位置)。本领域技术人员应理解，存在许多排列用于从抗原生成肽库。

[0316] 可以将如本文所考虑的新表位序列定义为具有相对较短长度的序列延伸段(例如，5-30聚体，更通常地7-11聚体，或者12-25聚体)，其中这样的延伸段包括氨基酸序列的一个或多个变化(例如突变)。最通常地，所述一个或多个变化位于中心或中心附近(例如，距中心位置少于4个、或少于5个、或少于6个氨基酸)。在特定方面，本文所考虑的新表位序列将尤其包括如下那些：其中相对于匹配的正常序列交换单一氨基酸，并且中变化的氨基酸的位置位于新表位序列的中心或在中心附近(例如，在9聚体中，变化的氨基酸位于位置2、3、4或5，并且更通常地位于位置3、4或5，并且最通常地位于位置4或5)。应了解，在包括变化的氨基酸的多个新表位序列中可能存在单一氨基酸变化，根据变化的氨基酸的位置而定。

[0317] 在特定实施方案中，将计算新表位以具有2-50个氨基酸之间、更通常地5-30个氨基酸之间、且最通常地9-15个氨基酸之间的长度。例如，在表位要通过MHC-I复合体呈递的情况下，典型的表位长度将为约8-11个氨基酸，而经由MHC-II复合体呈递的典型表位将具有约13-17个氨基酸的长度。很容易理解，由于新表位中改变的氨基酸的位置可能不是在中心，因此新表位的实际肽序列连同实际拓扑结构可能会有很大变化。另外，在将新表位作为合成肽呈递至免疫感受态(或其他)细胞的情况下，应了解，合成肽可以显著长于MHC-I或MHC-II系统最终结合的肽部分，从而允许细胞中的蛋白质水解处理。例如，所考虑的合成肽可以因此在变化的氨基酸的上游和下游具有8个与15个之间的氨基酸。

[0318] 已经开发出多种算法并且可以用于将T细胞表位(MHC I类和II类限制性两者)映射至各种起源的蛋白质分子内。在一些实施方案中，许多程序利用来自实验测量的大规模肽-MHC结合亲和力矩阵的可用性来训练基于机器学习(ML)的分类器以区分MHC结合物与非结合物(参见例如，Zhao等人(2018)PLoS Comput Biol 14(11):e1006457)。用于MHC I类(例如9聚体)的示例性预测方法包括smm、smmpmbec、ann(NetMHC3.4)、NetMHC4、PickPocket、共有序列、NetMHCpan2.8、NetMHCpan3、NetMHCpan4、NetMHCcons、mhcflurry、mhcflurry_pan或MixMHCpred。用于MHC II类(例如15聚体)的示例性预测方法包括NetMHCIIpan、NetMHCII2.3、nn_align、smm_align、共有序列、comblib、tepitope或mhcflurry。可以使用任何这样的方法。

[0319] 在实施方案中，在使用合成肽进行直接MHC-I结合的情况下，总长度将在8与10个

氨基酸之间。在实施方案中，在使用合成肽进行直接MHC-II结合的情况下，总长度将在12与25个氨基酸之间，如14与20个氨基酸之间。在一些情形中，在MHC呈递之前于细胞中处理(通常经由蛋白酶体处理)合成肽的情况下，总长度通常在10与40个氨基酸之间，其中改变的氨基酸位于或靠近合成肽的中心位置。在一些实施方案中，用于MHC-I结合的肽是9聚体。在一些实施方案中，用于MHC-II结合的肽是23聚体。在一些实施方案中，用于MHC-II结合的肽是25聚体。

[0320] 作为例子，肽(P)可以在侧接由于突变产生的氨基酸变化或新型接点的任一侧上包括0-25个氨基酸。在一个实施方案中，所述肽(P)是在侧接源自单核苷酸多态性的氨基酸变化的任一侧上包含12个氨基酸的新生抗原序列，例如，25个氨基酸的肽，其中第13个氨基酸是得自所述单核苷酸多态性的氨基酸残基。在一些实施方案中，所述肽(P)是在侧接具有新翻译后修饰的氨基酸的任一侧上包含12个氨基酸的新生抗原序列，例如，25个氨基酸的肽，其中第13个氨基酸是得自所述新翻译后修饰位点的氨基酸残基。在其他实施方案中，所述肽(P)是在侧接通过插入、缺失或倒置产生的新接点的任一侧上包含0-12个氨基酸的新生抗原序列。在一些情形中，构成得自新序列的新生抗原的肽(P)可以涵盖完整新序列，在也可能产生的新接点的任一侧上包括0-25个氨基酸。

[0321] 在一些实施方案中，可以基于癌症和患者特有的突变对如此鉴定的序列差异进行进一步下游分析，以鉴定导致新肽序列的那些序列差异。因此，新表位可以通过考虑突变的类型(例如，缺失、插入、颠换、转换、易位)和影响(例如，无义、错义、移码等)来鉴定，并且可以因此用作内容过滤器，经由其消除沉默和其他无关(例如，非表达)突变。

[0322] 在一些实施方案中，可以针对所鉴定的患者HLA类型在电脑中进一步过滤所鉴定的新表位。这样的HLA匹配被认为确保新表位与有核细胞的MHC-I复合体以及特定抗原呈递细胞的MHC-II复合体的强结合。特别地，认为靶向两种抗原呈递系统会产生治疗有效且持久的涉及免疫系统的细胞和体液分支二者的免疫应答。还应理解，由此鉴定的HLA匹配的新表位可以在体外进行生物化学验证。

[0323] MHC-I和MHC-II两者的HLA确定可以使用多种方法来进行。在一些实施方案中，可以在电脑中使用包含大部分或所有已知和/或常见HLA型的参考序列从组学数据预测HLA型。例如，查明患者的HLA类型(使用湿法化学或电脑确定)，并且从数据库计算或获得HLA类型的结构方案，然后将其在电脑中用作对接(docking)模型以确定新表位与HLA结构方案的结合亲和力。用于确定结合亲和力的合适系统包括NetMHC平台(参见例如，Nucleic Acids Res.2008年7月1日;36(Web Server issue):W509-W512.)、HLAMatchmaker(http://www.epitopes.net/downloads.html)以及IEDB Analysis Resource(http://tools.immuneepitope.org/mhcii/)。然后选择针对先前确定的HLA类型具有高亲和力(例如，对于MHC-I，小于100nM、小于75nM、小于50nM;对于MHC-II，小于500nM、小于300nM、小于100nM)的新表位。在计算最高亲和力时，对新表位的修饰可以通过将N末端和/或C末端修饰添加至所述表位来实现，以进一步增加合成新表位与患者的HLA类型的结合。因此，新表位可以是如所鉴定的天然的，或者被进一步修饰以更好地匹配特定HLA类型。在一些实施方案中，可以基于等位基因频率乘以每百万转录物数量对新表位进行评分/评级，以得到似然度得分。然后可以使用HLA信息以及与患者HLA类型的计算或实际结合亲和力进一步增大此得分。

[0324] 所提供的实施方案包括如下实施方案,其中将新表位与含有已知人序列的数据库进行比较,从而避免使用与人相同的序列。

[0325] 在电脑中鉴定合适的新表位序列后,然后在体外制备相应的合成肽(例如,使用固相合成)。在特定实施方案中,制备表示来自受试者的多个不同新表位的合成肽文库。文库可以包括100、1000、10000种或更多种不同的肽。为了获得针对所鉴定的一种或多种新表位的合成抗体,预期在体外制备所鉴定的表位以产生合成肽。

[0326] 可以使用各种方法来制备合成肽。例如,可以在固相上(例如,使用Merrified合成)、通过液相合成或者从较小肽片段来制备具有癌症新表位序列的肽。肽表位可以通过化学合成使用市售自动化肽合成仪来获得。在一些实施方案中,可以例如通过使用固相肽合成的Fmoc-聚酰胺模式来合成肽,所述方法披露于Lu等人(1981).J.Org.Chem.46,3433及其中的参考文献中。在一些方面,可以通过在合适的宿主中使用合适的表达系统表达重组核酸来产生肽。在一些方面,可以使用重组方法,其中多个新表位位于单条肽链上,如在新表位或切割位点之间具有间隔子。

[0327] 可以通过任何一种技术或技术的组合纯化肽,所述技术如重结晶、尺寸排阻色谱、离子交换色谱、疏水相互作用色谱以及使用例如乙腈/水梯度分离的反相高效液相色谱。在一些实施方案中,可以将肽沉淀并进一步纯化,例如通过高效液相色谱(HPLC)来进行。肽的分析可以使用如下方式来进行:薄层色谱、电泳(特别是毛细管电泳)、固相提取(CSPE)、反相高效液相色谱、酸水解后的氨基酸分析、以及通过快原子轰击(FAB)质谱分析、以及MALDI和ESI-Q-TOF质谱分析。

2.与APC的共培养

[0328] 在所提供方法的实施方案中,一旦合成了编码蛋白质的新表位,多种合成肽与抗原呈递细胞在呈递MHC分子背景中的肽的条件下接触,并与识别APC上呈递的肽的来自T细胞群体的T细胞一起孵育。在一些实施方案中,将合成肽脉冲处理到自体或同种异体APC中,然后与患者T细胞共培养。使用抗原呈递细胞来呈递这些肽。然后可以分离识别APC表面上的这些肽的T细胞,如通过下文所述的方法来分离。可以在富集并扩增培养物中的肿瘤反应性T细胞的条件下培养经孵育的细胞,所述肿瘤反应性T细胞即含有对APC上呈递的肽具有反应性的内源TCR的T细胞。在一些实施方案中,所述方法包括在用于扩增的条件下培养T细胞,直至获得阈值量的T细胞和/或直至在孵育开始后至多20天。在所提供的方法的一些实施方案中,所述方法可以包括在几小时至几天的过程中将T细胞与APC共培养,然后从T细胞群分离抗原呈递细胞,以在富集或扩增肿瘤反应性T细胞的条件下扩增T细胞。在一些实施方案中,所述分离可以包括基于T细胞上的一种或多种T细胞激活标记从培养物中分离或选择反应性T细胞。

[0329] 多种方法可以用于培养具有抗原特异性的细胞,参见例如美国公开的申请号US2017/0224800。

[0330] 在一些实施方案中,将肿瘤反应性T细胞与已接触过肽(例如含有突变氨基酸序列的肽,如上文描述的新表位肽)或暴露以呈递所述肽的APC共培养。所述方法可以包括诱导患者的自体抗原呈递细胞(APC)以呈递突变的氨基酸序列。APC可以包括呈递与其细胞表面上的主要组织相容性复合体(MHC)分子缔合的蛋白质的肽片段的任何细胞。MHC分子可以是患者表达的任何MHC分子,包括但不限于MHC I类、MHC II类、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DM、

HLA-DO、HLA-DP、HLA-DQ和HLA-DR分子。APC可以包括例如巨噬细胞、DC、朗格汉斯细胞、B淋巴细胞和T细胞中的任何一种或多种。在特定实施方案中，APC是DC。在一些特定实施方案中，APC是B细胞。在一些实施方案中，APC是人工APC。

[0331] 在特定实施方案中，APC包括能够呈递I类和II类限制性分子的细胞。例如，B细胞和DC二者都具有呈递MHC I类和MHC II类限制性分子的能力。在一些实施方案中，APC细胞样品包括B细胞和DC。在一些实施方案中，APC细胞样品富集B细胞，如通过从原代细胞样品选择或分离。在一些实施方案中，APC细胞样品富集DC，如通过从原代细胞样品选择或分离。

[0332] 在一些实施方案中，APC表达具有匹配的HLA的MHC I类和/或MHC II类分子，T细胞来源已经从所述HLA获得。在特定实施方案中，APC和T细胞两者已经都从同一受试者分离，即对于癌症患者是自体的。在一些实施方案中，所述方法可以包括诱导患者的自体抗原呈递细胞(APC)呈递突变的氨基酸序列。通过使用来自患者的自体APC，所述方法可以鉴定对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的T细胞，所述突变的氨基酸序列由在患者表达的MHC分子背景下呈递的癌症特有突变来编码。

[0333] 在一些实施方案中，APC是来自受试者(如患者)的血液或单采术样品的细胞。在一些实施方案中，APC包括存在于外周血单个核细胞(PBMC)样品中的细胞。通常，在PBMC培养物中的APC功能主要涉及单核细胞和B细胞。在一些实施方案中，分离的PBMC的群体可以在所提供的方法中用作APC。PBMC可以使用标准方法获得，所述标准方法如Ficoll-Paque梯度分离。在一些情形中，APC是或包括从血液或单采术样品或者从PBMC样品分离的B细胞。在其他情形中，APC是或包括从血液或单采术样品或者从PBMC样品分离的单核细胞。在一些方面，单核细胞可以用作制备单核细胞源DC(以用作APC)的来源。在一些实施方案中，单核细胞源DC(例如$CD11c^{高}MHCII^{高}CD14^{低}$细胞)的来源可以通过以下方式从分离的单核细胞离体生成：与GM-CSF和IL-4一起培养4至6天以产生单核细胞源树突细胞。在特定实施方案中，如通过CD14选择从PBMC分离单核细胞，然后将其与GM-CSF和IL-4一起培养4至6天。

[0334] 在一些实施方案中，APC是具有复制能力的原代细胞(例如B细胞或单核细胞源DC)，例如，细胞未经历辐照、热处理或会导致其失活的其他方法。在特定实施方案中，所提供的方法不使用辐照的APC。在一些实施方案中，APC是从受试者获得的刚分离的原代细胞，或者源自从受试者获得的原代细胞。在一些实施方案中，在根据所提供的方法与刺激的T细胞共培养之前，已经将APC冷冻保存并且随后解冻。

[0335] 在一些特定实施方案中，B细胞被用作APC的来源并且产生自患者单采术，如对于获得肿瘤碎片和/或T细胞的受试者是自体的单采术。在其他特定实施方案中，单核细胞源树突细胞被用作APC的来源并且是从来自患者单采术的单核细胞生成，所述单采术如对于获得肿瘤碎片和/或T细胞的受试者是自体的单采术。

[0336] 在一些实施方案中，收集分离或生成的APC并低温冷冻。在分离或产生APC后通过冷冻保存提供中间保持步骤可以用于使时机与新表位鉴定和肽生成(如章节I.B.1中所述)和/或T细胞的初始扩增(如章节I.A.2中所述)相配合。在一些实施方案中，对于冷冻保存，将分离或生成的APC用冷冻保护剂配制为组合物。在一些实施方案中，冷冻保护剂是或包括DMSO和/或甘油。在一些实施方案中，可以将配制用于冷冻保存的组合物储存在低温(如超低温)下，例如，储存温度的范围为-40℃至-150℃，如为或约80℃±6.0℃。

[0337] 在一些实施方案中，将冷冻保存的细胞通过解冻准备用于后续步骤。在一些情形

中,可以在解冻后在一个或多个洗涤步骤后立即将细胞准备好用于随后与T细胞和肽一起培养。

[0338] 在特定实施方案中,通过使PBMC与突变的氨基酸序列(如一种或多种(如多种)新表位肽)接触来启动用于富集或选择肿瘤反应性细胞的方法。然后可以将PBMC/肽与刺激的T细胞一起培养。PBMC和T细胞可以从同一受试者获得。

[0339] 在特定实施方案中,通过使B细胞与突变的氨基酸序列(如一种或多种(如多种)新表位肽)接触来启动用于富集或选择肿瘤反应性细胞的方法。然后可以将B细胞/肽与刺激的T细胞一起培养。B细胞和T细胞可以从同一受试者获得。

[0340] 在特定实施方案中,通过使单核细胞源DC与突变的氨基酸序列(如一种或多种(如多种)新表位肽)接触来启动用于富集或选择肿瘤反应性细胞的方法。然后可以将单核细胞来源的DC/肽与刺激的T细胞一起培养。单核细胞源DC和T细胞可以获自或源自同一受试者。

[0341] 在一些实施方案中,APC是人工抗原呈递细胞(aAPC)。通常,aAPC包括天然APC的特征,包括MHC分子、一种或多种刺激和共刺激分子、Fc受体、一种或多种粘附分子的表达和/或产生或分泌细胞因子(例如IL-2)的能力。通常,aAPC是缺乏上述中的一种或多种的表达的细胞系,并且是通过引入(例如通过转染或转导)来自MHC分子、低亲和力Fc受体(CD32)、高亲和力Fc受体(CD64)、以下中的一种或多种的缺失元件中的一种或多种来生成:共刺激信号(例如CD7、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、ICOS-L、ICAM、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素β受体、ILT3、ILT4、3/TR6或B7-H3配体;或者与CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、Toll配体受体或CD83配体特异性结合的抗体)、细胞粘附分子(例如ICAM-1或LFA-3)和/或细胞因子(例如IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、干扰素-α(IFNα)、干扰素-β(IFNβ)、干扰素-γ(IFNγ)、肿瘤坏死因子-α(TNFα)、肿瘤坏死因子-β(TNFβ)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和粒细胞集落刺激因子(GCSF))。在一些情形中,aAPC一般不表达MHC分子,但是可以被工程化以表达MHC分子,或者在一些情形中,被诱导或可以被诱导以表达MHC分子,如通过用细胞因子刺激。在一些情形中,aAPC还可以加载有刺激或共刺激配体,所述配体可以包括例如抗CD3抗体、抗CD28抗体或抗CD2抗体。可以用作用于生成aAPC的骨架的细胞系的例子是K562细胞系或成纤维细胞系。各种aAPC是本领域已知的,参见例如,美国专利号8,722,400,公开的申请号US2014/0212446;Butler和Hirano(2014)Immunol Rev.,257(1):10.1111/imr.12129;Suhoshki等人(2007)Mol.Ther.,15:981-988。在特定实施方案中,通过使aAPC与突变的氨基酸序列(如一种或多种(如多种)新表位肽)接触来启动用于富集或选择肿瘤反应性细胞的方法。然后可以将aAPC/肽与刺激的T细胞一起培养。

[0342] 诱导APC(例如B细胞或单核细胞来源的DC)以呈递突变氨基酸序列可以使用各种合适的方法进行。在一个实施方案中,诱导APC呈递突变的氨基酸序列(例如肽新表位)包括用包含突变的氨基酸序列的合成肽或肽库(所述库中的每种肽包含不同的突变的氨基酸序列)对APC进行脉冲处理。在一些情形中,使用电穿孔至抗原呈递细胞中,用所述肽脉冲处理APC。然后可以通过要由CD8细胞(MHC I类)或CD4细胞(MHC II类)识别的抗原呈递细胞来呈递合成肽。在某些特定实施方案中,生成适合于通过用于由CD8细胞识别的MHC I类限制性分子表达的合成肽。在其他特定实施方案中,生成适合于通过用于由CD4细胞识别的MHC II

类限制性分子表达的合成肽。

[0343] 在一些实施方案中，使APC(例如PBMC、B细胞或单核细胞源DC)与单一肽或肽库接触。所述肽库可以表示许多不同的突变的氨基酸序列，如5、10、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900或100种肽，或者前述任一项之间的任何值。

[0344] 如通过肽脉冲，以适合于其在主要组织相容性复合体(MHC)的表面上呈递的浓度，将肽或肽库加载至抗原呈递细胞(例如树突细胞)上。

[0345] 在一些实施方案中，表示单独或单一肽的肽浓度的范围可以在为或约0.000001μg/mL与为或约10μg/mL之间。在一些实施方案中，表示单独或单一肽的肽浓度的范围可以在为或约0.00001μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约0.00001μg/mL与为或约1μg/mL之间、为或约0.00001μg/mL与为或约0.1μg/mL之间、为或约0.00001μg/mL与为或约0.01μg/mL之间、为或约0.00001μg/mL与为或约0.001μg/mL之间、为或约0.00001μg/mL与为或约0.0001μg/mL之间、为或约0.0001μg/mL与10μg/mL之间、为或约0.0001μg/mL与为或约1μg/mL之间、为或约0.0001μg/mL与为或约0.1μg/mL之间、为或约0.0001μg/mL与为或约0.01μg/mL之间、为或约0.0001μg/mL与为或约0.001μg/mL之间、为或约0.001μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约0.001μg/mL与为或约1μg/mL之间、为或约0.001μg/mL与为或约0.1μg/mL之间、为或约0.001μg/mL与为或约0.01μg/mL之间、为或约0.01μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约0.01μg/mL与为或约1μg/mL之间、为或约0.01μg/mL与为或约0.1μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约1μg/mL之间或者为或约1μg/mL与为或约10μg/mL之间。在一些实施方案中，表示单独或单一肽的浓度可以是为或约0.000001μg/mL、为或约0.00001μg/mL、为或约0.0001μg/mL、为或约0.001μg/mL、为或约0.01μg/mL、为或约0.1μg/mL、为或约1μg/mL，或者前述任一项之间的任何值。

[0346] 在一些实施方案中，所述肽是表示许多不同的突变的氨基酸序列的肽库，并且所述库中单独或单一肽的平均浓度的范围可以在为或约0.000001μg/mL与为或约10μg/mL之间。在一些实施方案中，所述肽是表示许多不同的突变的氨基酸序列的肽库，并且所述库中单独或单一肽的平均浓度的范围可以在为或约0.00001μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约0.00001μg/mL与为或约1μg/mL之间、为或约0.00001μg/mL与为或约0.1μg/mL之间、为或约0.00001μg/mL与为或约0.01μg/mL之间、为或约0.00001μg/mL与为或约0.001μg/mL之间、为或约0.00001μg/mL与为或约0.0001μg/mL之间、为或约0.0001μg/mL与10μg/mL之间、为或约0.0001μg/mL与为或约1μg/mL之间、为或约0.0001μg/mL与为或约0.1μg/mL之间、为或约0.0001μg/mL与为或约0.01μg/mL之间、为或约0.0001μg/mL与为或约0.001μg/mL之间、为或约0.001μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约0.001μg/mL与为或约1μg/mL之间、为或约0.001μg/mL与为或约0.1μg/mL之间、为或约0.001μg/mL与为或约0.01μg/mL之间、为或约0.01μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约0.01μg/mL与为或约1μg/mL之间、为或约0.01μg/mL与为或约0.1μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约1μg/mL之间或者为或约1μg/mL与为或约10μg/mL之间。在一些实施方案中，所述库中单独或单一肽的平均浓度可以是为或约0.000001μg/mL、为或约0.00001μg/mL、为或约0.0001μg/mL、为或约0.001μg/mL、为或约0.01μg/mL、为或约0.1μg/mL、为或约1μg/mL，或者前述任一项之间的任何值。

[0347] 在一些实施方案中，一种或多种非天然肽的单独肽的浓度平均为小于0.02μg/mL。在一些实施方案中，一种或多种非天然肽的单独肽的浓度平均是为或约0.00001μg/mL至为或约0.01μg/mL，如为或约0.00001μg/mL至为或约0.005μg/mL、为或约0.00001μg/mL至为或约0.002μg/mL、为或约0.00001μg/mL至为或约0.001μg/mL、为或约0.00001μg/mL至为或约0.0005μg/mL、为或约0.00001μg/mL至为或约0.0002μg/mL、为或约0.00001μg/mL至为或约0.0001μg/mL、为或约0.00001μg/mL至为或约0.00005μg/mL、为或约0.00001μg/mL至为或约0.00002μg/mL、为或约0.00002μg/mL至为或约0.005μg/mL、为或约0.00002μg/mL至为或约0.002μg/mL、为或约0.00002μg/mL至为或约0.001μg/mL、为或约0.00002μg/mL至为或约0.0005μg/mL、为或约0.00002μg/mL至为或约0.0002μg/mL、为或约0.00002μg/mL至为或约0.0001μg/mL、为或约0.00002μg/mL至为或约0.00005μg/mL、为或约0.00005μg/mL至为或约0.005μg/mL、为或约0.00005μg/mL至为或约0.002μg/mL、为或约0.00005μg/mL至为或约0.001μg/mL、为或约0.00005μg/mL至为或约0.0005μg/mL、为或约0.00005μg/mL至为或约0.0002μg/mL、为或约0.00005μg/mL至为或约0.0001μg/mL、为或约0.0001μg/mL至为或约0.005μg/mL、为或约0.0001μg/mL至为或约0.002μg/mL、为或约0.0001μg/mL至为或约0.001μg/mL、为或约0.0001μg/mL至为或约0.0005μg/mL、为或约0.0001μg/mL至为或约0.0002μg/mL、为或约0.0005μg/mL至为或约0.005μg/mL、为或约0.0005μg/mL至为或约0.002μg/mL、为或约0.0005μg/mL至为或约0.001μg/mL、为或约0.001μg/mL至为或约0.005μg/mL、为或约0.001μg/mL至为或约0.002μg/mL或者为或约0.002μg/mL至为或约0.005μg/mL。

[0348] 在一些实施方案中，表示单一肽或肽库的肽浓度的范围可以在为或约0.0001μg/mL与为或约40μg/mL之间。表示单一肽或肽库的肽浓度的范围可以在为或约0.001μg/mL与为或约40μg/mL之间、为或约0.001μg/mL与为或约25μg/mL之间、0.001μg/mL与为或约10μg/mL之间、0.001μg/mL与为或约5μg/mL之间、0.001μg/mL与为或约1μg/mL之间、0.001μg/mL与为或约0.5μg/mL之间、0.001μg/mL与为或约0.1μg/mL之间、0.001μg/mL与为或约0.01μg/mL之间、0.01μg/mL与为或约40μg/mL之间，如为或约0.01μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约0.01μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约0.01μg/mL与为或约5μg/mL之间、为或约0.01μg/mL与为或约1μg/mL之间、为或约0.01μg/mL与为或约0.5μg/mL之间、为或约0.01μg/mL与为或约0.1μg/mL之间、为或约0.01μg/mL与为或约0.05μg/mL之间、0.05μg/mL与为或约40μg/mL之间、为或约0.05μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约0.05μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约0.05μg/mL与为或约5μg/mL之间、为或约0.05μg/mL与为或约1μg/mL之间、为或约0.05μg/mL与为或约0.5μg/mL之间、为或约0.05μg/mL与为或约0.1μg/mL之间、0.1μg/mL与为或约40μg/mL之间，如为或约0.1μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约5μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约1μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约0.5μg/mL之间、0.5μg/mL与为或约40μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约5μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约1μg/mL之间、1μg/mL与为或约40μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约5μg/mL之间、5μg/mL与为或约40μg/mL之间、为或约5μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约5μg/mL与为或约10μg/mL之间、10μg/mL与为或约40μg/mL之间、为或约10μg/mL与为或约25μg/mL之间或者为或约25μg/mL与为或约40μg/mL之间。在一些实施方案中，表示单一肽

或肽库的肽浓度可以是为或约0.0001μg/mL、为或约0.001μg/mL、为或约0.01μg/mL、为或约0.1μg/mL、为或约1μg/mL、为或约10μg/mL、为或约20μg/mL、为或约30μg/mL或者为或约40μg/mL，或者前述任一项之间的任何值。在一些实施方案中，所述肽浓度是肽库的浓度。在一些实施方案中，所述肽浓度是单一或单独肽的浓度。

[0349] 在一个实施方案中，诱导APC(例如B细胞或单核细胞源DC)呈递突变的氨基酸序列包括将编码突变的氨基酸序列的核苷酸序列引入APC中。将核苷酸序列引入APC中，使得APC在细胞膜上表达并展示与MHC分子结合的突变的氨基酸序列。编码突变的氨基酸的核苷酸序列可以是RNA或DNA。将核苷酸序列引入APC中可以以多种不同方式中的任一种来进行。可用于将核苷酸序列引入APC中的技术的非限制性例子包括转化、转导、转染和电穿孔。在一些情形中，用于结合MHC II类限制性分子的肽作为编码突变DNA的基因来呈递，并且被电穿孔至抗原呈递细胞中。随后将此DNA在体外转录为编码表面上用于由CD4+细胞识别的肽的RNA。在一些情形中，可以采用串联小基因(Tandem Mini Gene)方法对MHC II类限制性分子进行此操作，参见例如公开的PCT专利申请号WO 2016/053338和Parkhurst等人(2016)Clin Cancer Res.,23:2491-505。在鉴定超过一种基因的实施方案中，所述方法可以包括制备超过一种核苷酸序列(每种核苷酸序列编码由不同基因编码的突变的氨基酸序列)，并且将每种核苷酸序列引入不同的APC群体中。就此而言，可以获得APC的多个群体，每个群体表达并展示不同的突变的氨基酸序列。例如，在使用串联小基因的情形中，将APC(例如B细胞或单核细胞源DC)用编码不同的突变的氨基酸序列的DNA(多种DNA)的混合物电穿孔，然后将所述DNA在体外转录成编码用于由CD4+T细胞表面识别的肽的RNA。在一些实施方案中，使用Lonza 4D Nucleofector连续电穿孔系统对APC(例如B细胞或单核细胞源DC)进行电穿孔。

[0350] 所述方法包括向T细胞(例如来自患有肿瘤的患者)添加呈递肽的APC的培养物以及将APC与T细胞共培养一段时间，以允许群体中的一种或多种T细胞对APC表面上的肽的呈递和识别。在所提供的实施方案中，T细胞包括刺激的T细胞的群体。

[0351] 在一些实施方案中，对于肽脉冲处理，将APC(例如B细胞或单核细胞源DC)与肽一起孵育在为或约2小时与为或约48小时之间，如在为或约2小时与为或约36小时之间、在为或约2小时与为或约24小时之间、在为或约2小时与为或约24小时之间、在为或约2小时与为或约18小时之间、在为或约2小时与为或约12小时之间、在为或约2小时与为或约6小时之间、在为或约6小时与为或约48小时之间、在为或约6小时与为或约36小时之间、在为或约6小时与为或约24小时之间、在为或约6小时与为或约24小时之间、在为或约6小时与为或约18小时之间、在为或约6小时与为或约12小时之间、在为或约12小时与为或约48小时之间、在为或约12小时与为或约36小时之间、在为或约12小时与为或约24小时之间、在为或约12小时与为或约18小时之间、在为或约18小时与为或约48小时之间、在为或约18小时与为或约36小时之间、在为或约18小时与为或约24小时之间、在为或约24小时与为或约48小时之间、在为或约24小时与为或约36小时之间或者在为或约36小时与为或约48小时之间。在一些实施方案中，将APC(例如B细胞或单核细胞源DC)与肽一起孵育为或约4小时、为或约6小时、为或约7小时、为或约8小时、为或约9小时、为或约10小时、为或约12小时、为或约14小时、为或约16小时、为或约18小时、为或约20小时、为或约22小时、为或约24小时，或者前述任一项之间的任何值。在特定实施方案中，将APC(例如PBMC、B细胞或单核细胞源DC)与肽一起孵育过夜，如持续在为或约8至12小时之间。在一些实施方案中，共培养孵育持续为或约6

小时。

[0352] T细胞(例如刺激的T细胞)和APC(例如B细胞或单核细胞源DC)可以以1:100至100:1(如1:50至50:1、1:25至25:1、1:10至10:1或1:5至5:1)的T细胞与APC的比率存在于培养中。在一些实施方案中,T细胞(例如刺激的T细胞)与APC的比率是为或约1:100、为或约1:50、为或约1:25、为或约1:10、为或约1:5、为或约1:2.5、为或约1:1、为或约2:5:1、为或约5:1、为或约10:1、为或约25:1、为或约50:1或者为或约100:1,或者前述任一项之间的任何值。在一些实施方案中,T细胞(例如刺激的T细胞)与APC的比率在20:1与1:1之间、在15:1与1:1之间、在10:1与1:1之间、在5:1与1:1之间或在2.5:1与1:1之间。在一些实施方案中,T细胞(例如刺激的T细胞)与APC的比率是在1:20与1:1之间、在1:15与1:1之间、在1:10与1:1之间、在1:5与1:1之间或者在1:2.5与1:1之间。在特定实施方案中,将通过将T细胞(例如刺激的T细胞的群体)与APC(例如B细胞或单核细胞源DC)以大约3:1的比率混合来进行共培养。在一些实施方案中,将通过将T细胞(例如刺激的T细胞的群体)与APC(例如B细胞或单核细胞源DC)以大约1:1的比率混合来进行共培养。

[0353] 在一些实施方案中,将用于维持T细胞的一种或多种重组细胞因子添加至共培养。在一些实施方案中,重组细胞因子可以包括IL-2、IL-7、IL-15或IL-21中的一种或多种。在一些实施方案中,共培养是在重组IL-2、IL-15和IL-7的存在下进行。在一些实施方案中,共培养是在IL-2的存在下进行。在一些实施方案中,共培养是在IL-15和IL-17的存在下进行,其在一些方面不另外包括IL-2。

[0354] 重组细胞因子通常是重组人蛋白。在特定实施方案中,重组细胞因子在共培养期间以以下浓度存在于细胞培养基中:至少或至少约或者为或约10IU/mL、至少或至少约或者为或约100IU/mL、至少或至少约或者为或约1000IU/mL、至少或至少约或者为或约1500IU/mL、至少或至少约或者为或约2000IU/mL、至少或至少约或者为或约2500IU/mL、至少或至少约或者为或约3000IU/mL、至少或至少约或者为或约3500IU/mL、至少或至少约或者为或约4000IU/mL、至少或至少约或者为或约4500IU/mL、至少或至少约或者为或约5000IU/mL、至少或至少约或者为或约5500IU/mL、至少或至少约或者为或约6000IU/mL、至少或至少约或者为或约6500IU/mL、至少或至少约或者为或约7000IU/mL、至少或至少约或者为或约7500IU/mL或者至少或至少约或者为或约8000IU/mL。在一个实施方案中,细胞培养基包含在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间、为或约100IU/mL与为或约1000IU/mL之间、为或约1000与为或约2000IU/mL之间、在为或约2000与为或约3000IU/mL之间、在为或约3000与为或约4000IU/mL之间、在为或约4000与为或约5000IU/mL之间、在为或约5000与为或约6000IU/mL之间、在为或约6000与为或约7000IU/mL之间、在为或约7000与为或约8000IU/mL之间,每个都包含端值。

[0355] 在一些实施方案中,重组IL-2存在于细胞培养基中。在一些实施方案中,重组IL-2是以以下浓度被添加至培养基:在为或约10IU/mL与为或约1000IU/mL之间,如在为或约10IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约

1000IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约600IU/mL之间或者在为或约600IU/mL与为或约1000IU/mL之间。在一些实施方案中，重组IL-2是以在50与400IU/mL之间的量存在。

[0356] 在一些实施方案中，孵育是用更高剂量IL-2来进行。在一些方面，IL-2是添加至培养的唯一重组细胞因子。在一些实施方案中，重组IL-2是以以下浓度被添加至培养基：在为或约1000IU/mL与为或约8000IU/mL之间，如在为或约1000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、2000IU/mL为或约8000IU/mL、在为或约2000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、4000IU/mL为或约8000IU/mL、在为或约4000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约4000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约4000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约5000IU/mL与为或约8000IU/mL之间、在为或约5000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约5000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约6000IU/mL与为或约8000IU/mL之间、在为或约6000IU/mL与为或约7000IU/mL之间或者在为或约7000IU/mL与为或约8000IU/mL之间。在一些实施方案中，重组IL-2是以为或为约6000IU/mL的量存在。

[0357] 在一些实施方案中，重组IL-15存在于细胞培养基中。在一些实施方案中，重组IL-15是以以下浓度被添加至培养基：在为或约10IU/mL与500IU/mL之间，如在为或约10IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约70IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约30IU/mL之间、在为或约30IU/mL与500IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约70IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约70IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约300IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间或者在为或约400IU/mL与为或约500IU/mL之间。在一些实施方案中，将IL-15以在为或约100IU/mL与为或

约200IU/mL之间的量添加至培养基。在一些实施方案中，将IL-15以为或约180IU/mL添加至培养基。

[0358] 在一些实施方案中，将重组IL-7添加至培养基。在一些实施方案中，重组IL-7是以以下浓度被添加至培养基：在为或约100IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约800IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约800IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约800IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约2000IU/mL之间。在一些实施方案中，将IL-7以在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间的量添加至培养基。在一些实施方案中，将IL-7以为或约600IU/mL添加至培养基。

[0359] 在一些实施方案中，将重组IL-21添加至培养基。在一些实施方案中，重组IL-21是以以下浓度被添加至培养基：在为或约0.5IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约5IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约2.5IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约1IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约5IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约2.5IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约5IU/mL之间、在为或约5IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约5IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约5IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约15IU/mL之间或者在为或约15IU/mL与为或约20IU/mL之间。在一些实施方案中，将IL-21以在为或约0.5IU/mL与为或约2.5IU/mL之间的量添加至培养基。在一些实施方案中，将IL-21以为或约1IU/mL添加至培养基。

[0360] 可以在适合于呈递MHC上的肽和激活培养物中的T细胞的温度(例如，至少约25摄氏度，通常是至少约30度，并且通常是为或约37摄氏度)下孵育APC和T细胞的共培养物。在一些实施方案中，所述孵育进行长达96小时。所述孵育可以进行24小时至96小时，如为或约24小时、为或约36小时、为或约48小时、为或约60小时、为或约72小时、为或约84小时或者为或约96小时，或者前述任一项之间的时间。在特定实施方案中，将共培养物孵育24至48小时。

[0361] 在一些实施方案中，在共培养结束时，将肿瘤反应性T细胞与共培养物中存在的

APC分离。在一些实施方案中，所述分离可以包括选除或去除APC的方法。在一些实施方案中，所述分离可以包括阳性选择或保留共培养物中存在的T细胞的方法。在一些实施方案中，可以选择共培养物中的总T细胞。在特定实施方案中，可以选择肿瘤反应性T细胞或表达与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种上调标记(例如激活标记)的T细胞。

C.细胞的选择

[0362] 在所提供的方法的实施方案中，所述方法涉及通过选择或分离对CXCL13和/或耗竭标记(如PD-1、CD39和/或TIGIT中的一种或多种)呈阳性的T细胞来富集或选择肿瘤反应性T细胞或者可能或怀疑是肿瘤反应性T细胞的T细胞。

[0363] 在一些实施方案中，从已经从生物样品分离或选择的T细胞群体选择或富集对CXCL13和/或耗竭标记(如PD-1、CD39和/或TIGIT中的一种或多种)呈阳性的T细胞，如章节I.A.1中所述。在一些实施方案中，从已经从生物样品分离或选择的T细胞群体选择或富集对CXCL13呈阳性的T细胞，如章节I.A.1中所述。在一些实施方案中，从已经从生物样品分离或选择的T细胞群体选择或富集对PD-1、CD39和TIGIT中的一种或多种的T细胞，如章节I.A.1中所述。在一些实施方案中，从T细胞的所述群体选择或富集对PD-1和CD39呈阳性的T细胞。在一些实施方案中，从T细胞的所述群体选择或富集对PD-1和TIGIT呈阳性的T细胞。在一些实施方案中，从T细胞的所述群体选择或富集对CD39和TIGIT呈阳性的T细胞。在任何这样的实施方案的方面，生物样品是含有T细胞群体的肿瘤碎片，并且可以直接从肿瘤碎片的细胞选择对任何上文标记呈阳性的细胞。在任何这样的实施方案的其他方面，将肿瘤碎片酶消化为含有T细胞群体的单细胞悬浮液，并且可以直接从消化的细胞悬浮液的细胞选择对任何上文标记呈阳性的细胞。

[0364] 在一些实施方案中，在刺激或扩增后从T细胞群体进一步选择或富集对CXCL13和/或耗竭标记(如PD-1、CD39和/或TIGIT中的一种或多种)呈阳性的T细胞，如章节I.A.2中所述。在一些实施方案中，从已经进行初始扩增的T细胞群体(例如扩增的T细胞的第一群体)选择或富集对CXCL13呈阳性的T细胞，如章节I.A.2中所述。在一些实施方案中，从T细胞群体初始扩增的T细胞(例如第一扩增群体)选择或富集对PD-1、CD39和TIGIT中的一种或多种的T细胞，如章节I.A.2中所述。在一些实施方案中，从初始扩增的T细胞的群体(例如第一扩增群体)选择或富集对PD-1和CD39呈阳性的T细胞。在一些实施方案中，从初始扩增的T细胞群体(例如第一扩增群体)选择或富集对PD-1和TIGIT呈阳性的T细胞。在一些实施方案中，从初始扩增的T细胞群体(例如第一扩增群体)选择或富集对CD39和TIGIT呈阳性的T细胞。

[0365] 在一些实施方案中，在将T细胞与APC共培养后，从T细胞群体进一步选择或富集对CXCL13和/或耗竭标记(如PD-1、CD39和/或TIGIT中的一种或多种)呈阳性的T细胞，如章节I.B中所述。在一些实施方案中，从含有反应性T细胞群体的共培养物选择或富集对CXCL13呈阳性的T细胞，如章节I.B中所述。在一些实施方案中，从含有反应性T细胞群体的共培养物选择或富集对PD-1、CD39和TIGIT中的一种或多种的T细胞，如章节I.B中所述。在一些实施方案中，从含有反应性T细胞群体的共培养物选择或富集对PD-1和CD39呈阳性的T细胞。在一些实施方案中，从含有反应性T细胞群体的共培养物选择或富集对PD-1和TIGIT呈阳性的T细胞。在一些实施方案中，从含有反应性T细胞群体的共培养物选择或富集对CD39和TIGIT呈阳性的T细胞。

[0366] 在一些实施方案中，所述方法可以包括用于获得或富集肿瘤反应性T细胞或者可

能或怀疑是肿瘤反应性T细胞的T细胞的任何上文选择的组合。在一些实施方案中，将细胞的富集群体用于后续处理步骤中，如涉及根据任何所提供的方法的一个或多个步骤孵育、刺激或激活和/或扩增的后续处理步骤。

[0367] 在任何所提供的实施方案的方面，对CXCL13和/或耗竭标记(如PD-1、CD39和/或TIGIT中的一种或多种)呈阳性的细胞的选择可以根据任何所提供的方法来进行。在一些实施方案中，富集对一种或多种细胞表面标记呈表面阳性的T细胞包括用于基于这样的标记进行分离的任何方法。在一些实施方案中，分离是基于亲和力或基于免疫亲和力的分离。例如，在一些方面，分离包括基于一种或多种标记(通常是细胞表面标记)在细胞中的表达或表达水平来分离细胞和细胞群，例如通过用与这样的标记特异性结合的抗体或结合配偶体进行孵育，之后通常进行洗涤步骤并将已经结合所述抗体或结合配偶体的细胞与尚未结合至所述抗体或结合配偶体的那些细胞分离。分离细胞的方法包括但不限于珠选择(例如用于细胞的阳性/阴性选择的连续珠传代)、免疫亲和色谱(例如用于阳性/阴性选择的连续洗脱)和流式细胞术分选。对于根据所提供的方法使用，选择方法符合GMP标准。

[0368] 在特定实施方案中，细胞的选择是通过基于流式细胞术的细胞分选来进行。与其他方法相比，基于流式细胞术细胞分选具有以下优势：可以基于每种细胞的多个参数在单一步骤中分离细胞，从而实现细胞的更高产量以及使用基于珠(例如基于磁珠)的分离可能无法实现的更高纯度。使用流式细胞术分选，单一过程可以基于复合细胞表面表型去除和分离特定群体。可以使用细胞选择分选设备，其具有足够高的通量以操作大的体积和细胞数量。非限制性细胞分选设备包括例如Sony FX500或Tyto细胞分选系统(Miltenyi)。对于在所提供的方法中使用，流式细胞仪符合GMP。实现针对两种或更多种细胞表面标记(例如CD39、PD-1和TIGIT)的多参数分选的细胞分选方法可以使用相容的多色荧光团试剂来进行。技术人员可以熟练地选择适当的荧光团和试剂，如通过选择明亮荧光团和选择具有最小至无光谱重叠的荧光团。

[0369] 在一些实施方案中，直接从通过肿瘤碎片的酶或机械消化制备的单细胞悬浮液输入样品选择细胞，其中所述选择是使用CXCL13捕获或CD39/PD1/TIGIT阳性选择来进行。在一些实施方案中，然后使用如所述的方法刺激选择的细胞以供扩增，如通过在IL-2、IL-7、IL-15或IL-21中的一种或多种的存在下进行孵育或培养。在一些实施方案中，所述刺激不会包括与抗CD3抗体(OKT3)或其他共刺激分子一起培养。在一些实施方案中，所述刺激可以包括与抗CD3抗体(OKT3)或其他共刺激分子一起培养。

[0370] 在一些实施方案中，在与呈递新肽(突变的肽)的APC共培养后选择细胞，并且使用CXCL13捕获或CD39/PD1/TIGIT阳性选择基于CXCL13分泌或CD39/PD1/TIGIT上调来选择。在所述方法的方面，所述共培养还将包括一种或多种重组细胞因子，如IL-2、IL-7、IL-15或IL-21中的一种或多种。在一些实施方案中，在通过从共培养物选择细胞进行富集后，然后使用如所述的方法刺激富集的细胞以供扩增，如通过在IL-2、IL-7、IL-15或IL-21中的一种或多种的存在下进行孵育或培养。在一些实施方案中，所述刺激不会包括与抗CD3抗体(OKT3)或其他共刺激分子一起培养。在一些实施方案中，所述刺激可以包括与抗CD3抗体(OKT3)或其他共刺激分子一起培养。

[0371] 在一些方面，在选择或富集之前或同时，可以从生物样品富集或选择T细胞，如基于T细胞标记CD3、CD4或CD8。在一些实施方案中，这样的富集包括选择或分离对CD3、CD4和/

或CD8呈表面阳性的T细胞。例如，可以通过针对在肿瘤反应性T细胞上或在具有CXCL13和/或耗竭标记(如PD-1、CD39和/或TIGIT中的一种或多种)的表达或与肿瘤反应性T细胞相关的T细胞激活标记(例如CD134和/或CD137)的表达的T细胞上表达或以相对更高程度表达的标记进行阳性或阴性选择，将这样的CD3+T细胞或者$CD4^+$和/或$CD8^+$群体进一步分选为子群体。在一些实施方案中，这样的细胞包括或富集肿瘤反应性T细胞或与肿瘤反应性T细胞相关的T细胞。在一些实施方案中，所述选择得到富集CD3+T细胞或者CD4+细胞和CD8+细胞的T细胞群体，所述群体对CXCL13和/或耗竭标记(如PD-1、CD39和/或TIGIT中的一种或多种)中的一种或多种进一步呈阳性。

[0372] 在一些实施方案中，用于根据所提供的方法选择细胞的任何抗体试剂是GMP抗体试剂或者是ASR试剂。

[0373] 在一些实施方案中，选择对CD39、PD-1和/或TIGIT呈表面阳性的细胞。在一些情形中，染色方法还可以包括从样品选择CD4和/或CD8 T细胞。用于选择对这些标记呈阳性的细胞的方法和抗体试剂是已知的且是市售的。表1列出用于如本文所述对细胞进行染色以及选择或分选的示例性抗体。

表1：示例性染色抗体

靶标	名称	产品编号	制造商	克隆
TIGIT				
TIGIT	PE抗人TIGIT（VSTM3）	372704	BioLegend	A15153G
TIGIT	人TIGIT APC缀合的抗体	FAB7898A	R&D Systems	741182
TIGIT	TIGIT抗体，抗人	130-096-382	Miltenyi	4E1.2
TIGIT	PE小鼠抗小鼠TIGIT	565168	BD	1G9
CD39				
CD39	抗CD39小鼠单克隆抗体(APC(别藻蓝蛋白))	328210	BioLegend	A1
CD39	PE小鼠抗人CD39	555464	BD	TU66
CD39	CD39抗体，抗人	130-093-504	Miltenyi	MZ18-23C8
CD39	CD39-PC5.5，BA54	B55385	Beckman Coulter	BA54
PD-1				
PD-1	抗CD279(PD-1)小鼠单克隆抗体（Brilliant Violet® 421）	329920	BioLegend	EH12.2H7
PD-1	BB515小鼠抗人CD279（PD-1）	564494	BD	EH12.1
PD-1	CD279（PD1）抗体，抗人	130-117-384	Miltenyi	PD1.3.1.3
PD-1	CD279（PD1）抗体，抗人，REAfinity™	130-120-388	Miltenyi	REA1165
PD-1	CD279-PC5.5，PD1.3	B32613	Beckman Coulter	PD1.3
CD4				
CD4	抗CD4小鼠单克隆抗体（Brilliant Violet® 510）	317444	BioLegend	OKT4
CD8				
CD8a	PE/Cy7抗人CD8a	301012	BioLegend	RPA-T8

[0374] 在一些实施方案中，选择分泌CXCL13的细胞。从细胞选择分泌的分子的方法是已知的。在一些实施方案中，可以使用细胞因子特异性捕获系统，其中将细胞因子特异性“捕获”抗体与对T细胞上的细胞表面受体(例如CD45)具有特异性的抗体缀合。例如，可以将含有与CD45特异性单克隆抗体缀合的抗CXCL13抗体的捕获试剂与细胞群体一起孵育。可以将细胞孵育1-2小时，如30-45分钟，以允许细胞因子分泌以及细胞因子与分泌细胞上的细胞因子特异性捕获试剂的结合。在一些情形中，可以通过用荧光团标记细胞因子特异性抗体

或T细胞特异性抗体中的一种或两种来检测细胞。在其他例子中，可以将对细胞因子特异性抗体具有特异性的二抗用荧光团标记并作为检测抗体添加至孵育。可以通过流式细胞术来鉴定对荧光团呈阳性的细胞。在其他实施方案中，可以将捕获的细胞因子用与超顺磁颗粒缀合的特异性抗体进一步磁性标记，以供通过磁性细胞分选(MAC)加以富集。

[0375] 在一些方面，针对CXCR5的表面表达进行阳性选择。用于细胞上的表面受体的选择的方法可以通过多种技术中的任一种来进行，如通常涉及抗体与抗体特异性试剂结合，随后通过磁性分离或荧光激活细胞分选(FACS)进行富集。

[0376] 在一些实施方案中，可以根据任何所提供的方法针对一种或多种另外的激活标记的阳性表面表达来选择细胞。在一些实施方案中，另外的选择可以与如本文所提供的针对CD39、PD-1和/或TIGIT或者CXCL13的选择一起对相同的样品来进行。在其他实施方案中，另外的选择是在与如本文所提供的针对CD39、PD-1和/或TIGIT或者CXCL13的选择相同的过程中，但是作为另外的步骤对不同的样品群体来进行。例如，在一些实施方案中，针对CD39、PD-1和/或TIGIT中的一种或多种的选择可以直接对消化的肿瘤样品或者已经如所述进行初始扩增的来自所述肿瘤样品的样品进行，并且针对另一种激活标记(例如CD137和/或CD134)的另一选择步骤可以对所述方法的后一步骤(例如在共培养后)中产生的细胞群体进行。

[0377] 在一些方面，针对一种或多种激活标记或耗竭标记的表面表达进行阳性选择。然后可以使用这些标记来选择反应性细胞。特别地，用于选择的T细胞标记包括在T细胞的抗原刺激后上调和/或特异性检测到其表达的那些，使得可以将抗原特异性效应子鉴定为正在激活或刺激所述细胞的抗原的替代物。例如，在抗原诱导的刺激后，人T细胞经历动态的功能和表型变化，包括受体分子的上调的表面表达。表面分子的上调为鉴定和分离抗原特异性T细胞(如肿瘤反应性T细胞)提供机会，所述鉴定和分离是通过上调的决定簇的抗体结合以及随后通过流式细胞术(包括通过涉及磁性分离和荧光激活细胞分选(FACS))富集来进行。

[0378] 在一些实施方案中，所述标记是以下中的一种或多种：CD107a、CD39、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD36、CD38、CD30、CD154(CD40L)、CD134(OX40)、CD152(CTLA-4)、CD160、CXCR5(CD195)、CD244、CD258(LIGHT)、CD256(APRIL)、CD272(BTLA-4)、PD-1、TIM-3、LAG-3或TIGIT。在一些实施方案中，基于至少两种或更多种这样的标记(如至少3、4、5或6种T细胞标记)的阳性表面表达来选择、富集或分离肿瘤反应性T细胞或与肿瘤反应性T细胞相关的T细胞。在一些实施方案中，基于以下中的两种或更多种的阳性表面表达来选择、富集或分离肿瘤反应性T细胞或与肿瘤反应性T细胞相关的T细胞：CD107a、CD39、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD36、CD38、CD30、CD154(CD40L)、CD134(OX40)、CD152(CTLA-4)、CD160、CXCR5(CD195)、CD244、CD258(LIGHT)、CD256(APRIL)、CD272(BTLA-4)、PD-1、TIM-3、LAG-3或TIGIT。用于细胞上的表面受体的选择的方法可以通过多种技术中的任一种来进行，如通常涉及抗体与抗体特异性试剂结合，随后通过磁性分离或荧光激活细胞分选(FACS)进行富集。

[0379] 在一些实施方案中，所述一种或多种标记是PD-1、CD39和/或TIGIT。在一些实施方案中，所述一种或多种标记是PD-1、CD39和TIGIT(PD-1/CD39/TIGIT)。

[0380] 在一些实施方案中，所述选择针对CD137(41BB)的表面表达。在一些实施方案中，

所述选择针对CD134(OX40)的表面表达。在一些实施方案中,所述选择针对CD137和CD134的表面表达。

[0381] 在一些实施方案中,使用与突变相关肽或肿瘤相关肽结合的MHC四聚体选择肿瘤反应性T细胞。在一些实施方案中,所述四聚体是使用MHC I类或MHC II类算法来制备。在一些实施方案中,将所述四聚体可检测地标记,如荧光标记。在一些实施方案中,所述四聚体与从其获得生物细胞来源的受试者是HLA匹配的。在一些实施方案中,使用MHC四聚体选择细胞是直接从来自受试者的样品的细胞来源(例如外周血)选择。在一些实施方案中,使用MHC四聚体选择细胞是在选择或富集对T细胞激活标记呈表面阳性的T细胞之后进行。

[0382] 在一些实施方案中,可以以多种方式富集或分选与所提供的方法结合使用的T细胞,所述方式包括但不限于磁珠分离、荧光细胞分选和一次性封闭盒式细胞分选仪。在特定方面,可以使用对T细胞或其子集具有特异性的一种或多种试剂(如对用于选择反应性细胞的T细胞激活标记具有特异性的试剂),所述试剂包括但不限于细胞选择设备(但不限于CliniMACS、Sony FX500或Tyto细胞分选系统(Miltenyi))上的荧光抗体、纳米颗粒或珠。

[0383] 在一些方面,可以从生物样品选择T细胞,如基于T细胞标记CD3、CD4或CD8来选择。在一些实施方案中,选择对一种或多种细胞表面标记呈表面阳性的T细胞包括用于基于这样的标记进行分离的任何方法。

[0384] 在一些实施方案中,分离是基于亲和力或基于免疫亲和力的分离。例如,在一些方面,分离包括基于一种或多种标记(通常是细胞表面标记)在细胞中的表达或表达水平来分离细胞和细胞群,例如通过用与这样的标记特异性结合的抗体或结合配偶体进行孵育,之后通常进行洗涤步骤并将已经结合所述抗体或结合配偶体的细胞与尚未结合至所述抗体或结合配偶体的那些细胞分离。在一些实施方案中,基于免疫亲和力的选择包括使包含细胞的样品(如包含含有CD3+T细胞或CD4+和CD8+细胞的T细胞(例如原代人T细胞)的大量群体的样品)与特异性结合至一种或多种细胞表面标记的抗体或结合配偶体接触。在一些实施方案中,所述抗体或结合配偶体与固体支持物或基质(如球或珠,例如纳米颗粒、微珠、纳米珠,包括琼脂糖、磁珠或顺磁珠)结合,以允许分离细胞用于阳性和/或阴性选择。在一些实施方案中,可以将球或珠填充至柱中以实现免疫亲和色谱,其中使含有细胞(如原代人T细胞,含有CD3+T细胞或CD4+和CD8+细胞)的样品与所述柱的基质接触,随后从所述柱洗脱或释放。在其他实施方案中,对所述抗体或结合配偶体进行可检测标记。

[0385] 在一些方面,将要分离的细胞的样品或组合物与小的、可磁化的或磁响应材料(如磁响应颗粒或微粒,如纳米颗粒或顺磁珠)一起孵育。磁响应材料(例如,颗粒)通常直接或间接地附着于结合配偶体(例如,抗体),所述结合配偶体与期望分离(例如,期望阴性地或阳性地选择)的一个细胞、多个细胞或细胞群体上存在的分子(例如,表面标记)特异性结合。这样的珠是已知的并且可从多种来源购得,在一些方面,所述来源包括Dynabeads®(Life Technologies,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、MACS®珠(Miltenyi Biotec,圣地亚哥,加利福尼亚州)或Streptamer®珠试剂(IBA,德国)。在一些方面,将样品置于磁场中,并且附接有磁响应或可磁化颗粒的那些细胞将被吸引至磁体并与未标记的细胞分离。对于阳性选择,保留被磁铁吸引的细胞;对于阴性选择,保留未被吸引的细胞(未标记的细胞)。

[0386] 在某些实施方案中,使样品与特异性结合至细胞表面标记的结合剂(例如,可检测标记的结合剂)接触。在某些实施方案中,对一种或多种可检测标记的结合剂进行荧光标

记。在某些实施方案中，通过流式细胞术来鉴定用对细胞表面标记具有特异性的结合剂标记的T细胞。在某些实施方案中，所述方法还包括将用一种或多种结合剂标记的任何所得T细胞与样品的其他组分分离，以产生富集对所述一种或多种细胞表面标记呈表面阳性的T细胞的组合物。可以使用细胞选择分选设备，其具有足够高的通量以操作大的体积和细胞数量。非限制性细胞分选设备包括例如Sony FX500或Tyto细胞分选系统(Miltenyi)。

[0387] 所述孵育通常在如下条件下进行：由此附着至磁性颗粒或磁珠和/或可检测标记的抗体或结合配偶体或者与这样的抗体或结合配偶体特异性结合的分子(如二抗或其他试剂)与细胞表面分子(如果在样品内的细胞上存在)特异性结合。在一些方面，可以回收与抗体结合的细胞，或者将其与样品中的未结合细胞分离。

[0388] 在一些方面，在同一选择步骤期间进行阳性与阴性选择的组合，其中保留阳性和阴性级分并进一步处理或使其经历进一步的分离步骤。这样的分离步骤可以基于阳性选择(其中保留已结合试剂的细胞以供进一步使用)和/或阴性选择(其中保留尚未结合至所述抗体或结合配偶体的细胞)。在一些例子中，保留两种级分以供进一步使用。在一些方面，在没有可用于特异性鉴定异质群体中的细胞类型的抗体的情况下，阴性选择可能特别有用，使得最好基于由除所需群体之外的细胞表达的标记进行分离。

[0389] 分离不需要导致100％富集或去除特定细胞群或表达特定标记的细胞。例如，对特定类型的细胞(如表达标记的那些)的阳性选择或富集是指增加这样的细胞的数量或百分比，但不需要使不表达所述标记的细胞完全不存在。同样，对特定类型的细胞(如表达标记的那些)的阴性选择、去除或耗尽是指减少这样的细胞的数量或百分比，但不需要使所有这样的细胞完全去除。例如，在CD4+或CD8+细胞之一的选择中，所述选择会富集所述群体，即CD4+或CD8+群体，但是也可以含有一些残留或少部分的其他未选择的细胞，其在一些情形中可以包括仍存在于富集群体中的CD4或CD8群体中的另一群体。

[0390] 在一些实施方案中，通过如下方式进行分离：通过阳性选择富集特定细胞群，或者通过阴性选择耗尽特定细胞群。在一些实施方案中，通过如下方式完成阳性或阴性选择：用与一种或多种表面标记特异性结合的一种或多种抗体或其他结合剂孵育细胞，所述一种或多种表面标记分别在阳性或阴性选择的细胞上表达(标记$^{+}$)或以相对较高的水平表达(标记^{高})。

[0391] 在特定实施方案中，T细胞群体是包括CD4+和CD8+T细胞二者的群体。许多癌症(包括实体瘤，如许多常见的上皮适应证(例如GI))表达I类和II类限制性突变。为了使T细胞产物靶向这样的适应证(例如常见的上皮适应证)，考虑识别I类MHC限制性分子的CD8+T细胞和识别II类MHC限制性分子的CD4+T细胞都是必要的。

[0392] 在一些实施方案中，所述方法还包括分离、选择和/或富集CD3+细胞。在一些实施方案中，所述方法包括分离、选择和/或富集CD4+和CD8+细胞。在一些方面，使用$CD4^{+}$或$CD8^{+}$选择步骤(如针对CD4的阳性选择和针对CD8的阳性选择)来分离$CD4^{+}$辅助T细胞与$CD8^{+}$细胞毒性T细胞。这样的选择在一些方面是同时进行的，而在其他方面按任何顺序依序进行。在一些实施方案中，所述方法包括通过选择对CD3呈表面阳性的T细胞，或者通过依序或同时选择对CD4呈表面阳性的T细胞和对CD8呈表面阳性的T细胞，来富集CD4+和CD8+T细胞。可以通过针对在肿瘤反应性T细胞上或在具有与肿瘤反应性T细胞相关的T细胞标记的表达的T细胞上表达或以相对更高程度表达的标记进行阳性或阴性选择，将这样的CD3+T细胞或者

$CD4^+$和/或$CD8^+$群体进一步分选为子群体，例如如上所述。

[0393] 在一些实施方案中，所述选择产生细胞的富集群体，如富集CD3+T细胞或者CD4+细胞和CD8+细胞的细胞群体，所述细胞对这样的T细胞标记(例如CXCL13和/或PD-1/TIGIT/CD39)中的一种或多种进一步呈阳性。在一些实施方案中，这样的细胞包括或富集肿瘤反应性T细胞或与肿瘤反应性T细胞相关的T细胞。在一些实施方案中，将细胞的富集群体用于后续处理步骤中，如涉及根据任何所提供的方法的一个或多个步骤孵育、刺激或激活和/或扩增的后续处理步骤。

[0394] 在一些实施方案中，细胞的富集群体是如上所述从起始样品富集的细胞，其中特定表型的细胞(例如如本文所述的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种T细胞激活标记呈表面阳性的CD3+T细胞)在细胞的所述富集群体中的百分比增加比这样的细胞在起始样品中的百分比大至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、500％、1000％、5000％或更多。在一些实施方案中，肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种T细胞激活标记呈表面阳性的CD3+T细胞在富集的组合物中的纯度(即对选择的细胞表面标记呈阳性的细胞相比于富集的细胞群体中总细胞的百分比)为至少90％、91％、92％、93％、94％，并且通常为至少95％、96％、97％、98％、99％或更大。

[0395] 在一些实施方案中，细胞的富集群体是如上所述从起始样品富集的细胞，其中特定表型的细胞(例如肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种T细胞标记(例如CXCL13和/或PD-1/CD39/TIGIT)呈表面阳性的CD3+T细胞)在细胞的所述富集群体中的百分比增加比这样的细胞在起始样品中的百分比大至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、500％、1000％、5000％或更多。在一些实施方案中，肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种T细胞标记呈表面阳性的CD3+T细胞在富集的组合物中的纯度(即对选择的细胞表面标记(例如CXCL13和/或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的细胞相比于富集的细胞群体中总细胞的百分比)为至少90％、91％、92％、93％、94％，并且通常为至少95％、96％、97％、98％、99％或更大。

D.用于扩增和收获的孵育

[0396] 在一些实施方案中，所提供的方法包括进行与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的群体的条件下一起孵育用于扩增选择的细胞。在进行与APC的共培养的一些实施方案中，来自共培养物的T细胞或从其选择的T细胞在共培养后在离体扩增细胞的条件下进一步孵育。所述孵育是在一种或多种T细胞刺激剂的存在下在用于刺激T细胞(如用于扩增T细胞)的条件下进行。所述一种或多种T细胞刺激剂可以包括如上文章节A.2中所述的任一种。在所提供的方法的一些方面，用于扩增的孵育扩增选择或富集的细胞，如选择对激活标记(例如CXCL13或PD-1和/或TIGIT)呈阳性的细胞。

[0397] 在所提供的实施方案中，将来自直接后续步骤(例如在如章节I.B中所述的细胞共培养之后，或者在如章节I.C.中所述在进行或不进行共培养以及进行或不进行初始扩增的情况下进行细胞选择之后)的T细胞群体在一种或多种T细胞刺激剂的存在下在用于刺激T细胞的条件下进行孵育。收获或收集含有扩增的T细胞的所述群体的扩增输出作为治疗性细胞组合物。可以用适合于将细胞施用于受试者(例如人类患者，如经由自体过继转移)的药学上可接受的赋形剂配制收获的细胞。在一些实施方案中，用冷冻保护剂配制收获的细胞并将其冷冻保存，在此情形中在施用于受试者之前将细胞的治疗性组合物解冻。

[0398] 在一些方面，用于扩增的孵育是仅在用于根据所提供的方法产生扩增的T细胞的群体的过程期间进行的扩增。在一些实施方案中，收获或收集T细胞的扩增的群体作为治疗性细胞组合物。

[0399] 在所提供的方法的其他方面，用于扩增的孵育是第二扩增并且是在已经进行初始扩增(例如，如章节1.A.2中所述)的方法中进行。例如，在初始扩增步骤后，针对对激活标记(例如CXCL13或PD-1和/或TIGIT)呈阳性的细胞对初始扩增的细胞进行选择或分选，如章节I.C中所述。然后，进行第二扩增步骤来扩增选择的细胞的群体。在一些实施方案中，收获或收集扩增的T细胞的第二群体作为治疗性细胞组合物。

[0400] 在所提供的方法的其他方面，在从含有T细胞的样品(例如单细胞悬浮液消化物)选择细胞之前不进行初始扩增，但是将所述过程结束时用于扩增的孵育分为至少两个扩增，例如第一扩增和第二扩增。例如，在一些实施方案中，T细胞群体(例如在如章节I.B中所述共培养细胞之后，或者在如章节I.C.中所述在进行或不进行共培养的情况下选择细胞之后的T细胞群体)的第一扩增是在一种或多种第一T细胞刺激剂的存在下在用于将细胞扩增为第一扩增的T细胞群体的条件下进行，然后将第一扩增的T细胞群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养，其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。在这样的实施方案中，所述一种或多种第一T细胞刺激剂以及所述一种或多种第二T细胞刺激剂是相同的。

[0401] 在一些实施方案中，使用一种或多种T细胞刺激剂的扩增培养不包括与接合CD3和共刺激分子(如CD28)的一种或多种药剂一起孵育。在一些实施方案中，使用一种或多种T细胞刺激剂的扩增培养不包括与抗CD3抗体(如OKT3)一起孵育。在一些实施方案中，使用一种或多种T细胞刺激剂的扩增培养不包括与由APC呈递的、固定在固体表面(例如珠)上的或作为可溶抗体的抗CD3(例如OKT3)/抗CD28抗体一起孵育。在一些实施方案中，使用一种或多种T细胞刺激剂的扩增培养不包括与可溶抗CD3(如OKT3)一起孵育。在一些实施方案中，使用一种或多种T细胞刺激剂的扩增培养不包括与抗CD3/抗CD28(包括固定在珠上的这样的试剂，例如如由Dynabeads所提供)一起孵育。在一些实施方案中，使用一种或多种T细胞刺激剂的扩增培养不包括与APC(如辐照的APC)一起孵育。在一些实施方案中，使用一种或多种T细胞刺激剂的扩增培养不包括与非分裂PBMC(如辐照的PBMC)一起孵育。

[0402] 在一些任何所提供的实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂选自启动TCR/CD3细胞内信号传导的药剂和/或启动经由共刺激受体的信号传导的药剂。在一些任何所提供的实施方案中，启动TCR/CD3细胞内信号传导的药剂是抗CD3抗体，如OKT3。在一些任何所提供的实施方案中，启动经由共刺激受体的信号传导的药剂包含外周血单个核细胞(PBMC)，任选地非分裂或辐照的PBMC。在一些任何所提供的实施方案中，启动经由共刺激受体的信号传导的药剂是抗CD28抗体。在一些任何所提供的实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂是各自可溶的抗CD3抗体和抗CD28抗体。

[0403] 在所提供的方法的实施方案中，刺激条件包括一种或多种药剂(例如，配体)，所述药剂开启或启动T细胞中的TCR/CD3细胞内信号传导级联和/或T细胞中的共刺激信号。这样的药剂可以包括抗体，如对TCR组分具有特异性的那些(例如，抗CD3)和/或共刺激受体(例如抗CD28或抗4-1BB)。在一些实施方案中，将这样的药剂作为可溶抗体添加至培养基。在其他实施方案中，将这样的药剂与固体支持物如珠结合。在一些实施方案中，所述一种或多种

T细胞刺激剂包括抗CD3/CD28缀合的磁珠(例如,DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T细胞扩增器)。

[0404] 抗CD3抗体可以包括针对或可以特异性结合T细胞表面上的CD3受体(通常是人T细胞上的人CD3)的任何抗体。抗CD3抗体包括OKT3,也称为莫罗单抗。抗CD3抗体还包括UHCTI克隆,也称为T3和CD3E。其他抗CD3抗体包括例如奥昔珠单抗、替利珠单抗和维西珠单抗。抗CD3抗体可以作为可溶试剂或以与珠结合的形式来添加。在特定实施方案中,抗CD3抗体是可溶的。

[0405] 在特定实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂包括抗CD3抗体,将其在孵育期间添加至细胞培养基中。在一些实施方案中,抗CD3抗体是以范围如下的浓度来添加:在为或约0.1ng/mL与50ng/mL之间,如在为或约0.5ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.5ng/mL与为或约30ng/mL之间、在为或约0.5ng/mL与为或约15ng/mL之间、在为或约0.5ng/mL与为或约5ng/mL之间、在为或约0.5ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约30ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约15ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约5ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约30ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约15ng/mL之间、在为或约15ng/mL与为或50ng/mL之间、在为或约15ng/mL与为或约30ng/mL之间或者在为或约30ng/mL与为或约50ng/mL之间,每个都包含端值。

[0406] 在特定实施方案中,抗CD3抗体是OKT3。在一个实施方案中,细胞培养基包含约0.1ng/mL、约0.5ng/mL、约1ng/mL、约2.5ng/mL、约5ng/mL、约7.5ng/mL、约10ng/mL、约15ng/mL、约20ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200ng/mL、约500ng/mL和约1μg/mL的OKT3抗体。在一个实施方案中,细胞培养基包含在0.1ng/mL与1ng/mL之间、在1ng/mL与5ng/mL之间、在5ng/mL与10ng/mL之间、在10ng/mL与20ng/mL之间、在20ng/mL与30ng/mL之间、在30ng/mL与40ng/mL之间、在40ng/mL与50ng/mL之间以及在50ng/mL与100ng/mL之间的OKT3抗体。

[0407] 在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂包括与抗CD3抗体一起孵育以及与另一药剂一起孵育,所述另一药剂与CD28特异性结合或者刺激或诱导细胞中CD28介导的信号。在一些实施方案中,CD28介导的信号可以由抗CD28抗体或其抗原结合片段启动或提供。在一些实施方案中,CD28介导的信号可以由抗原呈递饲养细胞(APC)(如外周血单个核细胞(PBMC))提供。

[0408] 在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂可以包括向T细胞群体添加饲养细胞,如非分裂外周血单个核细胞(PBMC)。在一些方面,非分裂饲养细胞可以包含γ辐照的PBMC饲养细胞。在一些实施方案中,将PBMC用范围为约3000至3600拉德的γ射线辐照,以防止细胞分裂。在一些方面,在添加T细胞群之前将饲养细胞添加至培养基中。在一些实施方案中,对于要扩增的初始群体中的每个T淋巴细胞,所得细胞群体含有至少约5、10、20或40或更多个PBMC饲养细胞。在一些实施方案中,T细胞与PBMC和/或抗原呈递细胞的比率为约1至25、约1至50、约1至100、约1至125、约1至150、约1至175、约1至200、约1至225、约1至250、约1至275、约1至300、约1至325、约1至350、约1至375、约1至400或者约1至500。

[0409] 在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂可以包括向细胞群体添加抗

CD28抗体或其抗原结合片段。抗CD28抗体可以包括针对或可以特异性结合T细胞表面上的CD28受体的任何抗体。抗CD28抗体的非限制性例子包括NA/LE(例如BD Pharmingen)、IM1376(例如Beckman Coulter)或15E8(例如Miltenyi Biotec)。抗CD28抗体可以作为可溶试剂或以与珠结合的形式来添加。在特定实施方案中,抗CD3抗体是可溶的。在一些实施方案中,抗CD28抗体是以范围如下的浓度来添加:在为或约1ng/mL与1000ng/mL之间、在为或约1ng/mL与500ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间或者在为或约500ng/mL与为或约1000ng/mL之间。

[0410] 通常,所述培养和孵育可以在重组细胞因子的存在下进行。在一些实施方案中,细胞因子被添加至培养基中或者对于培养基是外源的。在一些实施方案中,所述培养是在重组T细胞刺激细胞因子(如IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25、IL-23、IL-27和/或IL-35)的存在下进行。在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂包括重组T细胞刺激细胞因子,如IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25和/或IL-23。在一些任何所提供的实施方案中,所述培养是在选自IL-2、IL-15、IL-7、IL-21、I1-25和IL-23的重组细胞因子存在下进行。在一些实施方案中,培养和孵育是在重组IL-2、IL-15和IL-7的存在下进行。在一些实施方案中,培养是在IL-2的存在下进行。在一些实施方案中,培养是在IL-15和IL-17的存在下进行,其在一些方面不另外包括IL-2。在一些实施方案中,所述T细胞刺激细胞因子包括IL-2,所述IL-2是单独的或者与来自IL-25、IL-23、IL-27和/或IL-35另一种细胞因子组合。

[0411] 在一些实施方案中,技术人员可以熟练地选择细胞因子或细胞因子组合,只要所述一种或多种细胞因子提供活性刺激T细胞扩增或增殖。刺激肿瘤反应性T细胞的活性可以是直接的或间接的。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子直接刺激肿瘤反应性T细胞增殖。在一些实施方案中,一种或多种细胞因子抑制T调节T细胞,从而间接刺激或增强所需肿瘤反应性T细胞的增殖。

[0412] 重组细胞因子通常是重组人蛋白。在特定实施方案中,重组细胞因子在孵育期间以以下浓度存在于细胞培养基中:至少或至少约0.5IU/mL、至少或至少约1.0IU/mL、至少或至少约5IU/mL、至少或至少约或者为或约10IU/mL、至少或至少约或者为或约100IU/mL、至少或至少约或者为或约1000IU/mL、至少或至少约或者为或约1500IU/mL、至少或至少约或者为或约2000IU/mL、至少或至少约或者为或约2500IU/mL、至少或至少约或者为或约3000IU/mL、至少或至少约或者为或约3500IU/mL、至少或至少约或者为或约4000IU/mL、至少或至少约或者为或约4500IU/mL、至少或至少约或者为或约5000IU/mL、至少或至少约或者为或约5500IU/mL、至少或至少约或者为或约6000IU/mL、至少或至少约或者为或约6500IU/mL、至少或至少约或者为或约7000IU/mL、至少或至少约或者为或约7500IU/mL,或者至少或至少约或者为或约8000IU/mL。在一个实施方案中,细胞培养基包含在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间、为或约100IU/mL与为或约1000IU/mL之间、为或约1000与为或约2000IU/mL之间、在为或约2000与为或约3000IU/mL之间、在为或约3000与为或约4000IU/mL之间、在为或约4000与为或约5000IU/mL之间、在为或约5000与为或约6000IU/mL之间、在为或约6000与为或约7000IU/mL之间、在为或约7000与为或约8000IU/mL之间,每个

都包含端值。

[0413] 在一些实施方案中，重组IL-2存在于细胞培养基中。在一些实施方案中，重组IL-2是以以下浓度被添加至培养基：在为或约10IU/mL与为或约1000IU/mL之间，如在为或约10IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约600IU/mL之间或者在为或约600IU/mL与为或约1000IU/mL之间。在一些实施方案中，重组IL-2是以在50与400IU/mL之间的量存在。

[0414] 在一些实施方案中，孵育是用更高剂量IL-2来进行。在一些方面，IL-2是添加至培养的唯一重组细胞因子。在一些实施方案中，重组IL-2是以以下浓度被添加至培养基：在为或约1000IU/mL与为或约8000IU/mL之间，如在为或约1000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、2000IU/mL为或约8000IU/mL、在为或约2000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、4000IU/mL为或约8000IU/mL、在为或约4000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约4000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约4000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约5000IU/mL与为或约8000IU/mL之间、在为或约5000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约5000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约6000IU/mL与为或约8000IU/mL之间、在为或约6000IU/mL与为或约7000IU/mL之间或者在为或约7000IU/mL与为或约8000IU/mL之间。在一些实施方案中，重组IL-2是以为或为约6000IU/mL的量存在。

[0415] 在一些实施方案中，重组IL-15存在于细胞培养基中。在一些实施方案中，重组IL-15是以以下浓度被添加至培养基：在为或约10IU/mL与500IU/mL之间，如在为或约10IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约70IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约30IU/mL之间、在为或约30IU/mL与500IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约70IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约70IU/

mL之间、在为或约70IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约300IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间或者在为或约400IU/mL与为或约500IU/mL之间。在一些实施方案中，将IL-15以在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间的量添加至培养基。在一些实施方案中，将IL-15以为或约180IU/mL添加至培养基。

[0416] 在一些实施方案中，孵育是用更高剂量IL-15来进行。

[0417] 在一些实施方案中，重组IL-15是以以下浓度被添加至培养基：在为或约500IU/mL与为或约5000IU/mL之间，如在为或约500IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约750IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约5000IU/mL之间，如在为或约2000IU/mL与为或约4000IU/mL之间或者在为或约4000IU/mL与为或约5000IU/mL之间。在一些实施方案中，重组IL-15是以以下浓度被添加至细胞培养基：为或约500IU/mL、为或约600IU/mL、为或约700IU/mL、为或约800IU/mL、为或约900IU/mL、为或约1000IU/mL、为或约1100IU/mL、为或约1200IU/mL、为或约1300IU/mL、为或约1400IU/mL、为或约1500IU/mL、为或约1600IU/mL、为或约1700IU/mL、为或约1800IU/mL、为或约1900IU/mL或者为或约2000IU/mL，或者前述任一项之间的任何浓度。在一些实施方案中，IL-15是以为或约1000IU/mL的浓度被添加至培养基。

[0418] 在一些实施方案中，所述扩增是在以500IU/mL至2000IU/mL(例如为或约1000IU/mL)的浓度添加的重组IL-15的存在下进行。在一些实施方案中，所述扩增是在以为或约1000IU/mL的浓度添加的重组IL-15的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基。

[0419] 在一些实施方案中，将重组IL-15和IL-2添加至培养基。在一些实施方案中，重组IL-15是以500IU/mL至2000IU/mL(例如为或约1000IU/mL)的浓度添加，并且重组IL-2是以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加。在一些实施方案中，所述扩增是在以1000IU/mL添加的重组IL-15和以300IU/mL添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-7、IL-21、IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基。

[0420] 在一些实施方案中，将重组IL-7添加至培养基。在一些实施方案中，重组IL-7是以

以下浓度被添加至培养基:在为或约100IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约800IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约800IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约800IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约2000IU/mL之间。在一些实施方案中,将IL-7以在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间的量添加至培养基。在一些实施方案中,将IL-7以为或约600IU/mL添加至培养基。

[0421] 在一些实施方案中,将重组IL-7和IL-2添加至培养基。在一些实施方案中,重组IL-7是以400IU/mL至2000IU/mL(例如为或约600IU/mL或1000IU/mL)的浓度添加,并且重组IL-2是以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加。在一些实施方案中,所述扩增是在以1000IU/mL添加的重组IL-7和以300IU/mL添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中,所述扩增是在以600IU/mL添加的重组IL-7和以300IU/mL添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中,将来自IL-15、IL-21、IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基。

[0422] 在一些实施方案中,将重组IL-15和IL-7添加至培养基。在一些实施方案中,重组IL-15是以500IU/mL至2000IU/mL(例如为或约1000IU/mL)的浓度添加,并且重组IL-7是以400IU/mL至2000IU/mL(例如为或约600IU/mL或1000IU/mL)的浓度添加。在一些实施方案中,所述扩增是在以1000IU/mL添加的重组IL-15和以1000IU/mL添加的重组IL-7的存在下进行。在一些实施方案中,所述扩增是在以1000IU/mL添加的重组IL-15和以600IU/mL添加的重组IL-7的存在下进行。在一些实施方案中,将来自IL-2、IL-21、IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基。

[0423] 在一些实施方案中,将重组IL-21添加至培养基。在一些实施方案中,重组IL-21是以以下浓度被添加至培养基:在为或约0.5IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约5IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约2.5IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约1IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约5IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约2.5IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约5IU/mL之间、在为或约5IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约5IU/mL与

为或约15IU/mL之间、在为或约5IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约15IU/mL之间或者在为或约15IU/mL与为或约20IU/mL之间。在一些实施方案中，将IL-21以在为或约0.5IU/mL与为或约2.5IU/mL之间的量添加至培养基。在一些实施方案中，将IL-21以为或约1IU/mL添加至培养基。

[0424] 在一些实施方案中，孵育是用更高剂量IL-21来进行。

[0425] 在一些实施方案中，重组IL-21是以以下浓度被添加至培养基：在为或约500IU/mL与为或约5000IU/mL之间，如在为或约500IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约750IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约5000IU/mL之间，如在为或约2000IU/mL与为或约4000IU/mL之间或者在为或约4000IU/mL与为或约5000IU/mL之间。在一些实施方案中，重组IL-21是以以下浓度被添加至细胞培养基：为或约500IU/mL、为或约600IU/mL、为或约700IU/mL、为或约800IU/mL、为或约900IU/mL、为或约1000IU/mL、为或约1100IU/mL、为或约1200IU/mL、为或约1300IU/mL、为或约1400IU/mL、为或约1500IU/mL、为或约1600IU/mL、为或约1700IU/mL、为或约1800IU/mL、为或约1900IU/mL或者为或约2000IU/mL，或者前述任一项之间的任何浓度。在一些实施方案中，IL-21是以为或约1000IU/mL的浓度被添加至培养基。

[0426] 在一些实施方案中，将重组IL-21和IL-2添加至培养基。在一些实施方案中，重组IL-21是以500IU/mL至2000IU/mL(例如为或约1000IU/mL)的浓度添加，并且重组IL-2是以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加。在一些实施方案中，所述扩增是在以1000IU/mL添加的重组IL-21和以300IU/mL添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-7、IL-15、IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基。

[0427] 在一些实施方案中，将重组IL-23添加至培养基。在一些实施方案中，重组IL-23是以以下浓度被添加至培养基：在为或约1nM与为或约500nM之间，如在为或约1nM与为或约400nM之间、在为或约1nM与为或约300nM之间、在为或约1nM与为或约200nM之间、在为或约1nM与为或约100nM之间、在为或约1nM与为或约50nM之间、在为或约1nM与为或约25nM之间、在为或约1nM与为或约10nM之间、在为或约1nM与为或约5nM之间、在为或约5nM与为或约500nM之间、在为或约5nM与为或约400nM之间、在为或约5nM与为或约300nM之间、在为或约5nM与为或约200nM之间、在为或约5nM与为或约100nM之间、在为或约5nM与为或约50nM之间、在为或约5nM与为或约25nM之间、在为或约5nM与为或约10nM之间、在为或约10nM与为或约500nM之间、在为或约10nM与为或约400nM之间、在为或约10nM与为或约300nM之间、在为或约10nM与为或约200nM之间、在为或约10nM与为或约100nM之间、在为或约10nM与为或约50nM之间、在为或约10nM与为或约25nM之间、在为或约25nM与为或约500nM之间、在为或约

25nM与为或约400nM之间、在为或约25nM与为或约300nM之间、在为或约25nM与为或约200nM之间、在为或约25nM与为或约100nM之间、在为或约25nM与为或约50nM之间、在为或约50nM与为或约500nM之间、在为或约50nM与为或约400nM之间、在为或约50nM与为或约300nM之间、在为或约50nM与为或约200nM之间、在为或约50nM与为或约100nM之间、在为或约100nM与为或约500nM之间、在为或约100nM与为或约400nM之间、在为或约100nM与为或约300nM之间、在为或约100nM与为或约200nM之间、在为或约200nM与为或约500nM之间、在为或约200nM与为或约400nM之间、在为或约200nM与为或约300nM之间、在为或约300nM与为或约500nM之间、在为或约300nM与为或约400nM之间或者在为或约400nM与为或约500nM之间。在一些实施方案中，重组IL-23是以以下浓度被添加至培养基：为或约5nM、为或约10nM、为或约20nM、为或约30nM、为或约40nM、为或约50nM、为或约60nM、为或约70nM、为或约80nM、为或约90nM或者为或约100nM，或者前述任一项之间的任何值。

[0428] 在一些实施方案中，重组IL-23是以以下浓度被添加至培养基：在为或约0.1ng/mL与为或约1000ng/mL之间，如在为或约0.1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约500ng/mL之间或者在为或约500ng/mL与为或约1000ng/mL之间。在一些实施方案中，重组IL-23是以以下浓度被添加至培养基：为或约1ng/mL、为或约5ng/mL、为或约10ng/mL、为或约20ng/mL、为或约30ng/mL、为或约40ng/mL、为或约50ng/mL、为或约60ng/mL、为或约70ng/mL、为或约80ng/mL、为或约90ng/mL或者为或约100ng/mL，或者前述任一项之间的任何值。

[0429] 在一些实施方案中，重组IL-23是以以下浓度被添加至培养基：为或约1ng/mL、为或约5ng/mL、为或约10ng/mL、为或约20ng/mL、为或约30ng/mL、为或约40ng/mL、为或约50ng/mL、为或约60ng/mL、为或约70ng/mL、为或约80ng/mL、为或约90ng/mL或者为或约100ng/mL，或者前述任一项之间的任何值。

[0430] 在一些实施方案中，重组IL-23是以以下浓度被添加至培养基：为或约200ng/mL、为或约300ng/mL、为或约400ng/mL、为或约500ng/mL、为或约600ng/mL、为或约700ng/mL、为或约800ng/mL、为或约900ng/mL、为或约1000ng/mL、为或约1200ng/mL、为或约1400ng/mL或者为或约1600ng/mL、为或约1800ng/mL或者为或约2000ng/mL，或者前述任一项之间的任何值。

[0431] 在一些实施方案中，将重组IL-2和重组IL-23添加至培养基。在一些实施方案中，

重组IL-2是以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加,并且重组IL-23是以100ng/mL至2000ng/mL(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间,如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加。在一些实施方案中,扩增(例如第二扩增)是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和在100ng/mL与2000ng/mL之间(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间,如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加的重组IL-23的存在下进行。在一些实施方案中,将来自IL-7、IL-21、IL-15、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基。

[0432] 在一些实施方案中,将重组IL-25添加至培养基。在一些实施方案中,重组IL-25是以在为或约0.001nM与为或约10nM之间的浓度被添加至培养基,如以下浓度:在为或约0.001nM与为或约5nM之间、在为或约0.001nM与为或约2.5nM之间、在为或约0.001nM与为或约1nM之间、在为或约0.001nM与为或约0.5nM之间、在为或约0.001nM与为或约0.1nM之间、在为或约0.001nM与为或约0.05nM之间、在为或约0.001nM与为或约0.01nM之间、在为或约0.001nM与为或约0.005nM之间、在为或约0.005nM与为或约10nM之间、在为或约0.005nM与为或约5nM之间、在为或约0.005nM与为或约2.5nM之间、在为或约0.005nM与为或约1nM之间、在为或约0.005nM与为或约0.5nM之间、在为或约0.005nM与为或约0.1nM之间、在为或约0.005nM与为或约0.05nM之间、在为或约0.005nM与为或约0.01nM之间、在为或约0.01nM与为或约10nM之间、在为或约0.01nM与为或约5nM之间、在为或约0.01nM与为或约2.5nM之间、在为或约0.01nM与为或约1nM之间、在为或约0.01nM与为或约0.5nM之间、在为或约0.01nM与为或约0.1nM之间、在为或约0.01nM与为或约0.05nM之间、在为或约0.05nM与为或约10nM之间、在为或约0.05nM与为或约5nM之间、在为或约0.05nM与为或约2.5nM之间、在为或约0.05nM与为或约1nM之间、在为或约0.05nM与为或约0.5nM之间、在为或约0.05nM与为或约0.1nM之间、在为或约0.1nM与为或约10nM之间、在为或约0.1nM与为或约5nM之间、在为或约0.1nM与为或约2.5nM之间、在为或约0.1nM与为或约1nM之间、在为或约0.1nM与为或约0.5nM之间、在为或约0.5nM与为或约10nM之间、在为或约0.5nM与为或约5nM之间、在为或约0.5nM与为或约2.5nM之间、在为或约0.5nM与为或约1nM之间、在为或约1nM与为或约10nM之间、在为或约1nM与为或约5nM之间、在为或约1nM与为或约2.5nM之间、在为或约2.5nM与为或约10nM之间、在为或约2.5nM与为或约5nM之间或者在为或约5nM与为或约10nM之间。在一些实施方案中,重组IL-25是以以下浓度被添加至培养基:为或约0.01nM、0.02nM、0.03nM、0.04nM、0.05nM、0.06nM、0.07nM、0.08nM、0.09nM或1nM、1.5nM或2nM,或者前述任一项之间的任何值。

[0433] 在一些实施方案中,重组IL-25是以以下浓度被添加至培养基:在为或约0.01ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约20ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约5ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约0.05ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约20ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约

10ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约5ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约20ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约5ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约20ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约20ng/mL之间、在为或约20ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约20ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约20ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约20ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约250ng/mL之间或者在为或约250ng/mL与为或约500ng/mL之间。在一些实施方案中，重组IL-25是以以下浓度被添加至培养基：为或约1ng/mL、为或约2ng/mL、为或约3ng/mL、为或约4ng/mL、为或约5ng/mL、为或约6ng/mL、为或约7ng/mL、为或约8ng/mL、为或约9ng/mL、为或约10ng/mL、为或约15ng/mL或者为或约20ng/mL，或者前述任一项之间的任何值。

[0434] 在一些实施方案中，重组IL-25是以以下浓度被添加至培养基：在为或约0.1ng/mL与为或约2000ng/mL之间，如在为或约0.1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约500ng/mL之间或者在为或约500ng/mL与为或约1000ng/mL之间。

[0435] 在一些实施方案中，重组IL-25是以以下浓度被添加至培养基：为或约1ng/mL、为或约5ng/mL、为或约10ng/mL、为或约20ng/mL、为或约30ng/mL、为或约40ng/mL、为或约50ng/mL、为或约60ng/mL、为或约70ng/mL、为或约80ng/mL、为或约90ng/mL或者为或约100ng/mL，或者前述任一项之间的任何值。

[0436] 在一些实施方案中，重组IL-25是以以下浓度被添加至培养基：为或约200ng/mL、为或约300ng/mL、为或约400ng/mL、为或约500ng/mL、为或约600ng/mL、为或约700ng/mL、为

或约800ng/mL、为或约900ng/mL、为或约1000ng/mL、为或约1200ng/mL、为或约1400ng/mL或者为或约1600ng/mL、为或约1800ng/mL或者为或约2000ng/mL，或者前述任一项之间的任何值。

[0437] 在一些实施方案中，将重组IL-2和重组IL-25添加至培养基。在一些实施方案中，重组IL-2是以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加，并且重组IL-25是以100ng/mL至2000ng/mL(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加。在一些实施方案中，所述扩增(例如第二扩增)是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以在100ng/mL与2000ng/mL之间(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加的重组IL-25的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-7、IL-21、IL-15、IL-23、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基。

[0438] 在一些实施方案中，重组IL-27是以以下浓度被添加至培养基：在为或约0.1ng/mL与为或约2000ng/mL之间，如在为或约0.1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约500ng/mL之间或者在为或约500ng/mL与为或约1000ng/mL之间。在一些实施方案中，所述浓度是在400ng/mL与500ng/mL之间。

[0439] 在一些实施方案中，重组IL-27是以以下浓度被添加至培养基：为或约200ng/mL、为或约300ng/mL、为或约400ng/mL、为或约500ng/mL、为或约600ng/mL、为或约700ng/mL、为或约800ng/mL、为或约900ng/mL、为或约1000ng/mL、为或约1200ng/mL、为或约1400ng/mL或者为或约1600ng/mL、为或约1800ng/mL或者为或约2000ng/mL，或者前述任一项之间的任何值。

[0440] 在一些实施方案中，将重组IL-2和重组IL-27添加至培养基。在一些实施方案中，重组IL-2是以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加，并且重组IL-27是以100ng/mL至2000ng/mL(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加。在一些实施方案中，所述扩增(例如第二扩增)是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以在100ng/mL与2000ng/mL之间(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、

为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加的重组IL-27的存在下进行。在一些实施方案中,将来自IL-7、IL-21、IL-15、IL-23、IL-25或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基。

[0441] 在一些实施方案中,重组IL-35是以以下浓度被添加至培养基:在为或约0.1ng/mL与为或约2000ng/mL之间,如在为或约0.1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约500ng/mL之间或者在为或约500ng/mL与为或约1000ng/mL之间。在一些实施方案中,所述浓度是在400ng/mL与500ng/mL之间。

[0442] 在一些实施方案中,重组IL-35是以以下浓度被添加至培养基:为或约200ng/mL、为或约300ng/mL、为或约400ng/mL、为或约500ng/mL、为或约600ng/mL、为或约700ng/mL、为或约800ng/mL、为或约900ng/mL、为或约1000ng/mL、为或约1200ng/mL、为或约1400ng/mL或者为或约1600ng/mL、为或约1800ng/mL或者为或约2000ng/mL,或者前述任一项之间的任何值。

[0443] 在一些实施方案中,将重组IL-2和重组IL-35添加至培养基。在一些实施方案中,重组IL-2是以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加,并且重组IL-35是以100ng/mL至2000ng/mL(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间,如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加。在一些实施方案中,所述扩增(例如第二扩增)是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以在100ng/mL与2000ng/mL之间(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间,如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加的重组IL-35的存在下进行。在一些实施方案中,将来自IL-7、IL-21、IL-15、IL-23、IL-25或IL-27的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基。

[0444] 在所提供的实施方案中,该扩增(例如第二扩增)可以在T细胞佐剂(如章节II中所述的任一种)的存在下进行。在一些方面,所述T细胞佐剂是共刺激激动剂,如肿瘤坏死因子超家族受体(TNFSR)激动剂,包括但不限于OX40和41BB的激动剂。在一些实施方案中,所述T细胞佐剂是细胞凋亡抑制剂,包括但不限于半胱天冬酶抑制剂或Fas/Fas配体轴的抑制剂。这些可溶激动剂和细胞凋亡抑制剂可以在培养中存在长达扩增步骤的最大培养时间或最小24小时。

[0445] 可以将分选或选择的T细胞在一种或多种刺激条件下在适合于细胞扩增的培养器皿中进行扩增。在一些实施方案中,所述培养器皿是透气性培养器皿,如G-Rex系统(例如G-Rex 10、G-Rex 10M、G-Rex 100M/100M-CS或G-Rex 500M/500M-CS)。在一些实施方案中,所述培养器皿是微量板、烧瓶、棒或适合于在封闭系统中扩增细胞的其他培养器皿。在一些实施方案中,扩增可以在生物反应器中进行。在一些实施方案中,将扩增的T细胞的组合物从封闭系统中取出并置于和/或连接至用于扩增的生物反应器。分选或选择的T细胞可以使用细胞扩增系统通过将所述细胞转移至透气性袋来扩增,所述透气性袋例如与生物反应器(例如Xuri细胞扩增系统W25(GE Healthcare))连接。在一个实施方案中,细胞扩增系统包括培养器皿,如袋,例如透气性细胞袋,其容积为约50mL、约100mL、约200mL、约300mL、约400mL、约500mL、约600mL、约700mL、约800mL、约900mL、约1L、约2L、约3L、约4L、约5L、约6L、约7L、约8L、约9L和约10L,或者前述任一项之间的任何值。在一些实施方案中,所述过程是自动化的或半自动化的。用于自动化灌注扩增的合适生物反应器的例子包括但不限于GE Xuri W25、GE Xuri W5、Sartorius BioSTAT RM 20|50、Finesse SmartRocker生物反应器系统和Pall XRS生物反应器系统或Miltenyi Prodigy。在一些方面,扩增培养是在静态条件下进行。在一些实施方案中,扩增培养是在摇摆条件下进行。培养基可以以推注来添加或者可以按灌注时间表来添加。在一些实施方案中,生物反应器将温度维持在为或接近37℃,并且将CO2水平维持在为或接近5%,且将稳定气流维持在为、为约或至少0.01L/min、0.05L/min、0.1L/min、0.2L/min、0.3L/min、0.4L/min、0.5L/min、1.0L/min、1.5L/min或2.0L/min或大于2.0L/min。在某些实施方案中,培养的至少一部分用灌注进行,如速率为290ml/天、580ml/天和/或1160ml/天。

[0446] 在一些实施方案中,将细胞以$0.5x10^6$个细胞/mL至$1.5x10^6$个细胞/mL的密度接种于适当培养器皿(例如透气性袋)中。在一些实施方案中,所述密度是为或约$0.5x10^6$个细胞/mL、$0.75x10^6$个细胞/mL、$1x10^6$个细胞/mL、$1.25x10^6$个细胞/mL或$1.5x10^6$个细胞/mL,或者前述任一项之间的任何值。

[0447] 在一些方面,在灌注启用的自动化封闭扩增系统中扩增细胞。灌注可以将培养基连续添加至细胞中,以确保实现最佳生长速率。

[0448] 在一些实施方案中,扩增是使用Xuri细胞扩增系统生物反应器来进行。可以以0.5-1.5百万个细胞/mL接种细胞。可以在静态或摇摆条件下培养细胞。可以以推注或者按灌注时间表添加培养基。在实施方案中,生物反应器将温度维持在为或接近37℃,并且将CO2水平维持在为或接近5%。可以将培养物的体积维持在大约0.5L至1.0L。在一些实施方案中,所述扩增进行7-14天,如7-10天。在一些方面,在所述扩增后,扩增产生1亿个至500亿个细胞和/或导致10至1000倍扩增的扩增倍数。

[0449] 在一些实施方案中,扩增是使用Miltenyi Prodigy生物反应器进行。可以以0.5-1.5百万个细胞/mL接种细胞。可以在静态或振荡条件下培养细胞。可以以推注或者按灌注时间表添加培养基。在实施方案中,生物反应器将温度维持在为或接近37℃,并且将CO2水平维持在为或接近5%。可以将培养体积维持在大约70mL至400mL。在一些实施方案中,扩增进行7-14天,如7-10天。在一些方面,在所述扩增后,扩增产生1亿个至30亿个细胞和/或导致10至1000倍扩增。

[0450] 在一些实施方案中,扩增是使用透气性袋进行。可以以0.5-1.5百万个细胞/mL接

种细胞。在静态条件下培养细胞。在实施方案中，生物反应器将温度维持在为或接近37℃，并且将CO2水平维持在为或接近5％。在这样的方面，在细胞浓度超过2.0百万个细胞/mL时，可以添加培养基以使细胞浓度达到0.5与1.0百万个细胞/mL之间。如果体积达到袋的最大容积，则将细胞添加至更大的袋或多个袋中，用于在相同条件下培养。在一些实施方案中，扩增进行7-14天，如7-10天。

[0451] 扩增方法可以在GMP条件下进行，包括在封闭的自动化系统中且使用无血清培养基。在一些实施方案中，所述方法的任何一个或多个步骤可以在封闭系统中或者在GMP条件下进行。在某些实施方案中，所有过程操作都是在GMP套件中进行。在一些实施方案中，使用封闭系统进行用于制造、生成或产生细胞疗法的方法的一个或多个其他处理步骤。在一些实施方案中，一个或多个或者所有处理步骤(例如，分离、选择和/或富集、处理、培养步骤，包括与细胞扩增结合的孵育)以及配制步骤使用集成式或自容式系统中的系统、装置或设备，和/或以自动化或可编程方式来进行。在一些方面，所述系统或设备包括与所述系统或设备通信的计算机和/或计算机程序，其允许用户对处理、分离、工程化和配制步骤的各个方面进行编程、控制、结果评估和/或调整。

[0452] 在一些实施方案中，用于扩增肿瘤反应性细胞的与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育进行为或约1天至35天，如1天至28天。在一些实施方案中，进行所述孵育直至达到来自输入样品的肿瘤反应性T细胞或T细胞的如下扩增倍数：至少10倍、至少20倍、至少50倍、至少100倍、至少200倍、至少400倍、至少500倍、至少600倍、至少700倍、至少800倍、至少900倍、至少1000倍、至少1250倍、至少1500倍、至少2000倍、至少2500倍、至少3000倍、至少3500倍、至少4000倍、至少4500倍、至少5000倍或更多。

[0453] 在一些实施方案中，用于扩增的与T细胞刺激剂一起孵育持续为或约1天，如通常为或约2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天或30天，或者前述任一项之间的任何时间范围。在一些实施方案中，用于扩增的孵育持续为或约7天至28天。在一些实施方案中，用于扩增的孵育持续约7天至21天。在一些实施方案中，用于扩增的孵育持续约7天至14天。

[0454] 在一些实施方案中，用于扩增肿瘤反应性细胞的与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育进行为或约1天，如通常为或约2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天，或者前述任一项之间的任何时间范围。在一些实施方案中，用于扩增肿瘤反应性细胞的与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育进行7-21天，如7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天或21天，或者前述任一项之间的任何值。在一些实施方案中，所述孵育进行7-14天。在一些实施方案中，所述孵育进行7-10天。在一些实施方案中，所述孵育持续为或约7天。在一些实施方案中，所述孵育持续为或约8天。在一些实施方案中，所述孵育持续为或约9天。在一些实施方案中，所述孵育持续为或约10天。

[0455] 在一些实施方案中，将用于扩增(例如在针对激活标记如PD-1、CD39和/或TIGIT选择细胞后)的与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育分为两个扩增期，例如第一扩增和第二扩增。在一些实施方案中，扩增的总持续时间可以是如上所述的任何持续时间。在一些实施方案中，第一扩增包括与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育1-21天，如1-14天。在一些实施方案中，第一扩增包括与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育7-21天，如7天、8天、9天、10天、11

天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天或21天，或者前述任一项之间的任何值。在一些实施方案中，用于第一扩增的孵育进行7-14天。在一些实施方案中，用于第一扩增的孵育进行7-10天。在一些实施方案中，所述孵育持续为或约7天。在一些实施方案中，用于第一扩增的孵育持续为或约8天。在一些实施方案中，用于第一扩增的孵育持续为或约9天。在一些实施方案中，用于第一扩增的孵育持续为或约10天。在一些实施方案中，第二扩增包括与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育1-21天，如1-14天。在一些实施方案中，第二扩增包括与一种或多种T细胞刺激剂一起孵育7-21天，如7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天或21天，或者前述任一项之间的任何值。在一些实施方案中，用于第二扩增的孵育进行7-14天。在一些实施方案中，用于第二扩增的孵育进行7-10天。在一些实施方案中，用于第二扩增的孵育持续为或约7天。在一些实施方案中，用于第二扩增的孵育持续为或约8天。在一些实施方案中，用于第二扩增的孵育持续为或约9天。在一些实施方案中，用于第二扩增的孵育持续为或约10天。

[0456] 在一些情形中，在培养或孵育的时间期间，可以每天、每隔一天、每隔两天、每隔四天或一周一次更换培养基。在一些实施方案中，在每次培养基更换时补充刺激剂(例如细胞因子、抗CD3)。

[0457] 在一些实施方案中，进行用于根据任何所提供的方法扩增细胞的培养方法直至获得阈值量的细胞，如肿瘤反应性细胞或对一种或多种T细胞激活标记呈阳性的细胞。在一些实施方案中，进行用于根据任何所提供的方法扩增细胞的培养方法直至从富集淋巴细胞的时间起长达30天。在一些实施方案中，进行用于根据任何所提供的方法扩增细胞的培养方法直至在第一扩增开始后长达20天。在一些实施方案中，进行用于根据任何所提供的方法扩增细胞的培养方法直至在共培养开始后长达20天。在一些任何所提供的实施方案中，在包含肿瘤反应性细胞的T细胞的培养和/或富集开始后20天内进行收获。在一些任何所提供的实施方案中，在培养开始后7至20天、7至14天、7至10天、10至20天、10至14天或14至20天收获细胞。应理解，提及天数时是关于细胞存在于培养中的天数，并且不包括来自任何一个或多个步骤的细胞可以在用于冷冻保存的条件下储存的时间。在一些任何所提供的实施方案中，进行培养直至实现细胞的如下阈值量：在为或约$0.5x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$0.5x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、在$0.5x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$0.5x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$0.5x10^8$与为或约$15x10^8$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$0.5x10^8$与为或约$8x10^8$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$0.5x10^8$与为或约$3.5x10^8$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$0.5x10^8$与为或约$1x10^8$之间的总细胞或总活细胞、在$1x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$1x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、在$1x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$1x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$1x10^8$与为或约$15x10^8$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$1x10^8$与为或约$8x10^8$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$1x10^8$与为或约$3.5x10^8$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$3.5x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$3.5x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$3.5x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$3.5x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$3.5x10^8$与为或约$15x10^8$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$3.5x10^8$与为或约$8x10^8$之间

的总细胞或总活细胞、在为或约$8x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$8x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$8x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$8x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$8x10^8$与为或约$15x10^8$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$15x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$15x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$15x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$15x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$60x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$60x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$60x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$12x10^9$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、在为或约$12x10^9$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞或者在为或约$30x10^9$与为或约$60x10^9$之间的总细胞或总活细胞，每个都包含端值。

[0458] 在一些任何所提供的实施方案中，进行培养直至实现至少或大于为或约$500x10^6$个肿瘤反应性T细胞或T细胞或其活细胞的细胞阈值量。

[0459] 在一些任何所提供的实施方案中，所述方法导致T细胞的倍数扩增或导致肿瘤反应性T细胞的倍数扩增，所述扩增倍数是至少或至少约2倍、至少或至少约5倍、至少或至少约10倍、至少或至少约25倍、至少或至少约50倍、至少或至少约100倍、至少或至少约250倍、至少或至少约500倍、至少或至少约1000倍或更多。在一些情形中，所述扩增倍数是至少或至少约2000倍、3000倍、4000倍、5000倍或更多。

[0460] 在扩增后达到治疗剂量后，可以将产物浓缩并在冷冻保存介质中冷冻。本文还提供通过本文所述的方法产生的T细胞的群体及其药物组合物。

[0461] 在一些任何所提供的实施方案中，所述方法还包括用冷冻保护剂配制收获的细胞。在一些实施方案中，冷冻保护剂选自甘油、丙二醇、二甲亚砜(DMSO)或其组合。在一些实施方案中，冷冻保护剂包括DMSO。在一些实施方案中，冷冻保护剂是DMSO。

[0462] 在一些实施方案中，用含有1.0％至30％ DMSO溶液(如5％至20％ DMSO溶液或5％至10％ DMSO溶液)的冷冻保存溶液配制细胞。在一些实施方案中，冷冻保存剂溶液是或含有例如含有20％ DMSO和8％人血清白蛋白(HSA)的PBS、或其他合适的细胞冷冻介质。在一些实施方案中，冷冻保存剂溶液是或含有例如至少或约7.5％ DMSO。在一些实施方案中，处理步骤可以涉及洗涤收获的细胞以替代冷冻保存溶液中的细胞。在一些实施方案中，在介质和/或溶液中冷冻(例如，冷冻保存或冷冻保护)细胞，所述介质和/或溶液具有终浓度为或为约12.5％、12.0％、11.5％、11.0％、10.5％、10.0％、9.5％、9.0％、8.5％、8.0％、7.5％、7.0％、6.5％、6.0％、5.5％或5.0％的DMSO，或者在1％与15％之间、在6％与12％之间、在5％与10％之间或在6％与8％之间的DMSO。在特定实施方案中，在介质和/或溶液中冷冻(例如，冷冻保存或冷冻保护)细胞，所述介质和/或溶液具有终浓度为或为约5.0％、4.5％、4.0％、3.5％、3.0％、2.5％、2.0％、1.5％、1.25％、1.0％、0.75％、0.5％或0.25％的HSA，或者在0.1％与-5％之间、在0.25％与4％之间、在0.5％与2％之间或在1％与2％之间的HSA。

II.T细胞调节剂或佐剂

[0463] 在一些实施方案中，所提供的方法的涉及离体培养含有肿瘤反应性T细胞的T细胞群体的一个或多个步骤(包括如上文章节I中所述的方法的一个或多个步骤)可以包括将细

胞与另外的调节剂(如细胞凋亡抑制剂或T细胞佐剂,包括药学激动剂)一起培养或孵育。将一种或多种调节剂或T细胞佐剂添加至T细胞的制造可以增加离体T细胞的功能性以及用于体内治疗方法中。在特定实施方案中,与非反应性细胞相比,这样的方法可以富集用于扩增反应性T细胞,并且促进反应性T细胞在离体培养中的存活和生长。考虑到所提供的方法可以以比现有方法显著更高的程度增加扩增至治疗剂量和/或针对治疗效果增加T细胞疗法的功能性。

[0464] 在一些实施方案中,所述方法的一个或多个步骤中用于孵育或培养的方法可以另外包括(1)使用一种或多种调节剂,例如另外的T细胞佐剂,如在一种或多种标准T细胞刺激剂(如抗CD3和/或重组细胞因子,例如IL-2)之前或同时使用。

[0465] 在特定实施方案中,所述调节剂或T细胞佐剂(如共刺激激动剂或细胞凋亡抑制剂)是可溶性蛋白,如没有结合或附着至固体表面(例如珠或其他固体支持物)的蛋白质。所述调节剂或T细胞佐剂可以包括小分子、肽或蛋白质。这样的T细胞佐剂包括可溶配体、抗体或抗原结合片段或其他结合剂。在一些实施方案中,共刺激激动剂可以包括与共刺激分子(如4-1BB或OX40)特异性结合以诱导或刺激细胞中的共刺激信号的分子。在一些实施方案中,细胞凋亡抑制剂可以包括与介导或参与诱导细胞的细胞凋亡的受体特异性结合的分子。在一些实施方案中,可以在制造过程期间容易地去除这些分子,如通过与细胞制造结合或者在最终配制细胞以供施用之前洗涤细胞来去除。

[0466] 在所提供的方法的方面,可以在所提供的方法的一个或多个或所有步骤期间包括一种或多种调节剂或T细胞佐剂。在一些实施方案中,在来自输入样品的T细胞的第一或初始扩增期间包括一种或多种调节剂或T细胞佐剂。在一些实施方案中,在T细胞的第二或最终扩增(如可以在从共培养物富集肿瘤反应性T细胞之后进行的扩增)期间包括一种或多种调节剂或T细胞佐剂。在一些实施方案中,在第一扩增和第二扩增二者期间包括一种或多种调节剂或T细胞佐剂。在一些情形中,在将T细胞与APC/肽新表位共培养期间包括一种或多种调节剂或T细胞佐剂。

[0467] 在任何所提供的方法的实施方案中,与至少一种调节剂或T细胞佐剂(如一种或多种共刺激激动剂和/或细胞凋亡抑制剂)中的每一种一起孵育在整个培养过程期间或在其一部分期间独立地持续。在一些实施方案中,与至少一种调节剂或T细胞佐剂中的每一种一起孵育持续不超过14天、不超过12天、不超过10天、不超过7天、不超过5天、不超过3天或不超过2天。在一些实施方案中,与至少一种调节剂或T细胞佐剂中的每一种一起孵育独立地持续12小时至96小时,如24小时至48小时,并且通常持续为或约48小时。

γmediumwhich themediumselectiveelicits

A.免疫抑制阻断剂

[0468] 在所提供的实施方案中,所述方法包括将含有T细胞群体的细胞与能够减少或降低免疫抑制因子(例如细胞因子、生长因子或酶,如IL-27、IL-35、TGFβ或IDO中的一种或多种)的活性的一种或多种阻断剂在调节T细胞活性的条件下一起离体孵育或培养。

[0469] 在一些实施方案中,在阻断或降低IL-27活性的药剂的存在下孵育或培养T细胞群体,如在第一次或第二次扩增期间。在一些实施方案中,所述培养或孵育(如在第一和/或第二扩增期间)是在阻断或降低IL-35的活性的阻断剂的存在下进行。在一些实施方案中,所述培养或孵育(如在第一和/或第二扩增期间)是在阻断或降低TGFβ的活性的阻断剂的存在

下进行。在一些实施方案中，所述培养或孵育(如在第一和/或第二扩增期间)是在阻断或降低IDO的活性的阻断剂的存在下进行。在一些实施方案中，可以使用任何上文方法的组合。

[0470] 免疫抑制阻断剂或拮抗剂可以是与细胞因子或生长因子结合并抑制或降低其与其受体结合和/或介导经由其受体的信号传导的能力的任何分子。

[0471] 在一些实施方案中，免疫抑制阻断剂可以是细胞因子或生长因子的天然受体的可溶形式。在一些情形中，同源受体的细胞外配体结合部分可以通过与免疫球蛋白Fc连接以产生可溶性拮抗剂试剂而作为融合蛋白产生。在一些实施方案中，Fc是IgG1 Fc，或者是其具有降低的Fc效应子功能(如降低的结合FcγR、C1q和/或介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力)的变体。免疫球蛋白IgG1 Fc中降低效应子功能的示例性突变包括但不限于L235E、G236A、N297A、L234A/L235A、E233P/L234V/L235A、C220S/C226S/C229S/P238S、C226S/C229S/E233P/L234V/L235A、M252Y/S254T/T256E、K326W。

[0472] 在一些实施方案中，免疫抑制阻断剂或拮抗剂可以是与细胞因子或生长因子结合的抗体或抗原结合片段。例如，与细胞因子或生长因子的结合可以抑制或降低相应细胞因子或生长因子与其相应同源受体结合的能力。

[0473] 在一些实施方案中，免疫抑制阻断剂减少或降低细胞因子或生长因子与它的同源受体或其亚基的结合。在一些实施方案中，结合被减少大于或大于约50％、60％、70％、80％、90％或更多。在一些实施方案中，免疫抑制阻断剂减少或降低通过免疫抑制细胞因子或生长因子的同源受体的信号传导，如将信号传导减少或降低大于或大于约50％、60％、70％、80％、90％或更多。

[0474] 在一些实施方案中，减少、降低或抑制IL-27活性的免疫抑制阻断剂存在于细胞培养基中。IL-27是一种异二聚体，其含有p28亚基和EB病毒诱导基因3(EBI3；也称为IL-27β)。IL-27是一种与IL-27受体(IL-27R)结合的细胞因子，所述受体由两个亚基IL-27α和gp130(也称为IL-27β)构成。IL-27与IL-27受体的结合诱导JAK-STAT和p38 MAPK信号传导。IL-27具有调节和促炎两种功能。已经证明IL-27可上调肿瘤细胞中的PD-L1和IDO，这在一些情形中导致强烈的免疫抑制环境。当仍然在实体瘤的存在下时，此活性可能导致TIL的抑制和耗竭增强。

[0475] 在一些实施方案中，免疫抑制阻断剂是IL-27受体的亚基的可溶形式。在一些实施方案中，免疫抑制阻断剂是IL-27Rα的可溶形式。例如，阻断剂可以是IL-27Ra Fc融合蛋白。在一些实施方案中，IL-27阻断剂可以包括与人IgG1的Fc(例如IgG1的残基Pro100-Lys330)连接的人IL-27Rα(例如UniProt登录号Q6UWB1)的残基Gly34-Lys516。用于在所提供的方法中使用的IL-27Ra Fc融合蛋白阻断剂是已知的和/或市售的，参见例如来自R&D Systems的目录号1479-TC-050。在一些实施方案中，阻断剂是IL-27Rα(sIL-27Rα)的天然可溶形式，参见例如Dietrich等人J Immunol.192:5382-5389。在一些实施方案中，免疫抑制阻断剂是gp130的可溶形式。例如，阻断剂可以是gp130 Fc融合蛋白。在一些实施方案中，IL-27阻断剂可以包括与人IgG1的Fc(例如IgG1的残基Pro100-Lys330)连接的人gp130(例如UniProt登录号P40189)的残基Glu23-Ile618。用于在所提供的方法中使用的gp130 Fc融合蛋白阻断剂是已知的和/或市售的，参见例如来自R&D Systems的目录号671-GP-100。

[0476] 在一些实施方案中，免疫抑制阻断剂是针对IL-27的单克隆抗体，其阻断IL-27与IL-27R或其亚基结合的能力。各种单克隆抗体是已知的并且是可用的。在一些实施方案中，

该抗体针对细胞因子的IL-27β(IL-27b)链,由于相应细胞因子的共享亚基,所述抗体也可以起到阻断IL-35活性的作用。针对IL-27b的各种单克隆抗体是已知的。示例性抗体包括但不限于抗体MAB6456(R&D Systems)或克隆V1.4H6.25。

[0477] 在一些实施方案中,免疫抑制阻断剂是针对IL-27R或其亚基的单克隆抗体。

[0478] 在所提供的过程的各个阶段期间可以在细胞培养基中包括IL-27阻断剂。在一些情形中,可以在初始T细胞扩增(第一扩增)中(如在从实体瘤分离和扩增TIL期间)包括IL-27阻断剂,其可以防止免疫抑制环境的产生和/或防止调节T细胞的诱导。在一些情形中,可以在用于扩增(例如第二扩增)的孵育期间在扩增选择的肿瘤反应性T细胞的培养中包括IL-27阻断剂,如章节I.D中所述。例如,在扩增TIL和分离新生抗原反应性T细胞后在培养中阻断IL-27可以为肿瘤反应性T细胞或TIL提供益处。IL-27信号传导可以促进抑制性、调节性表型,从而阻止新生抗原特异性TIL的有效细胞溶解活性。在所提供的过程中使用IL-27阻断剂可以避免任何免疫抑制刺激,同时促进肿瘤反应性T细胞或TIL的活性。

[0479] 在一些实施方案中,减少、降低或抑制IL-35活性的免疫抑制阻断剂存在于细胞培养基中。IL-35是一种异二聚体,其由EB病毒诱导基因3(EBI3,也称为IL-17β)和p35亚基(被IL-12共享)构成。IL-35与IL-35受体结合,所述受体由IL-12Rβ2和gp130(也称为IL-27β)链构成。IL-35是一种免疫抑制细胞因子,其中与其受体的结合经由STAT1/STAT4发信号以诱导TGFβ和IL-35产生。IL-35抑制抗肿瘤T细胞,并且促进调节T细胞反应和调节T细胞的增殖。IL-35水平增加已经与肿瘤大小呈正相关,并且与无进展生存期呈负相关。IL-35产生和/或信号传导的阻断已经在癌症中显示出有益的结果,因为它们减少调节T细胞的数量并限制肿瘤生长。IL-35的阻断还已经防止肿瘤特有的T细胞子集的耗竭。

[0480] 在一些实施方案中,免疫抑制阻断剂是针对IL-35的单克隆抗体,其阻断IL-35与IL-35R或其亚基结合的能力。各种单克隆抗体是已知的并且是可用的。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段不结合至或识别IL-35的p35亚基,因为它被IL-12共享。在特定实施方案中,抗体针对IL-27β(EBI3)亚基。针对IL-27b的各种单克隆抗体是已知的。示例性抗体是抗EBI3抗体/IL-35克隆V1.4H6.25或MAB6456。

[0481] 在一些实施方案中,免疫抑制阻断剂是针对IL-35R或其亚基的单克隆抗体。

[0482] 在所提供的过程的各个阶段期间可以在细胞培养基中包括IL-35阻断剂。在一些情形中,可以在初始T细胞扩增(第一扩增)中(如在从实体瘤分离和扩增TIL期间)包括IL-35阻断剂,其可以防止肿瘤微环境中的免疫抑制信号传导,从而导致增加的TIL回收和增殖。在这样的例子中,阻断剂(例如抗体)还可以防止调节T细胞的长出并减少它们在经分离的TIL培养物中的存在。在一些情形中,可以在用于扩增(例如第二扩增)的孵育期间在扩增选择的肿瘤反应性T细胞的培养中包括IL-35阻断剂,如章节I.D中所述。

[0483] 在一些实施方案中,减少、降低或抑制TGFbeta(TGFβ)活性的免疫抑制阻断剂存在于细胞培养基中。TGFβ由调节T细胞产生,并且是效应T细胞功能的有效抑制剂。TGFβ还由上皮或内皮细胞产生,并且有助于强烈的免疫抑制肿瘤微环境。在完全发展的肿瘤的背景下,TGFβ的上调可以导致细胞毒功能的下调并增加TIL的耗竭。总体而言,已经证明高水平的TGFβ可抑制抗肿瘤T细胞免疫并促进肿瘤存活。

[0484] 在一些实施方案中,免疫抑制阻断剂是针对TGFβ的单克隆抗体,其阻断TGFβ与其受体结合的能力。在一些实施方案中,抗体是非苏木单抗(GC1008)或其抗原结合片段。非苏

木单抗是一种结合至并抑制TGF-β的所有亚型的抗体。其他免疫抑制阻断剂包括但不限于阻断TGFβ1基因转录的小分子化合物,如吡咯-咪唑聚酰胺药物;靶向TGFβ1或TGFβ2mRNA进行降解的反义RNA(例如ISTH0036或ISTH0047);针对TGFβ配体的抗体(例如上述非苏木单抗;还有XPA681、XPA089、LY238770)或受体的抗体(例如LY3022859);或者小分子ATP-模拟物TβRI激酶抑制剂(例如加尼舍替或TEW-7197),参见例如Akhurst Cold Spring Harb Perspect Biol 2017,9:a022301。

[0485] 在所提供的过程的各个阶段期间可以在细胞培养基中包括TGFβ阻断剂。在一些情形中,可以在初始T细胞扩增(第一扩增)中(如在从实体瘤分离和扩增TIL期间)包括TGFβ阻断剂,其可以减少免疫抑制信号传导。例如,由于来自具有高肿瘤负荷的患者的实体瘤将具有高水平的TGFβ,因此潜在的免疫抑制信号传导可能阻止TIL回收和扩增。这还可以产生正反馈环,以增加调节T细胞的长出并加强另外的TGFβ产生。用阻断剂(如抗TGFβ抗体)阻断此信号传导可以增强激活的TIL的回收(即未耗竭),促进TIL扩增,并且防止调节T细胞的增加。在一些情形中,可以在用于扩增(例如第二扩增)的孵育期间在扩增选择的肿瘤反应性T细胞的培养中包括TGFβ阻断剂,如章节I.D中所述。

[0486] 在一些实施方案中,减少、降低或抑制吲哚胺-吡咯2,3-双加氧酶(IDO)活性的免疫抑制阻断剂存在于细胞培养基中。IDO是一种含血红素的酶,其在人中由IDO1基因编码。它是催化犬尿氨酸途径中的第一限速步骤L-色氨酸到N-甲酰基犬尿氨酸的O2依赖性氧化的三种酶之一,其他酶是IDO2和色氨酸2,3-双加氧酶(TDO)。IDO通过其限制T细胞功能和参与免疫耐受机制的能力已经与免疫调节有牵涉。新出现的证据表明,IDO在肿瘤发展期间被激活,帮助恶性细胞逃脱免疫系统的根除。IDO是一种免疫检查点分子,从某种意义上说,它是由一些可替代激活的巨噬细胞和其他免疫调节细胞产生的免疫调节酶(也被许多肿瘤和慢性感染性病毒用作免疫破坏策略)。已知IDO抑制T和NK细胞,产生和激活Treg和髓源性抑制细胞,并且促进新血细胞的生长以饲养肿瘤(血管生成)。

[0487] IDO的各种抑制剂是已知的。IDO抑制剂是IDO1酶活性的化学抑制剂,从而防止色氨酸耗尽并恢复T细胞的增殖能力。抑制剂的例子是PF-06840003(可从MedKoo Biosciences,Inc.获得)。其他IDO抑制剂包括但不限于艾卡哚司他(INCB24360)、INCB23843、纳沃昔莫德(GDC-0919)、BMS-986205、伊马替尼或1-甲基-色氨酸。

[0488] 在所提供的过程的各个阶段期间可以使用IDO抑制剂作为细胞培养基中的阻断剂。在一些情形中,可以在初始T细胞扩增(第一扩增)中(如在从实体瘤分离和长出或扩增TIL期间)包括IDO抑制剂,其可以阻止免疫调节细胞功能以及调节T细胞长出。例如,由于存在于肿瘤微环境中的抗原呈递细胞和内皮细胞产生IDO作为免疫抑制机制,因此使用抑制剂可以抵消此作用,并且在初始TIL扩增实验中导致新生抗原反应性TIL激活和增殖增强。在一些情形中,可以在用于扩增(例如第二扩增)的孵育期间在扩增选择的肿瘤反应性T细胞的培养中包括IL-35阻断剂,如章节I.D中所述。

[0489] 在任何所提供的方法的实施方案中,在孵育期间将一种或多种免疫抑制阻断剂添加至细胞培养基。在一些实施方案中,免疫抑制阻断剂是以范围如下的浓度来添加:在为或约0.1μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约50μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约5μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约1μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约0.5μg/mL

之间、0.5μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约50μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约5μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约1μg/mL之间、1μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约50μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约5μg/mL之间、为或约5μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约5μg/mL与为或约50μg/mL之间、为或约5μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约5μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约10μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约10μg/mL与为或约50μg/mL之间、为或约10μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约25μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约25μg/mL与为或约50μg/mL之间或者为或约50μg/mL与为或约100μg/mL之间，每个都包含端值。

[0490] 在任何所提供的方法的实施方案中，在孵育期间将一种或多种免疫抑制阻断剂添加至细胞培养基。在一些实施方案中，免疫抑制阻断剂是以范围如下的浓度来添加：在为或约0.001μM与为或约10μM之间、为或约0.001μM与为或约5μM之间、在为或约0.001μM与为或约1μM之间、在为或约0.001μM与为或约0.5μM之间、在为或约0.001μM与为或约0.1μM之间、在为或约0.001μM与为或约0.05μM之间、在为或约0.001μM与为或约0.01μM之间、在为或约0.001μM与为或约0.005μM之间、在为或约0.005μM与为或约10μM之间、为或约0.005μM与为或约5μM之间、在为或约0.005μM与为或约1μM之间、在为或约0.005μM与为或约0.5μM之间、在为或约0.005μM与为或约0.1μM之间、在为或约0.005μM与为或约0.05μM之间、在为或约0.005μM与为或约0.01μM之间、在为或约0.01μM与为或约10μM之间、为或约0.01μM与为或约5μM之间、在为或约0.01μM与为或约1μM之间、在为或约0.01μM与为或约0.5μM之间、在为或约0.01μM与为或约0.1μM之间、在为或约0.01μM与为或约0.05μM之间、在为或约0.05μM与为或约10μM之间、为或约0.05μM与为或约5μM之间、在为或约0.05μM与为或约1μM之间、在为或约0.05μM与为或约0.5μM之间、在为或约0.05μM与为或约0.1μM之间、在为或约0.1μM与为或约10μM之间、为或约0.1μM与为或约5μM之间、在为或约0.1μM与为或约1μM之间、在为或约0.1μM与为或约0.5μM之间、在为或约0.5μM与为或约10μM之间、为或约0.5μM与为或约5μM之间、在为或约0.5μM与为或约1μM之间、在为或约1μM与为或约10μM之间、为或约1μM与为或约5μM之间或者在为或约5μM与为或约10μM之间。在一些实施方案中，免疫抑制阻断剂是以如下浓度来添加：为或约0.001μM、为或约0.005μM、为或约0.01μM、为或约0.05μM、为或约0.1μM、为或约0.5μM、为或约1μM、为或约2μM、为或约3μM、为或约4μM、为或约5μM、为或约6μM、为或约7μM、为或约8μM、为或约9μM或者为或约10μM，或者前述任一项之间的任何值。

[0491] 在一些实施方案中，在与一种或多种免疫抑制阻断剂一起孵育之后或同时，还使T细胞群体与一种或多种T细胞刺激剂(如抗CD3或抗CD28刺激剂和/或重组T细胞刺激细胞因子(如IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15))在诱导或介导群体中的T细胞增殖的条件下接触。在一些实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂包括来自IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15的T细胞刺激细胞因子。在特定实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂至少包括重组IL-2。在一些这样的方面，如在从来自受试者的样品分离和刺激肿瘤反应性T细胞后和/或在培养期间在肿瘤反应性T细胞的富集和扩增期间，免疫抑制阻断剂的包括改进潜在的目的肿瘤反应性T细胞(如肿瘤浸润淋巴细胞(TIL))的离体回收和/或扩增。

B.T细胞刺激激动剂

[0492] 在所提供的实施方案中,所提供的方法的一个或多个步骤包括将细胞与共刺激激动剂在刺激或激活由样品中的一种或多种T细胞表达的共刺激受体的条件下一起离体孵育。在特定实施方案中,所述共刺激激动剂是4-1BB激动剂。在其他特定实施方案中,所述共刺激激动剂是OX40激动剂。在一些实施方案中,在与共刺激剂一起孵育之后或同时,还使T细胞群体与一种或多种T细胞刺激剂(如抗CD3和/或来自重组IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21的更多重组细胞因子)在诱导或介导群体中的T细胞增殖的条件下接触。在一些这样的方面,所述共刺激激动剂(如4-1BB激动剂或OX40激动剂)提供初始刺激以增强或加强群体中的T细胞的增殖能力和/或功能活性。

[0493] 在任何所提供的方法的方面,在一种或多种共刺激激动剂的存在下孵育T细胞群体。在特定实施方案中,共刺激激动剂是与T细胞表面上的共刺激分子特异性结合以刺激细胞中的一种或多种细胞内信号和/或刺激T细胞的一种或多种功能或生物活性的分子。在一些实施方案中,激动剂促进T细胞的存活和活性。在一些实施方案中,共刺激分子是肿瘤坏死因子受体超家族(TNFSR)的成员。示例性共刺激分子包括但不限于4-1BB、OX40、GITR和CD27。在一些实施方案中,共刺激激动剂是4-1BB激动剂、OX40激动剂、GITR激动剂或CD27激动剂。

[0494] 在一些实施方案中,共刺激激动剂是或包括与共刺激受体特异性结合的抗体或抗原结合片段。

[0495] 在一些实施方案中,共刺激激动剂是或包括共刺激受体的配体的细胞外结合结构域或其特异性结合部分。在一些情形中,细胞外结合结构域或其特异性结合片段是作为与另一种多肽的融合蛋白来提供,如以增加激动剂的结合亲合力。例如,在一些情形中,多肽是多聚化结构域,其可以促进分子的二聚化、三聚化、四聚化或五聚化。在特定实施方案中,融合蛋白是二聚体。在一些实施方案中,多聚化结构域包括如下任何氨基酸序列,所述氨基酸序列可以与互补多聚化结构域相互作用以形成稳定的蛋白质-蛋白质相互作用,以产生多肽分子与另一种多肽分子的多聚体。例如,多聚化结构域可以是能够与互补分子形成二硫键的分子。示例性多聚化结构域包括免疫球蛋白序列或其部分、亮氨酸拉链、疏水区、亲水区和相容的蛋白质-蛋白质相互作用结构域。例如,多聚化结构域可以是免疫球蛋白恒定区或结构域,如例如来自IgG(包括IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型)、IgA、IgE、IgD和IgM及其修饰形式的Fc结构域或其部分。在一些实施方案中,共刺激激动剂是Fc融合蛋白。

[0496] 在一些实施方案中,共刺激激动剂是OX40(CD134)激动剂。OX40是一种细胞表面糖蛋白并且是肿瘤坏死因子受体家族(TNFRSF)的成员,其在T淋巴细胞上表达并且提供用于激活的T细胞的增殖和存活的共刺激信号。与CD28不同,OX40通常不在静息幼稚T细胞上组成型表达。OX40是一种次级共刺激免疫检查点分子,其在一些方面在激活后24至72小时后表达;其配体OX40L也不在静息抗原呈递细胞上表达,但是在其激活后表达。OX40的表达依赖于T细胞的完全激活;在一些情形中,如在没有CD28刺激的情况下,OX40的表达被延迟并且其表达更低。在激活(例如用抗CD3(如OKT3)/抗CD28)后或在被诱导以呈递肿瘤抗原靶标的APC的离体共培养后,OX40可以在体内的T细胞上表达(与肿瘤共培养)。OX40与OX40L的结合触发OX40途径的激活。在一些实施方案中,此途径的激活导致其他途径的上调,从而导致增加的激活、存活、记忆反应以及免疫抑制活性的降低。

[0497] 在一些实施方案中,OX40激动剂可以是能够与人或哺乳动物OX40结合的抗体或抗

原结合片段或融合蛋白。在一些实施方案中,OX40激动剂结合至人OX40,如在T细胞表面上表达的人OX40。在一些实施方案中,OX40激动剂与OX40特异性结合,并且消除抗体依赖性细胞毒性(ADCC),例如NK细胞的细胞毒性。在一些实施方案中,OX40激动剂消除抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。在一些实施方案中,OX40激动剂消除补体依赖性细胞毒性(CDC)。在一些方面,在OX40激动剂与OX40蛋白受体结合时,其触发与增加的T细胞和炎性细胞因子产生相关的共刺激信号。用于在所提供的方法中使用的OX40激动剂包括熟练技术人员已知的任何一种。

[0498] 在一些实施方案中,OX40激动剂是融合蛋白。OX40融合蛋白包括包含与OX40L的一部分融合的Fc结构域的那些融合蛋白,参见例如Sadun等人,(2009)J.Immunother.,182:1481-89。在一些实施方案中,可以使用多聚OX40激动剂,如三聚或六聚OX40激动剂(具有三个或六个配体结合结构域)。含有三个TNFRSF结合结构域并且作为与Fc的融合物的三聚(三价)或六聚(或六价)或更大融合蛋白是已知的并且可以使用,参见例如Gieffers等人(2013)Cancer Therapeutics,12:2735-47。

[0499] 在一些实施方案中,OX40激动剂是融合蛋白,其中OX40L的一个或多个结构域与一个或多个另外的蛋白质结构域共价连接。可以用作OX40激动剂的示例性OX40L融合蛋白描述于美国专利号6,312,700;7,622,444;国际专利申请公开号WO 2011109789;以及WO 2010105068中。在一些实施方案中,OX40激动剂包括自组装为多聚(例如,三聚或六聚)OX40L融合蛋白的OX40L融合多肽。这样的融合蛋白描述于例如以下文献中:Morris等人(2007)Mol Immunol.44(12):3112-3121;美国专利号7,959,925。可以根据本文所提供的一些实施方案使用的特定融合蛋白是MEDI6383(由AZY/Medlmmune生产),其为一种人OX40配体融合蛋白,参见例如美国专利号6,312,700。

[0500] 在一些实施方案中,OX40激动剂是特异性结合OX40的抗体或抗原结合片段。用于在所提供的方法中使用的示例性OX40激动剂包括但不限于他佛利珠单抗(也称为MEDI0562或MEDI-0562)、11D4(参见美国专利号7,960,515;8,236,930;9,028,824)、18D8(参见例如美国专利号7,960,515;8,236,930;9,028,824);Hu119-122(参见例如美国专利号9,006,399和9,163,085,以及国际专利公开号WO2012/027328);Hu106-222(参见例如美国专利号9,006,399和9,163,085,以及国际专利公开号WO2012/027328);MEDI6469(也称为9B12;参见例如Weinberg等人(2006)J.Immunother.,29:575-585);泊加珠单抗(也称为MOXR0916和RG7888;Genentech,Inc.);GSK3174998(GlaxoSmithKline),或PF-04518600(PF-8600;Hamid等人(2016)Journal of Clinical Immunology,34:3079);BMS 986178;或者前述任一种的抗原结合片段。OX40激动剂还包括含有如在他佛利珠单抗(tavolizizumab)、11D4、18D8、Hu119-122、Hu106-22、MED16469、泊加珠单抗、GSK3174998、PF-04518600或BMS 986178中所含的六个CDR的任何结合分子,如任何抗体或抗原结合片段。

[0501] 在一些实施方案中,OX40激动剂是以下任何专利中所述的OX40激动剂:国际专利申请公开号WO 95/12673、WO 95/21925、WO 2006/121810、WO 2012/027328、WO 2013/028231、WO 2013/038191和WO 2014/148895;欧洲专利申请EP 0672141;美国专利申请公开号US 2010/136030、US 2014/377284、US 2015/190506和US 2015/132288(包括克隆20E5和12H3);以及美国专利号7,504,101、7,550,140、7,622,444、7,696,175、7,960,515、7,961,515、8,133,983、9,006,399和9,163,085。OX40激动剂还可以包括市售抗体,如L106 BD

(Pharmingen Product#340420);ACT35(Santa Cruz Biotechnology,目录号20073);或者可从InVivoMAb(BioXcell Inc,新罕布什尔州西黎巴嫩)购得的抗mCD134/mOX40(克隆OX86)。

[0502] 可以根据任何所提供的实施方案使用的其他OX40激动剂包括核苷酸、表达载体和肽,如例如Linch等人(2015)Front Oncol.5:34,美国专利号6,312,700和美国申请公开号20140271677中所披露。

[0503] 在一些实施方案中,共刺激激动剂是4-1BB(CD137)激动剂。在一些实施方案中,所述4-1BB激动剂可以是能够与人或哺乳动物4-1BB结合的抗体或抗原结合片段或融合蛋白。在一些实施方案中,4-1BB激动剂结合至人4-1BB,如在T细胞表面上表达的人4-1BB。4-1BB(CD137,肿瘤坏死因子受体超家族9)是一种在激活的T细胞和自然杀伤(NK)细胞上表达的诱导型共刺激受体。T细胞上的4-1BB连接触发信号传导级联,从而导致抗细胞凋亡分子的上调、细胞因子分泌以及效应子功能增强。在具有降低的细胞毒性能力的功能失调的T细胞中,4-1BB连接显示恢复效应子功能的有效能力。在NK细胞上,4-1BB信号传导可以增加抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。已经开发出靶向4-1BB的激动性单克隆抗体以利用4-1BB信号传导用于癌症免疫疗法。多种诱导的和自发的肿瘤模型中的临床前结果表明,用激动剂抗体靶向4-1BB可以导致肿瘤清除和持久的抗肿瘤免疫。

[0504] 在一些实施方案中,4-1BB激动剂以足以降低毒性的方式与4-1BB特异性结合。在一些实施方案中,4-1BB激动剂是消除抗体依赖性细胞毒性(ADCC)(例如NK细胞的细胞毒性)的激动性4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方案中,4-1BB激动剂是消除抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的激动性4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方案中,4-1BB激动剂是消除补体依赖性细胞毒性(CDC)的激动性4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。

[0505] 在一些实施方案中,4-1BB激动剂是融合蛋白。4-1BB融合蛋白包括包含与4-1BBL融合的Fc结构域的那些融合蛋白。在一些实施方案中,融合蛋白是包含用于结合与Fc融合的4-1BB的两个或更多个(如三个、四个或更多个)4-1BBL结构域的二聚(二价)、三聚(三价)或六聚(六价)或更大融合物。

[0506] 在一个实施方案中,4-1BB激动剂是以下文献中描述的4-1BB激动性融合蛋白:国际专利申请公开号WO 2008/025516 A1、WO 2009/007120 A1、WO 2010/003766 A1、WO 2010/010051 A1和WO 2010/078966 A1;美国专利申请公开号US 2011/0027218 A1、US 2015/0126709 A1、US 2011/0111494 A1、US 2015/0110734 A1和US 2015/0126710 A1;以及美国专利号9,359,420、9,340,599、8,921,519和8,450,460。

[0507] 在一些实施方案中,4-1BB激动剂是特异性结合4-1BB的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,4-1BB激动剂是EU-101(Eutilex Co.Ltd.)、乌托鲁单抗或乌瑞鲁单抗或其抗原结合片段。在一些实施方案中,4-1BB激动剂是乌托鲁单抗(也称为PF-05082566、PF-2566或MOR-7480)。乌托鲁单抗及其变体和片段的制备和特性描述于美国专利号8,821,867;8,337,850;和9,468,678,以及国际专利申请公开号WO 2012/032433 A1中。在一些实施方案中,4-1BB激动剂是乌瑞鲁单抗(也称为BMS-663513或20H4,9.h4a)。乌瑞鲁单抗及其变体和片段的制备和特性描述于美国专利号7,288,638和8,962,804中。OX40激动剂还包括含有如在乌托鲁单抗或乌瑞鲁单抗中所含的六个CDR的任何结合分子,如任何抗体或抗原结合片段。

[0508] 在一个实施方案中,4-1BB激动剂选自:1D8、3Elor、4B4(BioLegend 309809)、H4-1BB-M127(BD Pharmingen 552532)、BBK2(Thermo Fisher MS621PABX)、145501(Leinco Technologies B591)、由保藏为ATCC编号HB-11248并披露于美国专利号6,974,863中的细胞系产生的抗体、5F4(BioLegend 31 1503)、C65-485(BD Pharmingen 559446)、美国专利申请公开号US 2005/0095244中披露的抗体、美国专利号7,288,638中披露的抗体(如20H4.9-IgG1(BMS-663031))、美国专利号6,887,673中披露的抗体(如4E9或BMS-554271)、美国专利号7,214,493中披露的抗体、美国专利号6,303,121中披露的抗体、美国专利号6,569,997中披露的抗体、美国专利号6,905,685中披露的抗体(如4E9或BMS-554271)、美国专利号6,362,325中披露的抗体(如1D8或BMS-469492;3H3或BMS-469497;或者3E1)、美国专利号6,974,863中披露的抗体(如53A2);美国专利号6,210,669中披露的抗体(如1D8、3B8或3E1)、美国专利号5,928,893中所述的抗体、美国专利号6,303,121中披露的抗体、美国专利号6,569,997中披露的抗体、国际专利申请公开号WO 2012/177788、WO 2015/119923和WO 2010/042433中披露的抗体,及其片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物。

[0509] 在一些实施方案中,共刺激激动剂是CD27激动剂。在一些实施方案中,CD27激动剂以足以降低毒性的方式与CD27特异性结合。在一些实施方案中,CD27激动剂是消除抗体依赖性细胞毒性(ADCC)(例如NK细胞的细胞毒性)的激动性CD27单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方案中,CD27激动剂是消除抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的激动性CD27单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方案中,CD27激动剂是消除补体依赖性细胞毒性(CDC)的激动性CD27单克隆抗体或融合蛋白。

[0510] 在一些实施方案中,CD27激动剂是特异性结合CD27的抗体或抗原结合片段。在特定实施方案中,CD27激动剂是单克隆抗体伐立鲁单抗(也称为CDX-1127或IFS),是其抗原结合片段。伐立鲁单抗的制备和特性描述于国际专利申请公开号WO 2016/145085 A2以及美国专利申请公开号US 2011/0274685 A1和US 2012/0213771 A1中。

[0511] 在一些实施方案中,CD27激动剂是融合蛋白。CD27融合蛋白包括包含与CD27(CD70)的配体融合的Fc结构域的那些融合蛋白。在一些实施方案中,融合蛋白是包含用于结合与Fc融合的CD27的两个或更多个(如三个、四个或更多个)CD70结构域的二聚(二价)、三聚(三价)或六聚(六价)或更大融合物。

[0512] 在一个实施方案中,CD27激动剂是以下文献中所述的CD27激动剂:美国专利申请公开号US 2014/0112942 A1、US 2011/0274685 A1或US 2012/0213771 A1,或者国际专利申请公开号WO 2012/004367 A1。

[0513] 在一些实施方案中,共刺激激动剂是GITR激动剂。在一些实施方案中,GITR激动剂以足以降低毒性的方式与GITR特异性结合。在一些实施方案中,GITR激动剂是消除抗体依赖性细胞毒性(ADCC)(例如NK细胞的细胞毒性)的激动性GITR单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方案中,GITR激动剂是消除抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的激动性GITR单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方案中,GITR激动剂是消除补体依赖性细胞毒性(CDC)的激动性GITR单克隆抗体或融合蛋白。

[0514] 在一些实施方案中,GITR激动剂是特异性结合GITR的抗体或抗原结合片段。在一个实施方案中,GITR激动剂是激动性抗GITR单克隆抗体TRX518(TolerRx,Inc.),也称为6C8和Ch-6C8-Agly。6C8和2F8抗体及其变体的制备、特性和使用描述于美国专利号7,812,135;

8,388,967;和9,028,823中。

[0515] 在一些实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体1D7或其抗原结合片段。1D7的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体33C9或其抗原结合片段。33C9的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体33F6,或者是其抗原结合片段。33F6的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体34G4,或者是其抗原结合片段。34G4的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体35B10,或者是其抗原结合片段。35B10的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体41E11,或者是其抗原结合片段。41E11的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体41GS,或者是其抗原结合片段。41G5的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体42A11,或者是其抗原结合片段。42A11的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体44C1,或者是其抗原结合片段。44C1的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体45A8,或者是其抗原结合片段。45A8的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体46E11,或者是其抗原结合片段。46E11的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体48H12,或者是其抗原结合片段。48H12的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体48H7,或者是其抗原结合片段。48H7的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体49D9,或者是其抗原结合片段。49D9的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体49E2,或者是其抗原结合片段。49E2的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体48A9,或者是其抗原结合片段。48A9的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体5H7,或者是其抗原结合片段。5H7的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体7A10,或者是其抗原结合片段。7A10的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体9H6,或者是其抗原结合片段。9H6的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。

[0516] 在一个实施方案中,GITR激动剂是在以下文献中描述的激动性抗GITR单克隆抗体:美国专利号8,709,424;美国专利申请公开号US 2012/0189639 A1和US 2014/0348841 A1,以及国际专利申请公开号WO 2011/028683 A1(Merck Sharp&Dohme Corp.)。在一个实施方案中,GITR激动剂是选自以下的激动性抗GITR单克隆抗体:36E5、3D6、61G6、6H6、61F6、1D8、17F10、35D8、49A1、9E5和31H6,及其抗原结合片段。这些抗体的结构、特性和制备描述于美国专利号8,709,424;美国专利申请公开号US 2012/0189639 A1和US 2014/0348841

A1中。

[0517] 在一个实施方案中,GITR激动剂是以下文献中描述的GITR激动剂:国际专利申请公开号WO 2013/039954 A1和WO 2011/028683 A1;美国专利申请公开号US 2013/0108641 A1、US 2012/0189639 A1和US 2014/0348841 A1;以及美国专利号7,812,135;8,388,967;和9,028,823。

[0518] 在任何所提供的方法的实施方案中,扩增方法中T细胞(例如肿瘤反应性T细胞)与共刺激激动剂的比率(细胞与摩尔)为约1至25、约1至50、约1至100、约1至125、约1至150、约1至175、约1至200、约1至225、约1至250、约1至275、约1至300、约1至325、约1至350、约1至500、约1至1000或者约1至10000。

[0519] 在任何所提供的方法的实施方案中,在孵育期间将一种或多种共刺激性激动剂添加至细胞培养基。在一些实施方案中,所述一种或多种共刺激激动剂中的每一种独立地以范围如下的浓度来添加:在为或约0.1μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约50μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约5μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约1μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约0.5μg/mL之间、0.5μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约50μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约5μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约1μg/mL之间、1μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约50μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约5μg/mL之间、为或约5μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约5μg/mL与为或约50μg/mL之间、为或约5μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约5μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约10μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约10μg/mL与为或约50μg/mL之间、为或约10μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约25μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约25μg/mL与为或约50μg/mL之间或者为或约50μg/mL与为或约100μg/mL之间,每个都包含端值。在一些实施方案中,所述共刺激激动剂是以如下浓度来添加:为或约1μg/mL、为或约5μg/mL、为或约10μg/mL、为或约20μg/mL、为或约30μg/mL、为或约40μg/mL、为或约50μg/mL,或者前述任一项之间的任何值。

[0520] 在一些实施方案中,将共刺激激动剂与重组IL-2一起添加至培养基中。在一些实施方案中,重组IL-2是以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加,并且共刺激激动剂是以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL,如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加。在一些实施方案中,初始扩增(第一扩增)(例如章节I.A.2中所述)是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2的存在下进行,并且共刺激激动剂是以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL,如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加。在一些实施方案中,共培养(例如章节I.B.2中所述)是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2的存在下进行,并且共刺激激动剂是以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL,如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加。在一些实施方案中,用于扩增(例如第二扩增)的孵育(例如章节I.D)是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2的存在下进行,并且共刺激激动剂是以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL,如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加。

[0521] 在一些实施方案中，在分离或选择T细胞以供进行用于扩增的培养方法之前，将共刺激激动剂施用于受试者。在这样的实施方案中，考虑在根据所提供方法离体分离、选择和/或富集用于培养细胞之前，使肿瘤反应性T细胞或对如所述的一种或多种激活标记呈表面阳性的T细胞在体内恢复活力。在一些这样的实施方案中，共刺激激动剂是通过输注以选自以下的剂量施用于受试者：约5mg、约8mg、约10mg、约20mg、约25mg、约50mg、约75mg、100mg、约200mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约800mg、约900mg、约1000mg、约1100mg、约1200mg、约1300mg、约1400mg、约1500mg、约1600mg、约1700mg、约1800mg、约1900mg和约2000mg，或者前述任一项之间的值。在一些实施方案中，本文公开的共刺激激动剂的有效剂量在以下范围内：约1mg至约500mg、约10mg至约300mg、约20mg至约250mg、约25mg至约200mg、约1mg至约50mg、约5mg至约45mg、约10mg至约40mg、约15mg至约35mg、约20mg至约30mg、约23mg至约28mg、约50mg至约150mg、约60mg至约140mg、约70mg至约130mg、约80mg至约120mg、约90mg至约110mg、或约95mg至约105mg、约98mg至约102mg、约150mg至约250mg、约160mg至约240mg、约170mg至约230mg、约180mg至约220mg、约190mg至约210mg、约195mg至约205mg或者约198至约207mg。

[0522] 在一个实施方案中，每周施用共刺激激动剂。在一个实施方案中，每两周施用共刺激激动剂。在一个实施方案中，每三周施用共刺激激动剂。在一个实施方案中，每月施用共刺激激动剂。在一个实施方案中，以每三周给予8mg的剂量静脉内施用共刺激激动剂，在12周的时间内施用4次剂量。在一个实施方案中，以较低的初始剂量施用共刺激激动剂，所述初始剂量在以每个月施用的后续间隔施用时逐步升高。例如，第一次输注可以递送300mg共刺激激动剂，并且后续每周剂量可以递送2,000mg共刺激激动剂持续八周，之后是2,000mg每月剂量的共刺激激动剂。

C.免疫检查点抑制剂

[0523] 在一些实施方案中，T细胞调节剂是抑制免疫检查点途径的免疫检查点抑制剂。免疫系统具有参与维持自身耐受性和用于调节免疫应答的多种抑制途径。已知肿瘤可以使用某些免疫检查点途径作为免疫抗性的主要机制，特别是针对对于肿瘤抗原具有特异性的T细胞(Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。因为许多这样的免疫检查点是通过配体-受体相互作用开始的，所以它们可以容易地被针对所述配体和/或其受体的抗体阻断。

[0524] 因此，用阻断免疫检查点途径的拮抗性分子(如小分子、核酸抑制剂(例如，RNAi)或抗体分子)的疗法正在成为针对癌症和其他疾病的免疫疗法的有前途的途径。

[0525] 如本文所用，术语“免疫检查点抑制剂”是指完全或部分降低、抑制、干扰或调节一种或多种检查点蛋白的分子。检查点蛋白调节T细胞激活或功能。这些蛋白质负责T细胞反应的共刺激或抑制相互作用。免疫检查点蛋白调节并维持自身耐受性以及生理免疫应答的持续时间和幅度。

[0526] 免疫检查点抑制剂包括以统计学上显著的方式阻断或抑制免疫系统的抑制途径的任何药剂。这样的抑制剂可以包括小分子抑制剂或者可以包括结合至并阻断或抑制免疫检查点受体配体的抗体或其抗原结合片段。可以被靶向以供阻断或抑制的说明性免疫检查点分子包括但不限于PD1(CD279)、PDL1(CD274、B7-H1)、PDL2(CD273、B7-DC)、CTLA-4、LAG3(CD223)、TIM3、4-1BB(CD137)、4-1BBL(CD137L)、GITR(TNFRSF18、AITR)、CD40、OX40(CD134、

TNFRSF4)、CXCR2、肿瘤相关抗原(TAA)、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、GAL9、B7H3、B7H4、VISTA、KIR、2B4(属于CD2分子家族并且在所有NK、γδ和记忆CD8+(αβ)T细胞上表达)、CD160(也称为BY55)和CGEN-15049。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是抗体。免疫检查点抑制剂包括与以下中的一种或多种结合并阻断或抑制其活性的抗体或其抗原结合片段或其他结合蛋白:PD1、PDL1、PDL2、CTLA-4、LAG3、TIM3、4-1BB、4-1BBL、GITR、CD40、OX40、CXCR2、TAA、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、GAL9、B7H3、B7H4、VISTA、KIR、2B4、CD160和CGEN-15049。说明性免疫检查点抑制剂包括伊匹单抗(抗CTLA4)、帕博利珠单抗(抗PD1)、曲美木单抗(CTLA-4阻断抗体)、抗OX40L(例如奥塞芦单抗)和PD-L1单克隆抗体(抗B7-H1;MEDI4736)。

[0527] 在一些实施方案中,检查点抑制剂抑制PD1的活性。程序性细胞死亡蛋白1(PD1)是一种在B细胞、NK细胞和T细胞中表达的免疫检查点蛋白(Shinohara等人,1995,Genomics 23:704-6;Blank等人,2007,Cancer Immunol Immunother 56:739-45;Finger等人,1997,Gene 197:177-87;Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。PD1的主要作用是在响应于感染的炎症期间限制外周组织中T细胞的活性,以及限制自身免疫(Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。PD1表达在激活的T细胞中被诱导,并且PD1与其内源配体之一的结合起到通过抑制刺激激酶以及还起作用以抑制TCR“终止信号”来抑制T细胞激活的作用(Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。PD1在调节T细胞上高度表达,并且可以在配体的存在下增加所述调节T细胞的增殖(Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。抗PD1抗体已经用于治疗黑色素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌、前列腺癌、结直肠癌、头颈癌、三阴性乳腺癌、白血病、淋巴瘤和肾细胞癌(Topalian等人,2012,N Engl J Med 366:2443-54;Lipson等人,2013,Clin Cancer Res 19:462-8;Berger等人,2008,Clin Cancer Res 14:3044-51;Gildener-Leapman等人,2013,Oral Oncol 49:1089-96;Menzies&Long,2013,Ther Adv Med Oncol 5:278-85)。示例性抗PD1抗体包括纳武单抗(BMS的Opdivo©)、帕博利珠单抗(Merck的Keytruda©)、匹地利珠单抗(pidilizumab)(Cure Tech的CT-011)、兰博利珠单抗(lambrolizumab)(Merck的MK-3475)和AMP-224(Merck)。

[0528] 在一些实施方案中,检查点抑制剂抑制PD-L1的活性。PD-L1(也称为CD274和B7-H1)和PD-L2(也称为CD273和B7-DC)是PD1的配体,其发现于激活的T细胞、B细胞、髓系细胞、巨噬细胞和一些类型的肿瘤细胞上。PD1和PD-L1的复合物抑制CD8+T细胞的增殖并减少免疫应答(Topalian等人,2012,N Engl J Med 366:2443-54;Brahmer等人,2012,N Eng J Med 366:2455-65)。抗PD-L1抗体已经用于治疗非小细胞肺癌、黑色素瘤、结直肠癌、肾细胞癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、乳腺癌和血液恶性肿瘤(Brahmer等人,N Eng J Med 366:2455-65;Ott等人,2013,Clin Cancer Res 19:5300-9;Radvanyi等人,2013,Clin Cancer Res 19:5541;Menzies和Long,2013,Ther Adv Med Oncol 5:278-85;Berger等人,2008,Clin Cancer Res 14:13044-51)。示例性抗PD-L1抗体包括MDX-1105(Medarex)、MEDI4736(Medimmune)、MPDL3280A(Genentech)、BMS-935559(Bristol-Myers Squibb)和MSB0010718C。

[0529] 在一些实施方案中,检查点抑制剂抑制CTLA-4的活性。细胞毒性T淋巴细胞相关抗原(CTLA-4)(也称为CD152)是一种发挥调节T细胞激活功能的共抑制分子。CTLA-4是仅在T细胞上表达的免疫球蛋白超家族成员。CTLA-4起到抑制T细胞激活的作用并且被报道抑制

辅助T细胞活性并增强调节T细胞免疫抑制活性(Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。抗CTLA-4抗体已经用于治疗黑色素瘤、前列腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌的临床试验中(Robert&Ghiringhelli,2009,Oncologist 14:848-61;Ott等人,2013,Clin Cancer Res 19:5300;Weber,2007,Oncologist 12:864-72;Wada等人,2013,JTransl Med 11:89)。示例性抗CTLA-4抗体包括伊匹单抗(Bristol-Myers Squibb)和替西利姆单抗(Pfizer)。伊匹单抗已经获得FDA批准用于治疗转移性黑色素瘤(Wada等人,2013,J Transl Med 11:89)。

[0530] 在一些实施方案中,检查点抑制剂抑制LAG-3的活性。淋巴细胞激活基因-3(LAG-3)(也称为CD223)是另一种免疫检查点蛋白。LAG-3与对淋巴细胞活性的抑制相关,并且在一些情况下与淋巴细胞无反应性的诱导相关。LAG-3在免疫系统中的各种细胞上表达,包括B细胞、NK细胞和树突细胞。LAG-3是MHC II类受体的天然配体,所述MHC II类受体基本上在黑色素瘤浸润T细胞(包括被赋予有效免疫抑制活性的那些T细胞)上表达(Goldberg等人,Curr Top Microbiol Immunol(344)269-278,2011)。示例性抗LAG-3抗体包括BMS-986016,也称为拉莱利单抗(relatlimab)。IMP321是免疫检查点分子LAG-3的可溶形式,其激活树突细胞,增加抗原呈递。

[0531] 在一些实施方案中,检查点抑制剂抑制TIM-3的活性。T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域-3(TIM-3)(也称为CD366)最初在激活的Th1细胞上鉴定出,并且已经显示是免疫反应的负调节剂。TIM-3的阻断促进T细胞介导的抗肿瘤免疫,并且在一系列小鼠肿瘤模型中具有抗肿瘤活性。TIM-3阻断与其他免疫治疗剂(如抗PDL1抗体等)的组合在增加抗肿瘤作用方面可以是加和的或协同的。TIM-3表达已经与多种不同的肿瘤类型(包括黑色素瘤、NSCLC和肾癌)相关,并且另外,已经证明肿瘤内TIM-3的表达可与一系列肿瘤类型(包括NSCLC、宫颈癌和胃癌)的不良预后相关联。示例性抗TIM3抗体包括TSR-022和LY3321367。

[0532] 在任何所提供的方法的实施方案中,在孵育期间将一种或多种免疫检查点抑制剂添加至细胞培养基中。在一些实施方案中,一种或多种免疫检查点抑制剂中的每一种独立地以范围如下的浓度来添加:在为或约0.1μg/mL至为或约100μg/mL之间,如为或约0.1μg/mL与为或约50μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约5μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约1μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约0.5μg/mL之间、0.5μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约50μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约5μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约1μg/mL之间、1μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约50μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约5μg/mL之间、为或约5μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约5μg/mL与为或约50μg/mL之间、为或约5μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约5μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约10μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约10μg/mL与为或约50μg/mL之间、为或约10μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约25μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约25μg/mL与为或约50μg/mL之间或者为或约50μg/mL与为或约100μg/mL之间,每个都包含端值。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是以如下浓度来添加:为或约1μg/mL、为或约5μg/mL、为或约10μg/mL、为或约20μg/mL、为或约30μg/mL、为或约40μg/mL、为或约50μg/mL,或者前述任一项之间的任何值。

[0533] 在一些实施方案中，在与共刺激剂一起孵育之后或同时，还使T细胞群体与一种或多种T细胞刺激剂(如T细胞刺激细胞因子和/或抗CD3/抗CD28刺激剂(例如抗CD3/抗CD28珠))在诱导或介导群体中的T细胞增殖的条件下接触。在一些实施方案中，T细胞刺激细胞因子包括来自重组IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21的一种或多种重组细胞因子，其可以在孵育被包括以初始扩增来自受试者的细胞群体中的T细胞。

[0534] 在一些实施方案中，将免疫检查点抑制剂与重组IL-2一起添加至培养基中。在一些实施方案中，重组IL-2是以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加，并且免疫检查点抑制剂是以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL，如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加。在一些实施方案中，初始扩增(第一扩增)(例如章节I.A.2中所述)是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2的存在下进行，并且免疫检查点抑制剂是以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL，如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加。在一些实施方案中，共培养(例如章节I.B.2中所述)是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2的存在下进行，并且免疫检查点抑制剂是以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL，如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加。在一些实施方案中，用于扩增(例如第二扩增)的孵育(例如章节I.D)是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2的存在下进行，并且免疫检查点抑制剂是以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL，如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加。

[0535] 在一些实施方案中，将免疫检查点抑制剂与重组IL-15一起添加至培养基中。在一些实施方案中，重组IL-15是以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约180IU/mL)的浓度添加，并且免疫检查点抑制剂是以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL，如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加。在一些实施方案中，初始扩增(例如章节I.A.2中所述)是在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约180IU/mL)的浓度添加的重组IL-15的存在下进行，并且免疫检查点抑制剂是以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL，如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加。在一些实施方案中，共培养(例如章节I.B.2中所述)是在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约180IU/mL)的浓度添加的重组IL-15的存在下进行，并且免疫检查点抑制剂是以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL，如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加。在一些实施方案中，用于扩增(例如第二扩增)的孵育(例如章节I.D)是在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-15的存在下进行，并且免疫检查点抑制剂是以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL，如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加。

D.细胞凋亡抑制剂

[0536] 在任何所提供的方法的方面，在细胞凋亡或细胞中的细胞凋亡信号传导途径的一种或多种抑制剂(下文中的“细胞凋亡抑制剂”)的存在下孵育T细胞群体。在所提供的实施方案中，所述方法包括将细胞与细胞凋亡抑制剂在减少或防止样品中T细胞的细胞凋亡的条件下一起孵育。在特定实施方案中，细胞凋亡抑制剂是Fas/Fas配体轴的抑制剂或者是半胱天冬酶的抑制剂，所述两者都参与诱导特别是激活的T细胞的细胞凋亡。在一些实施方案中，在T细胞疗法的离体制造过程期间包括细胞凋亡抑制剂导致在扩增过程期间目的T细胞的产量改进。在特定方面，这样的方法与肿瘤反应性T细胞的离体制造结合使用，所述肿瘤

反应性T细胞表示罕见且稀有的内源细胞群体。即使在通过所述共培养方法离体富集这样的细胞时，它们仍然可能在扩增细胞的过程期间易于发生细胞凋亡。所提供的方法通过在防止或减少细胞凋亡的同时增加增殖并支持其激活和扩增来恢复这样的细胞的活力。

[0537] 在一些实施方案中，在与细胞凋亡抑制剂一起孵育之后或同时，还使T细胞群体与一种或多种T细胞刺激剂(如抗CD3和/或一种或多种重组细胞因子，如来自重组IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21)在诱导或介导群体中的T细胞增殖的条件下接触。在一些这样的方面，细胞凋亡抑制剂保护T细胞免于发生细胞凋亡，从而恢复群体中的T细胞增殖和扩增的潜力。

[0538] 在一些方面，指示不存在细胞凋亡的一种或多种表型在通过所提供的方法产生的细胞中减少。细胞凋亡是程序性细胞死亡的过程，所述过程包括导致特征性细胞变化和死亡的一系列定型的形态学和生物化学事件。这些变化包括起泡、细胞皱缩、核碎裂、染色质凝聚、染色体DNA断裂和全面mRNA降解。细胞凋亡是一种充分表征的过程，并且与各个阶段相关的特定分子是本领域熟知的。在细胞凋亡的早期阶段，细胞和线粒体膜的变化变得明显。在细胞的细胞质和细胞核中生物化学变化也很明显。例如，细胞凋亡的早期阶段可以通过某些半胱天冬酶(例如，2、8、9和10)的激活来指示。细胞凋亡的中期至晚期阶段的特征在于膜完整性的进一步丧失、染色质凝聚和DNA断裂，包括生物化学事件如半胱天冬酶3、6和7的激活。

[0539] 在某些实施方案中，通过所提供的方法产生的细胞或本文所提供的治疗性T细胞组合物具有降低的对细胞凋亡标记呈阳性的细胞的百分比或频率。各种细胞凋亡标记是本领域普通技术人员已知的，并且包括但不限于一种或多种半胱天冬酶活性的增加(即经激活的半胱天冬酶)、PARP切割的增加、Bcl-2家族蛋白(细胞死亡途径的成员(例如，Fas和FADD))的激活和/或转位、核皱缩的存在(例如，通过显微镜监测)和染色体DNA断裂的存在(例如，染色体DNA梯的存在)或用包括TUNEL染色和膜联蛋白V染色的细胞凋亡测定。膜联蛋白V是一种以高亲和力优先结合磷脂酰丝氨酸(PS)的蛋白质，所述磷脂酰丝氨酸是一种在细胞凋亡期间从质膜的内小叶易位至外小叶的脂质。在一些实施方案中，通过所提供的方法产生的细胞或本文所提供的治疗性T细胞组合物具有降低的对与细胞凋亡相关的一种或多种因子的表达呈阳性的细胞的百分比或频率，所述因子包括已知启动细胞凋亡的促细胞凋亡因子，例如死亡受体途径的成员、经激活的线粒体(内在)途径的成员(如Bcl-2家族成员，例如Bax、Bad和Bid)以及半胱天冬酶。在某些实施方案中，通过所提供的方法产生的细胞或本文所提供的治疗性T细胞组合物具有降低的对用指示剂(例如膜联蛋白V分子)染色呈阳性的细胞的百分比或频率，所述指示剂将在与细胞组合物一起孵育或接触时优先与正在经历细胞凋亡的细胞结合。在任何这样的实施方案中，这样的细胞的降低的频率或百分比与通过类似过程产生的治疗性T细胞组合物相比是降低的，但是其中此个过程不包括用细胞凋亡抑制剂进行孵育。在一些实施方案中，细胞凋亡降低大于为或约1.5倍、大于为或约2倍、大于为或约3倍、大于为或约5倍、大于为或约10倍或更多。

[0540] 在特定实施方案中，细胞凋亡抑制剂是Fas/Fas配体轴的抑制剂或者是半胱天冬酶的抑制剂，所述二者都参与诱导特别是激活的T细胞的细胞凋亡。在所提供的方法的方面，细胞凋亡抑制剂可以降低或破坏由Fas/Fas配体轴介导的和/或由半胱天冬酶介导的信号传导。

[0541] 在特定实施方案中，细胞凋亡抑制剂是Fas/Fas配体轴的抑制剂或者是半胱天冬

酶的抑制剂,所述二者都参与诱导特别是激活的T细胞的细胞凋亡。在一些实施方案中,在与细胞凋亡抑制剂一起孵育之后或同时,还使T细胞群体与一种或多种T细胞刺激剂(如T细胞刺激细胞因子(例如IL-2)和/或抗CD3/抗CD28刺激剂(例如抗CD3/抗CD28珠))在诱导或介导群体中的T细胞增殖的条件下接触。在一些这样的方面,细胞凋亡抑制剂保护T细胞免于发生细胞凋亡,从而恢复群体中的T细胞增殖和扩增的潜力。

[0542] 在一些实施方案中,细胞凋亡抑制剂通过破坏Fas/Fas配体轴(CD95/CD95L轴)来抑制细胞凋亡。在一些方面,细胞凋亡抑制剂抑制由CD95诱导或介导的细胞凋亡。Fas配体(FasL或CD95L)是一种属于肿瘤坏死因子(TNF)家族的II类跨膜蛋白。它与其受体的结合诱导细胞凋亡。Fas配体/受体相互作用在免疫系统的调节和癌症的进展中起重要作用。T细胞的激活导致其Fas配体的表达。T细胞最初在克隆扩增期间对Fas介导的细胞凋亡有抗性,但是随着它们被激活的时间延长而变得逐渐更敏感,最终导致激活诱导的细胞死亡(AICD)。在一些方面,此过程在体内是必需的,以防止过度免疫反应并消除自身反应性T细胞。具有Fas或Fas配体的有害突变的人和小鼠出现异常T细胞的积累,导致淋巴结病、脾肿大和红斑狼疮。

[0543] 在所提供的方法的方面,使T细胞群(如含有肿瘤反应性T细胞的群体)与破坏或阻断Fas与Fas配体之间的相互作用的细胞凋亡抑制剂一起孵育或接触,其中这样的孵育是在通过抗原和/或通过激活或刺激群体中的T细胞的一种或多种T细胞刺激剂激活T细胞的同时或之后进行。在一些实施方案中,T细胞的激活可以上调Fas配体的表达,其中Fas配体可以与也在细胞表面上表达的Fas相互作用,从而接合Fas并引起细胞凋亡。在一些实施方案中,阻断此相互作用的细胞凋亡抑制剂可以是与Fas或Fas配体特异性结合以阻断其相互作用,从而至少部分减少或阻断细胞中的Fas信号传导途径和/或细胞凋亡的结合分子。用于确定和/或评估Fas信号途径活性的方法是本领域技术人员已知的,并且例如描述于Lavrik等人(2012)Cell Death Differ.,19(1):36-41中。

[0544] 根据本公开文本的抑制剂可以在蛋白质水平和/或核酸水平上起作用。在蛋白质水平上起作用的抑制剂可以选自抗体、蛋白质和/或小分子。在核酸水平上起作用的抑制剂是例如反义分子、RNAi分子和/或核酶。抑制剂与Fas(CD95)和/或Fas配体(CD95L)结合。在另一实施方案中,可以抑制Fas/Fas配体相互作用。

[0545] 在一些实施方案中,抑制剂是抗体或其功能片段。在一些方面,作为抗体的抑制剂可以与Fas(CD95)结合。在一些实施方案中,作为抗体的抑制剂可以与CD95L结合。结合CD95L的抗体的例子是Nok-1或其抗原结合片段(参见例如目录号16-9919-81,ThermoFisher Scientific,马萨诸塞州沃尔瑟姆)。

[0546] 在一些实施方案中,细胞凋亡抑制剂是可以与Fas配体特异性结合的可溶性蛋白。在一些实施方案中,细胞凋亡抑制剂是可溶性CD95受体分子,其含有CD95的细胞外部分但不含跨膜结构域。可溶CD95受体分子描述于EP-A-0595659或EP-A-0965637中。在一些实施方案中,细胞凋亡抑制剂是或包括CD95受体肽,如WO 99/65935中所述。

[0547] 在一些实施方案中,细胞凋亡抑制剂是与Fas配体结合的融合蛋白。在特定实施方案中,细胞凋亡抑制剂含有Fas(CD95)的细胞外结构域或其与Fas配体结合的特异性结合蛋白,其中细胞外结构域或特异性结合部分与异源多肽(如Fc免疫球蛋白分子)融合。在一些实施方案中,可溶Fas分子是如WO 99/144330或WO 99/50413中所述的任一种。在一些实施

方案中,可溶Fas分子是称为FLINT或DCR3的分子或其片段。

[0548] 在特定实施方案中,细胞凋亡抑制剂与Fas配体(CD95配体)结合,并且是含有细胞外Fas(CD95)结构域和Fc结构域(特别是人Fc结构域)的融合蛋白。在一个实施方案中,细胞凋亡抑制剂包括Fas的细胞外结构域,如包括示为CD95的氨基酸26-173的成熟CD95的全部或连续的细胞外结构域(参见例如UniProt登录号P25445;美国专利号5,891,434)。在一些实施方案中,CD95是人CD95并且含有具有以下序列(人CD95的氨基酸26-173)的细胞外结构域:

QVTDINSKGLELRKTVTTVETQNLEGLHHDGQFCHKPCPPGERKARDCTVNGDEPDCVPCQEGKEYTD KAHFSSKCRRCRLCDEGHGLEVEINCTRTQNTKCRCKPNFFCNSTVCEHCDPCTKCEHGIIKECTLTSNTKCKEEG SRSN(SEQ ID NO.7)

[0549] 在一些实施方案中,Fas(CD95)-Fc融合蛋白包括如WO 2014/013039或WO 2014/013037中所述的任一种。在一些实施方案中,融合蛋白的细胞外Fas(CD95)结构域包含直至人CD95的氨基酸170、171、172或173的氨基酸序列。在特定实施方案中,融合蛋白含有人CD95的氨基酸26-172。在一些实施方案中,Fc结构域或其功能片段包含免疫球蛋白的CH2和/或CH3结构域,以及任选地铰链区结构域的至少一部分或源自其的修饰的免疫球蛋白结构域。免疫球蛋白结构域可以是IgG、IgM、IgD或IgE免疫球蛋白结构域或源自其的修饰的免疫球蛋白结构域。在一些实施方案中,Fc结构域是IgG的Fc,其含有恒定IgG免疫球蛋白结构域的至少一部分。IgG免疫球蛋白结构域可以选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4结构域或选自来自其的修饰的结构域。在一些实施方案中,Fc是人Fc结构域,如IgG Fc结构域,例如人IgG1 Fc结构域。在特定实施方案中,Fas的细胞外结构域或其特异性结合片段与例如来自人IgG1分子的包括铰链区的Fc免疫球蛋白分子融合。包含细胞外CD95结构域和人Fc结构域的融合蛋白描述于WO 95/27735或WO 2004/085478中。

[0550] 在一些实施方案中,Fas(CD95)-Fc融合蛋白是APG101(阿舒那西普(asunercept))或者是其功能片段。

[0551] 在一些实施方案中,Fas(CD95)-Fc融合蛋白是CAN008或者是其功能片段。

[0552] 在一些实施方案中,细胞凋亡抑制剂抑制由半胱天冬酶诱导或介导的细胞凋亡。半胱天冬酶是作为细胞功能(包括导致细胞凋亡和炎症的功能)的调节剂起重要作用的相关酶的家族。半胱天冬酶激活和调节通过多种机制受到密切控制。所有半胱天冬酶都作为酶促无活性形式(称为半胱天冬酶原)表达,所述酶促无活性形式可以在多种细胞损伤或刺激后被激活。上述七种半胱天冬酶明确参与细胞凋亡过程。

[0553] 经由半胱天冬酶激活的细胞凋亡可以以多种重叠方式启动,包括经由线粒体途径、经由死亡受体途径(即,Fas/FasL、TNF/TNF受体)、经由内质网应激途径以及经由诱导细胞凋亡的蛋白酶颗粒酶B。

[0554] 在特定实施方案中,作为半胱天冬酶抑制剂的细胞凋亡抑制剂导致群体细胞中降低的半胱天冬酶的激活。在某些实施方案中,半胱天冬酶激活可以通过普通技术人员已知的方法来检测。在一些实施方案中,与激活的半胱天冬酶特异性结合(即,与切割过的多肽特异性结合)的抗体可以用于检测半胱天冬酶激活。在另一个例子中,半胱天冬酶活性的荧光染料抑制剂(FLICA)测定可以用于通过检测半胱天冬酶-3对乙酰基Asp-Glu-Val-Asp 7-酰胺基-4-甲基香豆素(Ac-DEVD-AMC)的水解(即检测发荧光的7-氨基-4-甲基香豆素(AMC)

的释放)来检测半胱天冬酶-3激活。FLICA测定可以用于通过检测通过多种半胱天冬酶(例如,FAM-VAD-FMK FLICA)处理的底物的产物来确定半胱天冬酶激活。其他技术包括使用激活发光的半胱天冬酶-8四肽底物(Z-LETD-氨基萤光素)、半胱天冬酶-9四肽底物(Z-LEHD-氨基萤光素)、半胱天冬酶-3/7底物(Z-DEVD-氨基萤光素)、半胱天冬酶-6底物(Z-VEID-氨基萤光素)或半胱天冬酶-2底物(Z-VDVAD-氨基萤光素)的CASPASE-GLO®半胱天冬酶测定(PROMEGA)。

[0555] 细胞凋亡抑制剂的例子包括泛半胱天冬酶抑制剂和半胱天冬酶特异性抑制剂。细胞凋亡抑制剂的例子包括半胱天冬酶抑制剂(如恩利卡生(IDN-6556、PF-03491390))、NAIP(神经元细胞凋亡抑制蛋白;BIRC1)、cIAP1和cIAP2(细胞凋亡抑制蛋白1和2;分别为BIRC2和BIRC3)、XIAP(X染色体结合IAP;BIRC4)、存活蛋白(BIRC5)、BRUCE(Apollon;BIRC6)、生存蛋白(BIRC7)和Ts-IAP(睾丸特异性IAP;BIRC8)、蟛蜞菊内酯、NS3694、NSCI和Z-氟甲基酮Z-VAD-FMK及其中的任何氟甲基酮变体(即,Z-FA-FMK、Z-VAD(OH)-FMK、Z-DEVD-FMK、Z-VAD(OM2)-FMK、Z-VDVAD-FMK等)。在一些实施方案中,所述半胱天冬酶抑制剂是半胱天冬酶特异性抑制剂。在一些实施方案中,细胞凋亡抑制剂是泛半胱天冬酶抑制剂。

[0556] 在特定实施方案中,半胱天冬酶抑制剂是XIAP。在一些方面,XIAP能够终止通过半胱天冬酶过量产生诱导的细胞凋亡性细胞死亡,如通过其结合至并抑制半胱天冬酶3、7和9的能力来终止。XIAP的BIR2结构域抑制半胱天冬酶3和7,而BIR3结合至并抑制半胱天冬酶9。

[0557] 在特定实施方案中,半胱天冬酶抑制剂是Z-VAD-FMK(苄氧羰基-缬氨酰-丙氨酰-天冬氨酰-[O-甲基]-氟甲基酮)。在一些方面,Z-VAD-FMK能够终止通过半胱天冬酶诱导的细胞凋亡性细胞死亡,如通过其结合几种半胱天冬酶的活性位点的能力来终止。

[0558] 在任何所提供的方法的实施方案中,扩增方法中T细胞(例如肿瘤反应性T细胞)与细胞凋亡抑制剂的比率(细胞与摩尔)为约1至25、约1至50、约1至100、约1至125、约1至150、约1至175、约1至200、约1至225、约1至250、约1至275、约1至300、约1至325、约1至350、约1至500、约1至1000或者约1至10000。

[0559] 在任何所提供的方法的实施方案中,在孵育期间将一种或多种细胞凋亡抑制剂添加至细胞培养基。在一些实施方案中,一种或多种细胞凋亡抑制剂中的每一种独立地以范围如下的浓度来添加:在为或约0.1μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约50μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约5μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约1μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约0.5μg/mL之间、0.5μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约50μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约5μg/mL之间、为或约0.5μg/mL与为或约1μg/mL之间、1μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约50μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约5μg/mL之间、为或约5μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约5μg/mL与为或约50μg/mL之间、为或约5μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约5μg/mL与为或约10μg/mL之间、为或约10μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约10μg/mL与为或约50μg/mL之间、为或约10μg/mL与为或约25μg/mL之间、为或约25μg/mL至为或约100μg/mL之间、为或约25μg/mL与为或约50μg/mL之间或者为或约50μg/mL

与为或约100μg/mL之间,每个都包含端值。

[0560] 在一些实施方案中,一种或多种细胞凋亡抑制剂中的每一种独立地以范围在0.5μM与100μM之间的浓度来添加,如以下浓度:在为和约0.5μM与为或约50μM之间、在为或约0.5μM与为或约25μM之间、在为或约0.5μM与为或约10μM之间、在为或约0.5μM与为或约5μM之间、在为或约0.5μM与为或约1μM之间、在为或约1μM与为或约100μM之间、在为或约1μM与为或约50μM之间、在为或约1μM与为或约25μM之间、在为或约1μM与为或约10μM之间、在为或约1μM与为或约5μM之间、在为或约5μM与为或约100μM之间、在为或约5μM与为或约50μM之间、在为或约5μM与为或约25μM之间、在为或约5μM与为或约10μM之间、在为或约10μM与为或约100μM之间、在为或约10μM与为或约50μM之间、在为或约10μM与为或约25μM之间、在为或约25μM与为或约100μM之间、在为或约25μM与为或约50μM之间或者在为或约50μM与为或约100μM之间,每个都包含端值。

[0561] 在一些实施方案中,将细胞凋亡抑制剂与重组IL-2一起添加至培养基。在一些实施方案中,重组IL-2是以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加,并且细胞凋亡抑制剂是以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加。在一些实施方案中,初始扩增(第一扩增)(例如章节I.A.2中所述)是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2的存在下进行,并且细胞凋亡抑制剂是以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加。在一些实施方案中,共培养(例如章节I.B.2中所述)是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2的存在下进行,并且细胞凋亡抑制剂是以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加。在一些实施方案中,用于扩增(例如第二扩增)的孵育(例如章节I.D)是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2的存在下进行,并且细胞凋亡抑制剂是以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加。

[0562] 在一些实施方案中,细胞凋亡抑制剂是Z-VAD-FMK。在一些实施方案中,将Z-VAD-FMK与重组IL-2一起添加至培养基。在一些实施方案中,重组IL-2是以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加,并且Z-VAD-FMK是以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加。在一些实施方案中,初始扩增(第一扩增)(例如章节I.A.2中所述)是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2的存在下进行,并且Z-VAD-FMK是以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加。在一些实施方案中,共培养(例如章节I.B.2中所述)是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2的存在下进行,并且Z-VAD-FMK是以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加。在一些实施方案中,用于扩增(第二扩增)的孵育(例如章节I.D)是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2的存在下进行,并且Z-VAD-FMK是以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加。

[0563] 在一些实施方案中,将细胞凋亡抑制剂与重组IL-15一起添加至培养基。在一些实施方案中,重组IL-15是以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约180IU/mL)的浓度添加,并且细胞凋亡抑制剂是以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加。在一些实施方案中,初始扩增(第一扩增)(例如章节I.A.2中所述)是在以10IU/mL至500IU/mL

(例如为或约180IU/mL)的浓度添加的重组IL-15的存在下进行,并且细胞凋亡抑制剂是以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加。在一些实施方案中,共培养(例如章节I.B.2中所述)是在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约180IU/mL)的浓度添加的重组IL-15的存在下进行,并且细胞凋亡抑制剂是以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加。在一些实施方案中,用于扩增(例如第二扩增)的孵育(例如章节I.D)是在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约180IU/mL)的浓度添加的重组IL-15的存在下进行,并且细胞凋亡抑制剂是以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加。

[0564] 在一些实施方案中,细胞凋亡抑制剂是Z-VAD-FMK。在一些实施方案中,将Z-VAD-FMK与重组IL-15一起添加至培养基。在一些实施方案中,重组IL-15是以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约180IU/mL)的浓度添加,并且Z-VAD-FMK是以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加。在一些实施方案中,初始扩增(第一扩增)(例如章节I.A.2中所述)是在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约180IU/mL)的浓度添加的重组IL-15的存在下进行,并且Z-VAD-FMK是以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加。在一些实施方案中,共培养(例如章节I.B.2中所述)是在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约180IU/mL)的浓度添加的重组IL-15的存在下进行,并且Z-VAD-FMK是以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加。在一些实施方案中,用于扩增(例如第二扩增)的孵育(例如章节I.D)是在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约180IU/mL)的浓度添加的重组IL-15的存在下进行,并且Z-VAD-FMK是以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加。

[0565] 在特定实施方案中,T细胞调节剂是热休克蛋白的抑制剂。热休克蛋白(Hsp)是一组多样化的蛋白质,其包括可以由细胞响应于应激产生的分子伴侣。应激源可以包括但不限于热、氧化应激、感染、缺血、暴露于重金属以及营养缺乏。一些Hsp具有可证明的抗细胞凋亡作用,例如Hsp70被描述为经由抑制Bax蛋白的线粒体易位来减弱细胞凋亡。其他Hsp参与可以促进细胞凋亡反应的信号传导级联,如Hsp10参与激活半胱天冬酶原3(Ikwegbue等人,Pharmaceuticals 11(1):2,2018)。

[0566] 在某些实施方案中,Hsp抑制剂是Hsp90的抑制剂。Hsp90是一种ATP依赖性伴侣蛋白,其消极地抑制Hsp70,但是Hsp90和Hsp70合作防止蛋白质响应于应激经由热休克因子1而发生危险的聚集。已经观察到Hsp90的过表达导致蛋白质稳定、细胞增殖、血管生成以及增加的癌细胞存活。还已经证明Hsp90稳定参与致癌信号传导途径的几种受体,包括EGFR(Chatterjee等人,Int J Mol Sci(18)9,2017)。出于这些原因等,已经在癌症的临床前模型以及多项I期和II期研究中评价作为单一药剂以及与其他药剂组合的Hsp90抑制剂(Spreafico等人,Brit J of Cancer(112)650-659,2015)。

[0567] hsp抑制剂的例子包括但不限于MKT-077、二氢嘧啶(即,SW02、MAL2-IIB、MAL3-101、NSC630668等)、类黄酮(即,表没食子儿茶素、杨梅黄酮等)、15-DSG、Apoptozole、VER-155008、适配体A17、适配体A8、cmHSP70.1。hsp90抑制剂的例子包括但不限于17-AAg、17-DMAG、IPI-504、NVP-AUY922、AT13387、Ganetespib、KW-2478、CNF-2024(BIIB021)、Debio 0932、PU-H71、MPC-310、SNX-5422、Ds-2248、XL-888、TAS-116和NVP-HSP990。

[0568] 在特定实施方案中,hsp抑制剂是NVP-HSP990。

[0569] 在一些实施方案中，一种或多种hsp抑制剂中的每一种独立地以范围在1nM与为或约500nM之间的浓度来添加，如以下浓度：在为或约1nM与为或约250nM之间、在为或约1nM与为或约100nM之间、在为或约1nM与为或约50nM之间、在为或约1nM与为或约25nM之间、在为或约1nM与为或约10nM之间、在为或约1nM与为或约5nM之间、在为或约5nM与为或约500nM之间、5nM与为或约250nM之间、在为或约5nM与为或约100nM之间、在为或约5nM与为或约50nM之间、在为或约5nM与为或约25nM之间、在为或约5nM与为或约10nM之间、在为或约10nM与为或约500nM之间、10nM与为或约250nM之间、在为或约10nM与为或约100nM之间、在为或约10nM与为或约50nM之间、在为或约10nM与为或约25nM之间、在为或约25nM与为或约500nM之间、25nM与为或约250nM之间、在为或约25nM与为或约100nM之间、在为或约25nM与为或约50nM之间、在为或约50nM与为或约500nM之间、50nM与为或约250nM之间、在为或约50nM与为或约100nM之间、在为或约100nM与为或约500nM之间、100nM与为或约250nM之间或者在为或约250nM与为或约500nM之间，每个都包含端值。

[0570] 在一些实施方案中，hsp抑制剂独立地以范围在500nM与为或约1000nM之间的浓度来添加。在一些实施方案中，hsp抑制剂是以以下浓度来添加：为或约500nM、为或约600nM、为或约700nM、为或约800nM、为或约900nM或者为或约1000nM。

[0571] 在一些实施方案中，将hsp抑制剂与重组IL-2一起添加至培养基。在一些实施方案中，重组IL-2是以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加，并且hsp抑制剂是以1nM至1000nM(例如为或约1000nM)的浓度添加。在一些实施方案中，初始扩增(第一扩增)(例如章节I.A.2中所述)是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2的存在下进行，并且hsp抑制剂是以1nM至1000nM(例如为或约1000nM)的浓度添加。在一些实施方案中，共培养(例如章节I.B.2中所述)是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2的存在下进行，并且hsp抑制剂是以1nM至1000nM(例如为或约1000nM)的浓度添加。在一些实施方案中，用于扩增(例如第二扩增)的孵育(例如章节I.D)是在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2的存在下进行，并且hsp抑制剂是以1nM至1000nM(例如为或约1000nM)的浓度添加。

[0572] 在一些实施方案中，将hsp抑制剂与重组IL-15一起添加至培养基。在一些实施方案中，重组IL-15是以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约1800IU/mL)的浓度添加，并且hsp抑制剂是以1nM至1000nM(例如为或约1000nM)的浓度添加。在一些实施方案中，初始扩增(第一扩增)(例如章节I.A.2中所述)是在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约1800IU/mL)的浓度添加的重组IL-15的存在下进行，并且hsp抑制剂是以1nM至1000nM(例如为或约1000nM)的浓度添加。在一些实施方案中，共培养(例如章节I.B.2中所述)是在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约1800IU/mL)的浓度添加的重组IL-15的存在下进行，并且hsp抑制剂是以1nM至1000nM(例如为或约1000nM)的浓度添加。在一些实施方案中，用于扩增(例如第二扩增)的孵育(例如章节I.D)是在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约1800IU/mL)的浓度添加的重组IL-15的存在下进行，并且hsp抑制剂是以1nM至1000nM(例如为或约1000nM)的浓度添加。

III.组合物和药物配制品

[0573] 本文提供含有如通过任何所提供的方法产生的扩增的T细胞的组合物。在一些实施方案中，所述组合物含有肿瘤反应性T细胞或含有对肿瘤相关抗原(例如新生抗原)具有特异性的内源TCR的T细胞。特别地，所提供的组合物包括富集肿瘤反应性T细胞或含有对肿

瘤相关抗原(例如新生抗原)具有特异性的内源TCR的T细胞的细胞组合物。

[0574] 在一些实施方案中,所述组合物包含约5-99%肿瘤反应性T细胞或对一种或多种选择标记(例如如章节I.C中所述的任一种)呈阳性的T细胞,或者在5%与99%之间(包含端值)的这样的细胞的任何百分比。在一些实施方案中,与这样的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记呈阳性的CD3+T细胞相对于分离出所述细胞的受试者或生物样品中天然存在的总CD3+T细胞或总细胞的百分比相比,所述组合物可以包括增加的或更大的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如如章节I.D中所述的任一种)呈阳性的CD3+T细胞相对于所述组合物中的总CD3+T细胞或总细胞的百分比。在一些实施方案中,所述百分比增加至少或至少约2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、150倍、200倍或更多。在这样的实施方案中,所述一种或多种选择标记可以是如所述的任一种,如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT。

[0575] 在一些实施方案中,所述组合物可以包括至少或至少约20%、至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约81%、至少或至少约82%、至少或至少约83%、至少或至少约84%、至少或至少约85%、至少或至少约86%、至少或至少约87%、至少或至少约88%、至少或至少约89%、至少或至少约90%、至少或至少约91%、至少或至少约92%、至少或至少约93%、至少或至少约94%、至少或至少约95%、至少或至少约96%、至少或至少约97%、至少或至少约98%、至少或至少约99%或者基本上100%的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中,所述组合物包含超过30%的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中,所述组合物包含超过40%的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中,所述组合物包含超过50%的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中,所述组合物包含超过60%的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中,所述组合物包含超过70%的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中,所述组合物包含超过80%的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中,所述组合物包含超过90%的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞。在这样的实施方案中,所述一种或多种选择标记可以是如章节I.D中所述的任一种,如例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT中的任何一种或多种。在这样的实施方案中,所述选择标记包括对CXCL13呈阳性的细胞。在一些实施方案中,所述选择标记包括对PD-1/CD39/TIGIT呈阳性的细胞。

[0576] 在一些实施方案中,肿瘤反应性可以以治疗有效量存在于所述组合物中。细胞的有效量可以根据患者以及疾病的类型、严重程度和范围而变化。因此,医师可以在考虑受试者的健康、疾病的范围和严重程度以及其他变量后确定有效量。

[0577] 在某些实施方案中,这样的细胞在所述组合物中的数量是治疗有效量。在一些实

施方案中，所述量是降低动物中与癌症、病毒感染、微生物感染或脓毒性休克相关的严重程度、持续时间和/或症状的量。在一些实施方案中，治疗有效量是细胞的如下剂量，所述剂量导致相对于未施用本文所述的组合物的患者(或动物)或患者(或动物)组中癌症的生长或扩散，施用所述组合物的患者或动物中癌症的生长或扩散减少至少2.5％、至少5％、至少10％、至少15％、至少25％、至少35％、至少45％、至少50％、至少75％、至少85％、至少90％、至少95％或至少99％。在一些实施方案中，治疗有效量是导致细胞毒性活性从而产生抑制或减少癌症、病毒和微生物细胞生长的活性的量。

[0578] 在一些实施方案中，所述组合物具有为或约10^5和为或约10^{12}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞、或者为或约10^5至为或约10^8个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞、或者为或约10^6和为或约10^{12}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞、或者为或约10^8和为或约10^{11}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞、或者为或约10^9和为或约10^{10}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中，所述组合物包含大于或大于为或约10^5个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞、为或约10^6个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞、为或约10^7个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞、为或约10^8个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞、为或约10^9个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞、为或约10^{10}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞、为或约10^{11}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞或者为或约10^{12}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中，可以将这样的量施用于患有疾病或病症的受试者，如施用于癌症患者。在这样的实施方案中，所述一种或多种选择标记可以是如章节I.D中所述的任一种，如例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT中的任何一种或多种。在这样的实施方案中，所述选择标记包括对CXCL13呈阳性的细胞。在一些实施方案中，所述选择标记包括对PD-1/CD39/TIGIT呈阳性的细胞。

[0579] 在一些实施方案中，所述组合物包含约5-99％的对一种或多种T细胞激活标记(如CD137(4-1BB)或CD134(OX40))呈表面阳性的肿瘤反应性T细胞，或者在5％与99％之间(包含端值)的任何百分比的这样的细胞。在一些实施方案中，与这样的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种T细胞激活标记呈表面阳性的CD3+T细胞相对于分离出所述细胞的受试者或生物样品中天然存在的总CD3+T细胞或总细胞的百分比相比，所述组合物可以包括增加的或更大的对一种或多种T细胞激活标记呈表面阳性的CD3+T细胞相对于所述组合物中的总CD3+T细胞或总细胞的百分比。在一些实施方案中，所述百分比增加至少或至少约2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、150倍、200倍或更多。

[0580] 在一些实施方案中,所述组合物可以包括至少或至少约20%、至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约81%、至少或至少约82%、至少或至少约83%、至少或至少约84%、至少或至少约85%、至少或至少约86%、至少或至少约87%、至少或至少约88%、至少或至少约89%、至少或至少约90%、至少或至少约91%、至少或至少约92%、至少或至少约93%、至少或至少约94%、至少或至少约95%、至少或至少约96%、至少或至少约97%、至少或至少约98%、至少或至少约99%或者基本上100%的对一种或多种激活标记(例如CD134和/或CD137)呈表面阳性的肿瘤反应性CD3+T细胞。在一些实施方案中,所述组合物包含超过30%的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记(例如CD134和/或CD137)呈表面阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中,所述组合物包含超过40%的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记(例如CD134和/或CD137)呈表面阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中,所述组合物包含超过50%的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记(例如CD134和/或CD137)呈表面阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中,所述组合物包含超过60%的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记(例如CD134和/或CD137)呈表面阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中,所述组合物包含超过70%的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记(例如CD134和/或CD137)呈表面阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中,所述组合物包含超过80%的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记(例如CD134和/或CD137)呈表面阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中,所述组合物包含超过90%的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记(例如CD134和/或CD137)呈表面阳性的CD3+T细胞。

[0581] 在一些实施方案中,所述组合物以占群体中总细胞的如下百分比包含CD3+T细胞:大于或大于约60%、大于或大于约70%、大于或大于约80%、大于或大于约90%或者大于或大于约95%。在一些实施方案中,所述组合物以占群体中总细胞的如下百分比含有CD4+T细胞和CD8+T细胞:大于或大于约60%、大于或大于约70%、大于或大于约80%、大于或大于约90%或者大于或大于约95%。在特定实施方案中,所述组合物含有如下比率的CD8+T细胞与CD4+T细胞:在为或约1:100与为或约100:1之间、在为或约1:50与为或约50:1之间、在为或约1:25与为或约25:1之间、在为或约1:10与为或约10:1之间、在为或约1:5与为或约5:1之间或者在为或约1:2.5与为或约2.5:1之间。

[0582] 在一些实施方案中,所述组合物的体积为至少或至少约10mL、50mL、100mL、200mL、300mL、400mL或500mL,如为从或从约10mL至500mL、10mL至200mL、10mL至100mL、10mL至50mL、50mL至500mL、50mL至200mL、50mL至100mL、100mL至500mL、100mL至200mL或者200mL至500mL,每个都包含端值。在一些实施方案中,所述组合物的细胞密度为至少或至少约$1x10^5$个细胞/mL、$5x10^5$个细胞/mL、$1x10^6$个细胞/mL、$5x10^6$个细胞/mL、$1x10^7$个细胞/mL、$5x10^7$个细胞/mL或$1x10^8$个细胞/mL。在一些实施方案中,所述组合物的细胞密度在或在约$1x10^5$个细胞/mL至$1x10^8$个细胞/mL之间、$1x10^5$个细胞/mL至$1x10^7$个细胞/mL之间、$1x10^5$个细胞/mL至$1x10^6$个细胞/mL之间、$1x10^6$个细胞/mL至$1x10^7$个细胞/mL之间、$1x10^6$个细胞/mL至$1x10^8$个细胞/mL之间、$1x10^6$个细胞/mL至$1x10^7$个细胞/mL之间或$1x10^7$个细胞/mL至$1x10^8$个细胞/mL之间,每个都包含端值。

[0583] 所述组合物包括用于施用(如用于过继细胞疗法)的药物组合物和配制品。在一些

实施方案中,用药学上可接受的载体配制工程化的细胞。

[0584] 药学上可接受的载体可以包括与药物施用相容的所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等(Gennaro,2000,Remington:The science and practice of pharmacy,Lippincott,Williams&Wilkins,宾夕法尼亚州费城)。这样的载体或稀释剂的例子包括但不限于水、盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。也可使用脂质体和非水性媒介物,如不挥发油。还可以将补充性活性化合物掺入组合物中。药学载体应当是适合于NK细胞的载体,如盐水溶液、右旋糖溶液或包含人血清白蛋白的溶液。

[0585] 在一些实施方案中,用于这样的组合物的药学上可接受的载体或媒介物是任何无毒的水溶液,其中可以维持细胞或者细胞可以保持存活足够长的时间,以允许施用活细胞。例如,药学上可接受的载体或媒介物可以是盐水溶液或缓冲盐水溶液。药学上可接受的载体或媒介物还可以包括可以增加细胞效率的各种生物材料。细胞媒介物和载体可以例如包括多糖(如甲基纤维素)(M.C.Tate,D.A.Shear,S.W.Hoffman,D.G.Stein,M.C.LaPlaca,Biomaterials 22,1113,2001,其通过引用以其整体并入本文)、壳聚糖(Suh J K F,Matthew H W T.Biomaterials,21,2589,2000;Lahiji A,Sohrabi A,Hungerford D S,等人,J Biomed Mater Res,51,586,2000,其各自通过引用以其整体并入本文)、N-异丙基丙烯酰胺共聚物P(NIPAM-共-AA)(Y.H.Bae,B.Vernon,C.K.Han,S.W.Kim,J.Control.Release 53,249,1998;H.Gappa,M.Baudys,J.J.Koh,S.W.Kim,Y.H.Bae,Tissue Eng.7,35,2001,其各自通过引用以其整体并入本文),以及聚(氧乙烯)/聚(D,L-乳酸-共-乙醇酸)(B.Jeong,K.M.Lee,A.Gutowska,Y.H.An,Biomacromolecules 3,865,2002,其通过引用以其整体并入本文)、P(PF-共-EG)(Suggs L J,Mikos A G.Cell Trans,8,345,1999,其通过引用以其整体并入本文)、PEO/PEG(Mann B K,Gobin A S,Tsai A T,Schmedlen R H,West J L.,Biomaterials,22,3045,2001;Bryant S J,Anseth K S.Biomaterials,22,619,2001,其各自通过引用以其整体并入本文)、PVA(Chih-Ta Lee,Po-Han Kung和Yu-Der Lee,Carbohydrate Polymers,61,348,2005,其通过引用以其整体并入本文)、胶原蛋白(Lee C R,Grodzinsky A J,Spector M.,Biomaterials 22,3145,2001,其通过引用以其整体并入本文)、藻酸盐(Bouhadir K H,Lee K Y,Alsberg E,Damm K L,Anderson K W,Mooney D J.Biotech Prog 17,945,2001;Smidsrd O,Skjak-Braek G.,Trends Biotech,8,71,1990,其各自通过引用以其整体并入本文)。

[0586] 在一些实施方案中,包括药物组合物在内的所述组合物是无菌的。在一些实施方案中,细胞的分离或富集在封闭或无菌环境中进行,例如以使误差、用户操作和/或污染最小化。在一些实施方案中,可以容易地实现无菌性,例如,通过经无菌滤膜过滤来实现。

[0587] 本文还提供适合于冷冻保存所提供的T细胞(包括肿瘤反应性T细胞)的组合物。在一些实施方案中,所述组合物包含冷冻保护剂。在一些实施方案中,冷冻保护剂是或包括DMSO和/或甘油。在一些实施方案中,可以将配制用于冷冻保存的组合物储存在低温(如超低温)下,例如,储存温度的范围为-40℃至-150℃,如为或约80℃±6.0℃。

[0588] 在一些实施方案中,将冷冻保存的细胞通过解冻准备用于施用。在一些情形中,可以在解冻后立即将细胞施用于受试者。在此个实施方案中,组合物无需任何进一步处理即随时可用。在其他情形中,将细胞在解冻后进一步处理,如通过用药学上可接受的载体重悬,用激活剂或刺激剂进行孵育,或者在施用于受试者之前激活、洗涤并重悬于药学上可接

受的缓冲液中。

IV.治疗方法和治疗应用

[0589] 本文提供了与本文所述的所提供的治疗性细胞组合物相关的组合物和方法，用于在治疗受试者的疾病或病症，如癌症。这样的方法和用途包括治疗性方法和用途，例如，其涉及将治疗性细胞或含有所述治疗性细胞的组合物施用于患有疾病、病症或障碍的受试者。在一些情形中，所述疾病或障碍是肿瘤或癌症。在一些实施方案中，以有效量施用细胞或其药物组合物以实现对疾病或障碍的治疗。用途包括细胞或其药物组合物在这样的方法和治疗中，以及在用于进行这样的治疗方法的药物的制备中的用途。在一些实施方案中，所述方法由此治疗所述受试者的疾病或病症或障碍。

[0590] 在一些实施方案中，所述治疗方法包括施用有效量的含有肿瘤反应性CD3+T细胞或对如本文所述的一种或多种标记(例如CXCL13和/或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞的组合物。这样的组合物可以包括如本文所述的任一种，包括通过所提供的方法产生的组合物。

[0591] 在一些实施方案中，向受试者(例如自体的)施用为或约10^5至为或约10^{12}个通过任何所提供的方法产生的CD3+T细胞、或者为或约10^5至为或约10^8个通过任何所提供的方法产生的CD3+T细胞、或者为或约10^6与为或约10^{12}个通过任何所提供的方法产生的CD3+T细胞、或者为或约10^8与为或约10^{11}个通过任何所提供的方法产生的CD3+T细胞、或者为或约10^9与为或约10^{10}个通过任何所提供的方法产生的CD3+T细胞。在一些实施方案中，用于施用的治疗有效量包含大于或大于为或约10^5个通过任何所提供的方法产生的CD3+T细胞、为或约10^6个通过任何所提供的方法产生的CD3+T细胞、为或约10^7个通过任何所提供的方法产生的CD3+T细胞、为或约10^8个通过任何所提供的方法产生的CD3+T细胞、为或约10^9个通过任何所提供的方法产生的CD3+T细胞、为或约10^{10}个通过任何所提供的方法产生的CD3+T细胞、为或约10^{11}个通过任何所提供的方法产生的CD3+T细胞或者为或约10^{12}个通过任何所提供的方法产生的CD3+T细胞。在一些实施方案中，可以将这样的量施用于患有疾病或病症的受试者，如施用于癌症患者。在一些实施方案中，所施用的数量的T细胞是活T细胞。

[0592] 在一些实施方案中，所述治疗方法包括施用有效量的含有肿瘤反应性CD3+T细胞或对如本文所述的一种或多种选择标记(例如CXCL13和/或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的CD3+T细胞的组合物。这样的组合物可以包括如本文所述的任一种，包括通过所提供的方法产生的组合物。在一些实施方案中，将为或约10^5至为或约10^{12}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记(如如所述的任一种)呈阳性的CD3+T细胞、或者为或约10^5至为或约10^8个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记呈阳性的CD3+T细胞、或者为或约10^6和为或约10^{12}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记呈阳性的CD3+T细胞、或者为或约10^8和为或约10^{11}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记呈阳性的CD3+T细胞、或者为或约10^9和为或约10^{10}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记呈阳性的CD3+T细胞施用于个体。在一些实施方案中，用于施用的治疗有效量包含大于或大于为或约10^5个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记呈阳性的CD3+T细胞、为或约10^6个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记呈阳性的CD3+T细胞、为或约10^7个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记呈阳性的CD3+T细胞、为或约10^8个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记呈阳性的CD3+T细胞、为或约10^9个肿瘤反应性CD3+T细胞或

对一种或多种选择标记呈阳性的CD3+T细胞、为或约10^{10}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记呈阳性的CD3+T细胞、为或约10^{11}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记呈阳性的CD3+T细胞或者为或约10^{12}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种选择标记呈阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中，可以将这样的量施用于患有疾病或病症的受试者，如施用于癌症患者。在一些实施方案中，所施用的数量的T细胞是活T细胞。在这样的实施方案中，所述一种或多种选择标记可以是如章节I.D中所述的任一种，如例如CXCL13或PD-1/CD39/TIGIT中的任何一种或多种。在这样的实施方案中，所述选择标记包括对CXCL13呈阳性的细胞。在一些实施方案中，所述选择标记包括对PD-1/CD39/TIGIT呈阳性的细胞。

[0593] 在一些实施方案中，所述量是作为平剂量来施用。在其他实施方案中，所述量是按每公斤受试者体重来施用。

[0594] 在一些实施方案中，在根据所提供的方法扩增后不久，将组合物(如通过任何所提供的方法产生的或者含有肿瘤反应性T细胞或对选择标记(例如CXCL13和/或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的T细胞)施用于个体。在其他实施方案中，在施用前将扩增的T细胞(如扩增的肿瘤反应性T细胞或对选择标记呈阳性的T细胞)冷冻保存，如通过上述方法来进行。例如，在施用于个体之前，可以将T细胞(如肿瘤反应性T细胞或对选择标记呈阳性的T细胞)储存大于6、12、18或24个月。可以在施用前将这样的冷冻保存的细胞解冻。

[0595] 在一些实施方案中，所提供的组合物(如通过任何所提供的方法产生的或者含有肿瘤反应性T细胞或对T细胞选择标记呈阳性的T细胞)可以通过任何便捷途径施用于受试者，所述途径包括肠胃外途径，如皮下、肌内、静脉内和/或硬膜外施用途径。

[0596] 在一些实施方案中，组合物(如通过任何所提供的方法提供的或者含有肿瘤反应性T细胞或对选择标记呈阳性的T细胞)可以以单一剂量来施用。这样的施用可以通过注射进行，例如，静脉内注射。在一些实施方案中，肿瘤反应性T细胞或对选择标记呈阳性的T细胞可以以多个剂量来施用。给药可以是每年一次、两次、三次、四次、五次、六次或超过六次。给药可以是一个月一次、每两周一次、一周一次或每隔一天一次。只要需要，这样的组合物和细胞的施用可以持续进行。

[0597] 在一些实施方案中，在施用所述剂量的来自所提供的组合物(如通过任何所提供的方法产生的或者含有肿瘤反应性T细胞或对选择标记呈阳性的T细胞)的细胞之前，向受试者施用淋巴细胞清除疗法。所述淋巴细胞清除疗法可以包括施用氟达拉滨和/或环磷酰胺(活性形式被称为马磷酰胺)及其组合。这样的方法描述于以下文献中：Gassner等人，Cancer Immunol Immunother.2011,60(1):75-85;Muranski等人,Nat Clin Pract Oncol,2006 3(12):668-681;Dudley等人,J Clin Oncol 2008,26:5233-5239;以及Dudley等人,J Clin Oncol.2005,23(10):2346-2357，所述文献都是通过引用以其整体并入本文。在一些实施方案中，氟达拉滨是以以下剂量来施用：10mg/kg/天、15mg/kg/天、20mg/kg/天、25mg/kg/天、30mg/kg/天、35mg/kg/天、40mg/kg/天或45mg/kg/天，或者前述任一项的范围之间的剂量量。在一些实施方案中，氟达拉滨持续2-7天，如持续3-5天，如为或约3天、为或约4天或者为或约5天。在一些实施方案中，环磷酰胺是以以下剂量来施用：100mg/m2/天、150mg/m2/天、175mg/m2/天、200mg/m2/天、225mg/m2/天、250mg/m2/天、275mg/m2/天或300mg/m2/天。在一些实施方案中，环磷酰胺是静脉内(即，i.v.)施用。在一些实施方案中，环磷酰胺治疗持续2-7天，如3-5天、为或约3天、为或约4天或者为或约5天。淋巴细胞清除疗法是在所提供

的细胞组合物之前施用。在一些实施方案中，淋巴细胞清除疗法是在施用所提供的细胞组合物的一周内(如施用所述剂量的细胞之前5-7天内)进行的。

[0598] 本文所述的组合物可以用于治疗过度增殖性障碍的方法中。在优选实施方案中，所述组合物用于治疗癌症。在一些方面，所述癌症可以是黑色素瘤、卵巢癌、宫颈癌、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、头颈癌、肾细胞癌、急性髓性白血病、结直肠癌和肉瘤。在一些实施方案中，所述癌症是具有高突变负荷的癌症。在一些实施方案中，所述癌症是黑色素瘤、肺鳞癌、肺腺癌、膀胱癌、肺小细胞癌、食道癌、结直肠癌、宫颈癌、头颈癌、胃癌或子宫癌。

[0599] 在一些实施方案中，所述癌症是上皮癌。在一些实施方案中，所述癌症选自非小细胞肺癌(NSCLC)、CRC、卵巢癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆管细胞癌、子宫内膜癌。在一些实施方案中，所述乳腺癌是HR+/Her2-乳腺癌。在一些实施方案中，所述乳腺癌是三阴性乳腺癌(TNBC)。在一些实施方案中，所述乳腺癌是HER2+乳腺癌。

[0600] 在一些实施方案中，受试者患有作为血液肿瘤的癌症。血液肿瘤的非限制性例子包括白血病(包括急性白血病(如1 1q23阳性急性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性粒细胞白血病、急性髓细胞性白血病以及成髓细胞白血病、早幼粒细胞白血病、髓单核细胞白血病、单核细胞白血病和红白血病)、慢性白血病(如慢性粒细胞(myelocytic/granulocytic)白血病、慢性髓细胞性白血病和慢性淋巴细胞白血病))、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤(惰性和高分级形式)、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链疾病、骨髓增生异常综合征、毛细胞白血病和脊髓发育不良。

[0601] 在一些实施方案中，受试者患有实体瘤癌症。实体瘤(如肉瘤和癌)的非限制性例子包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨性肉瘤和其他肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌(包括基底乳腺癌、导管癌和小叶乳腺癌)、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髓样癌、乳头状甲状腺癌、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓样癌、支气管原癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、肾母细胞瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、精原细胞瘤、膀胱癌和CNS肿瘤(如神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤)。在几个例子中，肿瘤是黑色素瘤、肺癌、淋巴瘤、乳腺癌或结肠癌。

[0602] 在一些实施方案中，所述癌症是皮肤癌。在特定实施方案中，所述癌症是黑色素瘤，如皮肤黑色素瘤。在一些实施方案中，所述癌症是梅克尔细胞癌或转移性皮肤鳞状细胞癌(CSCC)。

[0603] 在一些实施方案中，所述肿瘤是如下癌，所述癌是从上皮细胞发展的癌症或者是上皮起源的癌症。在一些实施方案中，所述癌症源自上皮细胞，其包括但不限于乳腺癌、基底细胞癌、腺癌、胃肠癌、唇癌、口腔癌、食道癌、小肠癌和胃癌、结肠癌、肝癌、膀胱癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肺癌、乳腺癌和皮肤癌(如鳞状细胞癌和基底细胞癌)、前列腺癌、肾细胞癌以及影响全身上皮细胞的其他已知癌症。

[0604] 在一些实施方案中，受试者患有癌症，所述癌症是涉及胃肠道(GI道)癌症的胃肠癌，包括上消化道或下消化道或附属消化器官(如食道、胃、胆管系统、胰腺、小肠、大肠、直肠或肛门)的癌症。在一些实施方案中，所述癌症是食道癌、胃(stomach/gastric)癌、胰腺

癌、肝癌(肝细胞癌)、胆囊癌、粘膜相关淋巴组织的癌症(MALT淋巴瘤)、胆管树的癌症、结直肠癌(包括结肠癌、直肠癌或两者)、肛门癌或胃肠类癌瘤。在特定实施方案中,所述癌症是结直肠癌。

[0605] 在一些实施方案中,所述癌症是结直肠癌。结直肠癌(CRC)是一种发病率逐渐增加的常见肿瘤,其在许多情形中对检查点抑制或其他免疫疗法没有反应。即使这样的癌症具有与反应相关的特性(例如适当的高突变率和充分确立的预后与T细胞浸润水平的关联)也是如此。

[0606] 在一些实施方案中,所述癌症是卵巢癌。在一些实施方案中,所述癌症是三阴性乳腺癌(TNBC)。

[0607] 在一些实施方案中,所述癌症是肺癌。在一些实施方案中,所述癌症是乳腺癌。在一些实施方案中,所述癌症是结直肠癌。在一些实施方案中,所述癌症是胰腺癌。在一些实施方案中,所述癌症是梅克尔细胞癌。在一些实施方案中,所述癌症是转移性皮肤鳞状细胞癌(CSCC)。在一些实施方案中,所述癌症是黑色素瘤。

[0608] 在一些实施方案中,受试者是如下受试者,所述受试者的癌症是检查点阻断(如抗PD1或抗PD-L1疗法)难治的,和或所述受试者在用所述检查点阻断治疗后复发。

[0609] 在一些实施方案中,受试者是从其获得用于产生治疗性细胞组合物的生物样品的同一受试者。在一些这样的实施方案中,所提供的治疗方法是用含有对于受试者是自体的T细胞的治疗性组合物的过继细胞疗法。

[0610] 在一些实施方案中,本文所提供的细胞组合物对于待治疗的受试者是自体的。在这样的实施方案中,直接从如本文所述来自受试者的生物样品分离用于扩增的起始细胞,在一些情形中包括富集对如所述的一种或多种选择标记呈阳性的T细胞,并且在如本文提供的用于扩增的条件下进行培养。在一些方面,来自受试者的生物样品是或包括肿瘤或淋巴结样品,并且如通过切除或活检(例如芯针活检或细针抽吸)获得此种样品肿瘤和一定量的此种组织。在一些实施方案中,在根据所提供的方法在扩增条件下培养之后,配制细胞并且任选地将其冷冻保存以供随后施用于同一受试者用于治疗癌症。

[0611] 在一些实施方案中,本文所提供的细胞组合物对于待治疗的受试者是同种异体的。在一些方面,衍生出或分离出细胞的受试者是健康受试者,或者不知道患有疾病或病症,如癌症。在这样的实施方案中,直接从如本文所述来自这样的受试者的生物样品分离用于扩增的起始细胞,在一些情形中包括富集对如所述的一种或多种选择标记呈阳性的T细胞,并且在如本文所提供的用于扩增的条件下进行培养。在一些方面,来自受试者的生物样品是或包括肿瘤或淋巴结样品,并且如通过切除或活检(例如芯针活检或细针抽吸)获得此种样品肿瘤和一定量的此种组织。在一些实施方案中,在用于扩增的条件下培养后,配制细胞并任选地将其冷冻保存以供随后施用于不同受试者,用于治疗这个不同受试者的癌症。

[0612] 在一些实施方案中,所提供的方法可以与一种或多种其他免疫疗法一起进行。在一些实施方案中,所述免疫疗法是作为免疫检查点抑制剂的免疫调节剂。在一些实施方案中,所述免疫检查点抑制剂特异性结合选自以下的分子:CD25、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、LAG-3、TIM-3、4-1BB、GITR、CD40、CD40L、OX40、OX40L、CXCR2、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、CD28、TIGIT和VISTA。在一些实施方案中,所述免疫检查点抑制剂是抗体或抗原结合片段、小分子或多肽。在一些实施方案中,所述免疫检查点抑制剂选自纳武单抗、帕博利珠单抗、

匹地利珠单抗、MK-3475、BMS-936559、MPDL3280A、伊匹单抗、曲美木单抗、IMP31、BMS-986016、乌瑞鲁单抗、TRX518、达西珠单抗(dacetuzumab)、卢卡木单抗(lucatumumab)、SEQ-CD40、CP-870、CP-893、MED16469、MEDI4736、MOXR0916、AMP-224和MSB001078C,或者是其抗原结合片段。

[0613] 在一些实施方案中,所提供的方法包括如所述的细胞疗法与PD-1或PD-L1抑制剂的组合疗法。PD-1或PD-L1抑制剂可以包括结合抗体、拮抗剂或抑制剂(即,阻断剂)。

[0614] 在一个实施方案中,所述PD-I抑制剂是纳武单抗(可作为OPDIVO从Bristol-Myers Squibb Co.购得)或其生物类似物、抗原结合片段、缀合物或变体。纳武单抗是一种阻断PD-I受体的全人IgG4抗体。在一个实施方案中,所述抗PD-I抗体是免疫球蛋白G4κ抗(人CD274)抗体。纳武单抗被分配化学文摘社(CAS)登记号946414-94-4,并且也称为5C4、BMS-936558、l\tIDX-1106和ONO-4538。纳武单抗的制备和特性描述于美国专利号8,008,449和国际专利公开号WO 2006/121168中。

[0615] 在另一实施方案中,所述PD-1抑制剂包含帕博利珠单抗(可作为KEYTRUDA从Merck&Co.,Inc.(凯尼尔沃思,新泽西州,美国)购得)或其抗原结合片段、缀合物或变体。帕博利珠单抗被分配CAS登记号1374853-91-4,并且也称为兰博利珠单抗、MK-3475和SCH-900475。帕博利珠单抗的特性、用途和制备描述于以下文献中:国际专利公开号WO 2008/156712 A1、美国专利号8,354,509以及美国专利申请公开号US 2010/0266617 A1、US 2013/0108651 A1和US 2013/0109843 A2。

[0616] 在一个实施方案中,所述PD-LI抑制剂是德瓦鲁单抗,也称为MEDI4736(其可从作为AstraZeneca plc.子公司的马里兰州盖瑟斯堡的Medimmune,LLC购得)或其抗原结合片段、缀合物或变体。在一个实施方案中,所述PD-LI抑制剂是美国专利号8,779,108或美国专利申请公开号2013/0034559中披露的抗体。

[0617] 在一个实施方案中,所述PD-LI抑制剂是阿维鲁单抗,也称为MSB0010718C(可从Merck KGaA/EMD Serono购得)或其抗原结合片段、缀合物或变体。阿维鲁单抗的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2014/0341917 A1中。

[0618] 在一个实施方案中,所述PD-LI抑制剂是阿特珠单抗,也称为MPDL3280A或RG7446(可作为TECENTRIQ从作为瑞士巴塞尔的Roche Holding AG子公司的Genentech,Inc.购得)或其抗原结合片段、缀合物或变体。在一个实施方案中,所述PD-LI抑制剂是美国专利号8,217,149中披露的抗体,所述申请的公开内容通过引用明确并入本文。在一个实施方案中,所述PD-LI抑制剂是以下文献中披露的抗体:美国专利申请公开号2010/0203056 A1、2013/0045200 A1、2013/0045201 A1、2013/0045202 A1或2014/0065135 A1。阿特珠单抗的制备和特性描述于美国专利号8,217,149中。

V.试剂盒和制品

[0619] 本文提供制品和试剂盒,其包含所提供的组合物,如含有通过任何所提供的方法产生的T细胞或者含有或富集肿瘤反应性T细胞或对如所述的选择标记(例如CXCL13和/或PD-1/CD39/TIGIT)呈阳性的T细胞的组合物。在一些实施方案中,所述组合物是通过任何所提供的方法产生的。

[0620] 试剂盒可以任选地包括一个或多个组件,如使用说明书、装置和另外的试剂(例如,用于稀释组合物和/或重构冻干的蛋白质的无菌水或盐水溶液)以及用于实践所述方法

的组件(如管、容器和注射器)。在一些实施方案中,试剂盒还可以含有用于样品的收集、样品的制备和处理的试剂,和/或用于对样品中的一种或多种表面标记的量进行定量的试剂(如但不限于检测试剂,如抗体、缓冲液、酶染色底物、色原或其他材料(如载玻片、容器、微量滴定板)),以及任选地用于进行所述方法的说明书。本领域技术人员将认识到可以根据所提供的方法使用的许多其他可能的容器和板以及试剂。

[0621] 在一些实施方案中,试剂盒可以作为制品来提供,所述制品包括用于包装细胞、抗体或试剂或其组合物或者一种或多种其他组分的包装材料。例如,试剂盒可以含有容器、瓶、管、小瓶以及适合于分离或组织试剂盒的组分的任何包装材料。一个或多个容器可以由多种材料(如玻璃或塑料)形成。在一些实施方案中,一个或多个容器容纳包含细胞或抗体或用于在所述方法中使用的其他试剂的组合物。本文的制品或试剂盒可以在单独的容器中或在同一容器中包含细胞、抗体或试剂。

[0622] 在一些实施方案中,容纳组合物的一个或多个容器可以是一次性使用的小瓶或多次使用的小瓶,后者在一些情形中可以允许重复使用组合物。在一些实施方案中,所述制品或试剂盒还可以包含第二容器,所述第二容器包含合适的稀释剂。所述制品或试剂盒还可以包含从商业、治疗和用户角度来看希望的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针、注射筒、治疗剂和/或印有使用说明书的包装插页。

[0623] 在一些实施方案中,所述试剂盒可以任选地包含说明书。说明书通常包括描述细胞组合物、任选地试剂盒中包括的其他组分及其使用方法的明确表达。在一些实施方案中,说明书指示如根据所提供的任何实施方案使用细胞组合物施用于受试者以供治疗疾病或病症的方法。在一些实施方案中,说明书作为标签或包装插页来提供,所述标签或包装插页位于容器上或与容器相关联。在一些实施方案中,说明书可以指示重构和/或使用组合物的指导。

VI.定义

[0624] 除非另外定义,否则本文所用的所有领域术语、符号以及其他技术和科学术语或命名都旨在具有与所要求保护的主题所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。在一些情形中,为了清楚和/或为了便于参考而在本文中定义具有通常理解的含义的术语,并且在本文中包括此类定义不一定应当被解释为表示与本领域通常理解的实质性差异。

[0625] 除非上下文另外明确规定,否则如本文所用,单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“所述(the)”包括复数指代物。例如,“一个/一种(a)”或“一个/一种(an)”意指“至少一个/至少一种”或“一个或多个/一种或多种”。应理解,本文描述的方面和变化包括“由方面和变化组成”和/或“基本上由方面和变化组成”。

[0626] 在整个本公开文本中,所要求保护的主题的各个方面以范围形式呈现。应当理解,以范围形式描述仅仅是为了便捷和简洁,并且不应当被解释为对所要求保护的主题的范围的僵硬限制。因此,应当将范围的描述视为已经明确公开该范围内所有可能的子范围以及单独数值。例如,在提供值的范围的情况下,应理解,在该范围的上限与下限之间的每个中间值以及在所陈述范围内的任何其他所陈述值或中间值都涵盖在所要求保护的主题内。这些较小范围的上限和下限可以独立地被包括在较小范围内,并且也涵盖在所要求保护的主题内,受制于所陈述范围内任何明确排除的限值。在所陈述范围包括一个或两个限值的情

况下，排除那些所包括限值中的任一个或两个的范围也被包括在所要求保护的主题内。无论范围的宽度如何，这都适用。

[0627] 如本文所用的术语“约”是指本技术领域的技术人员容易知晓的对应值的通常误差范围。在本文中提及“约”某值或参数包括(并描述)涉及该值或参数本身的实施方案。例如，提及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0628] 术语“表位”意指源自蛋白质抗原的短肽，其中肽与主要组织相容性复合体(MHC)分子结合，并且在MHC结合的背景下被T细胞识别。表位可以结合MHC I类分子(例如，HLA-A1、HLA-A2或HLA-A3)或MHC II类分子。

[0629] 如本文所用的术语“同种异体的”意指从一种生物体取出并且然后输注或过继转移至相同物种的在遗传上不同的生物体中的细胞或组织。

[0630] 如本文所用的术语“自体的”意指从生物体中取出并且之后输注或过继转移至同一生物体中的细胞或组织。

[0631] 本文的术语“抗体”是以最广义使用，并且包括多克隆和单克隆抗体，包括完整抗体和功能性(抗原结合)抗体片段，包括片段抗原结合(Fab)片段、$F(ab')_2$片段、Fab’片段、Fv片段、重组IgG(rIgG)片段、单链抗体片段(包括单链可变片段(scFv))和单结构域抗体(例如，sdAb、sdFv、纳米抗体)片段。所述术语涵盖免疫球蛋白的基因工程化的和/或以其他方式修饰的形式，如胞内抗体、肽体、嵌合抗体、全人抗体、人源化抗体和异缀合抗体、多特异性(例如，双特异性)抗体、双抗体、三抗体和四抗体、串联二-scFv、串联三-scFv。除非另外说明，否则术语“抗体”应当理解为涵盖其功能性抗体片段。所述术语还涵盖完整或全长抗体，包括任何类别或亚类(包括IgG及其亚类、IgM、IgE、IgA和IgD)的抗体。所提供的抗体包括抗体片段。

[0632] “抗体片段”或“抗原结合片段”是指除了常规或完整抗体以外的分子，其包含常规或完整抗体的一部分，所述部分至少含有结合抗原的可变区。抗体片段的例子包括但不限于Fv、单链Fv(sdFv)、Fab、Fab’、Fab’-SH、$F(ab')_2$；双抗体；线性抗体；仅包含V_H区的单结构域抗体(VHH)。

[0633] 如本文所用，“结合(bind)”、“结合(bound)”或其语法变型是指分子参与和另一种分子的任何有吸引力的相互作用，导致稳定缔合，其中这两种分子彼此非常靠近。结合包括但不限于非共价键、共价键(如可逆和不可逆共价键)，并且包括分子之间的相互作用，所述分子如但不限于蛋白质、核酸、碳水化合物、脂质和小分子，如包括药物在内的化学化合物。

[0634] 术语“生物样品”意指来自活物或曾经的活物的一定量的物质。这样的物质包括但不限于血液(例如，全血)、血浆、血清、尿液、羊水、滑液、内皮细胞、白细胞、单核细胞、其他细胞、器官、组织、骨髓、淋巴结和脾脏。

[0635] 如本文所用，当提及一种或多种特定细胞类型或细胞群时，“富集”是指例如与组合物中的总细胞数或组合物的体积相比或者相对于其他细胞类型，如通过基于群体或细胞表达的标记的阳性选择，或通过基于在待耗尽的细胞群或细胞上不存在的标记的阴性选择来增加细胞类型或群体的数量或百分比。所述术语不需要从组合物完全去除其他细胞、细胞类型或群体，并且不需要如此富集的细胞在富集的组合物中以等于或甚至接近100％存在。

[0636] 术语“同时地”在本文中用于指代涉及两种或更多种药剂的程序，如孵育、选择、富

集或施用，其中在特定程序中用一种药剂的至少一部分在时间上与至少第二药剂重叠。

[0637] 术语“间断地”在本文中用于指代涉及两种或更多种药剂的程序，如孵育、选择、富集或施用，其中涉及每种药剂的特定程序不以规律的间隔进行，或者不是连续的，或者间隔一定时间段反复停止和开始。

[0638] 术语“依序地”在本文中用于指代涉及两种或更多种药剂的程序，如孵育、选择、富集或施用，其中涉及每种药剂的特定程序在时间上不重叠。

[0639] 如本文所用，关于肽、蛋白质或多肽的“分离的”或“纯化的”是指如下分子，所述分子基本上不含所有其他多肽、污染物、起始试剂或其他材料，或者在化学合成时基本上不含化学前体或其他化学品。如果制剂看起来不含如通过本领域技术人员用于评估这种纯度的标准分析方法(如高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)或毛细管电泳(CE))所确定可易于检测的杂质，或者足够纯而使得进一步纯化不会可检测地改变物质的物理和化学特性，则可以确定所述制剂基本上是游离的。

[0640] 如本文所用，术语“重组的”是指已经通过引入外源(如异源)核酸分子而被修饰的细胞、微生物、核酸分子或载体，或者是指已经被改变使得内源核酸分子或基因的表达受到控制、失调或呈组成型的细胞或微生物，其中这样的改变或修饰可以通过遗传工程引入。遗传改变可以包括例如引入编码一种或多种蛋白质或酶的核酸分子(其可以包括表达控制元件，如启动子)的修饰或其他核酸分子添加、缺失、取代或对细胞遗传材料的其他功能性破坏或添加。示例性修饰包括异源或同源多肽的编码区或其功能片段中的相对于参考或亲本分子的修饰。术语“重组的”还可以指代从此种核酸分子或载体或者从这样的细胞或微生物(向其中引入外源核酸或用外源核酸修饰)表达的蛋白质产物。

[0641] 如本文所用，组合物是指两种或更多种产物、物质或化合物(包括细胞)的任何混合物。它可以是溶液、悬浮液、液体、粉末、糊剂、水性的、非水性的或其任何组合。

[0642] 如本文所用，“任选的”或“任选地”意指随后描述的事件或情形发生或不发生，并且所述描述包括所述事件或情形发生的情况和所述事件或情形不发生的情况。例如，任选地取代的基团意指基团未被取代或被取代。

[0643] 术语“药物组合物”是指适合于哺乳动物受试者(通常是人)的医药用途的组合物。药物组合物通常包含有效量的活性剂(例如，如根据所提供的方法扩增的细胞)以及载体、赋形剂或稀释剂。载体、赋形剂或稀释剂通常分别是药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

[0644] “药学上可接受的载体”是指用于与治疗剂一起使用的无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包囊材料、配制助剂或本领域常规的载体，它们共同构成用于施用于受试者的“药物组合物”。药学上可接受的载体在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒，并且与配制品的其他成分相容。药学上可接受的载体适用于所采用的配制品。

[0645] 在本文中提及“细胞群”意在指代共享共同性状的多个细胞。细胞群通常含有多个细胞，如大于为或约100个细胞、为或约1000个细胞，并且通常数量的范围为$1x10^4$至$1x10^{10}$。

[0646] 关于蛋白质的如本文所用的术语“可溶性”意指蛋白质没有结合、固定或附着至颗粒(如细胞)或固体支持物(例如珠)。例如，可溶性蛋白包括如下蛋白质，所述蛋白质没有像跨膜蛋白那样结合至细胞的细胞膜。在一些情形中，蛋白质的溶解性可以通过直接或间接地经由接头与另一种分子(如Fc结构域)连接或附着来改进，这在一些情形中还可以改进蛋

白质的稳定性和/或半衰期。在一些方面，可溶性蛋白是Fc融合蛋白。

[0647] 如本文所用的术语“特异性结合”意指蛋白质在特异性结合条件下与靶蛋白结合，使得其亲和力或亲合力是相同蛋白质与足够统计量的随机肽或多肽集合的平均亲和力或亲合力的至少10倍，但是任选地50、100、250或500倍，或甚至至少1000倍的能力。特异性结合蛋白无需仅与单一靶标分子结合，而是可以与超过一种靶标分子特异性结合。在一些情形中，特异性结合蛋白可以与结构构象与靶蛋白类似的蛋白质(例如，旁系同源物或直系同源物)结合。技术人员将认识到，特异性结合至在不同物种的动物中具有相同功能的分子(即，直系同源物)或与靶分子具有基本上类似的表位的分子(例如，旁系同源物)是可能的，并且不会减弱相对于独特非靶标(例如，随机多肽)的统计学上有效的集合来确定的结合特异性。固相ELISA免疫测定、ForteBio Octet或Biacore测量可以用于确定两种蛋白质之间的特异性结合。通常，两种结合蛋白之间的相互作用的解离常数(Kd)小于约$1x10^{-5}$M，并且通常低至约$1x10^{-12}$M。在本公开文本的某些方面，两种结合蛋白之间的相互作用的解离常数小于约$1x10^{-6}$M、$1x10^{-7}$M、$1x10^{-8}$M、$1x10^{-9}$M、$1x10^{-10}$M或$1x10^{-11}$M或更小。

[0648] 如本文所用，细胞或细胞群对特定标记呈“阳性”的陈述是指，特定标记(通常是表面标记)在细胞上或细胞中的可检测存在。当提及表面标记时，所述术语是指如通过流式细胞术检测到的，表面表达的存在，例如通过用与所述标记特异性结合的抗体进行染色并检测所述抗体，其中所述染色通过流式细胞术以如下水平是可检测的，所述水平基本上高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配对照进行相同程序检测到的染色，和/或所述水平与已知对所述标记呈阳性的细胞的水平基本上相似，和/或所述水平基本上高于已知对所述标记呈阴性的细胞的水平。

[0649] 如本文所用，细胞或细胞群对特定标记呈“阴性”的陈述是指，特定标记(通常是表面标记)在细胞上或细胞中不存在实质上可检测的存在。当提及表面标记时，所述术语是指表面表达的不存在，如通过流式细胞术所检测，例如通过用与所述标记特异性结合的抗体进行染色并检测所述抗体，其中通过流式细胞术检测到的染色水平没有显著高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配的对照进行相同程序检测到的染色，和/或检测到的染色水平显著低于已知对于所述标记呈阳性的细胞的水平，和/或检测到的染色水平与已知对于所述标记呈阴性的细胞的水平相比基本上相似。

[0650] 如本文所用，“受试者”是哺乳动物，如人或其他动物，并且通常是人。受试者可以是雄性或雌性，并且可以是任何合适的年龄，包括婴儿、幼年、青少年、成年和老年受试者。

[0651] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指如含有例如根据所提供的方法扩增的细胞的治疗性组合物在施用于患者时产生病症、障碍或疾病或其他适应证的症状被改善或以其他方式有益地改变的任何方式的量和/或浓度。用于治疗疾病或障碍的有效量可以是减轻、减少或缓解与疾病或障碍相关的至少一种症状或生物反应或效应，阻止疾病或障碍进展，或者改进患者的身体机能的量。在特定方面，存在对疾病进展的统计学上显著的抑制，如例如通过改善或消除疾病的症状和/或病因。在细胞疗法的情形中，有效量是施用于患者的细胞的有效剂量或数量。在一些实施方案中，所述患者是人患者。

[0652] 如本文所用，“疾病”、“障碍”或“病症”是指生物体中源自病因或病症(包括但不限于感染、获得性病症、遗传病症)且特征为可鉴定的症状的病理性状况。特别地，它是需要和/或期望治疗的病症。

[0653] 如本文所用的术语疾病或障碍的“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”或“疗法”意指减慢、停止或逆转疾病或障碍的进展,如通过临床或诊断症状的减少、停止或消除所证实的,通过施用单独的或与如本文所述的另一种化合物组合的本发明的免疫调节蛋白或工程化细胞来实现。“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”或“疗法”还意指急性或慢性疾病或障碍的症状严重程度的降低,或如例如在复发型或缓解型自身免疫性疾病病程的情形中复发率的降低,或在自身免疫性疾病的炎症方面的情形中炎症的减少。如在本发明背景下所用的疾病或障碍的“预防(preventing)”、“预防(prophylaxis)”或“预防(prevention)”是指施用单独的或与另一种化合物组合的本发明的免疫调节蛋白或表达免疫调节蛋白的工程化细胞,以防止疾病或障碍或者疾病或障碍的一些或所有症状出现或发作,或者减小疾病或障碍发作的可能性。例如,在癌症的情况下,术语对癌症的“治疗”或“抑制(inhibit)”、“抑制(inhibiting)”或“抑制(inhibition)”是指以下中的至少一种:肿瘤生长速率的统计学上显著的下降、肿瘤生长的停止、或者肿瘤的大小、质量、代谢活性或体积的降低,如通过标准准则(例如但不限于实体肿瘤的反应评估准则(RECIST))所测量;或者无进展存活(PFS)或总存活(OS)的统计学上显著的增加。

[0654] 术语“抗原”是指可以诱导免疫反应的分子。通常,抗原是能够被免疫分子(如抗体或T细胞受体(如果由主要组织相容性复合体(MHC)分子呈递))上的识别位点结合的分子。抗原可以具有一个或多个表位,其中作为抗原的一部分的每个表位可以被抗体或TCR/MHC复合物的识别位点结合。在一些实施方案中,抗原能够诱导体液免疫反应或细胞免疫反应,导致B淋巴细胞和/或T淋巴细胞的激活。

[0655] 如本文所用,“肿瘤相关抗原”或“肿瘤特有抗原”是指仅在癌细胞上而没有在正常细胞上发现的蛋白质或其他分子。

[0656] 如本文所用,“新生抗原”是指免疫系统先前未曾暴露过的抗原,如通过以病毒感染、致瘤性转化、药物代谢或其他方式改变宿主抗原而产生的抗原。在特定方面,新生抗原是由肿瘤特有突变基因编码的抗原,或者是在肿瘤细胞中发展的新生抗原。

[0657] 术语“体内”是指在哺乳动物受试者体内发生的事件。

[0658] 术语“离体”是指在哺乳动物受试者的组织或细胞之上或之内发生但在哺乳动物受试者体外的事件。通常,所述事件在外部环境中进行。在特定方面,离体程序包括如下任何程序:其中从用于治疗或程序的受试者(通常是活体)获取器官、细胞或组织,然后将其返回所述受试者。

[0659] 术语“体外”是指在测试系统中(如在实验室中)发生的事件。

[0660] 如本文所用,试剂盒是包装的组合,其任选地包括其他元件(如另外的试剂)以及组合或其元件的使用说明书。

[0661] 术语“包装插页”用于指代通常在治疗产品的商业包装中所包括的说明书,所述说明书含有关于使用此类治疗产品的适应证、用法、剂量、施用、组合疗法、禁忌证和/或警告的信息。

[0662] 如本文所用,“制品”是被制造的并且在一些情形中可以销售的产品。在一些实施方案中,所述术语可以指代包装物品中(如容器中)所含的组合物。

[0663] 应理解,本文所述的本发明的方面和实施方案包括“包含方面和实施方案”、“由方面和实施方案组成”和“基本上由方面和实施方案组成”。

VII.示例性实施方案

[0664] 所提供的实施方案包括：

1.一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法，所述方法包括：(a)从来自患有肿瘤的受试者的包含T细胞的输入样品选择分泌趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)的细胞和/或对C-X-C趋化因子受体5型(CXCR5)呈表面阳性的细胞，以获得从所述样品选择的细胞；以及(b)通过将所选择的细胞与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的群体的条件下一起培养来进行扩增。

2.根据实施方案1所述的方法，其中所述方法包括选择分泌CXCL13的细胞。

3.根据实施方案1或2所述的方法，其中所述方法包括选择对CXCR5呈表面阳性的细胞。

4.根据实施方案1-3中任一项所述的方法，其中所述选择还包括选择对选自以下的一种或多种其他标记呈表面阳性的细胞：CD107a、CD39、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD36、CD38、CD30、CD154(CD40L)、CD134(OX40)、CD152(CTLA-4)、CD160、CXCR5(CD195)、CD244、CD258(LIGHT)、CD256(APRIL)、CD272(BTLA-4)、PD-1、TIM-3、LAG-3或TIGIT，其中所述选择分泌CXCL13的细胞和/或对CXCR5呈表面阳性的细胞以及所述选择对所述一种或多种其他标记呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行，以获得所选择的细胞。

5.根据实施方案4所述的方法，其中所述一种或多种其他标记是PD-1、CD39和/或TIGIT。

6.根据实施方案4或5中任一项所述的方法，其中所述一种或多种其他标记是PD-1、CD39和TIGIT。

7.根据实施方案1-6中任一项所述的方法，所述方法还包括选择、任选地通过阳性选择或阴性选择来选择对选自CD3、CD4或CD8的T细胞标记呈表面阳性的T细胞，其中所述选择对所述T细胞标记呈表面阳性的细胞以及所述选择分泌CXCL13的细胞和/或对CXCR5呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行，以获得所选择的细胞。

8.一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法，所述方法包括：(a)从来自患有肿瘤的受试者的包含T细胞的输入样品选择对PD-1、CD39和TIGIT呈表面阳性的细胞，以获得从所述样品选择的细胞；以及(b)通过将所选择的细胞与淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的群体的条件下一起培养来进行扩增。

9.根据实施方案8所述的方法，其中所述选择还包括选择对选自以下的一种或多种其他标记呈表面阳性的细胞：CD107a、CD39、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD36、CD38、CD30、CD154(CD40L)、CD134(OX40)、CD152(CTLA-4)、CD160、CXCR5(CD195)、CD244、CD258(LIGHT)、CD256(APRIL)、CD272(BTLA-4)、PD-1、TIM-3、LAG-3或TIGIT，其中所述选择对PD-1/CD39/TIGIT呈表面阳性的细胞以及所述选择对所述其他标记呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行，以获得所选择的细胞。

10.根据实施方案8或9中任一项所述的方法，其中所述选择还包括选择分泌趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)的细胞，其中所述选择对PD-1/CD39/TIGIT呈表面阳性的细胞以及所述选择分泌CXCL13的细胞是同时或以任何顺序依序进行，以获得所选择的细胞。

11.根据实施方案8-10中任一项所述的方法，所述方法还包括选择、任选地通过阳性选择或阴性选择来选择对选自CD3、CD4或CD8的T细胞标记呈表面阳性的T细胞，其中所述选择对所述T细胞标记呈表面阳性的细胞以及所述选择对PD-1/CD39/TIGIT呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行，以获得所选择的细胞。

12.根据实施方案1-11中任一项所述的方法，其中包含T细胞的所述输入样品来自外周血或来自肿瘤。

13.根据实施方案1-12中任一项所述的方法，其中所述输入样品包含肿瘤浸润淋巴细胞。

14.根据实施方案1-13中任一项所述的方法，其中包含T细胞的所述输入样品源自切除的肿瘤。

15.根据实施方案14中任一项所述的方法，其中包含T细胞的所述输入样品是通过来自所述切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片的匀浆化和/或酶消化处理的单细胞悬浮液。

16.根据实施方案14或15中任一项所述的方法，其中包含T细胞的所述输入样品是通过来自所述切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片的匀浆化和酶消化处理的单细胞悬浮液。

17.根据实施方案15或16中任一项所述的方法，其中所述酶消化是通过与胶原酶、任选地胶原酶IV或胶原酶I/II一起孵育来进行。

18.根据实施方案1-13中任一项所述的方法，其中淋巴细胞的所述一种或多种T细胞刺激剂是抗CD3剂和/或选自IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25和IL-23中的一种或多种的重组细胞因子。

19.根据实施方案1-18中任一项所述的方法，其中所述一种或多种T细胞刺激剂中的至少一种是重组IL-2。

20.根据实施方案1-19中任一项所述的方法，其中与所述一种或多种T细胞刺激剂一起培养还包括细胞凋亡抑制剂。

21.根据实施方案1-20中任一项所述的方法，其中所述一种或多种T细胞刺激剂是一种或多种第一T细胞刺激剂并且所述进行扩增是第一扩增，其中所述方法还包括通过将所述第一扩增的T细胞群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增，其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

22.根据实施方案1-21中任一项所述的方法，其中所述一种或多种T细胞刺激剂是一种或多种第一T细胞刺激剂并且所述进行扩增是第一扩增，其中所述方法还包括：(c)在将一种或多种非天然肽呈递于主要组织相容性复合体(MHC)上的抗原呈递细胞的存在下共培养所述第一扩增的T细胞群体以产生反应性T细胞群体，所述一种或多种非天然肽是与受试者肿瘤中相关的非同义体细胞突变对应的肽，所述反应性T细胞群体含有包含对所述肿瘤的突变编码肽具有反应性的内源T细胞受体的T细胞；以及(d)通过将所述反应性T细胞群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第二群体的条件下一起培养来进行第二扩增，其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

23.根据实施方案1-21所述的方法，其中所述一种或多种T细胞刺激剂是一种或多种第一T细胞刺激剂并且所述进行扩增是第一扩增，其中所述方法还包括：(c)在将一种或多种非天然肽呈递于主要组织相容性复合体(MHC)上的抗原呈递细胞的存在下共培养所述

第一扩增的T细胞群体以产生反应性T细胞群体，所述一种或多种非天然肽是与受试者肿瘤中相关的非同义体细胞突变对应的肽，所述反应性T细胞群体含有包含对所述肿瘤的突变编码肽具有反应性的内源T细胞受体的T细胞；(d)从所述反应性T细胞群体选择对与包含对所述肿瘤的突变编码肽具有反应性的天然T细胞受体的反应性T细胞相关的一种或多种标记呈阳性的细胞，以产生所述反应性T细胞的富集群体；以及(e)通过将所述反应性T细胞的富集群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第二群体的条件下一起培养来进行第二扩增，其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

24.根据实施方案23所述的方法，其中所述一种或多种标记是T细胞耗竭标记的标记。

25.根据实施方案23或24所述的方法，其中所述一种或多种标记是细胞表面CD107a、CD39、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD36、CD38、CD30、CD154(CD40L)、CD134(OX40)、CD152(CTLA-4)、CD160、CXCR5(CD195)、CD244、CD258(LIGHT)、CD256(APRIL)、CD272(BTLA-4)、PD-1、TIM-3、LAG-3或TIGIT。

26.根据实施方案23-25中任一项所述的方法，其中所述一种或多种标记是PD-1、CD39和TIGIT。

27.根据实施方案23所述的方法，其中所述一种或多种标记是分泌的CXCL13。

28.根据实施方案23-27中任一项所述的方法，所述方法还包括选择、任选地通过阳性选择或阴性选择来选择对选自CD3、CD4或CD8的T细胞标记呈表面阳性的T细胞，其中所述选择对所述T细胞标记呈表面阳性的细胞以及所述选择对与反应性T细胞相关的标记呈阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行，以获得所述反应性T细胞的富集群体。

29.一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法，所述方法包括：(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品；(b)通过将包含T细胞的所述输入样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增；(c)从扩增的细胞的所述第一群体选择分泌趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)的细胞和/或对C-X-C趋化因子受体5型(CXCR5)呈表面阳性的细胞，以产生选择的群体；以及(d)通过将所选择的群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增，其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

30.一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法，所述方法包括：(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品；(b)通过将包含T细胞的所述输入样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增；(c)从扩增的细胞的所述第一群体选择分泌趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)的细胞和/或对C-X-C趋化因子受体5型(CXCR5)呈表面阳性的细胞，以产生选择的群体；(d)在将一种或多种非天然肽呈递于主要组织相容性复合体(MHC)上的抗原呈递细胞的存在下共培养所选择的群体以产生反应性T细胞群体，所述一种或多种非天然肽是与受试者肿瘤中相关的非同义体细胞突变对应的肽，所述反应性T细胞群体含有包含对所述肿瘤的突变编码肽具有反应性的内源T细胞受体的T细胞；以及(e)通过将所述反应性T细胞群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增，其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合

物。

31.一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括:(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品;(b)通过将包含T细胞的所述输入样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增;(c)在将一种或多种非天然肽呈递于主要组织相容性复合体(MHC)上的抗原呈递细胞的存在下共培养扩增的细胞的所述第一群体以产生反应性T细胞群体,所述一种或多种非天然肽是与受试者肿瘤中相关的非同义体细胞突变对应的肽,所述反应性T细胞群体含有包含对所述肿瘤的突变编码肽具有反应性的内源T细胞受体的T细胞;(d)从所述反应性T细胞群体选择分泌趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)的细胞和/或对C-X-C趋化因子受体5型(CXCR5)呈表面阳性的细胞,以产生选择的群体;以及(e)通过将所选择的群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增,其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

32.根据实施方案29-31中任一项所述的方法,其中所述方法包括选择分泌CXCL13的细胞。

33.根据实施方案29-32中任一项所述的方法,其中所述方法包括选择对CXCR5呈表面阳性的细胞。

34.根据实施方案29-33中任一项所述的方法,其中所述选择还包括选择对选自以下的一种或多种其他标记呈表面阳性的细胞:CD107a、CD39、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD36、CD38、CD30、CD154(CD40L)、CD134(OX40)、CD152(CTLA-4)、CD160、CXCR5(CD195)、CD244、CD258(LIGHT)、CD256(APRIL)、CD272(BTLA-4)、PD-1、TIM-3、LAG-3或TIGIT,其中所述选择分泌CXCL13的细胞和/或对CXCR5呈表面阳性的细胞以及所述选择对所述一种或多种其他标记呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以产生所选择的群体。

35.根据实施方案34所述的方法,其中所述一种或多种其他标记是PD-1、CD39和/或TIGIT。

36.根据实施方案34或35中任一项所述的方法,其中所述一种或多种其他标记是PD-1、CD39和TIGIT。

37.根据实施方案29-36中任一项所述的方法,所述方法还包括选择、任选地通过阳性选择或阴性选择来选择对选自CD3、CD4或CD8的T细胞标记呈表面阳性的T细胞,其中所述选择对所述T细胞标记呈表面阳性的细胞以及所述选择分泌CXCL13的细胞和/或对CXCR5呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以产生所选择的细胞群体。

38.一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括:(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品;(b)通过将包含T细胞的所述样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增;(c)从扩增的细胞的所述第一群体选择对PD-1、CD39和TIGIT呈表面阳性的细胞,以产生选择的群体;以及(d)通过将所选择的群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增,其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

39.一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括:(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品;(b)通过将包含T细胞的所述样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增;(c)从扩增的细胞的所述第一群体选择对PD-1、CD39和TIGIT呈表面阳性的细胞,以产生选择的细胞群体;(d)在将一种或多种非天然肽呈递于主要组织相容性复合体(MHC)上的抗原呈递细胞的存在下共培养所选择的细胞群体以产生反应性T细胞群体,所述一种或多种非天然肽是与受试者肿瘤中相关的非同义体细胞突变对应的肽,所述反应性T细胞群体含有包含对所述肿瘤的突变编码肽具有反应性的内源T细胞受体的T细胞;以及(e)通过将所述反应性T细胞群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增,其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

40.一种用于制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法包括:(a)处理从患有肿瘤的供体受试者获得的含有T细胞的生物样品以产生包含T细胞的输入样品;(b)通过将包含T细胞的所述样品与淋巴细胞的一种或多种第一T细胞刺激剂在产生扩增的T细胞的第一群体的条件下一起培养来进行第一扩增;(c)在将一种或多种非天然肽呈递于主要组织相容性复合体(MHC)上的抗原呈递细胞的存在下共培养扩增的细胞的所述第一群体以产生反应性T细胞群体,所述一种或多种非天然肽是与受试者肿瘤中相关的非同义体细胞突变对应的肽,所述反应性T细胞群体含有包含对所述肿瘤的突变编码肽具有反应性的内源T细胞受体的T细胞;(d)从所述反应性T细胞群体选择对PD-1、CD39和TIGIT呈表面阳性的细胞,以产生选择的细胞群体;以及(e)通过将所选择的细胞群体与一种或多种第二T细胞刺激剂在产生第二扩增的T细胞群体的条件下一起培养来进行第二扩增,其中扩增的T细胞的所述第二群体用作治疗性细胞组合物。

41.根据实施方案38-40中任一项所述的方法,其中所述选择还包括选择对选自以下的一种或多种其他标记呈表面阳性的细胞:CD107a、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD36、CD38、CD30、CD154(CD40L)、CD134(OX40)、CD152(CTLA-4)、CD160、CXCR5(CD195)、CD244、CD258(LIGHT)、CD256(APRIL)、CD272(BTLA-4)、TIM-3或LAG-3,其中所述选择对PD-1/CD39/TIGIT呈表面阳性的细胞以及所述选择对所述其他标记呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以产生所选择的细胞群体。

42.根据实施方案38-41中任一项所述的方法,其中所述选择还包括选择分泌趋化因子(C-X-C基序)配体13(CXCL13)的细胞,其中所述选择对PD-1/CD39/TIGIT呈表面阳性的细胞以及所述选择对所述其他标记呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以产生所选择的细胞群体。

43.根据实施方案38-42中任一项所述的方法,所述方法还包括选择、任选地通过阳性选择或阴性选择来选择对选自CD3、CD4或CD8的T细胞标记呈表面阳性的T细胞,其中所述选择对所述T细胞标记呈表面阳性的细胞以及所述选择对PD-1/CD39/TIGIT呈表面阳性的细胞是同时或以任何顺序依序进行,以产生所选择的细胞群体。

44.根据实施方案29-43中任一项所述的方法,其中所述生物样品是外周血样品或肿瘤样品。

45.根据实施方案29-44中任一项所述的方法,其中包含T细胞的所述输入样品包

含肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

46.根据实施方案29-45中任一项所述的方法,其中包含T细胞的所述输入样品源自切除的肿瘤。

47.根据实施方案29-46中任一项所述的方法,其中所述生物样品是来自所述受试者的切除的肿瘤,并且包含T细胞的所述输入样品是来自所述切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片。

48.根据实施方案47所述的方法,其中所述一个或多个肿瘤碎片的直径为1-8mm。

49.根据实施方案47或48所述的方法,其中以约1个肿瘤碎片/2cm^2接种所述一个或多个肿瘤碎片用于所述第一扩增。

50.根据实施方案46所述的方法,其中包含T细胞的所述输入样品是通过来自所述切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片的匀浆化和/或酶消化处理的单细胞悬浮液。

51.根据实施方案46或50所述的方法,其中包含T细胞的所述输入样品是通过来自切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片的匀浆化和酶消化处理的单细胞悬浮液。

52.根据实施方案50-51所述的方法,其中所述酶消化是通过与胶原酶、任选地胶原酶IV或胶原酶I/II一起孵育来进行。

53.根据实施方案15-17和50-52中任一项所述的方法,其中以约5x10^5至为或约2x10^6个总细胞/2cm^2接种包含T细胞的所述输入样品用于扩增。

54.根据实施方案21-53中任一项所述的方法,其中淋巴细胞的所述一种或多种第一T细胞刺激剂是抗CD3剂和/或选自IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25和IL-23中的一种或多种的重组细胞因子。

55.根据实施方案21-54中任一项所述的方法,其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂中的至少一种是重组IL-2。

56.根据实施方案21-55中任一项所述的方法,其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂包括抗CD3抗体,任选地OKT3,任选地其中所述抗CD3抗体的浓度是为或约50ng/mL。

57.根据实施方案21-56中任一项所述的方法,其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂还包括细胞凋亡抑制剂。

58.根据实施方案21-57中任一项所述的方法,其中淋巴细胞的所述一种或多种第二T细胞刺激剂是抗CD3剂和/或选自IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-25和IL-23中的一种或多种的重组细胞因子。

59.根据实施方案21-58中任一项所述的方法,其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂中的至少一种是重组IL-2。

60.根据实施方案18、19、54、55、58-59中任一项所述的方法,其中重组IL-2的浓度为100IU/mL至6000IU/mL。

61.根据实施方案18、19、54、55和58-60中任一项所述的方法,其中重组IL-2的浓度为300IU/mL至1000IU/mL,任选地其中重组IL-2的浓度是为或约300IU/mL。

62.根据实施方案21-61中任一项所述的方法,其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂包括抗CD3抗体,任选地OKT3,任选地其中所述抗CD3抗体的浓度是为或约50ng/mL。

63.根据实施方案21-62中任一项所述的方法,其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂还包括细胞凋亡抑制剂。

64.根据实施方案20、57或63中任一项所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂减少由CD95(Fas)诱导的细胞凋亡，任选地其中所述细胞凋亡抑制剂特异性结合CD95(Fas)或CD95配体(Fas配体)。

65.根据实施方案64所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂是抗体或抗原结合片段，任选地其中所述细胞凋亡抑制剂是抗Fas抗体或抗Fas配体抗体。

66.根据实施方案64所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂是融合蛋白，其包含与Fc免疫球蛋白结构域融合的与CD95配体(Fas配体)结合的CD95(Fas)的细胞外结构域或其特异性结合片段，任选地其中所述细胞凋亡抑制剂是APG101或CAN008。

67.根据实施方案20、57或63所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂抑制半胱天冬酶激活或活性，任选地其中所述半胱天冬酶是半胱天冬酶2、半胱天冬酶8、半胱天冬酶9、半胱天冬酶10、半胱天冬酶3、半胱天冬酶6或半胱天冬酶7，任选地其中所述半胱天冬酶是半胱天冬酶3。

68.根据实施方案20、57、63或67中任一项所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂选自NAIP(神经元细胞凋亡抑制蛋白;BIRC1)、cIAP1和cIAP2(细胞凋亡抑制蛋白1和2;分别为BIRC2和BIRC3)、XIAP(X染色体结合IAP;BIRC4)、存活蛋白(BIRC5)、BRUCE(Apollon;BIRC6)、生存蛋白(BIRC7)和Ts-IAP(睾丸特异性IAP;BIRC8)。

69.根据实施方案20、57、63、67和68中任一项所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂是恩利卡生。

70.根据实施方案22-28、30-37和39-69中任一项所述的方法，其中所述抗原呈递细胞是树突细胞、单核巨噬细胞、B淋巴细胞、内皮细胞或胸腺上皮。

71.根据实施方案22-28、30-37和39-70中任一项所述的方法，其中所述抗原呈递细胞是树突细胞。

72.根据实施方案22-28、30-37和39-71中任一项所述的方法，其中所述抗原呈递细胞对于所述受试者是自体的。

73.根据实施方案22-28、30-37和39-72中任一项所述的方法，其中所述一种或多种非天然肽包括单独肽或肽库。

74.根据实施方案22-28、30-37和39-73中任一项所述的方法，其中通过串联编码所述一种或多种非天然肽的体外转录合成的小基因构建体的转染在抗原呈递细胞上加载所述一种或多种非天然肽，其中所转录的小基因构建体生成单独肽。

75.根据实施方案22-28、30-37和39-74中任一项所述的方法，其中通过肽脉冲，任选地通过电穿孔在抗原呈递细胞上加载所述一种或多种非天然肽。

76.根据实施方案75所述的方法，其中所述一种或多种非天然肽的长度为5-30个氨基酸，任选地12-25个氨基酸，任选地为或约25个氨基酸。

77.根据实施方案75或76中任一项所述的方法，其中：

所述一种或多种非天然肽是肽库，并且用于所述肽脉冲的肽库中的肽浓度为在为或约0.001μg/mL与为或约40μg/mL之间、0.01μg/mL与为或约40μg/mL之间、为或约0.1μg/mL与为或约40μg/mL之间、为或约1μg/mL与为或约40μg/mL之间、为或约0.01μg/mL与为或约10μg/mL之间或者为或约1μg/mL与为或约10μg/mL之间;或者

所述一种或多种非天然肽是单独肽，并且用于所述肽脉冲的单独肽的浓度为在为

或约0.00001μg/mL与为或约1μg/mL之间、为或约0.00001μg/mL与为或约0.1μg/mL之间、为或约0.00001μg/mL与为或约0.01μg/mL之间、为或约0.0001μg/mL与为或约1μg/mL之间、为或约0.0001μg/mL与为或约0.1μg/mL之间、为或约0.0001μg/mL与为或约0.1μg/mL之间或者为或约0.0001μg/mL与为或约0.01μg/mL之间。

78.根据实施方案75-77中任一项所述的方法,其中所述一种或多种非天然肽的单独肽的浓度平均地是为或约0.00001μg/mL至为或约0.01μg/mL。

79.根据实施方案75-78中任一项所述的方法,其中所述一种或多种非天然肽的单独肽的浓度平均地是为或约0.0001μg/mL和为或约0.001μg/mL。

80.根据实施方案22-28、30-37和39-79中任一项所述的方法,其中抗原呈递细胞与T细胞的共培养比率为在20:1与1:1之间、在15:1与1:1之间、在10:1与1:1之间、在5:1与1:1之间、在2.5:1与1:1之间、在1:20与1:1之间、在1:15与1:1之间、在1:10与1:1之间、在1:5与1:1之间或者在1:2.5与1:1之间。

81.根据实施方案22-28、30-37和39-80中任一项所述的方法,其中树突细胞与T细胞的共培养比率为在5:1与1:5之间或为在3:1与1:3之间,任选地为或为约1:1。

82.根据实施方案22-28、30-37和39-81中任一项所述的方法,其中抗原呈递细胞与T细胞的共培养比率为或为约1:1。

83.根据实施方案22-28、30-37和39-82中任一项所述的方法,其中所述共培养持续2小时至24小时。

84.根据实施方案22-28、30-37和39-83中任一项所述的方法,其中所述共培养持续为或约6小时。

85.根据实施方案1-84中任一项所述的方法,其中所述选择细胞是使用基于荧光的细胞分选仪来进行。

86.根据实施方案85所述的方法,其中所述基于荧光的细胞分选仪是自动化高通量流式细胞术分选仪,任选地FX500细胞分选仪或Miltenyi Tyto细胞分选仪。

87.根据实施方案85或86所述的方法,其中所述选择是通过所述基于荧光的细胞分选仪运行1次、2次、3次或4次。

88.根据实施方案85-87中任一项所述的方法,其中所述选择是使用基于荧光的一次性流控细胞分选仪以在10,000与100,000个细胞/秒之间的速率来进行。

89.根据实施方案1-20中任一项所述的方法,其中用于扩增的培养持续7至35天。

90.根据实施方案1-20和89中任一项所述的方法,其中用于扩增的培养持续7至21天,任选地7至14天。

91.根据实施方案1-90中任一项所述的方法,其中所述培养是在封闭系统中进行。

92.根据实施方案21-88中任一项所述的方法,其中用于所述第一扩增的培养持续7至21天,任选地7至14天。

93.根据实施方案21-88和92中任一项所述的方法,其中用于所述第一扩增的培养是在封闭系统中使用透气性培养器皿来进行。

94.根据实施方案21-88和92中任一项所述的方法,其中用于所述第一扩增的培养是在封闭系统中使用生物反应器来进行。

95.根据实施方案21-88和92-94中任一项所述的方法,其中用于所述第二扩增的

培养持续7至21天,任选地7至14天。

96.根据实施方案21-88和92-95中任一项所述的方法,其中用于所述第二扩增的培养是在透气性培养器皿中进行。

97.根据实施方案21-88和92-96中任一项所述的方法,其中用于所述第二扩增的培养是使用生物反应器来进行。

98.根据实施方案1-97中任一项所述的方法,其中所述肿瘤是上皮癌的肿瘤。

99.根据实施方案1-98中任一项所述的方法,其中所述肿瘤是以下的肿瘤:黑色素瘤、肺鳞癌、肺腺癌、膀胱癌、肺小细胞癌、食道癌、结直肠癌(CRC)、宫颈癌、头颈癌、胃癌或子宫癌。

100.根据实施方案1-99中任一项所述的方法,其中所述肿瘤是黑色素瘤。

101.根据实施方案1-99中任一项所述的方法,其中所述肿瘤是结直肠癌(CRC)。

102.根据实施方案1-98中任一项所述的方法,其中所述肿瘤是以下的肿瘤:非小细胞肺癌(NSCLC)、CRC、卵巢癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆管细胞癌、子宫内膜癌,任选地其中所述乳腺癌是HR+/Her2-乳腺癌、三阴性乳腺癌(TNBC)或HER2+乳腺癌。

103.根据实施方案1-102中任一项所述的方法,所述方法还包括收获通过所述方法产生的细胞以用于配制为治疗性组合物。

104.根据实施方案103所述的方法,所述方法包括用冷冻保护剂配制所收获的细胞。

105.一种组合物,其包含通过根据实施方案1-104中任一项所述的方法产生的肿瘤反应性T细胞。

106.根据实施方案105所述的组合物,其中所述组合物包含冷冻保护剂。

VIII.实施例

[0665] 以下实施例仅出于说明性目的而被包括,并且不意图限制本发明的范围。

实施例1对获得肿瘤来源的T细胞的群体的肿瘤处理方法的评估

[0666] 如下文所述处理来自患有结直肠癌(CRC)或黑色素瘤的患者的肿瘤,并分析所得浸润T细胞群体的细胞计数活力。

A.结直肠癌

[0667] 肿瘤来源于患有CRC的患者的原发性肿瘤,并且在HypoThermosol中在4℃下运输过夜。将肿瘤处理为碎片或单细胞悬浮液(SCS)培养物。

[0668] 对于碎片培养物,将肿瘤切碎成直径为1-8mm的碎片,并且将每个1-8mm的碎片置于在含有5%人血清的Roswell Park Memorial Institute(RPMI)或无血清OpTmizer培养基(ThermoFisher)的存在下的培养器皿(透气性24孔培养板或常规6孔板)的孔中。培养基补充有300或6000IU/mL的重组IL-2,并且还含有10μg/ml的庆大霉素、根据制造商的建议在2%与5%之间的免疫细胞血清替代物(ICSR,ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)。维持并目视监测碎片培养物,直至在培养的大约第5天与第11天之间进行细胞计数。

[0669] 对于SCS培养物,也将肿瘤切碎成直径为1-8mm的碎片。然后在存在或不存在1mg/ml或5mg/ml的消化肿瘤的酶的情况下,使用Miltenyi GentleMACS在封闭系统中将碎片匀浆化,所述酶是根据制造商的建议使用的来自Miltenyi人用肿瘤解离试剂盒(货号130-

095-929)的酶混合剂、胶原酶I/II共混物(Nordmark,胶原酶NB 4G证明等级,货号:S1746503)或胶原酶IV(Worthington Biomedical,货号:LS004130)。将指定用于通过匀浆化和酶消化获得的SCS的碎片与酶混合剂或胶原酶一起孵育总计60分钟。在产生SCS后,立即在NC-200自动化细胞计数器(ChemoMetec)上进行细胞计数和活力评估。

[0670] 如图3A中所示,使用或不使用酶消化的SCS培养物产生的总活细胞(TVC)多于在从CRC肿瘤碎片培养后获得的。图3B中描绘,在从碎片生成的培养物中或在酶的存在下通过匀浆化生成的SCS中,活细胞的百分比是相似的。

B.黑色素瘤

[0671] 肿瘤来源于患有黑色素瘤的患者的原发性肿瘤,并且在HypoThermosol中在4℃下运输过夜。以与上文所述类似地培养细胞。

[0672] 简而言之,对于碎片培养物,将肿瘤切碎成直径为1-8mm的碎片,并且将每个1-8mm的碎片在含有5%人血清的RPMI或无血清OpTmizer培养基的存在下在透气性24孔培养板或常规6孔板的孔中培养,所述培养基补充有浓度为300IU/ml或6000IU/ml的重组IL-2。培养基还含有10μg/ml庆大霉素,以及终浓度为2.0mM的谷氨酰胺的L-丙氨酰-L-谷氨酰胺二肽形式(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)。维持并目视监测碎片培养直至在培养的第5天与第9天之间进行细胞计数。

[0673] 为了生成SCS培养物,在存在或不存在酶的情况下使用Miltenyi GentleMACS将肿瘤碎片匀浆化,所述酶包括浓度为1mg/mL或5mg/mL的胶原酶IV或者浓度为1mg/mL或5mg/mL的胶原酶I/II共混物(Nordmark,胶原酶NB 4G证明等级,货号:S1746503)。如上,在产生SCS后立即使用NC-200自动化细胞计数器(Chemometec)进行细胞计数和活力评估。

[0674] 图4A描绘了与通过匀浆化和用酶解离生成的SCS相比,由黑色素瘤肿瘤碎片生成的培养物产生的总活细胞更多。如图4B所示,无论酶促匀浆化如何,碎片培养物的活细胞百分比也高于来自SCS培养物的细胞。

实施例2对肿瘤来源的细胞的T细胞扩增动力学的评估

[0675] 如实施例1中所述处理肿瘤以生成直径为1-8mm的碎片或SCS培养物,然后将其在扩增存在于肿瘤内的T细胞群的条件下孵育。如下所述,在重组IL-2的存在下,在各种测试条件下使培养物生长以评估细胞扩增。所测试的条件包括培养板的类型、培养基和IL-2的浓度对细胞扩增的影响。

A.培养条件

[0676] 通过来自患有CRC或黑色素瘤的供体患者的原发性肿瘤的匀浆化和酶消化获得单细胞悬浮液(SCS)。如实施例1中所述,将细胞在常规6孔板或透气性24孔培养板中培养。在可能的情况下,启动来自每名供体的多种条件并平均化(误差棒表示±标准差)。对于6孔板,将细胞以250,000与1,000,000个细胞/mL之间接种,并且对于透气性24孔板,将细胞以5,000与750,000个细胞/mL之间接种。在两种情形中,将细胞接种于含有5%人血清的RPMI或无血清OpTmizer培养基中,所述培养基含有以300IU/mL或6000IU/mL的IL-2浓度补充的重组IL-2。培养基还含有10μg/ml庆大霉素,以及终浓度为2.0mM的谷氨酰胺的L-丙氨酰-L-谷氨酰胺二肽形式(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)。将细胞孵育长达31天,通常14至21天,其中在培养第5天开始,每隔一天更换50%的细胞培养基。

[0677] 对于从肿瘤碎片扩增,将如实施例1中所述从患有CRC或黑色素瘤的供体患者的原

发性肿瘤获得的单独的1-8mm的肿瘤碎片置于透气性24孔培养板或6孔板的孔中，并且在含有5％人血清的RPMI或无血清OpTmizer培养基中进行培养，所述培养基含有以300IU/mL或6000IU/mL的浓度补充的重组IL-2。培养基还含有10μg/ml庆大霉素，以及终浓度为2.0mM的谷氨酰胺的L-丙氨酰-L-谷氨酰胺二肽形式(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)。将细胞孵育长达31天，如通常14至21天，其中在培养第5天开始，每隔一天更换50％的细胞培养基。

[0678] 对于所有条件，大约每隔一天使用NC-200自动化细胞计数器(Chemometec)进行细胞计数，并且收集样品用于荧光激活细胞分选(FACS)。在扩增期(例如第14天-第31天)完成后，将细胞在PBS中洗涤，然后在冷冻保护剂的存在下冷冻保存。冷冻保存是使用CoolCell装置(Corning)或VIA Freeze(GE Healthcare)来进行。

B.结果

1.生长曲线

[0679] 在不同培养器皿中扩增培养后，从来自CRC供体患者的肿瘤碎片获得的SCS的扩增的生长曲线显示于图5A和图5B中。所示的结果来自用300IU/mL或6000IU/mL两种浓度的重组IL-2在任一培养基类型中进行孵育的培养物，但是基于起始细胞的来源而分开。如所示，可以在这些条件下扩增来自CRC供体的肿瘤的SCS的肿瘤来源的细胞。在一些供体中，在直接从CRC肿瘤获得的细胞的此初始扩增期中观察到大于2倍甚至高达10倍或更大的扩增。

[0680] 评估与来自CRC肿瘤活检产物的肿瘤碎片相比从SCS实现的扩增。如图5C和图5D中所示，可以在这些条件下扩增来自CRC肿瘤的细胞，不论是作为碎片还是作为SCS来提取和培养。然而，通常，在作为SCS提取的CRC培养物中实现更大的扩增，如通过与培养经由碎片提取的细胞相比更高的总细胞数(图5C)和扩增倍数(图5D)所证实的。

[0681] 在不同培养器皿中扩增培养后，来自不同黑色素瘤供体的作为提取的肿瘤碎片或作为来自肿瘤碎片的SCS培养的细胞的扩增的生长曲线显示于图6A和图6B中。所示的结果来自用300IU/mL或6000IU/mL两种浓度的重组IL-2在任一培养基类型中进行孵育的培养物，但是基于起始细胞的来源而分开。如所示，在任一培养器皿中在作为肿瘤碎片提取的黑色素瘤培养物中观察到显著扩增，而对于作为SCS培养的黑色素瘤细胞观察到较少的扩增。

[0682] 与先前的观察结果一致，无论肿瘤类型如何，来自某些供体的肿瘤细胞都不适合扩增。这表明供体之间的扩增潜力有固有变异性，此外同一供体肿瘤的肿瘤碎片之间有固有变异性。在培养期间汇集来自供体患者的肿瘤碎片的更大规模的方法有望通过组合来自同一供体肿瘤的肿瘤碎片来减轻肿瘤内变异性。

2.按细胞培养基进行的生长评估

[0683] 在扩增14天与21天之间之后，比较如上所述在含有5％人血清的RPMI培养基或血清替代物配制品(OpTmizer培养基)中生成的扩增的培养物。所示结果来自与300IU/mL或6000IU/mL两种浓度的重组IL-2在任一类型的培养器皿中一起孵育的培养物，但是基于培养基的类型而分开。CRC肿瘤的结果来自从肿瘤碎片获得的SCS的培养物(图7A和图7B)，而黑色素瘤肿瘤的结果来自肿瘤碎片的培养物(图8A和图8B)。

[0684] 对于两个肿瘤类型，通过在5％人血清或血清替代物培养基中培养两个肿瘤类型，都观察到总细胞数量(图7A和图8A)和扩增倍数(图7B和图8B)的增加。在所测试的样品中，存在使用OpTmizer培养基改进扩增的趋势，如通过在初始扩增期结束时更高的总细胞数量所证实(图7A和图8A)。

3.IL-2浓度

[0685] 比较在来自不同肿瘤类型的扩增期间不同IL-2浓度的影响。将培养物如上所述在含有5％人血清的RPMI培养基或血清替代物配制品(OpTmizer培养基)中在300IU/mL或6000IU/mL重组IL-2中扩增14天与31天之间，如14天与21天之间。所示结果来自在任一培养基类型的存在下在任一类型的培养器皿中孵育的培养物，但是基于IL-2浓度而分开。CRC肿瘤的结果来自从肿瘤碎片获得的SCS的培养物(图9A和图9B)，而黑色素瘤肿瘤的结果来自肿瘤碎片的培养物(图10A和图10B)。

[0686] 对于两个肿瘤类型，结果显示在高或低浓度的IL-2中生长的细胞的类似的扩增，如通过类似的扩增后总细胞数量(图9A和图10A)以及扩增倍数(图9B和图10B)所证实。这些数据支持以下观察结果：约300IU/mL的IL-2剂量支持扩增，并且对于CRC或黑色素瘤培养物，高剂量的IL-2(如6000IU/mL)并非细胞扩增必需的。

[0687] 综上所述，结果显示，尽管扩增可能具有供体依赖性且另外具有肿瘤样品依赖性，但在多个供体中，CRC肿瘤浸润T细胞成功地从SCS培养物生长，并且黑色素瘤浸润T细胞成功地从碎片培养物生长。类似地观察到，对于黑色素瘤源和CRC源两种T细胞培养物，在与较低剂量相比时，添加高浓度的IL-2没有导致明显不同的扩增反应。

实施例3对肿瘤来源的细胞的扩增的抗CD3刺激的评估

[0688] 在存在或不存在50ng/mL OKT3(一种人抗CD3单克隆抗体)的情况下培养如实施例1和2中所述从黑色素瘤肿瘤碎片处理的细胞。在常规6孔板或透气性培养板中用RPMI或OpTmizer培养基将细胞培养进行14天与31天之间，如14天与21天之间。培养物还补充有300或6000IU/mL的重组IL-2、10μg/mL的庆大霉素以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)。如先前所述，在培养第5天开始，每隔一天更换约50％的细胞培养基。然后使用NC-200自动化细胞计数器(Chemometec)计数细胞。

[0689] 所示的结果来自用300IU/mL或6000IU/mL两种浓度的重组IL-2、不同培养基在任一类型的培养器皿中进行孵育的培养物，但是基于抗CD3刺激的存在或不存在而分开。在存在或不存在抗CD3刺激的两种情况下测试来自供体6的细胞，并且在所有条件下展示出2-4倍扩增，其中在不存在抗CD3刺激的情况下(-OKT3)孵育的补充有300IU/mL IL-2的OpTmizer培养基中观察到13倍扩增。图11A-图11B中所示的结果证实，经由OKT3进行的CD3刺激支持T细胞扩增，但是没有明显影响总细胞数量(图11A)或扩增倍数(图11B)。这些数据与如下发现一致，抗CD3刺激(例如经由OKT3抗体)可能并非是扩增来自肿瘤培养物的细胞所必需的。

实施例4对刺激后CD4+和CD8+激活标记的评估

[0690] 将来自三名健康供体的T细胞解冻，在补充有300IU/mL重组IL-2的OpTmizer培养基中静置过夜，然后使用50ng/mL OKT3(一种人抗CD3单克隆抗体)激活。在3-48小时的时间过程中使用流式细胞术测量在CD4+和CD8+细胞群上激活的特异性标记。具体而言，评估以下标记：CD38和CD39(图12A和图13A)、CD134和CD137(图12B和图13B)以及CD69和CD90(图12C和图13C)。

[0691] $CD8_+$细胞表面上的激活标记的表达结果示于图12A-图12C中，其展示了与在不存在OKT3的情况下的培养相比，在用OKT3进行的CD3刺激后48小时内CD8+T细胞上的标记的上

调动力学。在一些情形中，可以在刺激之前第0天见到所述标记的某一基础水平。如图所示，在此时间过程期间，所有评估的标记都以一定程度上调，且在此研究期间，对于标记CD38(图12A)、CD134(图12B)和CD69(图12C)上调的细胞百分比最高。

[0692] CD4+细胞表面上的激活标记的表达结果示于图13A-图13C中，其展示了与在不存在OKT3的情况下的培养相比，在用OKT3进行的CD3刺激后前48小时内CD4+T细胞上的标记的上调动力学。如图所示，在此时间过程期间，所有评估的标记都以一定程度上调，且在此研究期间，对于标记CD38(图13A)、CD137(图13B)和CD69(图13C)上调的细胞百分比最高。

[0693] 综上所述，这些数据支持，上文标记的表达可以用作上调标记以选择已经被激活的T细胞，包括在预期会刺激经由TCR-CD3复合物的信号传导的激活条件下，如在与呈递新生抗原肽的抗原呈递细胞共培养后将发生的。

实施例5供体细胞表型和细胞活力的确定

[0694] T细胞来源于患有黑色素瘤或CRC的患者的原发性肿瘤，如实施例1中所述。如实施例1中所述，将来自肿瘤的细胞提取为肿瘤碎片或提取为SCS，然后通过流式细胞术评估T细胞表型。

[0695] 对于肿瘤碎片，将每个1-8mm的碎片置于培养器皿(透气性24孔培养板或常规6孔板)的孔中，并且在含有5％人血清的RPMI或无血清OpTmizer培养基(ThermoFisher)的存在下孵育5天与11天之间。培养基补充有300IU/mL或6000IU/mL重组IL-2，并且还含有10μg/ml庆大霉素以及终浓度2.0mM的谷氨酰胺的L-丙氨酰-L-谷氨酰胺二肽形式(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)。所述孵育也在使用或不使用50ng/mL抗CD3抗体OKT3的情况下进行。目视监测碎片培养直至确定可以进行细胞计数(通常在培养的第5天与第9天之间)，然后维持细胞并通过流式细胞术分析T细胞标记。

[0696] 可替代地，对于SCS培养物，将肿瘤切碎成直径为1-8mm的碎片，然后在存在或不存在1mg/ml或5mg/ml的胶原酶IV(Worthington Biomedical，货号:LS004130)或1mg/mL的胶原酶NB4G证明等级(Nordmark Biomedicals;目录号S1746503)的情况下匀浆化。在与酶一起孵育约90分钟后，立即将细胞染色并通过流式细胞术分析T细胞标记。

[0697] 用于流式细胞术分析的门控层次结构设计如下:首先，记录来自总细胞事件的亲本群体的CD3+细胞的百分比，之后记录来自CD3+亲本群体的活CD4+细胞的百分比，接下来记录来自同一亲本CD3+群体的活CD8+细胞的百分比。然后基于相应CD4+和CD8+亲本群体来计算记忆T细胞群体(Tem)。因此，从活CD4+细胞的亲本群体确定CD4/Tem，同时从活CD8+细胞的亲本群体确定CD8/Tem。因此，如图12所描绘的结果是所记录的来自总细胞事件的亲本群体的CD3+细胞的百分比，其在层次结构中按照占层次结构中相应亲本群体的百分比被分选为子群体。图14描绘了紧接在通过匀浆化和酶消化从示例性CRC供体(供体1)提取肿瘤碎片之后，单细胞悬浮液中对选择T细胞标记呈阳性的活细胞的百分比。

[0698] 比较SCS样品中的CD3+细胞的百分比，所述SCS样品已经仅通过匀浆化来提取(无胶原酶)，或者通过在用低浓度胶原酶(1mg/mL)或高浓度胶原酶(5mg/mL)消化后匀浆化来提取。来自第二名CRC和黑色素瘤患者的结果分别示于图15A和图15B中。如图15A中所示，结果显示在匀浆化和用低浓度胶原酶消化后，来自CRC供体的SCS中CD3+T细胞的增加的回收。尽管来自黑色素瘤供体的SCS中CD3+细胞的百分比较低，但结果也证明，匀浆化和用低浓度胶原酶消化产生最高的CD3+T细胞百分比(图15B)。综上所述，这些观察结果证明，可以获得

相对较高纯度的来自黑色素瘤肿瘤的SCS的细胞，并且可以支持SCS是黑色素瘤源CD3+细胞的可行来源。

[0699] 还评估从另外的示例性CRC供体的肿瘤提取的SCS中CD3+细胞的百分比。另外，在此同一供体中，将紧接在匀浆化和消化后的SCS中CD3+T细胞的百分比与以下进行比较：(1)在将SCS用300IU/mL IL-2(低)或6000IU/mL IL-2(高)培养6天后CD3+细胞的百分比，或者(2)在存在或不存在CD3刺激(OKT3抗体)的情况下将单独肿瘤碎片用300IU/mL IL-2(低)或6000IU/mL IL-2(高)培养长达6天后CD3+细胞的百分比。如图15C所示，基线(第0天)SCS中CD3细胞的百分比显著高于在将肿瘤碎片用IL-2或OKT3培养6天后获得的培养物中CD3+细胞的百分比。观察到来自两名另外的供体的肿瘤碎片的培养物的类似结果，其中当在各种评估条件下从CRC肿瘤碎片提取肿瘤细胞时，在将CRC源肿瘤碎片用IL-2和/或OKT3培养11天(图15D)或9天(图15E)后获得的培养物中CD3+细胞的百分比也大体上显示出低产量。这些结果与如下发现一致，来自CRC患者的肿瘤活检的SCS可以比从肿瘤碎片的培养物获得的细胞更能够提供增加数量的T细胞用于扩增。

[0700] 与来自CRC患者的肿瘤碎片的培养物的结果相比，图16表明，可以在各种条件下从黑色素瘤肿瘤碎片的培养物获得高百分比的CD3+T细胞，所述条件如低(300IU/mL)或高(6000IU/mL)浓度IL-2的存在、CD3刺激(OKT3)的存在或不存在或者不同培养基。图16所描绘的结果来自第0天培养物。这些结果与如下发现一致，来自黑色素瘤患者的肿瘤碎片的培养物可以比从肿瘤活检的SCS获得的细胞更能够提供增加数量的T细胞用于扩增。

实施例6对与抗原呈递细胞共培养后肿瘤来源的T细胞的激活的定量

[0701] T细胞作为肿瘤碎片来源自患有黑色素瘤或CRC的患者的原发性肿瘤，如实施例1中所述。在补充有300IU/mL的重组IL-2、10μg/ml的庆大霉素、根据制造商的建议在2％与5％之间的免疫细胞血清替代物(ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)的无血清OpTmizer培养基(ThermoFisher)中培养5天后，用OpTmizer培养基洗涤肿瘤源细胞，之后以300xg离心5分钟并以$2x10^6$个细胞/mL悬浮。然后将细胞以10,000,000个细胞/孔接种至常规6孔培养板中。

[0702] 在平行培养中，从作为来源T细胞的获自同一患者的PBMC(自体的)分化出抗原呈递树突细胞(DC)。从十倍体积的1X DPBS(Gibco)中的液氮储存物解冻从接受单采术的患者分离的冷冻PBMC的冷冻小瓶，并且进行计数(NucleoCounter NC200)。在洗涤后，立即将细胞根据制造商试剂盒说明书用于CD14微珠阳性选择(MACS Miltenyi)。对经纯化的CD14(单核细胞)细胞进行计数，使细胞重悬于DendriMACs(MACS Miltenyi)中并以$0.5-2x10^6$个细胞/mL的密度接种于适当培养烧瓶中。将GM-CSF(100ng/mL)和IL-4(20ng/mL)添加至培养物，以促进分化为不成熟树突细胞。将单核细胞培养和分化总计5天，且在第2天添加等于培养基起始量的50％的50％培养基。

[0703] 根据全外显子组测序和RNA测序针对每名患者自体地鉴定肿瘤特有肽的编码转录物，如以下文献中所述：Parkhurst,Maria R.,等人"Unique neoantigens arise from somatic mutations in patients with gastrointestinal cancers."Cancer discovery 9.8(2019):1022-1035。对速冻的、未固定的肿瘤组织和正常外周血细胞(正常来源)进行患者样品的全外显子组测序(WES)。使用来自novocraft(http://www.novocraft.com/)的novoalign MPI针对人基因组构建物(build)hg19进行来自肿瘤与正常样品的序列的比对。

使用Picard的MarkDuplicates工具标记重复。根据GATK最佳实践工作流程(https://www.broadinstitute.org/gatk/)进行插入缺失重比对和碱基重校准。在数据清理后,使用samtools mpileup(http://samtools.sourceforge.net)和Varscan2(http://varscan.sourceforge.net)、SomaticSniper(http://gmt.genome.wustl.edu/packages/somatic-sniper/)、Strelka(https://sites.google.com/site/strelkasomaticvariantcaller/)以及Mutect(https://www.broadinstitute.org/gatk/)创建pileup文件。使用GATK CombineVariants工具合并VCF文件,并且使用Annovar(http://annovar.openbioinformatics.org)进行注释。然后使用Annovar(http://annovar.openbioinformatics.org)注释存在于患者肿瘤中的变体(突变)。

[0704] 使用以下过滤器来产生推定突变的初始列表以供评价:(1)肿瘤和正常覆盖度大于10,(2)变体等位基因频率(VAF)为7%或以上,(3)变体读段计数为4或以上,以及(4)四个调用程序中的两个鉴定到突变。对于插入和缺失,使用相同截止值,但是需要仅单一调用者鉴定突变以通过过滤器,因为这些仅由varscan和strelka调用。针对通过四个过滤器的那些变体产生与连接至由单核苷酸变体(SNV)(N聚体)上游和下游区域编码的12个氨基酸的突变残基对应的氨基酸序列的表格。对于移码转录物,翻译序列直至在正常编码区中或在3'非翻译区中产生终止密码子。然后使用允许将映射比对可视化的综合基因组学查看器(IGV,Broad Institute)来进行变体调用的人工策展。在人工策展揭示得自在编码N聚体的转录物内存在的另外的体细胞变体或种系变体的非同义变化时,对N聚体的序列进行改变。标记从含有映射至不同读段中的不同位置的多个错配核苷酸、插入/缺失的读段推断的变体以及对应于频繁SNP的变体以供去除。

[0705] 标记在超过一名患者的肿瘤中但在少于2.5%的总肿瘤中检测到的变体,但是其被包括在通过的变体列表中。仅在ENSEMBL数据库中注释的变体转录物通常代表未经证实的编码区并且也被去除。标记为已知单核苷酸多态性或者存在于多个肿瘤中的变体不会被自动去除,但是使用IGV进一步评价,因为去除潜在假阳性(其不可能编码由T细胞识别的产物)不如去除可能代表假阴性的候选物重要。

[0706] 然后使用这些测序数据来产生肽库,其代表与肿瘤相关的突变的肽和与未患病外周血细胞相关的野生型肽。

[0707] 合成肽是经由Fmoc化学来合成的。对于插入缺失,基于移码序列的翻译合成重叠10个氨基酸的25个氨基酸的肽,直至下一终止密码子。在一些情形中,合成最小表位的肽。将肽溶解于DMSO中并以等体积混合。

[0708] 向分化的DC加载变化数量和浓度的如上所述鉴定的来自肽库的肽,之后将其以肿瘤细胞:DC的几种比率添加至肿瘤来源的培养物。然后将DC和肿瘤来源的细胞在37℃下在5% CO_2下共培养6小时,之后温和地搅动培养物并回收悬浮液中的细胞。然后经由流式细胞术针对激活的T细胞使用T细胞激活标记4-1BB和OX40来分选回收的细胞。

[0709] 图17A和图17B显示在20至0.1ng/mL的肽范围中的肿瘤来源的T细胞激活。如图17A中所示,T细胞与加载有所测试三种肽浓度中的每一种的DC的共培养导致易检测水平的4-1BB/OX40+T细胞,包括在1ng/mL肽下高至大约80%。如相比于与未加载的DC一起培养的细胞,T细胞激活标记表达的增加显示于图17B中,其中0.1ng/mL肽导致最大Δ,但是所有三种肽浓度都导致正倍数变化。这些数据证明,低于20ng/mL的较低肽浓度可以导致共培养后T

细胞激活标记(上调标记)的上调增加。

[0710] 图18类似地描绘研究中随着41BB/OX40表达而变化的肿瘤来源的T细胞激活,在所述研究中在共培养期间用一种或两种肽对DC进行脉冲处理以供表面呈递。如图18A所示以及图18B作为倍数变化所示,加载有仅一种肽的DC在激活共培养物中的T细胞方面更显著地更有效。

[0711] 如图19中所示,在将肿瘤来源的T细胞与DC以1:2的比率(T细胞:DC)共培养时,如与1:1相比,T细胞激活的标记41BB和OX40显著上调。

实施例7经由细胞分选对激活的T细胞的富集和回收

[0712] 通过基于免疫亲和力的选择来分离来自健康供体的T细胞,然后将其冷冻保存。将T细胞解冻并静置过夜,然后用50ng/mL OKT3激活24-48小时,之后用抗CD4 FITC(BD)、抗CD8 PerCPCy.5.5(BD)、抗CD134(Beckman Couleter)和抗CD137(MACs Miltenyi)进行染色。使细胞达到大约$20x10^6$个细胞/mL的浓度,并使用BD FACSAriaII以大约15,000个事件/秒的分选速率进行分选。在表达CD134、CD137或CD134和CD137两者的细胞周围绘制门,并且将其分选为单个群体。这是阳性分选的群体。将缺少CD134和CD137两者表达的细胞分选为单独群体。这是阴性分选的群体。在分选后,在替代流式细胞仪上分析来自阳性和阴性分选群体以及未分选的群体的细胞,以验证纯度并评估回收率。

[0713] 如图20中所示,将未分选的肿瘤来源的T细胞群体(分选前)与阳性分选群体进行比较,所述阳性分选群体是如先前在实施例6中所述在与加载突变体肽的自体树突细胞共培养后收集并分选为41BB/OX40阳性群体。观察到,此门控策略导致三名供体的针对反应性TCR百分比的增加的富集(图20A)和增加的平均I类反应性(图20B)。

[0714] 来自细胞分选的总细胞回收相对于总细胞输入示于图21A中。在图21B中类似地见到,来自两次独立运行的回收率百分比为大约80%。结果证实,在选择和分选对上调标记呈阳性的细胞后,可以获得高细胞回收。

[0715] 图22描绘了经由用OKT3激活并如上所述染色的健康供体T细胞的流式细胞术得出的CD4+群体纯度。首先基于CD4+对细胞进行门控,然后接下来对表达最高强度的CD134+的群体进行门控,并且所展示的输出显示CD4+相比于CD8+以及CD137+相比于CD134+。这些数据支持使用这些标记对肿瘤浸润T细胞的高纯度群体进行门控。

实施例8激活的肿瘤来源的T细胞的分选后扩增

[0716] 如实施例1中所述处理来源于原发性CRC肿瘤的T细胞,然后使用如实施例6中所述的方法与呈递肽的树突细胞共培养。简单来说,将分离的肿瘤浸润淋巴细胞与自体DC一起培养,所述自体DC被加载以表达与健康组织相关的肽(野生型,WT)、与肿瘤组织相关的肽(突变体),或者完全没有加载肽(无肽)。将T细胞的对照子群体在没有DC的情况下培养(未激活的)。在共培养后,通过荧光激活的Sony FX500基于激活标记4-1BB和OX40的表面表达分选所述细胞。

[0717] 然后将细胞以250,000-1,000,000个细胞/cm2接种至透气性24孔培养板中的补充有浓度为300IU/mL的重组IL-2、10μg/mL的庆大霉素和2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)的无血清OpTmizer培养基中。将细胞孵育总计7天,其中在培养第5天开始,每隔一天更换50%培养基。在培养中的每一天,使用NC-200自动化细胞计数器(Chemometec)进行细胞计数。

[0718] 如图23A所示以及图23B作为扩增倍数所示，所测试的每个肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)T细胞群在培养第3天与第5天之间经历可测量的扩增，并且在7天培养期结束时走向继续向上。与加载有突变体肿瘤相关肽的DC一起培养的肿瘤浸润T细胞在实验过程中达到最高总细胞数量。

[0719] 使用上文数据，创建图23C中所示的理论数学模型以预测在分选后回收的细胞数量与在扩增期之后培养物中存在的预期细胞数量之间的关系。

实施例9对肿瘤来源的T细胞的离体扩增进行蒙特卡罗(Monte Carlo)建模

[0720] 作为对实施例8中确定性点分析的补充，设计第一次概率性蒙特卡罗模拟来预测由如实施例2中所述的第一次扩增产生的肿瘤浸润淋巴细胞的数量。通过代入固有不确定性、回收效率和倍数扩增能力中的两种因素的概率分布来运行在提取和第一扩增后可能的总存活和总反应性T细胞数量的蒙特卡罗模拟。将结果作为正态分布迭代计算数万次，其中针对低和中回收定义所回收细胞的平均值，并且针对低、中和高扩增潜力定义扩增中倍数变化的平均值。然后计算总活T细胞数量以及总反应性T细胞的分布。

[0721] 对于初始蒙特卡罗模拟(其中计算第一次扩增的可能T细胞输出)，运行测试案例以模拟低回收/低扩增、中回收/低扩增、中回收/中扩增和中回收/高扩增条件。回收和扩增两个变量的平均值和标准差的值分配如下：(1)低回收定义为培养来自处理的肿瘤的总计2千万个活细胞，标准差为6百万；(2)中回收定义为5千万或6千万个细胞，标准差为1千5百万；(3)低第一扩增倍数定义为50倍，标准差为11；(4)中扩增定义为75倍，标准差为15；并且(5)高扩增定义为500倍，标准差为160。

[0722] 来自第一次蒙特卡罗模拟的每个测试案例的数据展示于下表E1中。

表E1：第一扩增的蒙特卡罗模拟

		总活肿瘤浸润T细胞		*总反应性肿瘤浸润T细胞*
测试条件	**假设**	**统计学**	**预测值**	**预测值**
低回收/低扩增	平均值 =20 标准差 =6 平均值 =50 标准差 =11	平均值	1.99×10^7	1.59×10^6
		中值	1.99×10^7	1.51×10^6
		概率分布（第10-第90百分位数）	1.22×10^7 – 2.76×10^7	7.48×10^5 – 2.53×10^6
中回收/低扩增	平均值 =50 标准差 =15 平均值 =50 标准差 =11	平均值	4.99×10^7	3.99×10^6
		中值	5.00×10^7	3.81×10^6
		概率分布（第10-第90百分位数）	3.05×10^7 – 6.93×10^7	1.85×10^6 – 6.34×10^6
中回收/中扩增	平均值 =60 标准差 =15 平均值 =75 标准差 =15	平均值	6.00×10^7	4.81×10^6
		中值	5.99×10^7	4.63×10^6
		概率分布（第10-第90百分位数）	4.07×10^7 – 7.91×10^7	4.07×10^7 – 7.91×10^7
中回收/高扩增	平均值 =60 标准差 =15 平均值 =500 标准差 =160	平均值	4.78×10^7	5.99×10^7
		中值	4.60×10^7	6.00×10^7
		概率分布（第10-第90百分位数）	4.07×10^7 – 7.94×10^7	2.43×10^6 – 7.40×10^6

[0723] 使用这些数据，设计第二组蒙特卡罗模拟以预测在如实施例8中所述与APC共培养、通过流式细胞术分选以及第二扩增后，反应性肿瘤浸润淋巴细胞的最终数量。将从肿瘤

碎片或SCS培养的总T细胞群体中存在的反应性T细胞的百分比的固定值分配为平均值为8%且标准差为2.50。在数万次迭代计算后，来自第二次蒙特卡罗模拟的每个测试案例的数据描绘于下表E2中。

表E2：第二和最终扩增的蒙特卡罗模拟

		总反应性肿瘤浸润T细胞	
测试条件	假设	统计学	预测值
低回收/低扩增	平均值 =20 标准差 =6 平均值 =50 标准差 =11	平均值	7.96×10^7
		中值	7.34×10^7
		概率分布（第10-第90百分位数）	3.41×10^7 – 1.34×10^8
中回收/低扩增	平均值 =50 标准差 =15 平均值 =50 标准差 =11	平均值	2.00×10^8
		中值	1.85×10^8
		概率分布（第10-第90百分位数）	8.44×10^7 – 3.33×10^8
中回收/中扩增	平均值 =60 标准差 =15 平均值 =75 标准差 =15	平均值	3.61×10^8
		中值	3.39×10^8
		概率分布（第10-第90百分位数）	1.68×10^8 – 5.80×10^8
中回收/高扩增	平均值 =60 标准差 =15 平均值 =500 标准差 =160	平均值	2.39×10^9
		中值	2.19×10^9
		概率分布（第10-第90百分位数）	9.57×10^8 – 4.06×10^9

[0724] 来自肿瘤处理后的第一扩增或与APC的下游共培养后的第二扩增的肿瘤浸润反应性T细胞的回收和扩增潜力是如下因素：其在供体之间以及在肿瘤细胞群内是固有地可变的。通过这里所述的过程产生的T细胞数的预期范围包含在第10和第90百分位数内。低于第10百分位数的细胞数量不可能被生成，并将可能不会产生可用的药品。因此，来自表E1和表E2中的蒙特卡罗模拟的观察支持，在第10与第90百分位数之间的所有情况下，鉴于扩增潜力的差异性水平的范围，本文所述的方法将可能提供稳健的T细胞输出，所述T细胞输出接近于治疗性给药所需的细胞数量。

实施例10按IFN-γ产生和TCR克隆性对肿瘤反应性TCR富集的评估

[0725] 如实施例1中所述，从肿瘤碎片处理来源自患有卵巢癌(样品A)、CRC(样品B)或黑色素瘤(样品C)的患者的原发性肿瘤的T细胞。在初始扩增后，然后使用基本上如实施例6中所述的方法将T细胞与呈递肽的自体树突细胞共培养6小时。对于共培养，自体DC加载有对于患者肿瘤独特的突变型单一长肽(例如25聚体)或与来自患者的正常样品相比未突变的野生型单一长肽。在共培养后，通过针对4-1BB(CD137)和/或OX40(CD134)的表达对细胞进行染色并通过荧光激活细胞分选(FACS)分选细胞来富集肿瘤反应性T细胞。收集对41BB和OX40中的任一者或两者呈阳性的细胞作为“阳性”群体(也称为“突变体富集的”群体)，并且收集对41BB和OX40呈双重阴性的细胞作为“阴性”群体(也称为“野生型未富集的”群体)。

[0726] 然后将突变体和野生型T细胞群体在仅培养基中或在刺激IFN-γ分泌的条件下培养16小时。包括来自尚未基于41BB和OX40表达进行分选的共培养物的未分选的、未富集的T细胞(大量T细胞)作为选择前对照并类似地进行刺激。收集培养上清液，并且通过ELISA确

定IFN-γ分泌水平。

[0727] 通过单细胞TCR测序来确定分选的群体中表达对肽新表位具有反应性的TCR的T细胞的百分比。还通过对TCR-β和TCR-α链的单细胞RNA测序来确定T细胞群中的TCR克隆性。

1.样品A(卵巢癌)

[0728] 将从样品A肿瘤细胞产生的突变体和野生型富集的T细胞群体或对照大量T细胞在仅培养基中培养16小时,或者通过与抗CD28和抗CD49d抗体以及对应于突变体肽的最小肽表位(8聚体)(新表位)或来自相应患者肿瘤的野生型肽一起培养来进行刺激。如图24A所示,与仅培养基相比,在用新表位培养后,大量T细胞展现出改进的反应性,如通过增加的IFN-γ分泌所证实的。在用新表位刺激的突变体富集的T细胞群体中,产生IFN-γ的能力进一步增加,但是在仅培养基中刺激与用新表位条件刺激后,在野生型富集的T细胞群体中没有观察到差异。另外,野生型未富集的T细胞群仍包括一定程度的新生抗原反应性T细胞,如通过与仅培养基相比,其对IFN-γ分泌的上调所证实的。此数据表明,在共培养后,大量T细胞含有新生抗原反应性群体,将其通过基于41BB和OX40的表达进行分选来富集。此外,结果也证明了新生抗原富集的特异性。

[0729] 通过RNA测序和流式细胞术对新表位特异性TCR的分析显示在突变体富集的T细胞群体中TCR“A”新生抗原特异性TCR的富集,其具有17%新生抗原特异性TCR,与之相比,在初始大量T细胞群体中为2%,或者在野生型富集的T细胞群体中为0.1%(图24B)。与选择的群体(突变体富集的T细胞群)相比未选择的群体(野生型富集的T细胞群)中T细胞的TCR克隆性示于图24C中,其表明在未分选的T细胞群中引进的TCR多样性高,并且在选择的群体中实现独特TCR克隆的富集。图24D证明,分选之前(大量)和之后的细胞群体含有CD4和CD8细胞,表明I类和II类反应性细胞存在于富集的群体中。

2.样品B(CRC患者)

[0730] 将从样品B肿瘤细胞产生的突变体和野生型富集的T细胞群体或对照大量T细胞在仅培养基中培养16小时,或者响应于使用抗CD3抗体(OKT3)的一般TCR刺激加以刺激。如图25A所示,所有T细胞群体都在共培养和分选后响应于一般TCR刺激展示功能性(即IFNγ产生)。

[0731] 对新表位特异性TCR的分析显示新生抗原“B”特异性TCR在突变体富集的T细胞群体中的富集,其具有71%新生抗原特异性TCR,与之相比,在初始大量T细胞群体中为42%,或者在野生型富集的T细胞群体中为17%(图25B)。与共培养后的大量T细胞相比,这代表在分选的T细胞群体中肿瘤反应性T细胞的接近1.7倍富集,以及在未分选的T细胞群体中肿瘤反应性T细胞的接近2.5倍减少。与选择的群体(突变体富集的T细胞群体)相比,未选择群体(野生型富集的T细胞群体)中T细胞的TCR克隆性显示于图25C中,其显示在未分选T细胞群体中输入性TCR多样性高(807种独特TCR克隆),并且在选择的群体中实现了独特TCR克隆的富集(64种独特TCR克隆)。图25D证明,分选之前(大量)和之后的细胞群体含有CD4和CD8细胞,表明I类和II类反应性细胞存在于富集的群体中。

3.样品C(黑色素瘤患者)

[0732] 通过RNA测序和流式细胞术和TCR克隆性评估从样品C肿瘤细胞产生的突变体和野生型富集的T细胞群体或对照大量T细胞中的T细胞的新表位特异性TCR。结果显示新生抗原“C”特异性TCR在突变体富集的T细胞群体中的富集,其具有33%新生抗原特异性TCR,与之

相比，在初始大量T细胞群体中为5％，或者在野生型富集的T细胞群体中为4％(图26A)。与共培养后的大量T细胞相比，这表示在分选的T细胞群体中肿瘤反应性T细胞的接近7倍富集，以及在未分选的T细胞群体中肿瘤反应性T细胞没有富集。与选择的群体(突变体富集的T细胞群体)相比，未选择群体(野生型富集的T细胞群体)中T细胞的TCR克隆性显示于图26B中，其显示在未分选T细胞群体中输入性TCR多样性高(182种独特TCR克隆)，并且在选择的群体中实现了独特TCR克隆的富集(15种独特TCR克隆)。图26C证明，分选之前(大量)和之后的细胞群体含有CD4和CD8细胞，表明I类和II类反应性细胞存在于富集的群体中。

4.结论

[0733] 综上所述，结果显示，在未分选T细胞群体中输入性TCR多样性高(例如100-900种TCR)。此未分选的群体产生低水平的IFNγ(例如5-25pg/mL)。在基于激活标记(例如OX40/41BB)分选TCR群体后，TCR群体富集TCR的反应性群体(例如15-64种TCR)，其产生高于TCR的未分选和阴性分选群体(5pg/mL)的IFNγ(例如65.3-98.6pg/mL)。结果表明，这是与肿瘤反应性T细胞的富集一致的特异性激活，因为在野生型未分选共培养物中没有见到所述激活。

实施例11对T细胞佐剂对T细胞活力的影响的评估

[0734] 从PBMC扩增细胞，所述PBMC源自来自三名健康供体的单采术材料的Ficoll梯度分离。将PBMC以$2x10^6$个细胞/ml接种于补充有300IU/mL的重组IL-2、10μg/ml的庆大霉素、在2％与5％之间的免疫细胞血清替代物(ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)的OpTmizer细胞培养基中，并且用人抗CD3抗体OKT3抗体激活48小时。因为所述研究在健康供体中进行，所以用抗CD3(OKT3)刺激进行对T细胞的刺激以模拟存在于肿瘤微环境(TME)中的条件。

[0735] 接下来将细胞接种至透气性100M培养器皿中并扩增7-14天，以达到大型T细胞库，并且将其冷冻保存。将来自三名健康供体的先前扩增的人T细胞解冻，然后与一系列浓度的测试佐剂一起接种至96孔培养板中的补充有300IU/mL的重组IL-2、10μg/ml的庆大霉素、在2％与5％之间的免疫细胞血清替代物(ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)的OpTmizer细胞培养基中，至$5x10^5$个细胞/mL的最终细胞密度。一半孔另外补充有50ng/mL OKT3(一种人抗CD3单克隆抗体)。在存在和不存在抗CD3激活的情况下总计测试15种测试佐剂对细胞活力的影响(参见表E3)。将细胞培养总计6天，包括在培养第3天更换50％培养基，并且监测总活CD3+细胞计数。

表E3：高通量筛选中使用的化合物和浓度

化合物	浓度
抗体	
他佛利珠单抗、奥塞芦单抗、伊匹单抗、托珠单抗、乌瑞鲁单抗、帕博利珠单抗、伐立鲁单抗、抗GITR MK-1248	0.625 μg/mL - 10 μg/mL
FasL（人抗FasL抗体）	0.625 μg/mL - 10 μg/mL
小分子抑制剂	

Z-VAD-FMK	1.5625 μM - 25 μM
NVP-HSP990	15.625 nM-250 nM
细胞因子	
IL-7	62.5 IU/ml – 1000 IU/ml
IL-15	62.5 IU/ml – 1000 IU/ml
IL-21	62.5 IU/ml – 1000 IU/ml
IL-23	62.5 ng/ml – 1000 ng/ml
IL-25	62.5 ng/ml – 1000 ng/ml
IL-27	62.5 ng/ml – 1000 ng/ml
IL-35	62.5 ng/ml – 1000 ng/ml
DMSO（对照）	*0% - 1% v/v*

[0736] 在不存在和存在OKT3刺激的情况下生长的细胞的总活CD3+细胞计数分别显示于图27A-图27C以及图28A-图28C中。所示的结果是关于以下浓度的佐剂:10μg/mL的测试抗体(他佛利珠单抗、奥塞芦单抗、伊匹单抗、托珠单抗、乌瑞鲁单抗、帕博利珠单抗、伐立鲁单抗、抗GITR MK-1248、抗人FasL);25μM的Z-VAD-FMK泛半胱天冬酶抑制剂;250nM的HSP抑制剂NVP-HSP990;以及1000IU/mL的细胞因子(IL-7、IL-15、IL-21、IL-23、IL-25、IL-27或IL-35)。

[0737] 总得来说,对于所测试的任何化合物都没有观察到毒性,表明这些化合物对TIL制造无害。虽然观察到固有的供体差异性,但是用抗PD1抗体帕博利珠单抗、抗OX40L抗体奥塞芦单抗和泛半胱天冬酶抑制剂Z-VAD-FMK处理导致始终高于DMSO处理对照的活细胞计数,不管激活状态如何。

[0738] 分别在图29A和图29B所示的IL-7和IL-15的剂量反应曲线显示出剂量依赖性反应,其中细胞数量随浓度递增而增加。这些数据支持,此测试浓度范围的IL-7和IL-15对于在培养期间增强总T细胞数量是有益的。

实施例12在Fas配体或半胱天冬酶抑制下的T细胞扩增

[0739] 评估针对Fas和半胱天冬酶介导的途径的细胞凋亡抑制剂以确定在制造期间对肿瘤反应性T细胞的影响。所述研究在健康供体中进行,因此用抗CD3(OKT3)或抗CD3/抗CD28刺激进行对T细胞的刺激以模拟存在于肿瘤微环境(TME)中的条件。如可以通过抗CD3或抗CD3/抗CD28激活来刺激的存在于肿瘤微环境中的恒定激活信号可能对T细胞生长是有害的。使用细胞活力和预计的细胞数量来比较在瞬时和连续激活测定二者中调节细胞凋亡途径的影响,其中后一测定更接近地重演肿瘤微环境。

A.抗CD3刺激

[0740] 将来自三名健康供体的PBMC解冻,并且用补充有300IU/mL的重组IL-2、10μg/ml的庆大霉素、5%的免疫细胞血清替代物(ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)的OpTmizer细胞培养基洗涤。然后将细胞以2.14x10^5个细胞/mL(7.5x10^5个细胞/cm^2)的密度接种至24孔透气性细胞培养板中。将细胞使用50ng/ml OKT3(一种人抗CD3单克隆抗体)激活48小时,并且另外用如

下所述的药剂处理。

[0741] 将培养孔分配给五个处理组之一，如下：(1)无抑制剂培养对照，其仅含有如所述的细胞培养基，没有另外的细胞凋亡调节剂；(2)仅在培养第0天将2μM泛半胱天冬酶抑制剂Z-VAD-FMK添加至培养基(瞬时)；(3)在培养第0天添加2μM泛半胱天冬酶抑制剂Z-VAD-FMK，并且另外在每次更换培养基时以相同浓度补充所述抑制剂(连续)；(4)仅在第0天将500ng/ml的Fas配体(FasL)阻断抗体NOK-1(BioLegend)添加至培养基(瞬时)；或者(5)仅在第0天将500ng/ml的Fas配体(FasL)阻断抗体NOK-1(BioLegend)添加至培养基，并且在每次更换培养基时另外补充(连续抑制)。

[0742] 将培养维持至少13天，其中在培养第2天开始，每隔一天更换50％培养基。每隔一天监测细胞计数和活力。在细胞达到3x10^{6}个细胞/ml时，将1.5x10^{6}个细胞传代培养至24孔透气性培养板的含有7mL终体积培养基的新孔中，并且如上所述继续培养。

[0743] 三个供体中每一个的总细胞数量和细胞活力显示于图30A-图30B(供体1)、图31A-图31B(供体2)和图32A-图32B(供体3)中。在整个培养期中对于所有处理条件，活力都保持较高，然而具有连续FasL阻断的条件显示出名义上低于其他条件的活力。在所有供体中，这些细胞也都生长得最慢，并且其生长在任何其他条件之前达到稳定期。在培养基中持续存在半胱天冬酶抑制剂的细胞培养在供体之间显示出最大的细胞生长，而对照和瞬时处理条件类似地生长。用FasL阻断抗体NOK-1瞬时处理也导致显著T细胞扩增。

[0744] 这些结果表明，半胱天冬酶抑制剂的使用在TIL制造的扩增步骤期间可以用于使扩增最大化并维持活力，特别是在高密度培养物中。在其他细胞类型(尤其是肿瘤细胞)的存在下进行T细胞激活、共培养或处理期间瞬时使用FasL阻断也可以用于在促凋亡环境中阻断Fas信号传导。

B.抗CD3/抗CD28刺激

[0745] 将来自两名健康供体的PBMC解冻，并且用补充有300IU/mL的重组IL-2、10μg/ml的庆大霉素、5％的免疫细胞血清替代物(ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)的OpTmizer细胞培养基洗涤。然后将细胞以1.5x10^{5}个细胞/mL(5.0x10^{5}个细胞/cm^2)的密度接种至24孔透气性细胞培养板中。

[0746] 将培养孔分配给两个处理组(瞬时或连续激活)之一。对于瞬时激活，在培养第0天开始，将抗CD3/抗CD28顺磁珠(Dyanbeads^{TM})以每个细胞1个珠的比率添加至培养基中，然后在第2天更换培养基期间去除。对于连续激活，在培养第0天开始，将抗CD3/抗CD28顺磁珠(Dyanbeads^{TM})以每个细胞1个珠的比率添加至培养基中，然后在第4天再次添加，并且在第6天以每个细胞1个珠的比率再次添加。在第2天、第4天或第6天不去除抗CD3/抗CD28顺磁珠。

[0747] 对于连续和瞬时激活两者，将培养孔分配给如上所述的五个处理组之一，每名供体总计10种条件。

[0748] 每隔一天监测细胞计数和活力。在细胞达到3x10^{6}个细胞/ml时，将1.5x10^{6}个细胞传代培养至24孔透气性培养板的含有7mL终体积培养基的新孔中，并且如上所述继续培养。

[0749] 用抗CD3/抗CD28单次激活(瞬时激活)的处理组的细胞活力示于图33A(供体1)和图33B(供体2)中，并且相同处理的总细胞数量分别示于图34A(供体1)和图34B(供体2)中。虽然观察到固有的供体差异性，但是对于暴露于瞬时激活(单一激活)刺激物的所有处理条

件,活力都保持较高。对于所有处理组,活力都保持较高,但具有连续FasL阻断的条件的处理组除外,其中活力和总活细胞数量二者都随时间下降(图33A-图33B)。

[0750] 用抗CD3/抗CD28连续激活的处理组的细胞活力示于图35A(供体1)和图35B(供体2)中,并且相同处理的总细胞数量示于图36A(供体1)和图36B(供体2)中。在暴露于用抗CD3/抗CD28的连续激活(模拟天然肿瘤微环境)时,处理条件之间总活细胞数量和活力两者的差异大于仅涉及瞬时激活事件的条件。在连续激活的群体中,似乎暴露于半胱天冬酶抑制剂(瞬时和连续两种情况)的细胞胜过其他条件,其中连续半胱天冬酶抑制胜过瞬时条件。另外,暴露于FasL阻断的细胞显示总细胞数量和活力二者的最大下降,而瞬时暴露于FasL阻断且没有另外的处理的细胞的表现类似。

[0751] 这些结果表明,在培养期间使用半胱天冬酶抑制可以改进细胞在可能对正常T细胞生长不利的环境中表现的能力,如在直接从肿瘤处理细胞时,所述肿瘤可以与此测定系统类似地组成型地呈递激活信号。这些结果还表明,连续阻断FasL信号传导可能在瞬时和连续T细胞激活的两种条件下对T细胞生长有害,并且对FasL的阻断在瞬时提供时不会如此强地影响T细胞生长。

实施例13对肿瘤处理中半胱天冬酶抑制的评估

[0752] 如实施例1中所述使用胶原酶I/II共混物(Nordmark,胶原酶NB 4G证明等级,货号:S1746503)处理来自供体的CRC肿瘤,以产生碎片或SCS培养物。在透气性24孔培养板中使用补充有300IU/mL的重组IL-2、10μg/ml的庆大霉素、5%之间的免疫细胞血清替代物(ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)的OpTmizer培养基中维持肿瘤碎片和SCS培养物两者。一半培养物含有另外补充有2μM泛半胱天冬酶抑制剂Z-VAD-FMK的培养基,其是在每次更换培养基时进行补充。将培养物在约37℃下孵育最少18天,其中在培养第5天后每2-3天进行50%培养基更换。在第5天以及在每次更换培养基时使用NC-200自动化细胞计数器(ChemoMetec)进行细胞计数。

[0753] 图37A-图37C显示在存在或不存在Z-VAD-FMK的情况下生长的SCS和肿瘤碎片两种来源的培养物的扩增倍数(图37A)、总活细胞(图37B)和活力百分比(图37C)。图37A和图37B证明,细胞的长出在含有泛半胱天冬酶抑制剂的肿瘤碎片源条件下更优越。另外,如在图37C中所见,此条件的细胞活力也较高。对于作为SCS在半胱天冬酶抑制的存在下培养的那些细胞,细胞活力类似地高,即使对于SCS条件没有观察到T细胞的长出。这些数据表明,对于从肿瘤生长的T细胞,半胱天冬酶抑制可能是维持高活力和长出的机制。

实施例14对检查点调节剂和共刺激激动剂抗体对T细胞表型的影响的评价

[0754] 将来自两名健康供体的PBMC解冻,并且用补充有300IU/mL的重组IL-2、10μg/ml的庆大霉素、5%的免疫细胞血清替代物(ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)的OpTmizer细胞培养基洗涤。然后将细胞以5.0x10^5个细胞/cm^2的密度接种至24孔透气性细胞培养板中。将细胞使用50ng/ml OKT3(一种人抗CD3单克隆抗体)激活48小时,并且另外用如下所述的药剂处理。在培养48小时后,分析细胞的表型。

[0755] 将细胞分为6个处理组,如下:伊匹单抗(抗CTLA4)、帕博利珠单抗(抗PD1)、他佛利珠单抗(抗TNFRSF4)、乌瑞鲁单抗(抗CD137)和伐立鲁单抗(抗CD27),以及不添加药剂的对

照。对于所有测试组，在0.5、1、10或20μg/mL的单克隆抗体的存在下培养每个处理组中的细胞。

[0756] 所测试的抗体似乎都不影响T细胞的记忆分化状态。经由流式细胞术针对激活标记OX40、41BB、CD107a和PD1独立地评估CD4+和CD8+细胞的T细胞表型。结果示于图38(CD3+)、图39(CD4+)和图40(CD8+)中。较高浓度的伐立鲁单抗(一种激动剂抗CD27抗体)促进CD3+T细胞(图38B和38C)、CD4+T细胞(图39B和39C)和CD8+T细胞(图40B和40C)上的41BB和CD107a表达。乌瑞鲁单抗(一种激动剂CD137受体抗体)促进CD4 T细胞(图39B)和CD8+T细胞(图40B)上的41BB表达。帕博利珠单抗(一种抗PD-1拮抗剂)减少CD4 T细胞上的PD1表达(图39D)。

[0757] 这些数据支持使用单克隆抗体调节剂在T细胞扩增中用作调节细胞激活状态的方式。

实施例15对细胞因子、调节剂和激动剂抗体对T细胞数、记忆表型和T细胞耗尽的影响的评价

[0758] 如实施例11中所述，将来自三名健康供体的PBMC激活，扩增并冷冻保存。将细胞用补充有300IU/mL的重组IL-2、10μg/ml的庆大霉素、5％的免疫细胞血清替代物(ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)的OpTmizer细胞培养基洗涤24小时。如先前所述，用抗CD3(OKT3)刺激进行冷冻保存前对健康供体T细胞的刺激以模拟存在于肿瘤微环境(TME)中的条件。

[0759] 接下来将细胞接种至透气性100M培养器皿中并扩增7-14天，以达到大型T细胞库，并且将其冷冻保存。将来自三名健康供体的先前扩增的人T细胞解冻，然后与一系列浓度的测试佐剂一起接种至96孔培养板中的补充有300IU/mL的重组IL-2、10μg/ml的庆大霉素、在2％与5％之间的免疫细胞血清替代物(ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)的OpTmizer细胞培养基中，至$5x10^5$个细胞/mL的最终细胞密度。

[0760] 表E4示出了这些研究中评估的药剂和浓度。将细胞在培养中维持6天，其中在培养开始后3天更换50％培养基。

[0761] 对于所有培养条件，在培养期结束时，通过用CD45RA和CCR7进行染色(幼稚，CD45RA+CCR7+;“中枢”记忆，CD45RA-CCR7+)通过流式细胞术评估细胞的细胞计数以及幼稚和中枢记忆T细胞的子表型。

表E4：与IL-2组合使用的化合物和浓度	
化合物	浓度
抗体	
抗OX40L（例如奥塞芦单抗）、抗GITR（例如MK-1248）	0.2 μg/mL - 50 μg/mL
小分子抑制剂	
Z-VAD-FMK	0.2 μg/mL - 50 μg/mL
细胞因子	
IL-23	3.9 ng/ml – 1000 ng/ml
IL-21	3.9 IU/ml – 1000 IU/ml
IL-27	3.9 ng/ml – 1000 ng/ml
IL-35	3.9 ng/ml – 1000 ng/ml
IL-7	3.9 IU/ml – 1000 IU/ml
IL-15	3.9 IU/ml – 1000 IU/ml

[0762] 与仅用IL-2扩增的培养物相比，所测试的每种细胞因子都导致在第6天CD3+细胞/mL的增加。在一些情形中，第6天细胞数量的最大增加是在所测试的最高细胞因子浓度下。结果示于图41A(IL-23)、图42A(IL-21)、图43A(IL-35)、图44A(IL-27)、图45A(IL-15)和图46A(IL-7)中。

[0763] 除了细胞数量之外，细胞因子IL-23(图41B)、IL-21(图42B)、IL-35(图43B)、IL-27(图44B)、IL-15(IL-45B)和IL-7(图46B)也导致在第6天存在于扩增的群体中的幼稚和中枢记忆T细胞百分比的测量到的增加。具体而言，在几种测试浓度的IL-23和IL-27下，在孵育后，观察到幼稚和中枢记忆T细胞百分比的增加，它们是具有更少耗竭表型的T细胞。例如，如图44B所示，在三种测试浓度(3.9、250和1000IU/mL)中的每一种下，IL-27导致CD3+细胞数量以及存在于群体中的幼稚和中枢记忆T细胞百分比的显著增加。

[0764] 与仅单独用IL-2扩增的培养物相比，添加人抗GITR抗体或抗OX40L抗体导致在第6天在最高测试浓度(50μg/mL)下CD3+细胞/mL的增加。结果示于图47A(人抗GITR MK-1248)和图48B(奥塞芦单抗)中。最高测试浓度的抗GITR抗体MK-1248另外导致在培养第6天存在于群体中的幼稚和中枢记忆T细胞百分比的显著增加(图47A)，而与仅用IL-2扩增的培养物相比，在抗OX40L抗体的情况下观察到对幼稚和中枢记忆T细胞的百分比几乎没有影响。

[0765] 与仅单独用IL-2扩增的培养物相比，小分子半胱天冬酶抑制剂Z-VAD-FMK在第6天在高于0.2μg/mL的浓度下也显著增加CD3+细胞数量/mL(图49A)。Z-VAD-FMK化合物对与仅用IL-2扩增的培养物相比在抗OX40L抗体的情况下观察到的幼稚和中枢记忆T细胞的百分比没有影响。

实施例16对细胞因子、调节剂和激动剂抗体对CD4+/CD8+T细胞比率的影响的评价

[0766] 测定细胞因子、调节剂和激动剂抗体对存在于所得群体中的CD4+与CD8+T细胞的比率的影响。简而言之，如实施例15中所述，将来自三名健康供体的PBMC激活，扩增并冷冻

保存,之后解冻,洗涤并用OpTmizer细胞培养基静置24小时。然后将来自三名健康供体的先前扩增的人T细胞与一系列浓度的测试佐剂一起接种至96孔培养板中的补充有300IU/mL的重组IL-2、10μg/ml的庆大霉素、在2%与5%之间的免疫细胞血清替代物(ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)的OpTmizer细胞培养基中,至5x105个细胞/mL的最终细胞密度。

[0767] 表E5示出了这些研究中评估的药剂和浓度。将细胞在培养中维持6天,其中在培养开始后3天更换50%培养基。在培养期结束时,通过针对CD4和CD8进行染色通过流式细胞术评估细胞的T细胞亚型。一名供体的代表性结果示于图50中。

表E5:高通量筛选中使用的化合物和浓度

化合物	浓度
抗体	
他佛利珠单抗、奥塞芦单抗、伊匹单抗、托珠单抗、乌瑞鲁单抗、帕博利珠单抗、伐立鲁单抗、抗GITR MK-1248	0.2 μg/mL - 50 μg/mL
FasL(人抗FasL抗体)	0.2 μg/mL - 50 μg/mL
小分子抑制剂	
Z-VAD-FMK	0.4 μg/mL - 100 μg/mL
NVP-HSP990	4.0 μg/mL - 1000 μg/mL
细胞因子	
IL-23	3.9 ng/ml – 1000 ng/ml
IL-21	3.9 IU/ml – 1000 IU/ml
IL-27	3.9 ng/ml – 1000 ng/ml
IL-35	3.9 ng/ml – 1000 ng/ml
IL-7	3.9 IU/ml – 1000 IU/ml
IL-15	3.9 IU/ml – 1000 IU/ml
IL-21	3.9 ng/ml – 1000 ng/ml
DMSO(对照)	0.2 μg/mL - 50 μg/mL

[0768] 虽然观察到一定剂量依赖性,但所测试的抗体(图50A)、细胞因子(图50B)以及小分子抑制剂(图50C)都没有显著改变在仅IL-2(最左条)的情况下观察到的CD4+/CD8+T细胞比率。这些数据支持,这些药剂与IL-2组合可以用于调节T细胞数量、表型和耗竭状态而不会显著改变存在于群体中的T细胞亚型的平衡。

实施例17CD39、PD-1和TIGIT在用于获得肿瘤来源的细胞群体的直接选择中的用途

[0769] 从肿瘤碎片处理来源于患有结直肠癌(CRC)或黑色素瘤的患者的原发性肿瘤的T细胞。简单来说,将组织切碎成1-8mm碎片,然后使用自动化GentleMACS(Miltenyi)以每个Gentle MACS C管大约1-2克组织进行消化。在含有5%无血清OpTmizer培养基(ThermoFisher)的Roswell Park Memorial Institute(RPMI)的存在下,将自动化处理后

的细胞置入透气性培养器皿G-Rex 10中。培养基补充有300IU/mL的重组IL-2,并且还含有10μg/ml的庆大霉素、根据制造商的建议在2%与5%之间的免疫细胞血清替代物(ICSR,ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)。将碎片培养物在培养中维持长达30天。

[0770] 然后将来自肿瘤碎片培养物的细胞用可行的染料以及用抗CD39-APC、抗PD-1-BV421、抗TIGIT-PE、抗CD4-BV510和抗CD8-PE-Cy7染色抗体在悬浮液中以1μl每种染料/百万个细胞进行染色。然后通过多色流式细胞术来评估表达标记及其组合的细胞的百分比。结果描绘于表E6中。如所示,大部分细胞是CD39+,并且这些细胞的子集对PD-1、TIGIT或PD-1和TIGIT也呈阳性。这些结果与如下发现一致,对CD39、PD-1和TIGIT中的一种或多种呈阳性的细胞存在于肿瘤中,并且支持使用这样的标记用于选择预期会富含肿瘤反应性T细胞的T细胞。

表E6:两名供体的示例性分选总结

TIL样品	CD4或CD8 (%)	CD39+ (%)	PD1+ TIGIT- (%)	PD1+ TIGIT+ (%)	PD1- TIGIT- (%)	PD1- TIGIT+ (%)
黑色素瘤	79.5	90.1	8.8	39.7	23.2	18.7
CRC	77.5	71.9	4.7	28.1	53.1	10.9

实施例18直接选择的肿瘤来源的T细胞的离体扩增的蒙特卡罗建模

[0771] 设计蒙特卡罗模拟来预测从使用标记CD39、PD-1和TIGIT对肿瘤细胞的直接选择以及之后扩增选择的细胞获得的肿瘤浸润淋巴细胞的数量。蒙特卡罗模拟允许在不使大量患者经历实验程序的情况下,关于用于患者的细胞疗法产物的制造进行准确建模。这些方法有效地允许预测性建模、预测、模拟以及优化,继而深入了解影响风险的关键因素。

[0772] 所提供的实施方案是基于用于产生TIL疗法的过程,其中针对CD39、PD-1和/或TIGIT的选择步骤将富集肿瘤反应性T细胞。不希望受限于理论,已经识别肿瘤的肿瘤来源的T细胞将上调激活标记(如CD39、PD-1、TIGIT和其他标记)以及耗竭标记,因为它们已经识别肿瘤上存在的新生抗原。CD39、PD1和TIGIT的上调范围可以各自在1-80%之间,根据所收集的已经被运送至肿瘤的T细胞数量而定。在选择/分选步骤期间,分离TIL或识别突变体肽并且表达标记CD39、PD1、TIGIT中的一种、两种或所有三种的T细胞,并且每种标记可以在大约3-80%的所述细胞上单独表达。然后使选择/分选的细胞进一步扩增以获得TIL治疗剂量。

[0773] 针对三种不同的过程将所述模拟建模:(1)肿瘤>消化>扩增1>选择/分选>扩增2>治疗剂量;(2)肿瘤>消化>选择/分选>扩增1>扩增2>治疗剂量;以及(3)肿瘤>消化>选择/分选>扩增1>治疗剂量。

[0774] 对于每种模拟,基于如下过程将所述模拟建模,所述过程包括以范围为大约0.5g至10g的质量从患者收集肿瘤组织,然后使用自动化系统将所述肿瘤组织消化为单细胞悬浮液以产生肿瘤来源的细胞的群体。消化之后的回收率的范围可以为T细胞的20%至99%回收率。然后根据下文针对每种过程概述的程序来处理所述细胞。

(1)过程实施方案1:肿瘤>消化>扩增1>选择/分选>扩增2

[0775] 在用于制备TIL自体T细胞疗法的过程的第一实施方案中,在获得单细胞悬浮液后,将大约10x10^6个TIL或T细胞/克至100x10^6个TIL或T细胞/克原始肿瘤收集物与细胞因子一起培养短时间段。具体而言,首先将所述细胞在来自IL-2、IL-15、IL-7、IL-21、IL-23、IL-

21、IL-27和IL-35的几种细胞因子之一(通常包括约300IU/mL的量的至少IL-2)的存在下最小扩增1-14天之间。在一些实施方案中,第一或初始最小扩增培养步骤进行延长时间,使得在肿瘤中上调的激活标记(如CD39、PD-1和TIGIT)在选择/分选步骤期间保持存在,并且随后没有通过培养短暂下调。例如,不希望受限于理论,如果将细胞培养过长时间段,所述细胞可能下调或者可能停止表达这些标记(包括CD39、PD1和TIGIT),使得将不可能使用这些标记进行分选。

[0776] 在大约0-14天使用自动化细胞计数器进行细胞计数,以确定扩增步骤的产量。然后将TIL通过多色流式细胞术使用GMP或分析物特异性试剂(ASR)抗体进行染色,并且基于标记CD39、PD1和TIGIT的上调进行分选。分选步骤可以分离总细胞的大约5-60%。在分选后,使细胞在封闭的培养系统中在来自IL-2、IL-15、IL-7、IL-21、IL-23、IL-21、IL-27和IL-35的一种或多种细胞因子(通常包括约300IU/mL的量的至少IL-2)以及任选地如本文所述的一种或多种另外的T细胞刺激试剂或调节试剂的存在下扩增大约14天。进行所述培养以产生足量细胞用于治疗剂量,通常>500X10^6个总T细胞,其为已经扩增并且会在自体肿瘤的存在下产生细胞因子的T细胞。

[0777] 实施方案(1)过程的示例性描绘显示于表E7中。

表E7:实施方案(1)中的过程步骤

过程步骤	肿瘤	>	消化	>	PreRep(扩增1)	>	分选	>	Rep(扩增2)	>	治疗剂量
群体#		1		2		3		4		5	
持续时间		0-1天		0-1天		1-14天		0-1天		1-14天	

[0778] 对于初始蒙特卡罗模拟,通过代入固有不确定性因素的概率分布来运行测试用例以对可能的分选前总细胞进行建模:肿瘤质量、消化回收率百分比以及第一扩增后每克的总细胞。通过使用如表E8中所示的参数刺激250,000名患者和制造运行来反复计算结果,其中在肿瘤质量的对数正态分布、消化回收率的正态分布以及第一扩增后每克的总细胞的对数正态分布和分选前反应性细胞的对数正态分布中定义所回收细胞的平均值。来自第一蒙特卡罗模拟的每个测试用例的数据也展示于下表E8中。基于指定分布内每种测试条件的差异性,计算分选后总细胞的预测结果。不希望受限于理论,考虑到对于此第一实施方案,鉴于如上所述的第一扩增步骤,由于消化方法(即,对细胞"较轻"或较温和,因为消化样品所需的酶浓度较低,如在1与5mg/mL之间,如1mg/mL)而将观察到高回收率。

表E8:对于实施方案(1),可能的分选后总细胞的蒙特卡罗模拟

		分选后总细胞	
测试条件	**假设**	**统计学**	**预测值**
消化回收率（%）	平均值 =90.00 标准差 =2.00 正态分布	平均值：8.95 x10^6 中值：5.47 x10^6	0% 518,865.83 10% 2,210,092.62 20% 2,935,427.59 30% 3,663,314.31 40% 4,479,771.85 50% 5,468,988.75 60% 6,731,800.27 70% 8,535,879.64 80% 11,467,180.90 90% 17,701,417.23 100% 784,104,584.93
分选前的反应性细胞（%）	平均值 =25.00 标准差 =10.00 位置 =5.00 对数正态分布		
总细胞/克（扩增1后）	平均值 =20.00 标准差 =20.00 位置 =10.00 对数正态分布		
肿瘤质量	平均值 =2.00 标准差 =01.50 位置 =00.50 对数正态分布		
CD39（%）	Min = 0.03 Max - 0.50		
PD-1（%）	Min = 0.20 Max - 0.80		
TIGIT（%）	Min = 0.20 Max - 0.80		

[0779] 通过根据下文所述假设使用来自表E8的分选后预测数据代入倍数扩增的扩增2分布的正态分布，运行分选后用于治疗剂量的可能的总细胞的蒙特卡罗模拟。针对250,000名患者刺激反复计算结果，然后计算总细胞数量的分布，如下表E9中所示。

表E9：对于实施方案 (1)，最终扩增后可能的总细胞的蒙特卡罗模拟

		分选和扩增后的总细胞	
测试条件	**假设**	**统计学**	**预测值**
倍数扩增2	平均值 =750.00 标准差 =200.00 正态分布	平均值 =6.71x10^9 Max = 4.00 x10^9	0% 1,295,675,671.31 10% 1,486,065,198.60 20% 2,041,844,493.57 30% 2,603,747,895.37 40% 3,237,519,054.02 50% 3,999,406,936.98 60% 4,981,888,632.10 70% 6,363,031,134.08 80% 8,628,338,887.85 90% 13,480,329,792.97 100% 717,174,624,245.60

[0780] 通过使用此过程中的参数模拟250,000名患者和制造运行，大于97％的用于治疗癌症的治疗性用途的这些细胞疗法产物将能够以大于10亿个细胞被制造作为活性剂量。

(2)过程实施方案2:肿瘤>消化>选择/分选>扩增1>扩增2>治疗剂量

[0781] 在用于制备TIL自体T细胞疗法的过程的第二实施方案中,在获得单细胞悬浮液(大约10x10^6个TIL或T细胞/克至100x10^6个TIL或T细胞/克原始肿瘤收集物)后,然后基于标记CD39、PD1和TIGIT的上调分选TIL。对于分选,将TIL通过多色流式细胞术使用GMP或分析物特异性试剂(ASR)抗体进行染色,并且基于标记CD39、PD1和TIGIT的上调进行分选。分选步骤可以分离总细胞的大约5-60%。在分选后,使细胞在封闭的培养系统中在来自IL-2、IL-15、IL-7、IL-21、IL-23、IL-21、IL-27和IL-35的一种或多种细胞因子(通常包括约300IU/mL的量的至少IL-2)以及任选地如本文所述的一种或多种另外的T细胞刺激试剂或调节试剂的存在下扩增1-14天。进行该扩增以产生大约2-20倍的扩增倍数。在大约0-14天使用自动化细胞计数器进行细胞计数,以确定扩增1步骤的产量。在第一扩增后,使细胞在封闭的培养系统中在来自IL-2、IL-15、IL-7、IL-21、IL-23、IL-21、IL-27和IL-35的一种或多种细胞因子(通常包括约300IU/mL的量的至少IL-2)以及任选地如本文所述的一种或多种另外的T细胞刺激试剂或调节试剂的存在下进一步扩增(第二扩增)大约14天。进行该扩增以产生大约100-3000的扩增倍数。进行所述培养以产生足量细胞用于治疗剂量,通常>500 10^6个总T细胞,其为已经扩增并且会在自体肿瘤的存在下产生细胞因子的T细胞。

[0782] 实施方案(2)过程的示例性描绘显示于表E10中。

表E10:实施方案(2)中的过程步骤

过程步骤	肿瘤		消化	>	分选	>	PreRep(扩增1)	>	Rep(扩增2)	>	治疗剂量
群体#		1		2		3		4		5	
持续时间		0-1天		0-1天		0-1天		1-14天		1-14天	

[0783] 对于初始蒙特卡罗模拟,通过代入固有不确定性因素的概率分布来运行测试用例以对可能的分选前总细胞进行建模:肿瘤质量、消化回收率百分比和每克的总细胞。通过使用如表E11中所示的参数刺激250,000名患者并制造运行来反复计算结果,其中在肿瘤质量的对数正态分布、消化回收率的正态分布以及分选前反应性细胞的对数正态分布中定义所回收细胞的平均值。来自第一蒙特卡罗模拟的每个测试用例的数据展示于下表E11中。基于指定分布内每种测试条件的差异性,计算分选后总细胞的预测结果。

表E11：对于实施方案 (2)，可能的分选后总细胞的蒙特卡罗模拟

		分选后总细胞	
测试条件	**假设**	**统计学**	**预测值**
消化回收率（%）	平均值 =40.00 标准差 =10.00 正态分布	平均值：2.01 x10^6 中值：1.32 x10^6	0% -238,313.04 10% 478,149.86 20% 664,335.43 30% 853,957.87 40% 1,064,442.57 50% 1,316,139.18 60% 1,633,252.56 70% 2,072,304.31 80% 2,751,880.64 90% 4,142,666.83
分选前的反应性细胞（%）	平均值 =25.00 标准差 =10.00 位置 =5.00 对数正态分布		
总细胞/克（消化后）	平均值 =10.00 标准差 =5.00		
	位置 =2.00 对数正态分布		100% 121,152,894.27
肿瘤质量	平均值 =2.00 标准差 =01.50 位置 =00.50 对数正态分布		
CD39（%）	Min = 0.03 Max - 0.50		
PD-1（%）	Min = 0.20 Max - 0.80		
TIGIT（%）	Min = 0.20 Max - 0.80		

[0784] 通过根据下文所述假设使用来自表E10的分选后预测数据代入倍数扩增的扩增2分布的正态分布，运行分选然后扩增后用于治疗剂量的可能的总细胞的蒙特卡罗模拟。针对250,000名患者刺激反复计算结果，然后计算总细胞数量的分布，如下表E11中所示。

表E11：对于实施方案 (2)，最终扩增后可能的总细胞的蒙特卡罗模拟

		分选和扩增后的总细胞	
测试条件	**假设**	**统计学**	**预测值**
扩增倍数（扩增1）	平均值 =6.00 标准差 =1.50 正态分布	平均值：9.04 x10^9 中值：5.58 x10^9	0% -2,413,384,406.49 10% 1,749,645,301.65 20% 2,581,218,329.18 30% 3,434,870,328.97 40% 4,408,919,595.70 50% 5,578,888,455.27 60% 7,067,403,487.56 70% 9,140,674,828.29 80% 12,447,118,686.08 90% 19,134,097,493.43 100% 845,476,158,545.17
扩增倍数（扩增2）	平均值 =750.00 标准差 =200.00 正态分布		
总细胞/克（扩增1后）	平均值 =10.00 标准差 =5.00 位置 =2.00 对数正态分布		

[0785] 最终第五群体含有大于5亿个在自体肿瘤的存在下产生细胞因子的总T细胞，其中使用该方法制造的大于97.1%的细胞产物生成大于10亿个细胞用于治疗剂量。

(3)过程实施方案3:肿瘤>消化>选择/分选>扩增1>治疗剂量.

[0786] 在用于制备TIL自体T细胞疗法的过程的第三实施方案中,在获得单细胞悬浮液(大约10x10^6个TIL或T细胞/克至100x10^6个TIL或T细胞/克)后,然后基于标记CD39、PD1和TIGIT的上调分选TIL。对于分选,将TIL通过多色流式细胞术使用GMP或分析物特异性试剂(ASR)抗体进行染色,并且基于标记CD39、PD1和TIGIT的上调进行分选。分选步骤可以分离总细胞的大约5-60%。在分选后,在来自IL-2、IL-15、IL-7、IL-21、IL-23、IL-21、IL-27和IL-35的一种或多种细胞因子(通常包括约300IU/mL的量的至少IL-2)以及任选地如本文所述的一种或多种另外的T细胞刺激试剂或调节试剂的存在下使细胞扩增大约1-28天。进行所述培养以产生足量细胞用于治疗剂量,通常>500 10^6个总T细胞,其为已经扩增并且会在自体肿瘤的存在下产生细胞因子的T细胞。

[0787] 实施方案(3)过程的示例性描绘显示于表E12中。

表E12:实施方案(3)中的过程步骤

过程步骤	肿瘤		消化	>	分选	>	Rep (扩增1)	>	治疗剂量
群体#		1		2		3		4	
持续时间		0-1天		0-1天		0-1天		1-28天	

[0788] 对于初始蒙特卡罗模拟,通过代入固有不确定性因素的概率分布来运行测试用例以对可能的分选前总细胞进行建模:肿瘤质量、消化回收率百分比以及消化后每克的总细胞。通过使用如表E13中所示的参数刺激250,000名患者并制造运行来反复计算结果,其中在肿瘤质量的对数正态分布、消化回收率的正态分布以及消化后每克的总细胞的对数正态分布和分选前反应性细胞的对数正态分布中定义所回收细胞的平均值。来自第一蒙特卡罗模拟的每个测试用例的数据展示于下表E13中。不希望受限于理论,考虑到由于在方案开始时为了允许直接或接近直接的细胞分选,溶解肿瘤所需的消化较强,实施方案2和3在较低回收率方面是类似的。需要较高浓度的酶来完全消化样品,如在1与5mg/mL之间,如5mg/mL。基于指定分布内每种测试条件的差异性,计算分选后总细胞的预测结果。

表E13：对于实施方案 (3)，可能的分选后总细胞的蒙特卡罗模拟

		分选后总细胞	
测试条件	**假设**	**统计学**	**预测值**
消化回收率（%）	平均值 =50.00 标准差 =10.00 正态分布	平均值：2.50×10^6 中值：1.66×10^6	0% 98,927.91 10% 618,136.94 20% 855,954.59 30% 1,090,069.69 40% 1,351,091.06 50% 1,662,404.79 60% 2,053,550.59 70% 2,591,913.26 80% 3,434,214.94 90% 5,128,492.76 100% 472,924,420.72
分选前的反应性细胞（%）	平均值 =25.00 标准差 =10.00 位置 =5.00 对数正态分布		
总细胞/克（消化后）	平均值 =10.00 标准差 =5.00 位置 =2.00 对数正态分布		
肿瘤质量	平均值 =2.00 标准差 =1.50 位置 =0.50 对数正态分布		
CD39（%）	Min = 0.03 Max - 0.50		
PD-1（%）	Min = 0.20 Max - 0.80		
TIGIT（%）	Min = 0.20 Max - 0.80		

[0789] 通过根据下文所述假设使用来自表E13的分选后预测数据代入倍数扩增的扩增倍数的正态分布，运行分选/选择的细胞的扩增后用于治疗剂量的可能的总细胞的蒙特卡罗模拟。针对250,000名患者刺激反复计算结果，然后计算总细胞数量的分布，如下表E14中所示。

表E14：对于实施方案 (3)，可能的扩增后总细胞的蒙特卡罗模拟

		分选和扩增后的总细胞	
测试条件	**假设**	**统计学**	**预测值**
扩增倍数	平均值 =1500.00 标准差 =400.00 正态分布	平均值：3.75×10^9 中值：2.41×10^9	0% -761,064,618.77 10% 828,107,890.54 20% 1,186,909,754.04 30% 1,544,361,203.00 40% 1,941,230,593.39 50% 2,414,573,107.82 60% 3,018,115,043.27 70% 3,857,187,705.90 80% 5,157,994,271.81 90% 7,824,998,288.06 100% 935,380,498,046.68

[0790] 第四最终群体含有大于5亿个在自体肿瘤的存在下产生细胞因子的总T细胞，其中使用该方法制造的大于97.1%的细胞产物生成大于5亿个个细胞用于治疗剂量。

[0791] 本发明在范围上并不旨在限于具体公开的实施方案，提供所述具体公开的实施方案例如是为了说明本发明的各个方面。根据本文的描述和传授，对所述组合物和方法的各种修改将变得清楚。可以在不背离本公开文本的真实范围和精神的情况下实践这样的变化，并且所述变化意图落入本公开文本的范围内。

IX.序列

SEQ ID	序列	注释
1	RAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLAWSAHPLVGHMDLREEGDEE TTNDVPHIQCGDGCDPQGLRDNSQFCLQRIHQGLIFYEKLLGSDIFT GEPSLLPDSPVGQLHASLLGLSQLLQPEGHHWETQQIPSLSPSQPW QRLLLRFKILRSLQAFVAVAARVFAHGAATLSP	P19，UniProt Q9NPF7 20-189
2	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSE VLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIW STDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKS SRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAE ESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSR QVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTS ATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	P40，UniProt P29460 23-328
3	YSHWPSCCPSKGQDTSEELLRWSTVPVPPLEPARPNRHPESCRASE DGPLNSRAISPWRYELDRDLNRLPQDLYHARCLCPHCVSLQTGSH MDPRGNSELLYHNQTVFYRRPCHGEKGTHKGYCLERRLYRVSLA CVCVRPRVMG	IL-25，UniProt Q9H293 33-177
4	FPRPPGRPQL SLQELRREFT VSLHLARKLL SEVRGQAHRF AESHLPGVNL YLLPLGEQLP DVSLTFQAWR RLSDPERLCF ISTTLQPFHA LLGGLGTQGR WTNMERMQLW AMRLDLRDLQ RHLRFQVLAA GFNLPEEEEE EEEEEEEERK GLLPGALGSA LQGPAQVSWP QLLSTYRLLH SLELVLSRAV RELLLLSKAG HSVWPLGFPT LSPQP	P28（IL27A）
5	RKGPP AALTLPRVQC RASRYPIAVD CSWTLPPAPN STSPVSFIAT YRLGMAARGH SWPCLQQTPT STSCTITDVQ LFSMAPYVLN VTAVHPWGSS SSFVPFITEH IIKPDPPEGV RLSPLAERQL QVQWEPPGSW PFPEIFSLKY WIRYKRQGAA RFHRVGPIEA TSFILRAVRP RARYYVQVAA QDLTDYGELS DWSLPATATM SLGK	EB13（IL27B）
6	RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN	P35（IL-12α）
	AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNAS	
7	QVTDINSKGLELRKTVTTVETQNLEGLHHDGQFCHKPCPPGERKA RDCTVNGDEPDCVPCQEGKEYTDKAHFSSKCRRCRLCDEGHGLEV EINCTRTQNTKCRCKPNFFCNSTVCEHCDPCTKCEHGIIKECTLTSN TKCKEEGSRSN	CD95（AA 26-173）

序列表

<110> 迈斯特治疗公司

<120> 肿瘤反应性T细胞的离体富集和扩增的方法及其相关组合物

<130> 16517-20008.40

<140> 尚未分配

<141> 同时随同提交

<150> 62/982,704

<151> 2020-02-27

<160> 7

<170> 用于Windows的FastSEQ 4.0版

<210> 1

<211> 170

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> UniProt Q9NPF7 20-189

<400> 1

```
Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln Cys Gln Gln
1               5                  10                  15
Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His Pro Leu Val
            20                  25                  30
Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr Thr Asn Asp
        35                  40                  45
Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln Gly Leu Arg
    50                  55                  60
Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly Leu Ile Phe
65                  70                  75                  80
Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu Pro Ser Leu
                85                  90                  95
Leu Pro Asp Ser Pro Val Gly Gln Leu His Ala Ser Leu Leu Gly Leu
            100                 105                 110
Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr Gln Gln Ile
        115                 120                 125
Pro Ser Leu Ser Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu Leu Arg Phe
    130                 135                 140
Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala Ala Arg Val
145                 150                 155                 160
Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Ser Pro
```

165 170

<210> 2
<211> 306
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> UniProt P29460 23-328
<400> 2

Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr
1 5 10 15
Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu
20 25 30
Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln Ser Ser Glu Val Leu Gly
35 40 45
Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly
50 55 60
Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu
65 70 75 80
Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys
85 90 95
Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys
100 105 110
Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr
115 120 125
Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg Gly Ser Ser Asp Pro Gln
130 135 140
Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Arg Gly
145 150 155 160
Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala
165 170 175
Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile Glu Val Met Val Asp Ala
180 185 190
Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr Ser Ser Phe Phe Ile Arg
195 200 205
Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu
210 215 220
Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Thr Trp
225 230 235 240
Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln

245 250 255
Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr
260 265 270
Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala
275 280 285
Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro
290 295 300
Cys Ser
305

<210> 3
<211> 145
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> UniProt Q9H293 33-177
<400> 3
Tyr Ser His Trp Pro Ser Cys Cys Pro Ser Lys Gly Gln Asp Thr Ser
1 5 10 15
Glu Glu Leu Leu Arg Trp Ser Thr Val Pro Val Pro Pro Leu Glu Pro
20 25 30
Ala Arg Pro Asn Arg His Pro Glu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp Gly
35 40 45
Pro Leu Asn Ser Arg Ala Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Glu Leu Asp Arg
50 55 60
Asp Leu Asn Arg Leu Pro Gln Asp Leu Tyr His Ala Arg Cys Leu Cys
65 70 75 80
Pro His Cys Val Ser Leu Gln Thr Gly Ser His Met Asp Pro Arg Gly
85 90 95
Asn Ser Glu Leu Leu Tyr His Asn Gln Thr Val Phe Tyr Arg Arg Pro
100 105 110
Cys His Gly Glu Lys Gly Thr His Lys Gly Tyr Cys Leu Glu Arg Arg
115 120 125
Leu Tyr Arg Val Ser Leu Ala Cys Val Cys Val Arg Pro Arg Val Met
130 135 140
Gly
145

<210> 4
<211> 215
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> P28 (IL27A)
<400> 4

Phe Pro Arg Pro Pro Gly Arg Pro Gln Leu Ser Leu Gln Glu Leu Arg
1 5 10 15
Arg Glu Phe Thr Val Ser Leu His Leu Ala Arg Lys Leu Leu Ser Glu
20 25 30
Val Arg Gly Gln Ala His Arg Phe Ala Glu Ser His Leu Pro Gly Val
35 40 45
Asn Leu Tyr Leu Leu Pro Leu Gly Glu Gln Leu Pro Asp Val Ser Leu
50 55 60
Thr Phe Gln Ala Trp Arg Arg Leu Ser Asp Pro Glu Arg Leu Cys Phe
65 70 75 80
Ile Ser Thr Thr Leu Gln Pro Phe His Ala Leu Leu Gly Gly Leu Gly
85 90 95
Thr Gln Gly Arg Trp Thr Asn Met Glu Arg Met Gln Leu Trp Ala Met
100 105 110
Arg Leu Asp Leu Arg Asp Leu Gln Arg His Leu Arg Phe Gln Val Leu
115 120 125
Ala Ala Gly Phe Asn Leu Pro Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
130 135 140
Glu Glu Glu Glu Arg Lys Gly Leu Leu Pro Gly Ala Leu Gly Ser Ala
145 150 155 160
Leu Gln Gly Pro Ala Gln Val Ser Trp Pro Gln Leu Leu Ser Thr Tyr
165 170 175
Arg Leu Leu His Ser Leu Glu Leu Val Leu Ser Arg Ala Val Arg Glu
180 185 190
Leu Leu Leu Leu Ser Lys Ala Gly His Ser Val Trp Pro Leu Gly Phe
195 200 205
Pro Thr Leu Ser Pro Gln Pro
210 215

<210> 5
<211> 209
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> EB13 (IL27B)
<400> 5

Arg Lys Gly Pro Pro Ala Ala Leu Thr Leu Pro Arg Val Gln Cys Arg
1 5 10 15
Ala Ser Arg Tyr Pro Ile Ala Val Asp Cys Ser Trp Thr Leu Pro Pro
20 25 30
Ala Pro Asn Ser Thr Ser Pro Val Ser Phe Ile Ala Thr Tyr Arg Leu
35 40 45
Gly Met Ala Ala Arg Gly His Ser Trp Pro Cys Leu Gln Gln Thr Pro
50 55 60
Thr Ser Thr Ser Cys Thr Ile Thr Asp Val Gln Leu Phe Ser Met Ala
65 70 75 80
Pro Tyr Val Leu Asn Val Thr Ala Val His Pro Trp Gly Ser Ser Ser
85 90 95
Ser Phe Val Pro Phe Ile Thr Glu His Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro
100 105 110
Glu Gly Val Arg Leu Ser Pro Leu Ala Glu Arg Gln Leu Gln Val Gln
115 120 125
Trp Glu Pro Pro Gly Ser Trp Pro Phe Pro Glu Ile Phe Ser Leu Lys
130 135 140
Tyr Trp Ile Arg Tyr Lys Arg Gln Gly Ala Ala Arg Phe His Arg Val
145 150 155 160
Gly Pro Ile Glu Ala Thr Ser Phe Ile Leu Arg Ala Val Arg Pro Arg
165 170 175
Ala Arg Tyr Tyr Val Gln Val Ala Ala Gln Asp Leu Thr Asp Tyr Gly
180 185 190
Glu Leu Ser Asp Trp Ser Leu Pro Ala Thr Ala Thr Met Ser Leu Gly
195 200 205
Lys

<210> 6
<211> 197
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> P35 (IL-12A)
<400> 6

Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu
1 5 10 15
His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys
20 25 30
Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp

35 40 45

His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu
50 55 60

Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr
65 70 75 80

Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe
85 90 95

Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr
100 105 110

Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys
115 120 125

Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu
130 135 140

Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser
145 150 155 160

Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu
165 170 175

Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser
180 185 190

Tyr Leu Asn Ala Ser
195

<210> 7

<211> 148

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD95 (AA 26-173)

<400> 7

Gln Val Thr Asp Ile Asn Ser Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val
1 5 10 15

Thr Thr Val Glu Thr Gln Asn Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln
20 25 30

Phe Cys His Lys Pro Cys Pro Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys
35 40 45

Thr Val Asn Gly Asp Glu Pro Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys
50 55 60

Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg
65 70 75 80

Leu Cys Asp Glu Gly His Gly Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg

85 90 95

Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser

100 105 110

Thr Val Cys Glu His Cys Asp Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly Ile

115 120 125

Ile Lys Glu Cys Thr Leu Thr Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly

130 135 140

Ser Arg Ser Asn

145

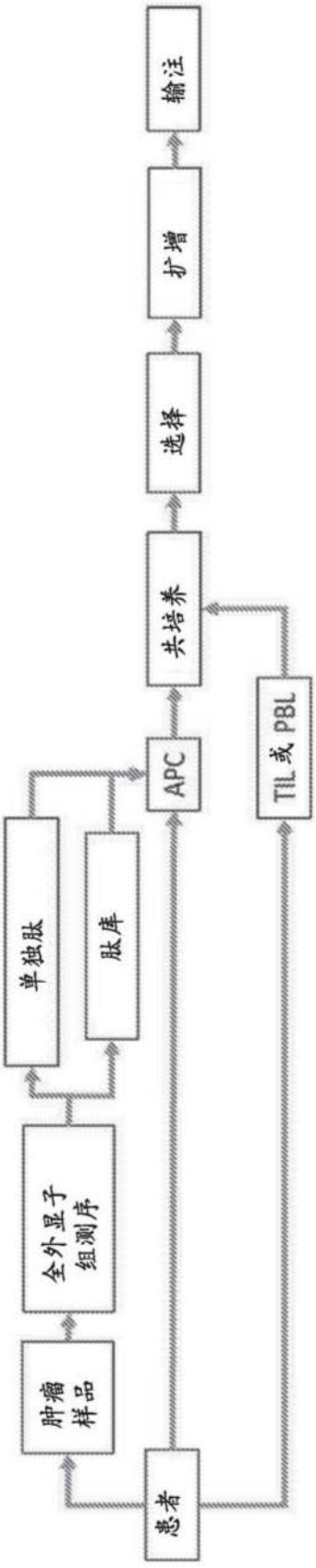


FIG.1A



FIG.1B

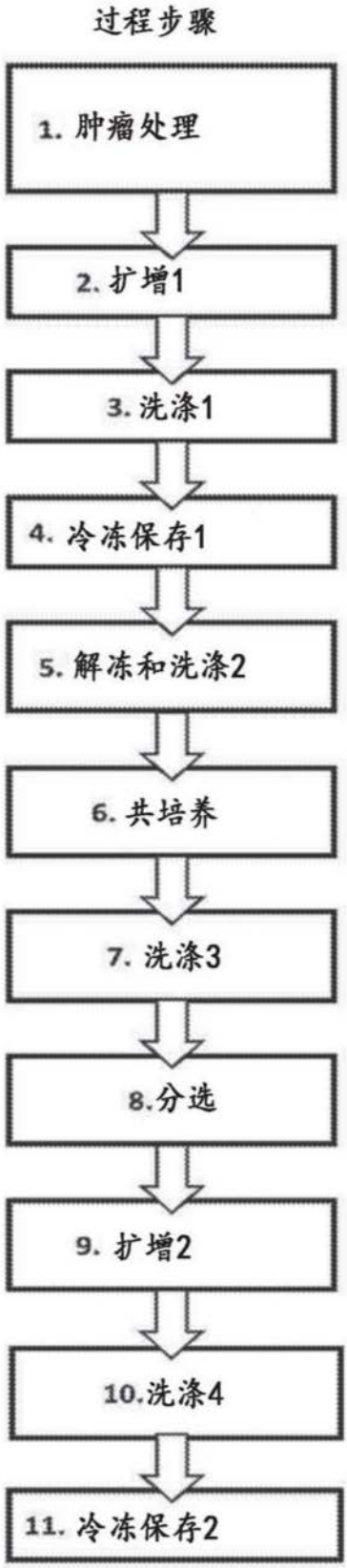

过程步骤
1. 肿瘤处理
2. 扩增1
3. 洗涤1
4. 冷冻保存1
5. 解冻和洗涤2
6. 共培养
7. 洗涤3
8.分选
9. 扩增2
10.洗涤4
11. 冷冻保存2

FIG.1C

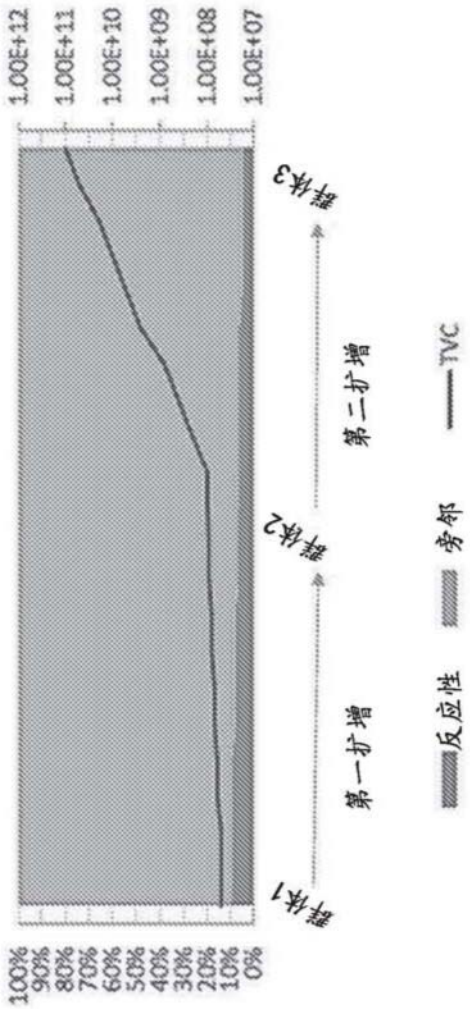

1.00E+12
1.00E+11
1.00E+10
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
群体1
群体2
群体3
第一扩增
第二扩增
反应性
旁邻
TVC

FIG.2A

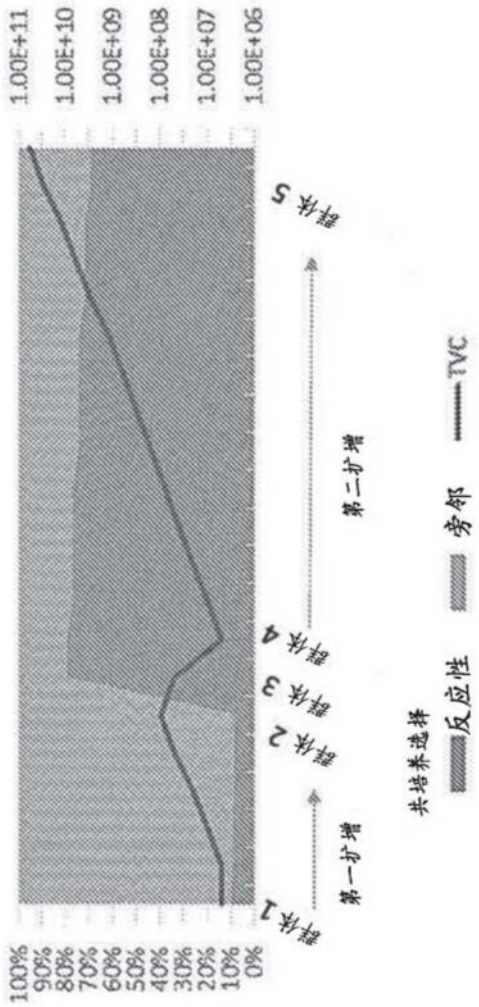

1.00E+11
1.00E+10
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
群体5
群体4
群体3
群体2
群体1
第二扩增
第一扩增
共培养选择
反应性
旁邻
TVC
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%

FIG.2B

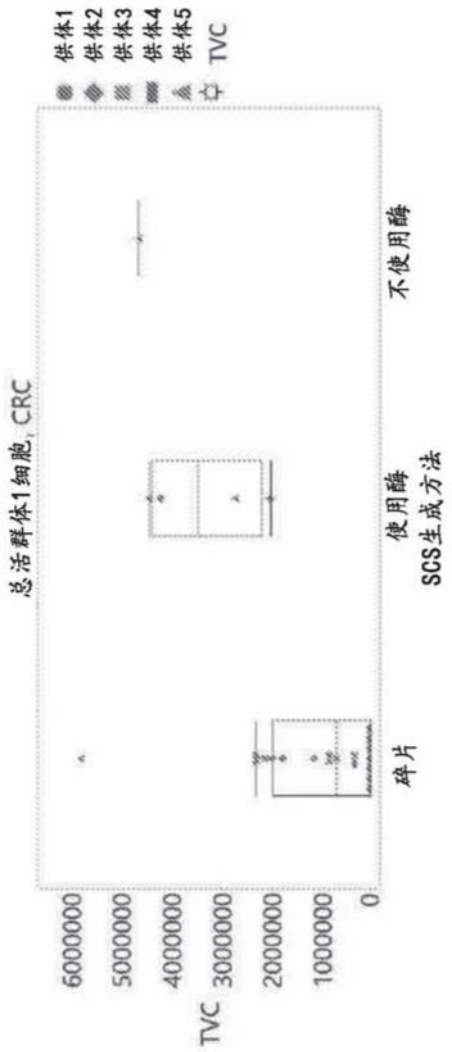

供体1
供体2
供体3
供体4
供体5
TVC
总活群体1细胞, CRC
TVC
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
碎片
使用酶
SCS生成方法
不使用酶

FIG.3A

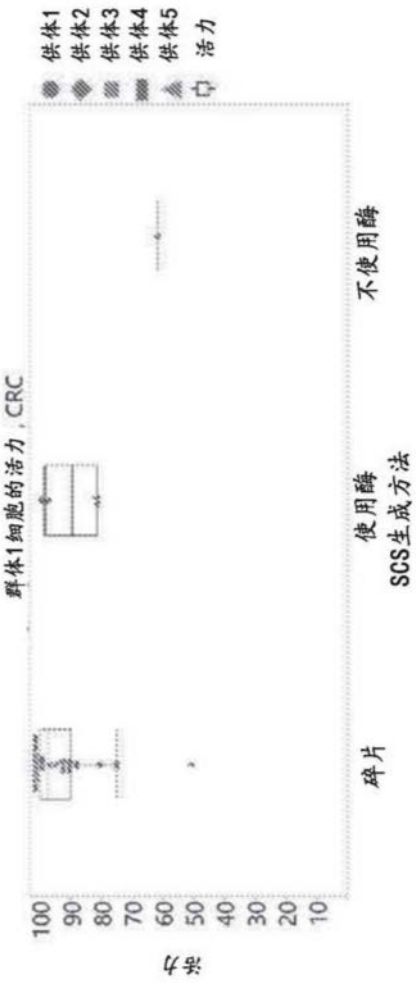

供体1
供体2
供体3
供体4
供体5
活力
群体1细胞的活力，CRC
不使用酶
使用酶
SCS生成方法
碎片
活力
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10

FIG.3B

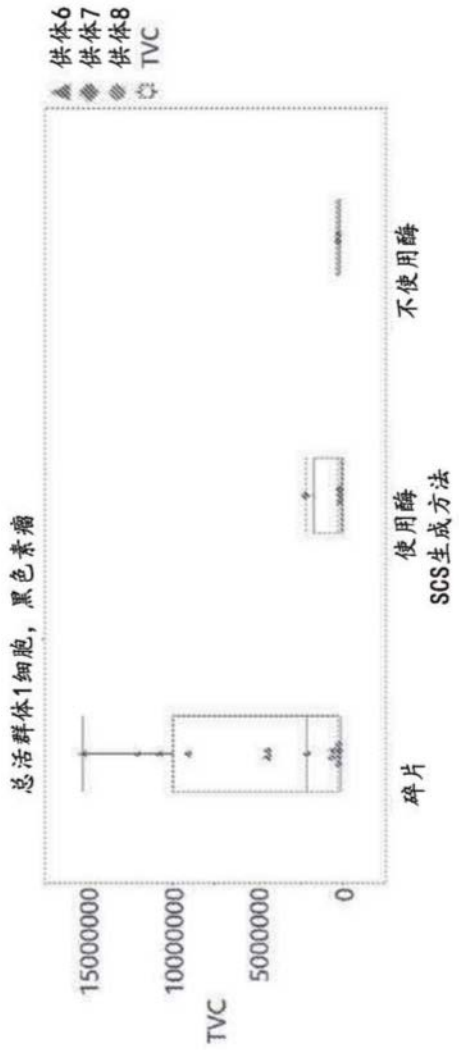

供体6
供体7
供体8
TVC
总活群体1细胞，黑色素瘤
15000000
10000000
5000000
0
TVC
碎片
使用酶
SCS生成方法
不使用酶

FIG.4A

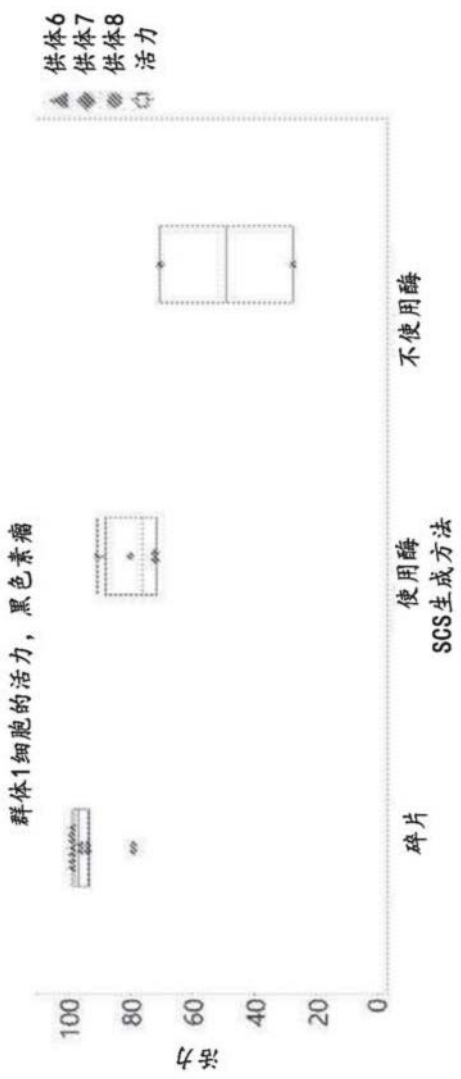

供体6
供体7
供体8
活力
群体1细胞的活力，黑色素瘤
100
80
60
40
20
0
碎片
使用酶
SCS生成方法
不使用酶

FIG.4B

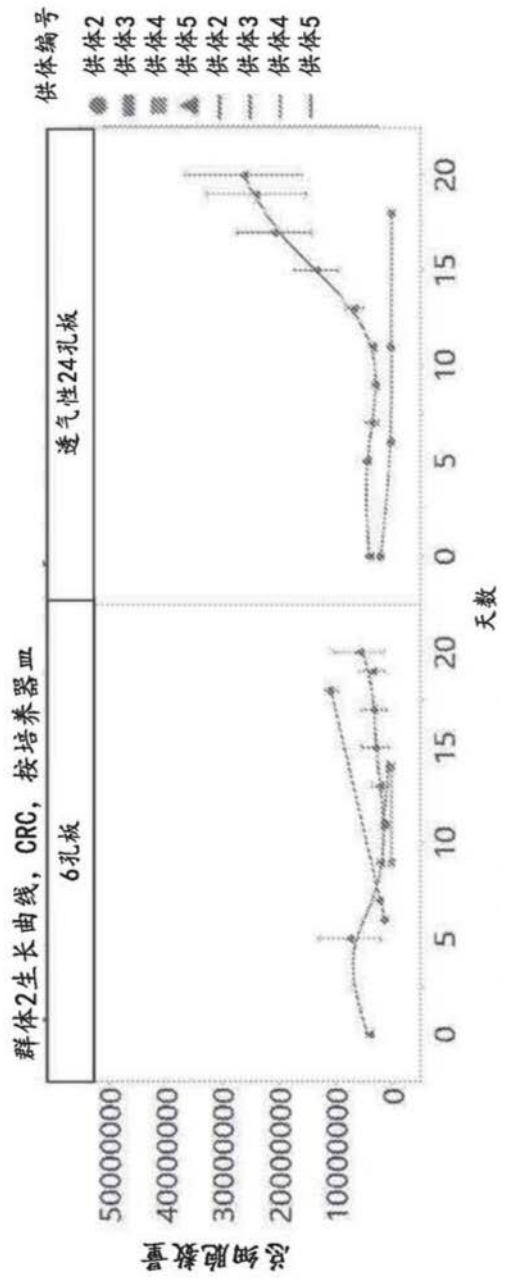

群体2生长曲线，CRC，按培养器皿
6孔板
透气性24孔板
供体编号
供体2
供体3
供体4
供体5
供体2
供体3
供体4
供体5
总细胞数量
50000000
40000000
30000000
20000000
10000000
0
0
5
10
15
20
0
5
10
15
20
天数

FIG.5A

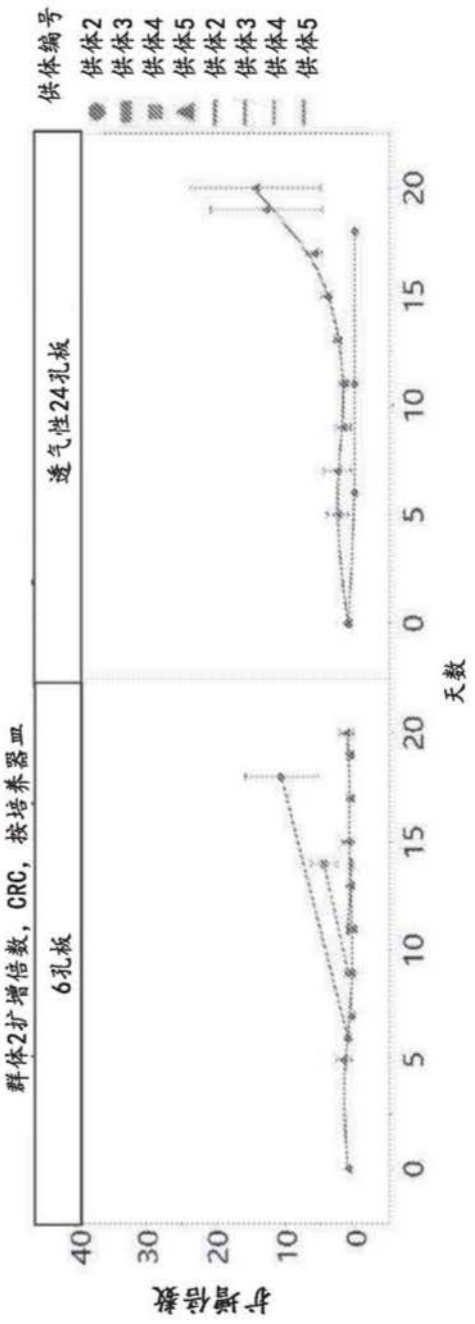

群体2扩增倍数，CRC，按培养器皿
6孔板
透气性24孔板
供体编号
供体2
供体3
供体4
供体5
供体2
供体3
供体4
供体5
扩增倍数
天数
0
10
20
30
40
0
5
10
15
20
0
5
10
15
20

FIG.5B

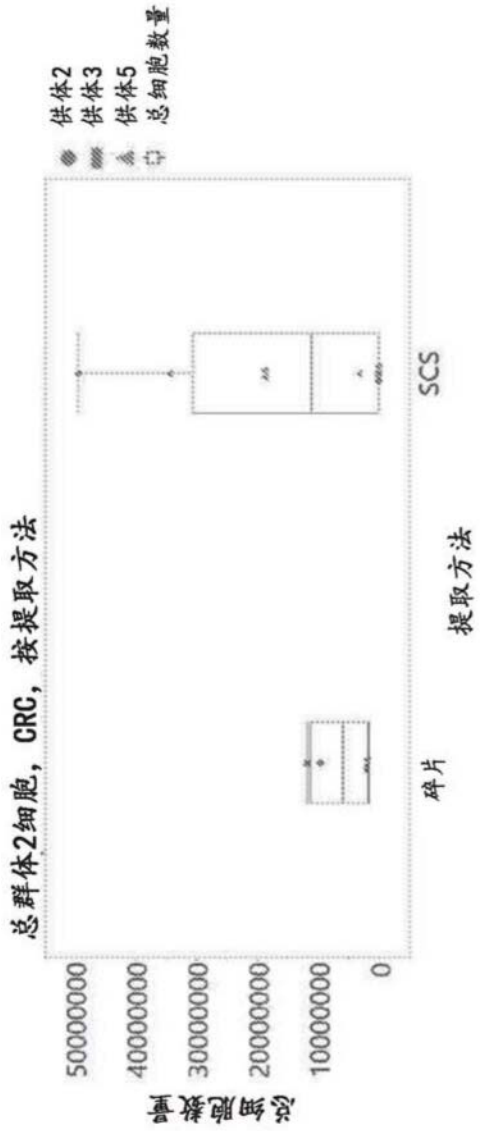

总群体2细胞，CRC，按提取方法
供体2
供体3
供体5
总细胞数量
50000000
40000000
30000000
20000000
10000000
0
总细胞数量
碎片
SCS
提取方法

FIG.5C

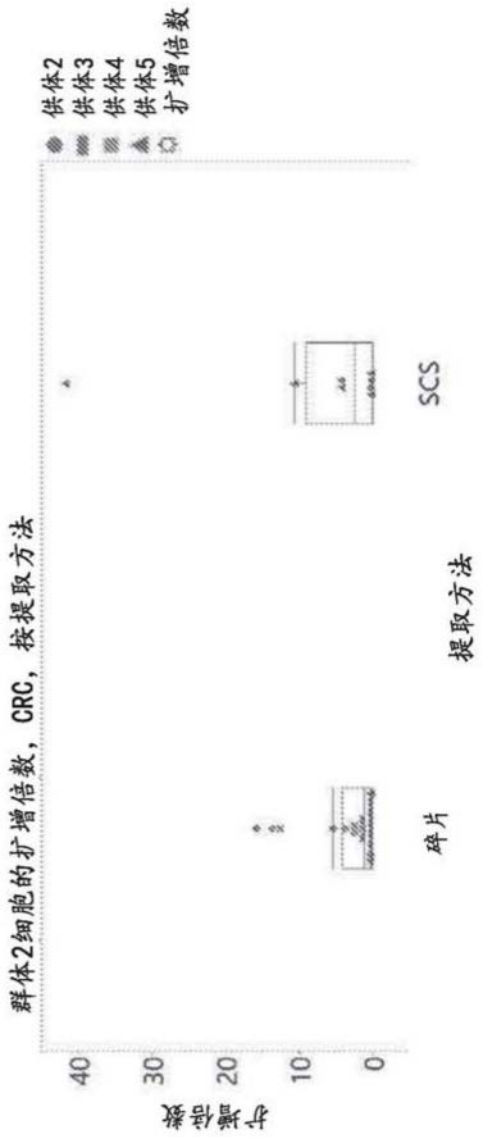

供体2
供体3
供体4
供体5
扩增倍数
群体2细胞的扩增倍数，CRC，按提取方法
40
30
20
10
0
扩增倍数
碎片
SCS
提取方法

FIG.5D

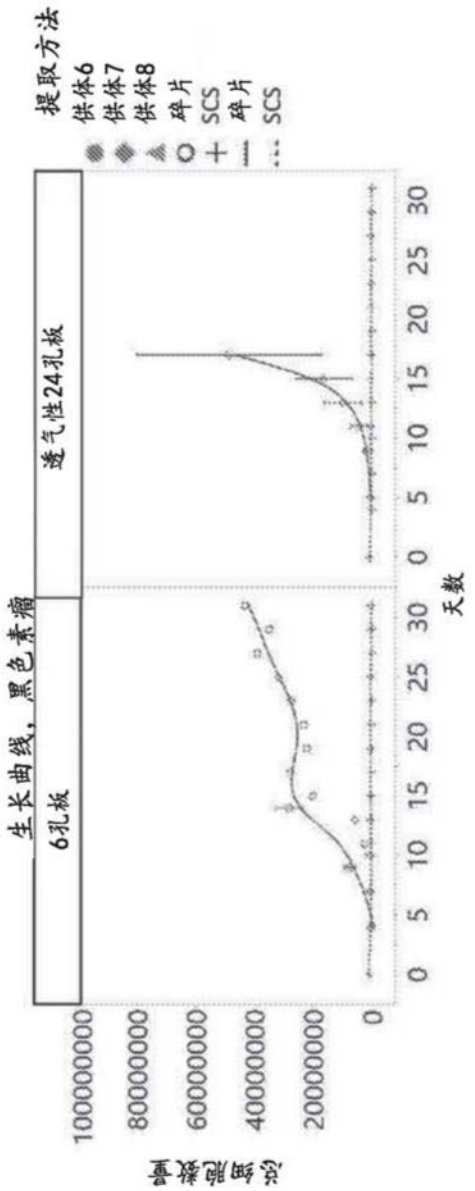

提取方法
供体6
供体7
供体8
碎片
SCS
碎片
SCS
生长曲线，黑色素瘤
6孔板
透气性24孔板
细胞数/孔
100000000
80000000
60000000
40000000
20000000
0
0 5 10 15 20 25 30
0 5 10 15 20 25 30
天数

FIG.6A

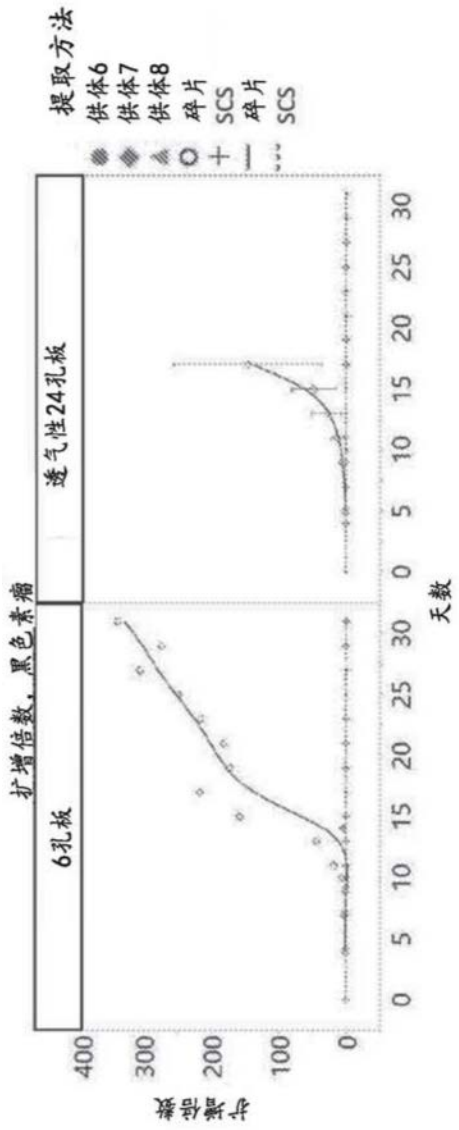

提取方法
供体6
供体7
供体8
碎片
SCS
碎片
SCS
扩增倍数，黑色素瘤
6孔板
透气性24孔板
400
300
200
100
0
0 5 10 15 20 25 30
0 5 10 15 20 25 30
天数

FIG.6B

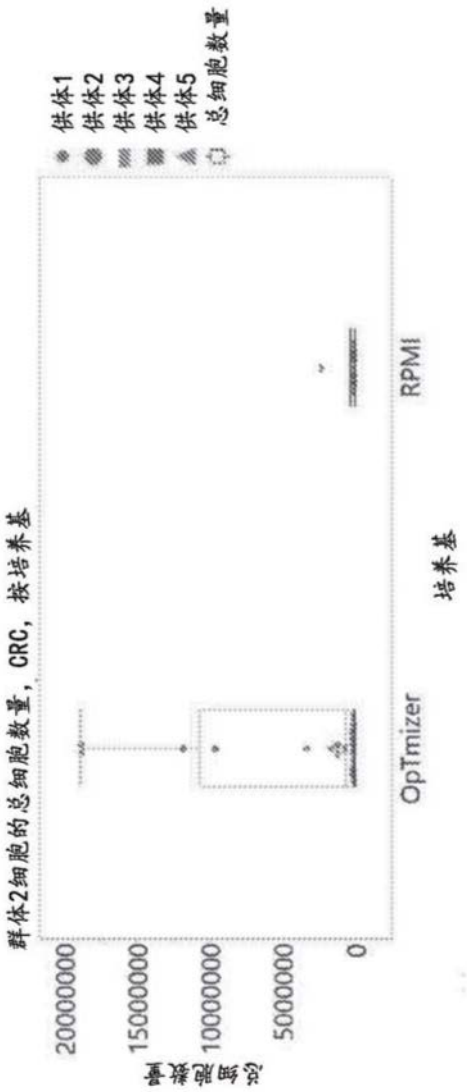

群体2细胞的总细胞数量，CRC，按培养基
供体1
供体2
供体3
供体4
供体5
总细胞数量
20000000
15000000
10000000
5000000
0
OpTmizer
RPMI
培养基

FIG.7A

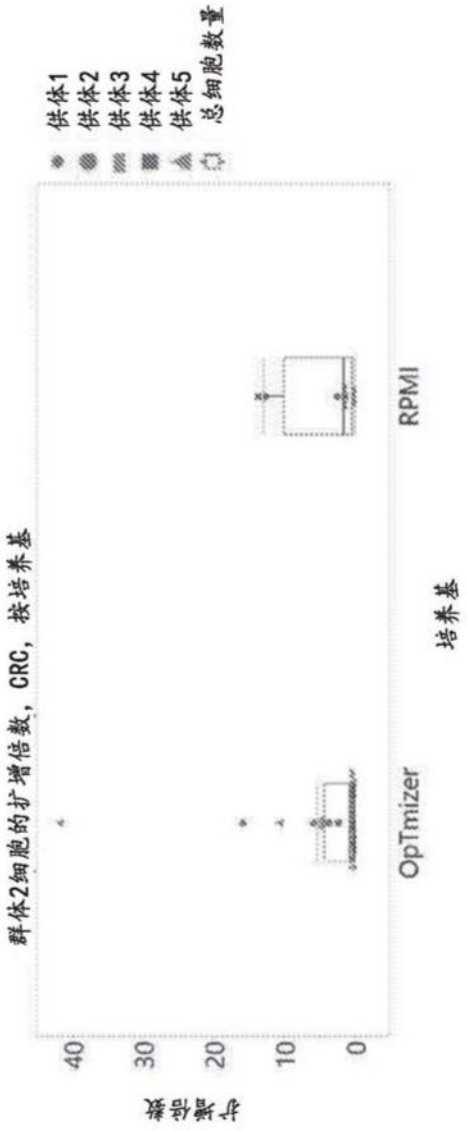

供体1
供体2
供体3
供体4
供体5
总细胞数量
群体2细胞的扩增倍数，CRC，按培养基
扩增倍数
40
30
20
10
0
OpTmizer
RPMI
培养基

FIG.7B

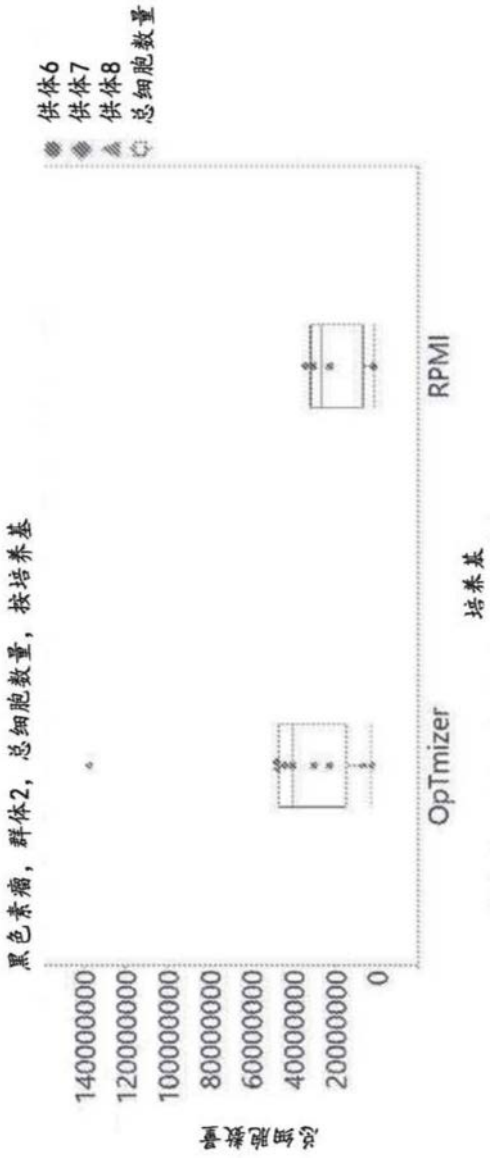

黑色素瘤，群体2，总细胞数量，按培养基
供体6
供体7
供体8
总细胞数量
140000000
120000000
100000000
80000000
60000000
40000000
20000000
0
总细胞数量
OpTmizer
RPMI
培养基

FIG.8A


供体6
供体7
供体8
总细胞数量
黑色素瘤，群体2，扩增倍数，按培养基
400
300
200
100
0
OpTmizer
RPMI
培养基

FIG.8B

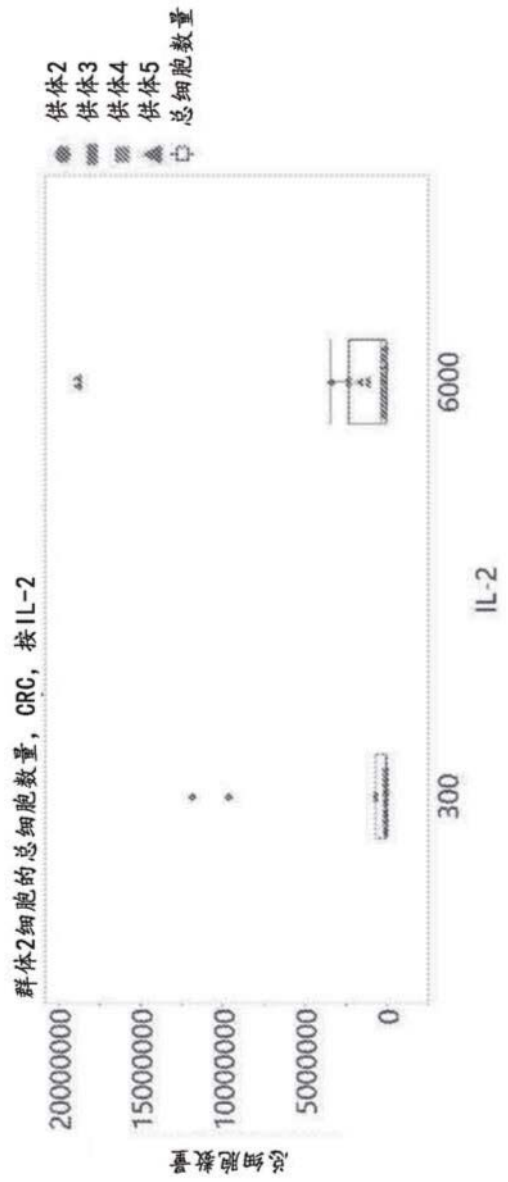

群体2细胞的总细胞数量，CRC，按IL-2
供体2
供体3
供体4
供体5
总细胞数量
20000000
15000000
10000000
5000000
0
总细胞数量
300
6000
IL-2

FIG.9A

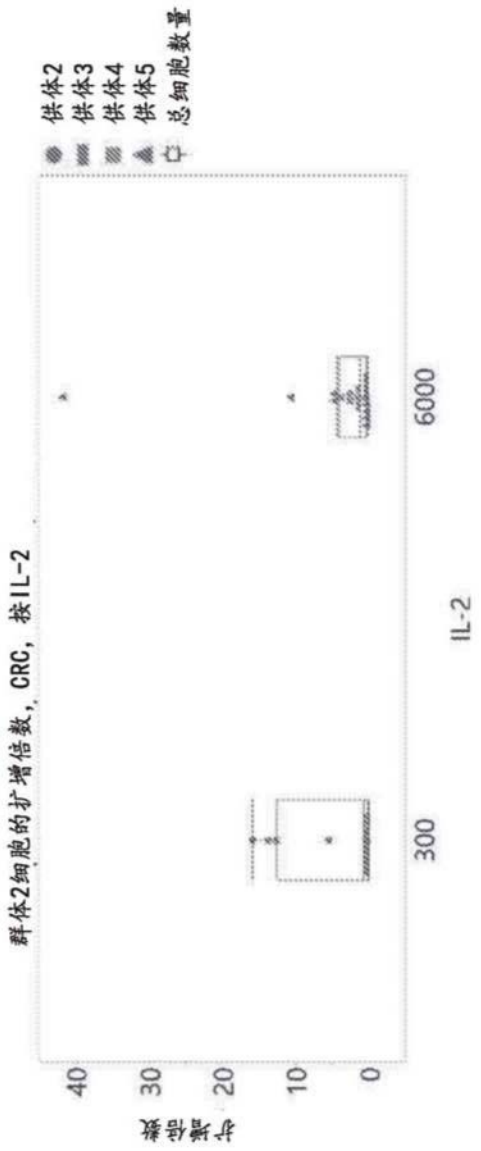

供体2
供体3
供体4
供体5
总细胞数量
群体2细胞的扩增倍数，CRC，按IL-2
扩增倍数
0
10
20
30
40
300
6000
IL-2

FIG.9B

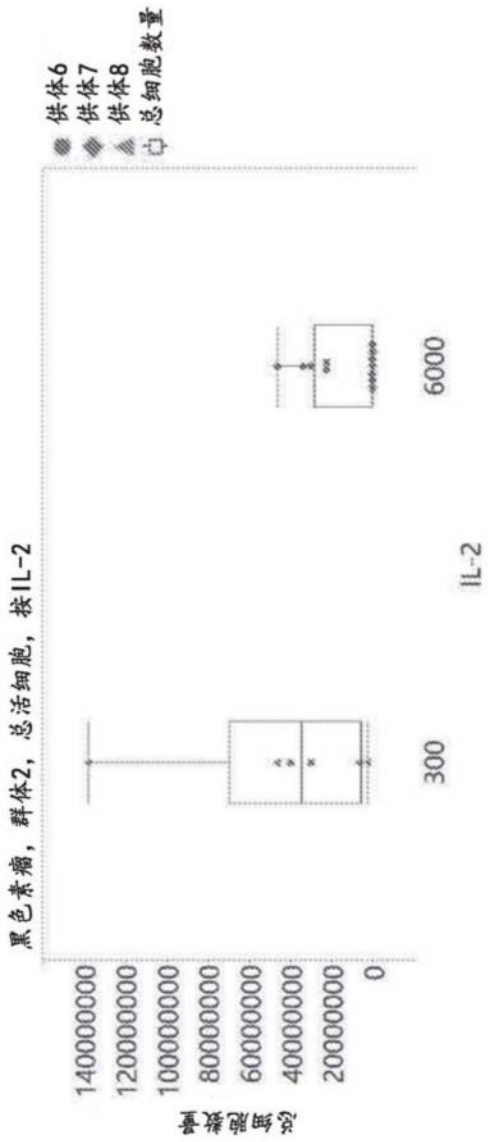

供体6
供体7
供体8
总细胞数量
黑色素瘤，群体2，总活细胞，按IL-2
总细胞数量
140000000
120000000
100000000
80000000
60000000
40000000
20000000
0
300
6000
IL-2

FIG.10A

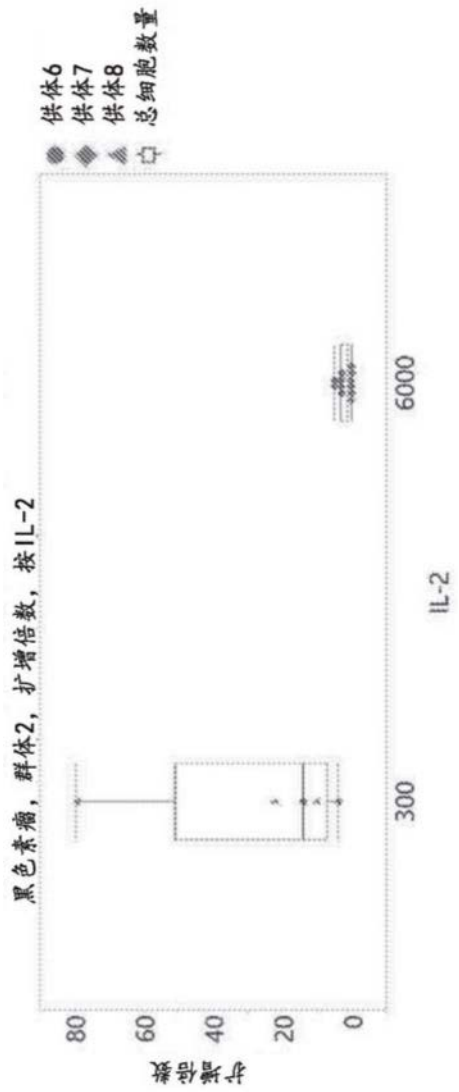

供体6
供体7
供体8
总细胞数量
黑色素瘤，群体2，扩增倍数，按IL-2
扩增倍数
0
20
40
60
80
300
6000
IL-2

FIG.10B

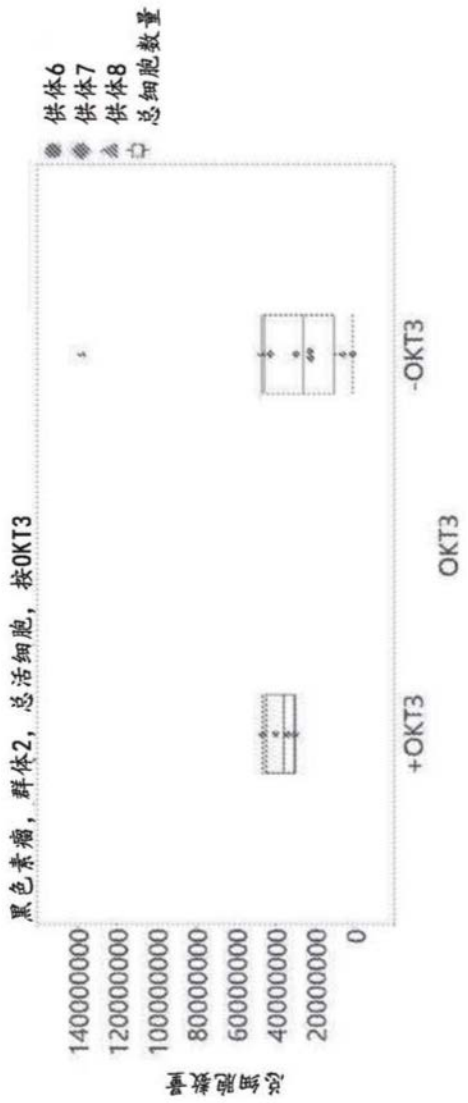

供体6
供体7
供体8
总细胞数量
黑色素瘤，群体2，总活细胞，按OKT3
总细胞数量
140000000
120000000
100000000
80000000
60000000
40000000
20000000
0
+OKT3
-OKT3
OKT3

FIG.11A

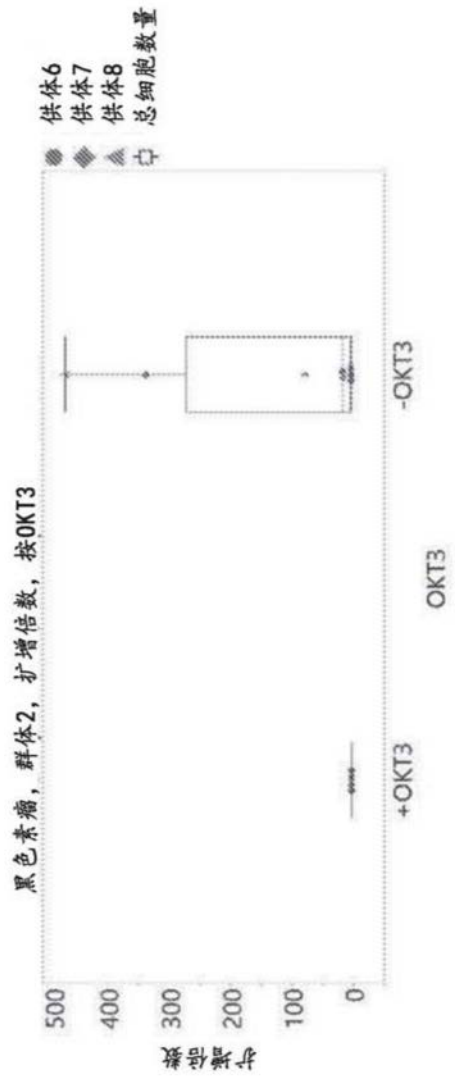

供体6
供体7
供体8
总细胞数量
黑色素瘤，群体2，扩增倍数，按OKT3
扩增倍数
500
400
300
200
100
0
-OKT3
+OKT3
OKT3

FIG.11B

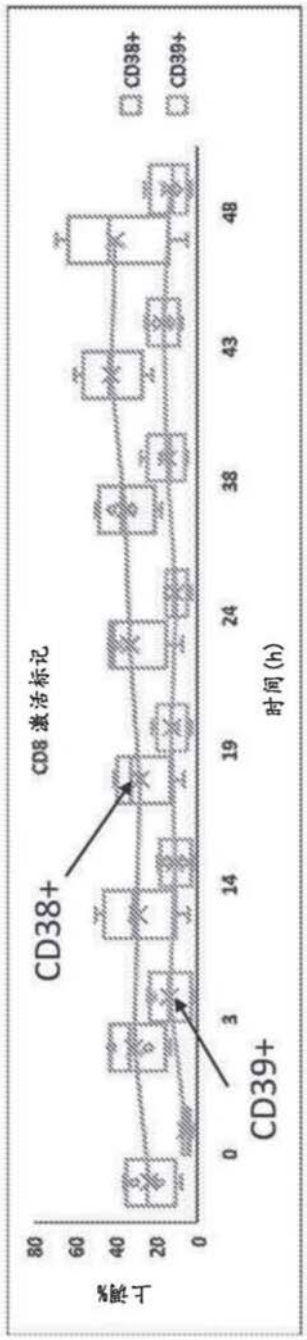

CD38+
CD39+
CD8 激活标记
CD38+
CD39+
时间(h)
0
3
14
19
24
38
43
48
上调%
80
60
40
20
0

FIG.12A

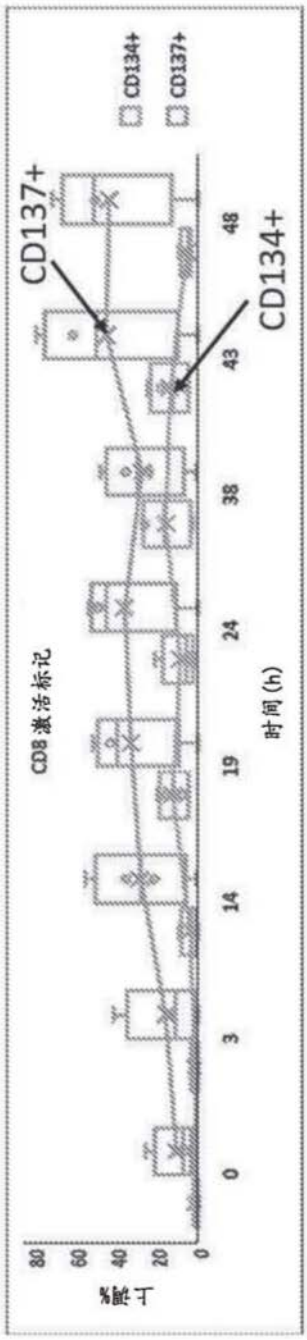

CD134+
CD137+
CD137+
CD134+
CD8激活标记
时间(h)
上调%
0
3
14
19
24
38
43
48
0
20
40
60
80

FIG.12B

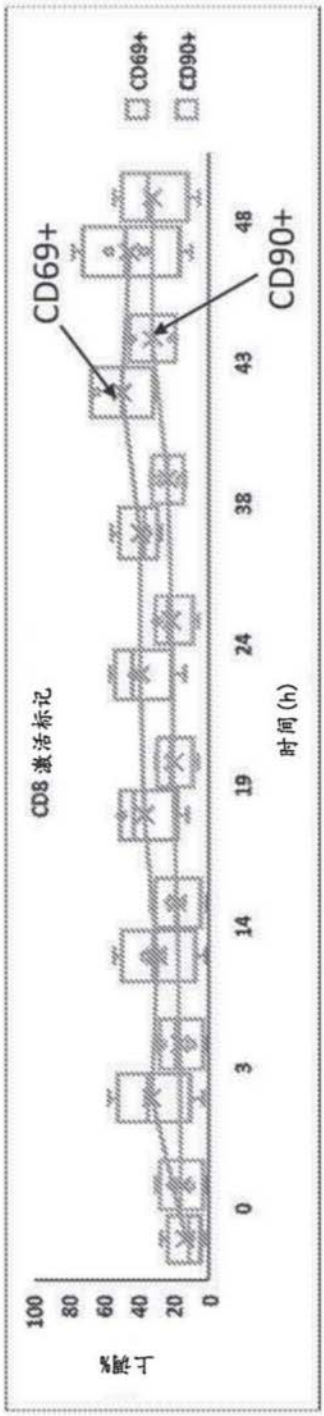

CD69+
CD90+
CD69+
CD90+
CD8 激活标记
时间 (h)
上调%
0
3
14
19
24
38
43
48
0
20
40
60
80
100

FIG.12C

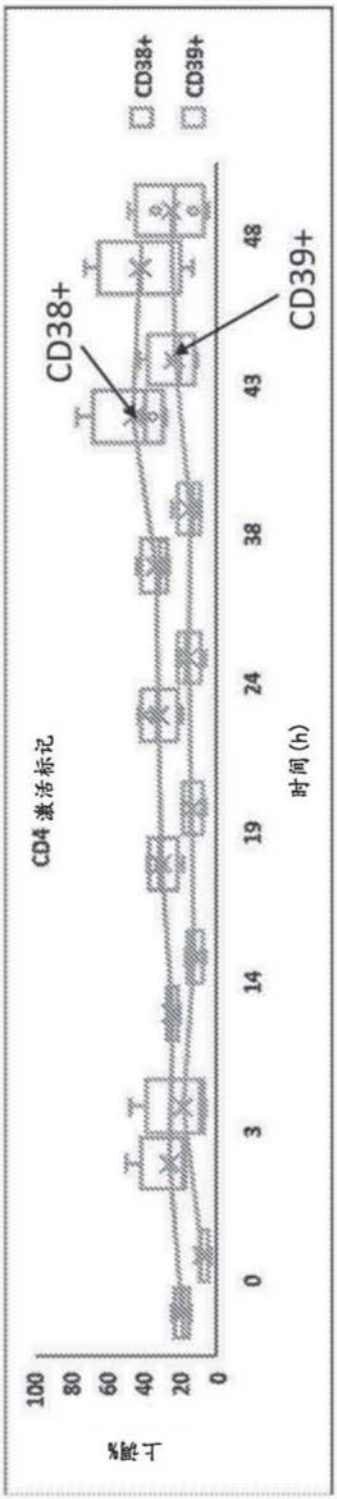

CD38+
CD39+
CD38+
CD39+
CD4 激活标记
时间(h)
上调%
0
3
14
19
24
38
43
48
0
20
40
60
80
100

FIG.13A

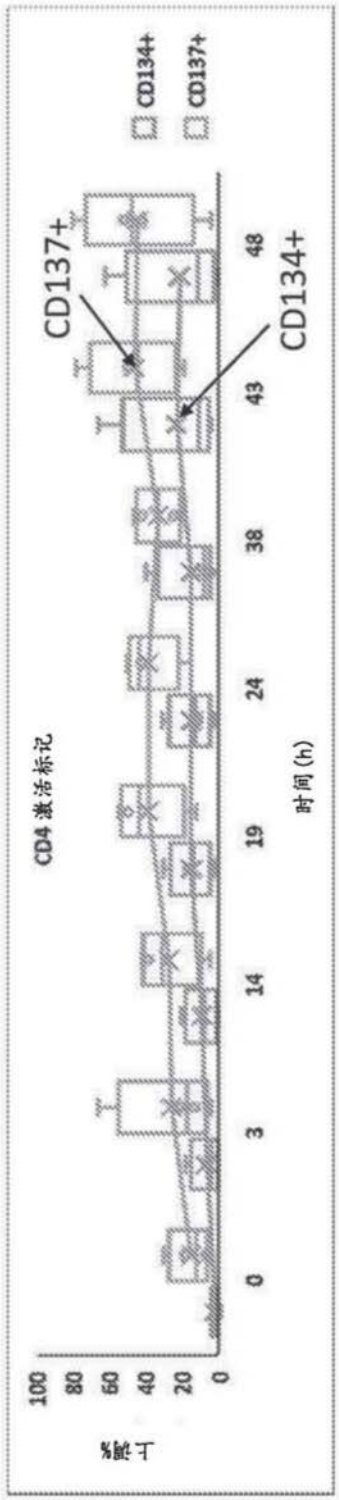

CD134+
CD137+
CD137+
CD134+
CD4 激活标记
上调%
100
80
60
40
20
0
0
3
14
19
24
38
43
48
时间 (h)

FIG.13B

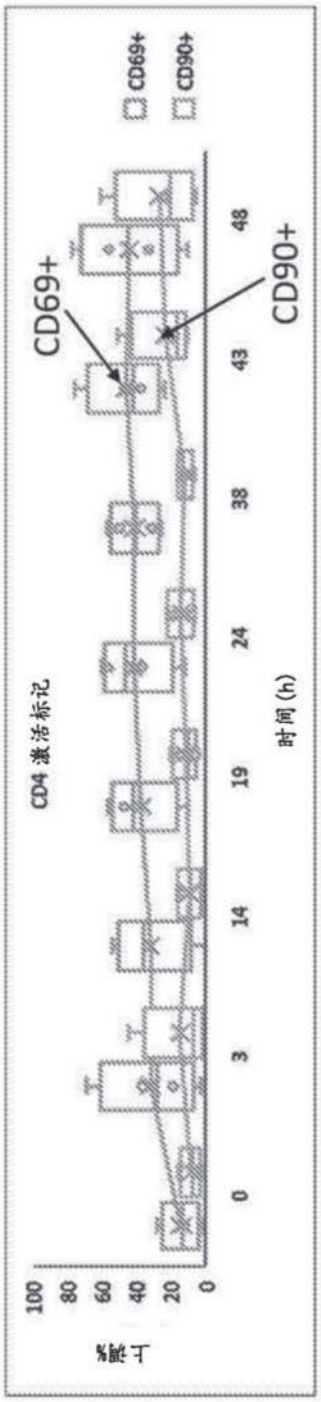

CD69+
CD90+
CD69+
CD90+
CD4 激活标记
时间(h)
上调%
100
80
60
40
20
0
0
3
14
19
24
38
43
48

FIG.13C

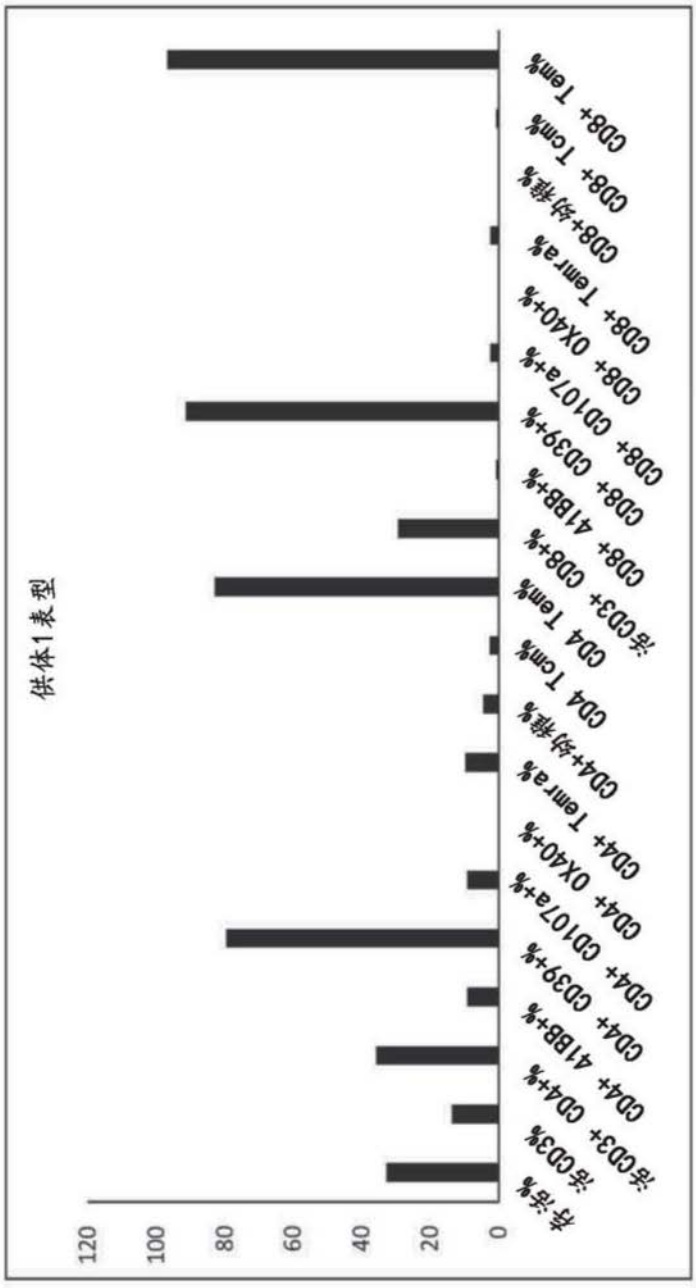

供体1表型
120
100
80
60
40
20
0
总活%
活CD3%
活CD3+ CD4+%
活CD3+ CD4+ 4IBB+%
活CD3+ CD4+ CD39+%
活CD3+ CD4+ CD107a+%
活CD3+ CD4+ 0X40+%
活CD3+ CD4+ Temra%
活CD3+ CD4+ 幼稚%
活CD3+ CD4+ Tcm%
活CD3+ CD4+ Tem%
活CD3+ CD8+%
活CD3+ CD8+ 4IBB+%
活CD3+ CD8+ CD39+%
活CD3+ CD8+ CD107a+%
活CD3+ CD8+ 0X40+%
活CD3+ CD8+ Temra%
活CD3+ CD8+ 幼稚%
活CD3+ CD8+ Tcm%
活CD3+ CD8+ Tem%

FIG.14

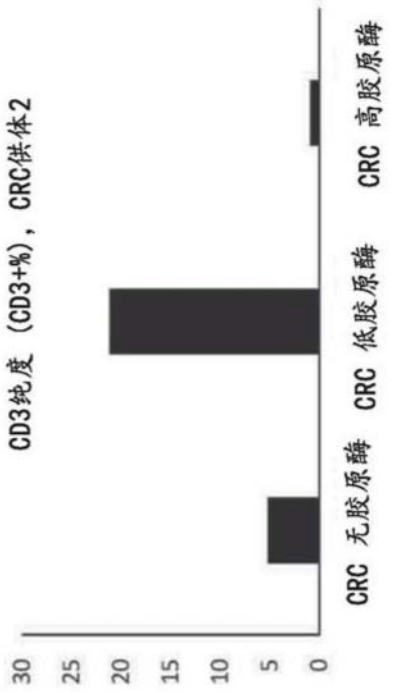


FIG.15A

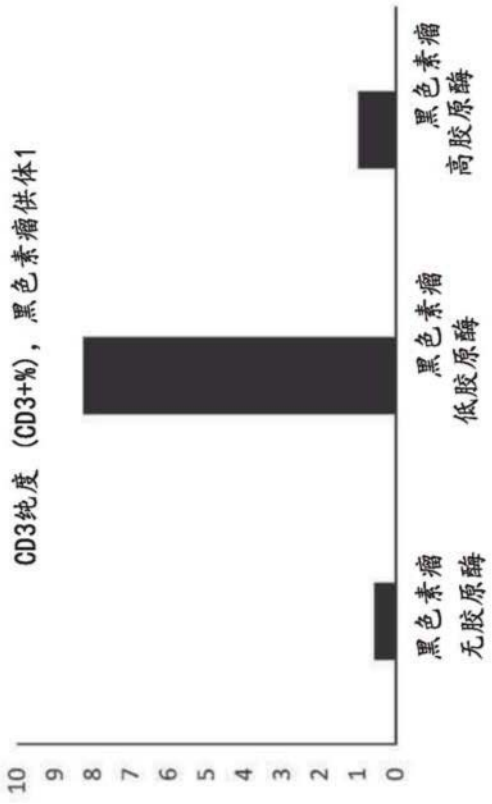


FIG.15B

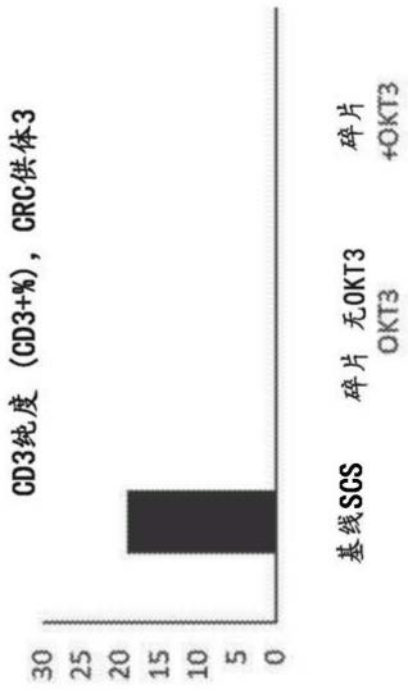


FIG.15C

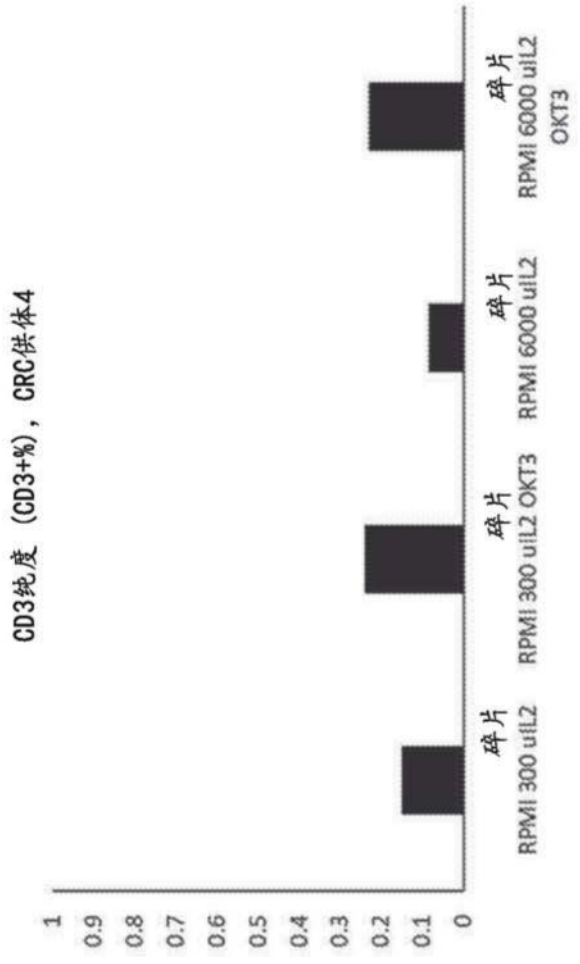

CD3纯度 (CD3+%), CRC供体4
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
碎片
RPMI 300 uiL2
碎片
RPMI 300 uiL2 OKT3
碎片
RPMI 6000 uiL2
碎片
RPMI 6000 uiL2
OKT3

FIG.15D

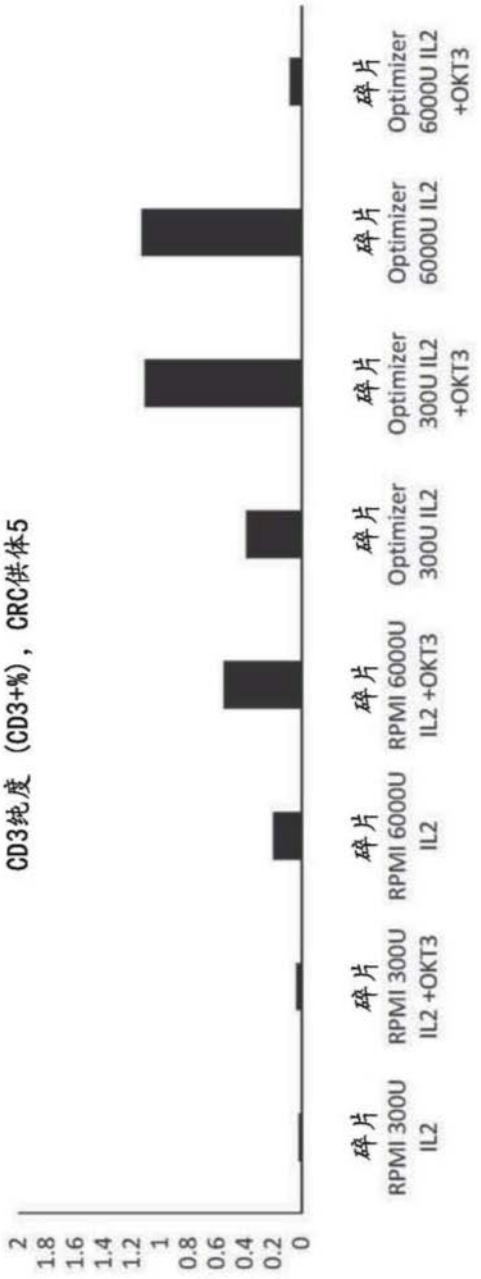

CD3纯度（CD3+%），CRC供体5
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
碎片 RPMI 300U IL2
碎片 RPMI 300U IL2 +OKT3
碎片 RPMI 6000U IL2
碎片 RPMI 6000U IL2 +OKT3
碎片 Optimizer 300U IL2
碎片 Optimizer 300U IL2 +OKT3
碎片 Optimizer 6000U IL2
碎片 Optimizer 6000U IL2 +OKT3

FIG.15E

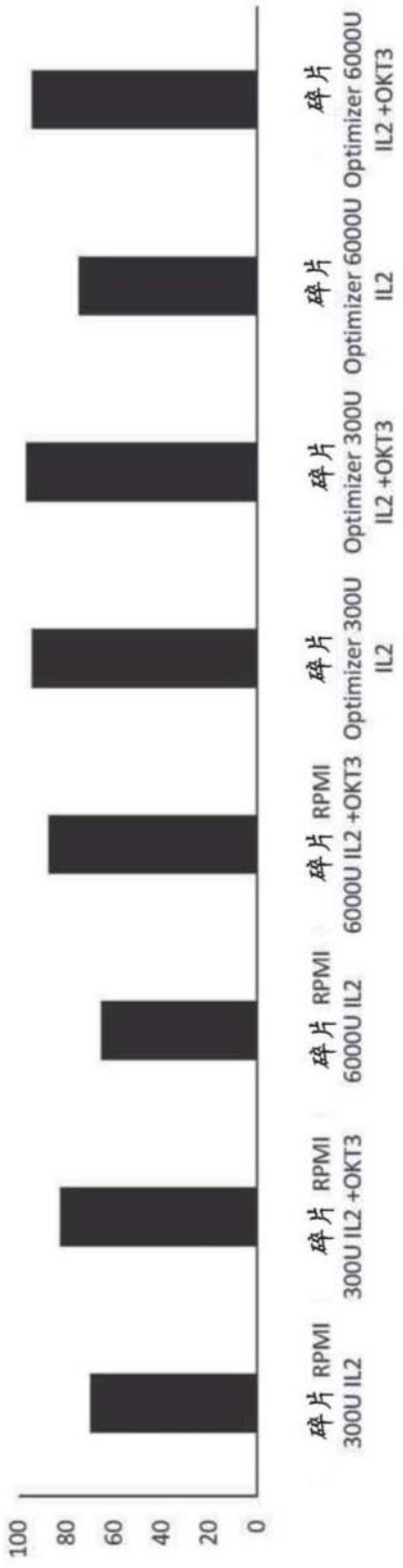

CD3纯度（CD3+%），黑色素瘤供体3
100
80
60
40
20
0
碎片 RPMI 300U IL2
碎片 RPMI 300U IL2 +OKT3
碎片 RPMI 6000U IL2
碎片 RPMI 6000U IL2 +OKT3
碎片 Optimizer 300U IL2
碎片 Optimizer 300U IL2 +OKT3
碎片 Optimizer 6000U IL2
碎片 Optimizer 6000U IL2 +OKT3

FIG.16

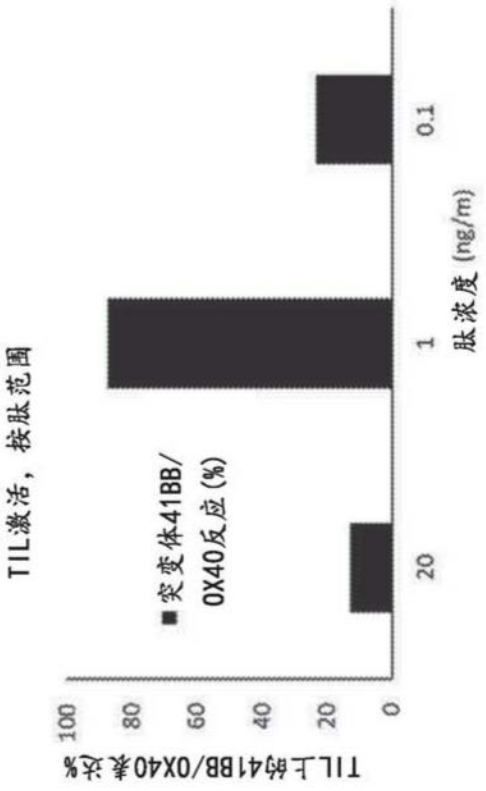


FIG.17A

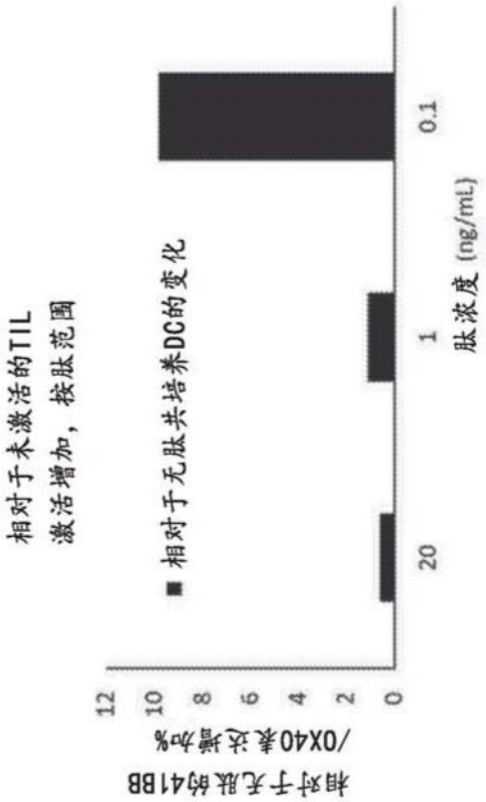


FIG.17B

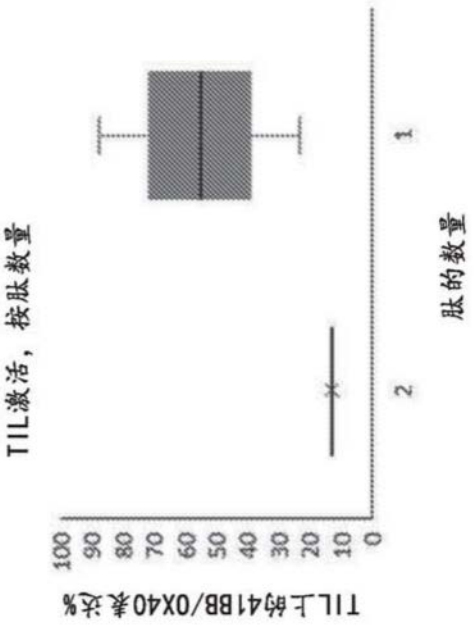


FIG.18A

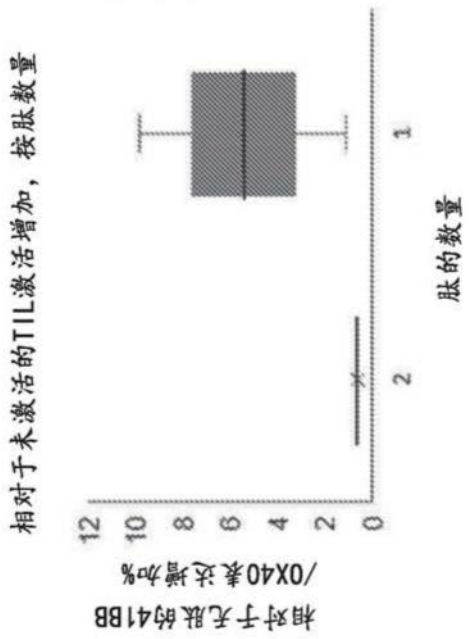


FIG.18B

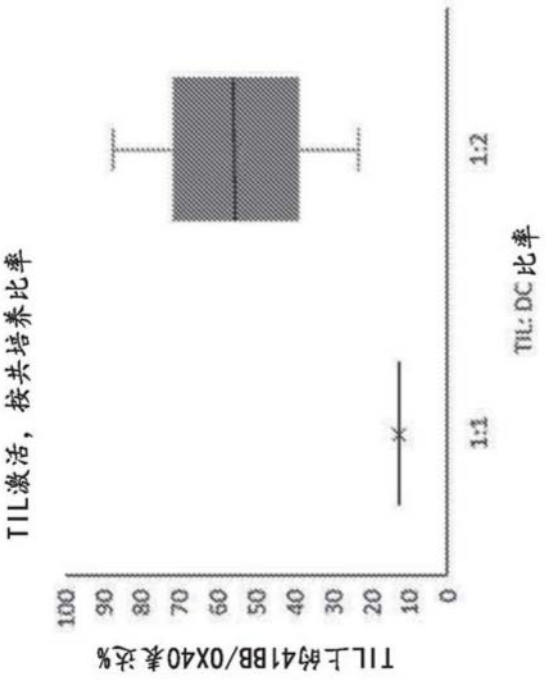


FIG.19A

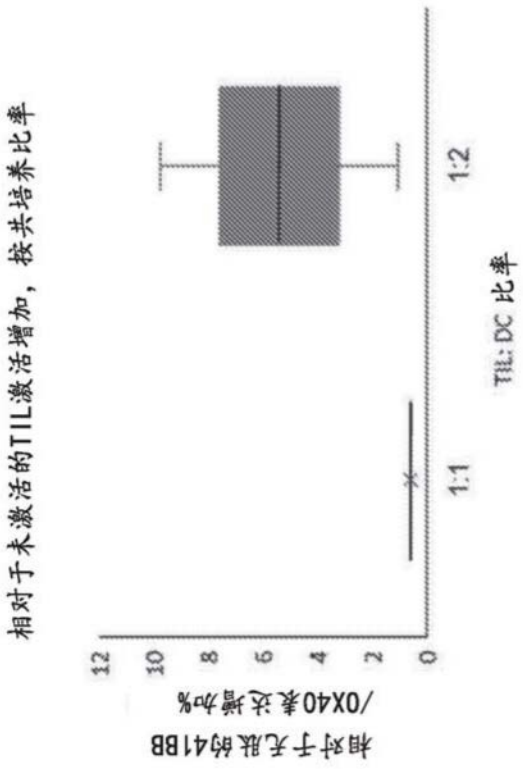


FIG.19B

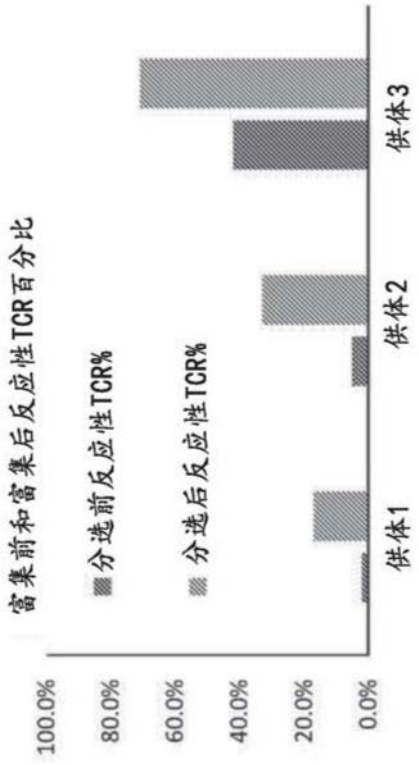


FIG.20A

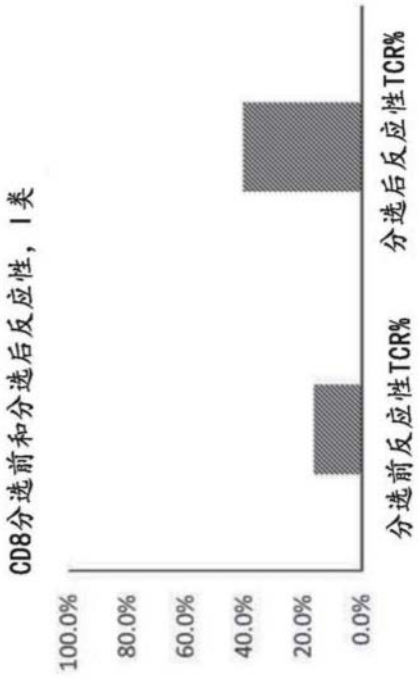


FIG.20B

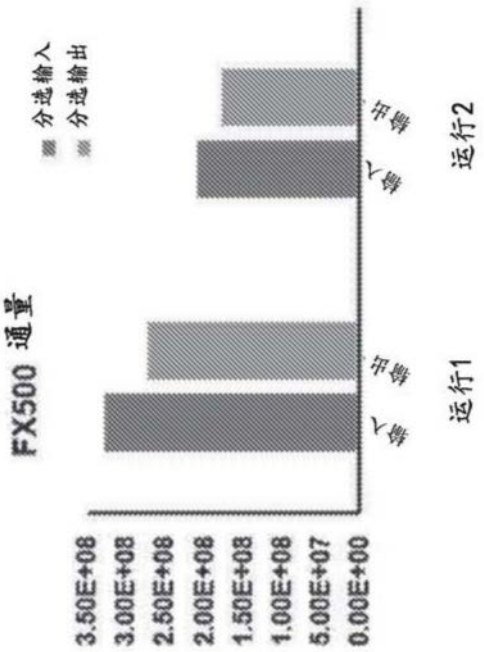


FIG.21A

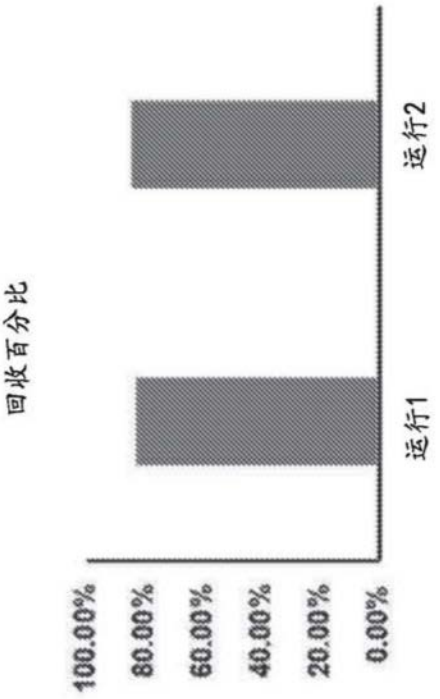


FIG.21B

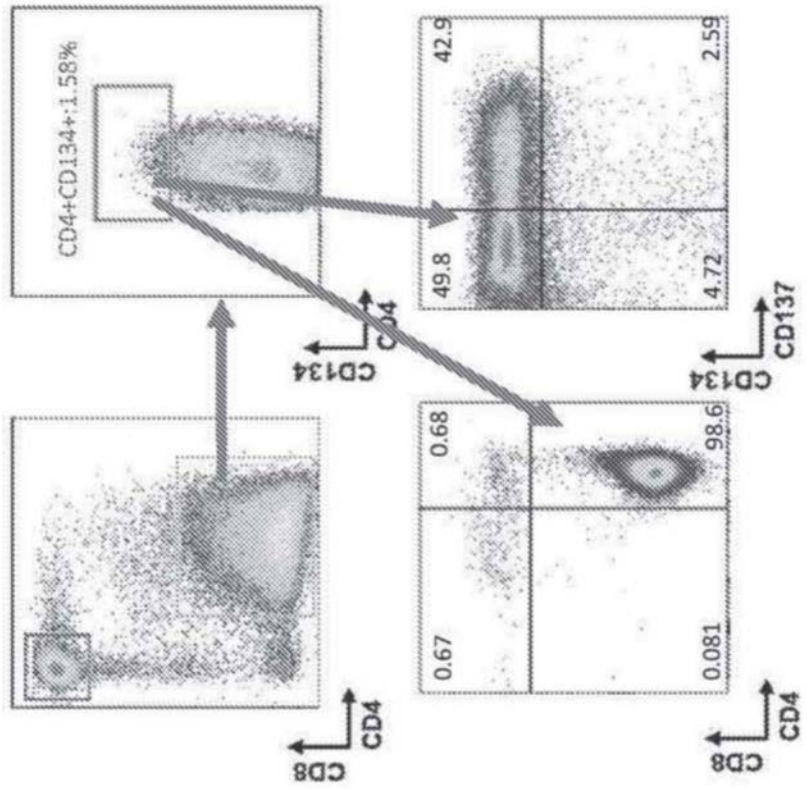

CD4+CD134+:1.58%
CD4
CD134
42.9
2.59
49.8
4.72
CD137
CD134
0.68
98.6
0.67
0.081
CD8
CD4
CD8
CD4

FIG.22

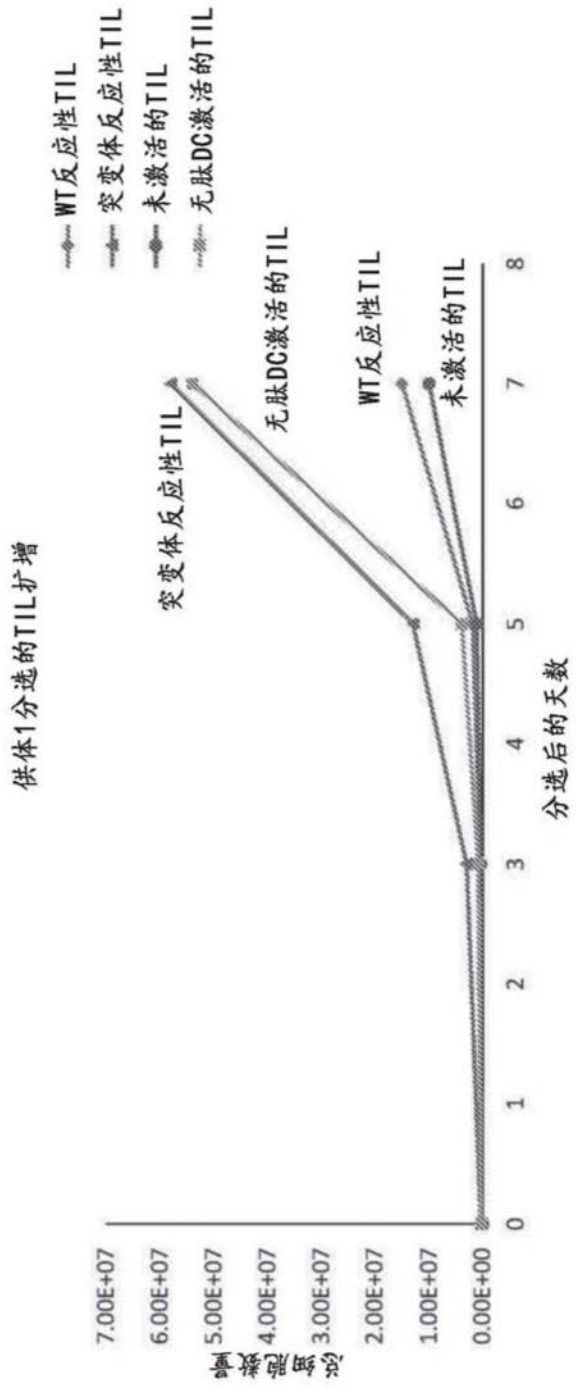

WT反应性TIL
突变体反应性TIL
未激活的TIL
无肽DC激活的TIL
供体1分选的TIL扩增
突变体反应性TIL
无肽DC激活的TIL
WT反应性TIL
未激活的TIL
分选后的天数
0
1
2
3
4
5
6
7
8
7.00E+07
6.00E+07
5.00E+07
4.00E+07
3.00E+07
2.00E+07
1.00E+07
0.00E+00

FIG.23A

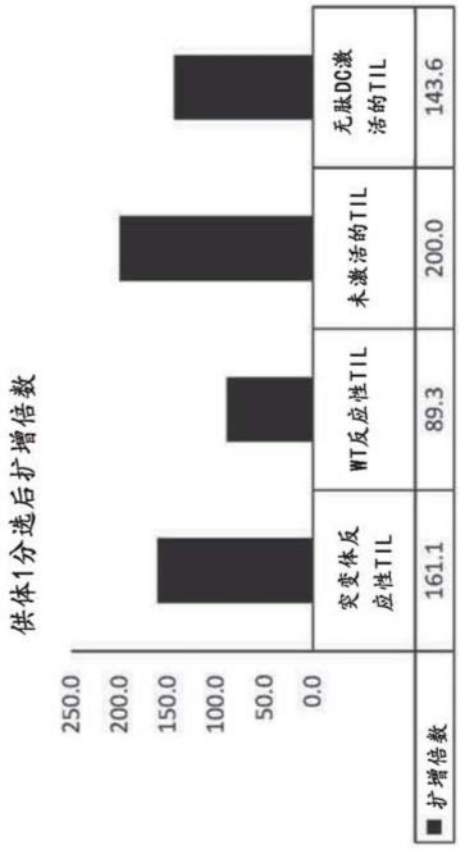

供体1分选后扩增倍数
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
突变体反应性TIL
WT反应性TIL
未激活的TIL
无肽DC激活的TIL
扩增倍数
161.1
89.3
200.0
143.6

FIG.23B

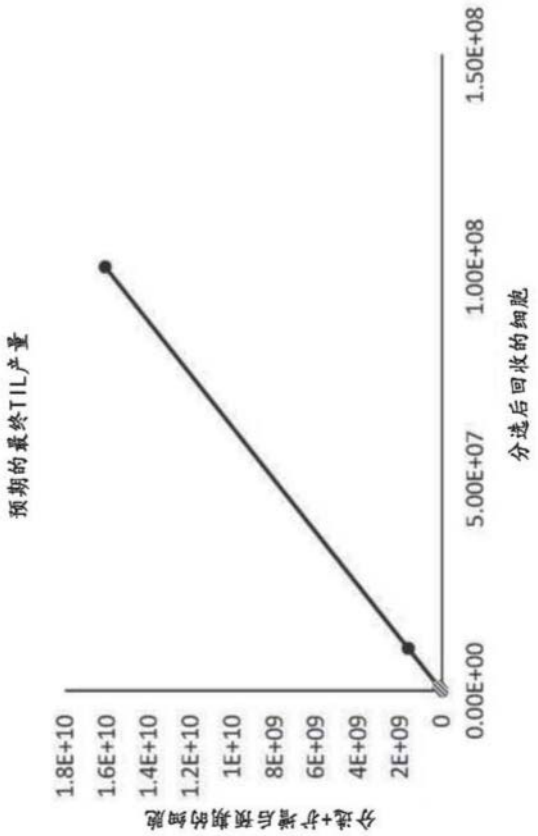

预期的最终TIL产量
分选+扩增后预期的细胞
1.8E+10
1.6E+10
1.4E+10
1.2E+10
1E+10
8E+09
6E+09
4E+09
2E+09
0
0.00E+00
5.00E+07
1.00E+08
1.50E+08
分选后回收的细胞

FIG.23C

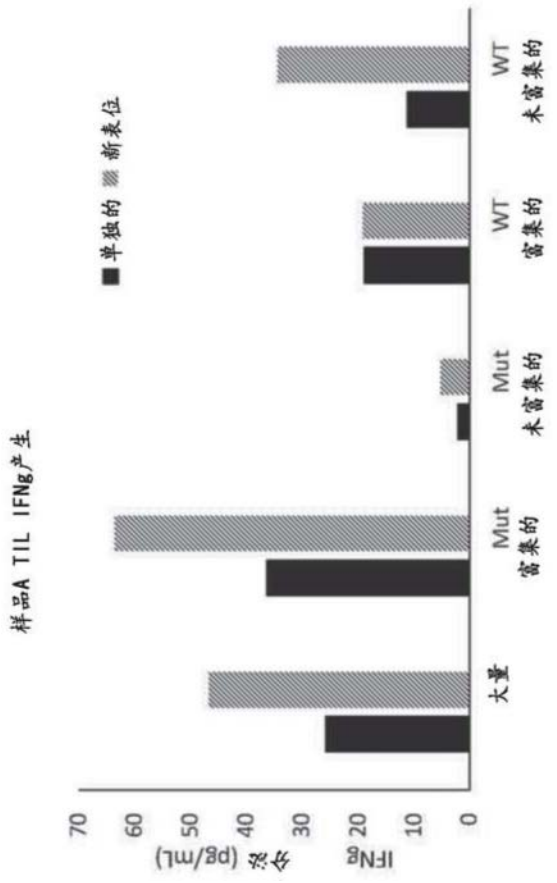


FIG.24A

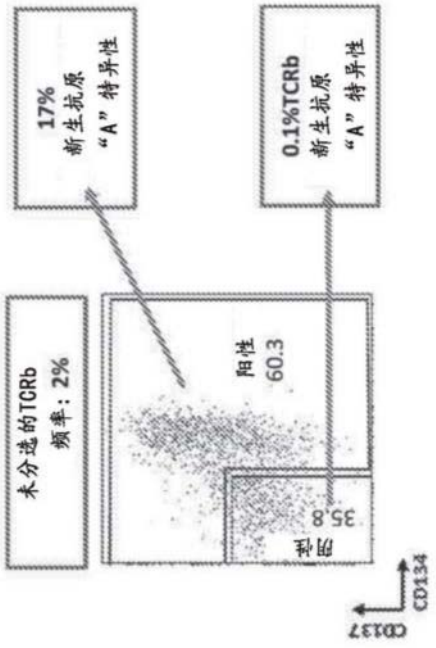


FIG.24B

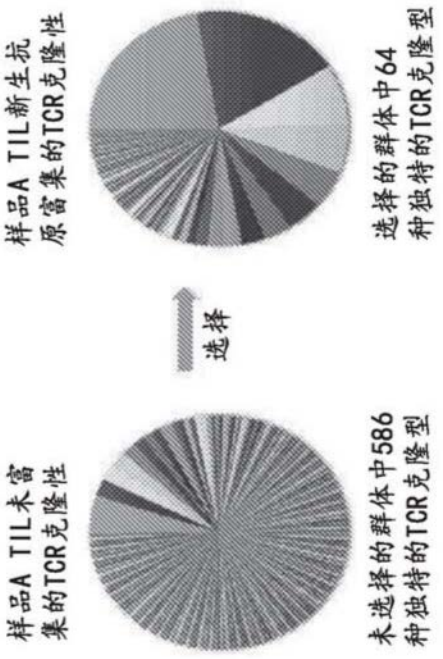


FIG.24C

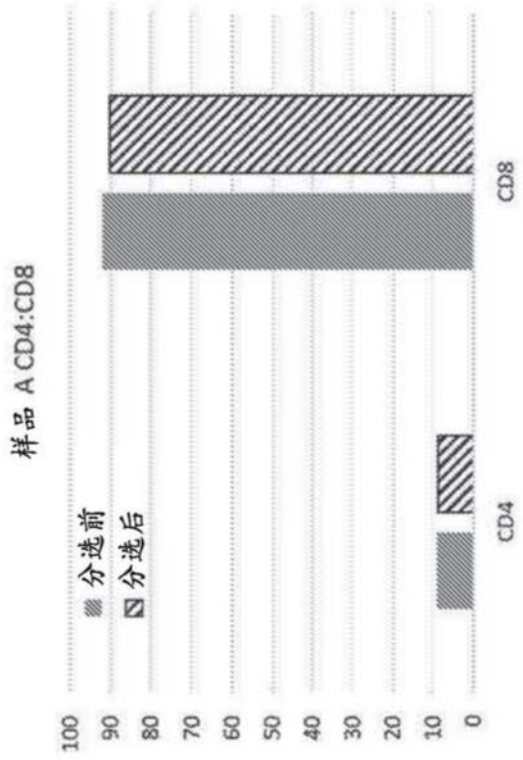


FIG.24D

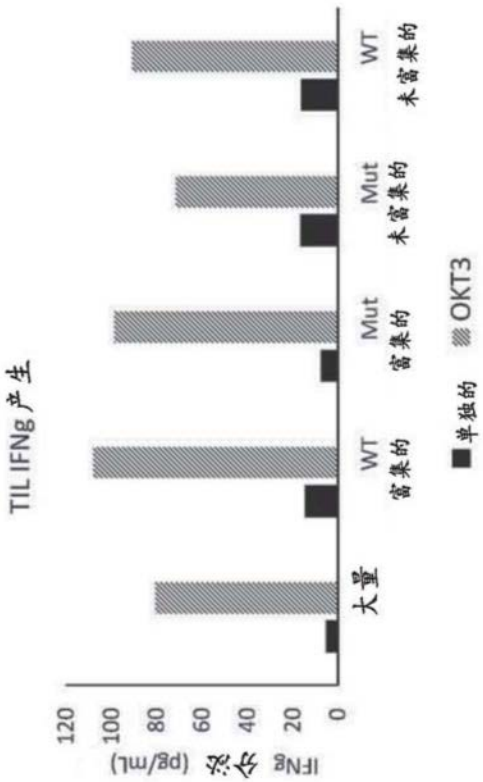


FIG.25A

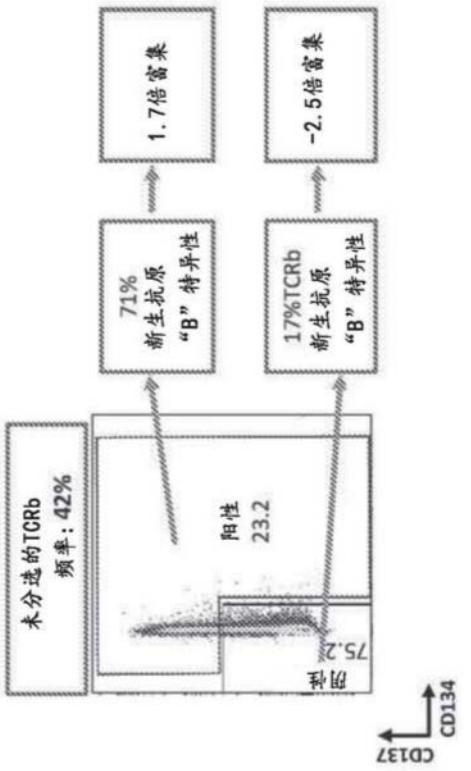


FIG.25B

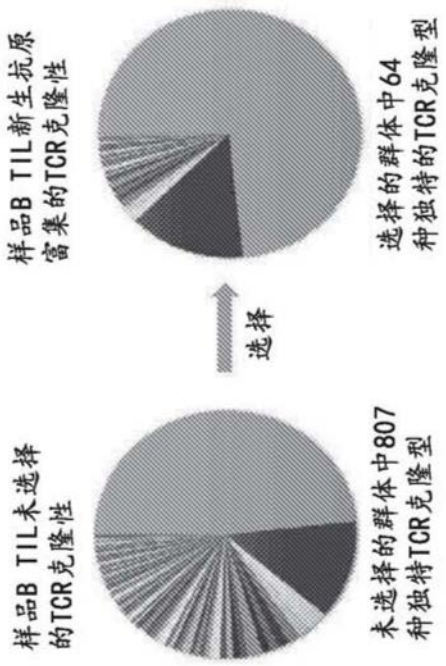


FIG.25C

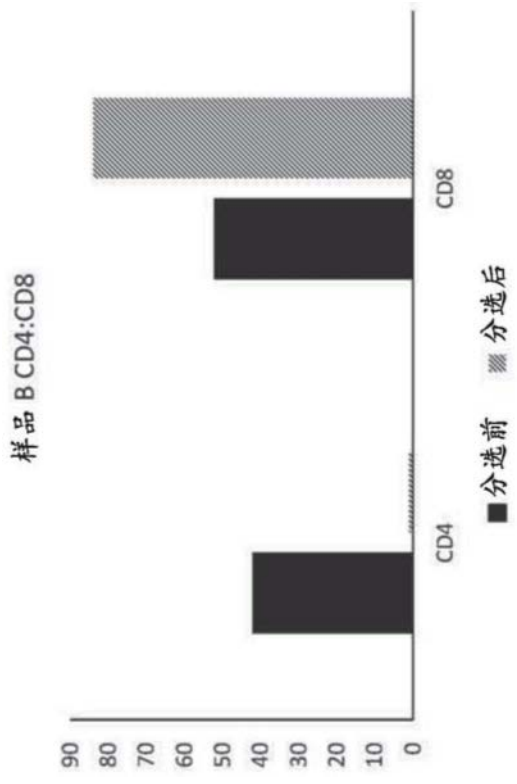


FIG.25D

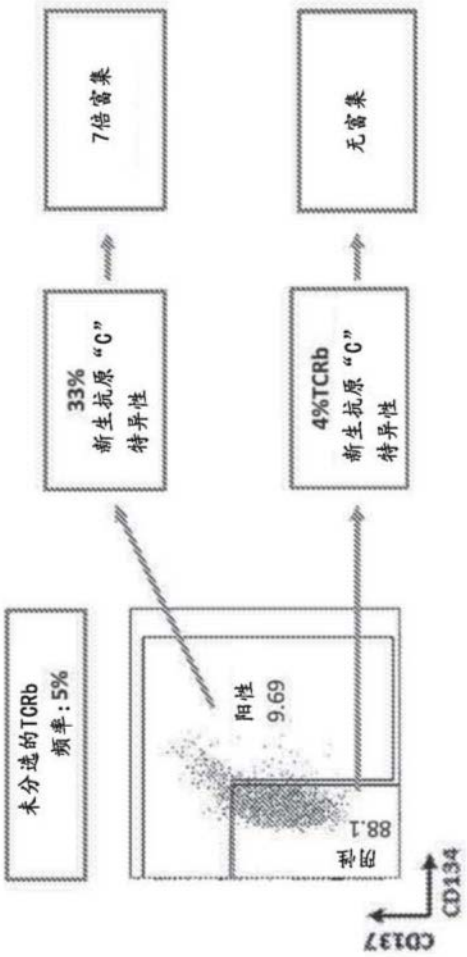

7倍富集
无富集
33%
新生抗原“C”
特异性
4%TCRb
新生抗原“C”
特异性
未分选的TCRb
频率:5%
阳性
9.69
88.1
CD137
CD134

FIG.26A

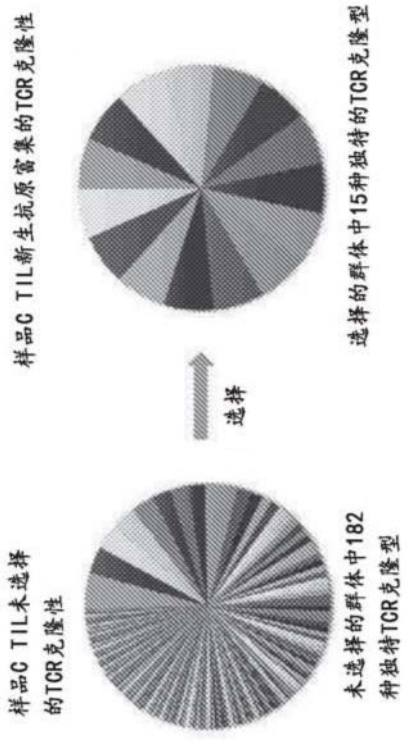

样品C TIL新生抗原富集的TCR克隆性
选择的群体中15种独特的TCR克隆型
选择
样品C TIL未选择的TCR克隆性
未选择的群体中182种独特TCR克隆型

FIG.26B

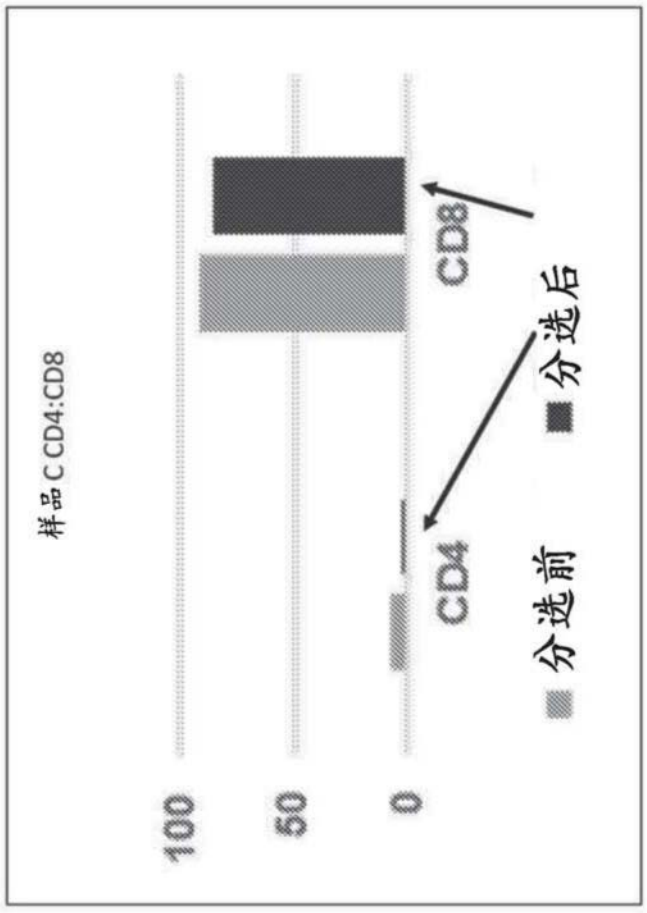


FIG.26C

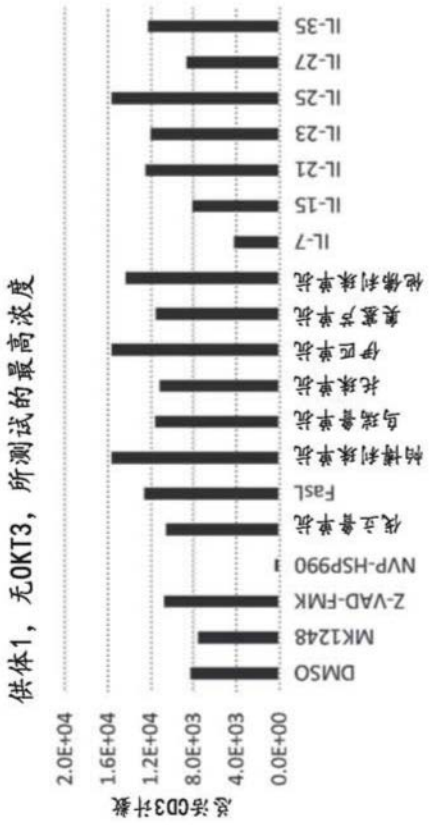

供体1，无OKT3，所测试的最高浓度
总活CD3计数
2.0E+04
1.6E+04
1.2E+04
8.0E+03
4.0E+03
0.0E+00
DMSO
MK1248
Z-VAD-FMK
NVP-HSP990
伏立普单抗
FasL
帕博利珠单抗
乌司奴单抗
托珠单抗
伊匹单抗
奥塞芬单抗
他佐利珠单抗
IL-7
IL-15
IL-21
IL-23
IL-25
IL-27
IL-35

FIG.27A

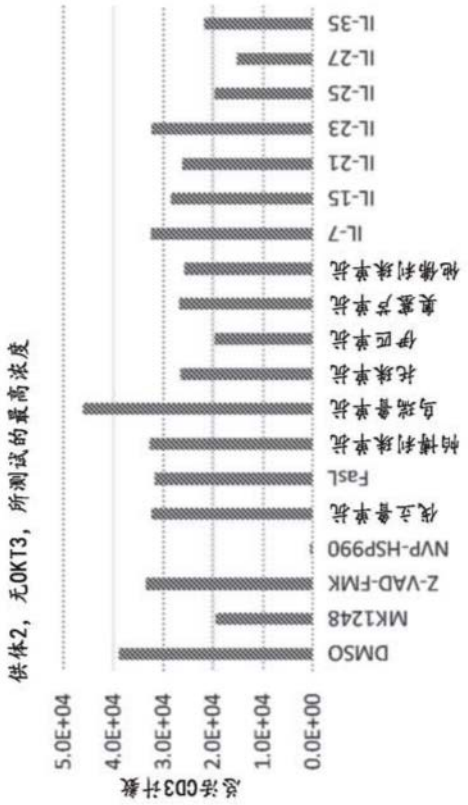

供体2，无OKT3，所测试的最高浓度
总活CD3计数
5.0E+04
4.0E+04
3.0E+04
2.0E+04
1.0E+04
0.0E+00
DMSO
MK1248
Z-VAD-FMK
NVP-HSP990
伏立鲁单抗
FasL
帕博利珠单抗
乌司鲁单抗
托珠单抗
伊匹单抗
奥塞芦单抗
他佛利珠单抗
IL-7
IL-15
IL-21
IL-23
IL-25
IL-27
IL-35

FIG.27B

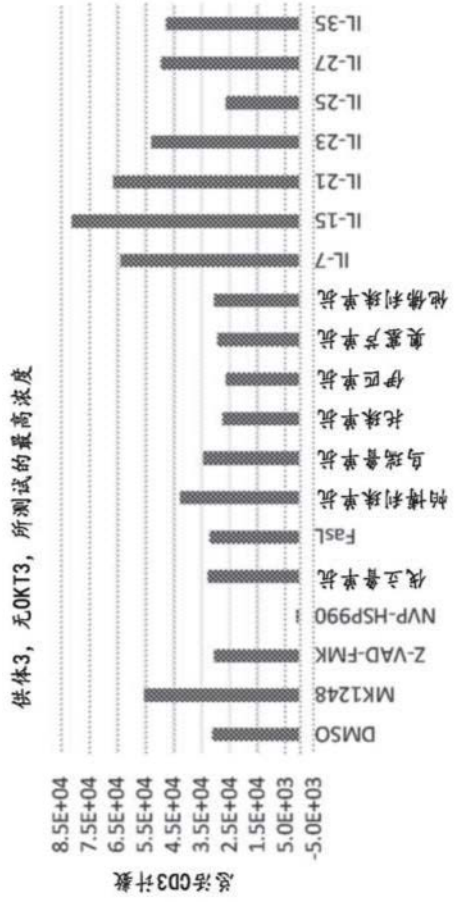

供体3，无OKT3，所测试的最高浓度
总活CD3计数
8.5E+04
7.5E+04
6.5E+04
5.5E+04
4.5E+04
3.5E+04
2.5E+04
1.5E+04
5.0E+03
-5.0E+03
DMSO
MK1248
Z-VAD-FMK
NVP-HSP990
伏立昂单抗
FasL
帕博利珠单抗
乌司奴单抗
托珠单抗
伊匹单抗
奥塞芦单抗
他佛利珠单抗
IL-7
IL-15
IL-21
IL-23
IL-25
IL-27
IL-35

FIG.27C

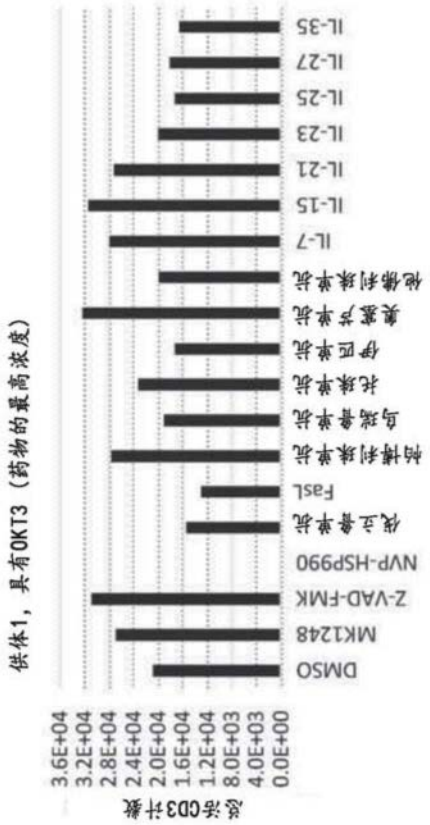

供体1，具有OKT3（药物的最高浓度）
总活CD3计数
3.6E+04
3.2E+04
2.8E+04
2.4E+04
2.0E+04
1.6E+04
1.2E+04
8.0E+03
4.0E+03
0.0E+00
DMSO
MK1248
Z-VAD-FMK
NVP-HSP990
伏立昂单抗
FasL
帕博利珠单抗
马瑞鲁单抗
托珠单抗
伊匹单抗
奥塞芬单抗
他佛利珠单抗
IL-7
IL-15
IL-21
IL-23
IL-25
IL-27
IL-35

FIG.28A

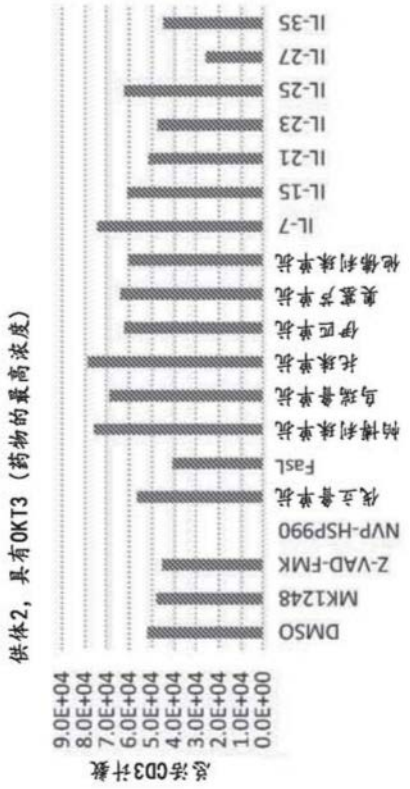


FIG.28B

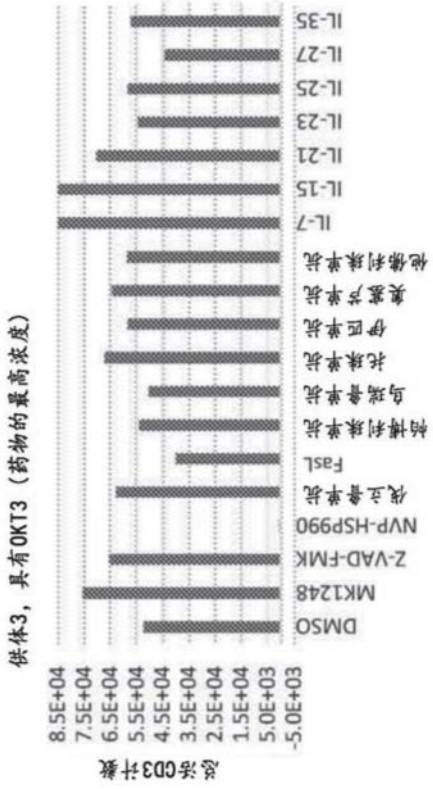


FIG.28C

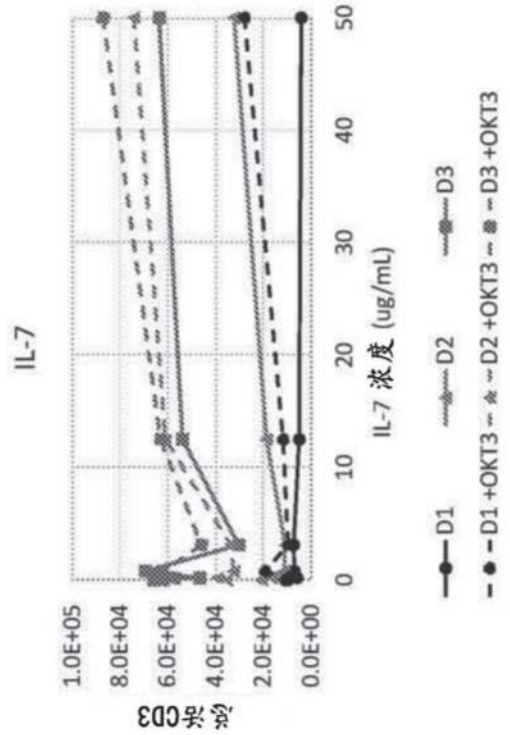


FIG.29A

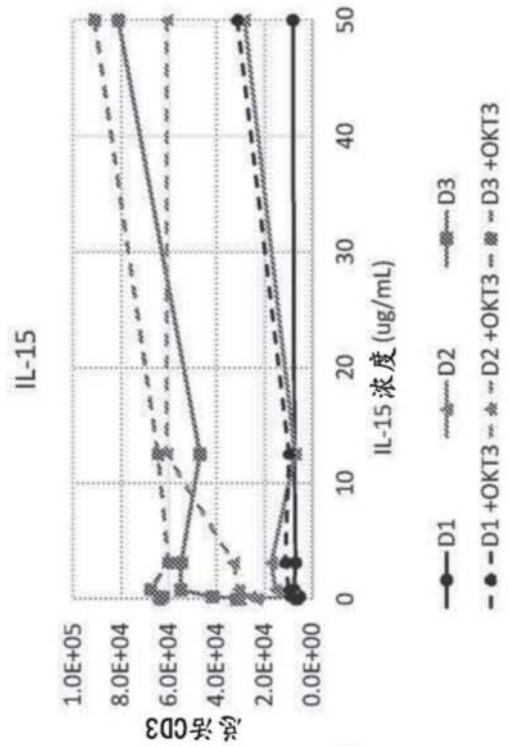


FIG.29B

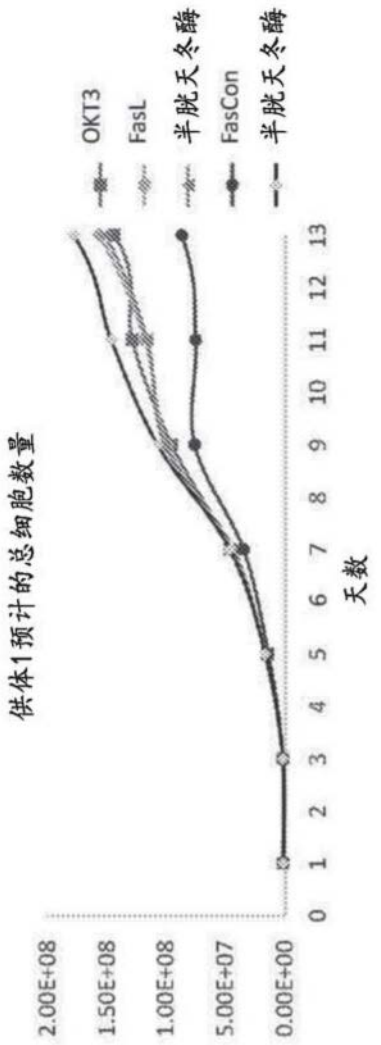

供体1预计的总细胞数量
2.00E+08
1.50E+08
1.00E+08
5.00E+07
0.00E+00
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
天数
OKT3
FasL
半胱天冬酶
FasCon
半胱天冬酶

FIG.30A

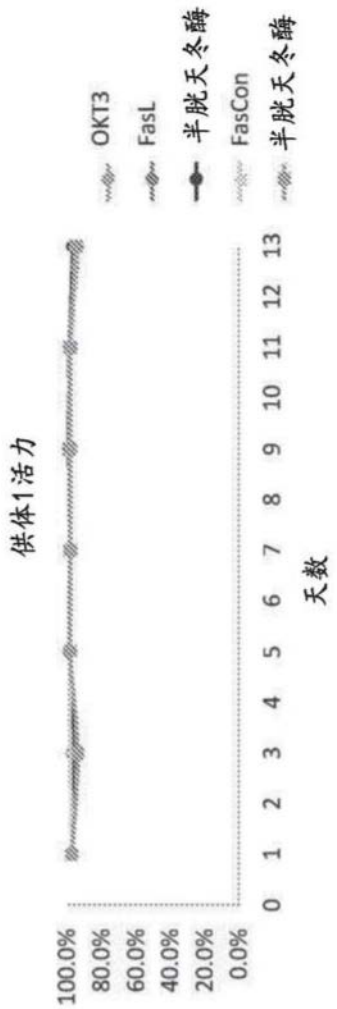

供体1活力
100.0%
80.0%
60.0%
40.0%
20.0%
0.0%
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
天数
OKT3
FasL
半胱天冬酶
FasCon
半胱天冬酶

FIG.30B

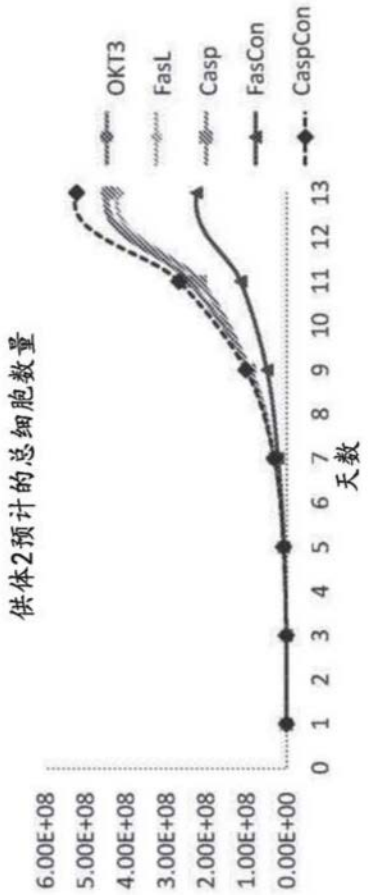

供体2预计的总细胞数量
6.00E+08
5.00E+08
4.00E+08
3.00E+08
2.00E+08
1.00E+08
0.00E+00
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
天数
OKT3
FasL
Casp
FasCon
CaspCon

FIG.31A

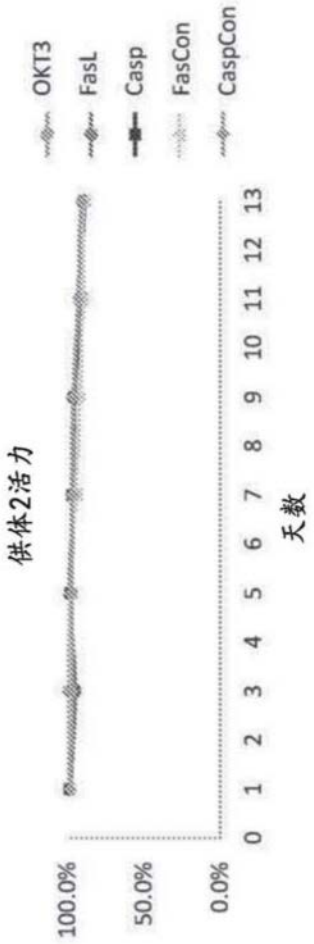

OKT3
FasL
Casp
FasCon
CaspCon
供体2活力
100.0%
50.0%
0.0%
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
天数

FIG.31B

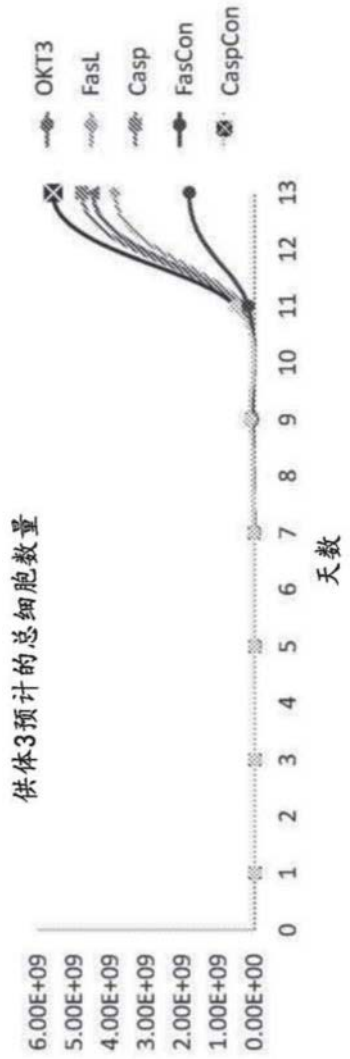

OKT3
FasL
Casp
FasCon
CaspCon
供体3预计的总细胞数量
6.00E+09
5.00E+09
4.00E+09
3.00E+09
2.00E+09
1.00E+09
0.00E+00
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
天数

FIG.32A

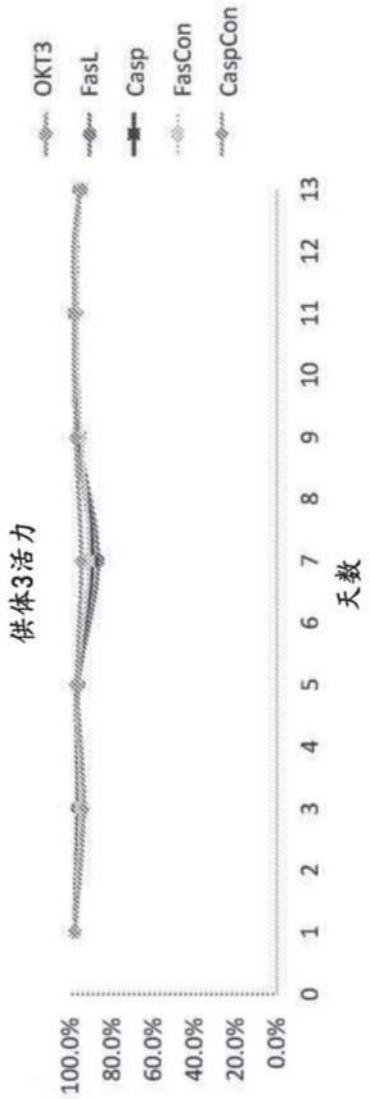

OKT3
FasL
Casp
FasCon
CaspCon
供体3活力
100.0%
80.0%
60.0%
40.0%
20.0%
0.0%
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
天数

FIG.32B

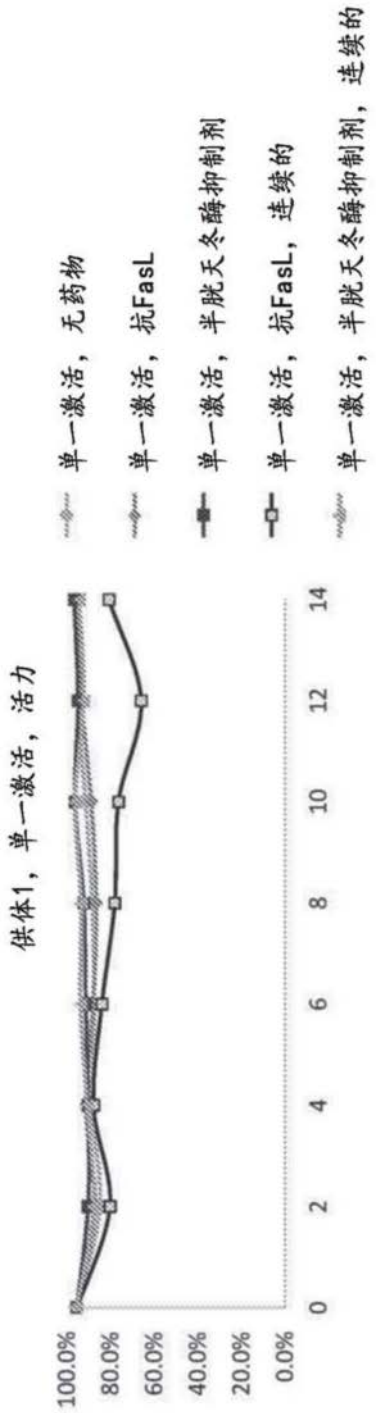

供体1，单一激活，活力
100.0%
80.0%
60.0%
40.0%
20.0%
0.0%
0
2
4
6
8
10
12
14
单一激活，无药物
单一激活，抗FasL
单一激活，半胱天冬酶抑制剂
单一激活，抗FasL，连续的
单一激活，半胱天冬酶抑制剂，连续的

FIG.33A


单一激活，无药物
单一激活，抗FasL
单一激活，半胱天冬酶抑制剂
单一激活，抗FasL，连续的
单一激活，半胱天冬酶抑制剂，连续的
供体2，单一激活，活力
100.0%
80.0%
60.0%
40.0%
20.0%
0.0%
0
2
4
6
8
10
12
14

FIG.33B


供体1，单一激活，预计的总细胞数量
1.4E+09
1.2E+09
1E+09
800000000
600000000
400000000
200000000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
单一激活，无药物
单一激活，抗FasL
单一激活，半胱天冬酶抑制剂
单一激活，抗FasL，连续的
单一激活，半胱天冬酶抑制剂，连续的

FIG.34A

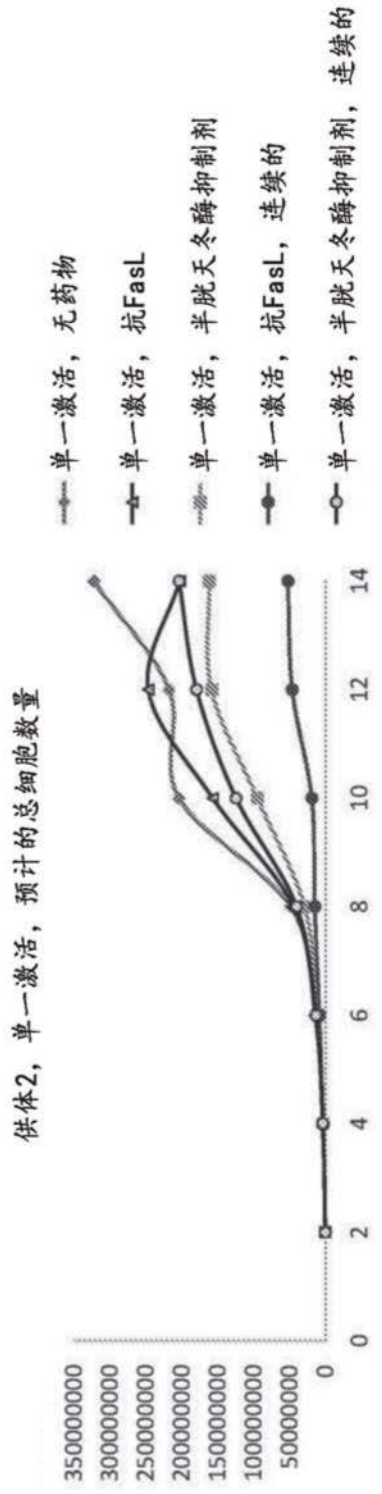

供体2，单一激活，预计的总细胞数量
350000000
300000000
250000000
200000000
150000000
100000000
50000000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
单一激活，无药物
单一激活，抗FasL
单一激活，半胱天冬酶抑制剂
单一激活，抗FasL，连续的
单一激活，半胱天冬酶抑制剂，连续的

FIG.34B

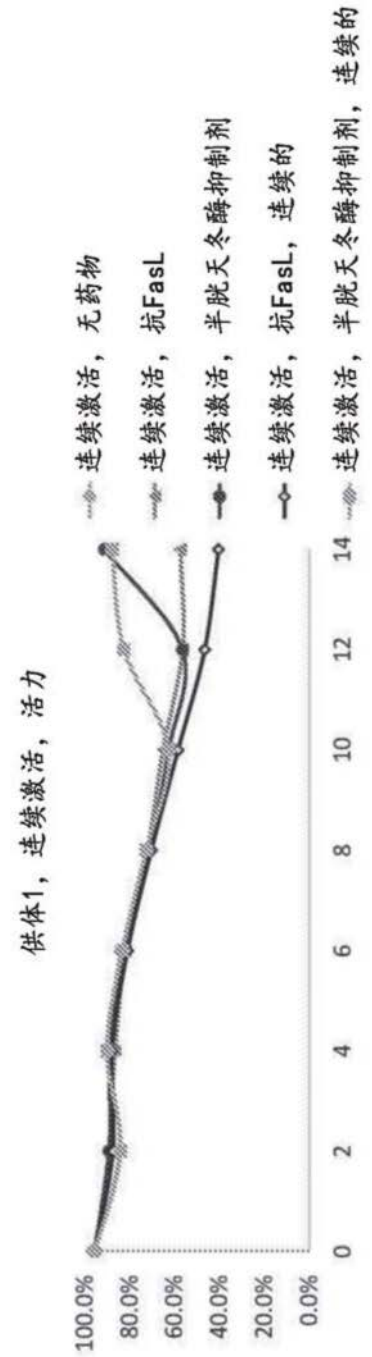

供体1，连续激活，活力
100.0%
80.0%
60.0%
40.0%
20.0%
0.0%
0
2
4
6
8
10
12
14
连续激活，无药物
连续激活，抗FasL
连续激活，半胱天冬酶抑制剂
连续激活，抗FasL，连续的
连续激活，半胱天冬酶抑制剂，连续的

FIG.35A

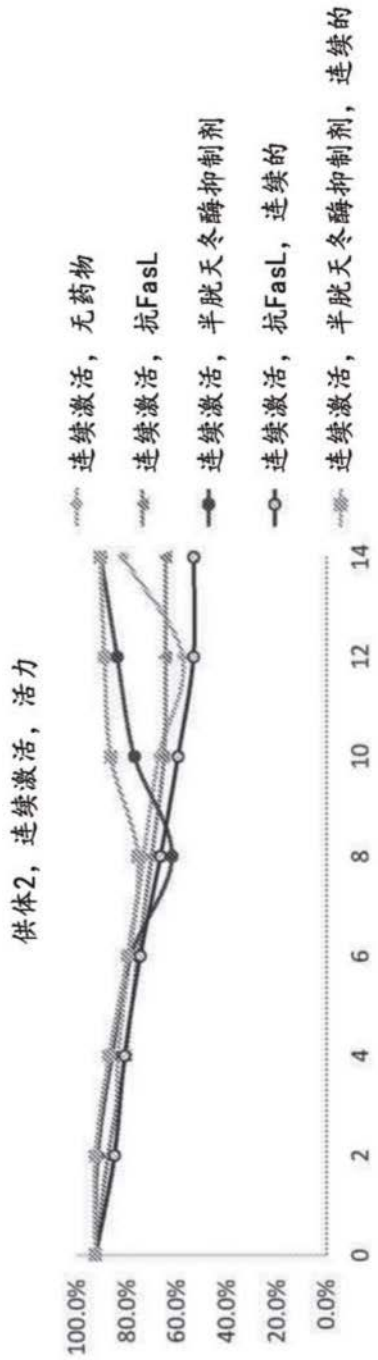

供体2，连续激活，活力
100.0%
80.0%
60.0%
40.0%
20.0%
0.0%
0
2
4
6
8
10
12
14
连续激活，无药物
连续激活，抗FasL
连续激活，半胱天冬酶抑制剂
连续激活，抗FasL，连续的
连续激活，半胱天冬酶抑制剂，连续的

FIG.35B


连续激活，无药物
连续激活，抗FasL
连续激活，半胱天冬酶抑制剂
连续激活，抗FasL，连续的
连续激活，半胱天冬酶抑制剂，连续的
供体1，连续激活，预计的总细胞数量
1E+09
100000000
10000000
1000000
0
5
10
15

FIG.36A

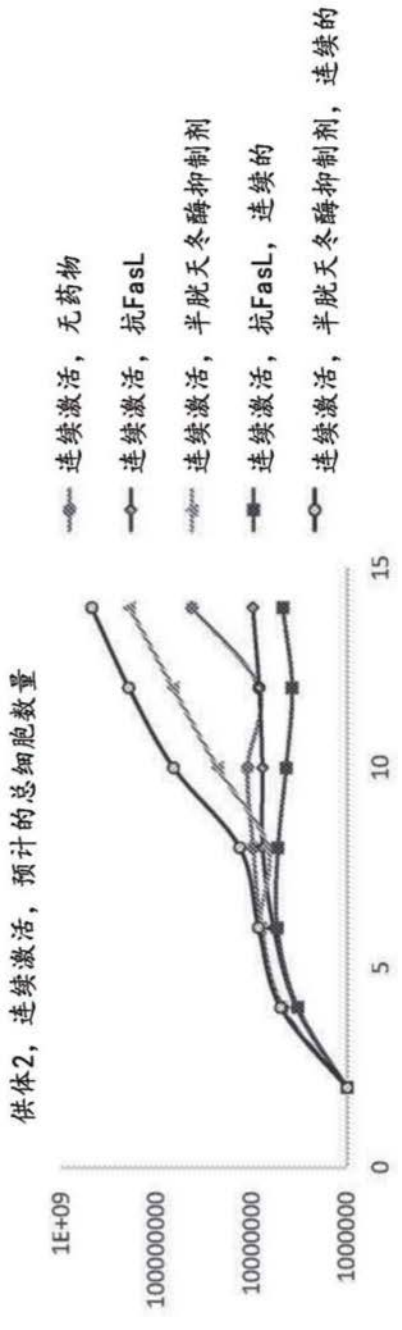
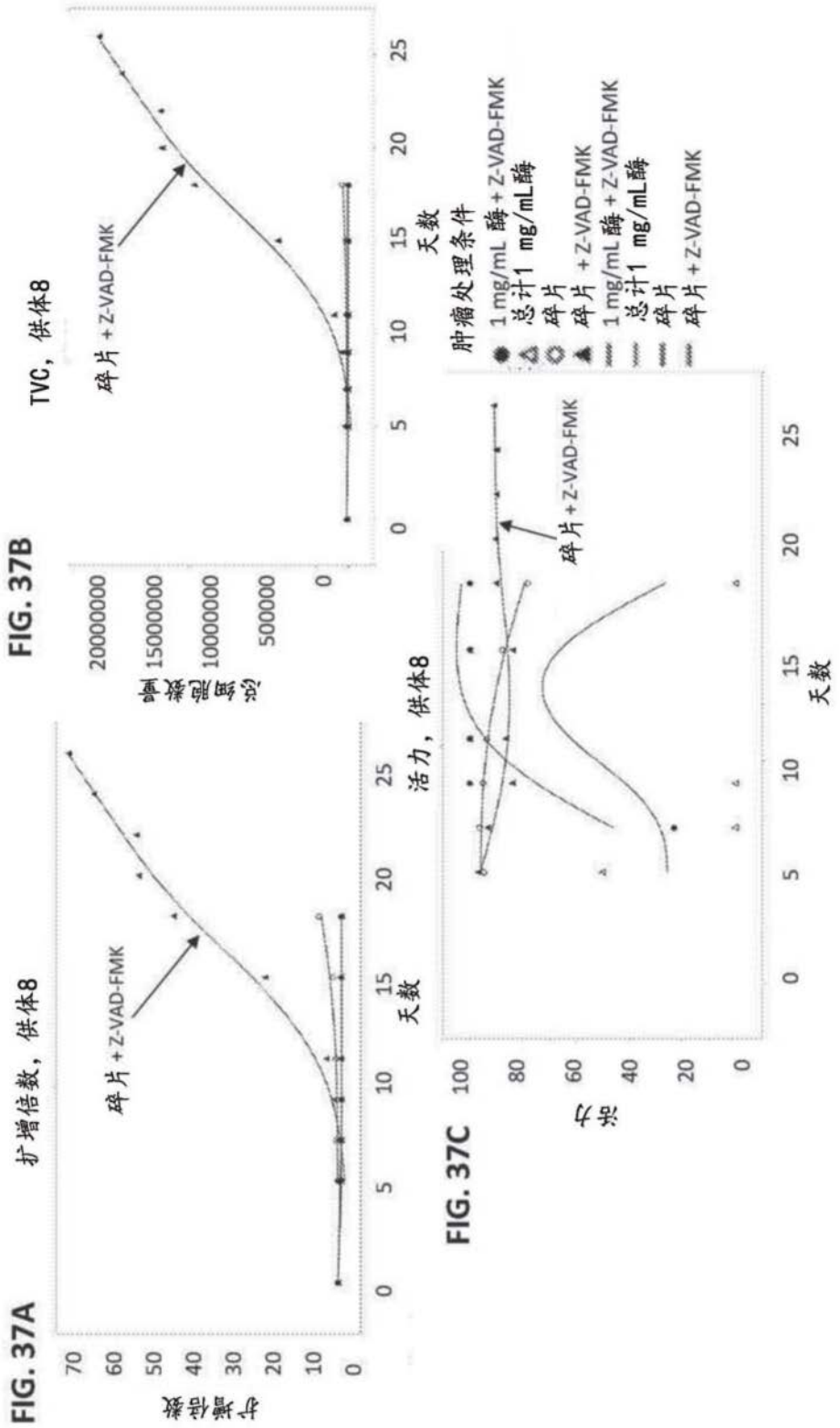

供体2，连续激活，预计的总细胞数量
1E+09
100000000
10000000
1000000
0
5
10
15
连续激活，无药物
连续激活，抗FasL
连续激活，半胱天冬酶抑制剂
连续激活，抗FasL，连续的
连续激活，半胱天冬酶抑制剂，连续的

FIG.36B


FIG. 37A
扩增倍数，供体8
碎片 + Z-VAD-FMK
天数
FIG. 37B
TVC，供体8
碎片 + Z-VAD-FMK
天数
FIG. 37C
活力，供体8
碎片 + Z-VAD-FMK
天数
肿瘤处理条件
1 mg/mL 酶 + Z-VAD-FMK
总计1 mg/mL酶
碎片
碎片 + Z-VAD-FMK
1 mg/mL酶 + Z-VAD-FMK
总计1 mg/mL酶
碎片
碎片 + Z-VAD-FMK

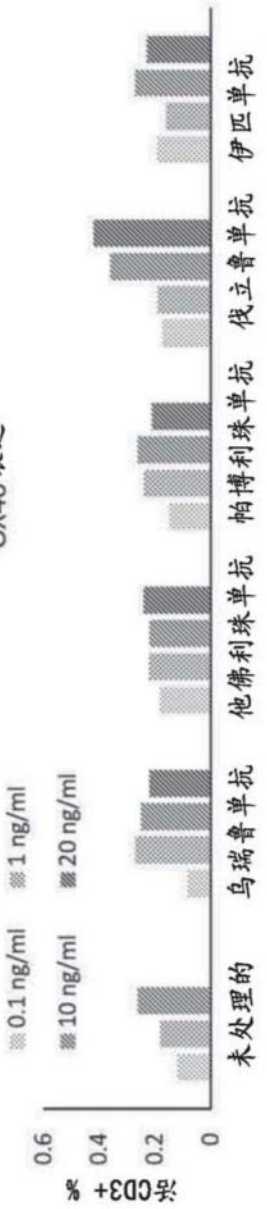

OX40 表达
0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
0.6
0.4
0.2
0
未处理的
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
帕博利珠单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗

FIG.38A

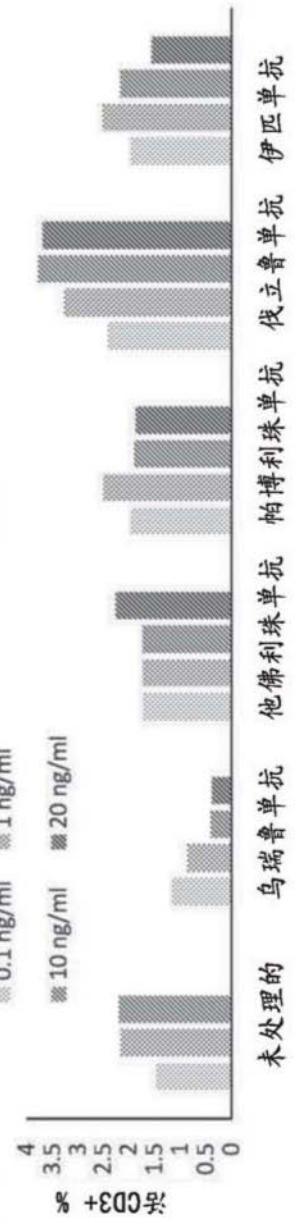

41BB 表达
0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
% CD3+
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
未处理的
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
帕博利珠单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗

FIG.38B


CD107a 表达
0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
未处理的
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
帕博利珠单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗

FIG.38C

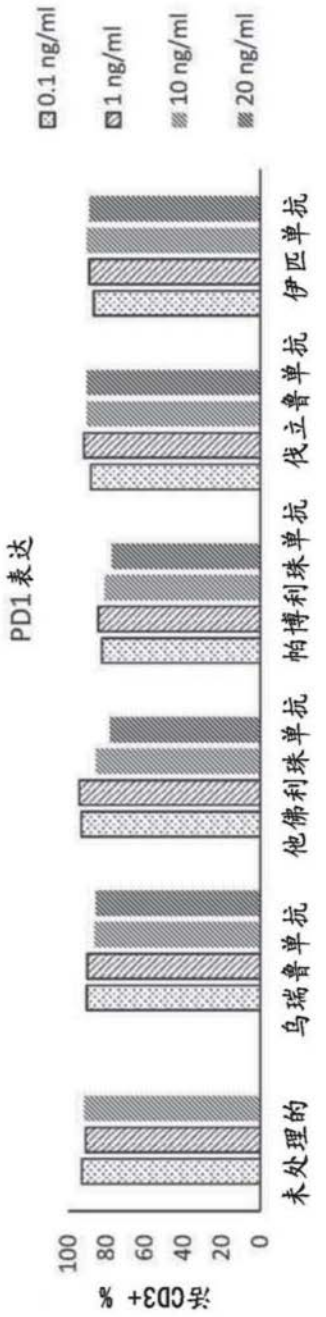

0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
PD1表达
%CD3+
100
80
60
40
20
0
未处理的
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
帕博利珠单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗

FIG.38D

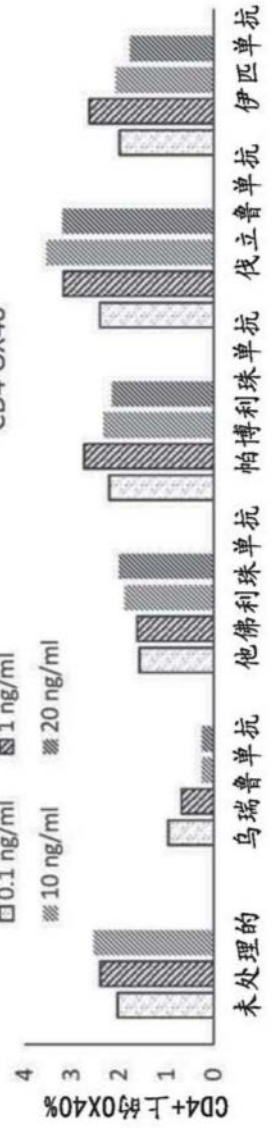

CD4 OX40
0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
CD4+ T细胞OX40%
0
1
2
3
4
未处理的
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
帕博利珠单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗

FIG.39A

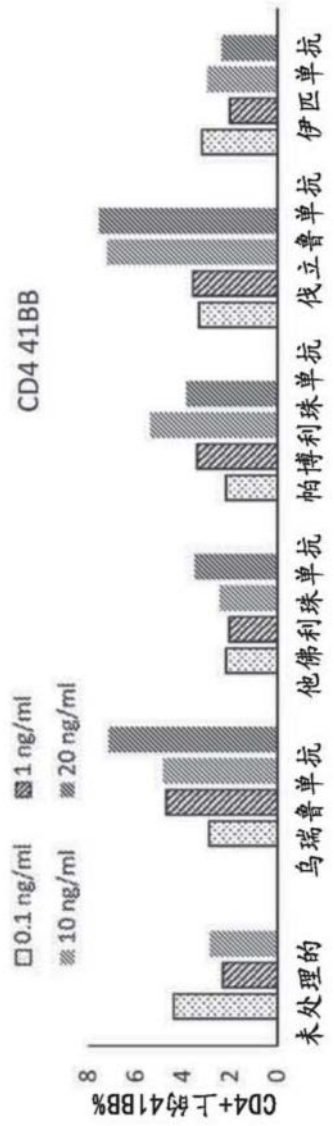

CD4 41BB
0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
CD4+上的41BB%
0
2
4
6
8
未处理的
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
帕博利珠单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗

FIG.39B


CD4 CD107a
0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
CD4+上的CD107a%
0
1
2
3
4
未处理的
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
帕博利珠单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗

FIG.39C

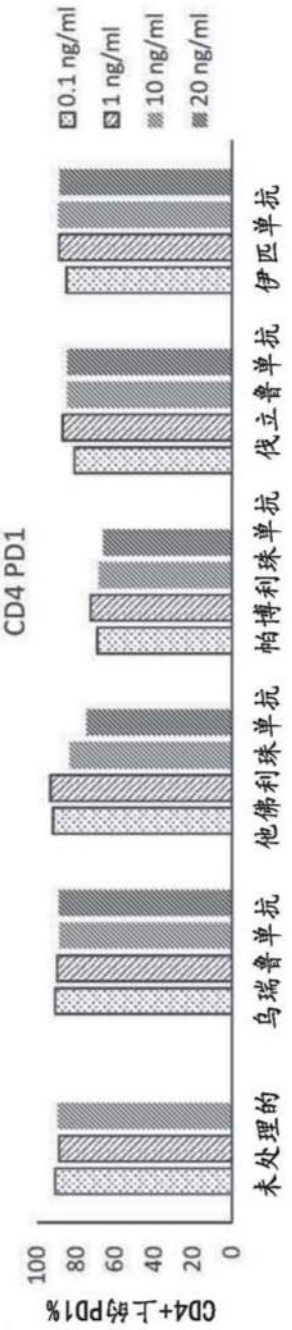

CD4 PD1
0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
CD4+上的PD1%
100
80
60
40
20
0
未处理的
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
帕博利珠单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗

FIG.39D

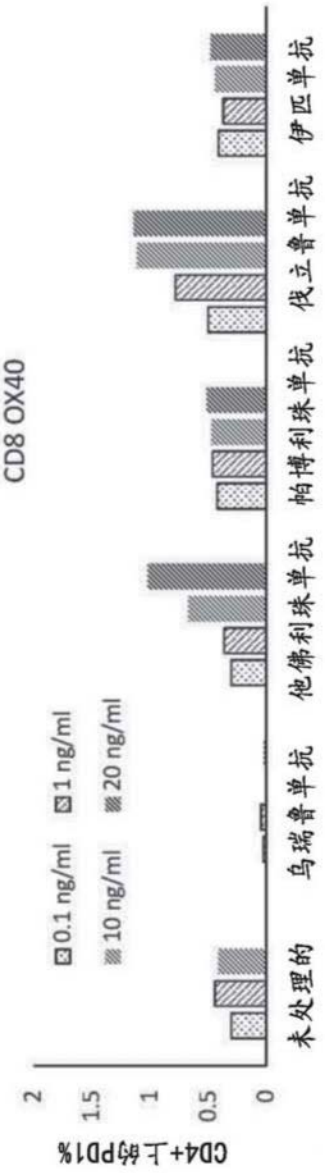

CD8 OX40
0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
CD4+上的PD1%
2
1.5
1
0.5
0
未处理的
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
帕博利珠单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗

FIG.40A

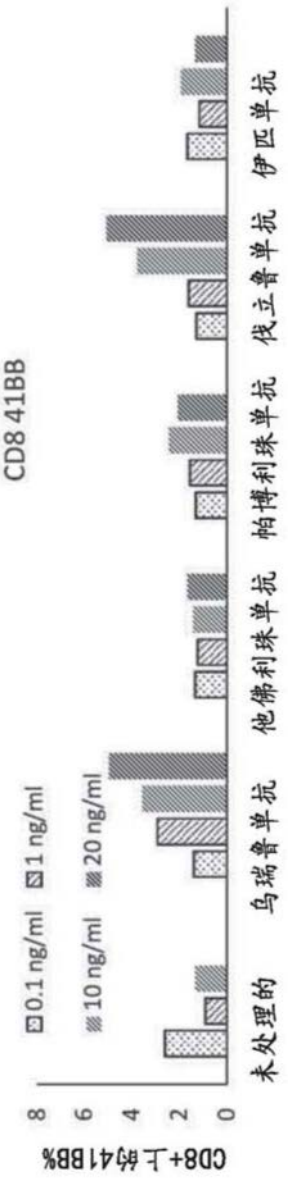

CD8 41BB
0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
CD8+上的41BB%
0
2
4
6
8
未处理的
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
帕博利珠单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗

FIG.40B

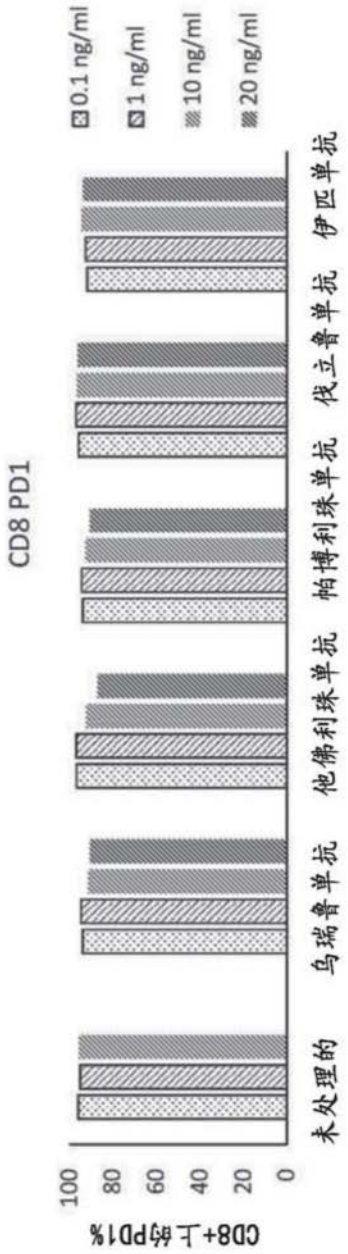

CD8 PD1
0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
CD8+上的PD1%
100
80
60
40
20
0
未处理的
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
帕博利珠单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗

FIG.40C

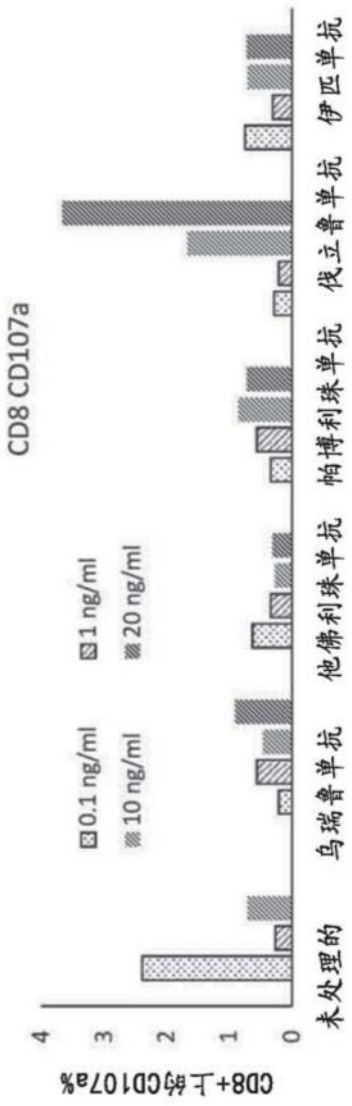

CD8 CD107a
0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
CD8+上的CD107a%
0
1
2
3
4
未处理的
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
帕博利珠单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗

FIG.40D

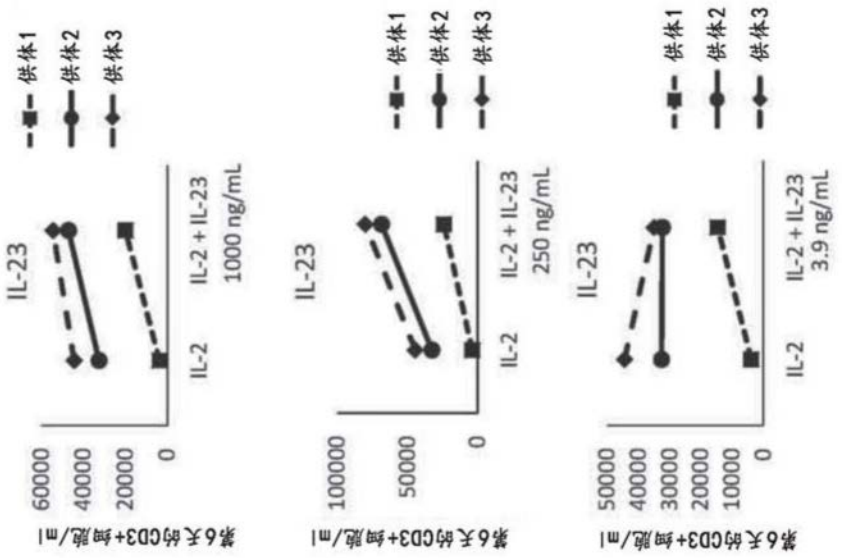


FIG.41A

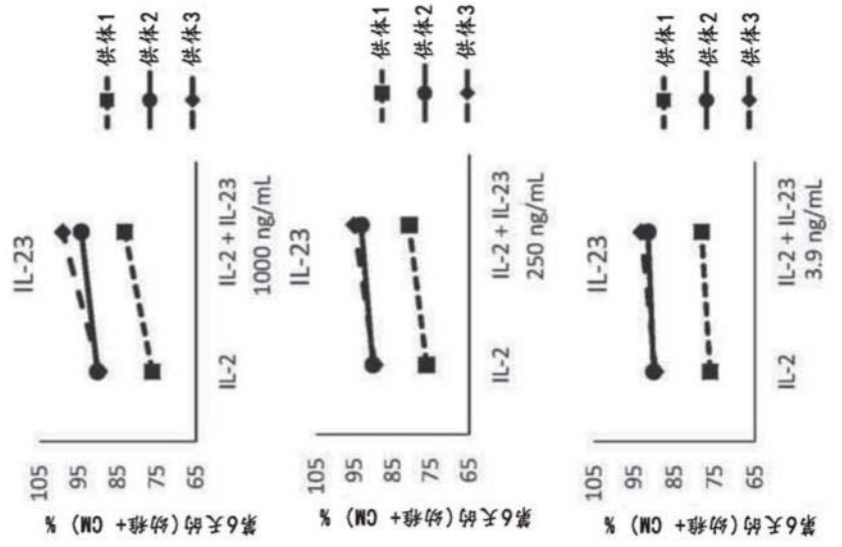


FIG.41B

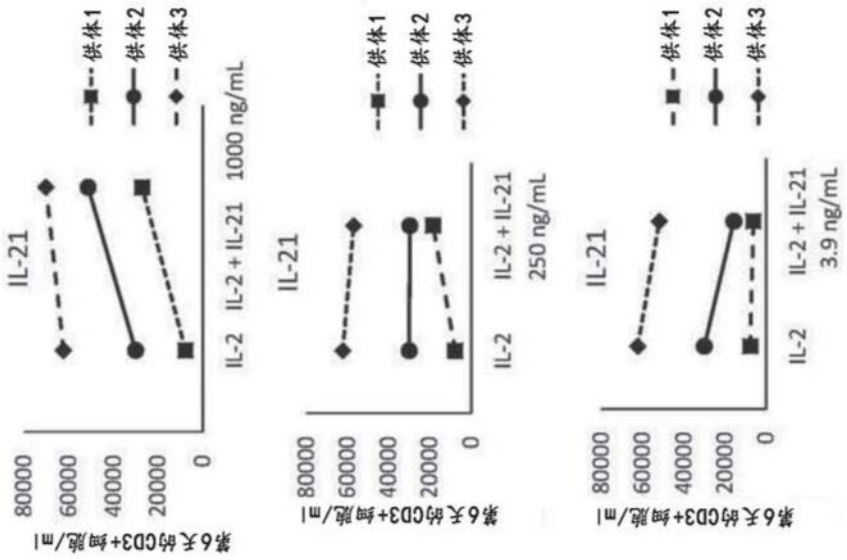


FIG.42A

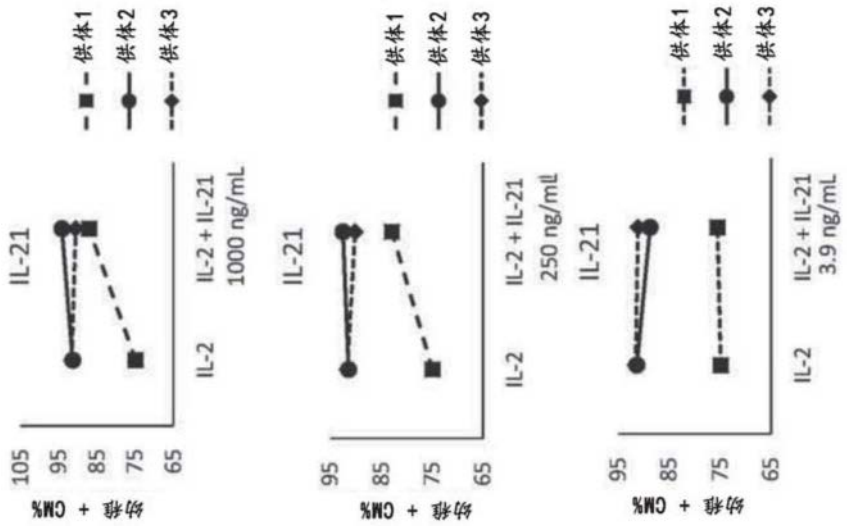


FIG.42B

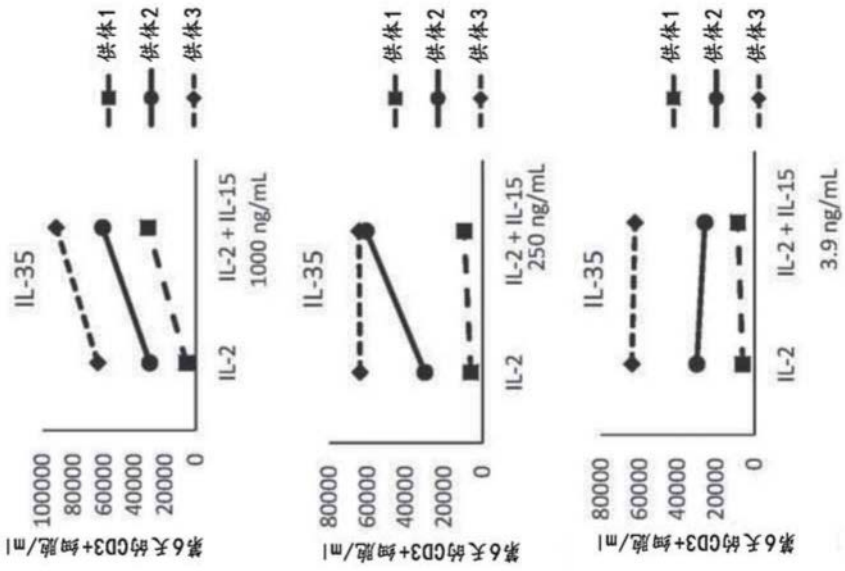


FIG.43A

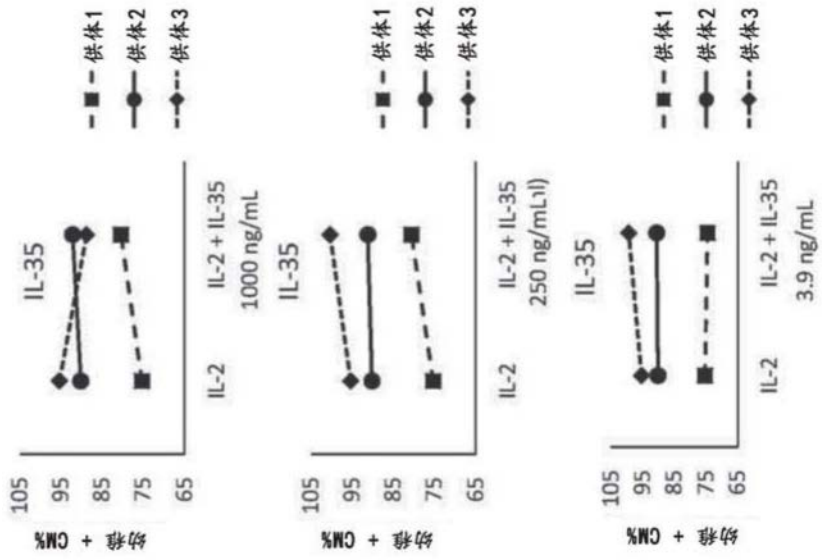


FIG.43B

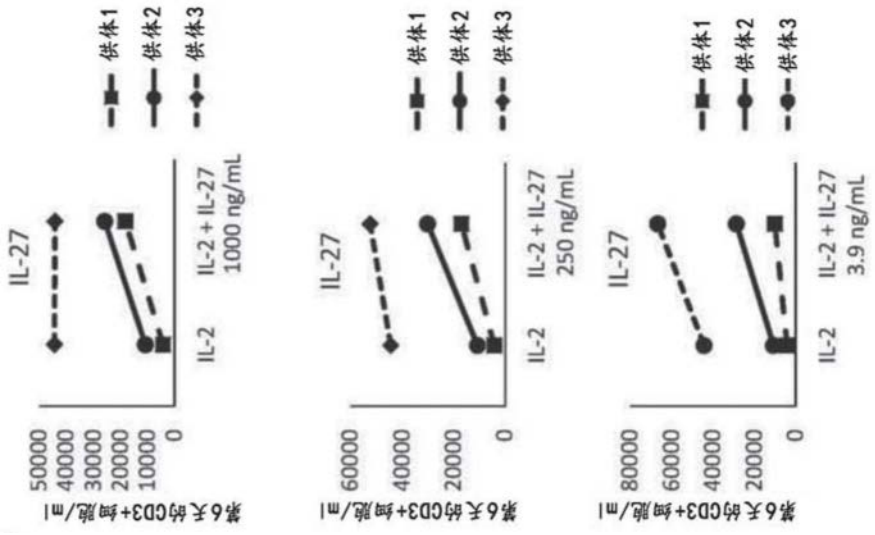


FIG.44A

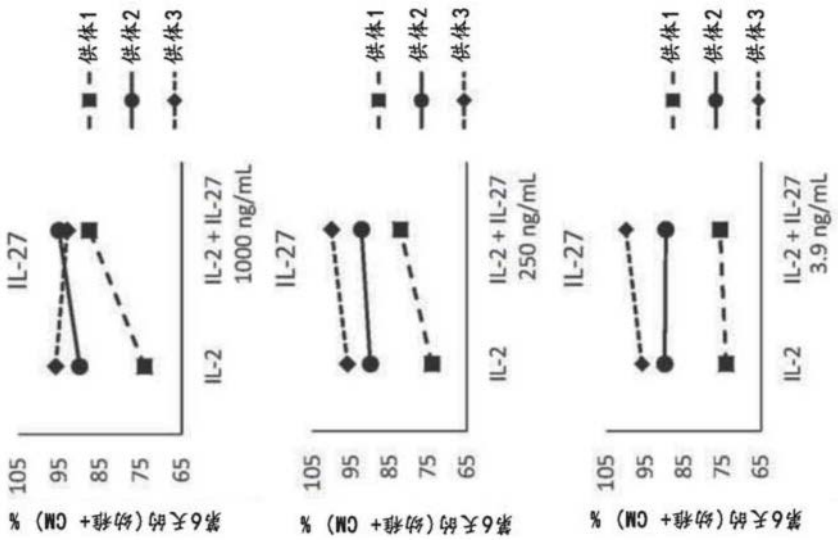


FIG.44B

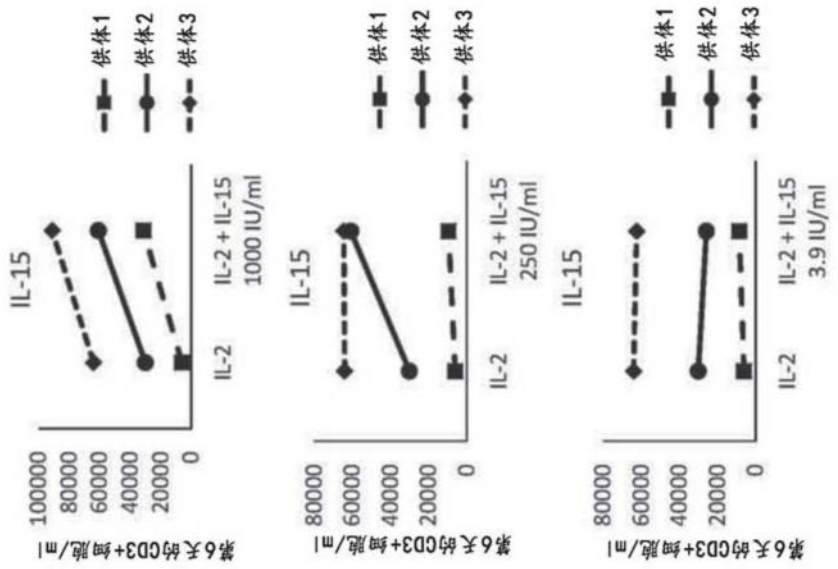


FIG.45A

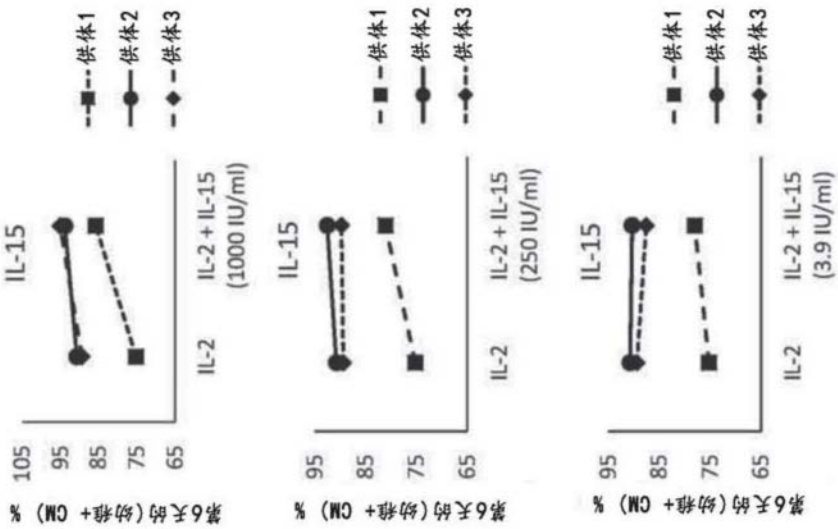


FIG.45B

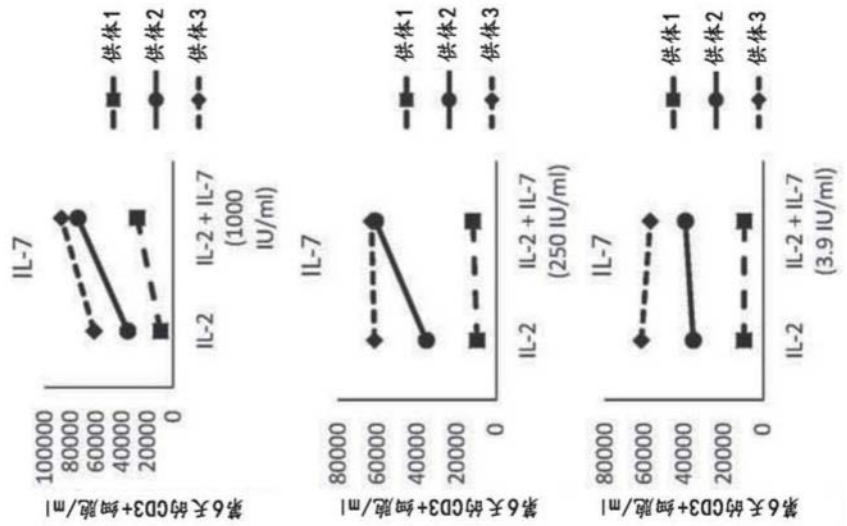


FIG.46A

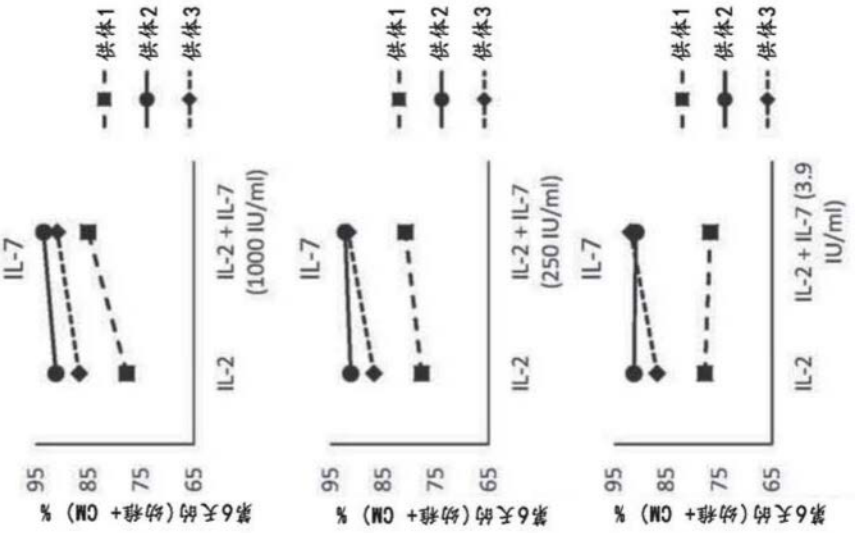


FIG.46B

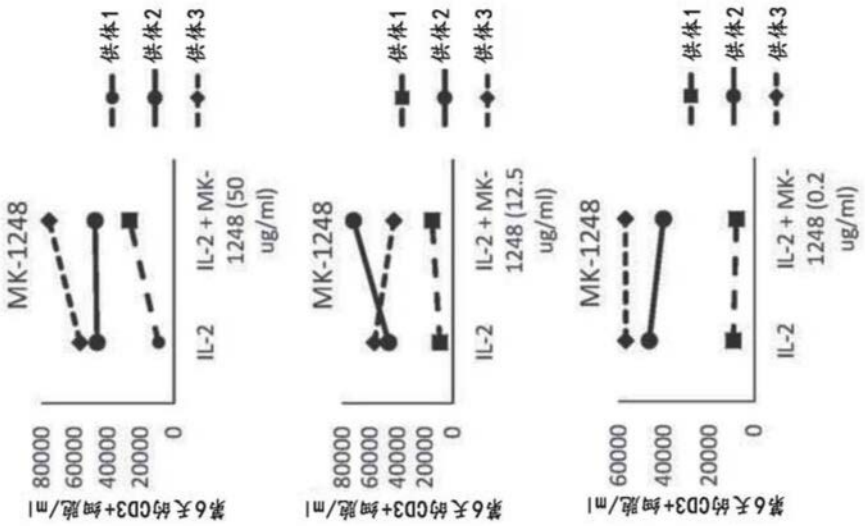


FIG.47A

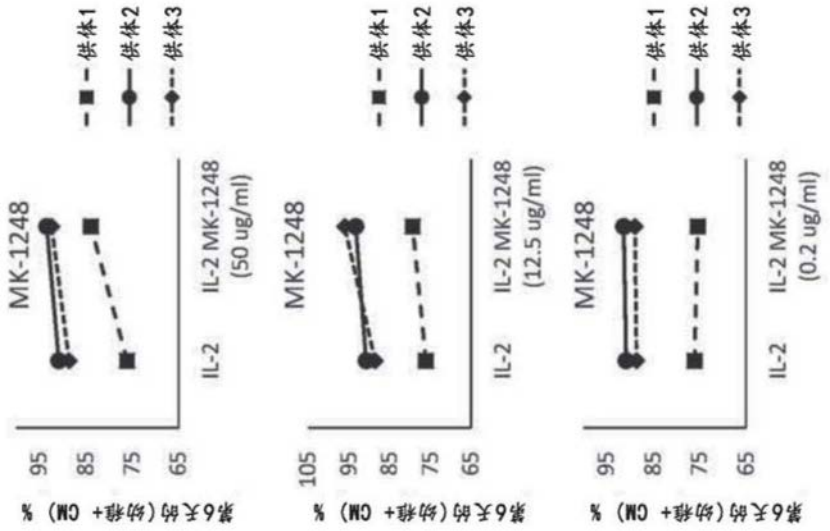


FIG.47B

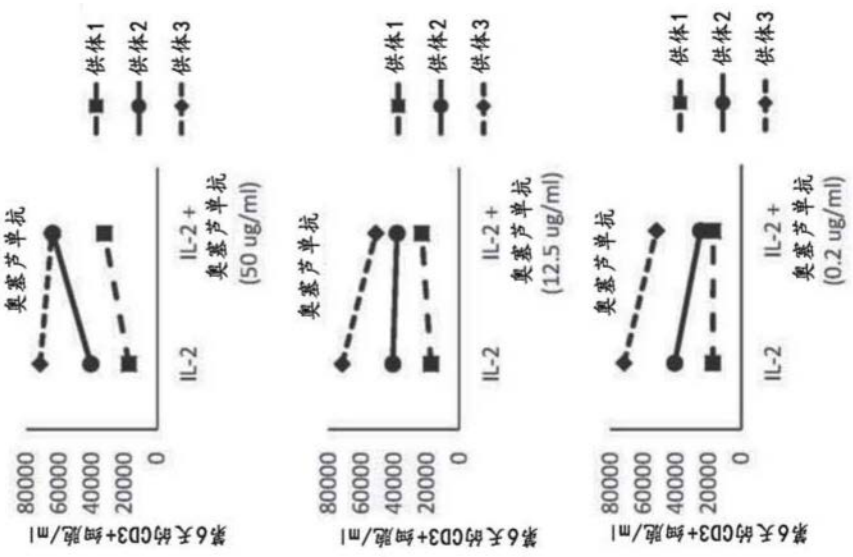


FIG.48A

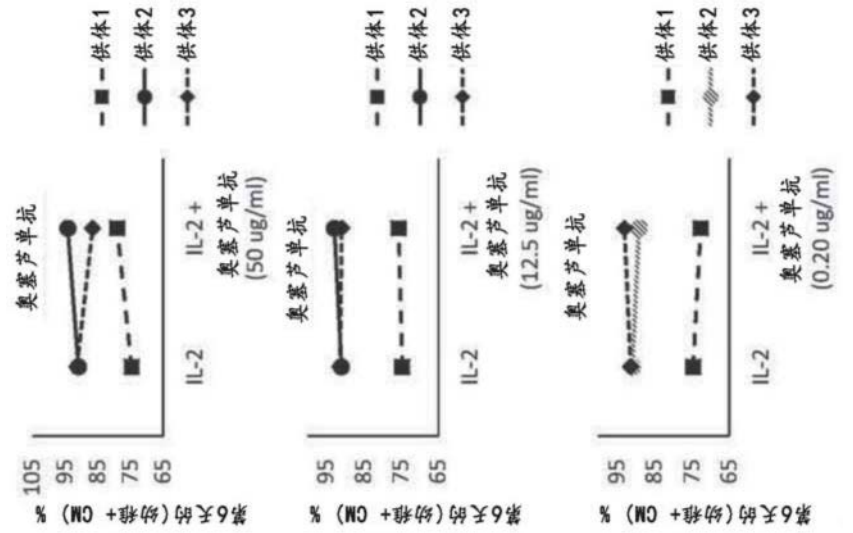


FIG.48B

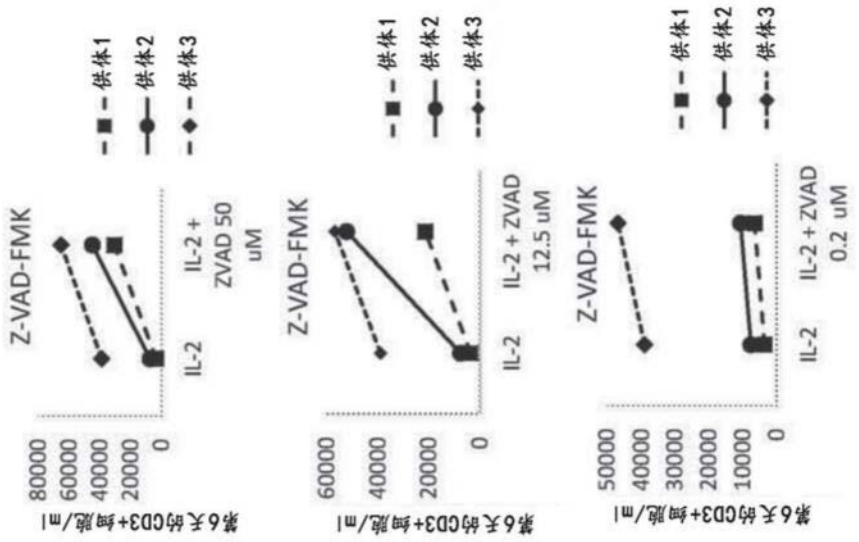


FIG.49A

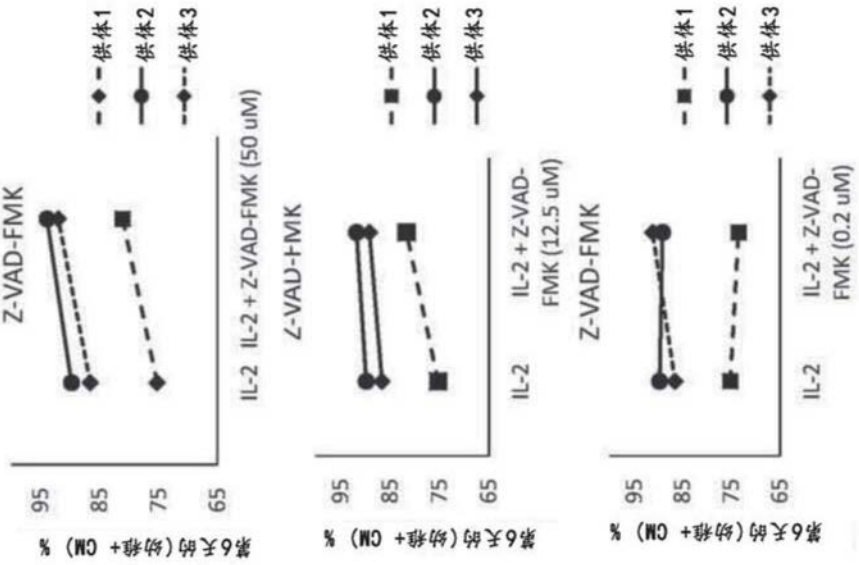


FIG.49B

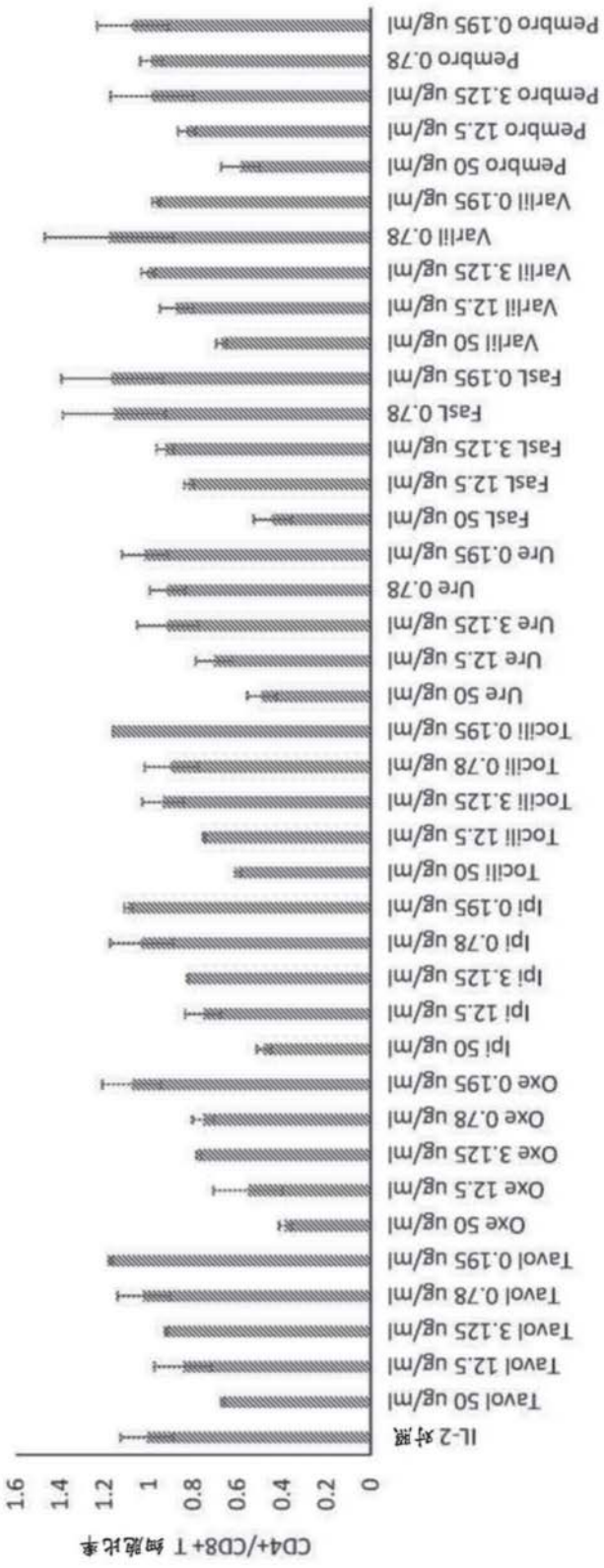

CD4+/CD8+ T 细胞比率
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
IL-2 对照
Tavol 50 ug/ml
Tavol 12.5 ug/ml
Tavol 3.125 ug/ml
Tavol 0.78 ug/ml
Tavol 0.195 ug/ml
Oxe 50 ug/ml
Oxe 12.5 ug/ml
Oxe 3.125 ug/ml
Oxe 0.78 ug/ml
Oxe 0.195 ug/ml
Ipi 50 ug/ml
Ipi 12.5 ug/ml
Ipi 3.125 ug/ml
Ipi 0.78 ug/ml
Ipi 0.195 ug/ml
Tocili 50 ug/ml
Tocili 12.5 ug/ml
Tocili 3.125 ug/ml
Tocili 0.78 ug/ml
Tocili 0.195 ug/ml
Ure 50 ug/ml
Ure 12.5 ug/ml
Ure 3.125 ug/ml
Ure 0.78
Ure 0.195 ug/ml
FasL 50 ug/ml
FasL 12.5 ug/ml
FasL 3.125 ug/ml
FasL 0.78
FasL 0.195 ug/ml
Varili 50 ug/ml
Varili 12.5 ug/ml
Varili 3.125 ug/ml
Varili 0.78
Varili 0.195 ug/ml
Pembro 50 ug/ml
Pembro 12.5 ug/ml
Pembro 3.125 ug/ml
Pembro 0.78
Pembro 0.195 ug/ml

FIG.50A

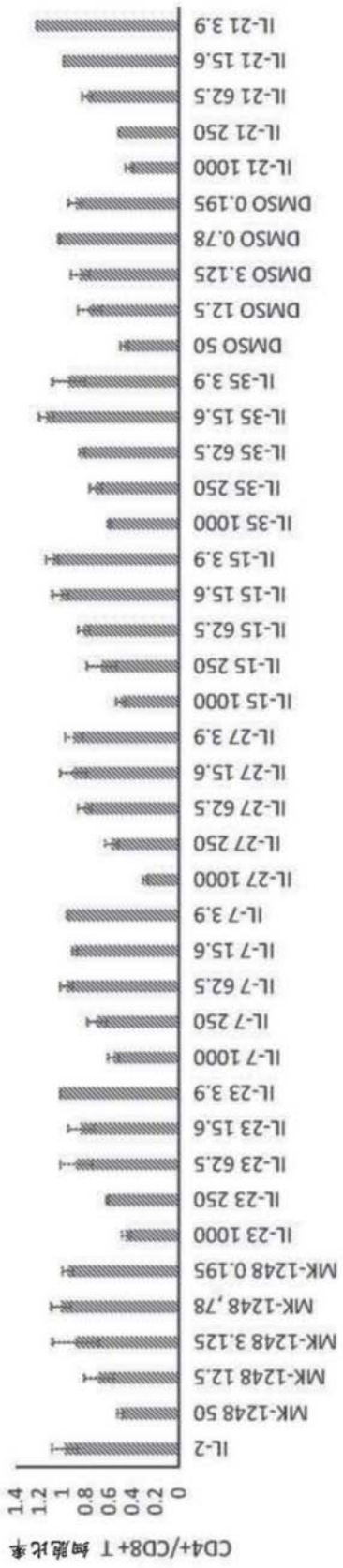

CD4+/CD8+ T 细胞比率
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
IL-2
MK-1248 50
MK-1248 12.5
MK-1248 3.125
MK-1248 ,78
MK-1248 0.195
IL-23 1000
IL-23 250
IL-23 62.5
IL-23 15.6
IL-23 3.9
IL-7 1000
IL-7 250
IL-7 62.5
IL-7 15.6
IL-7 3.9
IL-27 1000
IL-27 250
IL-27 62.5
IL-27 15.6
IL-27 3.9
IL-15 1000
IL-15 250
IL-15 62.5
IL-15 15.6
IL-15 3.9
IL-35 1000
IL-35 250
IL-35 62.5
IL-35 15.6
IL-35 3.9
DMSO 50
DMSO 12.5
DMSO 3.125
DMSO 0.78
DMSO 0.195
IL-21 1000
IL-21 250
IL-21 62.5
IL-21 15.6
IL-21 3.9

FIG.50B

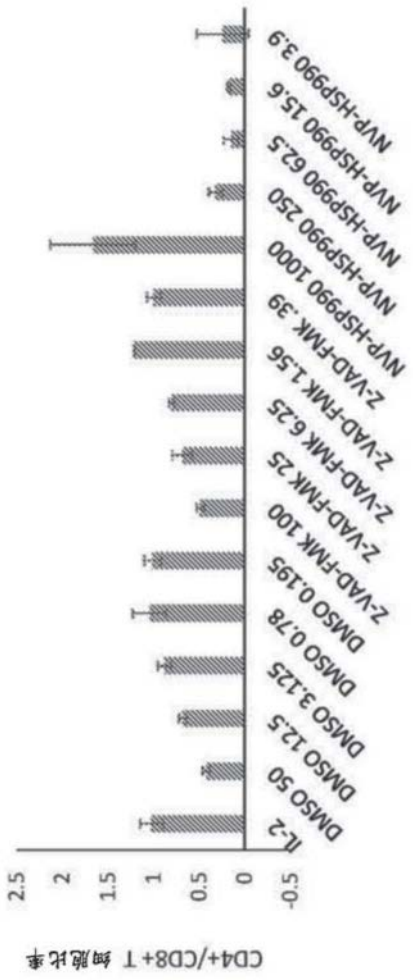

CD4+/CD8+ T 细胞比率
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
IL-2
DMSO 50
DMSO 12.5
DMSO 3.125
DMSO 0.78
DMSO 0.195
Z-VAD-FMK 100
Z-VAD-FMK 25
Z-VAD-FMK 6.25
Z-VAD-FMK 1.56
Z-VAD-FMK .39
NVP-HSP990 1000
NVP-HSP990 250
NVP-HSP990 62.5
NVP-HSP990 15.6
NVP-HSP990 3.9

FIG.50C