(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-544867
(P2024-544867A)
(43)公表日　令和6年12月5日(2024.12.5)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ　35/26　(2015.01)		Ａ６１Ｋ	35/26		４Ｂ０６５
Ａ６１Ｐ　35/00　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	35/00		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ　51/08　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	51/08	２００	４Ｃ０８５
Ａ６１Ｋ　31/675 (2006.01)		Ａ６１Ｋ	31/675		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	４Ｃ０８７

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全434頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-526955(P2024-526955)
(86)(22)出願日　令和4年11月9日(2022.11.9)
(85)翻訳文提出日　令和6年6月10日(2024.6.10)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/079519
(87)国際公開番号　WO2023/086803
(87)国際公開日　令和5年5月19日(2023.5.19)
(31)優先権主張番号　63/277,756
(32)優先日　令和3年11月10日(2021.11.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　519006377
アイオバンス バイオセラピューティクス，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０７０ サン カルロス インダストリアル ロード ８２５ スイート ４００
(74)代理人　100079108
弁理士　稲葉 良幸
(74)代理人　100109346
弁理士　大貫 敏史
(74)代理人　100117189
弁理士　江口 昭彦
(74)代理人　100134120
弁理士　内藤 和彦
(72)発明者　ヴォン フィンケンシュタイン，フリー
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＣＤ８腫瘍浸潤リンパ球を利用する拡張治療の方法

(57)【要約】
本明細書では、ＣＤ８＋濃縮ＴＩＬを取得及び拡張する方法が提供される。いくつかの実施形態では、対象ＴＩＬは、ＣＤ８＋濃縮ＴＩＬを含む腫瘍位置から産生される。本明細書では、そのようなＣＤ８＋濃縮ＴＩＬを産生するための拡張方法、及びそのようなＴＩＬを使用する治療方法も提供される。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、
（ａ）前記患者または前記対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、
（ｂ）前記１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から切除または生検された腫瘍試料から、前記腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｃ）任意選択で、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの前記採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの前記採取された第３のＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、
（ｉ）治療上有効な投与量の前記第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｈ）の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、を含む、前記方法。
【請求項２】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、
（ａ）前記患者または前記対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、
（ｂ）前記１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から切除または生検された腫瘍試料から、前記腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｃ）任意選択で、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

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

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

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

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

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

【請求項３】

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

（ａ）前記患者または前記対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、

（ｂ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から腫瘍試料を取得するための他の手段から、前記腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、

（ｃ）任意選択で、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、

（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団または任意選択で前記ＣＤ８＋濃縮ＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

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

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

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

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

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

【請求項４】

修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、
（ａ）前記患者または前記対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、
（ｂ）前記１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から腫瘍試料を切除するステップであって、前記腫瘍試料が、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記腫瘍試料を取得するための他の手段に任意選択で由来する第１のＴＩＬ集団を含むものであり、前記腫瘍試料が、前記がん由来の腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する、前記切除するステップと、
（ｃ）前記腫瘍を、複数の腫瘍断片に処理するステップと、
（ｄ）前記複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）任意選択で、前記ＣＤ８＋濃縮ＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、
（ｆ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団または任意選択で前記ＣＤ８＋濃縮ＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｇ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｉ）ステップ（ｈ）からの前記採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、
（ｊ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｉ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、
（ｋ）治療上有効な投与量の前記第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｇ）の前記注入バッグから前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、を含む、前記方法。
【請求項５】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、
（ａ）前記患者または前記対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、
（ｂ）前記１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍試料を取得するための他の手段によって獲得される前記腫瘍試料中の第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップであって、前記腫瘍試料が、前記対象または前記患者に由来する腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する、前記第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｃ）前記第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地と接触させるステップと、
（ｄ）前記第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミ

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

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

（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

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

【請求項６】

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

（ａ）前記患者または前記対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、

（ｂ）前記１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から腫瘍試料を切除するステップであって、前記腫瘍試料が、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記腫瘍試料を取得するための他の手段に任意選択で由来する第１のＴＩＬ集団を含むものであり、前記腫瘍試料が、前記がん由来の腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する、前記切除するステップと、

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

（ｄ）前記腫瘍断片または前記腫瘍消化物に含まれる前記第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地と接触させるステップと、

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

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

（ｇ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

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

【請求項７】

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

（ａ）前記患者または前記対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、

（ｂ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から腫瘍試料を取得するための他の手段から、前記腫瘍試料を複数の腫瘍断

片または腫瘍消化物に処理することによって第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップであって、前記腫瘍試料が、前記患者または前記対象における前記がんに由来する腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する、前記第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、

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

（ｄ）任意選択で、前記第２のＴＩＬ集団をＯＫＴ－３で再刺激するステップと、

（ｅ）前記修飾された第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の培養培地中で培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記急速な第２の拡張が、約１４日以内の第２の期間行われ、治療的ＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

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

【請求項８】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、

（ａ）がんに罹患している患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得ることと、

（ｂ）前記１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から切除した腫瘍試料から、前記腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または前記腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

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

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

（ｅ）ステップ（ｄ）から取得された前記治療的ＴＩＬ集団を採取することと、

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

【請求項９】

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

（ａ）がんに罹患している患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは

細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、
（ｂ）前記１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から切除した腫瘍試料から、前記腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｃ）任意選択で、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの前記採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、を含む、前記方法。
【請求項１０】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、前記方法が、
（ａ）がんに罹患している患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、
（ｂ）前記１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から切除した腫瘍試料から、前記腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｃ）任意選択で、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行って第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行って、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく

起こる、前記採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの前記採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、を含む、前記方法。
【請求項１１】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、前記方法が、
（ａ）がんに罹患している患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、
（ｂ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記１つ以上の特定されたＣＤ８＋＿腫瘍位置から腫瘍試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップであって、前記腫瘍試料が、患者または対象におけるがんに由来する腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する、前記第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｃ）任意選択で、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行って第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行って、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの前記採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、を含む、前記方法。
【請求項１２】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、前記方法が、
（ａ）がんに罹患している患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、
（ｂ）前記１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から腫瘍試料を切除するステップであって、前記腫瘍試料が、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記腫瘍試料を取得するための他の手段に任意選択で由来する第１のＴＩＬ集団を含むものであり、前記腫瘍試料が、前記がん由来の腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する、前記切除するステップと、
（ｃ）前記腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理するステップと、
（ｄ）前記複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｅ）任意選択で、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、
（ｆ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｇ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｉ）ステップ（ｈ）からの前記採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、を含む、前記方法。
【請求項１３】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、前記方法が、
（ａ）がんに罹患している患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、
（ｂ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から腫瘍試料を取得するための他の手段から、前記腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップであって、前記腫瘍試料が、前記患者または前記対象における前記がんに由来する腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する、前記第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｃ）前記第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地と接触させるステップと、
（ｄ）前記第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行って第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、前記プライミングによる第１の拡張が１～８日の期間にわたって起こる、前記第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行って第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、前記急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第２の拡張が、前記急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、または１０日にわたって進行することができる、前記第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、を含む、前記方法。
【請求項１４】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、前記方法が、
（ａ）がんに罹患している患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは

細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、
（ｂ）前記１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から腫瘍試料を切除するステップであって、前記腫瘍試料が、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記腫瘍試料を取得するための他の手段に任意選択で由来する第１のＴＩＬ集団を含むものであり、前記腫瘍試料が、前記がん由来の腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する、前記切除するステップと、
（ｂ）前記腫瘍試料を腫瘍断片または腫瘍消化物に断片化または処理するステップと、
（ｃ）前記腫瘍断片または前記腫瘍消化物に含まれる前記第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地と接触させるステップと、
（ｄ）前記第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行って、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、前記プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、前記第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、前記急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第２の拡張が、前記急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、前記第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、を含む、前記方法。
【請求項１５】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、
（ａ）がんに罹患している患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得ることと、
（ｂ）前記１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から切除した腫瘍試料から、前記腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｃ）ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行って第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記プライミングによる第１の拡張が、約１～１１日の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団が、前記第１のＴＩＬ集団より数が多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）前記第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行って第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記急速な第２の拡張が、約１～１１日の第２の期間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）ステップ（ｃ）から取得された前記治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、前記方法。
【請求項１６】
前記プライミングによる第１の拡張ステップにおいて、前記細胞培養培地が、抗原提示細胞（ＡＰＣ）をさらに含み、前記急速な第２の拡張ステップにおける前記培養培地中のＡＰＣの数が、前記プライミングによる第１の拡張ステップにおける前記培養培地中のＡＰＣの数より多い、請求項５～８または１３～１５のいずれかに記載の方法。
【請求項１７】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、
（ａ）がんに罹患している患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得ることと、
（ｂ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から腫瘍試料を取得するための他の手段から、前記腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することであって、前記腫瘍試料が、前記患者または前記対象における前記がんに由来する腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する、前記第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｃ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第１の拡張が、約１～１１日の第１の期間行われ、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団が、前記第１のＴＩＬ集団より数が多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）任意選択で、前記第２のＴＩＬ集団をＯＫＴ－３で再刺激することと、
（ｅ）前記修飾された第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の培養培地中で培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記急速な第２の拡張が、約１４日以内の第２の期間行われ、前記治療的ＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団を採取することと、を含む、前記方法。
【請求項１８】
前記がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される、請求項１～１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
前記ＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定するステップが、（ｉ）ＣＤ８検出剤を前記患者または前記対象に投与することと、（ｉｉ）前記ＣＤ８検出剤から検出されるシグナルを造影することによって示されるＣＤ８＋細胞の数及び／または局在化を造影及び／または決定することと、を含む、請求項１～１８のいずれかに記載の方法。
【請求項２０】
前記ＣＤ８検出剤が、ＣＤ８に特異的に結合するＣＤ８結合ドメインを含む、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記ＣＤ８検出剤が、抗ＣＤ８ミニボディを含む、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
前記ＣＤ８検出剤が、前記ＣＤ８結合ドメインに直接的または間接的にコンジュゲートされた検出可能なマーカーをさらに含む、請求項１９～２１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３】
前記検出可能なマーカーが、^{89}Ｚｒである、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
^{89}Ｚｒが、デフェロキサミンを介して前記抗ＣＤ８ミニボディに間接的にコンジュゲートされている、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
前記ＣＤ８＋細胞の数及び／または局在化を造影及び／または決定することが、前記患

者に対してＰＥＴ走査またはＣＴ走査を行うことと、前記ＰＥＴ走査または前記ＣＴ走査から造影データを収集することと、を含む、請求項１９～２４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２６】

前記第１の拡張が、約１１日の期間にわたって行われる、請求項１～４及び９～１２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２７】

前記プライミングによる第１の拡張が、約１１日の期間にわたって行われる、請求項５～８及び１３～１８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２８】

前記ＩＬ－２が、前記第１の拡張において、前記細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する、請求項１～４及び９～１２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２９】

前記ＩＬ－２が、前記プライミングによる第１の拡張において、前記細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する、請求項５～８及び１３～１８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３０】

前記第２の拡張ステップにおいて、前記ＩＬ－２が、１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在し、前記ＯＫＴ－３抗体が、約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する、請求項１～４及び９～１２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３１】

前記急速な第２の拡張ステップにおいて、前記ＩＬ－２が、１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在し、前記ＯＫＴ－３抗体が、約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する、請求項５～８及び１３～１８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３２】

前記第１の拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項１～４及び９～１２に記載の方法。

【請求項３３】

前記プライミングによる第１の拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項５～８及び１３～１８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３４】

前記第２の拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項１～４及び９～１２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３５】

前記急速な第２の拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項５～８及び１３～１８に記載の方法。

【請求項３６】

前記第１の拡張の前記細胞培養培地が、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む、請求項１～４及び９～１２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３７】

前記プライミングによる第１の拡張の前記細胞培養培地が、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む、請求項５～８及び１３～１８に記載の方法。

【請求項３８】

前記第２の拡張の前記細胞培養培地が、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む、請求項１～４及び９～１２のいずれか１項のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３９】

前記急速な第２の拡張の前記細胞培養培地が、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む、請求項５～８及び１３～１８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４０】

前記第３のＴＩＬ集団を前記患者に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含む、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４１】

前記骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む、請求項４０に記載の方法。

【請求項４２】

前記骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、及びフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む、請求項４０に記載の方法。

【請求項４３】

前記骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、及びフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で１日間投与するステップを含む、請求項４０に記載の方法。

【請求項４４】

前記シクロホスファミドが、メスナとともに投与される、請求項４１～４３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４５】

前記患者への前記ＴＩＬの投与の翌日に開始するＩＬ－２レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含む、請求項１～７または４０～４４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４６】

前記患者への前記ＴＩＬの投与と同じ日に開始するＩＬ－２レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含む、請求項１～７または４０～４４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４７】

前記ＩＬ－２レジメンが、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される、６００，０００もしくは７２０，０００ＩＵ／ｋｇのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを含む高用量ＩＬ－２レジメンである、請求項４５または４６に記載の方法。

【請求項４８】

治療上有効なＴＩＬ集団が投与され、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}ＴＩＬを含む、請求項１～７または請求項４０～４４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４９】

前記プライミングによる第１の拡張及び急速な第２の拡張が、２１日以内の期間にわたって行われる、請求項５～８及び１３～１８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５０】

前記プライミングによる第１の拡張及び急速な第２の拡張が、１６日または１７日以内の期間にわたって行われる、請求項５～８及び１３～１８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５１】

前記プライミングによる第１の拡張が、７日または８日以内の期間にわたって行われる、請求項５～８及び１３～１８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５２】

前記急速な第２の拡張が、１１日以内の期間にわたって行われる、請求項５～８及び１

３～１８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５３】
前記第１の拡張及び前記第２の拡張が、各々１１日の期間内に個別に行われる、請求項１～４及び９～１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５４】
前記取得するステップ～前記採取するステップ、または前記切除するステップ～前記採取するステップが、約２６日以内に行われる、請求項１～１８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５５】
前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することが、酵素培地中で前記腫瘍試料をインキュベートすることを含む、請求項１～２、４、６、８～１０、１２、及び１４～１５のいずれかに記載の方法。
【請求項５６】
前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することが、前記腫瘍試料を機械的に破壊して前記腫瘍試料を解離することをさらに含む、請求項１～２、４、６、８～１０、１２、及び１４～１５のいずれかに記載の方法。
【請求項５７】
前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することが、密度勾配分離を使用して前記解離された腫瘍試料を精製することをさらに含む、請求項１～２、４、６、８～１０、１２、及び１４～１５のいずれかに記載の方法。
【請求項５８】
前記酵素培地が、ＤＮａｓｅを含む、請求項５５に記載の方法。
【請求項５９】
前記酵素培地が、３０単位／ｍＬのＤＮａｓｅを含む、請求項５８に記載の方法。
【請求項６０】
前記酵素培地が、コラゲナーゼを含む、請求項５５に記載の方法。
【請求項６１】
前記酵素培地が、１．０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼを含む、請求項６０に記載の方法。
【請求項６２】
採取された前記治療的ＴＩＬ集団が、対象に治療上有効な投与量を投与する際に使用するのに十分なＴＩＬを含む、請求項１～１８のいずれかに記載の方法。
【請求項６３】
前記治療上有効な投与量が、約1×10^{9}～約9×10^{10}ＴＩＬを含む、請求項６２のいずれかに記載の方法。
【請求項６４】
前記ＡＰＣが、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を含む、請求項１～１８のいずれかに記載の方法。
【請求項６５】
採取された前記治療的ＴＩＬ集団が、前記第１及び／または第２のＴＩＬ集団と比較して増加したＣＤ８＋細胞の亜集団を示す、請求項１～１８のいずれかに記載の方法。
【請求項６６】
前記ＰＢＭＣが、約１：２５のＴＩＬ：ＰＢＭＣの比で補充される、請求項６４に記載の方法。
【請求項６７】
前記第１の拡張または前記プライミングによる第１の拡張、及び前記第２の拡張または前記急速な第２の拡張が、各々１１～１２日の期間内で個別に行われる、請求項１～６６のいずれかに記載の方法。
【請求項６８】
ステップ（ｂ）～（ｅ）、（ｆ）、または（ｇ）が、約１０日～約２４日で行われる、請求項１～６７のいずれかに記載の方法。

【請求項６９】
ステップ（ｂ）～（ｅ）、（ｆ）、または（ｇ）が、約１５日～約２４日で行われる、請求項１～６７のいずれかに記載の方法。
【請求項７０】
ステップ（ｂ）～（ｅ）、（ｆ）、または（ｇ）が、約２０日～約２４日で行われる、請求項１～６７のいずれかに記載の方法。
【請求項７１】
ステップ（ｂ）～（ｅ）、（ｆ）、または（ｇ）が、約２０日～約２２日で行われる、請求項１～６７のいずれかに記載の方法。
【請求項７２】
前記第２のＴＩＬ集団が、前記第１のＴＩＬ集団よりも数が少なくとも５０倍多い、請求項１～１８のいずれかに記載の方法。
【請求項７３】
請求項１～７２に記載の方法のいずかに従って取得可能なＴＩＬ集団。
【請求項７４】
先行請求項のいずれかに従ってがんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行うための、先行請求項のいずれかに従って取得可能な治療的ＴＩＬ集団。
【請求項７５】
がんを有する患者から腫瘍試料を取得する方法であって、
（ｉ）ＣＤ８に特異的に結合するＣＤ８検出剤を前記患者に投与することと、
（ｉｉ）ＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定することであって、前記ＣＤ８検出剤から検出されるシグナルを造影することによって示されるＣＤ８＋細胞の数及び／または局在化を造影及び／または決定することを含む、前記特定することと、
（ｉｉｉ）（ｉｉ）における前記１つ以上の腫瘍位置において、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記患者由来の腫瘍細胞とＣＤ８＋細胞との混合物を含有する腫瘍試料を取得するための他の手段を行うことと、を含む、前記方法。
【請求項７６】
本出願に開示の１つ以上の要素を特徴とする、がんを有する対象の治療のための薬剤の調製におけるＴＩＬの使用を含む、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を含む組成物製品、プロセス、または系の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０２１年１１月１０日に出願された米国仮特許出願第６３／２７７，７５６号の優先権を主張するものであり、当該仮出願は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００２】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の養子自家移入を使用した巨大な不応性がんの治療は、予後不良の患者の治療に対する強力なアプローチとなる。Ｇａｔｔｉｎｏｎｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００６，６，３８３－３９３。ＴＩＬはＴ細胞に支配され、ＩＬ－２ベースのＴＩＬ拡張とそれに続く「急速拡張プロセス」（ＲＥＰ）は、その速度及び効率のためにＴＩＬ拡張の好ましい方法になっている。Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ２００２，２９８，８５０－５４、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００５，２３，２３４６－５７、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００８，２６，５２３３－３９、Ｒｉｄｄｅｌｌ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ １９９２，２５７，２３８－４１、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００３，２６，３３２－４２。黒色腫におけるＴＩＬ療法への応答を改善し、ＴＩＬ療法を他の腫瘍タイプに拡大するための多

くのアプローチが限られた成功を収めており、この分野は依然として困難である。Ｇｏｆｆ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２０１６，３４，２３８９－９７、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００８，２６，５２３３－３９、Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１１，１７，４５５０－５７。単一免疫チェックポイント阻害剤との併用研究も記載されているが、さらなる研究が進行中であり、追加の治療方法が必要である（Ｋｖｅｒｎｅｌａｎｄ，ｅｔ ａｌ．，Ｏｎｃｏｔａｒｇｅｔ，２０２０，１１（２２），２０９２－２１０５）。

【０００３】

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

【０００４】

本発明は、本明細書に記載のＣＤ８事前選択を受けたＴＩＬによるがんの治療のための治療効果が増加した治療的ＴＩＬ集団を調製するために、ＴＩＬを調製するための改善及び／または短縮されたプロセス及び方法を提供する。

【発明の概要】

【０００５】

本明細書では、修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法が提供され、該方法は、

（ａ）患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、

（ｂ）１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から切除または生検された腫瘍試料から、腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、

（ｃ）任意選択で、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、

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

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

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

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

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

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

【０００６】

いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、当該方法は、

（ａ）患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、

（ｂ）１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から切除または生検された腫瘍試料から、腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、

（ｃ）任意選択で、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、

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

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

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

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

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

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

【０００７】

いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

（ａ）患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、

（ｂ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から腫瘍試料を取得するための他の手段から、腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、

（ｃ）任意選択で、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、

（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団または任意選択でＣＤ８＋濃縮ＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ス

テップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、
（ｉ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｈ）の注入バッグから対象に投与するステップと、を含む。

【０００８】

いくつかの実施形態では、本開示は、修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、当該方法は、
（ａ）患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、
（ｂ）１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から腫瘍試料を切除するステップであって、腫瘍試料が、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍試料を取得するための他の手段に任意選択で由来する第１のＴＩＬ集団を含むものであり、腫瘍試料が、がん由来の腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する、切除するステップと、
（ｃ）腫瘍を、複数の腫瘍断片に処理するステップと、
（ｄ）複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）任意選択で、ＣＤ８＋濃縮ＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、
（ｆ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団または任意選択でＣＤ８＋濃縮ＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｉ）ステップ（ｈ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

（ｊ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｉ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、
（ｋ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｇ）の注入バッグからがんを有する対象または患者に投与するステップと、を含む。
【０００９】
いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、当該方法は、
（ａ）患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、
（ｂ）１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍試料を取得するための他の手段によって獲得される腫瘍試料中の第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップであって、腫瘍試料が、対象または患者に由来する腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する、第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｃ）第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地と接触させるステップと、
（ｄ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行って第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が１～８日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行って第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、または１０日にわたって進行することができる、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｆ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｇ）第３のＴＩＬ集団の治療上有効な部分を、がんを有する対象または患者に投与するステップと、を含む。
【００１０】
いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、当該方法は、
（ａ）患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、
（ｂ）１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から腫瘍試料を切除するステップであって、腫瘍試料が、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍試料を取得するための他の手段に任意選択で由来する第１のＴＩＬ集団を含むものであり、腫瘍試料が、がん由来の腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する、切除するステップと、
（ｃ）腫瘍試料を腫瘍断片に断片化するか、または腫瘍試料を腫瘍消化物に処理するステップと、
（ｄ）腫瘍断片または腫瘍消化物に含まれる第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地と接触させるステップと、
（ｅ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行って第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が１～８日の期間にわたって起こる

、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｆ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｇ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｈ）第３のＴＩＬ集団の治療上有効な部分を、がんを有する対象または患者に投与するステップと、を含む。

【００１１】
いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、当該方法は、
（ａ）患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、
（ｂ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から腫瘍試料を取得するための他の手段から、腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップであって、腫瘍試料が、患者または対象におけるがんに由来する腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する、第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｃ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が、約１～１１日の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団より数が多い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をＯＫＴ－３で再刺激するステップと、
（ｅ）修飾された第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の培養培地中で培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、急速な第２の拡張が、約１４日以内の第２の期間行われて、治療的ＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｇ）第３のＴＩＬ集団の治療上有効な部分を、がんを有する対象または患者に投与するステップと、を含む。

【００１２】
いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法を提供し、当該方法は、
（ａ）がんに罹患している患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得ることと、
（ｂ）１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から切除した腫瘍試料から、腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｃ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、プライミングによる第１の拡張が、第１の

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

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

（ｅ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、

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

【００１３】

いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法を提供し、当該方法は、

（ａ）がんに罹患している患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、

（ｂ）１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から切除した腫瘍試料から、腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、

（ｃ）任意選択で、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、

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

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

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

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

【００１４】

いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

（ａ）がんに罹患している患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、

（ｂ）１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から切除した腫瘍試料から、腫瘍試料を

複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｃ）任意選択で、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、を含む。

【００１５】
いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法を提供し、当該方法は、
（ａ）がんに罹患している患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、
（ｂ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から腫瘍試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップであって、腫瘍試料が、患者または対象におけるがんに由来する腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する、第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｃ）任意選択で、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、を含む。

【００１６】
いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法を提供し、該方法は、
（ａ）がんに罹患している患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、
（ｂ）１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から腫瘍試料を切除するステップであって、腫瘍試料が、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍試料を取得するための他の手段に任意選択で由来する第１のＴＩＬ集団を含むものであり、腫瘍試料が、がん由来の腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する、切除するステップと、
（ｃ）腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理するステップと、
（ｄ）複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）任意選択で、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、
（ｆ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｉ）ステップ（ｈ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、を含む。
【００１７】
いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法を提供し、当該方法は、
（ａ）がんに罹患している患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、
（ｂ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から腫瘍試料を取得するための他の手段から、腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップであって、腫瘍試料が、患者または対象におけるがんに由来する腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する、第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｃ）第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地と接触させるステップと、
（ｄ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行って第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が１～８日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行って第３のＴ

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

（ｆ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、を含む。

【００１８】

いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法を提供し、当該方法は、

（ａ）がんに罹患している患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得るステップと、

（ｂ）１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から腫瘍試料を切除するステップであって、腫瘍試料が、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍試料を取得するための他の手段に任意選択で由来する第１のＴＩＬ集団を含むものであり、腫瘍試料が、がん由来の腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する、切除するステップと、

（ｂ）腫瘍試料を腫瘍断片または腫瘍消化物に断片化または処理するステップと、

（ｃ）腫瘍断片または腫瘍消化物に含まれる第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地と接触させるステップと、

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

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

（ｆ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、を含む。

【００１９】

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

（ａ）がんに罹患している患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得ることと、

（ｂ）１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から切除した腫瘍試料から、腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｃ）ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行って第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が、約１～１１日の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団より数が多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行って第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が、約１～１１日の第２の期間行われて、第３のＴＩＬ集団を取

得し、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）ステップ（ｃ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む。

【００２０】

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

【００２１】

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

（ａ）がんに罹患している患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定して、腫瘍切除または生検（針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、もしくは細針吸引（ＦＮＡ）など）に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置を得ることと、

（ｂ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置から腫瘍試料を取得するための他の手段から、腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することであって、腫瘍試料が、患者または対象におけるがんに由来する腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する、第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

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

（ｄ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をＯＫＴ－３で再刺激することと、

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

（ｆ）第３のＴＩＬ集団を採取することと、を含む。

【００２２】

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

【００２３】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定するステップは、（ｉ）ＣＤ８検出剤を患者または対象に投与することと、（ｉｉ）ＣＤ８検出剤から検出されるシグナルを造影することによって示されるＣＤ８＋細胞の数及び／または局在化を造影及び／または決定することと、を含む。

【００２４】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８検出剤は、ＣＤ８に特異的に結合するＣＤ８結合ドメインを含む。

【００２５】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８検出剤は、抗ＣＤ８ミニボディを含む。

【００２６】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８検出剤は、ＣＤ８結合ドメインに直接的または間接的

にコンジュゲートされた検出可能なマーカーをさらに含む。
【００２７】
いくつかの実施形態では、検出可能なマーカーは、^{89}Ｚｒである。
【００２８】
いくつかの実施形態では、^{89}Ｚｒは、デフェロキサミンを介して抗ＣＤ８ミニボディに間接的にコンジュゲートされる。
【００２９】
いくつかの実施形態では、ＣＤ８＋細胞の数及び／または局在化を造影及び／または決定することは、患者に対してＰＥＴ走査またはＣＴ走査を行うことと、ＰＥＴ走査またはＣＴ走査から造影データを収集することと、を含む。
【００３０】
いくつかの実施形態では、第１の拡張は、約１１日の期間にわたって行われる。
【００３１】
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、約１１日の期間にわたって行われる。
【００３２】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。
【００３３】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、プライミングによる第１の拡張において、細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。
【００３４】
いくつかの実施形態では、第２の拡張ステップにおいて、ＩＬ－２は、１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在し、ＯＫＴ－３抗体は、約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する。
【００３５】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップにおいて、ＩＬ－２は、１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在し、ＯＫＴ－３抗体は、約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する。
【００３６】
いくつかの実施形態では、第１の拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。
【００３７】
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。
【００３８】
いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。
【００３９】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。
【００４０】
いくつかの実施形態では、第１の拡張の細胞培養培地は、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。
【００４１】
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張の細胞培養培地は、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。
【００４２】
いくつかの実施形態では、第２の拡張の細胞培養培地は、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。

【００４３】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張の細胞培養培地は、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。
【００４４】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、第３のＴＩＬ集団を患者に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。
【００４５】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む。
【００４６】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む。
【００４７】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で１日間投与するステップを含む。
【００４８】
いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。
【００４９】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、ＴＩＬを患者に投与した翌日から開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。
【００５０】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、ＴＩＬを患者に投与したのと同じ日に開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。
【００５１】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される、６００，０００もしくは７２０，０００ＩＵ／ｋｇのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを含む高用量ＩＬ－２レジメンである。
【００５２】
いくつかの実施形態では、治療上有効なＴＩＬ集団が投与され、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}ＴＩＬを含む。
【００５３】
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張及び急速な第２の拡張は、２１日以内の期間にわたって行われる。
【００５４】
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張及び急速な第２の拡張は、１６日または１７日以内の期間にわたって行われる。
【００５５】
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、７日または８日以内の期間にわたって行われる。
【００５６】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、１１日以内の期間にわたって行われる。
【００５７】
いくつかの実施形態では、第１の拡張及び第２の拡張は、各々、１１日の期間内で個別

に行われる。
【００５８】
いくつかの実施形態では、取得するステップ～採取するステップ、または切除するステップ～採取するステップは、約２６日以内に行われる。
【００５９】
いくつかの実施形態では、対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することは、腫瘍試料を酵素培地中でインキュベートすることを含む。
【００６０】
いくつかの実施形態では、対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することは、腫瘍試料を機械的に破壊して腫瘍試料を解離することをさらに含む。
【００６１】
いくつかの実施形態では、対象から取得された腫瘍試料を処理することは、密度勾配分離を使用して解離された腫瘍試料を精製することをさらに含む。
【００６２】
いくつかの実施形態では、酵素培地は、ＤＮａｓｅを含む。いくつかの実施形態では、酵素培地は、３０単位／ｍＬのＤＮａｓｅを含む。
【００６３】
いくつかの実施形態では、酵素培地は、コラゲナーゼを含む。いくつかの実施形態では、酵素培地は、１．０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼを含む。
【００６４】
いくつかの実施形態では、採取された治療的ＴＩＬ集団は、治療上有効な投与量を対象に投与する際に使用するのに十分なＴＩＬを含む。
【００６５】
いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約1×10^{9}～約9×10^{10}のＴＩＬを含む。
【００６６】
いくつかの実施形態では、ＡＰＣは、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を含む。
【００６７】
いくつかの実施形態では、採取された治療的ＴＩＬ集団は、第１及び／または第２のＴＩＬ集団と比較して増加したＣＤ８＋細胞の亜集団を示す。
【００６８】
いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、約１：２５のＴＩＬ：ＰＢＭＣの比で補充される。
【００６９】
いくつかの実施形態では、第１の拡張またはプライミングによる第１の拡張、及び第２の拡張または急速な第２の拡張は、各々、１１～１２日の期間内で個別に行われる。
【００７０】
いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）～（ｅ）、（ｆ）または（ｇ）は、約１０日～約２４日で行われる。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）～（ｅ）、（ｆ）または（ｇ）は、約１５日～約２４日で行われる。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）～（ｅ）、（ｆ）または（ｇ）は、約２０日～約２４日で行われる。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）～（ｅ）、（ｆ）または（ｇ）は、約２０日～約２２日で行われる。
【００７１】
いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数が少なくとも５０倍多い。
【００７２】
いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書で提供される方法のいずれかに従って取得することが可能なＴＩＬ集団を提供する。
【００７３】

いくつかの実施形態では、本開示は、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行うための、本明細書で提供される方法のいずれか１つに従って取得することが可能な治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【００７４】

いくつかの実施形態では、本開示は、がんを有する患者から腫瘍試料を取得する方法を提供し、当該方法は、

（ｉ）ＣＤ８に特異的に結合するＣＤ８検出剤を患者に投与することと、

（ｉｉ）ＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定することであって、ＣＤ８検出剤から検出されるシグナルを造影することによって示されるＣＤ８＋細胞の数及び／または局在化を造影及び／または決定することを含む、特定することと、

（ｉｉｉ）（ｉｉ）における１つ以上の腫瘍位置において、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者由来の腫瘍細胞とＣＤ８＋細胞との混合物を含有する腫瘍試料を取得するための他の手段を行うことと、

を含む。

【図面の簡単な説明】

【００７５】

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

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

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

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

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

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

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

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

【図７】例示的なＧｅｎ３型ＴＩＬ製造プロセス。

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

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

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

【図８Ｄ】ステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的な修正Ｇｅｎ２様プロセス（およそ２２日プロセス）。

【図９】Ｇｅｎ２（プロセス２Ａ）とＧｅｎ３プロセスとの比較のための実験フローチャートを提供する。

【図１０】様々なＧｅｎ２（プロセス２Ａ）とＧｅｎ３．１プロセス実施形態との比較を示す。

【図１１】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１及びＧｅｎ３．０プロセスの実施形態の様々な特徴を説明する表。

【図１２】Ｇｅｎ３．１と称される、Ｇｅｎ３プロセスの実施形態のための培地条件の概要。

【図１３】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１及びＧｅｎ３．０プロセスの実施形態の様々な特徴を

説明する表。
【図１４】Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３．０プロセスの実施形態の様々な特徴を比較する表。
【図１５】記載された拡張プロセスの様々な実施形態における培地の使用を提供する表。
【図１６】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図１７】Ｇｅｎ３拡張プラットフォームを使用して造血器悪性腫瘍からＴ細胞を拡張するための方法の例示的な実施形態の概略図。
【図１８】構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂを提供する。円筒は、個々のポリペプチド結合ドメインを指す。構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂは、例えば、４－１ＢＢＬまたは４－１ＢＢに結合する抗体から誘導される３つの線形に結合したＴＮＦＲＳＦ結合ドメインを含み、これらを折り畳んで三価タンパク質を形成し、次いでこれをＩｇＧ１－Ｆｃ（ＣＨ３及びＣＨ２ドメインを含む）によって第２の三価タンパク質に結合し、次いでこれを使用して、三価タンパク質のうちの２つをジスルフィド結合（小さい長楕円）によって一緒に結合し、構造を安定化し、６つの受容体及びシグナル伝達タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを一緒にして、シグナル伝達複合体を形成することができるアゴニストを提供する。円筒として示されるＴＮＦＲＳＦ結合ドメインは、例えば、親水性残基及び柔軟性のためのＧｌｙ及びＳｅｒ配列、ならびに溶解性のためのＧｌｕ及びＬｙｓを含み得るリンカーによって結合されたV_H鎖及びV_L鎖を含む、ｓｃＦｖドメインであり得る。
【図１９】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２０】Ｇｅｎ３．１プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態のプロセス概要を提供する。
【図２１】Ｇｅｎ３．１試験プロセス（１６～１７日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２２】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２３】例示的なＧｅｎ２プロセス及び例示的なＧｅｎ３プロセスの比較表。
【図２４】Ｇｅｎ３プロセス（１６／１７日プロセス）の調製タイムラインの例示的な実施形態の概略図。
【図２５】Ｇｅｎ３プロセス（１４～１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２６Ａ】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２６Ｂ】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２７】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２８】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１、及びＧｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の実施形態の比較。
【図２９】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１、及びＧｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の実施形態の比較。
【図３０】Ｇｅｎ３実施形態の構成要素。
【図３１】Ｇｅｎ３実施形態のフローチャート比較（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、Ｇｅｎ３．１試験）。
【図３２】Ｇｅｎ３プロセス（１６～１７日プロセス）の例示的な実施形態の構成要素が示される。
【図３３】承認基準表。
【図３４】ＣＤ８＋Ｔ細胞が免疫療法の多機能性マーカーであることを実証する予後値及び予測値のまとめを提供する。
【図３５】ＣＤ８　ＩｍｍｕｎｏＰＥＴ製品^{89}Ｚｒ－Ｄｆ－クレフミリマブ（Ｃｒｅｆｍｉｒｌｉｍａｂ）のまとめを提供する。
【図３６】全身ＣＤ８　ＩｍｍｕｎｏＰＥＴを提供し、それによってリッチデータを得られることを実証するものである。
【図３７】ＣＤ８　ＰＥＴの画像を提供し、これらの画像は、免疫療法（ＩＯＴ）に応じたＣＤ８＋細胞分布の変化がＣＤ８　ＰＥＴによって測定されることを実証するものである。
【図３８】ＩＯＴに対する後の応答を１ヶ月時点でのＣＤ８　ＰＥＴが予測することを実

証した症例研究の結果を提供する。
【図３９】ＣＤ８　ＩｍｍｕｎｏＰＥＴが予後値を示すことを実証した症例研究の結果を提供する。
【図４０】臨床薬開発におけるＣＤ８造影の使用のまとめを提供する。
【図４１Ａ】自己細胞療法でのＣＤ８造影の実施形態のまとめを提供する。
【図４１Ｂ】自己細胞療法でのＣＤ８造影の実施形態のまとめを提供する。
【図４２】診断能についてＣＤ８　ＰＥＴを免疫組織化学（ＩＨＣ）と相関付ける実施形態のまとめを提供する。
【００７６】
配列表の簡単な説明
　配列番号１は、ムロモナブの重鎖のアミノ酸配列である。
【００７７】
　配列番号２は、ムロモナブの軽鎖のアミノ酸配列である。
【００７８】
　配列番号３は、組換えヒトＩＬ－２タンパク質のアミノ酸配列である。
【００７９】
　配列番号４は、アルデスロイキンのアミノ酸配列である。
【００８０】
　配列番号５は、ＩＬ－２形態である。
【００８１】
　配列番号６は、ネムバロイキンアルファのアミノ酸配列である。
【００８２】
　配列番号７は、ＩＬ－２形態である。
【００８３】
　配列番号８は、ムチンドメインポリペプチドである。
【００８４】
　配列番号９は、組換えヒトＩＬ－４タンパク質のアミノ酸配列である。
【００８５】
　配列番号１０は、組換えヒトＩＬ－７タンパク質のアミノ酸配列である。
【００８６】
　配列番号１１は、組換えヒトＩＬ－１５タンパク質のアミノ酸配列である。
【００８７】
　配列番号１２は、組換えヒトＩＬ－２１タンパク質のアミノ酸配列である。
【００８８】
　配列番号１３は、ＩＬ－２配列である。
【００８９】
　配列番号１４は、ＩＬ－２ムテイン配列である。
【００９０】
　配列番号１５は、ＩＬ－２ムテイン配列である。
【００９１】
　配列番号１６は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２である。
【００９２】
　配列番号１７は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ２である。
【００９３】
　配列番号１８は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ３である。
【００９４】
　配列番号１９は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２カバットである。
【００９５】
　配列番号２０は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ２カバットである。

【００９６】
配列番号２１は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ３カバットである。
【００９７】
配列番号２２は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２クロチアである。
【００９８】
配列番号２３は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ２クロチアである。
【００９９】
配列番号２４は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ３クロチアである。
【０１００】
配列番号２５は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２　ＩＭＧＴである。
【０１０１】
配列番号２６は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ２　ＩＭＧＴである。
【０１０２】
配列番号２７は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ３　ＩＭＧＴである。
【０１０３】
配列番号２８は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のV_H鎖である。
【０１０４】
配列番号２９は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１の重鎖である。
【０１０５】
配列番号３０は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ１カバットである。
【０１０６】
配列番号３１は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ２カバットである。
【０１０７】
配列番号３２は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ３カバットである。
【０１０８】
配列番号３３は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ１　ｃｈｏｔｈｉａである。
【０１０９】
配列番号３４は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ２　ｃｈｏｔｈｉａである。
【０１１０】
配列番号３５は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ３　ｃｈｏｔｈｉａである。
【０１１１】
配列番号３６は、V_L鎖である。
【０１１２】
配列番号３７は、軽鎖である。
【０１１３】
配列番号３８は、軽鎖である。
【０１１４】
配列番号３９は、軽鎖である。
【０１１５】
配列番号４０は、ヒト４－１ＢＢのアミノ酸配列である。
【０１１６】
配列番号４１は、マウス４－１ＢＢのアミノ酸配列である。
【０１１７】
配列番号４２は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖である。
【０１１８】
配列番号４３は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖である。

【０１１９】
配列番号４４は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖可変領域（V_H）である。
【０１２０】
配列番号４５は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０１２１】
配列番号４６は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖ＣＤＲ１である。
【０１２２】
配列番号４７は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖ＣＤＲ２である。
【０１２３】
配列番号４８は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖ＣＤＲ３である。
【０１２４】
配列番号４９は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０１２５】
配列番号５０は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０１２６】
配列番号５１は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０１２７】
配列番号５２は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖である。
【０１２８】
配列番号５３は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖である。
【０１２９】
配列番号５４は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０１３０】
配列番号５５は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０１３１】
配列番号５６は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖ＣＤＲ１である。
【０１３２】
配列番号５７は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖ＣＤＲ２である。
【０１３３】
配列番号５８は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖ＣＤＲ３である。
【０１３４】
配列番号５９は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０１３５】
配列番号６０は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６

３５１３）の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０１３６】
配列番号６１は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０１３７】
配列番号６２は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のＦｃドメインである。
【０１３８】
配列番号６３は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１３９】
配列番号６４は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１４０】
配列番号６５は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１４１】
配列番号６６は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１４２】
配列番号６７は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１４３】
配列番号６８は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１４４】
配列番号６９は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１４５】
配列番号７０は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１４６】
配列番号７１は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１４７】
配列番号７２は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１４８】
配列番号７３は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のＦｃドメインである。
【０１４９】
配列番号７４は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１５０】
配列番号７５は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１５１】
配列番号７６は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１５２】
配列番号７７は、４－１ＢＢリガンド（４－１ＢＢＬ）アミノ酸配列である。
【０１５３】
配列番号７８は、４－１ＢＢＬポリペプチドの可溶性部分である。
【０１５４】
配列番号７９は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン１の重鎖可変領域（V_H）である。
【０１５５】
配列番号８０は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン１の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０１５６】
配列番号８１は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン２の重鎖可変領域（V_H）である。
【０１５７】
配列番号８２は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン２の軽鎖可変領域（V_L）である。

【０１５８】
配列番号８３は、４－１ＢＢアゴニスト抗体Ｈ３９Ｅ３－２の重鎖可変領域（V_H）である。
【０１５９】
配列番号８４は、４－１ＢＢアゴニスト抗体Ｈ３９Ｅ３－２の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０１６０】
配列番号８５は、ヒトＯＸ４０のアミノ酸配列である。
【０１６１】
配列番号８６は、マウスＯＸ４０のアミノ酸配列である。
【０１６２】
配列番号８７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖である。
【０１６３】
配列番号８８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖である。
【０１６４】
配列番号８９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖可変領域（V_H）である。
【０１６５】
配列番号９０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０１６６】
配列番号９１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖ＣＤＲ１である。
【０１６７】
配列番号９２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖ＣＤＲ２である。
【０１６８】
配列番号９３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖ＣＤＲ３である。
【０１６９】
配列番号９４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０１７０】
配列番号９５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０１７１】
配列番号９６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０１７２】
配列番号９７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖である。
【０１７３】
配列番号９８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖である。
【０１７４】
配列番号９９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖可変領域（V_H）である。
【０１７５】
配列番号１００は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖可変領域（V_L）である。

【０１７６】
配列番号１０１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ１である。
【０１７７】
配列番号１０２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ２である。
【０１７８】
配列番号１０３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ３である。
【０１７９】
配列番号１０４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０１８０】
配列番号１０５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０１８１】
配列番号１０６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０１８２】
配列番号１０７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖である。
【０１８３】
配列番号１０８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖である。
【０１８４】
配列番号１０９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖可変領域（V_H）である。
【０１８５】
配列番号１１０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０１８６】
配列番号１１１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ１である。
【０１８７】
配列番号１１２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ２である。
【０１８８】
配列番号１１３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ３である。
【０１８９】
配列番号１１４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０１９０】
配列番号１１５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０１９１】
配列番号１１６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０１９２】
配列番号１１７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖可変領域（V_H）である。
【０１９３】

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

【０１９４】

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

【０１９５】

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

【０１９６】

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

【０１９７】

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

【０１９８】

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

【０１９９】

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

【０２００】

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

【０２０１】

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

【０２０２】

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

【０２０３】

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

【０２０４】

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

【０２０５】

配列番号１３０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ１である。

【０２０６】

配列番号１３１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ２である。

【０２０７】

配列番号１３２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ３である。

【０２０８】

配列番号１３３は、ＯＸ４０リガンド（ＯＸ４０Ｌ）アミノ酸配列である。

【０２０９】

配列番号１３４は、ＯＸ４０Ｌポリペプチドの可溶性部分である。

【０２１０】

配列番号１３５は、ＯＸ４０Ｌポリペプチドの代替可溶性部分である。

【０２１１】
配列番号１３６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体００８の重鎖可変領域（V_H）である。
【０２１２】
配列番号１３７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体００８の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２１３】
配列番号１３８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０１１の重鎖可変領域（V_H）である。
【０２１４】
配列番号１３９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０１１の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２１５】
配列番号１４０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２１の重鎖可変領域（V_H）である。
【０２１６】
配列番号１４１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２１の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２１７】
配列番号１４２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２３の重鎖可変領域（V_H）である。
【０２１８】
配列番号１４３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２３の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２１９】
配列番号１４４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０２２０】
配列番号１４５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２２１】
配列番号１４６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０２２２】
配列番号１４７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２２３】
配列番号１４８は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０２２４】
配列番号１４９は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０２２５】
配列番号１５０は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２２６】
配列番号１５１は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２２７】
配列番号１５２は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V

$_H$）である。
【０２２８】
配列番号１５３は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０２２９】
配列番号１５４は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２３０】
配列番号１５５は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２３１】
配列番号１５６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０２３２】
配列番号１５７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２３３】
配列番号１５８は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０２３４】
配列番号１５９は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０２３５】
配列番号１６０は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０２３６】
配列番号１６１は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０２３７】
配列番号１６２は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２３８】
配列番号１６３は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２３９】
配列番号１６４は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２４０】
配列番号１６５は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２４１】
配列番号１６６は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２４２】
配列番号１６７は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２４３】
配列番号１６８は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０２４４】
配列番号１６９は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０２４５】
配列番号１７０は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０２４６】
配列番号１７１は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０２４７】
配列番号１７２は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列であ

る。
【０２４８】
配列番号１７３は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２４９】
配列番号１７４は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２５０】
配列番号１７５は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２５１】
配列番号１７６は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２５２】
配列番号１７７は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２５３】
配列番号１７８は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０２５４】
配列番号１７９は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０２５５】
配列番号１８０は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０２５６】
配列番号１８１は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０２５７】
配列番号１８２は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２５８】
配列番号１８３は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２５９】
配列番号１８４は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２６０】
配列番号１８５は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２６１】
配列番号１８６は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２６２】
配列番号１８７は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２６３】
配列番号１８８は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０２６４】
配列番号１８９は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０２６５】
配列番号１９０は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列

である。
【０２６６】
配列番号１９１は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０２６７】
配列番号１９２は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２６８】
配列番号１９３は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２６９】
配列番号１９４は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２７０】
配列番号１９５は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２７１】
配列番号１９６は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２７２】
配列番号１９７は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２７３】
配列番号１９８は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０２７４】
配列番号１９９は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０２７５】
配列番号２００は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０２７６】
配列番号２０１は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０２７７】
配列番号２０２は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２７８】
配列番号２０３は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２７９】
配列番号２０４は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２８０】
配列番号２０５は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２８１】
配列番号２０６は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２８２】
配列番号２０７は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２８３】
配列番号２０８は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０２８４】
配列番号２０９は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０２８５】
配列番号２１０は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸

配列である。
【０２８６】
配列番号２１１は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０２８７】
配列番号２１２は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２８８】
配列番号２１３は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２８９】
配列番号２１４は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２９０】
配列番号２１５は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２９１】
配列番号２１６は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２９２】
配列番号２１７は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２９３】
配列番号２１８は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０２９４】
配列番号２１９は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０２９５】
配列番号２２０は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０２９６】
配列番号２２１は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０２９７】
配列番号２２２は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２９８】
配列番号２２３は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２９９】
配列番号２２４は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０３００】
配列番号２２５は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３０１】
配列番号２２６は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３０２】
配列番号２２７は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。

【０３０３】
配列番号２２８は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０３０４】
配列番号２２９は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０３０５】
配列番号２３０は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０３０６】
配列番号２３１は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０３０７】
配列番号２３２は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３０８】
配列番号２３３は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３０９】
配列番号２３４は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０３１０】
配列番号２３５は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３１１】
配列番号２３６は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３１２】
配列番号２３７は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０３１３】
配列番号２３８は、ＣＤ８検出剤の重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０３１４】
配列番号２３９は、ＣＤ８検出剤の重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０３１５】
配列番号２４０は、ＣＤ８検出剤の軽鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【発明を実施するための形態】
【０３１６】
Ｉ．導入
本明細書では、ＣＤ８＋濃縮ＴＩＬを取得及び拡張する方法が提供される。いくつかの実施形態では、対象ＴＩＬは、ＣＤ８検出及び／または造影手法を使用して特定されるＣＤ８＋濃縮ＴＩＬを含む腫瘍位置から産生される。本明細書では、そのようなＣＤ８＋濃縮ＴＩＬを産生するための拡張方法、及びそのようなＴＩＬを使用する治療方法も提供される。
【０３１７】
ＩＩ．定義
他に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味と同じである。本明細書で参照されるすべての特許及び刊行物は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。
【０３１８】
本明細書で使用される「同時投与」、「同時投与すること」、「～と組み合わせて投与される」、「～と組み合わせて投与すること」、「同時（ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓ）」

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

【０３１９】

「インビボ」という用語は、対象の体内で起こる事象を指す。

【０３２０】

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

【０３２１】

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

【０３２２】

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

【０３２３】

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

【０３２４】

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

【０３２５】

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

【０３２６】

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

【０３２７】
ＴＩＬは、一般に、細胞表面マーカーを使用して生化学的に定義されるか、または腫瘍に浸潤して治療を達成するそれらの能力によって機能的に定義されるかのいずれかであり得る。ＴＩＬは、一般に、ＣＤ４、ＣＤ８、ＴＣＲαβ、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ５６、ＣＣＲ７、ＣＤ４５Ｒａ、ＣＤ９５、ＰＤ－１、及びＣＤ２５のうちの１つ以上のバイオマーカーの発現によって分類され得る。さらに及び代替的に、ＴＩＬは、患者への再導入時に固形腫瘍に浸潤する能力により機能的に定義され得る。
【０３２８】
「凍結保存培地（ｃｒｙｏｐｒｅｓｅｒｖａｔｉｏｎ ｍｅｄｉａ）」または「凍結保存培地（ｃｒｙｏｐｒｅｓｅｒｖａｔｉｏｎ ｍｅｄｉｕｍ）」という用語は、細胞の凍結保存に使用できる任意の培地を指す。かかる培地は、７％～１０％のＤＭＳＯを含む培地を含むことができる。例示的な培地には、ＣｒｙｏＳｔｏｒ ＣＳ１０、Ｈｙｐｅｒｔｈｅｒｍａｓｏｌ、及びそれらの組み合わせが含まれる。「ＣＳ１０」という用語は、Ｓｔｅｍｃｅｌｌ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓまたはＢｉｏｌｉｆｅ Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓから入手した凍結保存培地を指す。ＣＳ１０培地は、商品名「ＣｒｙｏＳｔｏｒ（登録商標）ＣＳ１０」と称され得る。ＣＳ１０培地は、ＤＭＳＯを含む無血清の動物成分を含まない培地である。
【０３２９】
「セントラルメモリーＴ細胞」という用語は、ヒトではＣＤ４５Ｒ０＋であり、ＣＣＲ７（ＣＣＲ７^{高}）及びＣＤ６２Ｌ（ＣＤ６２^{高}）を構成的に発現するＴ細胞のサブセットを指す。セントラルメモリーＴ細胞の表面表現型には、ＴＣＲ、ＣＤ３、ＣＤ１２７（ＩＬ－７Ｒ）、及びＩＬ－１５Ｒも含まれる。セントラルメモリーＴ細胞の転写因子には、ＢＣＬ－６、ＢＣＬ－６Ｂ、ＭＢＤ２、及びＢＭＩ１が含まれる。セントラルメモリーＴ細胞は、ＴＣＲトリガー後、エフェクター分子としてＩＬ－２及びＣＤ４０Ｌを主に分泌する。セントラルメモリーＴ細胞は、血液中のＣＤ４コンパートメントで優勢であり、ヒトではリンパ節及び扁桃腺において比例して濃縮される。
【０３３０】
「エフェクターメモリーＴ細胞」という用語は、セントラルメモリーＴ細胞と同様にＣＤ４５Ｒ０＋であるが、ＣＣＲ７の構成的発現を失い（ＣＣＲ７^{低}）、ＣＤ６２Ｌ発現が不均一であるかまたは低い（ＣＤ６２Ｌ^{低}）、ヒトまたは哺乳動物Ｔ細胞のサブセットを指す。セントラルメモリーＴ細胞の表面表現型には、ＴＣＲ、ＣＤ３、ＣＤ１２７（ＩＬ－７Ｒ）、及びＩＬ－１５Ｒも含まれる。セントラルメモリーＴ細胞の転写因子には、ＢＬＩＭＰ１が含まれる。エフェクターメモリーＴ細胞は、インターフェロンガンマ、ＩＬ－４、及びＩＬ－５を含む、抗原刺激後に高レベルの炎症性サイトカインを急速に分泌する。エフェクターメモリーＴ細胞は、血液中のＣＤ８コンパートメントで優勢であり、ヒトでは肺、肝臓、及び腸において比例して濃縮される。ＣＤ８＋エフェクターメモリーＴ細胞は、大量のパーフォリンを担持する。
【０３３１】
「閉鎖系」という用語は、外部環境に対して閉鎖されている系を指す。細胞培養法に適した任意の閉鎖系を、本発明の方法で用いることができる。閉鎖系には、例えば、密閉Ｇ容器が含まれるが、これに限定されない。腫瘍セグメントが閉鎖系に付加されると、ＴＩＬを患者に投与する準備ができるまで、系は外部環境に開かれない。
【０３３２】
腫瘍を破壊するためのプロセスを説明するために本明細書で使用される「断片化すること」、「断片」、及び「断片化された」という用語は、腫瘍組織を破砕、スライス、分割、及び細切するなどの機械的断片化法、ならびに腫瘍組織の物理的構造を破壊するための任意の他の方法を含む。
【０３３３】
「末梢血単核細胞」及び「ＰＢＭＣ」という用語は、リンパ球（Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞）及び単球を含む、丸い核を有する末梢血細胞を指す。抗原提示細胞として使用され

る場合（ＰＢＭＣは抗原提示細胞の一種である）、末梢血単核細胞は、好ましくは、照射された同種異系末梢血単核細胞である。

【０３３４】

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

【０３３５】

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

【０３３６】

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

【０３３７】

【表１】

表１．ムロモナブのアミノ酸配列（例示的なＯＫＴ－３抗体）。

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

【０３３８】

「ＩＬ－２」（本明細書では「ＩＬ２」とも称される）という用語は、インターロイキン－２として知られるＴ細胞成長因子を指し、ヒト及び哺乳動物形態、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、バイオシミラー、及びバリアントを含む、ＩＬ－２のすべての形態を含む。ＩＬ－２は、例えば、Ｎｅｌｓｏｎ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００４，１７２

，３９８３－８８及びＭａｌｅｋ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００８，２６，４５３－７９に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－２のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号３）。例えば、ＩＬ－２という用語は、アルデスロイキン（ＰＲＯＬＥＵＫＩＮ、単回使用バイアル当たり２２００万ＩＵで複数の供給業者から市販されている）などのヒト組換えＩＬ－２形態、ならびにＣｅｌｌＧｅｎｉｘ，Ｉｎｃ．，Ｐｏｒｔｓｍｏｕｔｈ，ＮＨ，ＵＳＡ（ＣＥＬＬＧＲＯ　ＧＭＰ）またはＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ　ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ　Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ　Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡによって市販されている組換えＩＬ－２形態（カタログ番号ＣＹＴ－２０９－ｂ）及び他のベンダーからの他の商用同等物を包含する。アルデスロイキン（デス－アラニル－１、セリン－１２５ヒトＩＬ－２）は、およそ１５ｋＤａの分子量を有する非グリコシル化ヒト組換えＩＬ－２形態である。本発明での使用に好適なアルデスロイキンのアミノ酸配列を表２に示す（配列番号４）。ＩＬ－２という用語はまた、ペグ化ＩＬ２プロドラッグベンペガルデスロイキン（ＮＫＴＲ－２１４、平均６個のリジン残基が［（２，７－ビス｛［メチルポリ（オキシエチレン）］カルバモイル｝－９Ｈ－フルオレン－９－イル）メトキシ］カルボニル）で置換されたＮ^{6}である、配列番号４のようなペグ化ヒト組換えＩＬ－２）を含む、本明細書に記載のＩＬ－２のペグ化形態も包含し、Ｎｅｋｔａｒ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（Ｓｏｕｔｈ　Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）から入手可能であるか、または国際特許出願公開第ＷＯ２０１８／１３２４９６　Ａ１号の実施例１９に記載の方法、または米国特許出願公開第ＵＳ２０１９／０２７５１３３　Ａ１号の実施例１に記載の方法など、当該技術分野で知られている方法によって調製することができ、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適なベンペガルデスロイキン（ＮＫＴＲ－２１４）及び他のペグ化ＩＬ－２分子は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１４／０３２８７９１　Ａ１号及び国際特許出願公開第ＷＯ２０１２／０６５０８６　Ａ１号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適な複合化ＩＬ－２の代替形態は、米国特許第４，７６６，１０６号、同第５，２０６，３４４号、同第５，０８９，２６１号、及び同第４，９０２，５０２号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適なＩＬ－２の製剤は、米国特許第６，７０６，２８９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０３３９】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、Ｓｙｎｔｈｏｒｘ，Ｉｎｃ．から入手可能なＴＨＯＲ－７０７である。本発明での使用に好適なＴＨＯＲ－７０７及びＩＬ－２の追加の代替形態の調製ならびに特性は、米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／０１８１２２０　Ａ１号及び同第ＵＳ２０２０／０３３０６０１　Ａ１号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、単離及び精製ＩＬ－２ポリペプチドと、Ｋ３５、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｋ４３、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｋ６４、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択されるアミノ酸位置で単離及び精製ＩＬ－２ポリペプチドに結合する複合部分と、を含む、インターロイキン２（ＩＬ－２）複合体であり、アミノ酸残基の番号付けは配列番号５に対応する。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｋ６４、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｔ３７、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｒ３８及びＫ６４から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｅ６１、Ｅ６２、及びＥ６８から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｅ６２である。いくつかの実施形態では、Ｋ３５、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１

、Ｆ４２、Ｋ４３、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｋ６４、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択されるアミノ酸残基は、リジン、システイン、またはヒスチジンにさらに変異する。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基は、システインに変異する。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基は、リジンに変異する。いくつかの実施形態では、Ｋ３５、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｋ４３、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｋ６４、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択されるアミノ酸残基は、非天然アミノ酸にさらに変異する。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）、Ｎ６－プロパルギルエトキシ－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、ＢＣＮ－Ｌ－リジン、ノルボルネンリジン、ＴＣＯ－リジン、メチルテトラジンリジン、アリルオキシカルボニルリジン、２－アミノ－８－オキソノナン酸、２－アミノ－８－オキソオクタン酸、ｐ－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジドメチル－Ｌ－フェニルアラニン（ｐＡＭＦ）、ｐ－ヨード－Ｌ－フェニルアラニン、ｍ－アセチルフェニルアラニン、２－アミノ－８－オキソノナン酸、ｐ－プロパルギルオキシフェニルアラニン、ｐ－プロパルギル－フェニルアラニン、３－メチル－フェニルアラニン、Ｌ－ドーパ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジド－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アシル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ベンゾイル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ブロモフェニルアラニン、ｐ－アミノ－Ｌ－フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、Ｏ－アリルチロシン、Ｏ－メチル－Ｌ－チロシン、Ｏ－４－アリル－Ｌ－チロシン、４－プロピル－Ｌ－チロシン、ホスホノチロシン、トリ－Ｏ－アセチル－ＧｌｃＮＡｃｐ－セリン、Ｌ－ホスホセリン、ホスホノセリン、Ｌ－３－（２－ナフチル）アラニン、２－アミノ－３－（（２－（（３－（ベンジルオキシ）－３－オキソプロピル）アミノ）エチル）セラニル）プロパン酸、２－アミノ－３－（フェニルセラニル）プロパン酸、またはセレノシステインを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２複合体は、野生型ＩＬ－２ポリペプチドと比較して、ＩＬ－２受容体α（ＩＬ－２Ｒα）サブユニットに対する減少した親和性を有する。いくつかの実施形態では、減少した親和性は、野生型ＩＬ－２ポリペプチドと比較して、ＩＬ－２Ｒαに対する結合親和性の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、または９９％を超える減少である。いくつかの実施形態では、減少した親和性は、野生型ＩＬ－２ポリペプチドと比較して、約１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、３０倍、５０倍、１００倍、２００倍、３００倍、５００倍、１０００倍以上である。いくつかの実施形態では、複合部分は、ＩＬ－２とＩＬ－２Ｒαとの結合を損なうかまたは遮断する。いくつかの実施形態では、複合部分は、水溶性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、水溶性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリ（プロピレングリコール）（ＰＰＧ）、エチレングリコール及びプロピレングリコールのコポリマー、ポリ（オキシエチル化ポリオール）、ポリ（オレフィンアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリルアミド）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリレート）、ポリ（サッカライド）、ポリ（α－ヒドロキシ酸）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン（ＰＯＺ）、ポリ（Ｎ－アクリロイルモルホリン）、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ＰＥＧを含む。いくつかの実施形態では、ＰＥＧは、直鎖状ＰＥＧまたは分岐状ＰＥＧである。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ポリサッカライドを含む。いくつかの実施形態では、ポリサッカライドは、デキストラン、ポリシアル酸（ＰＳＡ）、ヒアルロン酸（ＨＡ）、アミロース、ヘパリン、ヘパランサルフェート（ＨＳ）、デキストリン、またはヒドロキシエチルデンプン（ＨＥＳ）を含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、グリカンを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ポリアミンを含む。いくつかの実施形態では、複合部分は、タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、アルブミン、トランスフェリン、ま

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

（ヨードアセチル）アミノ）メチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ｓＩＡＣ）、スクシンイミジル６－（（（（（４－ヨードアセチル）アミノ）メチル）シクロヘキサン－１－カルボニル）アミノ）ヘキサノエート（ｓＩＡＣＸ）、ｐ－ニトロフェニルヨードアセテート（ＮＰＩＡ）、カルボニル反応性及びスルフヒドリル反応性架橋剤、例えば、４－（４－Ｎ－マレイミドフェニル）酪酸ヒドラジド（ＭＰＢＨ）、４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシル－ヒドラジド－８（Ｍ２Ｃ２Ｈ）、３－（２－ピリジルジチオ）プロピオニルヒドラジド（ＰＤＰＨ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジル－４－アジドサリチル酸（ＮＨｓ－ＡｓＡ）、Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミジル－４－アジドサリチル酸（スルホ－ＮＨｓ－ＡｓＡ）、スルホスクシンイミジル－
（４－アジドサリチルアミド）ヘキサノエート（スルホ－ＮＨｓ－ＬＣ－ＡｓＡ）、スルホスクシンイミジル－２－（ｐ－アジドサリチルアミド）エチル－１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡｓＤ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジル－４－アジドベンゾエート（ＨｓＡＢ）、Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミジル－４－アジドベンゾエート（スルホ－ＨｓＡＢ）、Ｎ－スクシンイミジル－６－（４’－アジド－２’－ニトロフェニルアミノ）ヘキサノエート（ｓＡＮＰＡＨ）、スルホスクシンイミジル－６－（４’－アジド－２’－ニトロフェニルアミノ）ヘキサノエート（スルホ－ｓＡＮＰＡＨ）、Ｎ－５－アジド－２－ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド（ＡＮＢ－ＮＯ）、スルホスクシンイミジル－２－（ｍ－アジド－ｏ－ニトロベンズアミド）－エチル－１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡＮＤ）、Ｎ－スクシンイミジル－４（４－アジドフェニル）１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡＤＰ）、Ｎ－スルホスクシンイミジル（４－アジドフェニル）－１，３’－ジチオプロピオネート（スルホ－ｓＡＤＰ）、スルホスクシンイミジル４－（ｐ－アジドフェニル）ブチレート（スルホ－ｓＡＰＢ）、スルホスクシンイミジル２－（７－アジド－４－メチルクマリン－３－アセトアミド）エチル－１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡＥＤ）、スルホスクシンイミジル７－アジド－４－メチルクマリン－３－アセテート（スルホ－ｓＡＭＣＡ）、ｐ－ニトロフェニルジアゾピルベート（ｐＮＰＤＰ）、ｐ－ニトロフェニル－２－ジアゾ－３，３，３－トリフルオロプロピオネート（ＰＮＰ－ＤＴＰ）、１－（ρ－アジドサリチルアミド）－４－（ヨードアセトアミド）ブタン（ＡｓＩＢ）、Ｎ－［４－（ρ－アジドサリチルアミド）ブチル］－３’－（２’－ピリジルジチオ）プロピオンアミド（ＡＰＤＰ）、ベンゾフェノン－４－ヨードアセトアミド、ｐ－アジドベンゾイルヒドラジド（ＡＢＨ）、４－（ρ－アジドサリチルアミド）ブチルアミン（ＡｓＢＡ）、またはｐ－アジドフェニルグリオキサール（ＡＰＧ）を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、任意選択でジペプチドリンカーを含む、切断可能なリンカーを含む。いくつかの実施形態では、ジペプチドリンカーは、Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｖａｌ－Ａｌａ、またはＶａｌ－Ｌｙｓを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、切断不可能なリンカーを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、任意選択で、マレイミドカプロイル（ｍｃ）、スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ｓＭＣＣ）、またはスルホスクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（スルホ－ｓＭＣＣ）を含むマレイミド基を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、スペーサーをさらに含む。いくつかの実施形態では、スペーサーは、ｐ－アミノベンジルアルコール（ＰＡＢ）、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢＣ）、その誘導体、または類似体を含む。いくつかの実施形態では、複合部分は、ＩＬ－２複合体の血清半減期を延長することができる。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、ＩＬ－２複合体の血清半減期を延長することができる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、本明細書に記載のＩＬ－２形態のうちのいずれかの断片である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／０１８１２２０　Ａ１号及び米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／０３３０６０１　Ａ１号に開示されているようにペグ化されている。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む複合部分に共有結合

したＮ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含むＩＬ－２ポリペプチドを含む、ＩＬ－２複合体であり、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５と少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＡｚＫは、配列番号５内のアミノ酸位置に関して、Ｋ３５位、Ｆ４２位、Ｆ４４位、Ｋ４３位、Ｅ６２位、Ｐ６５位、Ｒ３８位、Ｔ４１位、Ｅ６８位、Ｙ４５位、Ｖ６９位、またはＬ７２位でアミノ酸を置換する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５に対して１残基のＮ末端欠失を含む。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ＩＬ－２Ｒアルファ鎖会合を欠いているが、中間親和性ＩＬ－２Ｒベーターガンマシグナル伝達複合体との正常な結合を保持している。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む複合部分に共有結合したＮ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含むＩＬ－２ポリペプチドを含む、ＩＬ－２複合体であり、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５と少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＡｚＫは、配列番号５内のアミノ酸位置に関して、Ｋ３５位、Ｆ４２位、Ｆ４４位、Ｋ４３位、Ｅ６２位、Ｐ６５位、Ｒ３８位、Ｔ４１位、Ｅ６８位、Ｙ４５位、Ｖ６９位、またはＬ７２位でアミノ酸を置換する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む複合部分に共有結合したＮ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含むＩＬ－２ポリペプチドを含む、ＩＬ－２複合体であり、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５と少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＡｚＫは、配列番号５内のアミノ酸位置に関して、Ｋ３５位、Ｆ４２位、Ｆ４４位、Ｋ４３位、Ｅ６２位、Ｐ６５位、Ｒ３８位、Ｔ４１位、Ｅ６８位、Ｙ４５位、Ｖ６９位、またはＬ７２位でアミノ酸を置換する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む複合部分に共有結合したＮ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含むＩＬ－２ポリペプチドを含む、ＩＬ－２複合体であり、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５と少なくとも９８％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＡｚＫは、配列番号５内のアミノ酸位置に関して、Ｋ３５位、Ｆ４２位、Ｆ４４位、Ｋ４３位、Ｅ６２位、Ｐ６５位、Ｒ３８位、Ｔ４１位、Ｅ６８位、Ｙ４５位、Ｖ６９位、またはＬ７２位でアミノ酸を置換する。

【０３４０】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ＡＬＫＳ－４２３０（配列番号６）としても知られるネムバロイキンアルファであり、Ａｌｋｅｒｍｅｓ，Ｉｎｃ．から入手可能である。ネムバロイキンアルファは、ペプチジルリンカー（^{60}ＧＧ^{61}）を介してヒトインターロイキン２断片（６２－１３２）と融合し、ペプチジルリンカー（^{133}ＧＳＧＧＧＳ^{138}）を介してヒトインターロイキン２受容体α鎖断片（１３９－３０３）と融合し、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞で産生され、グリコシル化されている、ヒトインターロイキン２断片（１－５９）、バリアント（Ｃｙｓ^{125}＞Ｓｅｒ^{51}）；G_2ペプチドリンカー（６０－６１）を介してヒトインターロイキン２（ＩＬ－２）（４－７４）－ペプチド（６２－１３２）と融合し、GSG_3Sペプチドリンカー（１３３－１３８）を介してヒトインターロイキン２受容体α鎖（ＩＬ２Ｒサブユニットアルファ、ＩＬ２Ｒα、ＩＬ２ＲＡ）（１－１６５）－ペプチド（１３９－３０３）と融合し、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞で産生され、アルファグリコシル化されている、ヒトインターロイキン２（ＩＬ－２）（７５－１３３）－ペプチド［Ｃｙｓ^{125}（５１）＞Ｓｅｒ］－変異体（１－５９）としても知られている。ネムバロイキンアルファのアミノ酸配列は、配列番号６に示されている。いくつかの実施形態では、ネムバロイキンアルファは、以下の翻訳後修飾を示す：以下の位置でのジスルフィド架橋：３１－１１６、１４１－２８５、１８４－２４２、２６９－３０１、１６６－１９７、または１６６－１９９、１６８－１９９または１６８－１９７（配列番号６の番号付けを使用する）、及び以下の位置でのグリコシル化部位：配列番号６の番号付けを使用する、Ｎ１８７、Ｎ２０６、Ｔ２１２。ネムバルイキン　アルファの調製及び特性、ならびに本発明での使用に好適な追加の代替形態のＩＬ－２は、米国特許出願公開第２０２１

／００３８６８４　Ａ１号及び米国特許第１０，１８３，９７９号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、配列番号６と少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または少なくとも９０％の配列同一性を有するタンパク質である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、配列番号６で示されるアミノ酸配列またはその保存的アミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、配列番号７のアミノ酸２４～４５２、またはそのバリアント、断片、もしくは誘導体を含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、配列番号７のアミノ酸２４～４５２と少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列、またはそのバリアント、断片、もしくは誘導体を含む融合タンパク質である。本発明での使用に好適な他のＩＬ－２形態は、米国特許第１０，１８３，９７９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。任意選択で、いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ムチンドメインポリペプチドリンカーによって第２の融合パートナーと連結された第１の融合パートナーを含む融合タンパク質であり、第１の融合パートナーは、ＩＬ－１Ｒα、またはＩＬ－１Ｒαと少なくとも９８％のアミノ酸配列同一性を有し、ＩＬ－Ｒαの受容体アンタゴニスト活性を有するタンパク質であり、第２の融合パートナーは、Ｆｃ領域を含む免疫グロブリンの全部または一部を含み、ムチンドメインポリペプチドリンカーは、配列番号８、または配列番号８と少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、融合タンパク質の半減期は、ムチンドメインポリペプチドリンカーの非存在下での第２の融合パートナーとの第１の融合パートナーの融合と比較して改善される。

【０３４１】

【表２】

表２．インターロイキンのアミノ酸配列。

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

【０３４２】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（V_H）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（V_L）と、V_HまたはV_LのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含む抗体サイトカイン移植タンパク質を含み、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（V_H）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（V_L）と、V_HまたはV_LのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含み、ＩＬ－２分子は、ムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、米国特許出願公開第２０２０／０２７０３３４　Ａ１号に記載されている抗体の投与を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）と、V_HまたはV_LのＣＤ

Ｒに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含み、ＩＬ－２分子は、ムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させ、抗体は、配列番号３９を含むＩｇＧクラス軽鎖及び配列番号３８を含むＩｇＧクラス重鎖、配列番号３７を含むＩｇＧクラスの軽鎖及び配列番号２９を含むＩｇＧクラスの重鎖、配列番号３９を含むＩｇＧクラス軽鎖及び配列番号２９を含むＩｇＧクラス重鎖、配列番号３７を含むＩｇＧクラス軽鎖及び配列番号３８を含むＩｇＧクラス重鎖からなる群から選択されるＩｇＧクラスの重鎖及びＩｇＧクラスの軽鎖をさらに含む。

【０３４３】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、V_HのＨＣＤＲ１に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、V_HのＨＣＤＲ２に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、V_HのＨＣＤＲ３に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、V_LのＬＣＤＲ１に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、V_LのＬＣＤＲ２に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、V_LのＬＣＤＲ３に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。

【０３４４】

ＩＬ－２分子の挿入は、ＣＤＲのＮ末端領域もしくはその近く、ＣＤＲの中間領域、またはＣＤＲのＣ末端領域もしくはその近くであり得る。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、ＣＤＲに組み込まれたＩＬ－２分子を含み、ＩＬ２配列はＣＤＲ配列をフレームシフトしない。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、ＣＤＲに組み込まれたＩＬ－２分子を含み、ＩＬ－２配列はＣＤＲ配列のすべてまたは一部を置き換える。ＩＬ－２分子による置き換えは、ＣＤＲのＮ末端領域、ＣＤＲの中間領域、またはＣＤＲのＣ末端領域もしくはその近くであり得る。ＩＬ－２分子による置き換えは、ＣＤＲ配列のわずか１個もしくは２個のアミノ酸、またはＣＤＲ配列全体であり得る。

【０３４５】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子は、ペプチドリンカーなしで、ＣＤＲ配列とＩＬ－２配列との間に追加のアミノ酸なしで、ＣＤＲに直接的に移植される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子は、ペプチドリンカーを用いて、ＣＤＲ配列とＩＬ－２配列との間に１つ以上の追加のアミノ酸を伴って、ＣＤＲに間接的に移植される。

【０３４６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＩＬ－２分子は、ＩＬ－２ムテインである。いくつかの事例では、ＩＬ－２ムテインは、Ｒ６７Ａ置換を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ムテインは、配列番号１４または配列番号１５のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ムテインは、米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／０２７０３３４　Ａ１号の表１のアミノ酸配列を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０３４７】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号１６、配列番号１９、配列番号２２及び配列番号２５からなる群から選択されるＨＣＤＲ１を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号７、配列番号１０、配列番号１３及び配列番号１６からなる群から選択されるＨＣＤＲ１を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号１７、配列番号２０、配列番号２３、及び配列番号２６からなる群から選択されるＨＣＤＲ２からなる群から選択されるＨＣＤＲ１を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号１８、配列番号２１、配列番号２４、及び配列番号２７からなる群から選択されるＨＣＤＲ３を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号２８のアミノ酸配列を含むV_H領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイ

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

【０３４８】

【表３－１】

表３：例示的なパリビズマブ抗体－ＩＬ－２移植タンパク質の配列

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 13 IL-2	MYRMQLLSCI ALSLALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML 60 TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE 120 TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT 153
配列番号 14 IL-2 ムテイン	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLT 133
配列番号 15 IL-2 ムテイン	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TAKFYMPKKA TELKHLQCLE 60

【表３－２】

	EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120
	WITFCQSIIS TLT 133
配列番号 16	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL
HCDR1_IL-2	60
	QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE 120
	FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMSVG 145
配列番号 17	DIWWDDKKDY NPSLKS 16
HCDR2	
配列番号 18	SMITNWYFDV 10
HCDR3	
配列番号 19	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE
HCDR1_IL-2	60
カバット	EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120
	WITFCQSIIS TLTSTSGMSV G 141
配列番号 20	DIWWDDKKDY NPSLKS 16
HCDR2 カバット	
配列番号 21	SMITNWYFDV 10
HCDR3 カバット	
配列番号 22	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL
HCDR1_IL-2	60
クロチア	QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE 120
	FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GM 142
配列番号 23	WWDDK
HCDR2 クロチア	5
配列番号 24	SMITNWYFDV 10
HCDR3 クロチア	
配列番号 25	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL
HCDR1_IL-2	60
IMGT	QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE 120
	FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMS 143
配列番号 26	IWWDDKK
HCDR2 IMGT	7
配列番号 27	ARSMITNWYF DV 12
HCDR3 IMGT	
配列番号 28	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY 60
V_H	KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV 120
	IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL 180
	EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWYF 240
	DVWGAGTTVT VSS 253
配列番号 29	QMILNGINNY KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR 60
重鎖	PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG 120
	WIRQPPGKAL EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC 180
	ARSMITNWYF DVWGAGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV 240
	TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR 300
	VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV AVSHEDPEVK 360
	FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALAAPIEK 420
	TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT 480
	PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK 533
配列番号 30	KAQLSVGYMH 10
LCDR1 カバット	
配列番号 31	DTSKLAS 7
LCDR2 カバット	
配列番号 32	FQGSGYPFT 9
LCDR3 カバット	
配列番号 33	QLSVGY 6
LCDR1 クロチア	
配列番号 34	DTS 3
LCDR2 クロチア	

【表３－３】

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

【０３４９】

「ＩＬ－４」（本明細書では「ＩＬ４」とも称される）という用語は、インターロイキン４として知られるサイトカインを指し、これは、Ｔｈ２　Ｔ細胞、ならびに好酸球、好塩基球、及び肥満細胞によって産生される。ＩＬ－４は、ナイーブヘルパーＴ細胞（Ｔｈ０細胞）からＴｈ２　Ｔ細胞への分化を調節する。Ｓｔｅｉｎｋｅ　ａｎｄ　Ｂｏｒｉｓｈ，Ｒｅｓｐｉｒ．Ｒｅｓ．２００１，２，６６－７０。ＩＬ－４によって活性化されると、Ｔｈ２　Ｔ細胞は、その後、正のフィードバックループで追加のＩＬ－４を産生する。ＩＬ－４は、Ｂ細胞増殖及びクラスＩＩ　ＭＨＣ発現も刺激し、Ｂ細胞からのＩｇＥ及びIgG_1発現へのクラス切り替えを誘導する。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－４は、ＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ　ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ　Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ　Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡ（カタログ番号ＣＹＴ－２１１）及びＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ（ヒトＩＬ－１５組換えタンパク質、カタログ番号Ｇｉｂｃｏ　ＣＴＰ００４３）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－４のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号９）。

【０３５０】

「ＩＬ－７」（本明細書では「ＩＬ７」とも称される）という用語は、インターロイキン７として知られるグリコシル化組織由来のサイトカインを指し、これは、間質細胞及び上皮細胞、ならびに樹状細胞から得ることができる。Ｆｒｙ　ａｎｄ　Ｍａｃｋａｌｌ，Ｂｌｏｏｄ　２００２，９９，３８９２－９０４。ＩＬ－７は、Ｔ細胞の発達を刺激することができる。ＩＬ－７は、ＩＬ－７受容体アルファ及び共通ガンマ鎖受容体からなるヘテロ二量体であるＩＬ－７受容体に結合し、これは、胸腺内でのＴ細胞発生及び末梢内での生存に重要な一連のシグナルである。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－７は、ＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ　ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ　Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ　Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡ（カタログ番号ＣＹＴ－２５４）及びＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ（ヒトＩＬ－１５組換えタンパク質、カタログ番号Ｇｉｂｃｏ　ＰＨＣ００７１）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－７のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号１０）。

【０３５１】

「ＩＬ－１５」（本明細書では「ＩＬ１５」とも称される）という用語は、インターロイキン－１５として知られるＴ細胞成長因子を指し、ヒト及び哺乳動物形態、保存的アミ

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

【０３５２】

「ＩＬ－２１」（本明細書では「ＩＬ２１」とも称される）という用語は、インターロイキン－２１として知られる多面発現性サイトカインタンパク質を指し、ヒト及び哺乳動物形態、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、バイオシミラー、及びバリアントを含む、ＩＬ－２１のすべての形態を含む。ＩＬ－２１は、例えば、Ｓｐｏｌｓｋｉ ａｎｄ Ｌｅｏｎａｒｄ，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｄｒｕｇ．Ｄｉｓｃ．２０１４，１３，３７９－９５に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＩＬ－２１は、主にナチュラルキラーＴ細胞及び活性化ヒトＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞によって産生される。組換えヒトＩＬ－２１は、１５．４ｋＤａの分子量を有する１３２個のアミノ酸を含む単一の非グリコシル化ポリペプチド鎖である。組換えヒトＩＬ－２１は、ＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡ（カタログ番号ＣＹＴ－４０８－ｂ）及びＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ（ヒトＩＬ－２１組換えタンパク質、カタログ番号１４－８２１９－８０）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号１２）。

【０３５３】

「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」、または「治療量」が示される場合、投与される本発明の組成物の正確な量は、患者（対象）の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染または転移の程度、及び健康状態の個人差を考慮して、医師によって決定され得る。一般に、本明細書に記載される腫瘍浸潤リンパ球（例えば、二次ＴＩＬまたは遺伝子改変された細胞傷害性リンパ球）は、体重１ｋｇ当たり10^{4}～10^{11}細胞（例えば、体重１ｋｇ当たり10^{5}～10^{6}、10^{5}～10^{10}、10^{5}～10^{11}、10^{6}～10^{10}、10^{6}～10^{11}、10^{7}～10^{11}、10^{7}～10^{10}、10^{8}～10^{11}、10^{8}～10^{10}、10^{9}～10^{11}、または10^{9}～10^{10}細胞）（それらの範囲内のすべての整数値を含む）の投与量で投与され得る。ＴＩＬ（場合によっては、遺伝子修飾細胞傷害性リンパ球を含む）組成物もまた、これらの投与量で複数回投与され得る。ＴＩＬ（場合によっては、遺伝子操作されたＴＩＬを含む）は、免疫療法で一般的に知られている注入技法を使用することによって投与することができる（例えば、Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｗ Ｅｎｇ．Ｊ．ｏｆ Ｍｅｄ．１９８８，３１９，１６７６を参照）。特定の患者に最適な投薬量及び治療レジーム（ｒｅｇｉｍｅ）は、患者を疾患の兆候について監視し、適宜に治療を調整することによって、医学分野の技術者によって容易に決定され得る。

【０３５４】

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

リンパ腫、及び非ホジキンリンパ腫が含まれ得るが、これらに限定されない。「Ｂ細胞血液学的悪性腫瘍」という用語は、Ｂ細胞を冒す血液学的悪性腫瘍を指す。

【０３５５】

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

【０３５６】

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

【０３５７】

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

【０３５８】

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

【０３５９】

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

【０３６０】

「治療」、「治療すること」、「治療する」などの用語は、所望の薬理学的及び／または生理学的効果を得ることを指す。その効果は、その疾患または症状を完全にまたは部分的に予防するという観点において予防的であり得、及び／または疾患及び／またはその疾患に起因する副作用の部分的または完全な治癒という観点において治療的であり得る。「治療」は、本明細書で使用される場合、哺乳動物、特にヒトにおける疾患の任意の治療を

包含し、（ａ）疾患にかかりやすい可能性があるが、まだ疾患を有すると診断されていない対象に疾患が生じるのを予防すること、（ｂ）疾患を抑制すること、すなわち、その発症または進行を抑止すること、及び（ｃ）疾患を軽減すること、すなわち、疾患の退行を引き起こし、及び／または１つ以上の疾患症状を軽減することを含む。「治療」は、疾患または状態がない場合でさえも、薬理学的効果を提供するための薬剤の送達を包含するようにも意図されている。例えば、「治療」は、病状がない場合、例えば、ワクチンの場合に免疫応答を誘発するか、または免疫を与えることができる組成物の送達を包含する。

【０３６１】

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

【０３６２】

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

【０３６３】

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

【０３６４】

本明細書における「腫瘍浸潤リンパ球」または「ＴＩＬ」とは、対象の血流を離れて腫瘍に移動した白血球として最初に取得された細胞の集団を意味する。ＴＩＬには、ＣＤ８$^{+}$細胞傷害性Ｔ細胞（リンパ球）、Ｔｈ１及びＴｈ１７　ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、ならびにＭ１マクロファージが含まれるが、これらに限定されない

。ＴＩＬには、一次ＴＩＬ及び二次ＴＩＬの両方が含まれる。「一次ＴＩＬ」は、本明細書に概説されるように患者組織試料から得られるもの（「新たに採取された」と称されることもある）であり、「二次ＴＩＬ」は、本明細書で考察されるように拡張または増殖された任意のＴＩＬ細胞集団であり、本明細書で考察されるバルクＴＩＬ、拡張ＴＩＬ（「ＲＥＰ　ＴＩＬ」）、ならびに「ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬ」が含まれるが、これらに限定されない。ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬは、例えば、第２の拡張ＴＩＬまたは第２の追加の拡張ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬと称されるＴＩＬを含む、図８のステップＤに記載されているものなど）を含み得る。

【０３６５】

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

【０３６６】

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

【０３６７】

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

【０３６８】

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

【０３６９】

「約」及び「およそ」という用語は、値の統計的に有意な範囲内を意味する。かかる範囲は、所与の値または範囲の１桁以内、好ましくは５０％以内、より好ましくは２０％以

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

【０３７０】

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

【０３７１】

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

【０３７２】

「抗原」という用語は、免疫応答を誘導する物質を指す。いくつかの実施形態では、抗原は、主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）分子によって提示される場合、抗体またはＴＣＲによって結合されることができる分子である。本明細書で使用される「抗原」という用語はまた、Ｔ細胞エピトープを包含する。抗原は、追加として免疫系によって認識されることができる。いくつかの実施形態では、抗原は、体液性免疫応答または細胞性免疫応答を誘導することができ、Ｂリンパ球及び／またはＴリンパ球の活性化につながる。場合によっては、これは、抗原がＴｈ細胞エピトープを含むか、またはそれに結合されることを必要とし得る。抗原はまた、１つ以上のエピトープ（例えば、Ｂ－及びＴ－エピトープ

）を有し得る。いくつかの実施形態では、抗原は、好ましくは、典型的には非常に特異的かつ選択的な方法で、対応する抗体またはＴＣＲと反応し、他の抗原によって誘導され得る多数の他の抗体またはＴＣＲとは反応しない。

【０３７３】

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

【０３７４】

本明細書で使用される、抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合断片」（または単に「抗体部分」もしくは「断片」）という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の１つ以上の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって行われ得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例には、（ｉ）V_L、V_H、C_L、及びＣＨ１ドメインからなる一価断片である、Ｆａｂ断片、（ｉｉ）ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合された２つのＦａｂ断片を含む二価断片である、Ｆ（ａｂ′）２断片、（ｉｉｉ）V_H及びＣＨ１ドメインからなるＦｄ断片、（ｉｖ）抗体の単一アームのV_L及びV_HドメインからなるＦｖ断片、（ｖ）V_HまたはV_Lドメインからなり得るドメイン抗体（ｄＡｂ）断片（Ｗａｒｄ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，１９８９，３４１，５４４－５４６）、ならびに（ｖｉ）単離した相補性決定領域（ＣＤＲ）が含まれる。Ｆｖ断片の２つのドメイン、V_L及びV_Hは、別々の遺伝子によってコードされるが、これらは、組換え方法を使用して、V_L及びV_H領域が対合して、一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）として知られる一価分子を形成する単一タンパク質鎖としてそれらを作製することを可能にする合成リンカーによって接合され得、例えば、Ｂｉｒｄ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ １９８８，２４２，４２３－４２６、及びＨｕｓｔｏｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ１９８８，８５，５８７９－５８８３）を参照されたい。かかるｓｃＦｖ抗体はまた、抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合断片」という用語に包含されることを意図している。これらの抗体断片は、当業者に知られている従来の技法を使用して得られ、断片は、無傷の抗体と同じ方法で有用性についてスクリーニングされる。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖタンパク質ドメインは、V_H部分及びV_L部分を含む。ｓｃＦｖ分子は、V_LドメインがｓｃＦｖ分子のＮ末端部分である場合、V_L－Ｌ－V_H、またはV_HドメインがｓｃＦｖ分子のＮ末端部分である場合、V_H－Ｌ－V_Lのいずれかとして示される。ｓｃＦｖ分子を作製し、好適なペプチドリンカーを設計するための方法は、米国特許第４，７０４，６９２号、米国特許第４，９４６，７７８号、Ｒ．Ｒａａｇ ａｎｄ Ｍ．Ｗｈｉｔｌｏｗ，“Ｓｉｎｇｌｅ Ｃｈａｉｎ Ｆｖｓ．”ＦＡＳＥＢ Ｖｏｌ ９：７３－８０（１９９５）及びＲ．Ｅ．Ｂｉｒｄ ａｎｄ Ｂ．Ｗ．Ｗａｌｋｅｒ，Ｓｉｎｇｌｅ Ｃｈａｉｎ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｖａｒｉａｂｌｅ Ｒｅｇｉｏｎｓ，ＴＩＢＴＥＣＨ，Ｖｏｌ ９：１３２－１３７（１９９１）に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０３７５】

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

【０３７６】

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

【０３７７】

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

【０３７８】

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

【０３７９】

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

【０３８０】

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

【０３８１】

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

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

【０３８２】

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

【０３８３】

「ダイアボディ（ｄｉａｂｏｄｙ）」は、２つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片である。断片は、同じポリペプチド鎖（V_H－V_LまたはV_L－V_H）中に軽鎖可変ドメイン（V_L）に接続された重鎖可変ドメイン（V_H）を含む。同じ鎖上の２つのドメインをペアリングするには短すぎるリンカーを使用すると、ドメインは別のチェーンの相補ドメインとペアリングさせられ、２つの抗原結合部位が作成される。ダイアボディは、例えば、欧州特許第ＥＰ４０４，０９７号、国際特許公開第ＷＯ９３／１１１６１号、及びＢｏｌｌｉｇｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ１９９３，９０，６４４４－６４４８においてより完全に記載されている。

【０３８４】

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

【０３８５】

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

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

【０３８６】

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

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

【０３８７】

ＩＩＩ．Ｇｅｎ２　ＴＩＬ製造プロセス

これらの特徴のうちのいくつかを含むＧｅｎ２として知られるＴＩＬプロセス（プロセス２Ａとして知られる）の例示的なファミリーが図１及び２に示される。図２には、Ｇｅｎ２の実施形態が示される。

【０３８８】

本明細書で考察されるように、本発明は、患者への移植前に凍結保存されたＴＩＬを再刺激して、それらの代謝活性、ひいては相対的健康を向上させることに関するステップ、及び当該代謝健康を試験する方法を含み得る。本明細書で一般に概説されるように、ＴＩＬは、一般に、患者試料から採取され、患者への移植前にそれらの数を拡張するように操作される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、以下で考察されるように、任意で遺伝子操作され得る。

【０３８９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、凍結保存され得る。解凍した時点で、それらが再刺激されて、患者への注入前に代謝を高めることができる。

【０３９０】

いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図で詳細に考察されるように、第１の拡張（ＲＥＰ前と称されるプロセス、ならびに図１にステップＡとして示されるプロセスを含む）は、３～１４日に短縮され、第２の拡張（ＲＥＰと称されるプロセス、ならびに図１にステップＢとして示されるプロセスを含む）は、７～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、第１の拡張（例えば、図１にステップＢとして記載される拡張）は、１１日に短縮され、第２の拡張（例えば、図１にステップＤとして記載される拡張）は、１１日に短縮される。いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図で詳細に考察されるように、第１の拡張と第２の拡張との組み合わせ（例えば、図１にステップＢ及びステップＤとして記載される拡張）は、２２日に短縮される。

【０３９１】

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

【０３９２】

Ａ．ステップＡ：患者の腫瘍試料を取得する

一般に、ＴＩＬは、最初に患者の腫瘍試料から取得され、その後、本明細書に記載され

るさらなる操作のためにより大きい集団に拡張され、任意選択で凍結保存され、本明細書に概説されるように再刺激され、任意選択でＴＩＬ健康の指標として表現型及び代謝パラメータについて評価される。

【０３９３】

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

【０３９４】

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

【０３９５】

腫瘍解離酵素混合物には、１つ以上の解離（消化）酵素、例えば、限定されないが、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはコラゲナーゼの種類を含む）、Ａｃｃｕｔａｓｅ（商標）、Ａｃｃｕｍａｘ（商標）、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、キモトリプシン、キモパパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパイン、ＸＩＶ型プロテアーゼ（プロナーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）、トリプシン阻害剤、任意の他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びそれらの任意の組み合わせが含まれ得る。

【０３９６】

いくつかの実施形態では、解離酵素は、凍結乾燥酵素から再構成される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥酵素は、ＨＢＳＳなどの滅菌緩衝液の量で再構成される。

【０３９７】

いくつかの事例では、コラゲナーゼ（アニマルフリー１型コラゲナーゼなど）を、１０ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液で再構成する。凍結乾燥ストック酵素は、２８９２ＰＺ Ｕ／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、５ｍＬ～１５ｍＬの緩衝液中で再構成される。いくつかの実施形態では、再構成後のコラゲナ

ーゼストックは、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬの範囲、例えば、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約３５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約３００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２１０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２２０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２３０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２４０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２６０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２７０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２８０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２８９．２ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約３００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約３５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、または約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬである。

【０３９８】

いくつかの実施形態では、中性プロテアーゼは、１ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥ストック酵素は、１７５ＤＭＣＵ／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、再構成後の中性プロテアーゼストックは、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬの範囲、例えば、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約３５０ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約３００ＤＭＣ／ｍＬ、約１５０ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ、約１１０ＤＭＣ／ｍＬ、約１２０ＤＭＣ／ｍＬ、約１３０ＤＭＣ／ｍＬ、約１４０ＤＭＣ／ｍＬ、約１５０ＤＭＣ／ｍＬ、約１６０ＤＭＣ／ｍＬ、約１７０ＤＭＣ／ｍＬ、約１７５ＤＭＣ／ｍＬ、約１８０ＤＭＣ／ｍＬ、約１９０ＤＭＣ／ｍＬ、約２００ＤＭＣ／ｍＬ、約２５０ＤＭＣ／ｍＬ、約３００ＤＭＣ／ｍＬ、約３５０ＤＭＣ／ｍＬ、または約４００ＤＭＣ／ｍＬである。

【０３９９】

いくつかの実施形態では、ＤＮＡｓｅ　Ｉは、１ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥したストック酵素は、４ＫＵ／バイアルの濃度であった。いくつかの実施形態では、再構成後のＤＮａｓｅ　Ｉストックは、約１ＫＵ／ｍＬ～１０ＫＵ／ｍＬ、例えば、約１ＫＵ／ｍＬ、約２ＫＵ／ｍＬ、約３ＫＵ／ｍＬ、約４ＫＵ／ｍＬ、約５ＫＵ／ｍＬ、約６ＫＵ／ｍＬ、約７ＫＵ／ｍＬ、約８ＫＵ／ｍＬ、約９ＫＵ／ｍＬ、または約１０ＫＵ／ｍＬの範囲である。

【０４００】

いくつかの実施形態では、酵素のストックは可変であり、濃度を決定する必要があり得る。いくつかの実施形態では、凍結乾燥ストックの濃度を検証することができる。いくつかの実施形態では、消化カクテルに添加される酵素の最終量は、決定されたストック濃度に基づいて調整される。

【０４０１】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、約４．７ｍｌの滅菌ＨＢＳＳ中に約１０．２ｕｌの中性プロテアーゼ（０．３６ＤＭＣ　Ｕ／ｍＬ）、２１．３ｕｌのコラゲナーゼ（１．２ＰＺ／ｍＬ）及び２５０ｕｌのＤＮＡｓｅ　Ｉ（２００Ｕ／ｍＬ）を含む。

【０４０２】

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

形成される。

【０４０３】

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

【０４０４】

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

【０４０５】

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

【０４０６】

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

【０４０７】

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

【０４０８】

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

【０４０９】

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

【０４１０】

いくつかの実施形態では、断片化は、例えば、解剖及び消化を含む物理的断片化を含む。いくつかの実施形態では、断片化は、物理的断片化である。いくつかの実施形態では、断片化は、解剖である。いくつかの実施形態では、断片化は、消化によるものである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、患者から取得された腫瘍試料を消化または断片化することから取得された酵素腫瘍消化物及び腫瘍断片から最初に培養され得る。

【０４１１】

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

【０４１２】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍断片から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、鋭的解剖によって取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3～１０mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3～８

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

【０４１３】

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

【０４１４】

いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、腫瘍の内部構造を維持するために行われる。いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、メスでのこ引き動作を行うことなく行われる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、ＲＰＭＩ１６４０（２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）であるが、これに限定されない酵素培地中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって生成された。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍は、およそ１分間機械的に解離され得る。その後、溶液が５％CO_2中３７℃で３０分間インキュベートされ、その後、およそ１分間再び機械的に破壊され得る。５％　CO_2中３７℃で３０分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ１分間、３回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きい組織片が存在する場合、３回目の機械的破壊後、５％CO_2中３７℃でさらに３０分間インキュベートするかにかかわらず、１回または２回の追加の機械的解離が試料に適用された。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、Ｆｉｃｏｌｌを使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。

【０４１５】

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

【０４１６】

いくつかの実施形態では、細胞は、試料採取後に任意選択で凍結され、ステップＢに記載される拡張に入る前に凍結保存され得、これは、以下でさらに詳細に説明され、図１及び図８にも例示される。

【０４１７】

１．胸水Ｔ細胞及びＴＩＬ

いくつかの実施形態では、試料は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのＴ細胞またはＴＩＬの供給源は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、試料は、胸水由来試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのＴＩＬの供給源は、胸水由来試料である。例えば、米国特許公開第２０１４／０２９５４２６号に記載されている方法を参照されたく、これはすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０４１８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬと思われる、及び／またはＴＩＬを含む任意の胸腔内液または胸水を利用することができる。かかる試料は、ＮＳＣＬＣもしくはＳＣＬＣなどの原発性または転移性肺癌に由来し得る。いくつかの実施形態では、試料は、別の臓器、例えば、乳房、卵巣、結腸、または前立腺に由来する二次転移性がん細胞に由来し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜浸出液である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜漏出液である。他の生体試料は、例えば、腹部からの腹水または膵嚢胞液を含む、ＴＩＬを含有する他の漿液を含み得る。腹水及び胸腔内液は、非常に類似した化学系を伴い、腹部及び肺の両方が、悪性腫瘍における同じ物質の胸膜空間及び腹部空間に中皮線及び流体形態を有し、いくつかの実施形態では、かかる流体は、ＴＩＬを含有する。開示される方法が胸水を利用するいくつかの実施形態では、同じ方法が、ＴＩＬを含有する他の嚢胞液を使用して同様の結果で行われてもよい。

【０４１９】

いくつかの実施形態では、胸腔内液は、患者から直接除去された未処理の形態である。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、さらなる処理ステップの前に、ＥＤＴＡまたはヘパリンチューブなどの標準的な採血管に入れられる。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、さらなる処理ステップの前に、標準的なＣｅｌｌＳａｖｅ（登録商標）チューブ（Ｖｅｒｉｄｅｘ）に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、生存ＴＩＬの数の減少を避けるために、患者から採取した直後にＣｅｌｌＳａｖｅチューブに入れられる。生存ＴＩＬの数は、４℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置されると、２４時間以内に大幅に減少する可能性がある。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの除去後１時間、５時間、１０時間、１５時間、または最大２４時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、４℃で、患者からの除去後１時間、５時間、１０時間、１５時間、または最大２４時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

【０４２０】

いくつかの実施形態では、選択された対象からの胸腔内液試料は、希釈され得る。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：１０である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：９である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：８である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：５である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：２である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：１である。いくつかの実施形態では、希釈剤には、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、別の緩衝液、または生理学的に許容される希釈剤が含まれる。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの収集及び希釈の直後にＣｅｌｌＳａｖｅチューブ内に入れられ、生存ＴＩＬの減少を回避し、これは、４℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置された場合、２４～４８時間以内に有意に生じ得る。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、患者からの除去及び希釈後１時間、５時間、１０時間、１５時間、２４時間、３６時間、最大４８時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、４℃で、患者からの除去及び希釈後１時間、５時間、１０時間、１５時間、２４時間、３６時間、最大４８時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

【０４２１】

さらに他の実施形態では、胸腔内液試料は、さらなる処理ステップの前に、従来の手段によって濃縮される。いくつかの実施形態では、胸腔内液のこの前処理は、方法を実施する実験室への輸送のために、またはその後の分析のために（例えば、採取後２４～４８時間より後に）胸水を凍結保存しなければならない状況において好ましい。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、それが対象から採取された後に胸腔内液試料を遠心分離し、遠心分離物またはペレットを緩衝液中に再懸濁することによって調製される。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、輸送または後の分析及び／または処理のために凍結保存される前に、複数の遠心分離及び再懸濁に供される。

【０４２２】
いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、濾過法を使用することによって、さらなる処理ステップの前に濃縮される。いくつかの実施形態では、さらなる処理で使用される胸腔内液試料は、胸腔内液が膜を通過することを可能にするが腫瘍細胞を保持する、既知で本質的に均一な孔径を含むフィルターを通して流体を濾過することによって調製される。いくつかの実施形態では、膜の細孔の直径は、少なくとも４μＭであり得る。他の実施形態では、細孔直径は、５μＭ以上であり得、他の実施形態では、６、７、８、９、または１０μＭのうちのいずれかであり得る。濾過後、膜によって保持されたＴＩＬを含む細胞を、膜から適切な生理学的に許容される緩衝液にすすいでもよい。次いで、このように濃縮されたＴＩＬを含む細胞は、方法のさらなる処理ステップで使用することができる。

【０４２３】
いくつかの実施形態では、胸腔内液試料（例えば、未処理の胸腔内液を含む）、希釈胸腔内液、または再懸濁細胞ペレットは、試料中に存在する無核赤血球を特異的に溶解する溶解試薬と接触させる。いくつかの実施形態では、このステップは、胸腔内液がかなりの数のＲＢＣを含む状況で、さらなる処理ステップの前に行われる。好適な溶解試薬には、単一の溶解試薬もしくは溶解試薬及びクエンチ試薬、または溶解剤、クエンチ試薬及び固定試薬が含まれる。好適な溶解システムは市販されており、ＢＤ　Ｐｈａｒｍ　Ｌｙｓｅ（商標）システム（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ）が含まれる。他の溶解システムには、Ｖｅｒｓａｌｙｓｅ（商標）システム、ＦＡＣＳｌｙｓｅ（商標）システム（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ）、Ｉｍｍｕｎｏｐｒｅｐ（商標）システム、またはＥｒｙｔｈｒｏｌｙｓｅ　ＩＩシステム（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）、または塩化アンモニウムシステムが含まれる。いくつかの実施形態では、溶解試薬は、赤血球の効率的な溶解、ならびに胸水におけるＴＩＬ及びＴＩＬの表現型特性の保存のような主要な要件によって異なり得る。溶解のための単一の試薬を利用することに加えて、本明細書に記載の方法に有用な溶解システムは、第２の試薬、例えば、方法の残りのステップ中に溶解試薬の効果をクエンチまたは遅延させるもの、例えばＳｔａｂｉｌｙｓｅ（商標）試薬（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）を含むことができる。溶解試薬の選択または方法の好ましい実施に応じて、従来の固定試薬を使用することもできる。

【０４２４】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、未処理、希釈または多重遠心分離または処理された胸腔内液試料は、本明細書で提供されるようにさらに処理及び／または拡張される前に、約－１４０℃の温度で凍結保存される。

【０４２５】
２．ＣＤ８＋ＴＩＬの検出方法
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＣＤ８結合ドメインを含むＣＤ８検出剤は、インビボでの標的ＣＤ８及び／またはＣＤ８＋細胞の存在または非存在の検出に使用できる。方法は、ＣＤ８結合検出剤を患者に投与することを含み得る。方法は、ＣＤ８への薬剤の結合の有無を検出することを含み得る。

【０４２６】
いくつかの実施形態では、患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定することで、腫瘍切除または生検に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置が得られる。いくつかの実施形態では、生検は、針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、または細針吸引（ＦＮＡ）である。

【０４２７】
いくつかの実施形態では、患者の体内の標的ＣＤ８＋ＴＩＬの数及び／または局在化が決定される。いくつかの実施形態では、患者の体内のＣＤ８＋細胞の数及び／または局在化を造影及び／または決定して、腫瘍の切除のための腫瘍病変部位を特定及び選択するか、またはＣＤ８＋シグナルが濃縮されている腫瘍病変中の領域（複数可）への腫瘍の生検の指針を得るステップは、患者の腫瘍組織から拡張される治療的ＴＩＬ集団での治療の効力を改善し得、患者におけるＴＩＬ治療の有効性を増強し得る。いくつかの実施形態では

、患者の体内のＣＤ８＋細胞の数及び／または局在化を造影及び／または決定するステップは、患者から腫瘍試料を取得する前に行われる。いくつかの実施形態では、患者の体内のＣＤ８＋細胞の数、密度、及び／または局在化を造影及び／または決定するステップは、生検の前に行われる。

【０４２８】

いくつかの実施形態では、患者腫瘍試料は、ＣＤ８＋シグナルが濃縮されているまたは集中している位置から取得される。いくつかの実施形態では、患者腫瘍試料は、細針吸引（ＦＮＡ）、コア生検、小生検（例えば、パンチ生検を含む）として取得される。

【０４２９】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８＋細胞の濃縮は、バックグラウンドシグナルと比較して少なくとも２倍～１００倍またはそれ超である本明細書で提供される検出可能なマーカー由来の造影シグナルによって示される。いくつかの実施形態では、濃縮ＣＤ８＋細胞は、バックグラウンドシグナルと比較して少なくとも２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、１００倍、またはそれ超の造影シグナルを与える。

【０４３０】

いくつかの実施形態では、造影シグナルは、診断走査を介して収集される。いくつかの実施形態では、診断走査は、非侵襲的である。いくつかの実施形態では、非侵襲的診断走査は、陽電子放出断層撮影（ＰＥＴ）、単一光子放出コンピューター断層撮影（ＳＰＥＣＴ）、コンピューター断層撮影（ＣＴ）、磁気共鳴画像法（ＮＭＲ）、または蛍光発光の検出から選択される。いくつかの実施形態では、ＰＥＴには、限定されないが、マイクロＰＥＴ造影が含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤の結合の有無は、２つ以上の造影形態を介して検出される。いくつかの実施形態では、検出は、近赤外線（ＮＩＲ）及び／またはチェレンコフを介するものであり得る。

【０４３１】

いくつかの実施形態では、患者の体内のＣＤ８＋細胞の数、密度、及び／または局在化を造影及び／または決定するステップが行われて、腫瘍試料採取の指針が得られる。いくつかの実施形態では、患者の体内のＣＤ８＋細胞の数、密度、及び／または局在化を造影及び／または決定するステップが行われて、本明細書で提供されるＴＩＬ治療及び／または拡張のための出発材料の収集の指針が得られる。いくつかの実施形態では、患者の体内のＣＤ８＋細胞の数及び／または局在化を造影及び／または決定するステップが行われて、生検位置の指針が得られる。いくつかの実施形態では、腫瘍試料は、細針吸引（ＦＮＡ）、コア生検、小生検（例えば、パンチ生検を含む）として取得される。

【０４３２】

いくつかの実施形態では、患者内のＣＤ８＋細胞の数、密度、及び／または局在化を造影及び／または決定するステップが行われて、異なる腫瘍位置の間のＣＤ８浸潤及び腫瘍炎症の不均一性が特定される。いくつかの実施形態では、患者内のＣＤ８＋細胞の数、密度、及び／または局在化を造影及び／または決定するステップが行われて、個々の腫瘍位置内のＣＤ８浸潤及び腫瘍炎症の不均一性が特定される。いくつかの実施形態では、患者内のＣＤ８＋細胞の数、密度、及び／または局在化を造影及び／または決定するステップが行われて、どの病変及び病変内のどの場所を生検するかの指針が得られる。

【０４３３】

いくつかの実施形態では、患者腫瘍試料は、濃縮ＣＤ８＋細胞を含む位置から取得される。いくつかの実施形態では、得られる患者腫瘍試料は、ＣＤ８＋濃縮ＴＩＬ集団を含む。いくつかの実施形態では、腫瘍試料中のＣＤ８＋濃縮ＴＩＬ集団は、本開示に提供される方法を使用して拡張される。

【０４３４】

いくつかの実施形態では、患者内のＣＤ８＋細胞の数、密度、及び／または局在化を造影及び／または決定するステップがＴＩＬ治療の間及び／または後に行われて、注入ＴＩＬの薬力学的監視または特徴付けが可能になる。いくつかの実施形態では、患者内のＣＤ

８＋細胞の数、密度、及び／または局在化を造影及び／または決定するステップが患者への治療的ＴＩＬ集団の投与後に行われて、ＴＩＬ治療の臨床的有効性が評価され、及び／または臨床的な意思決定の指針が得られる。治療の前、間、及び後にＣＤ８＋細胞の存在について患者の全身を造影する能力は、個別化された患者管理に有用な情報を与えるものである。いくつかの実施形態では、利用可能なＴＩＬ治療をマッチングするｓｃＦｖ、ミニボディ、及びｃｙｓ－ダイアボディ診断断片は、ＴＩＬ治療に対する患者の応答性の臨床的評価を可能にするものである。

【０４３５】

いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖ、ミニボディ、及び／またはｃｙｓ－ダイアボディ抗体断片は、画像診断に優れた薬物動態及び／または薬力学的特性を有する。現在の技術で利用されるインタクトな抗体での造影は、全長抗体の血清クリアランスが遅いことから、コントラストの高い画像の生成に非常に長い時間を要するものである（注射後およそ７～８日）。ミニボディ及びｃｙｓ－ダイアボディは、同日または翌日の造影の機会を提供するものである。侵攻性に進行する疾患を有する患者にとっては１日１日が命にかかわり、早期時点で適切な治療手法を特定する能力は、患者の生存を改善する潜在力を有するものである。全長抗体と比較してミニボディまたはｃｙｓ－ダイアボディ断片での造影の場合、移動に伴う滞在期間または１週間後の再訪問の必要性がなくなることから、同日または翌日の造影からは、治療／診断を受けるために長距離を移動する患者の多くが直面する問題に対する移動面での解決策も得られる。

【０４３６】

さらに、いくつかの実施形態では、ｃｙｓ－ダイアボディ断片成分単量体は、ジスルフィド結合を形成するＣ末端システイン残基を含む。これらの共有結合ｃｙｓ－ダイアボディシステイン残基は、穏和な化学的還元を介して開裂して、部位特異的なコンジュゲートのための活性チオール基を与え得るものである。現在、抗体のコンジュゲートは、機能的に重要な抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）中に一般に位置するチロシン残基またはリジン残基の非特異的標的化に依存するものである一方で、システイン残基がＣＤＲ中に位置することは稀である。適切に折り畳まれたｃｙｓ－ダイアボディ上のＣ末端システイン残基の位置はＣＤＲとは対極にあり、コンジュゲート物質によってＣＤＲ－抗原相互作用が立体的に遮断されることを阻止する。

【０４３７】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤が対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。いくつかの実施形態では、対象は、がん患者である。いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤が対象に注入される。いくつかの実施形態では、注入は、静脈内に行われる。いくつかの実施形態では、注入は、腹腔内に行われる。いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤は、（介入的な適用または手術中の適用の場合に行われるように）局部的または局所的に対象に適用される。いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤を含むカプセルが、対象に対して、例えば、経口的または腹腔内に適用される。いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤は、対象による免疫原性応答のリスクを低減するように選択される。例えば、ヒト対象については、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤は、本明細書に記載のようにヒト化され得る。いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤のインビボでの適用後、試料または試料の一部が宿主から採取される。いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤は、インビボで適用され、本明細書に記載のように一定時間インビボでインキュベートされ、インビトロ分析（例えば、本明細書に記載のように標的分子へのＣＤ８結合ドメイン含有薬剤の結合の有無をインビトロで検出すること）用に試料が採取される。

【０４３８】

いくつかの実施形態では、陽電子放出断層撮影（ＰＥＴ）、単一光子放出コンピューター断層撮影（ＳＰＥＣＴ）、コンピューター断層撮影（ＣＴ）、磁気共鳴画像法（ＮＭＲ）、または蛍光発光の検出、のうちの少なくとも１つを介してＣＤ８結合ドメインを含む

薬剤の結合の有無が検出される。ＰＥＴには、限定されないが、ｍｉｃｒｏＰＥＴ造影が含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤の結合の有無は、２つ以上の造影形態を介して検出される。いくつかの実施形態では、検出は、近赤外線（ＮＩＲ）及び／またはチェレンコフを介するものであり得る。

【０４３９】

いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖ、ミニボディ、及び／またはｃｙｓ－ダイアボディ抗体断片は、画像診断に優れた薬物動態及び／または薬力学的特性を有する。現在の技術で利用されるインタクトな抗体での造影は、全長抗体の血清クリアランスが遅いことから、コントラストの高い画像の生成に非常に長い時間を要するものである（注射後およそ７～８日）。ミニボディ及びｃｙｓ－ダイアボディは、同日または翌日の造影の機会を提供するものである。侵攻性に進行する疾患を有する患者にとっては１日１日が命にかかわり、早期時点で適切な治療手法を特定する能力は、患者の生存を改善する潜在力を有するものである。全長抗体と比較してミニボディまたはｃｙｓ－ダイアボディ断片での造影の場合、移動に伴う滞在期間または１週間後の再訪問の必要性がなくなることから、同日または翌日の造影からは、治療／診断を受けるために長距離を移動する患者の多くが直面する問題に対する移動面での解決策も得られる。

【０４４０】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含むＣＤ８検出／造影剤が約１回以上の用量で患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬剤は、０．１～２０ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、薬剤は、０．１、０．２、０．５、１．０、１．５、５、１０ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、患者は、注射からおよそ１～２、６～８、２４、４８、及び９６～１４４時間の時点でＰＥＴ／ＣＴ走査を受ける。いくつかの実施形態では、標準取り込み値（ＳＵＶ）は、約０．１～約１００の造影シグナル範囲から測定される。いくつかの実施形態では、ＳＵＶは、約０．１～約１０の造影シグナル範囲から測定される。いくつかの実施形態では、ＳＵＶは、約１０～約２０の造影シグナル範囲から測定される。いくつかの実施形態では、ＳＵＶは、約３０～約４０の造影シグナル範囲から測定される。いくつかの実施形態では、ＳＵＶは、約４０～約５０の造影シグナル範囲から測定される。いくつかの実施形態では、ＳＵＶは、約６０～約７０の造影シグナル範囲から測定される。いくつかの実施形態では、ＳＵＶは、約７０～約８０の造影シグナル範囲から測定される。いくつかの実施形態では、ＳＵＶは、約８０～約９０の造影シグナル範囲から測定される。いくつかの実施形態では、ＳＵＶは、約９０～約１００またはそれ超の造影シグナル範囲から測定される。

【０４４１】

いくつかの実施形態では、正常な臓器、リンパ節、及び病変部での薬剤の生体内分布が評価された。いくつかの実施形態では、およそ５分、３０分、及び６０分の時点、ならびに後の造影時点に血清試料が取得された。いくつかの実施形態では、患者は、注入の間及び最後の造影時点に至るまで安全性の監視が行われる。

【０４４２】

いくつかの実施形態では、本開示は、ＣＤ８検出剤、ならびにＣＤ８＋ＴＩＬの検出及び／または濃縮のためのその使用を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＣＤ８検出剤は、ＣＤ８結合ドメインを含むタンパク質である。いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインは、ＣＤ８、ＣＤ８＋Ｔ細胞、組織、臓器、及び同様のものの位置及び／または量を診断、検出、及び／または視覚化することを可能にするために、ＣＤ８を検出可能なマーカーにコンジュゲートされる。例示的なＣＤ８剤の説明は米国特許公開公報第ＵＳ２０１９／０３８２４８７号及び国際ＰＣＴ公開公報第ＷＯ／２０２０／０６９４３３号に示されており、これらはそれぞれ、その全体があらゆる目的のために参照によって本明細書に組み込まれる。

【０４４３】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤は、抗ＣＤ８抗体またはその断片である。いくつかの実施形態では、薬剤は、抗体断片から形成される直鎖抗体及び多

重特異性抗体を含む。抗体断片の例としては、限定されないが、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、Ｆｄ、ドメイン抗体（ｄＡｂ）、相補性決定領域（ＣＤＲ）断片、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、一本鎖抗体断片、マキシボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、直鎖抗体、キレート組換え抗体、トリボディもしくはバイボディ、イントラボディ、ナノボディ、小モジュラー免疫医薬（ＳＭＩＰ）、抗原結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質、ラクダ化抗体、ＶＨＨ含有抗体、またはそれらの変異タンパク質もしくは誘導体、及びポリペプチドへの特異的抗原結合を付与する上で十分な免疫グロブリンの少なくとも一部（ＣＤＲ配列など）を含むポリペプチド（但し、抗体が所望の生物学的活性を保持することが条件である）が挙げられる。

【０４４４】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８検出剤は、ＣＤ８に特異的に結合するダイアボディ（Ｃｙｓ－ダイアボディなど）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ８検出剤は、ＣＤ８に特異的に結合するミニボディを含む。

【０４４５】

ミニボディは、抗原に対する二価結合特性を維持しつつ、全長抗体よりも小さな分子量を有する抗体形式である。その小型化サイズが故に、ミニボディは、系からのそのクリアランスが高速化しており、腫瘍組織の標的化時の浸透性が増強されている。迅速なクリアランスを伴って強力な標的化を行うための能力を有することから、ミニボディは、循環時間が長期化すると患者投薬または線量測定が有害になり得る画像診断及び細胞毒性／放射性ペイロードの送達に有利である。ＰＫに差があり、Ｆｃガンマ受容体に結合する定常領域が存在しないことから、ミニボディは、より制御された様式で結合及び免疫応答の刺激を行って、望ましくない生物学的作用（生命を脅かすサイトカインストームの誘導など）を少なくするまたは低減することができる。

【０４４６】

いくつかの実施形態では、ミニボディは、親抗体の高い結合親和性及び特異性を維持しつつ、画像診断及びある特定の治療用途に有利な薬物動態特徴を有する。この薬物動態は、こうした断片が抗原を標的にし、その後に迅速な高コントラスト造影が得られるように系を迅速にクリアにできるという点で、全長親抗体での造影と比較してこうした断片に望ましいものである。いくつかの実施形態では、ミニボディの血清半減期が短くなっていることで、ミニボディの注射からおよそ４～７２時間という長時間にわたる範囲で最適な造影を得ることが可能である。これによって同日の造影が可能になり得、このことは、患者ケア管理に関して臨床現場において多大な利益になり得る。

【０４４７】

いくつかの実施形態では、ミニボディは、ホモ二量体である。いくつかの実施形態では、ミニボディの各単量体は、可変重ドメイン及び可変軽ドメインを含むＣＤ８に特異的に結合する一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）を含む。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖはそれぞれ、ＣＨ３ドメイン（ヒトＩｇＧ１　ＣＨ３ドメインなど）に連結される。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖは、ヒンジ領域及び任意選択でアミノ酸リンカー（ＧＳリンカーなど）を介してＣＨ３ドメインに係留される。いくつかの実施形態では、ミニボディ（ｓｃＦｖ－ＣＨ３）は、ＣＨ３ドメイン間の結び付き及びヒンジ領域内でのジスルフィド結合の形成に起因して、安定二量体として存在する。いくつかの実施形態では、分泌を可能にするためにミニボディの可変重ドメインのＮ末端にシグナル配列が融合される。いくつかの実施形態では、ＧＳリンカー残基は可動性を実現させる。いくつかの実施形態では、グルタミン及び／またはリジン残基が付加されて溶解性が増強され得る。

【０４４８】

いくつかの実施形態では、ミニボディは、ヒト化ミニボディである。いくつかの実施形態では、ミニボディは、ヒトミニボディである。いくつかの実施形態では、ミニボディは、マウスミニボディである。いくつかの実施形態では、ミニボディは、キメラミニボディである。

【０４４９】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＣＤ８検出剤は、ＣＤ８抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ミニボディのＣＤ８抗原結合ドメインは、ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＮＩＫＤＴＹＩＨＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＡＲＩＤＰＡＮＤＮＴＬＹＡＳＫＦＱＧＲＡＴＩＳＡＤＴＳＫＮＴＡＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＧＲＧＹＧＹＹＶＦＤＨＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号２３８）というアミノ酸配列を有する可変重ドメインまたはその任意の機能的に同等のバリアントを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ８抗原結合ドメインは、配列番号２３８のＶＨ　ＣＤＲ１、ＶＨ　ＣＤＲ２、及びＶＨ　ＣＤＲ３を含む。

【０４５０】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８抗原結合ドメインは、ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＴＶＫＩＳＣＫＶＳＧＦＮＩＫＤＴＹＩＨＷＶＱＱＡＰＧＫＧＬＥＷＭＧＲＩＤＰＡＮＤＮＴＬＹＡＳＫＦＱＧＲＶＴＩＴＡＤＴＳＴＤＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＧＹＧＹＹＶＦＤＨＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号２３９）というアミノ酸配列を有する可変重ドメインまたはその任意の機能的に同等のバリアントを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ８抗原結合ドメインは、配列番号２３９のＶＨ　ＣＤＲ１、ＶＨ　ＣＤＲ２、及びＶＨ　ＣＤＲ３を含む。

【０４５１】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８抗原結合ドメインは、ＤＶＱＩＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＴＳＲＳＩＳＱＹＬＡＷＹＱＱＫＰＧＫＶＰＫＬＬＩＹＳＧＳＴＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＶＡＴＹＹＣＱＱＨＮＥＮＰＬＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号２４０）というアミノ酸配列を有する可変重ドメインまたはその任意の機能的に同等のバリアントを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ８抗原結合ドメインは、配列番号２４０のＶＬ　ＣＤＲ１、ＶＬ　ＣＤＲ２、及びＶＬ　ＣＤＲ３を含む。

【０４５２】

いくつかの実施形態では、本発明のＣＤ８抗体のＣＤＲのうちの１つ以上に１つ以上のアミノ酸修飾が施される。一般に、いずれの単一ＣＤＲにおいても、置換されるアミノ酸の数は１つのみまたは２つのみまたは３つのみであり、一般に、一連のＣＤＲ内でなされる変更の数は、１以下、２以下、３以下、４以下、５以下、６以下、７以下、８以下、９以下、または１０以下である。一方で、いずれのＣＤＲにおいても、置換無し、１つ、２つ、または３つの置換の組み合わせはいずれも独立したものであり、任意選択で任意の他の置換と組み合わせられ得ることを理解されたい。したがって、本発明の抗体は、（ａ）本明細書に列挙される配列、（ｂ）１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個、またはそれ超のアミノ酸置換によって、（ａ）において特定されるＣＤＲアミノ酸配列とは異なる配列、（ｃ）（ａ）または（ｂ）において特定される配列との配列同一性が９０％以上、９５％以上、９８％以上、または９９％以上であるアミノ酸配列、（ｄ）本明細書に列挙されるアミノ酸をコードする核酸配列を有するポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、からなる群から選択されるＣＤＲアミノ酸配列を含む。２つのアミノ酸配列の間の同一性パーセントは、ＰＡＭ１２０重み残基表、１２のギャップ長ペナルティ、及び４のギャップペナルティを使用して、ＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に組み込まれているＥ．Ｍｅｙｅｒｓ　ａｎｄ　Ｗ．Ｍｉｌｌｅｒ（Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ．，４：１１－１７（１９８８））のアルゴリズムを使用して決定され得る。さらに、２つのアミノ酸配列の間の同一性パーセントは、Ｂｌｏｓｓｕｍ６２行列またはＰＡＭ２５０行列のいずれか、ならびに１６、１４、１２、１０、８、６、または４のギャップの重み、及び１、２、３、４、５、または６の長さの重みを使用して、ＧＣＧソフトウェアパッケージ（商業的に利用可能）においてＧＡＰプログラムに組み込まれているＮｅｅｄｌｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｗｕｎｓｃｈ（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４４－４５３（１９７０））アルゴリズムを使用して決定され得る。

【０４５３】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８検出剤は、検出可能なマーカーをさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ８検出剤の検出可能なマーカーは、薬剤のＣＤ８結合ドメインに直接的または間接的にコンジュゲートされている。本明細書で提供される薬剤に含まれる検出可能なマーカーには、限定されないが、放射性物質（例えば、放射性同位体、放射性核種、放射標識、または放射性トレーサー）、色素、コントラスト剤、蛍光化合物または分子、生物発光化合物または分子、酵素、及び造影剤（例えば、常磁性イオン）が含まれる。さらに、いくつかのナノ粒子（例えば、量子ドット及び金属ナノ粒子（以下に記載のもの））は、検出剤としての使用に適し得る。いくつかの実施形態では、検出可能なマーカーは、インドシアニングリーン（ＩＣＧ）である。

【０４５４】

本明細書に記載の実施形態に従って検出可能なマーカーとして使用され得る放射性物質の例としては、限定されないが、^{18}Ｆ、^{18}Ｆ－ＦＡＣ、^{32}Ｐ、^{33}Ｐ、^{45}Ｔｉ、^{47}Ｓｃ、^{52}Ｆｅ、^{59}Ｆｅ、^{62}Ｃｕ、^{64}Ｃｕ、^{67}Ｃｕ、^{67}Ｇａ、^{68}Ｇａ、^{75}Ｓｃ、^{77}Ａｓ、^{86}Ｙ、^{90}Ｙ、^{89}Ｓｒ、^{89}Ｚｒ、^{94}Ｔｃ、^{94}Ｔｃ、^{99}ｍＴｃ、^{99}Ｍｏ、^{105}Ｐｄ、^{105}Ｒｈ、^{111}Ａｇ、^{111}Ｉｎ、^{123}Ｉ、^{124}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{142}Ｐｒ、^{143}Ｐｒ、^{149}Ｐｍ、^{153}Ｓｍ、$^{154-158}$Ｇｄ、^{161}Ｔｂ、^{166}Ｄｙ、^{166}Ｈｏ、^{169}Ｅｒ、^{175}Ｌｕ、^{177}Ｌｕ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{189}Ｒｅ、^{194}Ｉｒ、^{198}Ａｕ、^{199}Ａｕ、^{211}Ａｔ、^{211}Ｐｂ、^{212}Ｂｉ、^{212}Ｐｂ、^{213}Ｂｉ、^{223}Ｒａ、及び^{225}Ａｃが挙げられる。検出可能なマーカーとして使用され得る常磁性イオン物質の例としては、限定されないが、遷移金属及びランタニド金属（例えば、６～９、２１～２９、４２、４３、４４、または５７～７１の原子番号を有する金属）のイオンが挙げられる。こうした金属には、Ｃｒ、Ｖ、Ｍｎ、Ｆｅ、Ｃｏ、Ｎｉ、Ｃｕ、Ｌａ、Ｃｅ、Ｐｒ、Ｎｄ、Ｐｍ、Ｓｍ、Ｅｕ、Ｇｄ、Ｔｂ、Ｄｙ、Ｈｏ、Ｅｒ、Ｔｍ、Ｙｂ、及びＬｕのイオンが挙げられる。

【０４５５】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインは、デフェロキサミンを介して^{89}Ｚｒにコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ミニボディは、^{64}Ｃｕにコンジュゲートされる。

【０４５６】

検出可能なマーカーが放射性金属または常磁性イオンである場合、いくつかの実施形態では、マーカーは、長い尾部を有する試薬と反応し得るものであり、長い尾部には、こうしたイオンとの結合のための１つ以上のキレート基が付加されている。長い尾部は、ポリマー（ポリリジン、多糖、またはイオンとの結合のためのキレート基に結合され得るペンダント基を有する他の誘導体化された鎖もしくは誘導体化可能な鎖など）であり得る。本明細書に記載の実施形態に従って使用され得るキレート基の例としては、限定されないが、エチレンジアミンテトラ酢酸（ＥＤＴＡ）、ジエチレントリアミンペンタ酢酸（ＤＴＰＡ）、ＤＯＴＡ、ＮＯＴＡ、ＮＯＧＡＤＡ、ＮＥＴＡ、デフェロキサミン（ＤｆＯ）、ポルフィリン、ポリアミン、クラウンエーテル、ビス－チオセミカルバゾン、ポリオキシム、及び同様の基が挙げられる。キレートは、抗原結合コンストラクトに対して、免疫反応性の消失を最小限にし、凝集及び／または内部架橋を最小限にしつつ当該分子への結合の形成を可能にする基によって連結され得る。同じキレートは、非放射性金属（マンガン、鉄、及びガドリニウムなど）と錯体を形成する場合、本明細書に記載の抗原結合コンストラクト及び担体と共に使用するとＭＲＩに有用である。大環状キレート（ＮＯＴＡ、ＮＯＧＡＤＡ、ＤＯＴＡ、及びＴＥＴＡなど）は、限定されないが、それぞれガリウム、イットリウム、及び銅の放射性核種を含めて、様々な金属及び放射性金属との使用に有用である。他の環型キレート（大環状ポリエーテルなど）（放射性核種（ＲＡＩＴ向けのラジウム－２２３など）との安定的な結合の目的に合うものである）も使用され得る。ある特定の実施形態では、キレート部分は、ＰＥＴ造影剤（アルミニウム－１８ＲＦ複合体など）をＰＥＴ分析での使用のための標的化分子に付加するために使用され得る。

【０４５７】

Ｂ．ステップＢ：第１の拡張

いくつかの実施形態では、本方法は、対象／患者への投与時に複製サイクルを増加させることができ、したがって、より古いＴＩＬ（すなわち、対象／患者への投与前により多くの複製ラウンドをさらに受けたＴＩＬ）よりも追加の治療的利益を提供し得る、若いＴＩＬを得ることを提供する。若いＴＩＬの特徴は、文献、例えば、Ｄｏｎｉａ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃａｎｄ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２，７５，１５７－１６７、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１０，１６，６１２２－６１３１、Ｈｕａｎｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００５，２８，２５８－２６７、Ｂｅｓｓｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１３，１９，ＯＦ１－ＯＦ９、Ｂｅｓｓｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００９，３２：４１５－４２３、Ｒｏｂｂｉｎｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００４，１７３，７１２５－７１３０、Ｓｈｅｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００７，３０，１２３－１２９、Ｚｈｏｕ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００５，２８，５３－６２、及びＴｒａｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００８，３１，７４２－７５１に記載されており、それらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０４５８】

Ｔリンパ球及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、及びＣ（一定）は、免疫グロブリン及びＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬ及び／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬ及び／または図５及び／または図６に例示されるようにプロセス１Ｃと称される方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第１の拡張で取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加する。

【０４５９】

例えば、図１ステップＡに記載されるものなどの腫瘍断片の解剖または消化後に、結果として得られた細胞は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長を好む条件下で、ＩＬ－２を含む血清中で培養される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を有する不活性化ヒトＡＢ血清を含む培地中２ｍＬのウェル中でインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に３～１４日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}バルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、７～１４日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}バルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、１０～１４日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}バルクＴ

ＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、約１１日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約1×10^{8}バルクＴＩＬ細胞を生じる。

【０４６０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの拡張は、以下及び本明細書に記載の初期バルクＴＩＬ拡張ステップ（例えば、ＲＥＰ前と称されるプロセスを含み得る、図１のステップＢに記載のものなど）、続いて以下のステップＤ及び本明細書に記載の第２の拡張（ステップＤ、急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）ステップと称されるプロセスを含む）、続いて任意の凍結保存、続いて以下及び本明細書に記載の第２のステップＤ（再刺激ＲＥＰステップと称されるプロセスを含む）を使用して行われ得る。このプロセスから取得されたＴＩＬは、本明細書に記載の表現型特徴及び代謝パラメータについて任意で特徴付けられ得る。

【０４６１】

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

【０４６２】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、ステップＢのＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭ Ｈｅｐｅｓ、及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充した、ＧｌｕｔａＭＡＸを含むＲＰＭＩ １６４０からなる。培養物が４０ｍＬ容量及び１０cm^{2}ガス透過性シリコン底部（例えば、Ｇ－ＲＥＸ１０、Ｗｉｌｓｏｎ Ｗｏｌｆ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ，Ｎｅｗ Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ）を有するガス透過性フラスコ内で開始される実施形態では、各フラスコに、ＩＬ－２を含む１０～４０ｍＬのＣＭ中の$10\sim40\times10^{6}$個の生きた腫瘍消化細胞または５～３０個の腫瘍断片を装填した。Ｇ－ＲＥＸ１０及び２４ウェルプレートの両方を、５％ CO_{2}中３７℃の加湿インキュベーター内でインキュベートし、培養開始から５日後、培地の半分を取り除き、新たなＣＭ及びＩＬ－２と交換し、５日後、培地の半分を２～３日毎に交換した。

【０４６３】

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

【０４６４】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。

【０４６５】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｅｒｕｍ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ、ＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ、１

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

【０４６６】

いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔは、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＳＴ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。

【０４６７】

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

【０４６８】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ

ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【０４６９】

いくつかの実施形態では、合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ

Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【０４７０】

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

【０４７１】

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

【０４７２】

いくつかの実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる国際ＰＣＴ公開第ＷＯ／１９９８／０３０６７９号に記載されている合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の微量元素、及び１つ以上の抗生物質からなる群から選択される１つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベータ－メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、及び１つ以上の微量元素からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}

、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

【０４７３】

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

【０４７４】

いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、以下の表４の「１×培地中の濃度範囲」という見出しの下の列にリストされた濃度範囲で存在する。他の実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされた最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかでは、無血清サプリメントは、以下の表４の「サプリメント中の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。

【０４７５】

【表４】

表４：非微量元素部分成分の濃度

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

【０４７６】

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

【０４７７】

いくつかの実施形態では、Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｔｒａｎｓｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，４（１）２０１５（ｄｏｉ：１０．１０３８／ｃｔｉ．２０１４．３１）に記載の定義された培地が、本発明において有用である。簡潔には、ＲＰＭＩまたはＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）を基礎細胞培地として使用し、０、２％、５％、または１０％のいずれかのＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔを補充した。

【０４７８】
いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ベーターメルカプトエタノール（ＢＭＥまたはβＭＥ、２－メルカプトエタノールとしても知られる、ＣＡＳ６０－２４－２）を欠いている。
【０４７９】
腫瘍断片の調製後、結果として得られた細胞（すなわち、断片）は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長を好む条件下で、ＩＬ－２を含む血清中で培養される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を有する不活性化ヒトＡＢ血清を含む培地中２ｍＬのウェル中（または、いくつかの事例では、本明細書で概説されるように、ＡＰＣ細胞集団の存在下）でインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に１０～１４日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約1×10^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、第１の拡張中の成長培地は、ＩＬ－２またはそのバリアントを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬは、組換えヒトＩＬ－２（ｒｈＩＬ－２）である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき２０～３０$\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき２０$\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき２５$\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき３０$\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、４～８$\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、５～７$\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、６$\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、実施例５に記載されるように調製される。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約１０，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、または約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、約４０００ＩＵ／ｍＬ、約４５００ＩＵ／ｍＬ、約５０００ＩＵ／ｍＬ、約５５００ＩＵ／ｍＬ、約６０００ＩＵ／ｍＬ、約６５００ＩＵ／ｍＬ、約７０００ＩＵ／ｍＬ、約７５００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬ、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬ、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。
【０４８０】
いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約２００ＩＵ／ｍ

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

【０４８１】

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

【０４８２】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、抗ＣＤ３アゴニスト抗体、例えば、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、及び約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇの間、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含まない。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３抗体は、ムロモナブである。例えば、表１を参照されたい。

【０４８３】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、細胞培養培地中に１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは４－１ＢＢアゴニストであり、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、ＥＵ－１０１、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリアント、バイオシミラー、及び組み合

わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、０．１μｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。

【０４８４】

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

【０４８５】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、それは、ＣＭ１（培養培地１）と称される。いくつかの実施形態では、ＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充した、ＧｌｕｔａＭＡＸを含むＲＰＭＩ１６４０からなる。培養物が４０ｍＬ容量及び１０ｃｍ^{2}ガス透過性シリコン底部（例えば、Ｇ－ＲＥＸ１０、Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ　Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ，Ｎｅｗ　Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ）を有するガス透過性フラスコ内で開始される実施形態では、ＩＬ－２を含む１０～４０ｍＬのＣＭ中の１０～４０×１０^{6}個の生きた腫瘍消化細胞または５～３０個の腫瘍断片を、各フラスコに入れた。Ｇ－ＲＥＸ１０及び２４ウェルプレートの両方を、５％　ＣＯ$_2$中３７℃の加湿インキュベーター内でインキュベートし、培養開始から５日後、培地の半分を取り除き、新たなＣＭ及びＩＬ－２と交換し、５日後、培地の半分を２～３日毎に交換した。いくつかの実施形態では、ＣＭは、実施例に記載されるＣＭ１であり、実施例１を参照されたい。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地は、ＩＬ－２を含む。

【０４８６】

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

【０４８７】

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

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

【０４８８】

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

【０４８９】

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

【０４９０】

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

【０４９１】

１．サイトカイン及び他の添加物

本明細書に記載の拡張方法は、一般に、当該技術分野で知られているように、高用量のサイトカイン、特にＩＬ－２を含む培養培地を使用する。あるいは、ＴＩＬの急速拡張及び／または第２の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第ＵＳ２０１７／０１０７４９０Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせを用いて追加として可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２及びＩＬ－１５、ＩＬ－２及びＩＬ－２１、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２またはＩＬ－１５及びＩＬ－２１が含まれ、後者は、多くの実施形態において特定の用途を見出す。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにＴ細胞の生成に特に有利に働く。

【０４９２】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＫＴ－３抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、４－１ＢＢアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＸ－４０アゴニストの、培養培地への添加を含み得る。他の実施形態では、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（ＰＰＡＲ）－ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーターＩ－アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１９／０３０７７９６　Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップＢ中の培養培地で使用されてもよい。

【０４９３】

Ｃ．ステップＣ：第１の拡張から第２の拡張へと移行

いくつかの事例では、例えば、図１に示されるステップＢから取得されたＴＩＬ集団を含む、第１の拡張から取得されたバルクＴＩＬ集団は、以下で考察されるプロトコルを使用して、直ちに凍結保存され得る。あるいは、第２のＴＩＬ集団と称される第１の拡張から取得されたＴＩＬ集団は、以下で考察されるように、第２の拡張（ＲＥＰと称されることもある拡張を含み得る）に供され、その後、凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾ＴＩＬが治療に使用される場合、第１のＴＩＬ集団（バルクＴＩＬ集団と称されることもある）または第２のＴＩＬ集団（いくつかの実施形態では、ＲＥＰ　ＴＩＬ集団と称される集団を含み得る）は、拡張前または第１の拡張後及び第２の拡張前に、好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。

【０４９４】

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

【０４９５】

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

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

【０４９６】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、第１の拡張後及び第２の拡張前に保管されず、ＴＩＬは、第２の拡張に直接進む（例えば、いくつかの実施形態では、図１に示されるステップＢからステップＤへの移行中に保管されない）。いくつかの実施形態では、移行は、本明細書に記載されるように、閉鎖系内で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張由来のＴＩＬである第２のＴＩＬ集団は、移行期間なしで第２の拡張に直接進む。

【０４９７】

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

【０４９８】

Ｄ．ステップＤ：第２の拡張

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

【０４９９】

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

日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約８日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約９日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１０日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１１日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１２日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１３日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１４日間続行することができる。

【０５００】

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

【０５０１】

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

【０５０２】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍ

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

【０５０３】

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

【０５０４】

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

【０５０５】

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

【０５０６】

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

【０５０７】

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

態では、第２の拡張培養培地は、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－１５をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。

【０５０８】

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

【０５０９】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣ及び／または抗原提示細胞に対する比は、約１：２５、約１：５０、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００、約１：３２５、約１：３５０、約１：３７５、約１：４００、または約１：５００である。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣに対する比は、１：５０～１：３００である。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣに対する比は、１：１００～１：２００である。

【０５１０】

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

【０５１１】

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

【０５１２】

いくつかの実施形態では、ＲＥＰ及び／または第２の拡張は、以前に記載されたＴ－１７５フラスコ及びガス透過性バッグ（Ｔｒａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００８，３１，７４２－５１、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔ

ｈｅｒ．２００３，２６，３３２－４２）またはガス透過性培養器具（Ｇ－ＲＥＸフラスコ）を使用して行われ得る。いくつかの実施形態では、第２の拡張（急速拡張と称される拡張を含む）は、Ｔ－１７５フラスコ内で行われ、１５０ｍＬの培地に懸濁された約１×１０^{6}個のＴＩＬが、各Ｔ－１７５フラスコに添加され得る。ＴＩＬは、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３を補充した、１：１のＣＭとＡＩＭ－Ｖ培地との混合物中で培養され得る。Ｔ－１７５フラスコは、５％ CO_2中３７℃でインキュベートされ得る。培地の半分が、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む５０／５０培地を使用して５日目に交換され得る。いくつかの実施形態では、７日目に、２つのＴ－１７５フラスコからの細胞が３Ｌバッグ内で組み合わせられ得、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む３００ｍＬのＡＩＭ Ｖが、３００ｍＬのＴＩＬ懸濁液に添加された。各バッグ内の細胞の数を、毎日または隔日カウントし、新鮮な培地を添加して、０．５～２．０×１０^{6}細胞／ｍＬの間の細胞数を維持した。

【０５１３】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張、ならびに図１のステップＤで参照される拡張を含み得る）は、１００ｃｍのガス透過性シリコン底部（Ｇ－ＲＥＸ－１００、Ｗｉｌｓｏｎ Ｗｏｌｆ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｎｅｗ Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ，ＵＳＡから市販されている）を有する５００ｍＬ容量のガス透過性フラスコ内で行われ得る。５×１０^{6}または１０×１０^{6}ＴＩＬは、５％ヒトＡＢ血清、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）を補充した４００ｍＬの５０／５０培地中、ＰＢＭＣで培養され得る。Ｇ－ＲＥＸ－１００フラスコを、５％ CO_2中３７℃でインキュベートすることができる。５日目に、２５０ｍＬの上清が除去され、遠心分離ボトルに入れられ、１５００ｒｐｍ（４９１×ｇ）で１０分間遠心分離される。ＴＩＬペレットが、５％ヒトＡＢ血清、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬの新鮮な培地で再懸濁され、元のＧ－ＲＥＸ－１００フラスコに戻し追加され得る。ＴＩＬがＧ－ＲＥＸ－１００フラスコ内で連続的に拡張される場合、７日目に、各Ｇ－ＲＥＸ－１００内のＴＩＬが、各フラスコに存在する３００ｍＬの培地に懸濁され得、細胞懸濁液が３つの１００ｍＬアリコートに分割され得、それを使用して、３つのＧ－ＲＥＸ－１００フラスコに播種することができる。その後、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのＡＩＭ－Ｖが各フラスコに添加され得る。Ｇ－ＲＥＸ－１００フラスコが５％ CO_2中３７℃でインキュベートされてもよく、４日後に、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのＡＩＭ－Ｖが、各Ｇ－ＲＥＸ－１００フラスコに添加されてもよい。培養１４日目に、細胞が採取され得る。

【０５１４】

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

【０５１５】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される増殖を含む）が行われ、優れた腫瘍反応性のためにＴＩＬが選択されるステップをさらに含む。当該技術分野で知られている任意の選択方法が使用され得る。例えば、米国特許出願公開第２０１６／００１００５８Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている方法が、優れた腫瘍反応性のためのＴＩＬの選択に使用され得る。

【０５１６】

任意選択で、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準的なアッセイを使用して、第２の拡張（ＲＥＰ拡張と称される拡張を含む）後に行われ得る。例えば、死

細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンブルー排除アッセイが、バルクＴＩＬの試料上で行われ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ試料は、Ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２自動セルカウンター（Ｎｅｘｃｅｌｏｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｌａｗｒｅｎｃｅ，ＭＡ）を使用して計数され、生存率が決定され得る。いくつかの実施形態では、生存率は、標準のＣｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２　Ｉｍａｇｅ　Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ　Ａｕｔｏｍａｔｉｃ　Ｃｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｅｒプロトコルに従って決定される。

【０５１７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）は、以前に記載されているＴ－１７５フラスコ及びガス透過性バッグ（Ｔｒａｎ，ｅｔ　ａｌ．，２００８，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，３１：７４２－７５１及びＤｕｄｌｅｙ，ｅｔ　ａｌ．２００３，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２６：３３２－３４２）またはガス透過性Ｇ－ＲＥＸフラスコを使用して行われ得る。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、フラスコを使用して行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ガス透過性Ｇ－ＲＥＸフラスコを使用して行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、Ｔ－１７５フラスコ内で行われ、約１×１０^{6}個のＴＩＬが約１５０ｍＬの培地に懸濁され、これが各Ｔ－１７５フラスコに添加される。ＴＩＬは、「フィーダー」細胞として１対１００の比で放射線照射された（５０Ｇｙ）同種異系ＰＢＭＣと培養され、細胞が、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３を補充した、１：１のＣＭとＡＩＭ－Ｖ培地との混合物（５０／５０培地）中で培養された。Ｔ－１７５フラスコを、５％ＣＯ$_{2}$中３７℃でインキュベートする。いくつかの実施形態では、培地の半分が、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む５０／５０培地を使用して５日目に交換される。いくつかの実施形態では、７日目に、２つのＴ－１７５フラスコからの細胞が３Ｌバッグ内で組み合わせられ、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む３００ｍＬのＡＩＭ－Ｖが、３００ｍＬのＴＩＬ懸濁液に添加される。各バッグ内の細胞の数が毎日または隔日計数され得、新鮮な培地が添加されて、約０．５～約２．０×１０^{6}細胞／ｍＬの細胞数を維持することができる。

【０５１８】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）は、１００ｃｍ^{2}のガス透過性シリコン底部（Ｇ－ＲＥＸ－１００、Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ）を有する５００ｍＬ容量のフラスコ内で行われ、約５×１０^{6}または１０×１０^{6}ＴＩＬが、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３を補充した、４００ｍＬの５０／５０培地中、１対１００の比で放射線照射された同種異系ＰＢＭＣと培養される。Ｇ－ＲＥＸ－１００フラスコを、５％　ＣＯ$_{2}$中３７℃でインキュベートする。いくつかの実施形態では、５日目に、２５０ｍＬの上清が除去され、遠心分離ボトルに入れられ、１５００ｒｐｍ（４９１ｇ）で１０分間遠心分離される。その後、ＴＩＬペレットが、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬの新鮮な５０／５０培地に再懸濁され、元のＧ－ＲＥＸ－１００フラスコに戻し追加され得る。ＴＩＬがＧ－ＲＥＸ－１００フラスコ内で連続的に拡張される実施形態では、７日目に、各Ｇ－ＲＥＸ－１００内のＴＩＬを、各フラスコ内に存在する３００ｍＬの培地に懸濁し、細胞懸濁液を３つの１００ｍＬアリコートに分割し、それを使用して３つのＧ－ＲＥＸ－１００フラスコに播種する。その後、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのＡＩＭ－Ｖが各フラスコに添加される。Ｇ－ＲＥＸ－１００フラスコが５％　ＣＯ$_{2}$中３７℃でインキュベートされ、４日後に、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのＡＩＭ－Ｖが、各Ｇ－ＲＥＸ－１００フラスコに添加される。培養１４日目に、細胞が採取される。

【０５１９】

Ｔリンパ球及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、及びＣ（一定）は、免疫グロブリン及びＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態で

は、本方法によって取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第２の拡張において取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加する。

【０５２０】

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

【０５２１】

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

【０５２２】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。

【０５２３】

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

【０５２４】
いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔは、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＳＴ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。

【０５２５】
いくつかの実施形態では、無血清または合成培地中の総血清代替物濃度（ｖｏｌ％）は、総無血清または合成培地の約１体積％、２体積％、３体積％、４体積％、５体積％、６体積％、７体積％、８体積％、９体積％、１０体積％、１１体積％、１２体積％、１３体積％、１４体積％、１５体積％、１６体積％、１７体積％、１８体積％、１９体積％、または２０体積％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約３％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約５％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約１０％である。

【０５２６】
いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【０５２７】
いくつかの実施形態では、合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの

２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）

が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。
【０５２８】
いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約０．１ｍＭ～約１０ｍＭ、０．５ｍＭ～約９ｍＭ、１ｍＭ～約８ｍＭ、２ｍＭ～約７ｍＭ、３ｍＭ～約６ｍＭ、または４ｍＭ～約５ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約２ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。
【０５２９】
いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５ｍＭ～約１５０ｍＭ、１０ｍＭ～約１４０ｍＭ、１５ｍＭ～約１３０ｍＭ、２０ｍＭ～約１２０ｍＭ、２５ｍＭ～約１１０ｍＭ、３０ｍＭ～約１００ｍＭ、３５ｍＭ～約９５ｍＭ、４０ｍＭ～約９０ｍＭ、４５ｍＭ～約８５ｍＭ、５０ｍＭ～約８０ｍＭ、５５ｍＭ～約７５ｍＭ、６０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約６５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。
【０５３０】
いくつかの実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる国際ＰＣＴ公開第ＷＯ／１９９８／０３０６７９号に記載されている合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の微量元素、及び１つ以上の抗生物質からなる群から選択される１つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベータ－メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、及び１つ以上の微量元素からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。
【０５３１】
いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌの範囲であり、Ｌ－ヒスチジンの濃度は、約５～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－イソロイシンの濃度は、約５～３００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－メチオニンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－フェニルアラニンの濃度は、約５～４００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－プロリンの濃度は、約１～１０００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－ヒドロキシプロリンの濃度は、約１～４５

ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－セリンの濃度は、約１～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－スレオニンの濃度は、約１０～５００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－トリプトファンの濃度は、約２～１１０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－チロシンの濃度は、約３～１７５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－バリンの濃度は、約５～５００ｍｇ／Ｌであり、チアミンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、還元型グルタチオンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩の濃度は、約１～２００ｍｇ／Ｌであり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約１～５０ｍｇ／Ｌであり、インスリンの濃度は、約１～１００ｍｇ／Ｌであり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約０．０００００１～０．０００１ｍｇ／Ｌであり、アルブミン（例えば、ＡｌｂｕＭＡＸ（登録商標）Ｉ）の濃度は、約５０００～５０，０００ｍｇ／Ｌである。

【０５３２】

いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地中の濃度範囲」という見出しの下の列にリストされた濃度範囲で存在する。他の実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされた最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかでは、無血清サプリメントは、表４の「サプリメント中の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。

【０５３３】

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

【０５３４】

いくつかの実施形態では、Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｔｒａｎｓｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，４（１）２０１５（ｄｏｉ：１０．１０３８／ｃｔｉ．２０１４．３１）に記載の定義された培地が、本発明において有用である。簡潔には、ＲＰＭＩまたはＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）を基礎細胞培地として使用し、０、２％、５％、または１０％のいずれかのＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔを補充した。

【０５３５】

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

【０５３６】

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

【０５３７】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～７日間培養することによって急速なまたは第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養でのＴＩＬを、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ

－ＲＥＸ－５００－ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来のＴＩＬを、第２の容器内でのより大規模な培養で約４～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。

【０５３８】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～７日間培養することによって急速なまたは第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴＩＬの一部が、第２の小規模培養で約４～７日間培養される。

【０５３９】

いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、ＴＩＬの複数の約２～５亜集団に配分される。

【０５４０】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～７日間培養することによって急速なまたは第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴＩＬの一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。

【０５４１】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約５日間培養することによって急速なまたは第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴＩＬの一部が、より大規模な培養で約６日間培養される。

【０５４２】

いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個のＴＩＬ、少なくとも10^9個のＴＩＬ、または少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。例示的な一実施形態では、各第２の容器は、少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。

【０５４３】

いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２～５亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２、３、４、または５亜集団に配分される。

【０５４４】

いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の完了後、複数の亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の完了後、１つ以上のＴＩＬの亜集団を一緒にプールして、治療有効量のＴＩＬを産生する。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、ＴＩＬの各亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。

【０５４５】
いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張は、複数のステップに分割される前に、約３～７日間行われる。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の分裂は、急速または第２の拡張の開始後約３日目、４日目、５日目、６日目、または７日目に起こる。
【０５４６】
いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の分裂は、第１の拡張（すなわち、ＲＥＰ前拡張）の開始後の約７日目、８日目、９日目、１０日目、１１日目、１２日目、１３日目、１４日目、１５日目、または１６日目、１７日目、または１８日目に起こる。例示的な一実施形態では、急速または第２の拡張の分裂は、第１の拡張の開始後約１６日目に起こる。
【０５４７】
いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張は、分裂後約７～１１日間、さらに行われる。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張は、分裂後約５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日間、さらに行われる。
【０５４８】
いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地と同じ成分を含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地とは異なる成分を含む。
【０５４９】
いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む。
【０５５０】
いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な細胞培養培地で置き換えることによって生成される。
【０５５１】
いくつかの実施形態では、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。
【０５５２】

いくつかの実施形態では、急速な膨張の分裂は、閉鎖系において起こる。

【０５５３】

いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張中のＴＩＬ培養物のスケールアップは、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に添加すること（ＴＩＬを供給することとも称される）を含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に頻繁に添加することを含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に一定の間隔で添加することを含む。いくつかの実施形態では、新鮮な細胞培養培地は、一定の流れを介してＴＩＬに供給される。いくつかの実施形態では、ＸｕｒｉＷ２５などの自動細胞拡張システムは、急速な膨張及び供給のために使用される。

【０５５４】

１．フィーダー細胞及び抗原提示細胞

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

【０５５５】

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

【０５５６】

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

【０５５７】

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

【０５５８】

いくつかの実施形態では、７日目及び１４日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、５～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び１０００～６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１０～５０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～５０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２０～４０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～４０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２５～３５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２５００～３５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【０５５９】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、約１：２５、約１：５０、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約

１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００、約１：３２５、約１：３５０、約１：３７５、約１：４００、または約１：５００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：５０～１：３００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：１００～１：２００である。

【０５６０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約２．５×10^9フィーダー細胞：約１００×10^6ＴＩＬの比を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約２．５×10^9フィーダー細胞：約５０×10^6ＴＩＬの比を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約２．５×10^9フィーダー細胞：約２５×10^6ＴＩＬを必要とする。

【０５６１】

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

【０５６２】

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

【０５６３】

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

【０５６４】

２．サイトカイン及び他の添加物

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

【０５６５】

あるいは、ＴＩＬの急速拡張及び／または第２の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第ＵＳ２０１７／０１０７４９０Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせを用いて追加として可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２及びＩＬ－１５、ＩＬ－２及びＩＬ－２１、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１が含まれ、後者は多くの実施形態において特定の用途を見出す。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにＴ細胞の生成に特に有利に働く。

【０５６６】

いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＫＴ－３抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、４－１ＢＢアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＸ－４０アゴニストの、培養培地への添加を含み得る。加えて、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（ＰＰＡＲ）－ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーターＩ－アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１９／０３０７７９６　Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップＤ中の培養培地で使用されてもよい。

【０５６７】

Ｅ．ステップＥ：ＴＩＬを採取する

第２の拡張ステップ後、細胞が採取され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図１に提供されるように、１、２、３、４つ、またはそれ以上の拡張ステップ後に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図１に提供されるように、２つの拡張ステップ後に採取される。

【０５６８】

ＴＩＬは、例えば、遠心分離を含む、任意の適切な滅菌様式で採取され得る。ＴＩＬを採取するための方法は、当該技術分野で周知であり、いずれかのかかる既知の方法が本プロセスで用いられ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、自動化システムを使用して採取される。

【０５６９】

細胞採取機及び／または細胞処理システムは、例えば、Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ　Ｋａｂｉ、Ｔｏｍｔｅｃ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ、及びＩｎｏｔｅｃｈ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃを含む、様々な供給源から市販されている。任意の細胞ベースの採取機が本方法とともに用いられ得る。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理システムは、膜ベースの細胞採取機である。いくつかの実施形態では、細胞採取は、ＬＯＶＯシステム（Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ　Ｋａｂｉによって製造されたもの）などの細胞処理システムによるものである。「ＬＯＶＯ細胞処理システム」という用語は、細胞を含む溶液を、滅菌及び／または閉鎖系環境で回転膜または回転フィルターなどの膜またはフィルターをとおしてポンプ輸送し、連続フローを可能にし、細胞を処理して、ペレット化せずに上清または細胞培養培地を除去する、任意のベンダーによって製造された任意の機器または装置も指す。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理システムは、滅菌閉鎖系内で、細胞分離、洗浄、流体交換、濃縮、及び／または他の細胞処理ステップを行うことができる。

【０５７０】

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

【０５７１】

いくつかの実施形態では、図１によるステップＥは、本明細書に記載のプロセスに従って行われる。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、閉鎖系の無菌性及び閉鎖性を維持するために、滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、実施例に記載の閉鎖系が用いられる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、実施例に記載の方法に従って採取される。いくつかの実施形態では、１日目～１１日目の間のＴＩＬは、実施例における１１日目のＴＩＬ採取のような、本明細書で言及されるステップにおいて記載される方法を使用して採取される。いくつかの実施形態では、１２日目～２４日目の間のＴＩＬは、実施例における２２日目のＴＩＬ採取のような、本明細書で言及されるステップにおいて記載される方法を使用して採取される。いくつかの実施形態では、１２日目～２２日目の間のＴＩＬは、実施例における２２日目のＴＩＬ採取のような、本明細書で言及されるステップにおいて記載される方法を使用して採取される。

【０５７２】

Ｆ．ステップＦ：最終製剤及び輸液容器への移行

図１に例示的な順序で提供され、かつ上及び本明細書で詳細に概説されるステップＡ～Ｅが完了した後、細胞は、注入バッグまたは無菌バイアルなどの患者への投与に使用するために容器に移される。いくつかの実施形態では、治療的に十分な数のＴＩＬが上記の拡張方法を使用して得られると、それらは、患者への投与に使用するために容器に移される。

【０５７３】

いくつかの実施形態では、本開示のＡＰＣを使用して拡張されたＴＩＬは、薬学的組成物として患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌緩衝液中のＴＩＬ懸濁液である。本開示のＰＢＭＣを使用して拡張されたＴＩＬは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、単回の動脈内または静脈内注入として投与され、これは、好ましくは、およそ３０～６０分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内投与が含まれる。

【０５７４】

ＩＶ．Ｇｅｎ３　ＴＩＬ製造プロセス

いかなる特定の理論にも限定されることなく、本発明の方法に記載される、Ｔ細胞の活性化をプライミングする、プライミングによる第１の拡張と、それに続くＴ細胞の活性化を促進する急速な第２の拡張により、「より若い」表現型を保持する拡張されたＴ細胞の調製が可能になると考えられ、したがって、本発明の拡張されたＴ細胞が、他の方法によって拡張されたＴ細胞よりも高いがん細胞に対する細胞傷害性を示すことが予想される。特に、本発明の方法によって教示される、抗ＣＤ３抗体（例えば、ＯＫＴ－３）、ＩＬ－２、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）への曝露によってプライミングされ、その後、追加の抗ＣＤ－３抗体（例えば、ＯＫＴ－３）、ＩＬ－２、及びＡＰＣへのその後の曝露によって促進されるＴ細胞の活性化が、培養下でＴ細胞の成熟を限定または回避し、成熟度の低い表現型を有するＴ細胞集団を産生し、これらのＴ細胞が、培養下での拡張によってあまり疲弊せず、より高いがん細胞に対する細胞傷害性を示すと考えられる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養でのＴ細胞を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来のＴ細胞を、第２の容器内でのより大規模な培養で約４～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来のＴ細胞を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴ細胞の一部が、第２の小規模培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴ細胞を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴ細胞の一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴ細胞を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴ細胞の一部が、より大規模な培養で約５日間培養される。

【０５７５】

いくつかの実施形態では、急速拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個

のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個のＴＩＬ、少なくとも10^9個のＴＩＬ、または少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。例示的な一実施形態では、各第２の容器は、少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。

【０５７６】

いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２～５亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２、３、４、または５亜集団に配分される。

【０５７７】

いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、複数の亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、１つ以上のＴＩＬの亜集団を一緒にプールして、治療有効量のＴＩＬを産生する。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、ＴＩＬの各亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。

【０５７８】

いくつかの実施形態では、急速拡張は、複数のステップに分割される前に、約１～５日間行われる。いくつかの実施形態では、急速拡張の分裂は、急速拡張の開始後約１日目、２日目、３日目、４日目、または５日目に起こる。

【０５７９】

いくつかの実施形態では、急速拡張の分裂は、第１の拡張（すなわち、ＲＥＰ前拡張）の開始後約８日目、９日目、１０日目、１１日目、１２日目、または１３日目に起こる。例示的な一実施形態では、急速拡張の分裂は、プライミングによる第１の拡張の開始後約１０日目に起こる。別の例示的な一実施形態では、急速拡張の分裂は、第１の拡張の開始後約１１日目に起こる。

【０５８０】

いくつかの実施形態では、急速拡張は、分裂後約４～１１日間、さらに行われる。いくつかの実施形態では、急速拡張は、分裂後約３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日間、さらに行われる。

【０５８１】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地と同じ成分を含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地とは異なる成分を含む。

【０５８２】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む。

【０５８３】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な細胞培養培地で置き換えることによって生成される。

【０５８４】
いくつかの実施形態では、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。
【０５８５】
いくつかの実施形態では、急速な膨張の分裂は、閉鎖系において起こる。
【０５８６】
いくつかの実施形態では、急速拡張中のＴＩＬ培養物のスケールアップは、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に添加すること（ＴＩＬを供給することとも称される）を含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に頻繁に添加することを含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に一定の間隔で添加することを含む。いくつかの実施形態では、新鮮な細胞培養培地は、一定の流れを介してＴＩＬに供給される。いくつかの実施形態では、Ｘｕｒｉ　Ｗ２５などの自動細胞拡張システムは、急速な膨張及び供給のために使用される。
【０５８７】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が減少、軽減、衰退、または沈静化し始めた後に行われる。
【０５８８】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、正確にまたは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％減少した後に行われる。
【０５８９】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、正確にまたは約１％～１００％の範囲のパーセンテージ減少した後に行われる。
【０５９０】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、正確にまたは約１％～１０％、１０％～２０％、２０％～３０％、３０％～４０％、４０％～５０％、５０％～６０％、６０％～７０％、７０％～８０％、８０％～９０％、または９０％～１００％の範囲のパーセンテージ減少した後に行われる。
【０５９１】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、少なくとも正確にまたは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、

４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％減少した後に行われる。

【０５９２】

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

【０５９３】

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

【０５９４】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、最大で正確にまたは約７日または約８日の期間中に行われる。

【０５９５】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、最大で正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日の期間中に行われる。

【０５９６】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日の期間中に行われる。

【０５９７】

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

【０５９８】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、最大で正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間中に行われる。

【０５９９】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間中に行われる。

【０６００】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約７日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約１１日の期間中に行われる。

【０６０１】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、最大で正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、最大で正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間中に行われる。

【０６０２】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、正確にまたは約

１日～正確にまたは約８日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約９日の期間中に行われる。

【０６０３】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、８日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、９日の期間中に行われる。

【０６０４】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約７日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約９日の期間中に行われる。

【０６０５】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、７日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、９日の期間中に行われる。

【０６０６】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）である。

【０６０７】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）である。

【０６０８】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、末梢血リンパ球（ＰＢＬ）である。

【０６０９】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、がんに罹患しているドナーから取得される。

【０６１０】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、がんに罹患している患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬである。

【０６１１】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、血液系悪性腫瘍に罹患している患者の骨髄から取得されたＭＩＬである。

【０６１２】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ドナー由来の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）から取得されたＰＢＬである。いくつかの実施形態では、ドナーは、がんに罹患している。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択されるがんである。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ドナーは、腫瘍に罹患している。いくつかの実施形態では、腫瘍は、液体腫瘍である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、ドナーは、血液系悪性腫瘍に罹患している。

【０６１３】

本開示の特定の態様では、免疫エフェクター細胞、例えば、Ｔ細胞は、ＦＩＣＯＬＬ分離などの当業者に知られている任意の数の技法を使用して対象から収集された血液の単位から得ることができる。好ましい一態様では、個体の循環血液由来の細胞は、アフェレーシスによって取得される。アフェレーシス産物は、典型的には、リンパ球、例えば、Ｔ細胞、単球、顆粒球、Ｂ細胞、他の有核白血球、赤血球、血小板を含む。一態様では、アフェレーシスによって収集された細胞が洗浄されて、血漿画分が除去され、任意選択で、その後の処理ステップのために細胞を適切な緩衝液または培地に入れられ得る。いくつかの実施形態では、細胞は、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で洗浄される。代替の実施形態では、洗浄溶液は、カルシウムを欠き、マグネシウムを欠き得るか、またはすべてではな

いが多くの二価カチオンを欠き得る。一態様では、Ｔ細胞は、赤血球を溶解し、かつ単球を枯渇させることによって、例えば、ＰＥＲＣＯＬＬ勾配による遠心分離によって、または対向流遠心溶出法によって末梢血リンパ球から単離される。

【０６１４】

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

【０６１５】

これらの特徴のうちのいくつかを含む、プロセス３として知られる（本明細書ではＧｅｎ３とも称される）例示的なＴＩＬプロセスが、図８（特に、例えば図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示され、本発明のこの実施形態の、Ｇｅｎ２を超える利点のうちのいくつかが、図１、２、８、３０、及び３１（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に記載される。Ｇｅｎ３の実施形態は、図１、８、及び３０（特に、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示される。プロセス２ＡまたはＧｅｎ２またはＧｅｎ２Ａはまた、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開第２０１８／０２８０４３６号にも記載されている。Ｇｅｎ３プロセスはまた、国際特許公開第ＷＯ２０２０／０９６９８８号に記載されている。

【０６１６】

本明細書で考察され、かつ一般に概説されるように、ＴＩＬは、患者試料から採取され、本明細書に記載され、かつＧｅｎ３と称されるＴＩＬ拡張プロセスを使用して患者に移植する前に、それらの数を拡張するように操作される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、以下で考察されるように、任意で遺伝子操作され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、拡張前または拡張後に凍結保存され得る。解凍した時点で、それらが再刺激されて、患者への注入前に代謝を高めることができる。

【０６１７】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（本明細書で急速拡張前（ＲＥＰ前）と称されるプロセス、ならびに図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢとして示されるプロセスを含む）は１～８日に短縮され、急速な第２の拡張（本明細書で急速拡張プロトコール（ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／ま

たは図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤとして示されるプロセスを含む）は１～９日に短縮され、このことは、以下ならびに実施例及び図において詳細に論じられる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（本明細書で急速拡張前（ＲＥＰ前）と称されるプロセス、ならびに図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢとして示されるプロセスを含む）は１～８日に短縮され、急速な第２の拡張（本明細書で急速拡張プロトコール（ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤとして示されるプロセスを含む）は１～８日に短縮され、このことは、以下ならびに実施例及び図において詳細に論じられる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（本明細書で急速拡張前（ＲＥＰ前）と称されるプロセス、ならびに図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢと称されるプロセスを含む）は１～７日に短縮され、急速な第２の拡張（本明細書で急速拡張プロトコール（ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤとして示されるプロセスを含む）は１～９日に短縮され、このことは、以下ならびに実施例及び図において詳細に論じられる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（本明細書で急速拡張前（ＲＥＰ前）と称されるプロセス、ならびに図８（具体的には、例えば、図１Ｂ及び／または図８Ｃ）においてステップＢと称されるプロセスを含む）は１～７日であり、急速な第２の拡張（本明細書で急速拡張プロトコール（ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤとして示されるプロセスを含む）は１～１０日であり、このことは、以下ならびに実施例及び図において詳細に論じられる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢと記載される拡張）は８日に短縮され、急速な第２の拡張（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤに記載される拡張）は７～９日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢと記載される拡張））は８日であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤに記載される拡張）は８～９日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢと記載される拡張））は７日に短縮され、急速な第２の拡張（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤに記載される拡張）は７～８日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢと記載される拡張））は８日に短縮され、急速な第２の拡張（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤに記載される拡張）は８日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢと記載される拡張））は８日であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤに記載される拡張）は９日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢと記載される拡張））は８日であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及

び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤに記載される拡張）は１０日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢと記載される拡張））は７日であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤに記載される拡張）は７～１０日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢと記載される拡張））は７日であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤに記載される拡張）は８～１０日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢと記載される拡張））は７日であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤに記載される拡張）は９～１０日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢと記載される拡張）は７日に短縮され、急速な第２の拡張（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤに記載される拡張）は７～９日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張及び急速な第２の拡張の組み合わせ（例えば、図８（具体的には、例えば、図１Ｂ及び／または図８Ｃ）においてステップＢ及びステップＤと記載される拡張）は１４～１６日であり、このことは、以下ならびに実施例及び図において詳細に論じられる。具体的には、本発明のある特定の実施形態は、ＩＬ－２の存在下での抗ＣＤ３抗体（例えば、ＯＫＴ－３）への曝露または少なくともＩＬ－２及び抗ＣＤ３抗体（例えばＯＫＴ－３）の存在下での抗原への曝露によってＴＩＬが活性化されるプライミングによる第１の拡張ステップを含むものと考えられる。ある特定の実施形態では、上記のプライミングによる第１の拡張ステップにおいて活性化されるＴＩＬは、第１のＴＩＬ集団であり、これは、すなわち、一次細胞集団である。

【０６１８】

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

【０６１９】

Ａ．ステップＡ：患者の腫瘍試料を取得する

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

【０６２０】

患者の腫瘍試料は、一般に、外科的切除、針生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を得るための他の手段により、当該技術分野で知られている方法を使用して得ることができる。一般に、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍試料は、血液系悪性腫瘍から取得された腫瘍などの液体腫瘍であり得る。固形腫瘍は、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、結腸直腸癌、肺癌

、脳癌、腎癌、胃癌、及び皮膚癌を含むが、これらに限定されない（扁平上皮癌、基底細胞癌、及び黒色腫を含むが、これらに限定されない）、任意の種類のがんであり得る。いくつかの実施形態では、がんは、子宮頸癌、頭頸部癌（例えば、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭ）、胃腸癌、卵巣癌、肉腫、膵臓癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、及び非小細胞肺癌から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。いくつかの実施形態では、悪性黒色腫腫瘍が特に高レベルのＴＩＬを有することが報告されているため、有用なＴＩＬは、悪性黒色腫腫瘍から取得される。

【０６２１】

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

【０６２２】

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

【０６２３】

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

【０６２４】

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

【０６２５】

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

【０６２６】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ヒアルロニダーゼを含む。いくつかの実施形態では、ヒアルロニダーゼの作業ストックは、１０ｍｇ／ｍＬの１０倍作業ストックである。
【０６２７】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、１０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼ、１０００ＩＵ／ｍＬのＤＮＡｓｅ、及び１ｍｇ／ｍＬのヒアルロニダーゼを含む。
【０６２８】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、１０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼ、５００ＩＵ／ｍＬのＤＮＡｓｅ、及び１ｍｇ／ｍＬのヒアルロニダーゼを含む。
【０６２９】
一般に、腫瘍から取得された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに取得された」または「新たに単離された」細胞集団と呼ばれる。ある特定の実施形態では、新たに取得されたＴＩＬ細胞集団は、抗原提示細胞、ＩＬ－１２、及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地に曝露される。
【０６３０】
いくつかの実施形態では、断片化には、例えば、解剖及び消化を含む物理的断片化が含まれる。いくつかの実施形態では、断片化は、物理的断片化である。いくつかの実施形態では、断片化は、解剖である。いくつかの実施形態では、断片化は、消化によるものである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、最初に、患者から取得された酵素腫瘍消化物及び腫瘍断片から培養され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、最初に、患者から取得された酵素腫瘍消化物及び腫瘍断片から培養され得る。
【０６３１】
腫瘍が固形腫瘍であるいくつかの実施形態では、腫瘍試料が、例えば、ステップＡ（図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供される）で取得された後、腫瘍は物理的断片化を受ける。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存前に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存後に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、腫瘍を得た後に、いずれの凍結保存もない場合に起こる。いくつかの実施形態では、断片化ステップは、インビトロまたはエクスビボプロセスである。いくつかの実施形態では、腫瘍が断片化され、１０、２０、３０、４０個、またはそれ以上の断片または小片が、プライミングによる第１の拡張のために各容器に入れられる。いくつかの実施形態では、腫瘍が断片化され、３０個または４０個の断片または小片が、プライミングによる第１の拡張のために各容器に入れられる。いくつかの実施形態では、腫瘍が断片化され、４０個の断片または小片が、プライミングによる第１の拡張のために各容器に入れられる。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約４～約５０個の断片を含み、各断片は、約２７mm^3の体積を有する。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１３００mm^3～約１５００mm^3の総体積を伴う約３０～約６０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１３５０mm^3の総体積を伴う約５０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１グラム～約１．５グラムの総質量を伴う約５０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約４個の断片を含む。
【０６３２】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍断片から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、鋭的解剖によって取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3～１０mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3～８mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約２mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約３mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約４mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約５mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約６mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約７mm^3である。いくつか

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

【０６３３】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性、壊死性、及び／または脂肪性組織の量を最小限に抑えるために断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性組織の量を最小限に抑えるために断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の壊死性組織の量を最小限に抑えるために断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の脂肪性組織の量を最小限に抑えるために断片化される。ある特定の実施形態では、腫瘍の断片化ステップは、インビトロまたはエクスビボ方法である。

【０６３４】

いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、腫瘍の内部構造を維持するために行われる。いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、メスでのこ引き動作を行うことなく行われる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、ＲＰＭＩ１６４０（２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）であるが、これに限定されない酵素培地中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって生成された。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍は、およそ１分間機械的に解離され得る。その後、溶液が５％CO_2中３７℃で３０分間インキュベートされ、その後、およそ１分間再び機械的に破壊され得る。５％　CO_2中３７℃で３０分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ１分間、３回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きい組織片が存在する場合、３回目の機械的破壊後、５％CO_2中３７℃でさらに３０分間インキュベートするかにかかわらず、１回または２回の追加の機械的解離が試料に適用された。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、Ｆｉｃｏｌｌを使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。

【０６３５】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張ステップ前の細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに取得された」または「新たに単離された」細胞集団と呼ばれる。

【０６３６】

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

【０６３７】

１．コア／小生検由来のＴＩＬ

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、最初に、コア生検または同様の手順によって取得された患者腫瘍試料（「一次ＴＩＬ」）から得られ、その後、本明細書に記載されるように、さらなる操作のためにより大きい集団に拡張され、任意で凍結保存され、任意で表現型及び代謝パラメータについて評価される。

【０６３８】

いくつかの実施形態では、患者の腫瘍試料は、一般に、小生検、コア生検、針生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を得るための他の手段により、当該

技術分野で知られている方法を使用して取得することができる。一般に、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍試料は、血液系悪性腫瘍から取得された腫瘍などの液体腫瘍であり得る。いくつかの実施形態では、試料は、複数の小さい腫瘍試料または生検に由来し得る。いくつかの実施形態では、試料は、同じ患者由来の単一の腫瘍からの複数の腫瘍試料を含むことができる。いくつかの実施形態では、試料は、同じ患者由来の１、２、３、または４つの腫瘍からの複数の腫瘍試料を含むことができる。いくつかの実施形態では、試料は、同じ患者由来の複数の腫瘍からの複数の腫瘍試料を含むことができる。固形腫瘍は、肺癌及び／または非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）であり得る。

【０６３９】

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

【０６４０】

いくつかの実施形態では、腫瘍が転移性であり、かつ原発性病変が過去に効率的に治療／除去された場合、転移性病変のうちの１つの除去が必要とされ得る。いくつかの実施形態では、最も侵襲性の低いアプローチは、皮膚病変、または利用可能な場合、首または腋窩領域のリンパ節を除去することである。いくつかの実施形態では、皮膚病変が除去されるか、またはその小生検が除去される。いくつかの実施形態では、リンパ節またはその小生検が除去される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、黒色腫である。いくつかの実施形態では、黒色腫の小生検は、ほくろまたはその一部を含む。

【０６４１】

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

【０６４２】

いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検であり、ほくろまたは増殖全体が除去される。いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検であり、ほくろまたは増殖全体が、正常に見える皮膚の小縁とともに除去される。

【０６４３】

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

【０６４４】

いくつかの実施形態では、小生検は、肺生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、気管支鏡検査によって取得される。一般に、気管支鏡検査では、患者は麻酔をかけられ、小さい用具が鼻または口を通り、喉を下って気管支通路に入り、そこで小さい用具を使用していくらかの組織を採取する。気管支鏡検査によって腫瘍または成長に到達できないいくつかの実施形態では、経胸腔針生検が用いられ得る。一般に、経胸腔針生検の場合も、患者は麻酔をかけられ、針が皮膚をとおして疑わしい場所に直接挿入されて、小さい組織試料を採取する。いくつかの実施形態では、経胸壁針生検は、介入放射線医学（例えば、針をガイドするためのＸ線またはＣＴ走査の使用）を必要とし得る。いくつかの実施形態では、小生検は、針生検によって取得される。いくつかの実施形態では、小生検は、超音波内視鏡検査によって得られる（例えば、照明を備えた内視鏡であり、口をとおして

食道に配置される）。いくつかの実施形態では、小生検は、外科的に取得される。
【０６４５】
いくつかの実施形態では、小生検は、頭頸部生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検であり、小さい組織片が異常に見える領域から切り取られる。いくつかの実施形態では、異常な領域に容易にアクセスできる場合、試料は、入院することなく採取され得る。いくつかの実施形態では、腫瘍が口または喉のより深くにある場合、生検は、全身麻酔を用いて手術室で行われる必要があり得る。いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、全領域が除去される切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、細針吸引（ＦＮＡ）である。いくつかの実施形態では、小生検は、細針吸引（ＦＮＡ）であり、シリンジに取り付けられた非常に細い針を使用して、腫瘍または塊から細胞を抽出（吸引）する。いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検であり、パンチ鉗子を使用して、疑わしい領域の一片を採取する。
【０６４６】
いくつかの実施形態では、小生検は、子宮頸部生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、膣鏡検査によって取得される。一般に、膣鏡検査は、拡大双眼鏡に取り付けられた照明付き拡大器具（膣鏡）の使用を採用し、その後、これを使用して、子宮頸部の表面の小さい切片を生検する。いくつかの実施形態では、小生検は、円錐切除／錐体生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、円錐切除／錐体生検であり、子宮頸部からより大きい組織片を採取するために外来手術が必要になる場合がある。いくつかの実施形態では、錐体生検は、診断の確認を助けることに加えて、錐体生検が初期治療となり得る。
【０６４７】
「固形腫瘍」という用語は、通常、嚢胞または液体領域を含まない異常な組織塊を指す。固形腫瘍は、良性または悪性であり得る。「固形腫瘍癌」という用語は、悪性、腫瘍性、またはがん性の固形腫瘍を指す。固形腫瘍癌には、肺の癌が含まれる。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。いくつかの実施形態では、がんは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）である。固形腫瘍の組織構造には、実質（がん細胞）を含む相互依存的組織区画、及びがん細胞が分散しており、かつ支持微小環境を提供し得る支持間質細胞が含まれる。
【０６４８】
いくつかの実施形態では、腫瘍由来の試料は、細針吸引物（ＦＮＡ）、コア生検、小生検（例えば、パンチ生検を含む）として取得される。いくつかの実施形態では、試料は、最初にＧ－ＲＥＸ－１０に入れられる。いくつかの実施形態では、１つまたは２つのコア生検及び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初にＧ－ＲＥＸ－１０に入れられる。いくつかの実施形態では、３、４、５、６、８、９、または１０個以上のコア生検及び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初にＧ－ＲＥＸ－１００に入れられる。いくつかの実施形態では、３、４、５、６、８、９、または１０個以上のコア生検及び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初にＧ－ＲＥＸ－５００に入れられる。
【０６４９】
ＦＮＡは、例えば、黒色腫を含む皮膚腫瘍から取得することができる。いくつかの実施形態では、ＦＮＡは、転移性黒色腫を有する患者からの皮膚腫瘍などの皮膚腫瘍から取得される。いくつかの事例では、黒色腫を有する患者は、外科的治療を以前に受けたことがある。
【０６５０】
ＦＮＡは、例えば、ＮＳＣＬＣを含む肺腫瘍から得ることができる。いくつかの実施形態では、ＦＮＡは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を有する患者由来の肺腫瘍などの肺腫瘍から取得される。いくつかの事例では、ＮＳＣＬＣを有する患者は、外科的治療を以前に受けたことがある。

【０６５１】
本明細書に記載のＴＩＬは、ＦＮＡ試料から得られ得る。いくつかの事例では、ＦＮＡ試料は、１８ゲージ針～２５ゲージ針の範囲の細いゲージ針を使用して、患者から得られるか、または単離される。細いゲージ針は、１８ゲージ、１９ゲージ、２０ゲージ、２１ゲージ、２２ゲージ、２３ゲージ、２４ゲージ、または２５ゲージであり得る。いくつかの実施形態では、患者由来のＦＮＡ試料は、少なくとも４００，０００個のＴＩＬ、例えば、４００，０００個のＴＩＬ、４５０，０００個のＴＩＬ、５００，０００個のＴＩＬ、５５０，０００個のＴＩＬ、６００，０００個のＴＩＬ、６５０，０００個のＴＩＬ、７００，０００個のＴＩＬ、７５０，０００個のＴＩＬ、８００，０００個のＴＩＬ、８５０，０００個のＴＩＬ、９００，０００個のＴＩＬ、９５０，０００個のＴＩＬ、またはそれ以上を含み得る。

【０６５２】
いくつかの事例では、本明細書に記載のＴＩＬは、コア生検試料から取得される。いくつかの事例では、コア生検試料は、１１ゲージ針～１６ゲージ針の範囲の外科用または医療用針を使用して、患者から得られるか、または単離される。針は、１１ゲージ、１２ゲージ、１３ゲージ、１４ゲージ、１５ゲージ、または１６ゲージであり得る。いくつかの実施形態では、患者由来のコア生検試料は、少なくとも４００，０００個のＴＩＬ、例えば、４００，０００個のＴＩＬ、４５０，０００個のＴＩＬ、５００，０００個のＴＩＬ、５５０，０００個のＴＩＬ、６００，０００個のＴＩＬ、６５０，０００個のＴＩＬ、７００，０００個のＴＩＬ、７５０，０００個のＴＩＬ、８００，０００個のＴＩＬ、８５０，０００個のＴＩＬ、９００，０００個のＴＩＬ、９５０，０００個のＴＩＬ、またはそれ以上を含み得る。

【０６５３】
一般に、採取された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに採取された」細胞集団と呼ばれる。

【０６５４】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から得られない。いくつかの実施形態では、固形腫瘍コアは、断片化されない。

【０６５５】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、ＲＰＭＩ１６４０（２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）であるが、これに限定されない酵素培地中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって生成された。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍は、およそ１分間機械的に解離され得る。その後、溶液が５％CO_2中３７℃で３０分間インキュベートされ、その後、およそ１分間再び機械的に破壊され得る。５％　CO_2中３７℃で３０分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ１分間、３回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きい組織片が存在する場合、３回目の機械的破壊後、５％CO_2中３７℃でさらに３０分間インキュベートするかにかかわらず、１回または２回の追加の機械的解離が試料に適用された。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、Ｆｉｃｏｌｌを使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。

【０６５６】
いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を取得することは、多病変サンプリング法を含む。

【０６５７】
腫瘍解離酵素混合物には、１つ以上の解離（消化）酵素、例えば、限定されないが、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはコラゲナーゼの種類を含む）、Ａｃｃｕｔａｓｅ（商標）、Ａｃｃｕｍａｘ（商標）、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）

、キモトリプシン、キモパパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパイン、ＸＩＶ型プロテアーゼ（プロナーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）、トリプシン阻害剤、任意の他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びそれらの任意の組み合わせが含まれ得る。

【０６５８】

いくつかの実施形態では、解離酵素は、凍結乾燥酵素から再構成される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥酵素は、ハンクス平衡塩溶液（ＨＢＳＳ）などの滅菌緩衝液の量で再構成される。

【０６５９】

いくつかの事例では、コラゲナーゼ（アニマルフリー１型コラゲナーゼなど）を、１０ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液で再構成する。凍結乾燥ストック酵素は、２８９２ＰＺ　Ｕ／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、５ｍＬ～１５ｍＬの緩衝液中で再構成される。いくつかの実施形態では、再構成後のコラゲナーゼストックは、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬの範囲、例えば、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約３５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約３００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２１０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２２０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２３０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２４０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２６０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２７０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２８０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２８９．２ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約３００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約３５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、または約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬである。

【０６６０】

いくつかの実施形態では、中性プロテアーゼは、１ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥ストック酵素は、１７５ＤＭＣＵ／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、再構成後の中性プロテアーゼストックは、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬの範囲、例えば、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約３５０ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約３００ＤＭＣ／ｍＬ、約１５０ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ、約１１０ＤＭＣ／ｍＬ、約１２０ＤＭＣ／ｍＬ、約１３０ＤＭＣ／ｍＬ、約１４０ＤＭＣ／ｍＬ、約１５０ＤＭＣ／ｍＬ、約１６０ＤＭＣ／ｍＬ、約１７０ＤＭＣ／ｍＬ、約１７５ＤＭＣ／ｍＬ、約１８０ＤＭＣ／ｍＬ、約１９０ＤＭＣ／ｍＬ、約２００ＤＭＣ／ｍＬ、約２５０ＤＭＣ／ｍＬ、約３００ＤＭＣ／ｍＬ、約３５０ＤＭＣ／ｍＬ、または約４００ＤＭＣ／ｍＬである。

【０６６１】

いくつかの実施形態では、ＤＮＡｓｅ　Ｉは、１ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥したストック酵素は、４ＫＵ／バイアルの濃度であった。いくつかの実施形態では、再構成後のＤＮａｓｅ　Ｉストックは、約１ＫＵ／ｍＬ～１０ＫＵ／ｍＬ、例えば、約１ＫＵ／ｍＬ、約２ＫＵ／ｍＬ、約３ＫＵ／ｍＬ、約４ＫＵ／ｍＬ、約５ＫＵ／ｍＬ、約６ＫＵ／ｍＬ、約７ＫＵ／ｍＬ、約８ＫＵ／ｍＬ、約９ＫＵ／ｍＬ、または約１０ＫＵ／ｍＬの範囲である。

【０６６２】

いくつかの実施形態では、酵素のストックは変化する可能性があるため、凍結乾燥ストックの濃度を確認し、それに応じて消化カクテルに追加される酵素の最終量を修正する。

【０６６３】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、約４．７ｍＬの滅菌ＨＢＳＳ中に約１０．２ｕｌの中性プロテアーゼ（０．３６ＤＭＣ　Ｕ／ｍＬ）、２１．３ｕｌのコラゲナーゼ（１．２ＰＺ／ｍＬ）及び２５０ｕｌのＤＮＡｓｅ　Ｉ（２００Ｕ／ｍＬ）を含む。

【０６６４】

２．胸水Ｔ細胞及びＴＩＬ

いくつかの実施形態では、試料は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのＴ細胞またはＴＩＬの供給源は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、試料は、胸水由来試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのＴＩＬの供給源は、胸水由来試料である。例えば、米国特許公開第２０１４／０２９５４２６号に記載されている方法を参照されたく、これはすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０６６５】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬと思われる、及び／またはＴＩＬを含む任意の胸腔内液または胸水を利用することができる。かかる試料は、ＮＳＣＬＣもしくはＳＣＬＣなどの原発性または転移性肺癌に由来し得る。いくつかの実施形態では、試料は、別の臓器、例えば、乳房、卵巣、結腸、または前立腺に由来する二次転移性がん細胞であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜浸出液である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜漏出液である。他の生体試料は、例えば、腹部からの腹水または膵嚢胞液を含む、ＴＩＬを含有する他の漿液を含み得る。腹水及び胸腔内液は、非常に類似した化学系を伴い、腹部及び肺の両方が、悪性腫瘍における同じ物質の胸膜空間及び腹部空間に中皮線及び流体形態を有し、いくつかの実施形態では、かかる流体は、ＴＩＬを含有する。本開示が胸水を例示するいくつかの実施形態では、同じ方法が、胸腔内液またはＴＩＬを含有する他の嚢胞液を使用して同様の結果で実行されてもよい。

【０６６６】

いくつかの実施形態では、胸腔内液は、患者から直接除去された未処理の形態である。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、接触ステップの前に、ＥＤＴＡまたはヘパリンチューブなどの標準的な採血管に入れられる。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、接触ステップの前に、標準的なＣｅｌｌＳａｖｅ（登録商標）チューブ（Ｖｅｒｉｄｅｘ）に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、生存ＴＩＬの数の減少を避けるために、患者から採取した直後にＣｅｌｌＳａｖｅチューブに入れられる。生存ＴＩＬの数は、４℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置されると、２４時間以内に大幅に減少する可能性がある。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの除去後１時間、５時間、１０時間、１５時間、または最大２４時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、４℃で、患者からの除去後１時間、５時間、１０時間、１５時間、または最大２４時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

【０６６７】

いくつかの実施形態では、選択された対象からの胸腔内液試料は、希釈され得る。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：１０である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：９である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：８である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：５である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：２である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：１である。いくつかの実施形態では、希釈剤には、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、別の緩衝液、または生理学的に許容される希釈剤が含まれる。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの収集及び希釈の直後にＣｅｌｌＳａｖｅチューブ内に入れられ、生存ＴＩＬの減少を回避し、これは、４℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置された場合、２４～４８時間以内に有意に生じ得る。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、患者からの除去及び希釈後１時間、５時間、１０時間、１５時間、２４時間、３６時間、最大４８時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、４℃で、患者からの除去及び希釈後１時間、５時間、１０時間、１５時間、２４時間、３６時間、最大４８時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

【０６６８】

さらに他の実施形態では、胸腔内液試料は、さらなる処理ステップの前に、従来の手段によって濃縮される。いくつかの実施形態では、胸腔内液のこの前処理は、方法を実施す

る実験室への輸送のために、またはその後の分析のために（例えば、採取後２４～４８時間より後に）胸水を凍結保存しなければならない状況において好ましい。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、それが対象から採取された後に胸腔内液試料を遠心分離し、遠心分離物またはペレットを緩衝液中に再懸濁することによって調製される。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、輸送または後の分析及び／または処理のために凍結保存される前に、複数の遠心分離及び再懸濁に供される。

【０６６９】

いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、濾過法を使用することによって、さらなる処理ステップの前に濃縮される。いくつかの実施形態では、接触ステップで使用される胸腔内液試料は、胸腔内液が膜を通過することを可能にするが腫瘍細胞を保持する、既知で本質的に均一な孔径を含むフィルターをとおして流体を濾過することによって調製される。いくつかの実施形態では、膜の細孔の直径は、少なくとも４μＭであり得る。他の実施形態では、細孔直径は、５μＭ以上であり得、他の実施形態では、６、７、８、９、または１０μＭのうちのいずれかであり得る。濾過後、膜によって保持されたＴＩＬを含む細胞を、膜から適切な生理学的に許容される緩衝液にすすいでもよい。次いで、このように濃縮されたＴＩＬを含む細胞は、方法の接触ステップで使用することができる。

【０６７０】

いくつかの実施形態では、胸腔内液試料（例えば、未処理の胸腔内液を含む）、希釈胸腔内液、または再懸濁細胞ペレットは、試料中に存在する無核赤血球を特異的に溶解する溶解試薬と接触させる。いくつかの実施形態では、このステップは、胸腔内液がかなりの数のＲＢＣを含む状況で、さらなる処理ステップの前に行われる。好適な溶解試薬には、単一の溶解試薬もしくは溶解試薬及びクエンチ試薬、または溶解剤、クエンチ試薬及び固定試薬が含まれる。好適な溶解システムは市販されており、ＢＤ　Ｐｈａｒｍ　Ｌｙｓｅ（商標）システム（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ）が含まれる。他の溶解システムには、Ｖｅｒｓａｌｙｓｅ（商標）システム、ＦＡＣＳｌｙｓｅ（商標）システム（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ）、Ｉｍｍｕｎｏｐｒｅｐ（商標）システム、またはＥｒｙｔｈｒｏｌｙｓｅ　ＩＩシステム（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）、または塩化アンモニウムシステムが含まれる。いくつかの実施形態では、溶解試薬は、赤血球の効率的な溶解、ならびに胸水におけるＴＩＬ及びＴＩＬの表現型特性の保存のような主要な要件によって異なり得る。溶解のための単一の試薬を利用することに加えて、本明細書に記載の方法に有用な溶解システムは、第２の試薬、例えば、方法の残りのステップ中に溶解試薬の効果をクエンチまたは遅延させるもの、例えばＳｔａｂｉｌｙｓｅ（商標）試薬（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）を含むことができる。溶解試薬の選択または方法の好ましい実施に応じて、従来の固定試薬を使用することもできる。

【０６７１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、未処理、希釈または多重遠心分離または処理された胸腔内液試料は、本明細書で提供されるようにさらに処理及び／または拡張される前に、約－１４０℃の温度で凍結保存される。

【０６７２】

３．ＣＤ８＋ＴＩＬの検出方法

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＣＤ８結合ドメインを含むＣＤ８検出剤は、インビボでの標的ＣＤ８及び／またはＣＤ８＋細胞の存在または非存在の検出に使用できる。方法は、ＣＤ８結合検出剤を患者に投与することを含み得る。方法は、ＣＤ８への薬剤の結合の有無を検出することを含み得る。

【０６７３】

いくつかの実施形態では、患者または対象の体でＣＤ８＋細胞を含む１つ以上の腫瘍位置を特定することで、腫瘍切除または生検に適した１つ以上の特定されたＣＤ８＋腫瘍位置が得られる。いくつかの実施形態では、生検は、針生検、コア生検、小生検、パンチ生検、または細針吸引（ＦＮＡ）である。

【０６７４】

いくつかの実施形態では、患者の体内の標的ＣＤ８＋ＴＩＬの数及び／または局在化が決定される。いくつかの実施形態では、患者の体内のＣＤ８＋細胞の数及び／または局在化を造影及び／または決定して、腫瘍の切除のための腫瘍病変部位を特定及び選択するか、またはＣＤ８＋シグナルが濃縮されている腫瘍病変中の領域（複数可）への腫瘍の生検の指針を得るステップは、患者の腫瘍組織から拡張される治療的ＴＩＬ集団での治療の効力を改善し得、患者におけるＴＩＬ治療の有効性を増強し得る。いくつかの実施形態では、患者の体内のＣＤ８＋細胞の数及び／または局在化を造影及び／または決定するステップは、患者から腫瘍試料を取得する前に行われる。いくつかの実施形態では、患者の体内のＣＤ８＋細胞の数、密度、及び／または局在化を造影及び／または決定するステップは、生検の前に行われる。

【０６７５】

いくつかの実施形態では、患者腫瘍試料は、ＣＤ８＋シグナルが濃縮されているまたは集中している位置から取得される。いくつかの実施形態では、患者腫瘍試料は、細針吸引（ＦＮＡ）、コア生検、小生検（例えば、パンチ生検を含む）として取得される。

【０６７６】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８＋細胞の濃縮は、バックグラウンドシグナルと比較して少なくとも２倍～１００倍またはそれ超である本明細書で提供される検出可能なマーカー由来の造影シグナルによって示される。いくつかの実施形態では、濃縮ＣＤ８＋細胞は、バックグラウンドシグナルと比較して少なくとも２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、１００倍、またはそれ超の造影シグナルを与える。

【０６７７】

いくつかの実施形態では、造影シグナルは、診断走査を介して収集される。いくつかの実施形態では、診断走査は、非侵襲的である。いくつかの実施形態では、非侵襲的診断走査は、陽電子放出断層撮影（ＰＥＴ）、単一光子放出コンピューター断層撮影（ＳＰＥＣＴ）、コンピューター断層撮影（ＣＴ）、磁気共鳴画像法（ＮＭＲ）、または蛍光発光の検出から選択される。いくつかの実施形態では、ＰＥＴには、限定されないが、マイクロＰＥＴ造影が含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤の結合の有無は、２つ以上の造影形態を介して検出される。いくつかの実施形態では、検出は、近赤外線（ＮＩＲ）及び／またはチェレンコフを介するものであり得る。

【０６７８】

いくつかの実施形態では、患者の体内のＣＤ８＋細胞の数、密度、及び／または局在化を造影及び／または決定するステップが行われて、腫瘍試料採取の指針が得られる。いくつかの実施形態では、患者の体内のＣＤ８＋細胞の数、密度、及び／または局在化を造影及び／または決定するステップが行われて、本明細書で提供されるＴＩＬ治療及び／または拡張のための出発材料の収集の指針が得られる。いくつかの実施形態では、患者の体内のＣＤ８＋細胞の数及び／または局在化を造影及び／または決定するステップが行われて、生検位置の指針が得られる。いくつかの実施形態では、腫瘍試料は、細針吸引（ＦＮＡ）、コア生検、小生検（例えば、パンチ生検を含む）として取得される。

【０６７９】

いくつかの実施形態では、患者内のＣＤ８＋細胞の数、密度、及び／または局在化を造影及び／または決定するステップが行われて、異なる腫瘍位置の間のＣＤ８浸潤及び腫瘍炎症の不均一性が特定される。いくつかの実施形態では、患者内のＣＤ８＋細胞の数、密度、及び／または局在化を造影及び／または決定するステップが行われて、個々の腫瘍位置内のＣＤ８浸潤及び腫瘍炎症の不均一性が特定される。いくつかの実施形態では、患者内のＣＤ８＋細胞の数、密度、及び／または局在化を造影及び／または決定するステップが行われて、どの病変及び病変内のどの場所を生検するかの指針が得られる。

【０６８０】

いくつかの実施形態では、患者腫瘍試料は、濃縮ＣＤ８＋細胞を含む位置から取得される。いくつかの実施形態では、得られる患者腫瘍試料は、ＣＤ８＋濃縮ＴＩＬ集団を含む

。いくつかの実施形態では、腫瘍試料中のＣＤ８＋濃縮ＴＩＬ集団は、本開示に提供される方法を使用して拡張される。

【０６８１】

いくつかの実施形態では、患者内のＣＤ８＋細胞の数、密度、及び／または局在化を造影及び／または決定するステップがＴＩＬ治療の間及び／または後に行われて、注入ＴＩＬの薬力学的監視または特徴付けが可能になる。いくつかの実施形態では、患者内のＣＤ８＋細胞の数、密度、及び／または局在化を造影及び／または決定するステップが患者への治療的ＴＩＬ集団の投与後に行われて、ＴＩＬ治療の臨床的有効性が評価され、及び／または臨床的な意思決定の指針が得られる。治療の前、間、及び後にＣＤ８＋細胞の存在について患者の全身を造影する能力は、個別化された患者管理に有用な情報を与えるものである。いくつかの実施形態では、利用可能なＴＩＬ治療をマッチングするｓｃＦｖ、ミニボディ、及びｃｙｓ－ダイアボディ診断断片は、ＴＩＬ治療に対する患者の応答性の臨床的評価を可能にするものである。

【０６８２】

いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖ、ミニボディ、及び／またはｃｙｓ－ダイアボディ抗体断片は、画像診断に優れた薬物動態及び／または薬力学的特性を有する。現在の技術で利用されるインタクトな抗体での造影は、全長抗体の血清クリアランスが遅いことから、コントラストの高い画像の生成に非常に長い時間を要するものである（注射後およそ７～８日）。ミニボディ及びｃｙｓ－ダイアボディは、同日または翌日の造影の機会を提供するものである。侵攻性に進行する疾患を有する患者にとっては１日１日が命にかかわり、早期時点で適切な治療手法を特定する能力は、患者の生存を改善する潜在力を有するものである。全長抗体と比較してミニボディまたはｃｙｓ－ダイアボディ断片での造影の場合、移動に伴う滞在期間または１週間後の再訪問の必要性がなくなることから、同日または翌日の造影からは、治療／診断を受けるために長距離を移動する患者の多くが直面する問題に対する移動面での解決策も得られる。

【０６８３】

さらに、いくつかの実施形態では、ｃｙｓ－ダイアボディ断片成分単量体は、ジスルフィド結合を形成するＣ末端システイン残基を含む。これらの共有結合ｃｙｓ－ダイアボディシステイン残基は、穏和な化学的還元を介して開裂して、部位特異的なコンジュゲートのための活性チオール基を与え得るものである。現在、抗体のコンジュゲートは、機能的に重要な抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）中に一般に位置するチロシン残基またはリジン残基の非特異的標的化に依存するものである一方で、システイン残基がＣＤＲ中に位置することは稀である。適切に折り畳まれたｃｙｓ－ダイアボディ上のＣ末端システイン残基の位置はＣＤＲとは対極にあり、コンジュゲート物質によってＣＤＲ－抗原相互作用が立体的に遮断されることを阻止する。

【０６８４】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤が対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。いくつかの実施形態では、対象は、がん患者である。いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤が対象に注入される。いくつかの実施形態では、注入は、静脈内に行われる。いくつかの実施形態では、注入は、腹腔内に行われる。いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤は、（介入的な適用または手術中の適用の場合に行われるように）局部的または局所的に対象に適用される。いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤を含むカプセルが、対象に対して、例えば、経口的または腹腔内に適用される。いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤は、対象による免疫原性応答のリスクを低減するように選択される。例えば、ヒト対象については、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤は、本明細書に記載のようにヒト化され得る。いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤のインビボでの適用後、試料または試料の一部が宿主から採取される。いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤のインビボでの適用後、試料または試料の一部が宿主から採取される。いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤は、インビ

ボで適用され、本明細書に記載のように一定時間インビボでインキュベートされ、インビトロ分析（例えば、本明細書に記載のように標的分子へのＣＤ８結合ドメイン含有薬剤の結合の有無をインビトロで検出すること）用に試料が採取される。

【０６８５】

いくつかの実施形態では、陽電子放出断層撮影（ＰＥＴ）、単一光子放出コンピューター断層撮影（ＳＰＥＣＴ）、コンピューター断層撮影（ＣＴ）、磁気共鳴画像法（ＮＭＲ）、または蛍光発光の検出、のうちの少なくとも１つを介してＣＤ８結合ドメインを含む薬剤の結合の有無が検出される。ＰＥＴには、限定されないが、ｍｉｃｒｏＰＥＴ造影が含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤の結合の有無は、２つ以上の造影形態を介して検出される。いくつかの実施形態では、検出は、近赤外線（ＮＩＲ）及び／またはチェレンコフを介するものであり得る。

【０６８６】

いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖ、ミニボディ、及び／またはｃｙｓ－ダイアボディ抗体断片は、画像診断に優れた薬物動態及び／または薬力学的特性を有する。現在の技術で利用されるインタクトな抗体での造影は、全長抗体の血清クリアランスが遅いことから、コントラストの高い画像の生成に非常に長い時間を要するものである（注射後およそ７～８日）。ミニボディ及びｃｙｓ－ダイアボディは、同日または翌日の造影の機会を提供するものである。侵攻性に進行する疾患を有する患者にとっては１日１日が命にかかわり、早期時点で適切な治療手法を特定する能力は、患者の生存を改善する潜在力を有するものである。全長抗体と比較してミニボディまたはｃｙｓ－ダイアボディ断片での造影の場合、移動に伴う滞在期間または１週間後の再訪問の必要性がなくなることから、同日または翌日の造影からは、治療／診断を受けるために長距離を移動する患者の多くが直面する問題に対する移動面での解決策も得られる。

【０６８７】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含むＣＤ８検出／造影剤が約１回以上の用量で患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬剤は、０．１～２０ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、薬剤は、０．１、０．２、０．５、１．０、１．５、５、１０ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、患者は、注射からおよそ１～２、６～８、２４、４８、及び９６～１４４時間の時点でＰＥＴ／ＣＴ走査を受ける。いくつかの実施形態では、標準取り込み値（ＳＵＶ）は、約０．１～約１００の造影シグナル範囲から測定される。いくつかの実施形態では、ＳＵＶは、約０．１～約１０の造影シグナル範囲から測定される。いくつかの実施形態では、ＳＵＶは、約１０～約２０の造影シグナル範囲から測定される。いくつかの実施形態では、ＳＵＶは、約３０～約４０の造影シグナル範囲から測定される。いくつかの実施形態では、ＳＵＶは、約４０～約５０の造影シグナル範囲から測定される。いくつかの実施形態では、ＳＵＶは、約６０～約７０の造影シグナル範囲から測定される。いくつかの実施形態では、ＳＵＶは、約７０～約８０の造影シグナル範囲から測定される。いくつかの実施形態では、ＳＵＶは、約８０～約９０の造影シグナル範囲から測定される。いくつかの実施形態では、ＳＵＶは、約９０～約１００またはそれ超の造影シグナル範囲から測定される。

【０６８８】

いくつかの実施形態では、正常な臓器、リンパ節、及び病変部での薬剤の生体内分布が評価された。いくつかの実施形態では、およそ５分、３０分、及び６０分の時点、ならびに後の造影時点に血清試料が取得された。いくつかの実施形態では、患者は、注入の間及び最後の造影時点に至るまで安全性の監視が行われる。

【０６８９】

いくつかの実施形態では、本開示は、ＣＤ８検出剤、ならびにＣＤ８＋ＴＩＬの検出及び／または濃縮のためのその使用を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＣＤ８検出剤は、Ｄ８結合ドメインを含むタンパク質である。いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインは、ＣＤ８、ＣＤ８＋Ｔ細胞、組織、臓器、及び同様のものの位置及び／または量を診断、検出、及び／または視覚化することを可能にするために、Ｃ

Ｄ８を検出可能なマーカーにコンジュゲートされる。例示的なＣＤ８剤の説明は米国特許公開公報第ＵＳ２０１９／０３８２４８７号及び国際ＰＣＴ公開公報第ＷＯ／２０２０／０６９４３３号に示されており、これらはそれぞれ、その全体があらゆる目的のために参照によって本明細書に組み込まれる。

【０６９０】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインを含む薬剤は、抗ＣＤ８抗体またはその断片である。いくつかの実施形態では、薬剤は、直鎖抗体、及び抗体断片から形成される多重特異性抗体を含む。抗体断片の例としては、限定されないが、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、Ｆｄ、ドメイン抗体（ｄＡｂ）、相補性決定領域（ＣＤＲ）断片、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、一本鎖抗体断片、マキシボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、直鎖抗体、キレート組換え抗体、トリボディもしくはバイボディ、イントラボディ、ナノボディ、小モジュラー免疫医薬（ＳＭＩＰ）、抗原結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質、ラクダ化抗体、ＶＨＨ含有抗体、またはそれらの変異タンパク質もしくは誘導体、及びポリペプチドへの特異的抗原結合を付与する上で十分な免疫グロブリンの少なくとも一部（ＣＤＲ配列など）を含むポリペプチド（但し、抗体が所望の生物学的活性を保持することが条件である）が挙げられる。

【０６９１】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８検出剤は、ＣＤ８に特異的に結合するダイアボディ（Ｃｙｓ－ダイアボディなど）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ８検出剤は、ＣＤ８に特異的に結合するミニボディを含む。

【０６９２】

ミニボディは、抗原に対する二価結合特性を維持しつつ、全長抗体よりも小さな分子量を有する抗体形式である。その小型化サイズが故に、ミニボディは、系からのそのクリアランスが高速化しており、腫瘍組織の標的化時の浸透性が増強されている。迅速なクリアランスを伴って強力な標的化を行うための能力を有することから、ミニボディは、循環時間が長期化すると患者投薬または線量測定が有害になり得る画像診断及び細胞毒性／放射性ペイロードの送達に有利である。ＰＫに差があり、Ｆｃガンマ受容体に結合する定常領域が存在しないことから、ミニボディは、より制御された様式で結合及び免疫応答の刺激を行って、望ましくない生物学的作用（生命を脅かすサイトカインストームの誘導など）を少数化または低減することができる。

【０６９３】

いくつかの実施形態では、ミニボディは、親抗体の高い結合親和性及び特異性を維持しつつ、画像診断及びある特定の治療用途に有利な薬物動態特徴を有する。この薬物動態は、こうした断片が抗原を標的にし、その後に迅速な高コントラスト造影が得られるように系を迅速にクリアにできるという点で、全長親抗体での造影と比較してこうした断片に望ましいものである。いくつかの実施形態では、ミニボディの血清半減期が短くなっていることで、ミニボディの注射からおよそ４～７２時間という長時間にわたる範囲で最適な造影を得ることが可能である。これによって同日の造影が可能になり得、このことは、患者ケア管理に関して臨床現場において多大な利益になり得る。

【０６９４】

いくつかの実施形態では、ミニボディは、ホモ二量体である。いくつかの実施形態では、ミニボディの各単量体は、可変重ドメイン及び可変軽ドメインを含むＣＤ８に特異的に結合する一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）を含む。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖはそれぞれ、ＣＨ３ドメイン（ヒトＩｇＧ１　ＣＨ３ドメインなど）に連結される。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖは、ヒンジ領域及び任意選択でアミノ酸リンカー（ＧＳリンカーなど）を介してＣＨ３ドメインに係留される。いくつかの実施形態では、ミニボディ（ｓｃＦｖ－ＣＨ３）は、ＣＨ３ドメイン間の結び付き及びヒンジ領域内でのジスルフィド結合の形成に起因して安定二量体として存在する。いくつかの実施形態では、分泌を可能にするためにミニボディの可変重ドメインのＮ末端にシグナル配列が融合される。いくつかの実施形態では、ＧＳリンカー残基は可動性を実現させる。いくつかの実施形態では、グ

ルタミン及び／またはリジン残基が付加されて溶解性が増強され得る。

【０６９５】

いくつかの実施形態では、ミニボディは、ヒト化ミニボディである。いくつかの実施形態では、ミニボディは、ヒトミニボディである。いくつかの実施形態では、ミニボディは、マウスミニボディである。いくつかの実施形態では、ミニボディは、キメラミニボディである。

【０６９６】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＣＤ８検出剤は、ＣＤ８抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ミニボディのＣＤ８抗原結合ドメインは、ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＮＩＫＤＴＹＩＨＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＡＲＩＤＰＡＮＤＮＴＬＹＡＳＫＦＱＧＲＡＴＩＳＡＤＴＳＫＮＴＡＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＧＲＧＹＧＹＹＶＦＤＨＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号２３８）というアミノ酸配列を有する可変重ドメインまたはその任意の機能的に同等のバリアントを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ８抗原結合ドメインは、配列番号２３８のＶＨ　ＣＤＲ１、ＶＨ　ＣＤＲ２、及びＶＨ　ＣＤＲ３を含む。

【０６９７】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８抗原結合ドメインは、ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＴＶＫＩＳＣＫＶＳＧＦＮＩＫＤＴＹＩＨＷＶＱＱＡＰＧＫＧＬＥＷＭＧＲＩＤＰＡＮＤＮＴＬＹＡＳＫＦＱＧＲＶＴＩＴＡＤＴＳＴＤＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＧＹＧＹＹＶＦＤＨＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号２３９）というアミノ酸配列を有する可変重ドメインまたはその任意の機能的に同等のバリアントを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ８抗原結合ドメインは、配列番号２３９のＶＨ　ＣＤＲ１、ＶＨ　ＣＤＲ２、及びＶＨ　ＣＤＲ３を含む。

【０６９８】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８抗原結合ドメインは、ＤＶＱＩＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＴＳＲＳＩＳＱＹＬＡＷＹＱＱＫＰＧＫＶＰＫＬＬＩＹＳＧＳＴＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＶＡＴＹＹＣＱＱＨＮＥＮＰＬＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号２４０）というアミノ酸配列を有する可変重ドメインまたはその任意の機能的に同等のバリアントを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ８抗原結合ドメインは、配列番号２４０のＶＬ　ＣＤＲ１、ＶＬ　ＣＤＲ２、及びＶＬ　ＣＤＲ３を含む。

【０６９９】

いくつかの実施形態では、本発明のＣＤ８抗体のＣＤＲのうちの１つ以上に１つ以上のアミノ酸修飾が施される。一般に、いずれの単一ＣＤＲにおいても、置換されるアミノ酸の数は１つのみまたは２つのみまたは３つのみであり、一般に、一連のＣＤＲ内でなされる変更の数は、１以下、２以下、３以下、４以下、５以下、６以下、７以下、８以下、９以下、または１０以下である。一方で、いずれのＣＤＲにおいても、置換無し、１つ、２つ、または３つの置換の組み合わせはいずれも独立したものであり、任意選択で任意の他の置換と組み合わせられ得ることを理解されたい。したがって、本発明の抗体は、（ａ）本明細書に列挙される配列、（ｂ）１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個、またはそれ超のアミノ酸置換によって、（ａ）において特定されるＣＤＲアミノ酸配列とは異なる配列、（ｃ）（ａ）または（ｂ）において特定される配列との配列同一性が９０％以上、９５％以上、９８％以上、または９９％以上であるアミノ酸配列、（ｄ）本明細書に列挙されるアミノ酸をコードする核酸配列を有するポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、からなる群から選択されるＣＤＲアミノ酸配列を含む。２つのアミノ酸配列の間の同一性パーセントは、ＰＡＭ１２０重み残基表、１２のギャップ長ペナルティ、及び４のギャップペナルティを使用して、ＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に組み込まれているＥ．Ｍｅｙｅｒｓ　ａｎｄ　Ｗ．Ｍｉｌｌｅｒ（Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ．，４：１１－１７（１９８８））のアルゴリズムを使用して決定され得る。さらに、２つのアミノ酸配列の間の同一

性パーセントは、Ｂｌｏｓｓｕｍ６２行列またはＰＡＭ２５０行列のいずれか、ならびに１６、１４、１２、１０、８、６、または４のギャップの重み、及び１、２、３、４、５、または６の長さの重みを使用して、ＧＣＧソフトウェアパッケージ（商業的に利用可能）においてＧＡＰプログラムに組み込まれているＮｅｅｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４４－４５３（１９７０））アルゴリズムを使用して決定され得る。

【０７００】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８検出剤は、検出可能なマーカーをさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ８検出剤の検出可能なマーカーは、薬剤のＣＤ８結合ドメインに直接的または間接的にコンジュゲートされている。本明細書で提供される薬剤に含まれる検出可能なマーカーには、限定されないが、放射性物質（例えば、放射性同位体、放射性核種、放射標識、または放射性トレーサー）、色素、コントラスト剤、蛍光化合物または分子、生物発光化合物または分子、酵素、及び造影剤（例えば、常磁性イオン）が含まれる。さらに、いくつかのナノ粒子（例えば、量子ドット及び金属ナノ粒子（以下に記載のもの））は、検出剤としての使用に適し得る。いくつかの実施形態では、検出可能なマーカーは、インドシアニングリーン（ＩＣＧ）である。

【０７０１】

本明細書に記載の実施形態に従って検出可能なマーカーとして使用され得る放射性物質の例としては、限定されないが、^{18}Ｆ、^{18}Ｆ－ＦＡＣ、^{32}Ｐ、^{33}Ｐ、^{45}Ｔｉ、^{47}Ｓｃ、^{52}Ｆｅ、^{59}Ｆｅ、^{62}Ｃｕ、^{64}Ｃｕ、^{67}Ｃｕ、^{67}Ｇａ、^{68}Ｇａ、^{75}Ｓｃ、^{77}Ａｓ、^{86}Ｙ、^{90}Ｙ、^{89}Ｓｒ、^{89}Ｚｒ、^{94}Ｔｃ、^{94}Ｔｃ、^{99}ｍＴｃ、^{99}Ｍｏ、^{105}Ｐｄ、^{105}Ｒｈ、^{111}Ａｇ、^{111}Ｉｎ、^{123}Ｉ、^{124}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{142}Ｐｒ、^{143}Ｐｒ、^{149}Ｐｍ、^{153}Ｓｍ、$^{154-158}$Ｇｄ、^{161}Ｔｂ、^{166}Ｄｙ、^{166}Ｈｏ、^{169}Ｅｒ、^{175}Ｌｕ、^{177}Ｌｕ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{189}Ｒｅ、^{194}Ｉｒ、^{198}Ａｕ、^{199}Ａｕ、^{211}Ａｔ、^{211}Ｐｂ、^{212}Ｂｉ、^{212}Ｐｂ、^{213}Ｂｉ、^{223}Ｒａ、及び^{225}Ａｃが挙げられる。検出可能なマーカーとして使用され得る常磁性イオン物質の例としては、限定されないが、遷移金属及びランタニド金属（例えば、６～９、２１～２９、４２、４３、４４、または５７～７１の原子番号を有する金属）のイオンが挙げられる。こうした金属には、Ｃｒ、Ｖ、Ｍｎ、Ｆｅ、Ｃｏ、Ｎｉ、Ｃｕ、Ｌａ、Ｃｅ、Ｐｒ、Ｎｄ、Ｐｍ、Ｓｍ、Ｅｕ、Ｇｄ、Ｔｂ、Ｄｙ、Ｈｏ、Ｅｒ、Ｔｍ、Ｙｂ、及びＬｕのイオンが挙げられる。

【０７０２】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ドメインは、デフェロキサミンを介して^{89}Ｚｒにコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、ＣＤ８結合ミニボディは、^{64}Ｃｕにコンジュゲートされる。

【０７０３】

検出可能なマーカーが放射性金属または常磁性イオンである場合、いくつかの実施形態では、マーカーは、長い尾部を有する試薬と反応し得るものであり、長い尾部には、こうしたイオンとの結合のための１つ以上のキレート基が付加されている。長い尾部は、ポリマー（ポリリジン、多糖、またはイオンとの結合のためのキレート基に結合され得るペンダント基を有する他の誘導体化された鎖もしくは誘導体化可能な鎖など）であり得る。本明細書に記載の実施形態に従って使用され得るキレート基の例としては、限定されないが、エチレンジアミンテトラ酢酸（ＥＤＴＡ）、ジエチレントリアミンペンタ酢酸（ＤＴＰＡ）、ＤＯＴＡ、ＮＯＴＡ、ＮＯＧＡＤＡ、ＮＥＴＡ、デフェロキサミン（ＤｆＯ）、ポルフィリン、ポリアミン、クラウンエーテル、ビス－チオセミカルバゾン、ポリオキシム、及び同様の基が挙げられる。キレートは、抗原結合コンストラクトに対して、免疫反応性の消失を最小限にし、凝集及び／または内部架橋を最小限にしつつ当該分子への結合の形成を可能にする基によって連結され得る。同じキレートは、非放射性金属（マンガン、鉄、及びガドリニウムなど）と錯体を形成する場合、本明細書に記載の抗原結合コンストラクト及び担体と共に使用するとＭＲＩに有用である。大環状キレート（ＮＯＴＡ、ＮＯ

ＧＡＤＡ、ＤＯＴＡ、及びＴＥＴＡなど）は、限定されないが、それぞれガリウム、イットリウム、及び銅の放射性核種を含めて、様々な金属及び放射性金属との使用に有用である。他の環型キレート（大環状ポリエーテルなど）（放射性核種（ＲＡＩＴ向けのラジウム－２２３など）との安定的な結合の目的に合うものである）も使用され得る。ある特定の実施形態では、キレート部分は、ＰＥＴ造影剤（アルミニウム－１８ＲＦ複合体など）をＰＥＴ分析での使用のための標的化分子に付加するために使用され得る。

【０７０４】

４．末梢血から末梢血リンパ球（ＰＢＬ）を拡張する方法

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

【０７０５】

本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬ法１は、以下のように行われる：０日目に、凍結保存されたＰＢＭＣ試料を解凍し、ＰＢＭＣを計数する。Ｔ細胞を、ヒトＰａｎ　Ｔ細胞単離キット及びＬＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して単離する。

【０７０６】

ＰＢＬ方法２。本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬは、全血からＰＢＭＣ試料を得ることを含むＰＢＬ法２を使用して拡張される。ＰＢＭＣ由来のＴ細胞は、ＰＢＭＣを３７℃で少なくとも３時間インキュベートし、その後、非接着細胞を単離することによって濃縮される。

【０７０７】

本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬ法２は、以下のように行われる：０日目に、凍結保存されたＰＭＢＣ試料を解凍し、ＰＢＭＣ細胞を、ＣＭ－２培地中の６ウェルプレートに６００万細胞／ウェルで播種し、３７℃で３時間インキュベートする。３時間後、ＰＢＬである非接着細胞を取り出し、計数する。

【０７０８】

ＰＢＬ方法３。本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬは、末梢血からＰＢＭＣ試料を得ることを含むＰＢＬ法３を使用して拡張される。Ｂ細胞は、ＣＤ１９＋選択を使用して単離され、Ｔ細胞は、ＰＢＭＣ試料の非ＣＤ１９＋画分の負の選択を使用して選択される。

【０７０９】

本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬ法３は、以下のように行われる：０日目に、末梢血から取得された凍結保存されたＰＢＭＣを解凍し、計数する。ＣＤ１９＋Ｂ細胞を、ＣＤ１９　Ｍｕｌｔｉｓｏｒｔキット、ヒト（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して選別する。非ＣＤ１９＋細胞画分のうち、Ｔ細胞を、ヒトＰａｎ　Ｔ細胞単離キット及びＬＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して精製する。

【０７１０】

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

【０７１１】

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

【０７１２】

いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで任意選択で前治療された対象または患者由来のものである。いくつかの実施形態では、腫瘍試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療された対象または患者由来のものである。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療されており、少なくとも１ヶ月間、少なくとも２ヶ月間、少なくとも３ヶ月間、少なくとも４ヶ月間、少なくとも５ヶ月間、少なくとも６ヶ月間、または１年間、またはそれ以上治療を受けた対象または患者由来のものである。他の実施形態では、ＰＢＭＣは、イブルチニブなどのＩＴＫ阻害剤レジメンを現在受けている患者に由来する。

【０７１３】

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

【０７１４】

いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療されたが、もはやキナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤での治療を受けていない対象または患者由来のものである。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療されたが、もはやキナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤での治療を受けておらず、少なくとも１ヶ月間、少なくとも２ヶ月間、少なくとも３ヶ月間、少なくとも４ヶ月間、少なくとも５ヶ月間、少なくとも６ヶ月間、または少なくとも１年間、またはそれ以上治療を受けていない対象または患者由来のものである。他の実施形態では、ＰＢＭＣは、ＩＴＫ阻害剤に以前に曝露されたが、少なくとも３ヶ月、少なくとも６ヶ月、少なくとも９ヶ月、または少なくとも１年以内に治療されていない患者に由来する。

【０７１５】

本発明のいくつかの実施形態では、０日目に、細胞がＣＤ１９＋について選択され、それに応じて選別される。本発明のいくつかの実施形態では、選択は、抗体結合ビーズを使用して行われる。本発明のいくつかの実施形態では、純粋なＴ細胞が、０日目にＰＢＭＣから単離される。

【０７１６】

本発明のいくつかの実施形態では、イブルチニブまたは他のＩＴＫ阻害剤で前治療されていない患者の場合、１０～１５ｍＬのバフィーコートは、約5×10^{9}のＰＢＭＣを産生し、これは、次いで、約5.5×10^{7}のＰＢＬを産生する。

【０７１７】

本発明のいくつかの実施形態では、イブルチニブまたは他のＩＴＫ阻害剤で前治療された患者の場合、拡張プロセスは、約20×10^{9}のＰＢＬを産生する。本発明のいくつかの実施形態では、40.3×10^{6}のＰＢＭＣは、約4.7×10^{5}のＰＢＬを産生する。

【０７１８】

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

【０７１９】

いくつかの実施形態では、ＰＢＬは、米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／０３４７３５０　Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載される方法を使用し

て調製される。
【０７２０】
５．骨髄由来のＰＢＭＣから骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）を拡張する方法
ＭＩＬ方法３。本発明のいくつかの実施形態では、方法は、骨髄からＰＢＭＣを取得することを含む。０日目に、ＰＢＭＣがＣＤ３＋／ＣＤ３３＋／ＣＤ２０＋／ＣＤ１４＋について選択され、選別され、非ＣＤ３＋／ＣＤ３３＋／ＣＤ２０＋／ＣＤ１４＋細胞画分が超音波処理され、超音波処理された細胞画分の一部が選択された細胞画分に戻し追加される。
【０７２１】
本発明のいくつかの実施形態では、ＭＩＬ法３は、以下のように行われる：０日目に、凍結保存されたＰＢＭＣ試料を解凍し、ＰＢＭＣを計数する。細胞を、ＣＤ３、ＣＤ３３、ＣＤ２０、及びＣＤ１４抗体で染色し、選別されたＳ３ｅ細胞（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して選別する。細胞を、免疫細胞画分（またはＭＩＬ画分）（ＣＤ３＋ＣＤ３３＋ＣＤ２０＋ＣＤ１４＋）及びＡＭＬ芽球画分（非ＣＤ３＋ＣＤ３３＋ＣＤ２０＋ＣＤ１４＋）の２つの画分に選別する。
【０７２２】
本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、骨髄から取得される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、アフェレーシス、吸引、針生検、または当該技術分野で知られている他の同様の手段により骨髄から取得される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、新鮮である。他の実施形態では、ＰＢＭＣは、凍結保存される。
【０７２３】
本発明のいくつかの実施形態では、ＭＩＬは、１０～５０ｍＬの骨髄穿刺液から拡張される。本発明のいくつかの実施形態では、１０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、２０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、３０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、４０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、５０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。
【０７２４】
本発明のいくつかの実施形態では、約１０～５０ｍＬの骨髄穿刺液から産生されたＰＢＭＣの数は、約5×10^{7}～約10×10^{7}ＰＢＭＣである。他の実施形態では、産生されたＰＭＢＣの数は、約7×10^{7}ＰＢＭＣである。
【０７２５】
本発明のいくつかの実施形態では、約5×10^{7}～約10×10^{7}ＰＢＭＣが、約0.5×10^{6}～約1.5×10^{6}ＭＩＬを産生する。本発明のいくつかの実施形態では、約1×10^{6}ＭＩＬが産生される。
【０７２６】
本発明のいくつかの実施形態では、骨髄穿刺液から誘導された12×10^{6}ＰＢＭＣは、およそ1.4×10^{5}ＭＩＬを産生する。
【０７２７】
前述の実施形態のうちのいずれにおいても、ＰＢＭＣは、全血試料から、骨髄から、アフェレーシスによって、バフィーコートから、またはＰＢＭＣを得るための当該技術分野で知られている任意の他の方法から得られ得る。
【０７２８】
いくつかの実施形態では、ＭＩＬは、米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／０３４７３５０　Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載される方法を使用して調製される。
【０７２９】
Ｂ．ステップＢ：プライミングによる第１の拡張
いくつかの実施形態では、本方法は、より古いＴＩＬ（すなわち、対象／患者への投与前により多くの複製ラウンドをさらに受けたＴＩＬ）よりも追加の治療的利益を提供し得る、より若いＴＩＬを提供する。若いＴＩＬの特徴は、文献、例えば、Ｄｏｎｉａ，ｅｔ

ａｌ．，Ｓｃａｎｄ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２，７５，１５７－１６７、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１０，１６，６１２２－６１３１、Ｈｕａｎｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００５，２８，２５８－２６７、Ｂｅｓｓｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１３，１９，ＯＦ１－ＯＦ９、Ｂｅｓｓｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００９，３２，４１５－４２３、Ｒｏｂｂｉｎｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００４，１７３，７１２５－７１３０、Ｓｈｅｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００７，３０，１２３－１２９、Ｚｈｏｕ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００５，２８，５３－６２、及びＴｒａｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００８，３１，７４２－７５１に記載されており、それらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０７３０】

例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ）のステップＡに記載されるものなどの腫瘍断片及び／または腫瘍断片の解剖または消化後に、結果として得られた細胞は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長を好む条件下で、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びフィーダー細胞（例えば、抗原提示フィーダー細胞）を含む血清中で培養される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びフィーダー細胞は、腫瘍消化物及び／または腫瘍断片とともに培養開始時に（例えば、０日目に）追加される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物及び／または腫瘍断片は、１容器当たり最大６０個の断片及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む容器内でインキュベートされる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に１～８日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に１～７日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、１～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、１～７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、５～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、５～７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約６～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に、約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約６～７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に、約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約７～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に、約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞をもたらす。

【０７３１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの拡張は、以下及び本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張ステップ（例えば、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるプロセスを含み得、０日目及び／または培養開始からのフィーダー細胞を含有する、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなど）、続いて以下のステップＤ及び本明細書に記載される急速な第２の拡張（ステップＤ、急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）ステップと称されるプロセスを含む）、続いて任意選択の凍結保存、続いて以下及び本明細書に記載される第２のステップＤ（再刺激ＲＥＰステップと称されるプロセスを含む）を使用して行うことができる

。このプロセスから取得されたＴＩＬは、本明細書に記載の表現型特徴及び代謝パラメータについて任意で特徴付けられ得る。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１ｍｍ^3～１０ｍｍ^{3}である。

【０７３２】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、ステップＢのＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭＨｅｐｅｓ、及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充した、ＧｌｕｔａＭＡＸを含むＲＰＭＩ　１６４０からなる。

【０７３３】

いくつかの実施形態では、２４０個以下の腫瘍断片が存在する。いくつかの実施形態では、４つ以下の容器に入れられた２４０個以下の腫瘍断片が存在する。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、６０個以下の腫瘍断片が１つの容器に入れられる。いくつかの実施形態では、各容器は、１容器当たり５００ｍＬ以下の培地を含む。いくつかの実施形態では、培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、抗原提示フィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇのＯＫＴ－３、及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【０７３４】

腫瘍断片の調製後、結果として得られた細胞（すなわち、一次細胞集団である断片）は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長を好み、かつ０日目の培養開始からＴＩＬプライミング及び加速された成長を可能にする条件下で、ＩＬ－２、抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む培地中で培養される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物及び／または腫瘍断片は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、ならびに抗原提示フィーダー細胞及びＯＫＴ－３とインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に１～８日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張中の成長培地は、ＩＬ－２またはそのバリアント、ならびに抗原提示フィーダー細胞及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に１～７日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張中の成長培地は、ＩＬ－２またはそのバリアント、ならびに抗原提示フィーダー細胞及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、組換えヒトＩＬ－２（ｒｈＩＬ－２）である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき２０～３０×１０^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき２０×１０^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき２５×１０^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき３０×１０^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、４～８×１０^{6}ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、５～７×１０^{6}ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、６×１０^{6}ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、実施例Ｃに記載されるように調製される。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約１０，００

０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、または約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、約４０００ＩＵ／ｍＬ、約４５００ＩＵ／ｍＬ、約５０００ＩＵ／ｍＬ、約５５００ＩＵ／ｍＬ、約６０００ＩＵ／ｍＬ、約６５００ＩＵ／ｍＬ、約７０００ＩＵ／ｍＬ、約７５００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬ、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬ、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【０７３５】

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

【０７３６】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約４ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、または約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミン

グによる第１の拡張培養培地は、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２１をさらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。

【０７３７】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、及び約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇの間、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、１５ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３抗体は、ムロモナブである。例えば、表１を参照されたい。

【０７３８】

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

【０７３９】

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

【０７４０】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、それは、ＣＭ１（培養培地１）と称される。いくつかの実施形態では、ＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充した、ＧｌｕｔａＭＡＸを含むＲＰＭＩ１

６４０からなる。いくつかの実施形態では、ＣＭは、実施例に記載されるＣＭ１である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培地または初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞（本明細書ではフィーダー細胞とも称される）を含む。

【０７４１】

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

【０７４２】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。

【０７４３】

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

【０７４４】

いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔは、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＳＴ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。

【０７４５】
いくつかの実施形態では、無血清または合成培地中の総血清代替物濃度（ｖｏｌ％）は、総無血清または合成培地の約１体積％、２体積％、３体積％、４体積％、５体積％、６体積％、７体積％、８体積％、９体積％、１０体積％、１１体積％、１２体積％、１３体積％、１４体積％、１５体積％、１６体積％、１７体積％、１８体積％、１９体積％、または２０体積％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約３％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約５％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約１０％である。
【０７４６】
いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。
【０７４７】
いくつかの実施形態では、合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００Ｉ

Ｕ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【０７４８】

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

【０７４９】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５ｍＭ～約１５０ｍＭ、１０ｍＭ～約１４０ｍＭ、１５ｍＭ～約１３０ｍＭ、２０ｍＭ～約１２０ｍＭ、２５ｍＭ～約１１０ｍＭ、３０ｍＭ～約１００ｍＭ、３５ｍＭ～約９５ｍＭ、４０ｍＭ～約９０ｍ

Ｍ、４５ｍＭ～約８５ｍＭ、５０ｍＭ～約８０ｍＭ、５５ｍＭ～約７５ｍＭ、６０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約６５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【０７５０】

いくつかの実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる国際ＰＣＴ公開第ＷＯ／１９９８／０３０６７９号に記載されている合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の微量元素、及び１つ以上の抗生物質からなる群から選択される１つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベーター－メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、及び１つ以上の微量元素からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

【０７５１】

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

【０７５２】

いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地中の濃度範囲」という見出しの下の列にリストされた濃度範囲で存在する。他の実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされた最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかでは、無血清サプリメントは、表４の「サプリメント中の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。

【０７５３】

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

【０７５４】

いくつかの実施形態では、Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ ａｌ．，ＣｌｉｎＴｒａｎｓｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，４（１）２０１５（ｄｏｉ：１０．１０３８／ｃｔｉ．２０１４．３１）に記載の定義された培地が、本発明において有用である。簡潔には、ＲＰＭＩまたはＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）を基礎細胞培地として使用し、０、２％、５％、または１０％のいずれかのＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔを補充した。

【０７５５】

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

【０７５６】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、１～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、２～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、３～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、４～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、５～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例え

ば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、６～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図１（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに提供されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、７～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに提供されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、１～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、２～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、３～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、４～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂ及び／または図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、５～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、６～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに提供されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、７日間である。

【０７５７】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから２日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び

／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから２日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから３日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから３日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから４日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから４日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから５日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから５日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから６日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから６日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから７日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから７日間続行することができる。

【０７５８】

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

【０７５９】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１の組み合わせは、プライミングによる第１の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８

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

【０７６０】

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

【０７６１】

１．フィーダー細胞及び抗原提示細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載のものなどの拡張、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものを含む）はＴＩＬ拡張の開始時点にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とするものではなく、むしろこれは、プライミングによる第１の拡張の間に添加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載のものなどの拡張、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものを含む）はＴＩＬ拡張の開始時点にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とするものではなく、むしろこれは、プライミングによる第１の拡張の間に、４～８日目の間の任意の時点で、添加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載のものなどの拡張、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものを含む）はＴＩＬ拡張の開始時点にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とするものではなく、むしろこれは、プライミングによる第１の拡張の間に、４～７日目の間の任意の時点で、添加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載のものなどの拡張、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものを含む）はＴＩＬ拡張の開始時点にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とするものではなく、むしろこれは、プライミングによる第１の拡張の間に、５～８日目の間の任意の時点で、添加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載のものなどの拡張、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものを含む）はＴＩＬ拡張の開始時点にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とするものではなく、むしろこれは、プライミングによる第１の拡張の間に、５～７日目の間の任意の時点で、添加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）

のステップＢに記載のものなどの拡張、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものを含む）はＴＩＬ拡張の開始時点にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とするものではなく、むしろこれは、プライミングによる第１の拡張の間に、６～８日目の間の任意の時点で、添加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載のものなどの拡張、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものを含む）はＴＩＬ拡張の開始時点にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とするものではなく、むしろこれは、プライミングによる第１の拡張の間に、６～７日目の間の任意の時点で、添加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載のものなどの拡張、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものを含む）はＴＩＬ拡張の開始時点にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とするものではなく、むしろこれは、プライミングによる第１の拡張の間に、７または８日目の間の任意の時点で、添加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載のものなどの拡張、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものを含む）はＴＩＬ拡張の開始時点にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とするものではなく、むしろこれは、プライミングによる第１の拡張の間に、７日目の間の任意の時点で、添加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（具体的には、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載のものなどの拡張、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものを含む）はＴＩＬ拡張の開始時点にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とするものではなく、むしろこれは、プライミングによる第１の拡張の間に、８日目の間の任意の時点で、添加される。

【０７６２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時及びプライミングによる第１の拡張中にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要する。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者由来の標準の全血単位から取得される末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、2.5×10^{8}のフィーダー細胞が、プライミングによる第１の拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、容器当たり2.5×10^{8}のフィーダー細胞が、プライミングによる第１の拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、ＧＲＥＸ－１０当たり2.5×10^{8}のフィーダー細胞が、プライミングによる第１の拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、ＧＲＥＸ－１００当たり2.5×10^{8}のフィーダー細胞が、プライミングによる第１の拡張中に使用される。

【０７６３】

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

【０７６４】

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

【０７６５】
いくつかの実施形態では、７日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された総生細胞数が、プライミングによる第１の拡張の０日目に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。
【０７６６】
いくつかの実施形態では、７日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された総生細胞数が、プライミングによる第１の拡張の０日目に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、５～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び１０００～６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１０～５０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～５０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２０～４０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～４０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２５～３５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２５００～３５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。
【０７６７】
いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、約１：２５、約１：５０、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００、約１：３２５、約１：３５０、約１：３７５、約１：４００、または約１：５００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：５０～１：３００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：１００～１：２００である。
【０７６８】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順は、約２．５×10^8フィーダー細胞：約１００×10^6ＴＩＬの比を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順は、約２．５×10^8フィーダー細胞：約５０×10^6ＴＩＬの比を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順は、約２．５×10^8フィーダー細胞：約２５×10^6ＴＩＬを必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張は、約２．５×10^8フィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、急速な第２の拡張で使用されるフィーダー細胞の数の４分の１、３分の１、１２分の５、または半分を必要とする。
【０７６９】
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、容器当たり２．５×10^8の抗原提示フィーダー

細胞を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり３０ｎｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞当たり１５μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地及び１５μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、５００ｍＬの培養培地、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、１５μｇのＯＫＴ－３、及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞当たり１５μｇのＯＫＴ－３を含む。

【０７７０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順は、第２の拡張中にＴＩＬを超える過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者由来の標準の全血単位から取得される末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、人工抗原提示（ａＡＰＣ）細胞がＰＢＭＣの代わりに使用される。

【０７７１】

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

【０７７２】

いくつかの実施形態では、人工抗原提示細胞は、ＰＢＭＣの代替物として、またはＰＢＭＣと組み合わせて、プライミングによる第１の拡張において使用される。

【０７７３】

２．サイトカイン及び他の添加物

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

【０７７４】

あるいは、ＴＩＬのプライミングによる第１の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第ＵＳ２０１７／０１０７４９０Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせを用いて追加として可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２及びＩＬ－１５、ＩＬ－２及びＩＬ－２１、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１が含まれ、後者は多くの実施形態で特に有用である。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにＴ細胞の生成に特に有利に働く。例えば、表２を参照されたい。

【０７７５】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＫＴ－３抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、４－１ＢＢアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＢはまた

、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＸ－４０アゴニストの、培養培地への添加を含み得る。加えて、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（ＰＰＡＲ）－ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーターＩ－アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１９／０３０７７９６　Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップＢ中の培養培地で使用されてもよい。

【０７７６】

Ｃ．ステップＣ：プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行

場合によっては、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されるようにステップＢから取得されるＴＩＬ集団を含む、プライミングによる第１の拡張から取得されたバルクＴＩＬ母集団（ＲＥＰ前と称されることもある拡張を含み得る）は、急速な第２の拡張（これは、急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されることもある拡張を含み得る）に供され、次いで、以下で考察されるように凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾ＴＩＬが療法に使用される場合、プライミングによる第１の拡張由来の拡張ＴＩＬ集団または急速な第２の拡張由来の拡張ＴＩＬ集団は、拡張ステップ前またはプライミングによる第１の拡張後及び急速な第２の拡張前に好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。

【０７７７】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されるステップＢから）取得されたＴＩＬは、選択のために表現型決定されるまで保管される。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されるステップＢから）取得されたＴＩＬは保存されず、急速な第２の拡張に直接進む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から取得されたＴＩＬは、プライミングによる第１の拡張後及び急速な第２の拡張前に凍結保存されない。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、腫瘍の断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約３日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約３日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約４日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約４日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約５日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約５日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約６日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約６日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約７日～８日で起こる。いくつかの

実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約８日で起こる。

【０７７８】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから２日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから２日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから３日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから３日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから４日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから４日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから５日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから５日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから６日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから６日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから７日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから８日で起こる。

【０７７９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、初期第１の拡張後、及び急速な第２の拡張前に保存されず、ＴＩＬは、急速な第２の拡張に直接進む（例えば、いくつかの実施形態では、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されるようにステップＢからステップＤへの移行中の保存がない）。いくつかの実施

形態では、移行は、本明細書に記載されるように、閉鎖系内で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張由来のＴＩＬである第２のＴＩＬ集団は、移行期間なしで急速な第２の拡張に直接進む。

【０７８０】

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

【０７８１】

Ｄ．ステップＤ：急速な第２の拡張

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ細胞集団は、採取及びプライミングによる第１の拡張後、ステップＡ及びステップＢ、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されるように、ステップＣと称される移行後に数がさらに拡張される。このさらなる拡張は、本明細書では急速な第２の拡張または急速拡張と称され、これは、当該技術分野で概して急速拡張プロセス（急速拡張プロトコルまたはＲＥＰ、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＤに示されるプロセス）と称される拡張プロセスを含み得る。急速な第２の拡張は、一般に、フィーダー細胞、サイトカイン源、及び抗ＣＤ３抗体を含む、いくつかの成分を含む培養培地を使用して、ガス透過性容器内で達成される。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張開始の１日、２日、３日、または４日後（すなわち、Ｇｅｎ３プロセス全体の８、９、１０、または１１日目）に、ＴＩＬは、より大容量の容器に移される。

【０７８２】

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

日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約６日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約６日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約７日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約７日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約８日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約８日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約９日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約３日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約５日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約６日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約１０日間続行することができる。

【０７８３】

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

さらに再刺激され得る。いくつかの実施形態では、再刺激は、第２の拡張の一部として起こる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、照射された自己リンパ球の存在下で、または照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２を用いて起こる。

【０７８４】

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

【０７８５】

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

【０７８６】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、容器当たり７．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培地中に、容器当たり５００ｍＬの培養培地及び３０μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培地中に、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び７．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０μｇのＯＫＴ－３、及び７．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【０７８７】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実

施形態では、培地は、容器当たり５×１０^{8}～７．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地及び３０μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び５×１０^{8}～７．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地、ならびに６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０μｇのＯＫＴ－３、及び５×１０^{8}～７．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【０７８８】

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

【０７８９】

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

【０７９０】

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

【０７９１】

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

【０７９２】

いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１６０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１４０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、または約１００Ｉ

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

【０７９３】

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

【０７９４】

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

【０７９５】

いくつかの実施形態では、ＲＥＰ及び／または急速な第２の拡張は、バルクＴＩＬが１５０ｍＬ培地中で１００倍または２００倍過剰の不活性化フィーダー細胞、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３、抗ＣＤ３抗体、及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２と混合されているフラスコ内で行われ、フィーダー細胞濃度は、プライミングによる第１の拡張におけるフィーダー細胞濃度の少なくとも１．１倍（１．１Ｘ）、１．２倍、１．３倍、１．４倍、１．５倍、１．６倍、１．７倍、１．８倍、１．８倍、２倍、２．１倍、２．２倍、２．３倍、２．４倍、２．５倍、２．６倍、２．７倍、２．８倍、２．９倍、３．０倍、３．１倍、３．２倍、３．３倍、３．４倍、３．５倍、３．６倍、３．７倍、３．８倍、３．９倍、または４．０倍である。培地交換（一般に、使用済み培地の３分の２の吸引及び等量の新鮮な培地との交換による、３分の２培地交換）は、細胞が代替の成長チャンバに移されるまで行われる。代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、Ｇ－Ｒ

ＥＸフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【０７９６】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張（ＲＥＰプロセスと称されるプロセスを含み得る）は、実施例及び図で論じられるように、７～９日間である。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、７日間である。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、８日間である。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、９日間である。

【０７９７】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＤで参照される拡張を含み得る）は、１００ｃｍのガス透過性シリコン底部（Ｇ－ＲＥＸ－１００、Ｗｉｌｓｏｎ Ｗｏｌｆ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｎｅｗ Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ，ＵＳＡから市販）を有する５００ｍＬ容量のガス透過性フラスコ内で行うことができる。５×１０^{6}または１０×１０^{6}ＴＩＬは、５％ヒトＡＢ血清、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）を補充された４００ｍＬの５０／５０培地中でＰＢＭＣとともに培養され得る。Ｇ－ＲＥＸ－１００フラスコを、５％ CO_2中３７℃でインキュベートすることができる。５日目に、２５０ｍＬの上清が除去され、遠心分離ボトルに入れられ、１５００ｒｐｍ（４９１×ｇ）で１０分間遠心分離される。ＴＩＬペレットが、５％ヒトＡＢ血清、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬの新鮮な培地で再懸濁され、元のＧＲＥＸ－１００フラスコに戻し追加され得る。ＴＩＬがＧＲＥＸ－１００フラスコで連続して拡張される場合、１０日目または１１日目に、ＴＩＬは、ＧＲＥＸ－５００などのより大きいフラスコに移され得る。培養１４日目に、細胞が採取され得る。培養１５日目に、細胞が採取され得る。培養１６日目に、細胞が採取され得る。いくつかの実施形態では、培地交換は、細胞が代替の成長チャンバに移されるまで行われる。いくつかの実施形態では、培地の３分の２は、使用済み培地の吸引及び等体積の新鮮な培地との交換によって交換される。いくつかの実施形態では、代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、ＧＲＥＸフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【０７９８】

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

【０７９９】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。

【０８００】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｅｒｕｍ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ、ＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代用物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代用物、１つ以上の抗酸化剤、１

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

【０８０１】

いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔは、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＳＴ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。

【０８０２】

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

【０８０３】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。

【０８０４】

いくつかの実施形態では、合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘ

ｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭ

のグルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。
【０８０５】
いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約０．１ｍＭ～約１０ｍＭ、０．５ｍＭ～約９ｍＭ、１ｍＭ～約８ｍＭ、２ｍＭ～約７ｍＭ、３ｍＭ～約６ｍＭ、または４ｍＭ～約５ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約２ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。
【０８０６】
いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５ｍＭ～約１５０ｍＭ、１０ｍＭ～約１４０ｍＭ、１５ｍＭ～約１３０ｍＭ、２０ｍＭ～約１２０ｍＭ、２５ｍＭ～約１１０ｍＭ、３０ｍＭ～約１００ｍＭ、３５ｍＭ～約９５ｍＭ、４０ｍＭ～約９０ｍＭ、４５ｍＭ～約８５ｍＭ、５０ｍＭ～約８０ｍＭ、５５ｍＭ～約７５ｍＭ、６０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約６５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。
【０８０７】
いくつかの実施形態では、国際特許出願公開第ＷＯ１９９８／０３０６７９号及び米国特許出願公開第ＵＳ２００２／００７６７４７　Ａ１号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載される合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の微量元素、及び１つ以上の抗生物質からなる群から選択される１つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベーター－メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、及び１つ以上の微量元素からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。
【０８０８】
いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌの範囲であり、Ｌ－ヒスチジンの濃度は、約５～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－イソロイシンの濃度は、約５～３００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－メチオニンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－フェニルアラニンの濃度は、約５～４００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－プロリンの濃度は、約１～１０００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－ヒドロキシプロリンの濃度は、約１～４５

ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－セリンの濃度は、約１～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－スレオニンの濃度は、約１０～５００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－トリプトファンの濃度は、約２～１１０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－チロシンの濃度は、約３～１７５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－バリンの濃度は、約５～５００ｍｇ／Ｌであり、チアミンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、還元型グルタチオンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩の濃度は、約１～２００ｍｇ／Ｌであり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約１～５０ｍｇ／Ｌであり、インスリンの濃度は、約１～１００ｍｇ／Ｌであり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約０．０００００１～０．０００１ｍｇ／Ｌであり、アルブミン（例えば、ＡｌｂｕＭＡＸ（登録商標）Ｉ）の濃度は、約５０００～５０，０００ｍｇ／Ｌである。

【０８０９】

いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地中の濃度範囲」という見出しの下の列に列挙された濃度範囲で存在する。他の実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地の好ましい実施形態」という見出しの下の列に列挙された最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかでは、無血清サプリメントは、表４の「サプリメント中の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。

【０８１０】

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

【０８１１】

いくつかの実施形態では、Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，４（１）２０１５（ｄｏｉ：１０．１０３８／ｃｔｉ．２０１４．３１）に記載の合成培地が、本発明において有用である。簡潔には、ＲＰＭＩまたはＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）を基礎細胞培地として使用し、０、２％、５％、または１０％のいずれかのＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔを補充した。

【０８１２】

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

【０８１３】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）が行われ、優れた腫瘍反応性のためにＴＩＬが選択されるステップをさらに含む。当該技術分野で知られている任意の選択方法が使用され得る。例えば、米国特許出願公開第２０１６／００１００５８Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている方法が、優れた腫瘍反応性のためのＴＩＬの選択に使用され得る。

【０８１４】

任意選択で、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準のアッセイを使用して、急速な第２の拡張（ＲＥＰ拡張と称される拡張を含む）後に行われ得る。例えば、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンブルー排除アッセイが、バルクＴＩＬの試料上で行われ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ試料は、Ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２自動セルカウンター（Ｎｅｘｃｅｌｏｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｌ

ａｗｒｅｎｃｅ，ＭＡ）を使用して計数され、生存率が決定され得る。いくつかの実施形態では、生存率は、標準のＣｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２　Ｉｍａｇｅ　Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ　Ａｕｔｏｍａｔｉｃ　Ｃｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｅｒプロトコルに従って決定される。

【０８１５】

Ｔリンパ球及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、及びＣ（一定）は、免疫グロブリン及びＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第２の拡張において取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加する。

【０８１６】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地とも称される）は、以下でさらに詳細に論じられるように、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、ならびに抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地とも称される）は、以下でさらに詳細に論じられるように、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｕｇ／フラスコのＯＫＴ－３、ならびに７．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地とも称される）は、以下でさらに詳細に論じられるように、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、ならびに抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地とも称される）は、以下でさらに詳細に論じられるように、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｕｇ／フラスコのＯＫＴ－３、ならびに５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。

【０８１７】

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

【０８１８】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～７日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養でのＴＩＬを、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００－ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来のＴＩＬを、第２の容器内でのより大規模な培

養で約４～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。

【０８１９】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～７日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴＩＬの一部が、第２の小規模培養で約４～７日間培養される。

【０８２０】

いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、ＴＩＬの複数の約２～５亜集団に配分される。

【０８２１】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～７日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴＩＬの一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。

【０８２２】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約５日間培養することによって急速なまたは第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴＩＬの一部が、より大規模な培養で約６日間培養される。

【０８２３】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個のＴＩＬ、少なくとも10^9個のＴＩＬ、または少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。例示的な一実施形態では、各第２の容器は、少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。

【０８２４】

いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２～５亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２、３、４、または５亜集団に配分される。

【０８２５】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張の完了後、複数の亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の完了後、１つ以上のＴＩＬの亜集団を一緒にプールして、治療有効量のＴＩＬを産生する。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、ＴＩＬの各亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。

【０８２６】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、複数のステップに分割される前に、約３～７日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張の分裂は、急速または

第２の拡張の開始後約３日目、４日目、５日目、６日目、または７日目に起こる。

【０８２７】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張の分裂は、第１の拡張（すなわち、ＲＥＰ前拡張）の開始後の約７日目、８日目、９日目、１０日目、１１日目、１２日目、１３日目、１４日目、１５日目、または１６日目、１７日目、または１８日目に起こる。例示的な一実施形態では、急速または第２の拡張の分裂は、第１の拡張の開始後約１６日目に起こる。

【０８２８】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、分裂後約７～１１日間、さらに行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、分裂後約５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日間、さらに行われる。

【０８２９】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地と同じ成分を含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地とは異なる成分を含む。

【０８３０】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む。

【０８３１】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な細胞培養培地で置き換えることによって生成される。

【０８３２】

いくつかの実施形態では、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。

【０８３３】

１．フィーダー細胞及び抗原提示細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される急速な第２の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＤに記載されるような拡張、ならびにＲＥＰと称されるものを含む）は、ＲＥＰＴＩＬ拡張中及び／または急速な第２の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多

くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な献血者由来の標準の全血単位から得られる末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。

【０８３４】

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

【０８３５】

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

【０８３６】

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

【０８３７】

いくつかの実施形態では、７日目及び１４日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された総生細胞数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び１０００～６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～５０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～４０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２５００～３５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【０８３８】

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

【０８３９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約5×10^{8}フィーダー細胞：約100×10^{6}ＴＩＬの比を必要とする。いくつかの実施形態では、本明細書

に記載の第２の拡張手順は、約７．５×１０^{8}フィーダー細胞：約１００×１０^{6}ＴＩＬの比を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約５×１０^{8}フィーダー細胞：約５０×１０^{6}ＴＩＬの比を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約７．５×１０^{8}フィーダー細胞：約５０×１０^{6}ＴＩＬの比を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約５×１０^{8}フィーダー細胞：約２５×１０^{6}ＴＩＬを必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約７．５×１０^{8}フィーダー細胞：約２５×１０^{6}ＴＩＬを必要とする。さらに他の実施形態では、急速な第２の拡張は、急速な第２の拡張の２倍の数のフィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張が約２．５×１０^{8}フィーダー細胞を必要とする場合、急速な第２の拡張は、約５×１０^{8}フィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張が約２．５×１０^{8}フィーダー細胞を必要とする場合、急速な第２の拡張は、約７．５×１０^{8}フィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張の２倍（２．０×）、２．５倍、３．０倍、３．５倍または４．０倍の数のフィーダー細胞を必要とする。

【０８４０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の急速な第２の拡張手順は、急速な第２の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者由来の標準の全血単位から取得される末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、人工抗原提示（ａＡＰＣ）細胞がＰＢＭＣの代わりに使用される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、プライミングによる第１の拡張に追加されたＰＢＭＣの２倍の濃度で、急速な第２の拡張に追加される。

【０８４１】

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

【０８４２】

いくつかの実施形態では、人工抗原提示細胞は、ＰＢＭＣの代替物として、またはＰＢＭＣと組み合わせて、急速な第２の拡張において使用される。

【０８４３】

２．サイトカイン及び他の添加物

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

【０８４４】

あるいは、ＴＩＬの急速な第２の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第ＵＳ２０１７／０１０７４９０Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせを用いて追加として可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２及びＩＬ－１５、ＩＬ－２及びＩＬ－２１、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１が含まれ、後者は多くの実施形態で特に有用である。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにＴ細胞の生成に特に有利に働く。

【０８４５】

いくつかの実施形態では、ステップＤ（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄから）はまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＫＴ－３抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、４－１ＢＢアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＤ（

特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄから）はまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＸ－４０アゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。加えて、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（ＰＰＡＲ）－ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーターＩ－アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１９／０３０７７９６　Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップＤ（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄから）中の培養培地で使用されてもよい。

【０８４６】

Ｅ．ステップＥ：ＴＩＬを採取する

急速な第２の拡張ステップ後、細胞が採取され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供されるように、１、２、３、４、またはそれ以上の拡張ステップ後に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供されるように、２つの拡張ステップ後に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、２つの拡張ステップ、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供されるように、１回のプライミングによる第１の拡張及び１回の急速な第２の拡張の後に採取される。

【０８４７】

ＴＩＬは、任意の適切な滅菌様式で、例えば、遠心分離によって採取され得る。ＴＩＬを採取するための方法は、当該技術分野で周知であり、任意のかかる既知の方法が本プロセスとともに用いられ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、自動化システムを使用して採取される。

【０８４８】

細胞採取機及び／または細胞処理システムは、例えば、Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ　Ｋａｂｉ、Ｔｏｍｔｅｃ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ、及びＩｎｏｔｅｃｈ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃを含む、様々な供給源から市販されている。任意の細胞ベースの採取機が本方法とともに用いられ得る。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理システムは、膜ベースの細胞採取機である。いくつかの実施形態では、細胞採取は、ＬＯＶＯシステム（Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ　Ｋａｂｉによって製造されたもの）などの細胞処理システムによるものである。「ＬＯＶＯ細胞処理システム」という用語は、細胞を含む溶液を、滅菌及び／または閉鎖系環境で回転膜または回転フィルターなどの膜またはフィルターをとおしてポンプ輸送し、連続フローを可能にし、細胞を処理して、ペレット化せずに上清または細胞培養培地を除去する、任意のベンダーによって製造された任意の機器または装置も指す。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理システムは、滅菌閉鎖系内で、細胞分離、洗浄、流体交換、濃縮、及び／または他の細胞処理ステップを行うことができる。

【０８４９】

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

【０８５０】

いくつかの実施形態では、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または

図８Ｃ及び／または図８Ｄ）によるステップＥは、本明細書に記載のプロセスに従って行われる。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、閉鎖系の無菌性及び閉鎖性を維持するために、滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるような閉鎖系が用いられる。

【０８５１】

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

【０８５２】

Ｆ．ステップＦ：最終製剤及び輸液容器への移行

図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に例示的な順序で提供され、かつ上及び本明細書で詳細に概説されるステップＡ～Ｅが完了した後、細胞は、注入バッグまたは無菌バイアルなどの患者への投与に使用するために容器に移される。いくつかの実施形態では、治療的に十分な数のＴＩＬが上記の拡張方法を使用して得られると、それらは、患者への投与に使用するために容器に移される。

【０８５３】

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

【０８５４】

Ｖ．さらなるＧｅｎ２、Ｇｅｎ３、及び他のＴＩＬ製造プロセスの実施形態

Ａ．ＰＢＭＣフィーダー細胞比

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

【０８５５】

いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣフィーダー層の数は、以下のように計算される：

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

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

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

Ｄ．四次元空間で最適に活性化され得る細胞の数：４．８６×１０^{8}／２４＝２０．２５×１０^{6}

Ｅ．Ｇ－ＲＥＸ－５００に外挿されるフィーダー及びＴＩＬの数：ＴＩＬ：１００×１０^{6}及びフィーダー：２．５×１０^{9}

この計算では、１００ｃｍ^{2}の底部を有するシリンジ中でのＴＩＬの活性化のために二十面体形状を提供するのに必要な単核細胞の数の近似値が使用される。この計算は、Ｊｉｎ，ｅｔ．ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１２，３５，２８３－２９２に記載されているように、ＮＣＩ実験データを密接に反映するＴ細胞の閾値活性化について、約５

×１０^{8}の実験結果を導き出す。（Ｃ）では、乗数（０．６４）は、Ｊａｅｇｅｒ ａｎｄ Ｎａｇｅｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ，１９９２，２５５，１５２３－３によって計算された等価球のランダム充填密度である。（Ｄ）において、除数２４は、Ｍｕｓｉｎ，Ｒｕｓｓ．Ｍａｔｈ．Ｓｕｒｖ．，２００３，５８，７９４－７９５に記載される、四次元空間内の同様のオブジェクトと接触する可能性のある等価球の数または「ニュートン数」である。

【０８５６】

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

【０８５７】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）の数は、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数よりも多い。

【０８５８】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２０：１の範囲から選択される。

【０８５９】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択される。

【０８６０】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約９：１の範囲から選択される。

【０８６１】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約８：１の範囲から選択される。

【０８６２】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約７：１の範囲から選択される。

【０８６３】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約６：１の範囲から選択される。

【０８６４】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択される。

【０８６５】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択される。

【０８６６】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミン

グによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択される。

【０８６７】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択される。

【０８６８】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択される。

【０８６９】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択される。

【０８７０】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択される。

【０８７１】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択される。

【０８７２】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択される。

【０８７３】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択される。

【０８７４】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択される。

【０８７５】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択される。

【０８７６】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２：１の範囲から選択される。

【０８７７】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択される。

【０８７８】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択される。

【０８７９】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択される。
【０８８０】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択される。
【０８８１】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択される。
【０８８２】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択される。
【０８８３】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択される。
【０８８４】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択される。
【０８８５】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択される。
【０８８６】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択される。
【０８８７】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択される。
【０８８８】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択される。
【０８８９】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択される。
【０８９０】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１である。
【０８９１】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミン

グによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．１：１、２．２：１、２．３：１、２．４：１、２．５：１、２．６：１、２．７：１、２．８：１、２．９：１、３：１、３．１：１、３．２：１、３．３：１、３．４：１、３．５：１、３．６：１、３．７：１、３．８：１、３．９：１、４：１、４．１：１、４．２：１、４．３：１、４．４：１、４．５：１、４．６：１、４．７：１、４．８：１、４．９：１、または５：１である。

【０８９２】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約１×１０^{8}、１．１×１０^{8}、１．２×１０^{8}、１．３×１０^{8}、１．４×１０^{8}、１．５×１０^{8}、１．６×１０^{8}、１．７×１０^{8}、１．８×１０^{8}、１．９×１０^{8}、２×１０^{8}、２．１×１０^{8}、２．２×１０^{8}、２．３×１０^{8}、２．４×１０^{8}、２．５×１０^{8}、２．６×１０^{8}、２．７×１０^{8}、２．８×１０^{8}、２．９×１０^{8}、３×１０^{8}、３．１×１０^{8}、３．２×１０^{8}、３．３×１０^{8}、３．４×１０^{8}、または３．５×１０^{8}ＡＰＣであり、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約３．５×１０^{8}、３．６×１０^{8}、３．７×１０^{8}、３．８×１０^{8}、３．９×１０^{8}、４×１０^{8}、４．１×１０^{8}、４．２×１０^{8}、４．３×１０^{8}、４．４×１０^{8}、４．５×１０^{8}、４．６×１０^{8}、４．７×１０^{8}、４．８×１０^{8}、４．９×１０^{8}、５×１０^{8}、５．１×１０^{8}、５．２×１０^{8}、５．３×１０^{8}、５．４×１０^{8}、５．５×１０^{8}、５．６×１０^{8}、５．７×１０^{8}、５．８×１０^{8}、５．９×１０^{8}、６×１０^{8}、６．１×１０^{8}、６．２×１０^{8}、６．３×１０^{8}、６．４×１０^{8}、６．５×１０^{8}、６．６×１０^{8}、６．７×１０^{8}、６．８×１０^{8}、６．９×１０^{8}、７×１０^{8}、７．１×１０^{8}、７．２×１０^{8}、７．３×１０^{8}、７．４×１０^{8}、７．５×１０^{8}、７．６×１０^{8}、７．７×１０^{8}、７．８×１０^{8}、７．９×１０^{8}、８×１０^{8}、８．１×１０^{8}、８．２×１０^{8}、８．３×１０^{8}、８．４×１０^{8}、８．５×１０^{8}、８．６×１０^{8}、８．７×１０^{8}、８．８×１０^{8}、８．９×１０^{8}、９×１０^{8}、９．１×１０^{8}、９．２×１０^{8}、９．３×１０^{8}、９．４×１０^{8}、９．５×１０^{8}、９．６×１０^{8}、９．７×１０^{8}、９．８×１０^{8}、９．９×１０^{8}、または１×１０^{9}ＡＰＣである。

【０８９３】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約１．５×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約３×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約４×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約７．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択される。

【０８９４】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約２×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約２．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約４．５×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約５．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択される。

【０８９５】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約２．５×１０^{8}ＡＰＣであり、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約５×１０^{8}ＡＰＣである。

【０８９６】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に追加されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、プライミングによる第１の拡張の７日目（例えば、方法の７日目）に追加されるＰＢＭＣの数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、方法は、プライミングによる第１の拡張の０日目に抗原提示細胞を第１のＴＩＬ集団に追加することと、７日目に抗原提示細胞を第２のＴＩＬ集団に追加することとを含み、０日目に追加される抗原提示細胞の数は、プライミングによる第１の拡張の７日目（例えば

、方法の７日目）に追加される抗原提示細胞の数のおよそ５０％である。
【０８９７】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数よりも多い。
【０８９８】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【０８９９】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【０９００】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【０９０１】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。
【０９０２】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．０×１０^{6}、１．１×１０^{6}、１．２×１０^{6}、１．３×１０^{6}、１．４×１０^{6}、１．５×１０^{6}、１．６×１０^{6}、１．７×１０^{6}、１．８×１０^{6}、１．９×１０^{6}、２×１０^{6}、２．１×１０^{6}、２．２×１０^{6}、２．３×１０^{6}、２．４×１０^{6}、２．５×１０^{6}、２．６×１０^{6}、２．７×１０^{6}、２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}、３×１０^{6}、３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}、４×１０^{6}、４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}、または４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。
【０９０３】
他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【０９０４】
他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約６．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【０９０５】
他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【０９０６】
他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【０９０７】
他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．６×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．７×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}、３×１０^{6}、３．１×１０^{6}、３．

２×１０^{6}、３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}、４×１０^{6}、４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}、４．５×１０^{6}、４．６×１０^{6}、４．７×１０^{6}、４．８×１０^{6}、４．９×１０^{6}、５×１０^{6}、５．１×１０^{6}、５．２×１０^{6}、５．３×１０^{6}、５．４×１０^{6}、５．５×１０^{6}、５．６×１０^{6}、５．７×１０^{6}、５．８×１０^{6}、５．９×１０^{6}、６×１０^{6}、６．１×１０^{6}、６．２×１０^{6}、６．３×１０^{6}、６．４×１０^{6}、６．５×１０^{6}、６．６×１０^{6}、６．７×１０^{6}、６．８×１０^{6}、６．９×１０^{6}、７×１０^{6}、７．１×１０^{6}、７．２×１０^{6}、７．３×１０^{6}、７．４×１０^{6}、または７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【０９０８】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．０×１０^{6}、１．１×１０^{6}、１．２×１０^{6}、１．３×１０^{6}、１．４×１０^{6}、１．５×１０^{6}、１．６×１０^{6}、１．７×１０^{6}、１．８×１０^{6}、１．９×１０^{6}、２×１０^{6}、２．１×１０^{6}、２．２×１０^{6}、２．３×１０^{6}、２．４×１０^{6}、２．５×１０^{6}、２．６×１０^{6}、２．７×１０^{6}、２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}、３×１０^{6}、３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}、４×１０^{6}、４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}、または４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．６×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．７×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}、３×１０^{6}、３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}、４×１０^{6}、４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}、４．５×１０^{6}、４．６×１０^{6}、４．７×１０^{6}、４．８×１０^{6}、４．９×１０^{6}、５×１０^{6}、５．１×１０^{6}、５．２×１０^{6}、５．３×１０^{6}、５．４×１０^{6}、５．５×１０^{6}、５．６×１０^{6}、５．７×１０^{6}、５．８×１０^{6}、５．９×１０^{6}、６×１０^{6}、６．１×１０^{6}、６．２×１０^{6}、６．３×１０^{6}、６．４×１０^{6}、６．５×１０^{6}、６．６×１０^{6}、６．７×１０^{6}、６．８×１０^{6}、６．９×１０^{6}、７×１０^{6}、７．１×１０^{6}、７．２×１０^{6}、７．３×１０^{6}、７．４×１０^{6}、または７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【０９０９】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【０９１０】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約６×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【０９１１】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ

^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約４×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【０９１２】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約４×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。

【０９１３】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２０：１の範囲から選択される。

【０９１４】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択される。

【０９１５】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約９：１の範囲から選択される。

【０９１６】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約８：１の範囲から選択される。

【０９１７】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約７：１の範囲から選択される。

【０９１８】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約６：１の範囲から選択される。

【０９１９】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択される。

【０９２０】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択される。

【０９２１】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例え

ば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択される。

【０９２２】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択される。

【０９２３】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択される。

【０９２４】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択される。

【０９２５】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択される。

【０９２６】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択される。

【０９２７】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択される。

【０９２８】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択される。

【０９２９】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択される。

【０９３０】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択される。

【０９３１】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例え

ば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２：１の範囲から選択される。

【０９３２】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択される。

【０９３３】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択される。

【０９３４】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択される。

【０９３５】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択される。

【０９３６】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択される。

【０９３７】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択される。

【０９３８】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択される。

【０９３９】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択される。

【０９４０】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択される。

【０９４１】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、

ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択される。

【０９４２】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択される。

【０９４３】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数のプライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択される。

【０９４４】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択される。

【０９４５】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１である。

【０９４６】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数のプライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．１：１、２．２：１、２．３：１、２．４：１、２．５：１、２．６：１、２．７：１、２．８：１、２．９：１、３：１、３．１：１、３．２：１、３．３：１、３．４：１、３．５：１、３．６：１、３．７：１、３．８：１、３．９：１、４：１、４．１：１、４．２：１、４．３：１、４．４：１、４．５：１、４．６：１、４．７：１、４．８：１、４．９：１、または５：１である。

【０９４７】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約1×10^{8}、1.1×10^{8}、1.2×10^{8}、1.3×10^{8}、1.4×10^{8}、1.5×10^{8}、1.6×10^{8}、1.7×10^{8}、1.8×10^{8}、1.9×10^{8}、2×10^{8}、2.1×10^{8}、2.2×10^{8}、2.3×10^{8}、2.4×10^{8}、2.5×10^{8}、2.6×10^{8}、2.7×10^{8}、2.8×10^{8}、2.9×10^{8}、3×10^{8}、3.1×10^{8}、3.2×10^{8}、3.3×10^{8}、3.4×10^{8}、または3.5×10^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）であり、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約3.5×10^{8}、3.6×10^{8}、3.7×10^{8}、3.8×10^{8}、3.9×10^{8}、4×10^{8}、4.1×10^{8}、4.2×10^{8}、4.3×10^{8}、4.4×10^{8}、4.5×10^{8}、4.6×10^{8}、4.7×10^{8}、4.8×10^{8}、4.9×10^{8}、5×10^{8}、5.1×10^{8}、5.2×10^{8}、5.3×10^{8}、5.4×10^{8}、5.5×10^{8}、5.6×10^{8}、5.7×10^{8}、5.8×10^{8}、5.9×10^{8}、6×10^{8}、6.1×10^{8}、6.2×10^{8}、6.3×10^{8}、6.4×10^{8}、6.5×10^{8}、6.6×10^{8}、6.7×10^{8}、6.8×10^{8}、6.9×10^{8}、7×10^{8}、7.1×10^{8}、7.2×10^{8}、7.3×10^{8}、7.4×10^{8}、7.5×10^{8}、7.6×10^{8}、7.7×10^{8}、7.8×10

^{8}、７．９×１０^{8}、８×１０^{8}、８．１×１０^{8}、８．２×１０^{8}、８．３×１０^{8}、８．４×１０^{8}、８．５×１０^{8}、８．６×１０^{8}、８．７×１０^{8}、８．８×１０^{8}、８．９×１０^{8}、９×１０^{8}、９．１×１０^{8}、９．２×１０^{8}、９．３×１０^{8}、９．４×１０^{8}、９．５×１０^{8}、９．６×１０^{8}、９．７×１０^{8}、９．８×１０^{8}、９．９×１０^{8}、または１ｘ１０^{9}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）である。

【０９４８】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約１×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～正確にまたは約３．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択され、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約３．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～正確にまたは約１×１０^{9}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択される。

【０９４９】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約１．５×１０^{8}ＡＰＣ～約３×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択され、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、約４×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～約７．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択される。

【０９５０】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約２×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～正確にまたは約２．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択され、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約４．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～正確にまたは約５．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択される。

【０９５１】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約２．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）であり、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）である。

【０９５２】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に追加されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数は、急速な第２の拡張の７日目に追加されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、方法は、プライミングによる第１の拡張の０日目に抗原提示細胞層を第１のＴＩＬ集団に追加することと、７日目に抗原提示細胞を第２のＴＩＬ集団に追加することとを含み、０日目に追加される抗原提示細胞層の数は、７日目に追加される抗原提示細胞層の数のおよそ５０％である。

【０９５３】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数は、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数よりも多い。

【０９５４】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約４細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【０９５５】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第３の拡張の７日目は、正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。
【０９５６】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１．５細胞層～正確にまたは約２．５細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。
【０９５７】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。
【０９５８】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６、３．７、３．８、３．９、４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。
【０９５９】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１細胞層～正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３細胞層～正確にまたは約１０細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。
【０９６０】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約２細胞層～正確にまたは約３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。
【０９６１】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。
【０９６２】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１、２、または３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【０９６３】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：１０の範囲から選択される。
【０９６４】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：８の範囲から選択される。
【０９６５】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：７の範囲から選択される。
【０９６６】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：６の範囲から選択される。
【０９６７】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：５の範囲から選択される。
【０９６８】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：４の範囲から選択される。
【０９６９】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢ

ＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：３の範囲から選択される。

【０９７０】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：２の範囲から選択される。

【０９７１】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．２～正確にまたは約１：８の範囲から選択される。

【０９７２】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．３～正確にまたは約１：７の範囲から選択される。

【０９７３】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．４～正確にまたは約１：６の範囲から選択される。

【０９７４】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．５～正確にまたは約１：５の範囲から選択される。

【０９７５】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭ

Ｃを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．６～正確にまたは約１：４の範囲から選択される。

【０９７６】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．７～正確にまたは約１：３．５の範囲から選択される。

【０９７７】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．８～正確にまたは約１：３の範囲から選択される。

【０９７８】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．９～正確にまたは約１：２．５の範囲から選択される。

【０９７９】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：２である。

【０９８０】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第１のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数の第２のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数に対する比は、約１：１．１、１：１．２、１：１．３、１：１．４、１：１．５、１：１．６、１：１．７、１：１．８、１：１．９、１：２、１：２．１、１：２．２、１：２．３、１：２．４、１：２．５、１：２．６、１：２．７、１：２．８、１：２．９、１：３、１：３．１、１：３．２、１：３．３、１：３．４、１：３．５、１：３．６、１：３．７、１：３．８、１：３．９、１：４、１：４．１、１：４．２、１：４．３、１：４．４、１：４．５、１：４．６、１：４．７、１：４．８、１：４．９、１：５、１：５．１、１：５．２、１：５．３、１：５．４、１：５．５、１：５．６、１：５．７、１：５．８、１：５．９、１：６、１：６

．１、１：６．２、１：６．３、１：６．４、１：６．５、１：６．６、１：６．７、１：６．８、１：６．９、１：７、１：７．１、１：７．２、１：７．３、１：７．４、１：７．５、１：７．６、１：７．７、１：７．８、１：７．９、１：８、１：８．１、１：８．２、１：８．３、１：８．４、１：８．５、１：８．６、１：８．７、１：８．８、１：８．９、１：９、１：９．１、１：９．２、１：９．３、１：９．４、１：９．５、１：９．６、１：９．７、１：９．８、１：９．９、または１：１０から選択される。

【０９８１】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張におけるＡＰＣの数は、約１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択され、急速な第２の拡張におけるＡＰＣの数は、約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される。

【０９８２】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張におけるＡＰＣの数は、約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択され、急速な第２の拡張におけるＡＰＣの数は、約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約６．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される。

【０９８３】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張におけるＡＰＣの数は、約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約３．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択され、急速な第２の拡張におけるＡＰＣの数は、約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される。

【０９８４】

Ａ．任意選択の細胞培地成分

１．抗ＣＤ３抗体

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用される培養培地（例えば、図１及び８（特に、例えば、図８Ｂ）を参照）は、抗ＣＤ３抗体を含む。ＩＬ－２と組み合わせた抗ＣＤ３抗体は、ＴＩＬ集団におけるＴ細胞活性化及び細胞分裂を誘導する。この効果は、全長抗体、ならびにＦａｂ及びＦ（ａｂ′）２断片で見ることができ、前者が一般に好まれ、例えば、Ｔｓｏｕｋａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９８５，１３５，１７１９（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【０９８５】

当業者によって理解されるように、マウス、ヒト、霊長類、ラット、及びイヌ抗体を含むが、これらに限定されない、様々な哺乳動物由来の抗ヒトＣＤ３ポリクローナル及びモノクローナル抗体を含む、本発明での使用が見出されるいくつかの好適な抗ヒトＣＤ３抗体が存在する。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体ムロモナブであるＯＫＴ３が使用される（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ，Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪまたはＭｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡから市販されている）。表１を参照されたい。

【０９８６】

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

【０９８７】

２．４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）アゴニスト

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張及び／または急速な第２の拡張の細胞培養培地は、ＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）アゴニストである。４－１ＢＢアゴニストは、当該技術分野で知られている任意の４－１ＢＢ結合分子であり得る。４－１ＢＢ結

合分子は、ヒトまたは哺乳動物４－１ＢＢに結合することができるモノクローナル抗体または融合タンパク質であり得る。４－１ＢＢアゴニストまたは４－１ＢＢ結合分子は、任意のアイソタイプ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、及びＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、及びＩｇＡ２）、またはサブクラスの免疫グロブリン分子の免疫グロブリン重鎖を含み得る。４－１ＢＢアゴニストまたは４－１ＢＢ結合分子は、重鎖及び軽鎖の両方を有し得る。本明細書で使用される場合、結合分子という用語は、抗体（全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、及び抗体断片、例えば、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ′）断片、Ｆａｂ発現ライブラリーによって産生された断片、上記のうちのいずれかのエピトープ結合断片、ならびに４－１ＢＢに結合する抗体の操作された形態、例えば、ｓｃＦｖ分子も含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、完全ヒト抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ヒト化抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法及び組成物に使用するための４－１ＢＢアゴニストには、抗４－１ＢＢ抗体、ヒト抗４－１ＢＢ抗体、マウス抗４－１ＢＢ抗体、哺乳動物抗４－１ＢＢ抗体、モノクローナル抗４－１ＢＢ抗体、ポリクローナル抗４－１ＢＢ抗体、キメラ抗４－１ＢＢ抗体、抗４－１ＢＢアドネクチン、抗４－１ＢＢドメイン抗体、一本鎖抗４－１ＢＢ断片、重鎖抗４－１ＢＢ断片、軽鎖抗４－１ＢＢ断片、抗４－１ＢＢ融合タンパク質、及びそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、またはバイオシミラーが含まれる。アゴニスト抗４－１ＢＢ抗体は、強力な免疫応答を誘導することが知られている。Ｌｅｅ，ｅｔ ａｌ．，ＰＬＯＳ Ｏｎｅ ２０１３，８，ｅ６９６７７。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、アゴニスト、抗４－１ＢＢヒト化、または完全ヒトモノクローナル抗体（すなわち、単一の細胞株に由来する抗体）である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＥＵ－１０１（Ｅｕｔｉｌｅｘ Ｃｏ．Ｌｔｄ．）、ウトミルマブ、もしくはウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブもしくはウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。

【０９８８】

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

【０９８９】

アゴニスト４－１ＢＢ抗体及び融合タンパク質は、強い免疫応答を誘導することが知られている。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、毒性を低減するのに十分な様式で４－１ＢＢ抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、抗体依存性細胞毒性（ｃｅｌｌｕｌａｒ ｔｏｘｉｃｉｔｙ）（ＡＤＣＣ）、例えば、ＮＫ細胞細胞傷害性（ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ）を抑制するアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）を抑制するアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、補体依存性細胞傷害性（

ＣＤＣ）を抑制するアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、Ｆｃ領域機能性を抑制するアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。

【０９９０】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、高い親和性及びアゴニスト活性でヒト４－１ＢＢ（配列番号４０）に結合することを特徴とする。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ヒト４－１ＢＢに結合する結合分子である（配列番号４０）。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、マウス４－１ＢＢに結合する結合分子である（配列番号４１）。４－１ＢＢアゴニストまたは結合分子が結合する４－１ＢＢ抗原のアミノ酸配列を表５に要約する。

【０９９１】

【表５】

表５．４－１ＢＢ抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号40 ヒト4-1BB、 腫瘍壊死因子受容体 スーパーファミリー、 メンバー9 (ホモサピエンス)	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG CSCRFPEEEE GGCEL	60 120 180 240 255
配列番号41 マウス4-1BB、 腫瘍壊死因子受容体 スーパーファミリー、 メンバー9 (ハツカネズミ)	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG GHSLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKTT GAAQEEDACS CRCPQEEEGG GGGYEL	60 120 180 240 256

【０９９２】

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

【０９９３】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約７．５×10^5ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約７．５×10^5ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８×10^5ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８．５×10^5ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９×10^5ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９．５×10^5ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１×10^6ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０９９４】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．１×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．２×10^{-5}ｌ／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトも

しくはマウス４－１ＢＢに約２．３×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．４×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．５×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．６×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．７×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．８×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．９×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約３×１０$^{-5}$ｌ／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０９９５】

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

【０９９６】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＰＦ－０５０８２５６６もしくはＭＯＲ－７４８０としても知られるウトミルマブ、またはその断片、誘導体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。ウトミルマブは、Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．から入手可能である。ウトミルマブは、免疫グロブリンＧ２－ガンマ、抗［ホモサピエンスＴＮＦＲＳＦ９（腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーメンバー９、４－１ＢＢ、Ｔ細胞抗原ＩＬＡ、ＣＤ１３７）］、ホモサピエンス（完全ヒト）モノクローナル抗体である。ウトミルマブのアミノ酸配列を表６に示す。ウトミルマブは、Ａｓｎ５９及びＡｓｎ２９２にグリコシル化部位、２２－９６位（V_H－V_L）、１４３－１９９位（C_H1－C_L）、２５６－３１６位（C_H2）、及び３６２－４２０位（C_H3）に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、２２′－８７′位（V_H－V_L）及び１３６′－１９５′位（C_H1－C_L）に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、ＩｇＧ２Ａアイソフォーム２１８－２１８、２１９－２１９、２２２－２２２、及び２２５－２２５位、ＩｇＧ２Ａ／Ｂアイソフォーム２１８－１３０、２１９－２１９、２２２－２２２、及び２２５－２２５位、ならびにＩｇＧ２Ｂアイソフォーム２１９－１３０（２）、２２２－２２２、及び２２５－２２５位に鎖間重鎖－重鎖ジスルフィド架橋、ならびにＩｇＧ２Ａアイソフォーム１３０－２１３′（２）位、ＩｇＧ２Ａ／Ｂアイソフォーム２１８－２１３′位、及び１３０－２１３′位、ならびにＩｇＧ２ＢアイソフォームＩｇＧ２Ｂアイソフォーム２１８－２１３′（２）位に鎖間重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウトミルマブならびにそのバリアント及び断片の調製及び特性は、米国特許第８，８２１，８６７号、同第８，３３７，８５０号、及び同第９，４６８，６７８号、ならびに国際特許出願公開第ＷＯ２０１２／０３２４３３Ａ１（これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。ウトミルマブの前臨床特徴は、Ｆｉｓｈｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇ．＆Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１２，６１，１７２１－３３に記載されている。様々な血液学的及び固形腫瘍適応症におけるウトミルマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所のｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０２４４４７９３、ＮＣＴ０１３０７２６７、ＮＣＴ０２３１５０６６、及びＮＣＴ０２５５４８１２が含まれる。

【０９９７】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、配列番号４２によって示される重鎖及び配列番号４３によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢ

アゴニストは、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【０９９８】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号４４に示される配列を含み、４－１ＢＢアゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号４５に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖ抗体を含む。

【０９９９】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号４６、配列番号４７、及び配列番号４８に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号４９、配列番号５０、及び配列番号５１に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１０００】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブに関して薬物規制当局によって承認された４－１ＢＢアゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含む４－１ＢＢ抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出された４－１ＢＢアゴニスト抗体であり、４－１ＢＢアゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。４－１ＢＢアゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧

州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。

【１００１】

【表６】

表６．ウトミルマブに関連する４－１ＢＢアゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 42 ウトミルマブの重鎖	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTNY SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G	60 120 180 240 300 360 420 441
配列番号 43 ウトミルマブの軽鎖	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS	60 120 180 214
配列番号 44 ウトミルマブの 重鎖可変領域	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
配列番号 45 ウトミルマブの 軽鎖可変領域	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL	60 108
配列番号 46 ウトミルマブの 重鎖 CDR1	STYWIS	6
配列番号 47 ウトミルマブの 重鎖 CDR2	KIYPGDSYTN YSPSFQG	17
配列番号 48 ウトミルマブの 重鎖 CDR3	RGYGIFDY	8
配列番号 49 ウトミルマブの 軽鎖 CDR1	SGDNIGDQYA H	11
配列番号 50 ウトミルマブの 軽鎖 CDR2	QDKNRPS	7
配列番号 51 ウトミルマブの 軽鎖 CDR3	ATYTGFGSLA V	11

【１００２】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＢＭＳ－６６３５１３及び２０Ｈ４．９．ｈ４ａとしても知られるモノクローナル抗体ウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。ウレルマブは、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ，Ｉｎｃ．及びＣｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｉｎｃ．から入手可能である。ウレルマブは、免疫グロブリンＧ４－カッパ、抗［ホモサピエンスＴＮＦＲＳＦ９（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー９、４－１ＢＢ、Ｔ細胞抗原ＩＬＡ、ＣＤ１３７）］、ホモサピエンス（完全ヒト）モノクローナル抗体である。ウレルマブのアミノ酸配列を表７に示す。ウレルマブは、２９８位（及び２９８’’）にＮ－グリコシル化部位、２２－９５位（V_H－V_L）、１４８－２０４位（C_H1－C_L）、２６２－３２２位（C_H2）、及び３６８－４２６位（C_H3）（２２’’－９５’’、１４８’’－２０４’’、２６２’’－３２２’’、及び３６８’’－４２６’’

位）に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、２３′－８８′位（V_H－V_L）及び１３６′－１９６′位（C_H1－C_L）（２３′′′－８８′′′及び１３６′′′－１９６′′′位）に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、２２７－２２７′′位及び２３０－２３０′′位に鎖間重鎖－重鎖ジスルフィド架橋ならびに１３５－２１６′及び１３５′′－２１６′′′に鎖間重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウレルマブならびにそのバリアント及び断片の調製及び特性は、米国特許第７，２８８，６３８号及び同第８，９６２，８０４号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ウレルマブの前臨床及び臨床特徴は、Ｓｅｇａｌ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１６に記載されており、ｈｔｔｐ：／ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１５８／１０７８－０４３２．ＣＣＲ－１６－１２７２で入手可能である。様々な血液学的及び固形腫瘍適応症におけるウレルマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所のｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０１７７５６３１、ＮＣＴ０２１１００８２、ＮＣＴ０２２５３９９２、及びＮＣＴ０１４７１２１０が含まれる。

【１００３】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、配列番号５２によって示される重鎖及び配列番号５３によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１００４】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号５４に示される配列を含み、４－１ＢＢアゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号５５に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖ抗体を含む。

【１００５】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号５６、配列番号５７、及び配列番号５８に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３

ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号５９、配列番号６０、及び配列番号６１に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１００６】

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

【１００７】

【表７】

表７．ウレルマブに関連する４－１ＢＢアゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 52 ウレルマブの 重鎖	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN PSLESRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 448
配列番号 53 ウレルマブの 軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC	60 120 180 216
配列番号 54 ウレルマブの 可変重鎖	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP	60 120
配列番号 55 ウレルマブの 可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ	60 110
配列番号 56 ウレルマブの 重鎖 CDR1	GYYWS	5
配列番号 57 ウレルマブの 重鎖 CDR2	EINHGGYVTY NPSLES	16
配列番号 58 ウレルマブの 重鎖 CDR3	DYGPGNYDWY FDL	13
配列番号 59 ウレルマブの 軽鎖 CDR1	RASQSVSSYL A	11
配列番号 60 ウレルマブの 軽鎖 CDR2	DASNRAT	7
配列番号 61 ウレルマブの 軽鎖 CDR3	QQRSDWPPAL T	11

【１００８】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、１Ｄ８、３Ｅｌｏｒ、４Ｂ４（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　３０９８０９）、Ｈ４－１ＢＢ－Ｍ１２７（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ　５５２５３２）、ＢＢＫ２（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　ＭＳ６２１ＰＡＢＸ）、１４５５０１（Ｌｅｉｎｃｏ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｂ５９１）、ＡＴＣＣ番号ＨＢ－１１２４８として寄託された細胞株によって産生され、米国特許第６，９７４，８６３号に開示される抗体、５Ｆ４（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　３１　１５０３）、Ｃ６５－４８５（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ　５５９４４６）、米国特許出願公開第ＵＳ２００５／００９５２４４号に開示される抗体、米国特許第７，２８８，６３８号に開示される抗体（例えば、２０Ｈ４．９－ＩｇＧｌ（ＢＭＳ－６６３０３１））、米国特許第６，８８７，６７３号に開示される抗体（例えば、４Ｅ９もしくはＢＭＳ－５５４２７１）、米国特許第７，２１４，４９３号に開示される抗体、米国特許第６，３０３，１２１号に開示される抗体、米国特許第６，５６９，９９７号に開示される抗体、米国特許第６，９０５，６８５号に開示される抗体（例えば、４Ｅ９もしくはＢＭＳ－５５４２７１）、米国特許第６，３６２，３２５号に開示される抗体（例えば、１Ｄ８もしくはＢＭＳ－４６９４９２、３Ｈ３もしくはＢＭＳ－４６９４９７、または３Ｅｌ）、米国特許第６，９７４，８６３号に開示される抗体（例えば、５３Ａ２）、米国特許第６，２１０，６６９号に開示される抗体（例えば、１Ｄ８、３Ｂ８、もしくは３Ｅｌ）、米国特許第５，９２８，８９３号に開示される抗体、米国特許第６，３０３，１２１号に開示される抗体、米国特許第６，５６９，９９７号に開示される抗体、国際特許出願公開第ＷＯ２０１２／１７７

８８号、同第ＷＯ２０１５／１１９９２３号、及び同第ＷＯ２０１０／０４２４３３号に開示される抗体、ならびにそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、またはバイオシミラーからなる群から選択され、前述の特許または特許出願公開の各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【１００９】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、国際特許出願公開第ＷＯ２００８／０２５５１６Ａ１号、同第ＷＯ２００９／００７１２０Ａ１号、同第ＷＯ２０１０／０３７６６Ａ１号、同第ＷＯ２０１０／０１００５１Ａ１号、及び同第ＷＯ２０１０／０７８９６６Ａ１号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１１／００２７２１８Ａ１号、同第ＵＳ２０１５／０１２６７０９Ａ１号、同第ＵＳ２０１１／０１１１４９４Ａ１号、同第ＵＳ２０１５／０１１０７３４Ａ１号、及び同第ＵＳ２０１５／０１２６７１０Ａ１号、ならびに米国特許第９，３５９，４２０号、同第９，３４０，５９９号、同第８，９２１，５１９号、及び同第８，４５０，４６０号に記載される４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質であり、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１０１０】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、構造Ｉ－Ａ（Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）もしくは構造Ｉ－Ｂ（Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）に示されるような４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質、またはそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、バリアント、もしくはバイオシミラーである（図１８を参照）。構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂにおいて、円筒は、個々のポリペプチド結合ドメインを指す。構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂは、例えば、４－１ＢＢＬ（４－１ＢＢリガンド、ＣＤ１３７リガンド（ＣＤ１３７Ｌ）、もしくは腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー９（ＴＮＦＳＦ９））または４－１ＢＢに結合する抗体に由来する３つの直線的に連結されたＴＮＦＲＳＦ結合ドメインを含み、これらが折り重なって三価タンパク質を形成し、その後、これがＩｇＧ１－Ｆｃ（C_H3及びC_H2ドメインを含む）によって第２の三価タンパク質に連結され、その後、これを使用して、三価タンパク質のうちの２つをジスルフィド結合（小さく長細い楕円）によって一緒に連結し、構造を安定化し、６つの受容体及びシグナル伝達タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを一緒にして、シグナル伝達複合体を形成することができるアゴニストを提供する。円筒として示されるＴＮＦＲＳＦ結合ドメインは、例えば、親水性残基及び柔軟性のためのＧｌｙ及びＳｅｒ配列、ならびに溶解性のためのＧｌｕ及びＬｙｓを含み得るリンカーによって結合されたV_H鎖及びV_L鎖を含む、ｓｃＦｖドメインであり得る。ｄｅ Ｍａｒｃｏ，Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ｃｅｌｌ Ｆａｃｔｏｒｉｅｓ，２０１１，１０，４４、Ａｈｍａｄ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．＆Ｄｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２，９８０２５０、Ｍｏｎｎｉｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，２０１３，２，１９３－２０８、または本明細書の他の場所に組み込まれている参照文献に記載されるものなどの任意のｓｃＦｖドメイン設計が使用され得る。この形態の融合タンパク質構造は、米国特許第９，３５９，４２０号、同第９，３４０，５９９号、同第８，９２１，５１９号、及び同第８，４５０，４６０号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１０１１】

図１８に示される構造Ｉ－Ａの他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表８に見出される。Ｆｃドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン（配列番号６２のアミノ酸１７～２３０）、完全なヒンジドメイン（配列番号６２のアミノ酸１～１６）、またはヒンジドメインの一部（例えば、配列番号６２のアミノ酸４～１６）を含む。Ｃ末端Ｆｃ抗体を結合するための好ましいリンカーは、追加のポリペプチドの融合に好適なリンカーを含む、配列番号６３～配列番号７２に示される実施形態から選択され得る。

【１０１２】

【表８】

表８．Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンタンパク質設計（構造Ｉ－Ａ）を有する、４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質を含む、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 62 Fc ドメイン	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 230
配列番号 63 リンカー	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
配列番号 64 リンカー	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
配列番号 65 リンカー	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
配列番号 66 リンカー	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
配列番号 67 リンカー	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
配列番号 68 リンカー	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
配列番号 69 リンカー	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE	24
配列番号 70 リンカー	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE	23
配列番号 71 リンカー	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E	21
配列番号 72 リンカー	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE	25

【１０１３】

図１８に示される構造Ｉ－Ｂの他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表９に見出される。Ｆｃ抗体断片が構造Ｉ－ＢにあるようなＴＮＲＦＳＦ融合タンパク質のＮ末端に融合される場合、Ｆｃモジュールの配列は、好ましくは、配列番号７３に示されるものであり、リンカー配列は、好ましくは、配列番号７４～配列番号７６に示される実施形態から選択される。

【１０１４】

【表９】

表９．Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質設計（構造Ｉ－Ｂ）を有する、４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質を含む、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 73 Fc ドメイン	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	60 120 180 240 246
配列番号 74 リンカー	SGSGSGSGSG S	11
配列番号 75 リンカー	SSSSSSGSGS GS	12
配列番号 76 リンカー	SSSSSSGSGS GSGSGS	16

【１０１５】

いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、ウトミルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、ウレルマブの可変重鎖及び可変軽鎖

、ウトミルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、表１０に記載の可変重鎖及び可変軽鎖から選択される可変重鎖及び可変軽鎖、前述の可変重鎖及び可変軽鎖の任意の組み合わせ、ならびにそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、及びバイオシミラーからなる群から選択される１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。

【１０１６】

いくつかの複合体実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、４－１ＢＢＬ配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、配列番号７７による配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、可溶性４－１ＢＢＬ配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、配列番号７８による配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。

【１０１７】

いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインはリンカーによって結合されている。いくつか実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、各々が、表１０に示されるV_H配列及びV_L配列と少なくとも９５％同一であるV_H配列及びV_L配列を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインはリンカーによって結合されている。

【１０１８】

【表１０】

表１０．融合タンパク質における４－１ＢＢ結合ドメインとしてまたは
ｓｃＦｖ　４－１ＢＢアゴニスト抗体として有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 77 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE	60 120 180 240 254
配列番号 78 4-1BBL 可溶性 ドメイン	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE	60 120 168
配列番号 79 4B4-1-1 バージョン１の 可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS	60 118
配列番号 80 4B4-1-1 バージョン１の 可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号 81 4B4-1-1 バージョン２の 可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA	60 119
配列番号 82 4B4-1-1 バージョン２の 可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR	60 108
配列番号 83 H39E3-2 の 可変重鎖	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT	60 120
配列番号 84 H39E3-2 の 可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA	60 110

【１０１９】

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

【１０２０】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、（ｉ）第１の可溶性腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）スーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインを含む４－１ＢＢアゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインは各々、茎領域を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは独立して、３～８アミノ酸長であり、各ＴＮＦスーパーファミリーサイトカイン

ドメインは、４－１ＢＢ結合ドメインである。
【１０２１】
いくつか実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、前述のV_Lドメインのうちのいずれかに連結された前述のV_Hドメインのうちのいずれかを含む４－１ＢＢアゴニストｓｃＦｖ抗体である。
【１０２２】
いくつか実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＢＰＳ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）から市販されているＢＰＳ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ ４－１ＢＢアゴニスト抗体カタログ番号７９０９７－２である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、Ｃｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ（Ｓｈｉｒｌｅｙ，ＮＹ，ＵＳＡ）から市販されているＣｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ ４－１ＢＢアゴニスト抗体カタログ番号ＭＯＭ－１８１７９である。
【１０２３】
３．ＯＸ４０（ＣＤ１３４）アゴニスト
いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、ＯＸ４０（ＣＤ１３４）アゴニストである。ＯＸ４０アゴニストは、当該技術分野で知られている任意のＯＸ４０結合分子であり得る。ＯＸ４０結合分子は、ヒトまたは哺乳動物ＯＸ４０に結合することができるモノクローナル抗体または融合タンパク質であり得る。ＯＸ４０アゴニストまたはＯＸ４０結合分子は、任意のアイソタイプ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、及びＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、及びＩｇＡ２）、またはサブクラスの免疫グロブリン分子の免疫グロブリン重鎖を含み得る。ＯＸ４０アゴニストまたはＯＸ４０結合分子は、重鎖及び軽鎖の両方を有し得る。本明細書で使用される場合、結合分子という用語は、抗体（全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、及び抗体断片、例えば、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ′）断片、Ｆａｂ発現ライブラリーによって産生された断片、上記のうちのいずれかのエピトープ結合断片、ならびにＯＸ４０に結合する抗体の操作された形態、例えば、ｓｃＦｖ分子も含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、完全ヒト抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ヒト化抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法及び組成物に使用するためのＯＸ４０アゴニストには、抗ＯＸ４０抗体、ヒト抗ＯＸ４０抗体、マウス抗ＯＸ４０抗体、哺乳動物抗ＯＸ４０抗体、モノクローナル抗ＯＸ４０抗体、ポリクローナル抗ＯＸ４０抗体、キメラ抗ＯＸ４０抗体、抗ＯＸ４０アドネクチン、抗ＯＸ４０ドメイン抗体、一本鎖抗ＯＸ４０断片、重鎖抗ＯＸ４０断片、軽鎖抗ＯＸ４０断片、抗ＯＸ４０融合タンパク質、及びそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、またはバイオシミラーが含まれる。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、アゴニスト、抗ＯＸ４０ヒト化、または完全ヒトモノクローナル抗体（すなわち、単一の細胞株に由来する抗体）である。
【１０２４】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストまたはＯＸ４０結合分子は、融合タンパク質である場合もある。ＯＸ４０Ｌに融合されたＦｃドメインを含むＯＸ４０融合タンパク質は、例えば、Ｓａｄｕｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００９，１８２，１４８１－８９に記載されている。いくつかの実施形態では、三量体または六量体ＯＸ４０アゴニスト（３つまたは６つのリガンド結合ドメインを有する）などの多量体ＯＸ４０アゴニストは、典型的に２つのリガンド結合ドメインを有するアゴニストモノクローナル抗体と比較して、優れた受容体（ＯＸ４０Ｌ）クラスター化及び内部細胞シグナル伝達複合体形成を誘導し得る。３つのＴＮＦＲＳＦ結合ドメイン及びＩｇＧ１－Ｆｃを含み、かつ任意選択でこれらの融合タンパク質のうちの２つ以上をさらに結合する三量体（三価）または六量体（もしくは六価）またはそれ以上の融合タンパク質は、例えば、Ｇｉｅｆｆｅｒｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ２０

１３，１２，２７３５－４７に記載されている。

【１０２５】

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

【１０２６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、高い親和性及びアゴニスト活性でヒトＯＸ４０（配列番号８５）に結合することを特徴とする。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ヒトＯＸ４０に結合する結合分子である（配列番号８５）。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、マウスＯＸ４０に結合する結合分子である（配列番号８６）。ＯＸ４０アゴニストまたは結合分子が結合するＯＸ４０抗原のアミノ酸配列を表１１に要約する。

【１０２７】

【表１１】

表１１．ＯＸ４０抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号85 ヒトOX40 (ホモサピエンス)	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ 60 NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK 120 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ 180 GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL 240 RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI 277
配列番号86 マウスOX40 (ハツカネズミ)	MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC 60 HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG 120 VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP 180 TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW 240 RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI 272

【１０２８】

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

【１０２９】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７．５×10^5ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７．５×10^5ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８×10^5ｌ／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトも

しくはマウスＯＸ４０に約８．５×１０^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９×１０^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９．５×１０^{5}ｌ／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$で結合する、またはヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１×１０^{6}ｌ／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$で結合するＯＸ４０アゴニストを含む。

【１０３０】

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

【１０３１】

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

【１０３２】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＭＥＤＩ０５６２またはＭＥＤＩ－０５６２としても知られるタボリキシズマブである。タボリキシズマブは、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ，Ｉｎｃ．の子会社であるＭｅｄＩｍｍｕｎｅから入手可能である。タボリキシズマブは、免疫グロブリンＧ１－カッパ、抗［ホモサピエンスＴＮＦＲＳＦ４（腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーメンバー４、ＯＸ４０、ＣＤ１３４）］、ヒト化及びキメラモノクローナル抗体である。タボリキシズマブのアミノ酸配列を表１２に示す。タボリキシズマブは、３０１及び３０１’’位にＮ－グリコシル化部位（フコシル化複合二分岐ＣＨＯ型グリカンを有する）、２２－９５位（Ｖ$_{H}$－Ｖ$_{L}$）、１４８－２０４位（Ｃ$_{H}$１－Ｃ$_{L}$）、２６５－３２５位（Ｃ$_{H}$２）、及び３７１－４２９位（Ｃ$_{H}$３）（及び２２’’－９５’’、１４８’’－２０４’’、２６５’’－３２５’’、及び３７１’’－４２９’’位）に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、２３’－８８’位（Ｖ$_{H}$－Ｖ$_{L}$）及び１３４’－１９４’位（Ｃ$_{H}$１－Ｃ$_{L}$）（及び２３’’’－８８’’’及び１３４’’’－１９４’’’位）に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、２３０－２３０”及び２３３－２３３”位に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、ならびに２２４－２１４’及び２２４’’－２１４’’’に鎖間重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。様々な固形腫瘍適応症におけるタボリキシズマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所のｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０２３１８３９４及びＮＣＴ０２７０５４８２が含まれる。

【１０３３】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号８７によって示される重鎖及び配列番号８８によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴ

ニストは、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１０３４】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、タボリキシズマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号８９に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号９０に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖ抗体を含む。

【１０３５】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号９１、配列番号９２、及び配列番号９３に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号９４、配列番号９５、及び配列番号９６に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１０３６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、タボリキシズマブに関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオ

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

【１０３７】

【表１２】

表１２．タボリキシズマブに関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 87 タボリキシズマブの重鎖	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
配列番号 88 タボリキシズマブの軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号 89 タボリキシズマブの重鎖可変領域	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT 118
配列番号 90 タボリキシズマブの軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR 108
配列番号 91 タボリキシズマブの重鎖 CDR1	GSFSSGYWN 9
配列番号 92 タボリキシズマブの重鎖 CDR2	YIGYISYNGI TYH 13
配列番号 93 タボリキシズマブの重鎖 CDR3	RYKYDYDGGH AMDY 14
配列番号 94 タボリキシズマブの軽鎖 CDR1	QDISNYLN 8
配列番号 95 タボリキシズマブの軽鎖 CDR2	LLIYYTSKLH S 11
配列番号 96 タボリキシズマブの軽鎖 CDR3	QQGSALPW 8

【１０３８】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．から入手可能な完全ヒト抗体である１１Ｄ４である。１１Ｄ４の調製及び特性は、米国特許第７，９６０，５１５号、同第８，２３６，９３０号、及び同第９，０２８，８２４号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。１１Ｄ４のアミノ酸配列を表１３に示す。

【１０３９】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号９７によって示される重鎖及び配列番号９８によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、

それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１０４０】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１１Ｄ４の重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号９９に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１００に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【１０４１】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１０１、配列番号１０２、及び配列番号１０３に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１０４、配列番号１０５、及び配列番号１０６に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１０４２】

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

品は、１１Ｄ４である。
【１０４３】
【表１３】

表１３．１１Ｄ４に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 97 11D4 の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPPCPAP PVAGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK	60 120 180 240 300 360 420 444
配列番号 98 11D4 の軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
配列番号 99 11D4 の重鎖 可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
配列番号 100 11D4 の軽鎖 可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK	60 107
配列番号 101 11D4 の重鎖 CDR1	SYSMN	5
配列番号 102 11D4 の重鎖 CDR2	YISSSSSTID YADSVKG	17
配列番号 103 11D4 の重鎖 CDR3	ESGWYLFDY	9
配列番号 104 11D4 の軽鎖 CDR1	RASQGISSWL A	11
配列番号 105 11D4 の軽鎖 CDR2	AASSLQS	7
配列番号 106 11D4 の軽鎖 CDR3	QQYNSYPPT	9

【１０４４】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．から入手可能な完全ヒト抗体である１８Ｄ８である。１８Ｄ８の調製及び特性は、米国特許第７，９６０，５１５号、同第８，２３６，９３０号、及び同第９，０２８，８２４号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。１８Ｄ８のアミノ酸配列を表１４に示す。
【１０４５】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号１０７によって示される重鎖及び配列番号１０８によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列と少なくとも９６％同一

である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１０４６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１８Ｄ８の重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１０９に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１１０に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【１０４７】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１１１、配列番号１１２、及び配列番号１１３に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１１４、配列番号１１５、及び配列番号１１６に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１０４８】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１８Ｄ８に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。

【１０４９】

【表１４】

表１４．１８Ｄ８に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 107 18D8 の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
配列番号 108 18D8 の軽鎖	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	60 120 180 213
配列番号 109 18D8 の重鎖 可変領域	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSS	60 120 124
配列番号 110 18D8 の軽鎖 可変領域	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK	60 106
配列番号 111 18D8 の重鎖 CDR1	DYAMH	5
配列番号 112 18D8 の重鎖 CDR2	GISWNSGSIG YADSVKG	17
配列番号 113 18D8 の重鎖 CDR3	DQSTADYYFY YGMDV	15
配列番号 114 18D8 の軽鎖 CDR1	RASQSVSSYL A	11
配列番号 115 18D8 の軽鎖 CDR2	DASNRAT	7
配列番号 116 18D8 の軽鎖 CDR3	QQRSNWPT	8

【１０５０】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ ｐｌｃ．から入手可能なヒト化抗体であるＨｕ１１９－１２２である。Ｈｕ１１９－１２２の調製及び特性は、米国特許第９，００６，３９９号及び同第９，１６３，０８５号、ならびに国際特許公開第ＷＯ２０１２／０２７３２８号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。Ｈｕ１１９－１２２のアミノ酸配列を表１５に示す。

【１０５１】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１１９－１２２の重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１１７に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１１８に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９６％同一である

V_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【１０５２】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１１９、配列番号１２０、及び配列番号１２１に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１２２、配列番号１２３、及び配列番号１２４に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１０５３】

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

【１０５４】

【表１５】

表１５．Ｈｕ１１９－１２２に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 117 Hu119-122 の 重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
配列番号 118 Hu119-122 の 軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号 119 Hu119-122 の 重鎖 CDR1	SHDMS	5
配列番号 120 Hu119-122 の 重鎖 CDR2	AINSDGGSTY YPDTMER	17
配列番号 121 Hu119-122 の 重鎖 CDR3	HYDDYYAWFA Y	11
配列番号 122 Hu119-122 の 軽鎖 CDR1	RASKSVSTSG YSYMH	15
配列番号 123 Hu119-122 の 軽鎖 CDR2	LASNLES	7
配列番号 124 Hu119-122 の 軽鎖 CDR3	QHSRELPLT	9

【１０５５】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ ｐｌｃ．から入手可能なヒト化抗体であるＨｕ１０６－２２２である。Ｈｕ１０６－２２２の調製及び特性は、米国特許第９，００６，３９９号及び同第９，１６３，０８５号、ならびに国際特許公開第ＷＯ２０１２／０２７３２８号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。Ｈｕ１０６－２２２のアミノ酸配列を表１６に示す。

【１０５６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１０６－２２２の重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１２５に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１２６に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【１０５７】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１２７、配列番号１２８、及び配列番号１２９に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１３０、配

列番号１３１、及び配列番号１３２に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１０５８】

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

【１０５９】

【表１６】

表１６．Ｈｕ１０６－２２２に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 125 Hu106-222 の 重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	60 120 122
配列番号 126 Hu106-222 の 軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK	60 107
配列番号 127 Hu106-222 の 重鎖 CDR1	DYSMH	5
配列番号 128 Hu106-222 の 重鎖 CDR2	WINTETGEPT YADDFKG	17
配列番号 129 Hu106-222 の 重鎖 CDR3	PYYDYVSYYA MDY	13
配列番号 130 Hu106-222 の 軽鎖 CDR1	KASQDVSTAV A	11
配列番号 131 Hu106-222 の 軽鎖 CDR2	SASYLYT	7
配列番号 132 Hu106-222 の 軽鎖 CDR3	QQHYSTPRT	9

【１０６０】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＭＥＤＩ６４６９（９Ｂ１２とも称される）である。ＭＥＤＩ６４６９は、マウスモノクローナル抗体である。Ｗｅｉｎｂｅｒｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００６，２９，５７５－５８５

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

【１０６１】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｌ１０６　ＢＤ（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体Ｌ１０６（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）のＣＤＲを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体Ｌ１０６（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）のＣＤＲを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＩｎＶｉｖｏＭＡｂ、ＢｉｏＸｃｅｌｌ　Ｉｎｃ（Ｗｅｓｔ　Ｌｅｂａｎｏｎ，ＮＨ）から市販されているマウスモノクローナル抗体抗ｍＣＤ１３４／ｍＯＸ４０（クローンＯＸ８６）である。

【１０６２】

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

【１０６３】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、構造Ｉ－Ａ（Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）もしくは構造Ｉ－Ｂ（Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）に示されるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質、またはそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂの特性は、上記及び米国特許第９，３５９，４２０号、同第９，３４０，５９９号、同第８，９２１，５１９号、及び同第８，４５０，４６０号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。図１８に示される構造Ｉ－Ａのポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表９に見出される。Ｆｃドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン（配列番号６２のアミノ酸１７～２３０）、完全なヒンジドメイン（配列番号６２のアミノ酸１～１６）、またはヒンジドメインの一部（例えば、配列番号６２のアミノ酸４～１６）を含む。Ｃ末端Ｆｃ抗体を結合するための好ましいリンカーは、追加のポリペプチドの融合に好適なリンカーを含む、配列番号６３～配列番号７２に示される実施形態から選択され得る。同様に、図１８に示される構造Ｉ－Ｂのポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表１０に見出される。Ｆｃ抗体断片が構造Ｉ－ＢにあるようなＴＮＲＦＳＦ融合タンパク質のＮ末端に融合される場合、Ｆｃモジュールの配列は、好ましくは、配列番号７３に示されるものであり、

リンカー配列は、好ましくは、配列番号７４～配列番号７６に示される実施形態から選択される。

【１０６４】

いくつかの複合体実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、タボリキシズマブの可変重鎖及び可変軽鎖、１１Ｄ４の可変重鎖及び可変軽鎖、１８Ｄ８の可変重鎖及び可変軽鎖、Ｈｕ１１９－１２２の可変重鎖及び可変軽鎖、Ｈｕ１０６－２２２の可変重鎖及び可変軽鎖、表１７に記載の可変重鎖及び可変軽鎖から選択される可変重鎖及び可変軽鎖、前述の可変重鎖及び可変軽鎖の任意の組み合わせ、ならびにそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、及びバイオシミラーからなる群から選択される１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。

【１０６５】

いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、ＯＸ４０Ｌ配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１３３による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、可溶性ＯＸ４０Ｌ配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１３４による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１３５による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。

【１０６６】

いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号１２７及び配列番号１２８に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、表１７に示されるV_H配列及びV_L配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインはリンカーによって結合されている。

【１０６７】

【表１７－１】

表１７．融合タンパク質（例えば、構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂ）におけるＯＸ４０結合ドメインとしてまたはｓｃＦｖ　ＯＸ４０アゴニスト抗体ドメインとして有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号133 0X40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ 60 SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ 120 KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF 180 CVL 183
配列番号134 0X40L可溶性ドメイン	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE 60 VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL 120 IHQNPGEFCV L 131
配列番号135 0X40L可溶性 ドメイン（代替）	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI 60 SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ 120 NPGEFCVL 128
配列番号136 008の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS 120
配列番号137 008の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
配列番号138 011の可変重鎖	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD 60 SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA 120
配列番号139 011の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
配列番号140 021の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS 120
配列番号141 021の可変軽鎖	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK 108
配列番号142 023の可変重鎖	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA 60 DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS 120
配列番号143 023の可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR 108
配列番号144 重鎖可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY 60 NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS 119
配列番号145 軽鎖可変領域	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR 108
配列番号146 重鎖可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY 60 NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS 120 P 121
配列番号147 軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD 60 RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR 108

【表１７－２】

配列番号148 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV SS	60 120 122
配列番号149 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	60 120 122
配列番号150 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号151 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号152 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA	60 120
配列番号153 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
配列番号154 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K	60 111
配列番号155 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号156 重鎖可変領域	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG EVFYFDYWGQ GTTLTVSS	60 120 138
配列番号157 軽鎖可変領域	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG TKLELK	60 120 126

【１０６８】

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

【１０６９】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、（ｉ）第１の可溶性腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）スーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインを含むＯＸ４０アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、可溶性ＴＮＦスーパー

ファミリーサイトカインドメインは各々、茎領域を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは独立して、３～８アミノ酸長であり、ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインは、ＯＸ４０結合ドメインである。

【１０７０】

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

【１０７１】

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

【１０７２】

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

【１０７３】

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

【１０７４】

Ｂ．任意選択の細胞生存率分析

任意選択で、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準のアッセイを使用して、プライミングによる第１の拡張（初期バルク拡張と称されることもある）後に行われ得る。したがって、ある特定の実施形態では、方法は、プライミングによる第１の拡張後に細胞生存率アッセイを行うことを含む。例えば、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンブルー排除アッセイが、バルクＴＩＬの試料上で行われ得る。生存率の試験に使用する他のアッセイには、アラマーブルーアッセイ及びＭＴＴアッセイが含まれるが、これらに限定されない。

【１０７５】

１．細胞計数、生存率、フローサイトメトリー

いくつかの実施形態では、細胞数及び／または生存率が測定される。ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、及びＣＤ５６などであるが、これらに限定されないマーカー、ならびに本明細書に開示または記載される任意の他のマーカーの発現は、ＦＡＣＳＣａｎｔｏ（商標）フローサイトメーター（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して、例えば、ＢＤ Ｂｉｏ－ｓｃｉｅｎｃｅｓ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）から市販されているものであるが、これに限定されない抗体を用いたフローサイトメトリーによって測定され得る。細胞は、使い捨てのｃチップ血球計数器（ＶＷＲ，Ｂａｔａｖｉａ，ＩＬ）を使用して手動で計数することができ、生存率は、トリパンブルー染色を含むが、これに限定されない、当該技術分野で知られている任意の方法を使用して評価することができる。細胞生存率は、米国特許出願公開第２０１８／０２８２６９４号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に基づいてアッセイされ得る。細胞生存率は、米国特許公開第２０１８／０２８０４３６号または国際特許公開第ＷＯ／２０１８／０８１４７３号（いずれもあらゆる目的のためにそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に基づいてアッセイすることもできる。

【１０７６】

いくつかの事例では、バルクＴＩＬ集団は、以下で考察されるプロトコルを使用して直ちに凍結保存され得る。あるいは、以下で論じられるように、バルクＴＩＬ集団がＲＥＰに供されて、凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾ＴＩＬが療法に使用される場合、バルクまたはＲＥＰ ＴＩＬ集団が好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。

【１０７７】
２．細胞培養
いくつかの実施形態では、上で考察され、図１及び８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に例示されたものを含む、ＴＩＬを拡張するための方法は、約５，０００ｍＬ～約２５，０００ｍＬの細胞培地、約５，０００ｍＬ～約１０，０００ｍＬの細胞培地、または約５，８００ｍＬ～約８，７００ｍＬの細胞培地を使用することを含み得る。いくつかの実施形態では、培地は、無血清培地である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、無血清である。いくつかの実施形態では、第２の拡張における培地は、無血清である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張及び第２の拡張（急速な第２の拡張とも称される）における培地は、両方とも無血清である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの数を拡張することは、わずか１種類の細胞培養培地を使用する。任意の好適な細胞培養培地、例えば、ＡＩＭ－Ｖ細胞培地（Ｌ－グルタミン、５０μＭの硫酸ストレプトマイシン、及び１０μＭの硫酸ゲンタマイシン）細胞培養培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ　ＣＡ）が使用され得る。これに関して、本発明の方法は、ＴＩＬの数を拡張するために必要な培地の量及び培地の種類の数を有利に減少させる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの数を拡張することは、３日または４日に１回以下の頻度で細胞にフィードすることを含み得る。ガス透過性容器内で細胞の数を拡張することは、細胞を拡張するために必要なフィード頻度を減少させることによって、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化する。

【１０７８】
いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培養培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ベータ－メルカプトエタノール（ＢＭＥ）を欠いている。

【１０７９】
いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、プライミングによる第１の拡張として約１～８日間、例えば約７日間、またはプライミングによる第１の拡張として約８日間にわたってＩＬ－２、１Ｘ抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第１のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を培養することと、ＴＩＬを第２のガス透過性容器に移し、ＩＬ－２、２Ｘ抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第２のガス透過性容器内でＴＩＬの数を約７～９日間、例えば約７日間、約８日間、または約９日間にわたって拡張することと、を含む。

【１０８０】
いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、プライミングによる第１の拡張として、ＩＬ－２、１Ｘ抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第１のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を約１～７日間、例えば、約７日間にわたって培養することと、ＴＩＬを第２のガス透過性容器に移し、ＩＬ－２、２Ｘ抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第２のガス透過性容器内でＴＩＬの数を約７～１４日間、または約７～９日間、例えば、約７日間、約８日間、または約９日間、約１０日間、または約１１日間にわたって拡張することと、を含む。

【１０８１】
いくつかの実施形態では、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、プライミングによる第１の拡張として、ＩＬ－２、１×抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第１のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を約１～７日間、例えば、約７日間培養することと、ＴＩＬを第２のガス透過性容器に移し、ＩＬ－２、２×抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第２のガス透過性容器内で

ＴＩＬの数を約７～１１日間、例えば、約７日間、約８日間、約９日間、約１０日間、または約１１日間にわたって拡張することと、を含む、方法の期間。

【１０８２】

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

【１０８３】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、Ｇ－ＲＥＸフラスコ（Ｗｉｌｓｏｎ Ｗｏｌｆ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇから市販されている）内で拡張され得る。かかる実施形態は、細胞集団が約５×１０^{5}細胞／ｃｍ^{2}から１０×１０^{6}～３０×１０^{6}細胞／ｃｍ^{2}まで拡張するのを可能にする。いくつかの実施形態では、これは、フィードなしである。いくつかの実施形態では、これは、培地がＧ－ＲＥＸフラスコ内の約１０ｃｍの高さに存在する限り、フィードなしである。いくつかの実施形態では、これは、フィードなしであるが、１つ以上のサイトカインの追加を伴う。いくつかの実施形態では、サイトカインを培地と混合する必要なしに、サイトカインがボーラスとして追加され得る。かかる容器、装置、及び方法は、当該技術分野で知られており、ＴＩＬを拡張するために使用されており、米国特許出願公開第ＵＳ２０１４／０３７７７３９Ａ１号、国際公開第ＷＯ２０１４／２１００３６Ａ１号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３／０１１５６１７Ａ１号、国際公開第ＷＯ２０１３／１８８４２７Ａ１、米国特許出願公開第ＵＳ２０１１／０１３６２２８Ａ１、米国特許第ＵＳ８，８０９，０５０Ｂ２号、国際公開第ＷＯ２０１１／０７２０８８Ａ２号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１６／０２０８２１６Ａ１号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１２／０２４４１３３Ａ１号、国際公開第ＷＯ２０１２／１２９２０１Ａ１号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３／０１０２０７５Ａ１号、米国特許第ＵＳ８，９５６，８６０Ｂ２号、国際公開第ＷＯ２０１３／１７３８３５Ａ１号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１５／０１７５９６６Ａ１号に記載されるものを含み、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。かかるプロセスも、Ｊｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，２０１２，３５：２８３－２９２に記載されている。

【１０８４】

Ｃ．ＴＩＬにおける遺伝子の任意選択のノックダウンまたはノックアウト

いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、タンパク質発現を一過的に変化させるために、各々本明細書で提供されるように、閉鎖滅菌製造プロセス中を含む、拡張ステップ前、拡張ステップ中、または拡張ステップ後にさらに操作される。いくつかの実施形態では、一過的に変化したタンパク質発現は、一過性の遺伝子編集によるものである。いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、ＴＩＬにおけるタンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子（ＴＦ）及び／または他の分子で処理される。いくつかの実施形態では、タンパク質発現を一過的に変化させることができるＴＦ及び／または他の分子は、腫瘍抗原の発現の変化及び／またはＴＩＬ集団における腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の数の変化を提供する。

【１０８５】
ある特定の実施形態では、方法は、ＴＩＬ集団を遺伝子編集することを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、及び／または第３のＴＩＬ集団を遺伝子編集することを含む。
【１０８６】
いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のタンパク質の発現の促進または１つ以上のタンパク質の発現の阻害、ならびに一組のタンパク質の促進及び別の組のタンパク質の阻害の両方の組み合わせの同時発生のために、リボ核酸（ＲＮＡ）挿入、例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）または低分子（もしくは短）干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）のＴＩＬ集団への挿入などのヌクレオチド挿入による遺伝子編集を含む。
【１０８７】
いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、タンパク質発現の一過性の変化を受ける。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８（特に、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されるように、ステップＡから取得されたＴＩＬ集団を含む、第１の拡張前のバルクＴＩＬ集団において起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８（例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されるように、例えば、ステップＢで拡張されたＴＩＬ集団におけるものを含む、第１の拡張中に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、ステップＢから取得され、ステップＣに含まれるＴＩＬ集団である、例えば、第１の拡張と第２の拡張との間の移行中のＴＩＬ集団（例えば、本明細書に記載の第２のＴＩＬ集団）におけるものを含む、第１の拡張後に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＣから取得され、ステップＤでのその拡張前のＴＩＬ集団を含む、第２の拡張前のバルクＴＩＬ集団において起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＤで拡張されたＴＩＬ集団（例えば、第３のＴＩＬ集団）を含む、第２の拡張中に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＤでの拡張から取得されたＴＩＬ集団を含む、第２の拡張後に起こる。
【１０８８】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、エレクトロポレーションステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｔｓｏｎｇ，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．１９９１，６０，２９７－３０６及び米国特許出願公開第２０１４／０２２７２３７Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法（リン酸カルシウムＤＮＡ沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス）は、当該技術分野で知られており、Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９７３，５２，４５６－４６７、Ｗｉｇｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１９７９，７６，１３７３－１３７６、及びＣｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｒｅａ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１９８７，７，２７４５－２７５２、ならびに米国特許第５，５９３，８７５号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リポソームトランスフェクションステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－ｎ，ｎ，ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）及びジオレオイルホスホチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム製剤を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Ｒｏｓｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １９９１，１０，５２０－５２５及びＦｅｌｇｎｅｒ，ｅｔ

ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８７，８４，７４１３－７４１７、ならびに米国特許第５，２７９，８３３号、同第５，９０８，６３５号、同第６，０５６，９３８号、同第６，１１０，４９０号、同第６，５３４，４８４号、及び同第７，６８７，０７０号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、米国特許第５，７６６，９０２号、同第６，０２５，３３７号、同第６，４１０，５１７号、同第６，４７５，９９４号、及び同第７，１８９，７０５号に記載されている方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１０８９】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、幹細胞メモリーＴ細胞（ＴＳＣＭ）の増加をもたらす。ＴＳＣＭは、抗原を経験したセントラルメモリーＴ細胞の初期前駆細胞である。ＴＳＣＭは、一般に、幹細胞を定義する長期生存、自己再生、及び多分化能を示し、一般に、効果的なＴＩＬ製品の生成に望ましいものである。ＴＳＣＭは、養子細胞移植のマウスモデルにおいて他のＴ細胞サブセットと比較して増強された抗腫瘍活性を示している。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、高い割合のＴＳＣＭを含む組成を有するＴＩＬ集団をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＳＣＭパーセンテージの少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＬ集団中のＴＳＣＭの少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、または１０倍の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％のＴＳＣＭを有するＴＩＬ集団をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％のＴＳＣＭを有する治療的ＴＩＬ集団をもたらす。

【１０９０】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、抗原を経験したＴ細胞の幼若化をもたらす。いくつかの実施形態では、幼若化には、例えば、増加した増殖、増加したＴ細胞活性化、及び／または増加した抗原認識が含まれる。

【１０９１】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のＴＣＲレパートリーを保存するために、Ｔ細胞の大部分における発現を変化させる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のＴＣＲレパートリーを変化させない。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のＴＣＲレパートリーを維持する。

【１０９２】

いくつかの実施形態では、タンパク質の一過性の変化は、特定の遺伝子の発現の変化をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１（ＰＤＣＤ１またはＣＣ２７９とも称される）、ＴＧＦＢＲ２、ＣＣＲ４／５、ＣＢＬＢ（ＣＢ

Ｌ－Ｂ）、ＣＩＳＨ、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ　１／２　ＩＣＤ、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβ、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＳＣＲ３、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、ＣＣＬ１７、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＶＨＬ、ＣＤ４４、ＰＩＫ３ＣＤ、ＳＯＣＳ１、胸腺細胞選択関連高移動度群（ＨＭＧ）ボックス（ＴＯＸ）、アンキリンリピートドメイン１１（ＡＮＫＲＤ１１）、ＢＣＬ６コリプレッサー（ＢＣＯＲ）、及び／またはｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）を含むが、これらに限定されない遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＴＧＦＢＲ２、ＣＣＲ４／５、ＣＴＬＡ－４、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）、ＣＩＳＨ、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤ、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβ、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＳＣＲ３、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、ＣＣＬ１７、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＶＨＬ、ＣＤ４４、ＰＩＫ３ＣＤ、ＳＯＣＳ１、胸腺細胞選択関連高移動度群（ＨＭＧ）ボックス（ＴＯＸ）、アンキリンリピートドメイン１１（ＡＮＫＲＤ１１）、ＢＣＬ６コリプレッサー（ＢＣＯＲ）、及び／またはｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）からなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦＢＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ４／５を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－１２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－１５を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－１８を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＥＴ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦβを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ４を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ５を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＲ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＳＣＲ３を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣ

Ｌ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＬ８を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ２２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ１７を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ＶＨＬを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ４４を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＩＫ３ＣＤを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＳＯＣＳ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、胸腺細胞選択関連高移動度群（ＨＭＧ）ボックス（ＴＯＸ）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、アンキリンリピートドメイン１１（ＡＮＫＲＤ１１）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ＢＣＬ６コリプレッサー（ＢＣＯＲ）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）を標的とする。

【１０９３】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、一過性タンパク質発現によって過剰発現されるケモカイン受容体は、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１、ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、及び／またはＣＣＬ１７を含むが、これらに限定されないリガンドを有する受容体を含む。

【１０９４】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＣＢＬＢ、ＣＩＳＨ、ＴＩＭ－３、ＬＡＧ－３、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、及び／またはＴＧＦβの発現の低下及び／または減少をもたらす（例えば、ＴＧＦβ経路の遮断をもたらすことを含む）。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ－３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ－３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＥＴ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦβＲ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦβの発現の低下及び／または減少をもたらす。

【１０９５】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、腫瘍部位へのＴＩＬの輸送または移動を改善するために、ケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ１、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、及び／またはＣＳＣＲ３からなる群から選択されるケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【１０９６】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、インターロイキンの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１からなる群から選択されるインターロイキンの発現の増加及び／または過剰発現をもた

らす。
【１０９７】
いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＶＨＬの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ４４の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＩＫ３ＣＤの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＳＯＣＳ１の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。
【１０９８】
いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）の発現の低下及び／または減少をもたらす。
【１０９９】
いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される２つの分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ならびにＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される１つの分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＴＥＴ２，ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、ＴＩＧＩＴ、及びそれらの組み合わせの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ならびにＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、及びそれらの組み合わせのうちの１つの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＬＡＧ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＴＩＭ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＴＥＴ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＬＡＧ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＴＩＭ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＴＥＴ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及

びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＴＩＭ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＴＥＴ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨ及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨ及びＴＩＭ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨ及びＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨ及びＴＥＴ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＢＬＢ及びＴＩＭ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＢＬＢ及びＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＢＬＢ及びＴＥＴ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＰＤ－１の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＬＡＧ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＴＥＴ２の発現の低下及び／または減少をもたらす。

【１１００】

いくつかの実施形態では、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される接着分子は、ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法によって、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団に挿入される（例えば、接着分子の発現が増加する）。

【１１０１】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の低下及び／または減少、ならびにＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせの発現の増加及び／または増強をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の低下及び／または減少、ならびにＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせの発現の増加及び／または増強をもたらす。

【１１０２】

いくつかの実施形態では、発現が約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いく

つかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９９％減少する。

【１１０３】

いくつかの実施形態では、発現が約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９０％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９９％増加する。

【１１０４】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＬにおけるタンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子（ＴＦ）及び／または他の分子でのＴＩＬの処理によって誘導される。いくつかの実施形態では、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームが、タンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子（ＴＦ）及び／または他の分子の細胞内送達のために用いられる。かかる方法は、転写因子を含むタンパク質を、Ｔ細胞を含む様々な初代ヒト細胞に送達する能力を示す（これらは、米国特許出願公開第ＵＳ２０１９／００９３０７３　Ａ１号、同第ＵＳ２０１８／０２０１８８９　Ａ１号、及び同第ＵＳ２０１９／００１７０７２　Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）。かかる方法は、ＴＩＬ集団を、転写因子（ＴＦ）及び／または一過性タンパク質発現を誘導することができる他の分子に曝露するために本発明で用いることができ、一過性タンパク質発現を誘導することができる当該ＴＦ及び／または他の分子は、腫瘍抗原の発現の増加及び／またはＴＩＬ集団における腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の数の増加をもたらし、それ故に、ＴＩＬ集団の再プログラミング及び再プログラミングされていないＴＩＬ集団と比較して再プログラミングされたＴＩＬ集団の治療的有効性の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、本明細書に記載されるように、ＴＩＬ開始集団またはＴＩＬ前集団（すなわち、再プログラミング前の）集団と比較して、エフェクターＴ細胞及び／またはセントラルメモリーＴ細胞の亜集団の増加をもたらす。

【１１０５】

いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）には、ＴＣＦ－１、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤ、及び／またはＭＹＢが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＴＣＦ－１である。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤである。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＭＹＢである。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、さらなるＴＩＬ再プログラミングを誘導するために、市販のＫＮＯＣＫＯＵＴ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（Ｇｉｂｃｏ／ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）などの誘導多能性幹細胞培養物（ｉＰＳＣ）とともに投与される。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、さらなるＴＩＬ再プログラミングを誘導するために、ｉＰＳＣカクテルとともに投与される。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ｉＰＳＣカクテルなしで投与される。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、ＴＳＣＭのパーセンテージの増加をもたらす。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、ＴＳＣＭのパーセンテージの約５％、約１

０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％ＴＳＣＭの増加をもたらす。

【１１０６】

いくつかの実施形態では、上記のようにタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、ＴＩＬの集団を遺伝子修飾する方法と組み合わせられてもよく、１つ以上のタンパク質の産生のための遺伝子の安定した組み込みステップを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾するステップを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、及び／または第３のＴＩＬ集団を遺伝子修飾することを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レトロウイルス形質導入ステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レンチウイルス形質導入ステップを含む。レンチウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｌｅｖｉｎｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ‘ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．２００６，１０３，１７３７２－７７、Ｚｕｆｆｅｒｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９７，１５，８７１－７５、Ｄｕｌｌ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９９８，７２，８４６３－７１、及び米国特許第６，６２７，４４２号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、ガンマレトロウイルス形質導入ステップを含む。ガンマレトロウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｃｅｐｋｏ ａｎｄ Ｐｅａｒ，Ｃｕｒ．Ｐｒｏｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９６，９．９．１－９．９．１６に記載されており、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入ステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入系は、当該技術分野で知られており、トランスポザーゼが、ＤＮＡ発現ベクターとしてまたは発現可能なＲＮＡもしくはタンパク質として提供される系を含み、これにより、トランスポザーゼ、例えば、ｍＲＮＡ（例えば、キャップ及びポリＡ尾部を含むｍＲＮＡ）として提供されるトランスポザーゼの長期発現がトランスジェニック細胞で起こらないようになる。ＳＢ１０、ＳＢ１１、及びＳＢ１００ｘなどのサケ科型Ｔｅｌ様トランスポザーゼ（ＳＢまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼ）を含む好適なトランスポゾン媒介遺伝子導入系、ならびに増加した酵素活性を有する操作された酵素は、例えば、Ｈａｃｋｅｔｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ ２０１０，１８，６７４－８３及び米国特許第６，４８９，４５８号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１１０７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ中のタンパク質発現の一過性変化は、短干渉ＲＮＡまたはサイレンシングＲＮＡとして知られることもある、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）は、一般に１９～２５塩基対長の二本鎖ＲＮＡ分子である。ｓｉＲＮＡは、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）において使用され、相補的なヌクレオチド配列を有する特定の遺伝子の発現に干渉する。

【１１０８】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、発現の低下である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬにおけるタンパク質発現の一過性の変化は、高パーセンテージの２’－ＯＨ置換（典型的にはフッ素または－ＯＣＨ$_3$）を有する化学的に合成された非対称ｓｉＲＮＡ二重鎖である自己送達ＲＮＡ干渉（ｓｄＲＮＡ）によって誘導され、これはテトラエチレングリコール（ＴＥＧ）リンカーを使用してその３’末端でコレステロールに複合された、２０ヌクレオチドアンチセンス（ガイド）鎖及び１３～１５塩基センス（パッセンジャー）鎖を含む。短干渉ＲＮＡまたはサイレンシングＲＮＡとして知られることもある、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）は、一般に１９～２５塩基対長の二本鎖ＲＮＡ分子である。ｓｉＲＮＡは、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）において使用され、相補的なヌクレオチド配列を有する特定の遺伝子の発現に干渉する。ｓｄＲＮＡは、共有結合及び疎

水的に修飾されたＲＮＡｉ化合物であり、細胞に侵入するために送達媒体を必要としない。ｓｄＲＮＡは、一般に、最小限の二本鎖領域を有する非対称の化学修飾された核酸分子である。ｓｄＲＮＡ分子は、典型的に一本鎖領域及び二本鎖領域を含み、分子の一本鎖領域及び二本鎖領域の両方に様々な化学修飾を含み得る。加えて、ｓｄＲＮＡ分子は、本明細書に記載されているように、従来の高度なステロール型分子などの疎水性複合体に結合することができる。ｓｄＲＮＡ及びかかるｓｄＲＮＡを作製するための関連方法は、例えば、米国特許出願公開第ＵＳ２０１６／０３０４８７３　Ａ１号、同第ＵＳ２０１９／０２１１３３７　Ａ１号、同第ＵＳ２０１９／００４８３４１　Ａ１号、及び同第ＵＳ２０１９／００４８３４１　Ａ１号、ならびに米国特許第１０，６３３，６５４号及び同第１０，９１３，９４８　Ｂ２号（これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）にも広く記載されている。ｓｄＲＮＡ構造、化学、標的化位置、配列の好み等を最適化するために、ｓｄＲＮＡ力価予測用のアルゴリズムが開発及び利用されている。これらの分析に基づいて、機能的なｓｄＲＮＡ配列は、一般に、１μＭの濃度で７０％を超える発現の減少を有すると定義されており、確率は４０％を超える。

【１１０９】

二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）は、一般に、ＲＮＡの相補鎖の対、一般にセンス（パッセンジャー）鎖及びアンチセンス（ガイド）鎖を含む任意の分子を定義するために使用することができ、一本鎖オーバーハング領域を含み得る。ｓｉＲＮＡとは対照的に、ｄｓＲＮＡという用語は、一般に、ダイサーを含む切断酵素系の作用によりより大きいｄｓＲＮＡ分子から放出されるｓｉＲＮＡ分子の配列を含む前駆体分子を指す。

【１１１０】

いくつかの実施形態では、方法は、ＣＣＲを発現するように修飾されたＴＩＬを含むＴＩＬ集団におけるタンパク質発現の一過性変化を含み、例えば、テトラエチレングリコール（ＴＥＧ）リンカーを使用して２０ヌクレオチドアンチセンス（ガイド）鎖及び３’末端でコレステロールにコンジュゲートされた１３～１５塩基センス（パッセンジャー）鎖を含む、高いパーセンテージの２’－ＯＨ置換（典型的にはフッ素または－OCH_3）を有する化学的に合成された非対称ｓｉＲＮＡ二本鎖である、自己送達ＲＮＡ干渉（ｓｄＲＮＡ）の使用を含む。ｓｉＲＮＡ及びｓｄＲＮＡを使用する方法は、Ｋｈｖｏｒｏｖａ ａｎｄ Ｗａｔｔｓ，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１７，３５，２３８－２４８、Ｂｙｒｎｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｏｃｕｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．２０１３，２９，８５５－８６４、及びＬｉｇｔｅｎｂｅｒｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１８，２６，１４８２－９３（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡの送達は、エレクトロポレーションまたは細胞膜破壊（スクイーズまたはＳＱＺ法など）を使用して達成される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達は、エレクトロポレーション、ＳＱＺ、または他の方法を使用せず、代わりに、ＴＩＬ集団が培地中１μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。ある特定の実施形態では、方法は、ＴＩＬ集団を培地中１μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度のｓｄＲＮＡに１～３日間曝露することを含む、ＴＩＬ集団へのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡの送達を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中１０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中５０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中０．１μＭ／１０，０００ＴＩＬ～５０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中０．１μＭ／１０，０００ＴＩＬ～５０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成され、ｓｄＲＮＡへの曝露は、培地に新鮮なｓｄＲＮＡを添加することによって２、３、４、または５回行われる。他の好適なプロセスは、

例えば、米国特許出願公開第ＵＳ２０１１／００３９９１４Ａ１号、同第ＵＳ２０１３／０１３１１４１Ａ１号、及び同第ＵＳ２０１３／０１３１１４２Ａ１号、ならびに米国特許第９，０８０，１７１号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１１１１】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、製造中にＴＩＬ集団に挿入される。いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡは、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤ、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４　ＴＩＭ－３、ＬＡＧ－３、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβ、ＴＧＦＢＲ２、ｃＡＭＰプロテインキナーゼＡ（ＰＫＡ）、ＢＡＦＦ　ＢＲ３、ＣＩＳＨ、及び／またはＣＢＬＢに干渉するＲＮＡをコードする。いくつかの実施形態では、発現の減少は、例えば、フローサイトメトリー及び／またはｑＰＣＲによって評価される、遺伝子サイレンシングのパーセンテージに基づいて決定される。いくつかの実施形態では、発現が約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９９％減少する。

【１１１２】

ｓｉＲＮＡの化学修飾に基づく自己送達可能なＲＮＡｉ技術を本発明の方法とともに用いて、本明細書に記載されるように、ｓｄＲＮＡをＴＩＬに首尾よく送達することができる。非対称ｓｉＲＮＡ構造及び疎水性リガンドとの骨格修飾の組み合わせ（例えば、Ｌｉｇｔｅｎｂｅｒｇ，ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１８，２６，１４８２－９３及び米国特許出願公開第２０１６／０３０４８７３　Ａ１（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）を参照）は、ｓｄＲＮＡのヌクレアーゼ安定性を利用して、培養培地に単純に添加することによって、追加の製剤及び方法なしに、ｓｄＲＮＡが培養された哺乳類細胞に浸透することを可能にする。この安定性により、単に培地中のｓｄＲＮＡの活性濃度を維持することによって、標的遺伝子活性の一定レベルのＲＮＡｉを介した減少を支援することができる。理論に拘束されることはないが、ｓｄＲＮＡの骨格安定化は、非分裂細胞で数ヶ月間続く可能性のある遺伝子発現効果の延長された低減を提供する。

【１１１３】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの９５％を超えるトランスフェクション効率及び様々な特定のｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡによる標的の発現の減少が起こる。いくつかの実施形態では、いくつかの未修飾リボース残基を含むｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＲＮＡｉ効果の効力及び／または寿命を増加させるために、完全に修飾された配列で置き換えられた。いくつかの実施形態では、発現効果の減少は、１２時間、２４時間、３６時間、４８時間、５日間、６日間、７日間、または８日間以上維持される。いくつかの実施形態では、発現効果の減少は、ＴＩＬのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ処理後１０日以上で低下する。いくつかの実施形態では、標的発現の発現の７０％を超える減少が維持される。いくつかの実施形態では、標的発現の発現の７０％を超える減少が維持されるＴＩＬ。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１経路における発現の減少により、ＴＩＬがより強力なインビボ効果を示すことが可能になり、これは、いくつかの実施形態では、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１経路の抑制効果の回避に起因する。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡ

またはｓｄＲＮＡによるＰＤ－１の発現の減少は、ＴＩＬ増殖の増加をもたらす。

【１１１４】

いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の７０％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の７５％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の８０％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の８５％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の９０％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の９５％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の９９％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．２５μＭ～約４μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約４．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。

【１１１５】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチド剤は、治療剤の安定性及び／または有効性を増加させ、かつ治療される細胞または組織へのオリゴヌクレオチドの効率的な送達をもたらすための１つ以上の修飾を含む。かかる修飾には、２’－Ｏ－メチル修飾、２’－Ｏ－フルロ修飾、ジホスホロチオエート修飾、２’Ｆ修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－メチル修飾、及び／または２’デオキシヌクレオチドが含まれ得る。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、例えば、ステロール、コレステロール、ビタミンＤ、ナフチル、イソブチル、ベンジル、インドール、トリプトファン、及び／またはフェニルを含む１つ以上の疎水性修飾を含むように修飾される。いくつかの実施形態では、化学修飾ヌクレオチドは、ホスホロチオエート、２’－Ｏ－メチル、２’デオキシ、疎水性修飾及びホスホロチオエートの組み合わせである。いくつかの実施形態では、糖が修飾され得、修飾された糖には、Ｄ－リボース、２’－Ｏ－アルキル（２’－Ｏ－

メチル及び２′－０－エチルを含む）、すなわち、２′－アルコキシ、２′－アミノ、２′－Ｓ－アルキル、２′－ハロ（２′－フルオロを含む）、Ｔ－メトキシエトキシ、２′－アリルオキシ（－ＯＣＨ$_2$ＣＨ＝ＣＨ$_2$）、２′－プロパルギル、２′－プロピル、エチニル、エテニル、プロペニル、及びシアノなどが含まれ得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、糖部分は、ヘキソースであり得、Ａｕｇｕｓｔｙｎｓ，ｅｔａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．１９９２，１８，４７１１（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているようにオリゴヌクレオチドに組み込まれ得る。

【１１１６】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖であり、すなわち、分子のいずれかの末端にも一本鎖配列が突出しておらず、すなわち、平滑末端である。いくつかの実施形態では、個々の核酸分子は、異なる長さであり得る。言い換えれば、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖ではない。例えば、２つの別個の核酸分子が使用される場合、アンチセンス配列を含むそれらの分子の一方、例えば、第１の分子は、それにハイブリダイズする（分子の一部を一本鎖のままにする）第２の分子よりも長い可能性がある。いくつかの実施形態では、単一の核酸分子が使用される場合、いずれかの末端の分子の一部は、一本鎖のままであり得る。

【１１１７】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、ミスマッチ及び／またはループもしくはバルジを含むが、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約７０％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約８０％にわたって二本鎖である。他の実施形態では、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約９０％～９５％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約９６％～９８％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくともまたは最大１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５のミスマッチを含む。

【１１１８】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、例えば、米国特許第５，８４９，９０２号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように３’または５’結合を修飾することによって、ヌクレアーゼから実質的に保護され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、「ブロッキング基」を含めることによって耐性にすることができる。本明細書で使用される場合、「ブロッキング基」という用語は、合成のための保護基またはカップリング基のいずれかとして（例えば、ＦＩＴＣ、プロピル（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_3$）、グリコール（－０－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ－）ホスフェート（ＰＯ$_3$$^{2'}$）’、リン酸水素、もしくはホスホロアミダイト）、オリゴヌクレオチドまたはヌクレオモノマーに結合され得る置換基（例えば、ＯＨ基以外）を指す。「ブロッキング基」は、修飾ヌクレオチド及び非ヌクレオチドエキソヌクレアーゼ耐性構造を含む、オリゴヌクレオチドの５′及び３′末端を保護する「末端ブロッキング基」または「エキソヌクレアーゼブロッキング基」も含み得る。

【１１１９】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ内の隣接するポリヌクレオチドの少なくとも一部分は、代替の結合、例えば、ホスホロチオエート結合によって結合されている。

【１１２０】

いくつかの実施形態では、化学修飾は、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡの細胞取り込みの少なくとも１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、

３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、または５００パーセントの増強をもたらし得る。いくつかの実施形態では、Ｃ残基またはＵ残基の少なくとも一方が疎水性修飾を含む。いくつかの実施形態では、複数のＣ及びＵが疎水性修飾を含む。いくつかの実施形態では、Ｃ及びＵの少なくとも１０％、１５％、２０％、３０％、４０％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、または少なくとも９５％が疎水性修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、Ｃ及びＵのすべてが疎水性修飾を含む。

【１１２１】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ分子は、プロトン化可能なアミンの組み込みにより増強されたエンドソーム放出を示す。いくつかの実施形態では、プロトン化可能なアミンは、センス鎖（ＲＩＳＣ負荷後に廃棄される分子の一部分）に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明のｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ化合物は、二重鎖領域（１０～１５塩基長の効率的なＲＩＳＣ侵入に必要）及び４～１２ヌクレオチド長の一本鎖領域を１３ヌクレオチド二重鎖とともに含む非対称化合物を含む。いくつかの実施形態では、６ヌクレオチドの一本鎖領域が用いられる。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡの一本鎖領域は、２～１２個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合（ホスホロチオエート修飾と称される）を含む。いくつかの実施形態では、６～８個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合が用いられる。いくつかの実施形態では、本発明のｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ化合物は、安定性を提供し、かつＲＩＳＣ侵入と互換性がある固有の化学修飾パターンを含む。ガイド鎖は、例えば、ＲＩＳＣ侵入に干渉することなく安定性を確証する任意の化学修飾によって修飾することもできる。いくつかの実施形態では、ガイド鎖における化学修飾パターンは、２′Ｆが修飾され、かつ５′末端がリン酸化されたＣ及びＵヌクレオチドの大部分を含む。

【１１２２】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡのヌクレオチドの少なくとも３０％が修飾されている。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡのヌクレオチドの少なくとも３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％が修飾されている。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡのヌクレオチドの１００％が修飾されている。

【１１２３】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ分子は、最小の二本鎖領域を有する。いくつかの実施形態では、二本鎖である分子の領域は、８～１５ヌクレオチド長の範囲である。いくつかの実施形態では、二本鎖である分子の領域は、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、二本鎖領域は、１３ヌクレオチド長である。ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に１００％の相補性が存在する場合もあれば、ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に１つ以上の不一致が存在する場合もある。いくつかの実施形態では、二本鎖分子の一端で、分子は、平滑末端であるか、または１ヌクレオチドのオーバーハングを有するかのいずれかである。分子の一本鎖領域は、いくつかの実施形態では、４～１２ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２ヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、４ヌクレオチド長未満また

は１２ヌクレオチド長超であることもできる。ある特定の実施形態では、一本鎖領域は、６または７ヌクレオチド長である。

【１１２４】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ分子は、増加した安定性を有する。いくつかの事例では、化学修飾されたｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ分子は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４時間以上、または２４時間超（任意の中間値を含む）の培地中での半減期を有する。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、１２時間以上の培地中での半減期を有する。

【１１２５】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、効力の増加及び／または毒性の低減のために最適化されている。いくつかの実施形態では、ガイド鎖及び／またはパッセンジャー鎖のヌクレオチド長、及び／またはガイド鎖及び／またはパッセンジャー鎖におけるホスホロチオエート修飾の数が、いくつかの態様では、ＲＮＡ分子の効力に影響を与え得る一方で、２′－フルオロ（２′Ｆ）修飾の２′－０－メチル（２′ＯＭｅ）修飾での置き換えは、いくつかの態様では、分子の毒性に影響を与え得る。いくつかの実施形態では、分子の２′Ｆ含有量の減少は、分子の毒性を低減すると予測される。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ分子におけるホスホロチオエート修飾の数は、細胞への分子の取り込み、例えば、細胞への分子の受動的取り込みの効率に影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、２′Ｆ修飾を有しないが、それにもかかわらず、細胞取り込み及び組織浸透における同等の有効性を特徴とする。

【１１２６】

いくつかの実施形態では、ガイド鎖は、およそ１８～１９ヌクレオチド長であり、およそ２～１４個のリン酸修飾を有する。例えば、ガイド鎖は、リン酸修飾された２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４個、または１４個超のヌクレオチドを含み得る。ガイド鎖は、ＲＩＳＣの侵入に干渉することなく増加した安定性を付与する１つ以上の修飾を含み得る。ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドなどのリン酸修飾ヌクレオチドは、３′末端にあるか、５′末端にあるか、またはガイド鎖全体に広がっている可能性がある。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の３′末端１０ヌクレオチドは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを含む。ガイド鎖は、分子全体に位置し得る２′Ｆ及び／または２′ＯＭｅ修飾も含み得る。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の１位のヌクレオチド（ガイド鎖の最も５′側のヌクレオチド）は、２′ＯＭｅ修飾及び／またはリン酸化されている。ガイド鎖内のＣ及びＵヌクレオチドは、２′Ｆ修飾されていてもよい。例えば、１９ｎｔガイド鎖の２～１０位（または異なる長さのガイド鎖における対応する位置）のＣ及びＵヌクレオチドは、２′Ｆ修飾されていてもよい。ガイド鎖内のＣ及びＵヌクレオチドは、２′ＯＭｅ修飾されている場合もある。例えば、１９ｎｔガイド鎖の１１～１８位（または異なる長さのガイド鎖における対応する位置）のＣ及びＵヌクレオチドは、２′ＯＭｅ修飾されていてもよい。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の最も３′側の末端のヌクレオチドは修飾されていない。ある特定の実施形態では、ガイド鎖内のＣ及びＵの大部分は２′Ｆ修飾されており、ガイド鎖の５′末端はリン酸化されている。他の実施形態では、１位及び１１～１８位のＣまたはＵは２′ＯＭｅ修飾されており、ガイド鎖の５′末端はリン酸化されている。他の実施形態では、位置１及び位置１１～１８のＣｓまたはＵｓは２′ＯＭｅ修飾されており、ガイド鎖の５′末端はリン酸化されており、２～１０位のＣまたはＵは２′Ｆ修飾されている。

【１１２７】

自己送達可能なＲＮＡｉ技術は、追加の製剤または技法を必要とすることなくＲＮＡｉ剤（ｓｉＲＮＡ、ｓｄＲＮＡ、または他のＲＮＡｉ剤のいずれか）で細胞を直接トランスフェクトする方法を提供する。トランスフェクションが困難な細胞株をトランスフェクトする能力、高いインビボ活性、及び使用の単純さは、従来のｓｉＲＮＡベースの技法に優

る重大な機能的利点を提示する組成物及び方法の特徴であり、したがって、ｓｄＲＮＡ法は、本発明のＴＩＬにおける標的遺伝子の発現を減少させる方法に関連するいくつかの実施形態で用いられる。ｓｄＲＮＡｉ法により、化学合成された化合物をエクスビボ及びインビボの両方で広範囲の一次細胞及び組織に直接送達することが可能になる。本明細書における本発明のいくつかの実施形態に記載のｓｄＲＮＡは、Ａｄｖｉｒｎａ　ＬＬＣ（Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ，ＭＡ，ＵＳＡ）から市販されている。

【１１２８】

ｓｉＲＮＡ及びｓｄＲＮＡは、疎水的に修飾されたｓｉＲＮＡ－アンチセンスオリゴヌクレオチドハイブリッド構造として形成され得、例えば、Ｂｙｒｎｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｏｃｕｌａｒ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｅｕｔ．，２０１３，２９，８５５－８６４（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている。

【１１２９】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、滅菌エレクトロポレーションを使用して本明細書に記載のＴＩＬに送達され得る。ある特定の実施形態では、方法は、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドを送達するためにＴＩＬ集団の滅菌エレクトロポレーションを含む。

【１１３０】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、膜貫通送達システムと組み合わせて細胞に送達され得る。いくつかの実施形態では、この膜貫通送達システムは、脂質、ウイルスベクターなどを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド剤は、自己送達ＲＮＡｉ剤であり、いかなる送達剤も必要としない。特定の実施形態では、方法は、ＴＩＬの集団にｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドを送達するための膜貫通送達システムの使用を含む。

【１１３１】

オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド組成物は、本明細書に記載のＴＩＬと接触し（例えば、接触させられ、本明細書では投与または送達されるとも称される）、ＴＩＬによって取り込まれる（ＴＩＬによる受動的取り込みを含む）。ｓｄＲＮＡは、第１の拡張中（例えば、ステップＢ）、第１の拡張後（例えば、ステップＣ中）、第２の拡張前または拡張中（例えば、ステップＤの前またはステップＤ中）、ステップＤ後及びステップＥにおける採取前、ステップＦにおける採取中または採取後、ステップＦにおける最終製剤化及び／または注入バッグへの移行前または移行中、ならびにステップＦにおける任意選択の凍結保存ステップ前に、本明細書に記載のＴＩＬに添加され得る。さらに、ｓｄＲＮＡは、ステップＦにおける任意の凍結保存ステップから解凍した後に添加され得る。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の１つ以上のｓｄＲＮＡ標的遺伝子が、１００ｎＭ～２０ｍＭ、２００ｎＭ～１０ｍＭ、５００ｎｍ～１ｍＭ、１μＭ～１００μＭ、及び１μＭ～１００μＭからなる群から選択される濃度でＴＩＬ及び他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の１つ以上のｓｄＲＮＡ標的遺伝子は、０．１μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、０．５μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、０．７５μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、１μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、１．２５μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、１．５μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、２μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、５μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、または１０μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地からなる群から選択される量でＴＩＬ及び他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の１つ以上のｓｄＲＮＡ標的遺伝子は、ＲＥＰ前段階またはＲＥＰ段階中に１日２回、１

日１回、２日毎、３日毎、４日毎、５日毎、６日毎、または７日毎にＴＩＬ培養物に添加され得る。

【１１３２】

ｓｄＲＮＡを含む本発明のオリゴヌクレオチド組成物は、例えば、細胞培養培地にｓｄＲＮＡを高濃度で溶解し、かつ受動的取り込みが起こるのに十分な時間を許容することによって、拡張プロセス中に本明細書に記載のＴＩＬと接触することができる。ある特定の実施形態では、本発明の方法は、ＴＩＬ集団を、本明細書に記載のオリゴヌクレオチド組成物と接触させることを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、オリゴヌクレオチド、例えば、ｓｄＲＮＡを細胞培養培地に溶解することと、細胞培養培地をＴＩＬ集団と接触させることとを含む。ＴＩＬは、本明細書に記載の第１の集団、第２の集団、及び／または第３の集団であり得る。

【１１３３】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの細胞への送達は、リン酸カルシウム、ＤＭＳＯ、グリセロールもしくはデキストラン、エレクトロポレーションを含む好適な技術分野で認識される方法によって、またはトランスフェクションによって、例えば、当該技術分野で知られている方法、例えば、米国特許第４，８９７，３５５号、同第５，４５９，１２７号、同第５，６３１，２３７号、同第５，９５５，３６５号、同第５，９７６，５６７号、同第１０，０８７，４６４号、及び同第１０，１５５，９４５号、ならびにＢｅｒｇａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１９９３，２１，３５６７（これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載される方法を使用して、カチオン性、アニオン性、もしくは中性脂質組成物またはリポソームを使用して増強され得る。

【１１３４】

いくつかの実施形態では、１つを超えるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡが、標的遺伝子の発現を減少させるために使用されるいくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２及び／またはＣＩＳＨを標的とするｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡのうちの１つ以上が一緒に使用される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１　ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、１つを超える遺伝子標的の発現を減少させるために、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２及び／またはＣＩＳＨのうちの１つ以上とともに使用される。いくつかの実施形態では、ＬＡＧ３　ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、両方の標的の遺伝子発現を減少させるために、ＣＩＳＨを標的とするｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡと組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、本明細書におけるＰＤ－１、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２及び／またはＣＩＳＨのうちの１つ以上を標的とするｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、Ａｄｖｉｒｎａ　ＬＬＣ（Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ，ＭＡ，ＵＳＡ）または複数の他のベンダーから市販されている。

【１１３５】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、別のｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、及びそれらの組み合わせから選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲ

ＮＡは、ＰＤ－１、ならびにＬＡＧ３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３のうちの１つ、及びそれらの組み合わせから選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＥＴ２を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＥＴ２を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＥＴ２を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＥＴ２を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ

は、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＥＴ２を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＥＴ２を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＥＴ２を標的とする。

【１１３６】

本明細書で考察されたように、本発明の実施形態は、それらの治療効果を増強するために遺伝子編集を介して遺伝子修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を提供する。本発明の実施形態は、１つ以上のタンパク質の発現の促進及び１つ以上のタンパク質の発現の阻害の両方、ならびにそれらの組み合わせのために、ＴＩＬ集団へのヌクレオチド挿入（ＲＮＡまたはＤＮＡ）による遺伝子編集を包含する。本発明の実施形態は、ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法も提供し、方法は、ＴＩＬを遺伝子編集することを含む。ＴＩＬ集団を遺伝子修飾するために使用され得るいくつかの遺伝子編集技術が存在し、それらは本発明による使用に好適である。かかる方法は、以下に記載の方法、ならびに本明細書の他の場所に記載のウイルス及びトランスポゾン方法を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを遺伝子修飾してＣＣＲを発現させる方法はまた、かかる遺伝子の安定したノックアウトまたはかかる遺伝子の一過性ノックダウンのいずれかを介して遺伝子の発現を抑制する修飾を含んでもよい。

【１１３７】

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

００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬにおける細孔形成を誘導するステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる、及び（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なり、これにより、誘導された細孔が比較的長期間にわたって持続され、ＴＩＬの生存率が維持される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法（リン酸カルシウムＤＮＡ沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス）は、当該技術分野で知られており、Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９７３，５２，４５６－４６７、Ｗｉｇｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１９７９，７６，１３７３－１３７６、及びＣｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｒｅａ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１９８７，７，２７４５－２７５２、ならびに米国特許第５，５９３，８７５号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、リポソームトランスフェクションステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－ｎ，ｎ，ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）及びジオレオイルホスホチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム製剤を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Ｒｏｓｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １９９１，１０，５２０－５２５及びＦｅｌｇｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８７，８４，７４１３－７４１７、ならびに米国特許第５，２７９，８３３号、同第５，９０８，６３５号、同第６，０５６，９３８号、同第６，１１０，４９０号、同第６，５３４，４８４号、及び同第７，６８７，０７０号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、米国特許第５，７６６，９０２号、同第６，０２５，３３７号、同第６，４１０，５１７号、同第６，４７５，９９４号、及び同第７，１８９，７０５号に記載の方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＴＩＬは、本明細書に記載のＴＩＬの第１の集団、第２の集団、及び／または第３の集団であり得る。

【１１３８】

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

【１１３９】

部位特異的ゲノム編集を可能にするために開発されたヌクレアーゼの主要なクラスには、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写活性化因子様ヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、及びＣＲＩＳＰＲ関連ヌクレアーゼ（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９）が含まれる。これらのヌクレアーゼシステムは、ＤＮＡ認識のモードに基づいて大きく２つのカテゴリーに分類され得、ＺＦＮ及びＴＡＬＥＮは、タンパク質－ＤＮＡ相互作用を介して特定のＤＮＡ結合を達成するが、Ｃａｓ９などのＣＲＩＳＰＲシステムは、標的ＤＮＡと直接塩基対を形成する短いＲＮＡガイド分子によって、かつタンパク質－ＤＮＡ相互作用によって特定のＤＮＡ配列を標的とする。例えば、Ｃｏｘ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２０１５，Ｖｏｌ．２１，Ｎｏ．２を参照されたい。

【１１４０】

本発明のＴＩＬ拡張法に従って使用され得る遺伝子編集法の非限定的な例には、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、及びＺＦＮ法が含まれ、これらは以下でより詳細に説明される。ある実施形態によれば、ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、Ｇｅｎ２）に従って、または米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／０２９９６４４　Ａ１号及び同第ＵＳ２０２０／０１２１７１９　Ａ１号、ならびに米国特許第１０，９２５，９００号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように実行することができ、方法は、増強された治療効果を提供することができるＴＩＬを生成するために、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはＺＦＮ法のうちの１つ以上によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。ある実施形態によれば、遺伝子編集されたＴＩＬは、インビトロでそれらを修飾されていないＴＩＬと比較することによって、例えば、修飾されていないＴＩＬと比較してインビトロでのエフェクター機能、サイトカインプロファイルなどを評価することによって、治療効果の改善について評価され得る。ある特定の実施形態では、この方法は、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、及び／またはＺＦＮ法を使用してＴＩＬ集団を遺伝子編集することを含む。

【１１４１】

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

張法の残りとともに、滅菌閉鎖系を形成する。

【１１４２】

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、Ｇｅｎ２）に従って、または米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／０２９９６４４　Ａ１号及び同第ＵＳ２０２０／０１２１７１９　Ａ１号、ならびに米国特許第１０，９２５，９００号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように実施することができ、方法は、ＣＲＩＳＰＲ法（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１）によってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣＲＩＳＰＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部分においてサイレンシングまたは減少させる。あるいは、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣＲＩＳＰＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部分において増強させる。

【１１４３】

ＣＲＩＳＰＲは、ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ　ｒｅｇｕｌａｒｌｙ　ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ　ｓｈｏｒｔ　ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ　ｒｅｐｅａｔｓ（クラスター化された定期的に間隔をあけた短いパリンドロミックリピート）の略語である。遺伝子編集のためにＣＲＩＳＰＲシステムを使用する方法は、本明細書ではＣＲＩＳＰＲ法とも称される。ＲＮＡ及びＣａｓタンパク質を組み込み、かつ本発明に従って使用され得るＣＲＩＳＰＲシステムには、３つの型：Ｉ型、ＩＩ型、及びＩＩＩ型がある。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ（Ｃａｓ９によって例示される）は、最もよく特徴付けられているシステムのうちの１つである。

【１１４４】

ＣＲＩＳＰＲ技術は、細菌及び古細菌（単細胞微生物のドメイン）の自然防御機構から適合された。これらの生物は、ＣＲＩＳＰＲ由来のＲＮＡ及びＣａｓ９を含む様々なＣａｓタンパク質を使用して、外来侵入物のＤＮＡを切り刻んで破壊することによって、ウイルス及び他の異物による攻撃を阻止する。ＣＲＩＳＰＲは、ヌクレオチド反復配列及びスペーサーの存在という２つの異なる特徴を有するＤＮＡの特殊な領域である。ヌクレオチドの反復配列は、ＣＲＩＳＰＲ領域全体に分布しており、外来ＤＮＡ（スペーサー）の短いセグメントが反復配列の間に散在している。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムでは、スペーサーは、ＣＲＩＳＰＲゲノム遺伝子座内に組み込まれ、転写され、短いＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）に処理される。これらのｃｒＲＮＡは、トランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）にアニーリングし、Ｃａｓタンパク質による病原性ＤＮＡの配列特異的切断及びサイレンシングを指示する。Ｃａｓ９タンパク質による標的認識には、ｃｒＲＮＡ内の「シード」配列、及びｃｒＲＮＡ結合領域の上流にある保存されたジヌクレオチドを含むプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列が必要である。これにより、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムが再標的されて、ｃｒＲＮＡを再設計することにより、実質的にいずれのＤＮＡ配列も切断することができる。天然システムにおけるｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、遺伝子操作で使用するために、およそ１００ヌクレオチドの単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）に簡略化され得る。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼを発現するプラスミドと必要なｃｒＲＮＡ成分を同時送達することにより、ヒト細胞に直接運搬可能である。Ｃａｓタンパク質の異なるバリアント（例えば、Ｃｐｆ１などのＣａｓ９のオルソログ）を使用して、標的の制限を低減することができる。

【１１４５】

ＣＲＩＳＰＲ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡ

ＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが含まれる。

【１１４６】

ＣＲＩＳＰＲ法によりＴＩＬを永久に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１が含まれる。

【１１４７】

ＣＲＩＳＰＲ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第８，６９７，３５９号、同第８，９９３，２３３号、同第８，７９５，９６５号、同第８，７７１，９４５号、同第８，８８９，３５６号、同第８，８６５，４０６号、同第８，９９９，６４１号、同第８，９４５，８３９号、同第８，９３２，８１４号、同第８，８７１，４４５号、同第８，９０６，６１６号、及び同第８，８９５，３０８号に記載されており、各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１を発現するためのプラスミドなどのＣＲＩＳＰＲ法を行うための資源は、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔなどの企業から市販されている。

【１１４８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＴＩＬ集団の遺伝子修飾は、米国特許第ＵＳ９７９０４９０号に記載されているＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１システムを使用して行うことができ、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１１４９】

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、Ｇｅｎ２）に従って、または米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／０２９９６４４　Ａ１号及び同第ＵＳ２０２０／０１２１７１９　Ａ１号、ならびに米国特許第１０，９２５，９００号に記載されているように実施することができ、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれ、方法は、ＴＡＬＥ法によってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部分においてサイレンシングまたは減少させる。あるいは、ＴＩＬ拡張プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部分において増強させる。

【１１５０】

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

【１１５１】

様々な組み立て方法を利用したいくつかの大規模な系統的研究により、ＴＡＬＥ反復配

列を組み合わせて、実質的にすべてのユーザ定義配列を認識することができることが示されている。カスタム設計されたＴＡＬＥアレイも、Ｃｅｌｌｅｃｔｉｓ Ｂｉｏｒｅｓｅａｒｃｈ（Ｐａｒｉｓ，Ｆｒａｎｃｅ）、Ｔｒａｎｓｐｏｓａｇｅｎ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ，ＫＹ，ＵＳＡ）、及びＬｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ，ＵＳＡ）から市販されている。本発明での使用に好適なＴＡＬＥ法及びＴＡＬＥＮ法は、米国特許公開第ＵＳ２０１１／０２０１１１８　Ａ１号、同第ＵＳ２０１３／０１１７８６９　Ａ１号、同第ＵＳ２０１３／０３１５８８４　Ａ１号、同第ＵＳ２０１５／０２０３８７１　Ａ１号、及び同第ＵＳ２０１６／０１２０９０６　Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１１５２】

ＴＡＬＥ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが含まれる。

【１１５３】

ＴＡＬＥ法によりＴＩＬを永久に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－２１が含まれる。

【１１５４】

ＴＡＬＥ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第８，５８６，５２６号に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【１１５５】

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態に従って、または米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／０２９９６４４　Ａ１号及び同第ＵＳ２０２０／０１２１７１９　Ａ１号、ならびに米国特許第１０，９２５，９００号に記載されているように実施することができ、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれ、方法は、ジンクフィンガーまたはジンクフィンガーヌクレアーゼ法によってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンシングまたは減少させる。あるいは、ＴＩＬ拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。

【１１５６】

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

【１１５７】

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

【１１５８】

ジンクフィンガー法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが含まれる。

【１１５９】

ジンクフィンガー法によりＴＩＬを永久に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－２１が含まれる。

【１１６０】

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

【１１６１】

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

【１１６２】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、高親和性ＴＣＲ、例えば、ＭＡＧＥ－１、ＨＥＲ２、もしくはＮＹ－ＥＳＯ－１などの腫瘍関連抗原で標的とされるＴＣＲ、または腫瘍関連細胞表面分子（例えば、メソセリン）もしくは系統制限細胞表面分子（例えば、ＣＤ１

９）に結合するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含むが、これらに限定されない追加の機能を含むように任意選択で遺伝子操作される。ある特定の実施形態では、この方法は、高親和性ＴＣＲ、例えば、ＭＡＧＥ－１、ＨＥＲ２、もしくはＮＹ－ＥＳＯ－１などの腫瘍関連抗原で標的とされるＴＣＲ、または腫瘍関連細胞表面分子（例えば、メソセリン）もしくは系統制限細胞表面分子（例えば、ＣＤ１９）に結合するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含むようにＴＩＬ集団を遺伝子操作することを含む。適切には、ＴＩＬ集団は、本明細書に記載の第１の集団、第２の集団及び／または第３の集団であり得る。

【１１６３】

Ｄ．ＴＩＬ製造のための閉鎖系

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

【１１６４】

かかる閉鎖系は当該技術分野でよく知られており、例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｆｄａ．ｇｏｖ／ｃｂｅｒ／ｇｕｉｄｅｌｉｎｅｓ．ｈｔｍ及びｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｆｄａ．ｇｏｖ／ＢｉｏｌｏｇｉｃｓＢｌｏｏｄＶａｃｃｉｎｅｓ／ＧｕｉｄａｎｃｅＣｏｍｐｌｉａｎｃｅＲｅｇｕｌａｔｏｒｙＩｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ／Ｇｕｉｄａｎｃｅｓ／Ｂｌｏｏｄ／ｕｃｍ０７６７７９．ｈｔｍで見つけることができる。

【１１６５】

滅菌接続装置（ＳＴＣＤ）は、互換性のある２本の管間の滅菌溶接をもたらす。この手順により、様々な容器と管径との滅菌接続が可能になる。いくつかの実施形態では、閉鎖系には、実施例に記載のルアーロック系及びヒートシール系が含まれる。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、閉鎖系の無菌性及び閉鎖性を維持するために、滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、実施例に記載の閉鎖系が用いられる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、実施例において本明細書に記載される方法に従って、最終製品製剤容器に製剤化される。

【１１６６】

いくつかの実施形態では、閉鎖系は、腫瘍断片が得られてから、ＴＩＬを患者に投与するかまたは凍結保存する準備が整うまで、１つの容器を使用する。いくつかの実施形態では、２つの容器が使用される場合、第１の容器は密閉Ｇ容器であり、ＴＩＬ集団が遠心分離され、第１の密閉Ｇ容器を開かずに注入バッグに移される。いくつかの実施形態では、２つの容器が使用される場合、注入バッグは、ＨｙｐｏＴｈｅｒｍｏｓｏｌを含有する注入バッグである。閉鎖系または閉鎖ＴＩＬ細胞培養系は、腫瘍試料及び／または腫瘍断片が追加されると、系が外部からしっかりと密閉され、細菌、真菌、及び／またはいずれの他の微生物汚染も侵入しない閉鎖環境を形成することを特徴とする。

【１１６７】

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

【１１６８】

閉鎖系は、微生物汚染の不在下で及び／または微生物汚染が大幅に低減された状態で、ＴＩＬの成長を可能にする。

【１１６９】

さらに、ＴＩＬ細胞培養環境のｐＨ、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧は各々、細胞が培養されるにつれて変化する。したがって、細胞培養に適切な培地を循環させても、ＴＩＬ

増殖に最適な環境として閉鎖環境を常に一定に維持する必要がある。この目的のために、閉鎖環境の培養液中のｐＨ、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧の物理的要因がセンサーによって監視されること、そのシグナルが培養環境の入口に設置されたガス交換器を制御するために使用されること、及び閉鎖環境のガス分圧が細胞培養環境を最適化するように培養液の変化に応じてリアルタイムで調整されることが望ましい。いくつかの実施形態では、本発明は、閉鎖環境のｐＨ、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧を測定する監視装置を備えたガス交換器を閉鎖環境の入口に組み込み、かつ監視装置からのシグナルに基づいてガス濃度を自動的に調整することによって細胞培養環境を最適化する閉鎖細胞培養系を提供する。

【１１７０】

いくつかの実施形態では、閉鎖環境内の圧力は、連続的または断続的に制御される。すなわち、閉鎖環境内の圧力を、例えば、圧力維持装置によって変化させることができ、それ故に、空間が正圧状態でＴＩＬの成長に好適であることを確実にするか、または負圧状態で流体の浸出を促進し、ひいては細胞増殖を促進する。さらに、負圧を断続的に加えることにより、閉鎖環境内の体積の一時的な収縮によって、閉鎖環境内の循環液体を均一かつ効率的に置き換えることが可能である。

【１１７１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの増殖に最適な培養成分を置換または追加することができ、ＩＬ－２及び／またはＯＫＴ３などの因子、ならびに組み合わせを追加することができる。

【１１７２】

Ｅ．ＴＩＬの任意選択の凍結保存

バルクＴＩＬ集団（例えば、第２のＴＩＬ集団）または拡張されたＴＩＬ集団（例えば、第３のＴＩＬ集団）のいずれかを、任意選択で凍結保存することができる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、治療的ＴＩＬ集団に起こる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、第２の拡張後に採取されたＴＩＬに起こる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）の例示的なステップＦにおいてＴＩＬに起こる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、注入バッグ内で凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、注入バッグに入れる前に凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、凍結保存され、注入バッグに入っていない。いくつかの実施形態では、凍結保存は、凍結保存培地を使用して行われる。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含有する。これは、一般に、ＴＩＬ集団を凍結溶液、例えば、８５％補体不活性化ＡＢ血清及び１５％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に入れることによって達成される。溶液中の細胞が極低温バイアルに入れられ、－８０℃で２４時間保存され、任意選択で凍結保存のためにガス状窒素冷凍庫に移される。Ｓａｄｅｇｈｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｃｔａ　Ｏｎｃｏｌｏｇｉｃａ　２０１３，５２，９７８－９８６を参照されたい。

【１１７３】

適切な場合、細胞が冷凍庫から取り出され、溶液のおよそ５分の４が解凍されるまで３７℃の水浴中で解凍される。細胞は、一般に、完全培地中に再懸濁され、任意で１回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍されたＴＩＬは、当該技術分野で知られているように計数され、生存率について評価され得る。

【１１７４】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、ＣＳ１０凍結保存培地（ＣｒｙｏＳｔｏｒ１０、ＢｉｏＬｉｆｅ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ）を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含有する凍結保存培地を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、１：１（体積：体積）比のＣＳ１０及び細胞培養培地を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、約１：１（体積：体積）比のＣＳ１０及び細胞培養培地を使用して凍結保存され、追加のＩＬ－２をさらに含む。

【１１７５】
上で考察され、図１及び／または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供されるようなステップＡ～Ｅにおいて例示されるように、凍結保存は、ＴＩＬ拡張プロセス全体の様々な時点で起こり得る。いくつかの実施形態では、第１の拡張後のＴＩＬの拡張集団（例えば、ステップＢに従って提供される）または図１もしくは８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＤによる１回以上の第２の拡張後のＴＩＬの拡張集団を凍結保存することができる。凍結保存は、一般に、ＴＩＬ集団を凍結溶液、例えば、８５％補体不活性化ＡＢ血清及び１５％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に入れることによって達成され得る。溶液中の細胞が極低温バイアルに入れられ、－８０℃で２４時間保存され、任意選択で凍結保存のためにガス状窒素冷凍庫に移される。Ｓａｄｅｇｈｉ，ｅｔａｌ．，Ａｃｔａ　Ｏｎｃｏｌｏｇｉｃａ　２０１３，５２，９７８－９８６を参照されたい。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、５％　ＤＭＳＯ中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、５％　ＤＭＳＯを加えた細胞培養培地中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、実施例６に提供される方法に従って凍結保存される。

【１１７６】
適切な場合、細胞が冷凍庫から取り出され、溶液のおよそ５分の４が解凍されるまで３７℃の水浴中で解凍される。細胞は、一般に、完全培地中に再懸濁され、任意で１回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍されたＴＩＬは、当該技術分野で知られているように計数され、生存率について評価され得る。

【１１７７】
場合によっては、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＢのＴＩＬ集団は、以下に論じられるプロトコルを使用して、直ちに凍結保存され得る。あるいは、バルクＴＩＬ集団を、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＣ及びステップＤに供し、その後、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＤの後に凍結保存することができる。同様に、遺伝子修飾されたＴＩＬが治療法に使用される場合、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＢまたはステップＤのＴＩＬ集団を、好適な治療のために遺伝子修飾に供することができる。

【１１７８】
Ｆ．拡張ＴＩＬの表現型特徴
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書及び実施例に記載されているものを含む、拡張後の多数の表現型マーカーの発現について分析される。いくつかの実施形態では、１つ以上の表現型マーカーの発現が調べられる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＢにおける第１の拡張後に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＣにおける遷移中に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＣによる移行中及び凍結保存後に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＤにおける第２の拡張後に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＤによる２回以上の拡張後に分析される。

【１１７９】

いくつかの実施形態では、マーカーは、ＣＤ８及びＣＤ２８からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＣＤ８の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、ＣＤ２８の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、ＣＤ８及び／またはＣＤ２８の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供される２Ａプロセスと比較して、現行の発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、ＣＤ８の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば図８Ｂ）に提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供される２Ａプロセスと比較して、現行の発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、ＣＤ２８の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば図８Ａ）に提供される２Ａプロセスと比較して、現行の発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、高いＣＤ２８発現は、より若く、より持続的なＴＩＬ表現型を示す。いくつかの実施形態では、１つ以上の調節マーカーの発現が測定される。

【１１８０】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８及び／またはＣＤ２８に基づく第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、第３のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団の選択は、本明細書に記載の腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を拡張するための方法のいずれのステップ中にも行われない。

【１１８１】

いくつかの実施形態では、セントラルメモリー細胞のパーセンテージは、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば図８Ａ）に提供される２Ａプロセスと比較して、現行の発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、セントラルメモリー細胞のメモリーマーカーは、ＣＣＲ７及びＣＤ６２Ｌからなる群から選択される。

【１１８２】

いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬメモリーサブセットは、異なるメモリーサブセットに分類され得る。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、ナイーブ（ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＤ６２Ｌ＋）ＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、セントラルメモリー（ＣＭ、ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ６２Ｌ＋）ＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、エフェクターメモリー（ＥＭ、ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ６２Ｌ－）ＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、ＲＡ＋エフェクターメモリー／エフェクター（ＴＥＭＲＡ／ＴＥＦＦ、ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＤ６２Ｌ＋）ＴＩＬを含む。

【１１８３】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、グランザイムＢ、パーフォリン、及びグラニュライシンからなる群から選択されるもう１つのマーカーを発現する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、グランザイムＢを発現する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、パーフォリンを発現する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、グラニュライシンを発現する。

【１１８４】

いくつかの実施形態では、再刺激されたＴＩＬは、サイトカイン放出アッセイを使用して、サイトカイン放出についても評価され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、インターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）分泌について評価され得る。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、ＥＬＩＳＡアッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／ま

たは図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供されるように、ステップＤの後の急速な第２の拡張ステップの後のＥＬＩＳＡアッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの健康は、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）分泌によって測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、活性なＴＩＬを示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ産生の効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能の別の尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、ＣＤ３、ＣＤ２８、及びＣＤ１３７／４－１ＢＢに対する抗体で刺激されたＴＩＬの培地中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することによって測定され得る。これらの刺激されたＴＩＬからの培地中のＩＦＮ－γレベルは、ＩＦＮ－γ放出を測定することによって決定され得る。いくつかの実施形態では、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ）に提供される２Ａプロセスのステップと比較した、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供される、例えば、Ｇｅｎ３プロセスのステップにおけるステップＤのＴＩＬの細胞傷害能の増加を示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、３倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、４倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、５倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＥＬＩＳＡキットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、エクスビボでのＴＩＬ中で測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば図８Ｂの方法を含む、本発明の方法によって産生されたＴＩＬを含む、ＴＩＬにおいてエクスビボで測定される。

【１１８５】

いくつかの実施形態では、少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【１１８６】

いくつかの実施形態では、少なくとも１００ｐｇ／ｍＬ～約１０００ｐｇ／ｍＬ以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも２５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも３００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも３５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも４００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも４５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも５５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも６００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも６５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも７００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも７５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも８００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも８５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも９００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも９５０ｐｇ／ｍＬ、または少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬ以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ

及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施

形態では、少なくとも１０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１５，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２５，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３５，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４５，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【１１８７】

いくつかの実施形態では、少なくとも１００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも２５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも３００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも３５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも４００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも４５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも５５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも６００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも６５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも７００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも７５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも８００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも８５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも９００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも９５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、または少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例

えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１５，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬで

ある。いくつかの実施形態では、少なくとも２５，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３５，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４５，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【１１８８】

Ｔリンパ球及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、及びＣ（一定）は、免疫グロブリン及びＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって得られたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬ及び／または例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬ及び／または図８（特に、例えば図８Ａ）に例示されるようにＧｅｎ２と称される方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第１の拡張で取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセス（例えば、Ｇｅｎ３プロセス）は、他のプロセス、例えば、試料中の固有のペプチドＣＤＲの数に基づくＧｅｎ２と称されるプロセスと比較して、より高いクローン多様性を示す。

【１１８９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの活性化及び疲弊は、１つ以上のマーカーを調べることによって決定され得る。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊は、多色フローサイトメトリーを使用して決定され得る。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊のマーカ

ーには、ＣＤ３、ＰＤ－１、２Ｂ４／ＣＤ２４４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＢＴＬＡ、ＫＬＲＧ、ＴＩＭ－３、ＣＤ１９４／ＣＣＲ４、ＣＤ４、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ１８３、ＣＤ６９、ＣＤ９５、ＣＤ１２７、ＣＤ１０３、及び／またはＬＡＧ－３）からなる群から選択される１つ以上のマーカーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊のマーカーには、ＢＴＬＡ、ＣＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、Ｋｉ６７、ＬＡＧ－３、ＰＤ－１、ＴＩＧＩＴ、及び／またはＴＩＭ－３からなる群から選択される１つ以上のマーカーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊のマーカーには、ＢＴＬＡ、ＣＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、Ｋｉ６７、ＬＡＧ－３、ＣＤ１０３＋／ＣＤ６９＋、ＣＤ１０３＋／ＣＤ６９－、ＰＤ－１、ＴＩＧＩＴ及び／またはＴＩＭ－３からなる群から選択される１つ以上のマーカーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞マーカー（活性化及び疲弊マーカーを含む）は、Ｔ細胞の活性化、阻害、または機能を調べるために決定及び／または分析され得る。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞マーカーには、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ３、ＦｏｘＰ３、Ｔｉｍ－３、ＰＤ－１、ＣＤ１０３、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＢＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、Ｋｉ６７、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ４５、ＣＤ４、及び／またはＣＤ５９からなる群から選択される１つ以上のマーカーが含まれ得るが、これらに限定されない。

【１１９０】

いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超～３０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ以上のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、５０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、７０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、９０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１１０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１５０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１７０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１９０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、４００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、６００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、８００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１２００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１４００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１６００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１８００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２２００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２４００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２６０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２８０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、３０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超またはそれ以上のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、５０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、７０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、９０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１１０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１５０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図

８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１７０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１９０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、４００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、６００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、８００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１２００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１４００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１６００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１８００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２２００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２４００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２６０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２８００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超～３０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ以上のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施

形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、５０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、７０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、９０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１１０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１５０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１７０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１９０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、４００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、６００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、８００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１２００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１４００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１６００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、１８０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２２０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２４０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２６０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、２８０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超、３００００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超またはそれ以上のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、５０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、７０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、９０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１１０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１５０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１７０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの
実施形態では、１９０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、４００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、６００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、８００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いく

つかの実施形態では、１２０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１４０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１６０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１８０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２２０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２４０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２６０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２８０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【１１９１】

いくつかの実施形態では、１０００ｐｇ／ｍＬ超～３０００００ｐｇ／ｍＬ以上のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００ｐｇ／ｍＬ超、２０００ｐｇ／ｍＬ超、３０００ｐｇ／ｍＬ超、４０００ｐｇ／ｍＬ超、５０００ｐｇ／ｍＬ超、６０００ｐｇ／ｍＬ超、７０００ｐｇ／ｍＬ超、８０００ｐｇ／ｍＬ超、９０００ｐｇ／ｍＬ超、１００００ｐｇ／ｍＬ超、２００００ｐｇ／ｍＬ超、３００００ｐｇ／ｍＬ超、４００００ｐｇ／ｍＬ超、５００００ｐｇ／ｍＬ超、６００００ｐｇ／ｍＬ超、７００００ｐｇ／ｍＬ超、８００００ｐｇ／ｍＬ超、９００００ｐｇ／ｍＬ超、１０００００ｐｇ／ｍＬ超またはそれ以上のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、４０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、５０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ

及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、６０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、７０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、８０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、９０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、４００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、５００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、６００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、７００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、８００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、９００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１２０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１４０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、ＴＩＬグランザイムＢ分泌は、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１６０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１８０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いく

つかの実施形態では、２２０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２４０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２６０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２８０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３００００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【１１９２】

いくつかの実施形態では、本発明の拡張方法は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄに提供されるようなＴＩＬを含む、インビトロで増加したグランザイムＢ分泌を示す拡張されたＴＩＬ集団を産生する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも１倍～５０倍以上増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、１倍、少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、少なくとも９倍、少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも３０倍、少なくとも４０倍、少なくとも５０倍以上増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも１倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも２倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも３倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも４倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも５倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも６倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも７倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも８倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも９倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも１０倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも２０倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも３０倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも４０倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも５０倍増加する。

【１１９３】

いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも１倍、２倍、３倍、

４倍、または５倍以上低いレベルのＴＮＦ－α（すなわち、ＴＮＦ－アルファ）分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも１倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも２倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも３倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも４倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも５倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【１１９４】

いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α（すなわち、ＴＮＦ－アルファ）分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では

、少なくとも８０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【１１９５】

いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ及びグランザイムＢのレベルを測定して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬの表現型特徴を決定する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ及びＴＮＦ－αのレベルを測定して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬの表現型特徴を決定する。いくつかの実施形態では、グランザイムＢ及びＴＮＦ－αのレベルを測定して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬの表現型特徴を決定する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ、グランザイムＢ及びＴＮＦ－αのレベルを測定して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬの表現型特徴を決定する。

【１１９６】

いくつかの実施形態では、表現型特徴付けは、凍結保存後に調べられる。

【１１９７】

Ｇ．追加のプロセスの実施形態

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、（ａ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行うことであって、プライミングによる第１の拡張を約１～７日間または約１～８日間行って第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、プライミングによる第１の拡張を行うことと、（ｃ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地と接触させて急速な第２の拡張を行って、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張を約１～１１日間または約１～１０日間行って第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間、または約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移すこととによって、培養のスケールアップを達成し、第２の容器内で、小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団が、より大規模な培養で約４～７日間、または約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかか

る第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、第２の小規模培養で約４～７日間、または約約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間、または約２～４日間培養することによって急速な第２の増殖を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約４～７日間、または約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約５～７日間培養される。

【１１９８】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、（ａ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行うことであって、プライミングによる第１の拡張を約１～８日間行って第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、プライミングによる第１の拡張を行うことと、（ｃ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地と接触させて急速な第２の拡張を行って、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張を約１～８日間行って第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移すこととによって、培養のスケールアップを達成し、第２の容器内で、小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団が、より大規模な培養で約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、第２の小規模培養で約４～６日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、

１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約４～６日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の増殖を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約４～５日間培養される。

【１１９９】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、（ａ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行うことであって、プライミングによる第１の拡張を約１～７日間行って第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、プライミングによる第１の拡張を行うことと、（ｃ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地と接触させて急速な第２の拡張を行って、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張を約１～１１日間行って第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移すことによって、培養のスケールアップを達成し、第２の容器内で、小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、第２の小規模培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約４日間培養すること

によって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－ｇ５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約５日間培養される。

【１２００】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団を、外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）をさらに含む培養培地と接触させることによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）における培養培地中のＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）における培養培地中のＡＰＣの数よりも多い、方法を提供する。

【１２０１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において培養培地に追加の外因性ＡＰＣが補充されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２０２】

他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２０：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２０３】

他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２０４】

他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約９：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２０５】

他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約８：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２０６】

他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約７：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２０７】

他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約６：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２０８】

他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２０９】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１０】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１１】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１２】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１３】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１４】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１５】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１６】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１７】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１８】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２１９】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２２０】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２２１】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２２２】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２２３】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２２４】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２２５】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２２６】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２２７】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２２８】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２２９】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２３０】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２３１】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２３２】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２３３】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２３４】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１になるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２３５】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．１：１、２．２：１、２．３：１、２．４：１、２．５：１、２．６：１、２．７：１、２．８：１、２．９：１、３：１、３．１：１、３．２：１、３．３：１、３．４：１、３．５：１、３．６：１、３．７：１、３．８：１、３．９：１、４：１、４．１：１、４．２：１、４．３：１、４．４：１、４．５：１、４．６：１、４．７：１、４．８：１、４．９：１、または５：１になるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２３６】
他の実施形態では、本発明は、一次の第１の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約1×10^8、1.1×10^8、1.2×10^8、1.3×10^8、1.4×10^8、1.5×10^8、1.6×10^8、1.7×10^8、1.8×10^8、1.9×10^8、2×10^8、2.1×10^8、2.2×10^8、2.3×10^8、2.4×10^8、2.5×10^8、2.6×10^8、2.7×10^8、2.8×10^8、2.9×10^8、3×10^8、3.1×10^8、3.2×10^8、3.3×10^8、3.4×10^8、または3.5×10^8ＡＰＣになるように、かつ急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約3.5×10^8、3.6×10^8、3.7×10^8、3.8×10^8、3.9×10^8、4×10^8、4.1×10^8、4.2×10^8、4.3×10^8、4.4×10^8、4.5×10^8、4.6×10^8、4.7×10^8、4.8×1

０^{8}、４．９×１０^{8}、５×１０^{8}、５．１×１０^{8}、５．２×１０^{8}、５．３×１０^{8}、５．４×１０^{8}、５．５×１０^{8}、５．６×１０^{8}、５．７×１０^{8}、５．８×１０^{8}、５．９×１０^{8}、６×１０^{8}、６．１×１０^{8}、６．２×１０^{8}、６．３×１０^{8}、６．４×１０^{8}、６．５×１０^{8}、６．６×１０^{8}、６．７×１０^{8}、６．８×１０^{8}、６．９×１０^{8}、７×１０^{8}、７．１×１０^{8}、７．２×１０^{8}、７．３×１０^{8}、７．４×１０^{8}、７．５×１０^{8}、７．６×１０^{8}、７．７×１０^{8}、７．８×１０^{8}、７．９×１０^{8}、８×１０^{8}、８．１×１０^{8}、８．２×１０^{8}、８．３×１０^{8}、８．４×１０^{8}、８．５×１０^{8}、８．６×１０^{8}、８．７×１０^{8}、８．８×１０^{8}、８．９×１０^{8}、９×１０^{8}、９．１×１０^{8}、９．２×１０^{8}、９．３×１０^{8}、９．４×１０^{8}、９．５×１０^{8}、９．６×１０^{8}、９．７×１０^{8}、９．８×１０^{8}、９．９×１０^{8}、または１×１０^{9}ＡＰＣになるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２３７】

他の実施形態では、本発明は、一次の第１の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約１×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約３．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約３．５×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約１×１０^{9}ＡＰＣの範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２３８】

他の実施形態では、本発明は、一次の第１の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約１．５×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約３×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約４×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約７．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２３９】

他の実施形態では、本発明は、一次の第１の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約２×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約２．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約４．５×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約５．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２４０】

他の実施形態では、本発明は、正確にまたは約２．５×１０^{8}ＡＰＣが一次の第１の拡張に追加され、かつ正確にまたは約５×１０^{8}ＡＰＣが急速な第２の増殖に追加されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２４１】

他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２４２】

他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍断片が複数の別個の容器に分配され、それらの別個の容器の各々内で、第１のＴＩＬ集団がステップ（ａ）において取得され、第２のＴＩＬ集団がステップ（ｂ）において取得され、第３のＴＩＬ集団がステップ（ｃ）において取得され、ステップ（ｃ）における複数の容器からの治療的ＴＩＬ集団が組み合わせられて、ステップ（ｄ）からの採取されたＴＩＬ集団を産生するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２４３】

他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍が複数の別個の容器に均一に分配されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２４４】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が少なくとも２個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２４５】
他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～２０個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２４６】
他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～１５個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２４７】
他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～１０個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２４８】
他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～５個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２４９】
他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２５０】
他の実施形態では、本発明は、プライミングによる第１の拡張がステップ（ｂ）において第１のＴＩＬ集団で行われる各容器の場合、ステップ（ｃ）における急速な第２の拡張が、同じ容器内でかかる第１のＴＩＬ集団から産生された第２のＴＩＬ集団で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２５１】
他の実施形態では、本発明は、別個の容器の各々が第１のガス透過性表面積を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２５２】
他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍断片が単一の容器に分配されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２５３】
他の実施形態では、本発明は、単一の容器が第１のガス透過性表面積を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２５４】
他の実施形態では、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１細胞層～正確にまたは約３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化される、方法を提供する。
【１２５５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１．５細胞層～正確にまたは約２．５細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２５６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約２細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２５７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２

．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２５８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３細胞層～正確にまたは約１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２５９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２６０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２６１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２６２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む第１の容器内で行われ、ステップ（ｃ）において、急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む第２の容器内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２６３】

他の実施形態では、本発明は、第２の容器が第１の容器よりも大きいように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２６４】

他の実施形態では、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１細胞層～正確にまたは約３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化される、方法を提供する。

【１２６５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１．５細胞層～正確にまたは約２．５細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２６６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約２細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２６７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１

、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２６８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３細胞層～正確にまたは約１０細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２６９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２７０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２７１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２７２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む第１の容器内で行われ、ステップ（ｃ）において、急速な第２の拡張が、第１の容器内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２７３】

他の実施形態では、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１細胞層～正確にまたは約３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化される、方法を提供する。

【１２７４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１．５細胞層～正確にまたは約２．５細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２７５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約２細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２７６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細

胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２７７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３細胞層～正確にまたは約１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２７８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２７９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２８０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２８１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：１０の範囲から選択される、方法を提供する。

【１２８２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：９の範囲から選択される、方法を提供する。

【１２８３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：８の範囲から選択される、方法を提供する。

【１２８４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われる

ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：７の範囲から選択される、方法を提供する。

【１２８５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：６の範囲から選択される、方法を提供する。

【１２８６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：５の範囲から選択される、方法を提供する。

【１２８７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：４の範囲から選択される、方法を提供する。

【１２８８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：３の範囲から選択される、方法を提供する。

【１２８９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：２の範囲から選択される、方法を提供する。

【１２９０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣ

の数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．２～正確にまたは約１：８の範囲から選択される、方法を提供する。

【１２９１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．３～正確にまたは約１：７の範囲から選択される、方法を提供する。

【１２９２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．４～正確にまたは約１：６の範囲から選択される、方法を提供する。

【１２９３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．５～正確にまたは約１：５の範囲から選択される、方法を提供する。

【１２９４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．６～正確にまたは約１：４の範囲から選択される、方法を提供する。

【１２９５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．７～正確にまたは約１：３．５の範囲から選択される、方法を提供する。

【１２９６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．

８～正確にまたは約１：３の範囲から選択される、方法を提供する。

【１２９７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．９～正確にまたは約１：２．５の範囲から選択される、方法を提供する。

【１２９８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：２の範囲から選択される、方法を提供する。

【１２９９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１、１：１．２、１：１．３、１：１．４、１：１．５、１：１．６、１：１．７、１：１．８、１：１．９、１：２、１：２．１、１：２．２、１：２．３、１：２．４、１：２．５、１：２．６、１：２．７、１：２．８、１：２．９、１：３、１：３．１、１：３．２、１：３．３、１：３．４、１：３．５、１：３．６、１：３．７、１：３．８、１：３．９、１：４、１：４．１、１：４．２、１：４．３、１：４．４、１：４．５、１：４．６、１：４．７、１：４．８、１：４．９、１：５、１：５．１、１：５．２、１：５．３、１：５．４、１：５．５、１：５．６、１：５．７、１：５．８、１：５．９、１：６、１：６．１、１：６．２、１：６．３、１：６．４、１：６．５、１：６．６、１：６．７、１：６．８、１：６．９、１：７、１：７．１、１：７．２、１：７．３、１：７．４、１：７．５、１：７．６、１：７．７、１：７．８、１：７．９、１：８、１：８．１、１：８．２、１：８．３、１：８．４、１：８．５、１：８．６、１：８．７、１：８．８、１：８．９、１：９、１：９．１、１：９．２、１：９．３、１：９．４、１：９．５、１：９．６、１：９．７、１：９．８、１：９．９、または１：１０から選択される、方法を提供する。

【１３００】

他の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数に対する比が、正確にまたは約１．５：１～正確にまたは約１００：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３０１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数に対する比が、正確にまたは約５０：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３０２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数に対する比が、正確にまたは約２５：１であるように修正された、

上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３０３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数に対する比が、正確にまたは約２０：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３０４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数に対する比が、正確にまたは約１０：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３０５】
他の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団の数が、第１のＴＩＬ集団よりも少なくとも正確にまたは約５０倍多いように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３０６】
他の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団の数が、第１のＴＩＬ集団よりも少なくとも正確にまたは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、または５０倍多いように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３０７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第２の期間の開始の正確にまたは約２日または正確にまたは約３日後に、細胞培養培地に追加のＩＬ－２が補充されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３０８】
他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｄ）において採取されたＴＩＬ集団を凍結保存するステップをさらに含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３０９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）の後に、（ｅ）ステップ（ｄ）から採取したＴＩＬ集団を、任意選択でＨｙｐｏＴｈｅｒｍｏｓｏｌを含有する注入バッグに移す追加のステップを行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３１０】
他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｅ）において採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３１１】
他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスが、１：１の採取されたＴＩＬ集団の凍結保存培地に対する比を使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３１２】
他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３１３】
他の実施形態では、本発明は、ＰＢＭＣが放射線照射され、かつ同種異系であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３１４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において細胞培養に追加されるＡＰＣの総数が2.5×10^{8}であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれか

に記載の方法を提供する。

【１３１５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において細胞培養に追加されるＡＰＣの総数が5×10^{8}であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３１６】

他の実施形態では、本発明は、ＡＰＣがＰＢＭＣであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３１７】

他の実施形態では、本発明は、ＰＢＭＣが放射線照射され、かつ同種異系であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３１８】

他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が人工抗原提示細胞であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３１９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）での採取が膜ベースの細胞処理システムを使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）での採取がＬＯＶＯ細胞処理システムを使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約１０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約１５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約２０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約２５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約３０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約３５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約４０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３２９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約４５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３３０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約５０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３３１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、または６０個の断片（複数可）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３３２】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２７ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３３３】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２０ｍｍ^3～正確にまたは約５０ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３３４】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２１ｍｍ^3～正確にまたは約３０ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３３５】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２２ｍｍ^3～正確にまたは約２９．５ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３３６】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２３ｍｍ^3～正確にまたは約２９ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３３７】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２４ｍｍ^3～正確にまたは約２８．５ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３３８】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２５ｍｍ^3～正確にまたは約２８ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３３９】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２６．５ｍｍ^3～正確にまたは約２７．５ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいず

れかに記載の方法を提供する。

【１３４０】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、または５０mm^3の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３４１】

他の実施形態では、本発明は、複数の断片が正確にまたは約３０～正確にまたは約６０個の断片を含み、正確にまたは約１３００mm^3～正確にまたは約１５００mm^3の総体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３４２】

他の実施形態では、本発明は、複数の断片が正確にまたは約５０個の断片を含み、正確にまたは約１３５０mm^3の総体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３４３】

他の実施形態では、本発明は、複数の断片が正確にまたは約５０個の断片を含み、正確にまたは約１グラム～正確にまたは約１．５グラムの総質量を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３４４】

他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地がＧ容器またはＸｕｒｉセルバッグである容器内に提供されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３４５】

他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地中のＩＬ－２濃度が約１０，０００ＩＵ／ｍＬ～約５０００ＩＵ／ｍＬであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３４６】

他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地中のＩＬ－２濃度が約６，０００ＩＵ／ｍＬであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３４７】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地がジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３４８】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地が７％～１０％ＤＭＳＯを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３４９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）における第１の期間が正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日の期間内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３５０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第２の期間が正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３５１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）における第１の期間及びステップ（ｃ）における第２の期間が各々、正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、また

は７日の期間内に個別に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３５２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）における第１の期間及びステップ（ｃ）における第２の期間が各々、正確にまたは約５日、６日、または７日の期間内に個別に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３５３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）における第１の期間及びステップ（ｃ）における第２の期間が各々、正確にまたは約７日の期間内に個別に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３５４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３５５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３５６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１６日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３５７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１７日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３５８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日～正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３５９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日～正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３６０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１６日～正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３６１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日～正確にまたは約１６日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３６２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日～正確にまたは約１６日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３６３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提

供する。
【１３６４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３６５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１６日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３６６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３６７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３６８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３６９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３７０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１６日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３７１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１８日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３７２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）で採取された治療的ＴＩＬ集団が、ＴＩＬの治療上有効な投与量に十分なＴＩＬを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３７３】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量に十分なＴＩＬの数が、正確にまたは約２．３×１０^{10}～正確にまたは約１３．７×１０^{10}であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３７４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３７５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍～５倍以上のインターフェロンガンマ産生を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのい

ずれかに記載の方法を提供する。
【１３７６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍～５倍以上のインターフェロンガンマ産生を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３７７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍～５倍以上のインターフェロンガンマ産生を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３７８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）の第３のＴＩＬ集団から取得されたエフェクターＴ細胞及び／またはセントラルメモリーＴ細胞が、ステップ（ｂ）の第２の細胞集団から取得されたエフェクターＴ細胞及び／またはセントラルメモリーＴ細胞と比較して増加したＣＤ８及びＣＤ２８発現を示すように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３７９】
他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器が密閉容器であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３８０】
他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧ容器であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３８１】
他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧＲＥＸ－１０であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３８２】
他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧＲＥＸ－１００であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３８３】
他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧＲＥＸ－５００であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３８４】
他の実施形態では、本発明は、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法によって作製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供する。
【１３８５】
他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団であって、治療的ＴＩＬ集団が、抗原提示細胞（ＡＰＣ）またはＯＫＴ３を添加せずにＴＩＬの第１の拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。
【１３８６】
他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団であって、治療的ＴＩＬ集団が、抗原提示細胞（ＡＰＣ）を添加せずにＴＩＬの第１の拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。
【１３８７】
他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団であって、治療的ＴＩＬ集団が、ＯＫＴ３を添加せずにＴＩＬの第１の

拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

【１３８８】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団であって、治療的ＴＩＬ集団が、抗原提示細胞（ＡＰＣ）を添加せず、かつＯＫＴ３を添加せずにＴＩＬの第１の拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

【１３８９】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団であって、１６日間より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、治療的ＴＩＬ集団が、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

【１３９０】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団であって、１７日間より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、治療的ＴＩＬ集団が、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

【１３９１】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団であって、１８日間より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、治療的ＴＩＬ集団が、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

【１３９２】

他の実施形態では、本発明は、増加したインターフェロンガンマ産生を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【１３９３】

他の実施形態では、本発明は、増加したポリクローン性を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載された治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【１３９４】

他の実施形態では、本発明は、増加した有効性を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【１３９５】

他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少な

くとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。
【１３９６】
他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。
【１３９７】
他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。
【１３９８】
他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）を添加せずにＴＩＬの第１の拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。
【１３９９】
他の実施形態では、本発明は、ＯＫＴ３を添加せずにＴＩＬの第１の拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。
【１４００】

他の実施形態では、本発明は、ＡＰＣを添加せずにＴＩＬの第１の拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【１４０１】

他の実施形態では、本発明は、ＯＫＴ３を添加せずにＴＩＬの第１の拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【１４０２】

他の実施形態では、本発明は、ＡＰＣを添加せずにＴＩＬの第１の拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【１４０３】

他の実施形態では、本発明は、ＯＫＴ３を添加せずにＴＩＬの第１の拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【１４０４】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が、小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物であるように修正された、上記の該当する前の段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【１４０５】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片がコア生検であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４０６】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が細針吸引物であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４０７】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が小生検（例えば、パンチ生検を含む）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４０８】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片がコア針生検であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４０９】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１つ以上の小生検

（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から第１のＴＩＬ集団を得ることを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、約８日間にわたってプライミングによる第１の拡張を行うことを含み、かつ（ｉｖ）方法が、約１１日間にわたって急速な第２の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【１４１０】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から第１のＴＩＬ集団を得ることを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、約８日間にわたってプライミングによる第１の拡張を行うことを含み、かつ（ｉｖ）方法が、第２のＴＩＬ集団の培養物を約５日間培養し、培養物を最大５つの継代培養物に分割し、かつ継代培養物を約６日間培養することによって、急速な第２の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、最大５つの継代培養物が各々、第２のＴＩＬ集団の培養が急速な第２の拡張で開始される容器と同じサイズのまたはそれよりも大きい容器内で培養される。前述の実施形態のうちのいくつかでは、第２のＴＩＬ集団の培養物は、最大５つの継代培養物間で均等に分けられる。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【１４１１】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４１２】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４１３】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４１４】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４１５】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４１６】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０

個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４１７】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４１８】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４１９】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２０】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２１】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２２】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２３】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２４】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２５】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２６】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２７】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２８】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２９】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４３０】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４３１】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア生検から第１のＴＩＬ集団を得ることを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む培養培地中で約８日間培養することによってプライミングによる第１の拡張ステップを行い、第２のＴＩＬ集団を取得することを含み、かつ（ｉｖ）方法が、第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む培養培地中で約１１日間培養することによって急速な第２の拡張ステップを行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【１４３２】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア生検から第１のＴＩＬ集団を取得することを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む培養培地中で約８日間培養することによってプライミングによる第１の拡張ステップを行い、第２のＴＩＬ集団を取得することを含み、かつ（ｉｖ）方法が、第２のＴＩＬ集団の培養物を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む培養培地中で約５日間培養し、培養物を最大５つの継代培養物に分割し、かつ継代培養物の各々を、ＩＬ－２を含む培養培地中で約６日間培養することによって、急速な第２の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、最大５つの継代培養物が各々、第２のＴＩＬ集団の培養が急速な第２の拡張で開始される容器と同じサイズのまたはそれよりも大きい容器内で培養される。前述の実施形態のうちのいくつかでは、第２のＴＩＬ集団の培養物は、最大５つの継代培養物間で均等に分けられる。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【１４３３】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア生検から第１のＴＩＬ集団を取得することを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、Ｇ－ＲＥＸ－１００Ｍフラスコ内の０．５ＬのＣＭ１培養培地中６０００ＩＵ　ＩＬ－２／ｍＬを含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、６０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬ　ＯＫＴ－３、及び約10^8個のフィーダー細胞を含む０．５ＬのＣＭ１培養培地を添加し、約８日間培養することによって、プライミングによる第１の

拡張を行うことを含み、かつ（ｉｖ）方法が、（ａ）第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬ　ＯＫＴ－３、及び５×１０^{9}個のフィーダー細胞を有する５ＬのＣＭ２培養培地を含むＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコに移し、約５日間培養し、（ｂ）１０^{9}個のＴＩＬを、３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２を有する５ＬのＡＩＭ－Ｖ培地を含む最大５つのＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコの各々に移すことによって培養物を最大５つの継代培養物に分割し、継代培養物を約６日間培養することによって、急速な第２の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【１４３４】

他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞を拡張する方法であって、（ａ）第１のＴ細胞集団を培養することによってドナーから取得された第１のＴ細胞集団のプライミングによる第１の拡張を行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、（ｂ）ステップ（ａ）においてプライミングされた第１のＴ細胞集団の活性化が減衰し始めた後、第１のＴ細胞集団を培養することによって第１のＴ細胞集団の急速な第２の拡張を行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、（ｃ）第２のＴ細胞集団を採取することと、を含む、Ｔ細胞を拡張する方法を提供する。他の実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養での第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第２の容器内でのより大規模な培養で約４～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。他の実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、第２の小規模培養で約４～７日間培養される。他の実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。他の実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約５日間培養される。

【１４３５】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容

器内での小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養での第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第２の容器内でのより大規模な培養で約５～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４３６】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、第２の小規模培養で約５～７日間培養される。

【１４３７】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約５～７日間培養される。

【１４３８】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約５～６日間培養される。

【１４３９】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約５日間培養される。

【１４４０】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での

小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約６日間培養される。

【１４４１】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約７日間培養される。

【１４４２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）のプライミングによる第１の拡張が最大７日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４４３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大８日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４４４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４４５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大１０日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４４６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大１１日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４４７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が７日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４４８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が７日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大１０日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４４９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が７日または８日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大９日

の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４５０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が７日または８日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大１０日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４５１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が８日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４５２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が８日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大８日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４５３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団がＯＫＴ－３及びＩＬ－２を含む第１の培養培地中で培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４５４】

他の実施形態では、本発明は、第１の培養培地が４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３及びＩＬ－２を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４５５】

他の実施形態では、本発明は、第１の培養培地がＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４５６】

他の実施形態では、本発明は、第１の培養培地が４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４５７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団がＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の培養培地中で培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４５８】

他の実施形態では、本発明は、第２の培養培地が４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４５９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地中で培養され（ここで、第１の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰ

Ｃ集団が、第１のＡＰＣ集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４６０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地中で培養され（ここで、第１の培養培地が、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団が、第１のＡＰＣ集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４６１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地中で培養され（ここで、第１の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地が、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団が、第１のＡＰＣ集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４６２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地中で培養され（ここで、第１の培養培地が、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地が、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団が、第１のＡＰＣ集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４６３】

他の実施形態では、本発明は、第２のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数の、第１のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数に対する比が約２：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４６４】

他の実施形態では、本発明は、第１のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数が約2.5×10^{8}であり、第２のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数が約5×10^{8}であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４６５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が、２層のＡＰＣの平均厚さで第１のガス透過性表面上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４６６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が、４～８層のＡＰＣから選択される平均厚さで第１のガス透過性表面上に層状化されるように修正

された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４６７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において第１のガス透過性表面上に層状化されたＡＰＣの平均層数の、ステップ（ａ）において第１のガス透過性表面上に層状化されたＡＰＣの平均層数に対する比が、２：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４６８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が約１．０×10^6ＡＰＣ／cm^2～約４．５×10^6ＡＰＣ／cm^2の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４６９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が約１．５×10^6ＡＰＣ／cm^2～約３．５×10^6ＡＰＣ／cm^2の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４７０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が約２．０×10^6ＡＰＣ／cm^2～約３．０×10^6ＡＰＣ／cm^2の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４７１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．０×10^6ＡＰＣ／cm^2の密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４７２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．５×10^6ＡＰＣ／cm^2～正確にまたは約７．５×10^6ＡＰＣ／cm^2の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４７３】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約３．５×10^6ＡＰＣ／cm^2～正確にまたは約６．０×10^6ＡＰＣ／cm^2の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４７４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約４．０×10^6ＡＰＣ／cm^2～正確にまたは約５．５×10^6ＡＰＣ／cm^2の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４７５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約４．０×10^6ＡＰＣ／cm^2の密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４７６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約１．０×10^6ＡＰＣ／cm^2～正確にまたは約４．５×10^6ＡＰＣ／cm^2の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．５×10^6ＡＰＣ／cm^2～正確にまたは約７．５×10^6ＡＰＣ／cm^2の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種され

るように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４７７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約６．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４７８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約４，０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４７９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４８０】
他の実施形態では、本発明は、ＡＰＣが末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４８１】
他の実施形態では、本発明は、ＰＢＭＣが放射線照射され、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４８２】
他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞が腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４８３】
他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞が骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４８４】
他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞が末梢血リンパ球（ＰＢＬ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４８５】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団がドナーの全血からの分離によって取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４８６】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団がドナーのアフェレーシス産物からの分離によって取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４８７】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、Ｔ細胞表現型の正または負の選択によってドナーの全血またはアフェレーシス産物から分離されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４８８】

他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞表現型がＣＤ３＋及びＣＤ４５＋であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４８９】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団のプライミングによる第１の拡張を行う前に、Ｔ細胞がＮＫ細胞から分離されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。他の実施形態では、Ｔ細胞は、第１のＴ細胞集団からのＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞の除去によって、第１のＴ細胞集団中のＮＫ細胞から分離される。他の実施形態では、ＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞は、ＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞画分を除去し、かつ陰性画分を回収するゲーティング戦略を使用して、第１のＴ細胞集団を細胞選別に供することによって、第１のＴ細胞集団から除去される。他の実施形態では、前述の方法は、高いＮＫ細胞パーセンテージを特徴とする第１のＴ細胞集団におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、高いＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞パーセンテージを特徴とする第１のＴ細胞集団におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のＮＫ細胞の存在を特徴とする腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞を特徴とする腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のＮＫ細胞の存在を特徴とする腫瘍に罹患している患者から取得された腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞の存在を特徴とする腫瘍に罹患している患者から取得された腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、卵巣癌に罹患している患者から取得された腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。

【１４９０】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団由来の正確にまたは約1×10^{7}Ｔ細胞が容器内に播種されて、かかる容器内で一次の第１の拡張を開始するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４９１】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が複数の容器に分配され、各容器内で、第１のＴ細胞集団由来の正確にまたは約1×10^{7}Ｔ細胞が播種されて、かかる容器内で一次の第１の拡張を開始するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４９２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において採取された第２のＴ細胞集団が治療的ＴＩＬ集団であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４９３】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４９４】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４９５】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４９６】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４９７】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４９８】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４９９】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５００】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５０１】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５０２】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５０３】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５０４】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５０５】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５０６】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５０７】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５０８】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５０９】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５１０】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５１１】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５１２】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５１３】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５１４】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５１５】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５１６】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５１７】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５１８】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、ｉ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で腫瘍試料を約３日間培養することによって対象における腫瘍の１つ以上の小生検、コア生検、または針生検

から取得された腫瘍試料から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、（ｉｉ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が約７日または８日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団は第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、（ｉｉｉ）第２のＴＩＬ集団の第２の細胞培養倍地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣで補充することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｉｉ）において追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、急速な第２の拡張が約１１日間の第２の期間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団であり、急速な第２の拡張が第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｉｖ）ステップ（ｉｉｉ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、（ｖ）ステップ（ｉｖ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことと、を含む、方法を提供する。

【１５１９】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、（ｉ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で腫瘍試料を約３日間培養することによって対象における腫瘍の１つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、（ｉｉ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が約７日または８日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団は第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、（ｉｉｉ）第２のＴＩＬ集団をＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第３の細胞培養培地で補充することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が約１１日間の第２の期間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｉｖ）ステップ（ｉｉｉ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、方法を提供する。

【１５２０】

他の実施形態では、本発明は、第２の期間の５日目の後に、培養物が２つ以上の継代培養物に分割され、各継代培養物に追加量の第３の培養培地が補充され、約６日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５２１】

他の実施形態では、本発明は、第２の期間の５日目の後に、培養物が２つ以上の継代培養物に分割され、各継代培養物にＩＬ－２を含む第４の培養培地が補充され、約６日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５２２】

他の実施形態では、本発明は、第２の期間の５日目の後に、培養物が最大５つの継代培養物に分割されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５２３】

他の実施形態では、本発明は、方法におけるすべてのステップが約２２日で完了するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５２４】

他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞を拡張する方法であって、（ｉ）第１のＴ細胞集団を培養することによって、ドナーにおける腫瘍の１つ以上の小生検、コア生検、または

針生検から取得された腫瘍試料からの第１のＴ細胞集団のプライミングによる第１の拡張を行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、（ｉｉ）ステップ（ａ）においてプライミングされた第１のＴ細胞集団の活性化が減衰し始めた後に、第１のＴ細胞集団を培養することによって第１のＴ細胞集団の急速な第２の拡張を行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、（ｉｖ）第２のＴ細胞集団を採取することと、を含む、ＴＩＬ培養細胞を拡張する方法を提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍試料は、複数のコア生検から得られる。いくつかの実施形態では、複数のコア生検は、２、３、４、５、６、７、８、９及び１０個のコア生検からなる群から選択される。

【１５２５】

いくつかの実施形態では、本発明は、Ｔ細胞またはＴＩＬが腫瘍消化物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載される方法。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、ＲＰＭＩ１６４０、２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼであるが、これらに限定されない酵素培地中で腫瘍をインキュベートすること、続いて、機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって生成される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはタイプのコラゲナーゼを含む）、Ａｃｃｕｔａｓｅ（商標）、Ａｃｃｕｍａｘ（商標）、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、キモトリプシン、キモパパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパイン、プロテアーゼタイプＸＩＶ（プロナーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）、トリプシン阻害剤、任意の他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びこれらの任意の組み合わせ等の１つ以上の解離（消化）酵素を含むが、これらに限定されない腫瘍解離酵素混合物の中に配置される。他の実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはタイプのコラゲナーゼを含む）、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）及びデオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）を含む腫瘍解離酵素混合物中に配置される。

【１５２６】

ＶＩ．薬学的組成物、投与量、及び投薬レジメン

いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して拡張及び／または遺伝子修飾された（ＣＣＲを発現するように遺伝子修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを含む）ＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬは、薬学的組成物として患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌緩衝液中のＴＩＬ懸濁液である。本開示のＰＢＭＣを使用して拡張されたＴＩＬは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、単回の動脈内または静脈内注入として投与され、これは、好ましくは、およそ３０～６０分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内投与が含まれる。

【１５２７】

任意の好適な用量のＴＩＬが投与され得る。いくつかの実施形態では、特にがんがＮＳＣＬＣまたは黒色腫である場合、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}のＴＩＬが投与され、平均約７．８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、約１．２×１０^{10}～約４．３×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約３×１０^{10}～約１２×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約４×１０^{10}～約１０×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約５×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約６×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約７×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}である。いくつかの実施形態では、特にがんが黒色腫である場合、治療上有効な投与量は、約７．８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、特にがんがＮＳＣＬＣである場合、治療上有効な投与量は、約７．８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約１

．２×１０^{10}～約４．３×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約３×１０^{10}～約１２×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約４×１０^{10}～約１０×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約５×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約６×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約７×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬである。

【１５２８】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供されるＴＩＬの数は、約１×１０^{6}、２×１０^{6}、３×１０^{6}、４×１０^{6}、５×１０^{6}、６×１０^{6}、７×１０^{6}、８×１０^{6}、９×１０^{6}、１×１０^{7}、２×１０^{7}、３×１０^{7}、４×１０^{7}、５×１０^{7}、６×１０^{7}、７×１０^{7}、８×１０^{7}、９×１０^{7}、１×１０^{8}、２×１０^{8}、３×１０^{8}、４×１０^{8}、５×１０^{8}、６×１０^{8}、７×１０^{8}、８×１０^{8}、９×１０^{8}、１×１０^{9}、２×１０^{9}、３×１０^{9}、４×１０^{9}、５×１０^{9}、６×１０^{9}、７×１０^{9}、８×１０^{9}、９×１０^{9}、１×１０^{10}、２×１０^{10}、３×１０^{10}、４×１０^{10}、５×１０^{10}、６×１０^{10}、７×１０^{10}、８×１０^{10}、９×１０^{10}、１×１０^{11}、２×１０^{11}、３×１０^{11}、４×１０^{11}、５×１０^{11}、６×１０^{11}、７×１０^{11}、８×１０^{11}、９×１０^{11}、１×１０^{12}、２×１０^{12}、３×１０^{12}、４×１０^{12}、５×１０^{12}、６×１０^{12}、７×１０^{12}、８×１０^{12}、９×１０^{12}、１×１０^{13}、２×１０^{13}、３×１０^{13}、４×１０^{13}、５×１０^{13}、６×１０^{13}、７×１０^{13}、８×１０^{13}、及び９×１０^{13}である。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供されるＴＩＬの数は、１×１０^{6}～５×１０^{6}、５×１０^{6}～１×１０^{7}、１×１０^{7}～５×１０^{7}、５×１０^{7}～１×１０^{8}、１×１０^{8}～５×１０^{8}、５×１０^{8}～１×１０^{9}、１×１０^{9}～５×１０^{9}、５×１０^{9}～１×１０^{10}、１×１０^{10}～５×１０^{10}、５×１０^{10}～１×１０^{11}、５×１０^{11}～１×１０^{12}、１×１０^{12}～５×１０^{12}、及び５×１０^{12}～１×１０^{13}の範囲内である。

【１５２９】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、例えば、薬学的組成物の１００％、９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖ未満である。

【１５３０】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９．７５％、１９．５０％、１９．２５％、１９％、１８．７５％、１８．５０％、１８．２５％、１８％、１７．７５％、１７．５０％、１７．２５％、１７％、１６．７５％、１６．５０％、１６．２５％、１６％、１５．７５％、１５．５０％、１５．２５％、１５％、１４．７５％、１４．５０％、１４．２５％、１４％、１３．７５％、１３．５０％、１３．２５％、１３％、１２．７５％、１２．５０％、１２．２５％、１２％、１１．７５％、１１．５０％、１１．２５％、１１％、１０．７５％、１０．５０％、１０．２５％、１０％、９．７５％、９．５０％、９．２５％、９％、８．７５％、８．５０％、８．２５％、８％、７．７５％、７．５０％、７．２５％、７％、６．７５％、６．５０％、６．２５％、６％、５．７５％、５．５０％、５．２５％、５％、４．７５％、４．５０％、４．２５％、４％、３．７５％、３．５０％、３．２５％、３％、２．７５％、

２．５０％、２．２５％、２％、１．７５％、１．５０％、１２５％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖ超である。

【１５３１】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の約０．０００１％～約５０％、約０．００１％～約４０％、約０．０１％～約３０％、約０．０２％～約２９％、約０．０３％～約２８％、約０．０４％～約２７％、約０．０５％～約２６％、約０．０６％～約２５％、約０．０７％～約２４％、約０．０８％～約２３％、約０．０９％～約２２％、約０．１％～約２１％、約０．２％～約２０％、約０．３％～約１９％、約０．４％～約１８％、約０．５％～約１７％、約０．６％～約１６％、約０．７％～約１５％、約０．８％～約１４％、約０．９％～約１２％、または約１％～約１０％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの範囲内である。

【１５３２】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の約０．００１％～約１０％、約０．０１％～約５％、約０．０２％～約４．５％、約０．０３％～約４％、約０．０４％～約３．５％、約０．０５％～約３％、約０．０６％～約２．５％、約０．０７％～約２％、約０．０８％～約１．５％、約０．０９％～約１％、約０．１％～約０．９％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの範囲内である。

【１５３３】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの量は、１０ｇ、９．５ｇ、９．０ｇ、８．５ｇ、８．０ｇ、７．５ｇ、７．０ｇ、６．５ｇ、６．０ｇ、５．５ｇ、５．０ｇ、４．５ｇ、４．０ｇ、３．５ｇ、３．０ｇ、２．５ｇ、２．０ｇ、１．５ｇ、１．０ｇ、０．９５ｇ、０．９ｇ、０．８５ｇ、０．８ｇ、０．７５ｇ、０．７ｇ、０．６５ｇ、０．６ｇ、０．５５ｇ、０．５ｇ、０．４５ｇ、０．４ｇ、０．３５ｇ、０．３ｇ、０．２５ｇ、０．２ｇ、０．１５ｇ、０．１ｇ、０．０９ｇ、０．０８ｇ、０．０７ｇ、０．０６ｇ、０．０５ｇ、０．０４ｇ、０．０３ｇ、０．０２ｇ、０．０１ｇ、０．００９ｇ、０．００８ｇ、０．００７ｇ、０．００６ｇ、０．００５ｇ、０．００４ｇ、０．００３ｇ、０．００２ｇ、０．００１ｇ、０．０００９ｇ、０．０００８ｇ、０．０００７ｇ、０．０００６ｇ、０．０００５ｇ、０．０００４ｇ、０．０００３ｇ、０．０００２ｇ、または０．０００１ｇ以下である。

【１５３４】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの量は、０．０００１ｇ、０．０００２ｇ、０．０００３ｇ、０．０００４ｇ、０．０００５ｇ、０．０００６ｇ、０．０００７ｇ、０．０００８ｇ、０．０００９ｇ、０．００１ｇ、０．００１５ｇ、０．００２ｇ、０．００２５ｇ、０．００３ｇ、０．００３５ｇ、０．００４ｇ、０．００４５ｇ、０．００５ｇ、０．００５５ｇ、０．００６ｇ、０．００６５ｇ、０．００７ｇ、０．００７５ｇ、０．００８ｇ、０．００８５ｇ、０．００９ｇ、０．００９５ｇ、０．０１ｇ、０．０１５ｇ、０．０２ｇ、０．０２５ｇ、０．０３ｇ、０．０３５ｇ、０．０４ｇ、０．０４５ｇ、０．０５ｇ、０．０５５ｇ、０．０６ｇ、０．０６５ｇ、０．０７ｇ、０．０７５ｇ、０．０８ｇ、０．０８５ｇ、０．０９ｇ、０．０９５ｇ、０．１ｇ、０．１５ｇ、０．２ｇ、０．２５ｇ、０．３ｇ、０．３５ｇ、０．４ｇ、０．４５ｇ、０．５ｇ、０．５５ｇ、０．６ｇ、０．６５ｇ、０．７ｇ、０．７５ｇ、０．８ｇ、０．８５ｇ、０．９ｇ、０．９５ｇ、１ｇ、１．５ｇ、２ｇ、２．５、３ｇ、３．５、４ｇ、４．５ｇ、５ｇ、５．５ｇ、６ｇ、６．５ｇ、７ｇ、７．５ｇ、８ｇ、８．５ｇ、９ｇ、９．５ｇ、または１０ｇ超である。

【１５３５】

本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬは、広い投与量範囲にわたって有効である。正確な投与量は、投与経路、化合物が投与される形態、治療される対象の性別及び年齢、治療される対象の体重、ならびに主治医の選好及び経験に依存するであろう。適切な場合、ＴＩＬの臨床的に確立された投与量が使用される場合もある。ＴＩＬの投与量などの本明細書の方法を使用して投与される薬学的組成物の量は、治療されるヒトまたは哺乳動物、障害または状態の重症度、投与速度、医薬品有効成分の性質、及び処方医師の裁量に依存するであろう。

【１５３６】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、単回用量で投与され得る。かかる投与は、注射、例えば、静脈内注射によるものであり得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、複数回用量で投与され得る。投薬は、１年に１回、２回、３回、４回、５回、６回、または６回超であり得る。投薬は、月１回、２週間に１回、週１回、または隔日に１回であり得る。ＴＩＬの投与は、必要な限り継続することができる。

【１５３７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}、8×10^{7}、9×10^{7}、1×10^{8}、2×10^{8}、3×10^{8}、4×10^{8}、5×10^{8}、6×10^{8}、7×10^{8}、8×10^{8}、9×10^{8}、1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}、及び9×10^{13}である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、1×10^{6}～5×10^{6}、5×10^{6}～1×10^{7}、1×10^{7}～5×10^{7}、5×10^{7}～1×10^{8}、1×10^{8}～5×10^{8}、5×10^{8}～1×10^{9}、1×10^{9}～5×10^{9}、5×10^{9}～1×10^{10}、1×10^{10}～5×10^{10}、5×10^{10}～1×10^{11}、5×10^{11}～1×10^{12}、1×10^{12}～5×10^{12}、及び5×10^{12}～1×10^{13}の範囲内である。

【１５３８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約４．３ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約３．２ｍｇ／ｋｇ、約０．３５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．３ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約１．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１ｍｇ／ｋｇ、約０．５５ｍｇ／ｋｇ～約０．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．６５ｍｇ／ｋｇ～約０．８ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約０．７５ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．８５ｍｇ／ｋｇ～約２ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約１．８５ｍｇ／ｋｇ、約１．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約１．３ｍｇ／ｋｇ～約１．６ｍｇ／ｋｇ、約１．３５ｍｇ／ｋｇ～約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約２．３ｍｇ／ｋｇ～約３．４ｍｇ／ｋｇ、約２．４ｍｇ／ｋｇ～約３．３ｍｇ／ｋｇ、約２．６ｍｇ／ｋｇ～約３．１５ｍｇ／ｋｇ、約２．７ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、約２．８ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、または約２．８５ｍｇ／ｋｇ～約２．９５ｍｇ／ｋｇの範囲内である。

【１５３９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約１ｍｇ～約５００ｍｇ、約１０

ｍｇ～約３００ｍｇ、約２０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約２５ｍｇ～約２００ｍｇ、約１ｍｇ～約５０ｍｇ、約５ｍｇ～約４５ｍｇ、約１０ｍｇ～約４０ｍｇ、約１５ｍｇ～約３５ｍｇ、約２０ｍｇ～約３０ｍｇ、約２３ｍｇ～約２８ｍｇ、約５０ｍｇ～約１５０ｍｇ、約６０ｍｇ～約１４０ｍｇ、約７０ｍｇ～約１３０ｍｇ、約８０ｍｇ～約１２０ｍｇ、約９０ｍｇ～約１１０ｍｇ、または約９５ｍｇ～約１０５ｍｇ、約９８ｍｇ～約１０２ｍｇ、約１５０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約１６０ｍｇ～約２４０ｍｇ、約１７０ｍｇ～約２３０ｍｇ、約１８０ｍｇ～約２２０ｍｇ、約１９０ｍｇ～約２１０ｍｇ、約１９５ｍｇ～約２０５ｍｇ、または約１９８～約２０７ｍｇの範囲内である。

【１５４０】

ＴＩＬの有効量は、鼻腔内経路及び経皮経路を含む、同様の有用性を有する薬剤の認められた投与様式のうちのいずれかによって、動脈内注射によって、静脈内、腹腔内、非経口、筋肉内、皮下、局所、移植によって、または吸入によって、単回用量または複数回用量のいずれかで投与され得る。

【１５４１】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を含む注入バッグを提供する。

【１５４２】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団及び薬学的に許容される担体を含む腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）組成物を提供する。

【１５４３】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を含む注入バッグを提供する。

【１５４４】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団の凍結保存された調製物を提供する。

【１５４５】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団及び凍結保存された培地を含む腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）組成物を提供する。

【１５４６】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地がＤＭＳＯを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。

【１５４７】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地が７～１０％のＤＭＳＯを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。

【１５４８】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物の凍結保存された調製物を提供する。

【１５４９】

いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して拡張されたＴＩＬは、薬学的組成物として患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌緩衝液中のＴＩＬ懸濁液である。本開示のＰＢＭＣを使用して拡張されたＴＩＬは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、単回の動脈内または静脈内注入として投与され、これは、好ましくは、およそ３０～６０分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内投与が含まれる。

【１５５０】

任意の好適な用量のＴＩＬが投与され得る。いくつかの実施形態では、特にがんがＮＳＣＬＣである場合、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}のＴＩＬが投与され、平均は約７．８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、約１．２×１０^{10}～約４．３×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約３×１０^{10}～約１２×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約４×１０^{10}～

約１０×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約５×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約６×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約７×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}である。いくつかの実施形態では、特にがんがＮＳＣＬＣである場合、治療上有効な投与量は、約７．８×１０^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約１．２×１０^{10}～約４．３×１０^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約３×１０^{10}～約１２×１０^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約４×１０^{10}～約１０×１０^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約５×１０^{10}～約８×１０^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約６×１０^{10}～約８×１０^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約７×１０^{10}～約８×１０^{10}ＴＩＬである。

【１５５１】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供されるＴＩＬの数は、約１×１０^{6}、２×１０^{6}、３×１０^{6}、４×１０^{6}、５×１０^{6}、６×１０^{6}、７×１０^{6}、８×１０^{6}、９×１０^{6}、１×１０^{7}、２×１０^{7}、３×１０^{7}、４×１０^{7}、５×１０^{7}、６×１０^{7}、７×１０^{7}、８×１０^{7}、９×１０^{7}、１×１０^{8}、２×１０^{8}、３×１０^{8}、４×１０^{8}、５×１０^{8}、６×１０^{8}、７×１０^{8}、８×１０^{8}、９×１０^{8}、１×１０^{9}、２×１０^{9}、３×１０^{9}、４×１０^{9}、５×１０^{9}、６×１０^{9}、７×１０^{9}、８×１０^{9}、９×１０^{9}、１×１０^{10}、２×１０^{10}、３×１０^{10}、４×１０^{10}、５×１０^{10}、６×１０^{10}、７×１０^{10}、８×１０^{10}、９×１０^{10}、１×１０^{11}、２×１０^{11}、３×１０^{11}、４×１０^{11}、５×１０^{11}、６×１０^{11}、７×１０^{11}、８×１０^{11}、９×１０^{11}、１×１０^{12}、２×１０^{12}、３×１０^{12}、４×１０^{12}、５×１０^{12}、６×１０^{12}、７×１０^{12}、８×１０^{12}、９×１０^{12}、１×１０^{13}、２×１０^{13}、３×１０^{13}、４×１０^{13}、５×１０^{13}、６×１０^{13}、７×１０^{13}、８×１０^{13}、及び９×１０^{13}である。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供されるＴＩＬの数は、１×１０^{6}～５×１０^{6}、５×１０^{6}～１×１０^{7}、１×１０^{7}～５×１０^{7}、５×１０^{7}～１×１０^{8}、１×１０^{8}～５×１０^{8}、５×１０^{8}～１×１０^{9}、１×１０^{9}～５×１０^{9}、５×１０^{9}～１×１０^{10}、１×１０^{10}～５×１０^{10}、５×１０^{10}～１×１０^{11}、５×１０^{11}～１×１０^{12}、１×１０^{12}～５×１０^{12}、及び５×１０^{12}～１×１０^{13}の範囲内である。

【１５５２】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、例えば、薬学的組成物の１００％、９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖ未満である。

【１５５３】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９．７５％、１９．５０％、１９．２５％、１９％、１８．７５％、１８．５０％、１８．２５％、１８％、１７．７５％、１７．５０％、１７．２５％、１７％、１６．７５％、１６．５０％、１６．２５％、１６％、１５．７５％、１５．５０％、１５．２５％、１５％、１４．７５％、１４．５０％、１４．２５％、１４％、１３．７５％、１３．５０％

、１３．２５％、１３％、１２．７５％、１２．５０％、１２．２５％、１２％、１１．７５％、１１．５０％、１１．２５％、１１％、１０．７５％、１０．５０％、１０．２５％、１０％、９．７５％、９．５０％、９．２５％、９％、８．７５％、８．５０％、８．２５％、８％、７．７５％、７．５０％、７．２５％、７％、６．７５％、６．５０％、６．２５％、６％、５．７５％、５．５０％、５．２５％、５％、４．７５％、４．５０％、４．２５％、４％、３．７５％、３．５０％、３．２５％、３％、２．７５％、２．５０％、２．２５％、２％、１．７５％、１．５０％、１２５％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖ超である。

【１５５４】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の約０．０００１％～約５０％、約０．００１％～約４０％、約０．０１％～約３０％、約０．０２％～約２９％、約０．０３％～約２８％、約０．０４％～約２７％、約０．０５％～約２６％、約０．０６％～約２５％、約０．０７％～約２４％、約０．０８％～約２３％、約０．０９％～約２２％、約０．１％～約２１％、約０．２％～約２０％、約０．３％～約１９％、約０．４％～約１８％、約０．５％～約１７％、約０．６％～約１６％、約０．７％～約１５％、約０．８％～約１４％、約０．９％～約１２％、または約１％～約１０％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの範囲内である。

【１５５５】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の約０．００１％～約１０％、約０．０１％～約５％、約０．０２％～約４．５％、約０．０３％～約４％、約０．０４％～約３．５％、約０．０５％～約３％、約０．０６％～約２．５％、約０．０７％～約２％、約０．０８％～約１．５％、約０．０９％～約１％、約０．１％～約０．９％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの範囲内である。

【１５５６】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの量は、１０ｇ、９．５ｇ、９．０ｇ、８．５ｇ、８．０ｇ、７．５ｇ、７．０ｇ、６．５ｇ、６．０ｇ、５．５ｇ、５．０ｇ、４．５ｇ、４．０ｇ、３．５ｇ、３．０ｇ、２．５ｇ、２．０ｇ、１．５ｇ、１．０ｇ、０．９５ｇ、０．９ｇ、０．８５ｇ、０．８ｇ、０．７５ｇ、０．７ｇ、０．６５ｇ、０．６ｇ、０．５５ｇ、０．５ｇ、０．４５ｇ、０．４ｇ、０．３５ｇ、０．３ｇ、０．２５ｇ、０．２ｇ、０．１５ｇ、０．１ｇ、０．０９ｇ、０．０８ｇ、０．０７ｇ、０．０６ｇ、０．０５ｇ、０．０４ｇ、０．０３ｇ、０．０２ｇ、０．０１ｇ、０．００９ｇ、０．００８ｇ、０．００７ｇ、０．００６ｇ、０．００５ｇ、０．００４ｇ、０．００３ｇ、０．００２ｇ、０．００１ｇ、０．０００９ｇ、０．０００８ｇ、０．０００７ｇ、０．０００６ｇ、０．０００５ｇ、０．０００４ｇ、０．０００３ｇ、０．０００２ｇ、または０．０００１ｇ以下である。

【１５５７】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの量は、０．０００１ｇ、０．０００２ｇ、０．０００３ｇ、０．０００４ｇ、０．０００５ｇ、０．０００６ｇ、０．０００７ｇ、０．０００８ｇ、０．０００９ｇ、０．００１ｇ、０．００１５ｇ、０．００２ｇ、０．００２５ｇ、０．００３ｇ、０．００３５ｇ、０．００４ｇ、０．００４５ｇ、０．００５ｇ、０．００５５ｇ、０．００６ｇ、０．００６５ｇ、０．００７ｇ、０．００７５ｇ、０．００８ｇ、０．００８５ｇ、０．００９ｇ、０．００９５ｇ、０．０１ｇ、０．０１５ｇ、０．０２ｇ、０．０２５ｇ、０．０３ｇ、０．０３５ｇ、０．０４ｇ、０．０４５ｇ、０．０５ｇ、０．０５５ｇ、０．０６ｇ、０．０６５ｇ、０．０７ｇ、０．０７５ｇ、０．０８ｇ、０．０８５ｇ、０．０９ｇ、０．０９５ｇ

、０．１ｇ、０．１５ｇ、０．２ｇ、０．２５ｇ、０．３ｇ、０．３５ｇ、０．４ｇ、０．４５ｇ、０．５ｇ、０．５５ｇ、０．６ｇ、０．６５ｇ、０．７ｇ、０．７５ｇ、０．８ｇ、０．８５ｇ、０．９ｇ、０．９５ｇ、１ｇ、１．５ｇ、２ｇ、２．５、３ｇ、３．５、４ｇ、４．５ｇ、５ｇ、５．５ｇ、６ｇ、６．５ｇ、７ｇ、７．５ｇ、８ｇ、８．５ｇ、９ｇ、９．５ｇ、または１０ｇ超である。

【１５５８】

本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬは、広い投与量範囲にわたって有効である。正確な投与量は、投与経路、化合物が投与される形態、治療される対象の性別及び年齢、治療される対象の体重、ならびに主治医の選好及び経験に依存するであろう。適切な場合、ＴＩＬの臨床的に確立された投与量が使用される場合もある。ＴＩＬの投与量などの本明細書の方法を使用して投与される薬学的組成物の量は、治療されるヒトまたは哺乳動物、障害または状態の重症度、投与速度、医薬品有効成分の性質、及び処方医師の裁量に依存するであろう。

【１５５９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、単回用量で投与され得る。かかる投与は、注射、例えば、静脈内注射によるものであり得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、複数回用量で投与され得る。投薬は、１年に１回、２回、３回、４回、５回、６回、または６回超であり得る。投薬は、月１回、２週間に１回、週１回、または隔日に１回であり得る。ＴＩＬの投与は、必要な限り継続することができる。

【１５６０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}、8×10^{7}、9×10^{7}、1×10^{8}、2×10^{8}、3×10^{8}、4×10^{8}、5×10^{8}、6×10^{8}、7×10^{8}、8×10^{8}、9×10^{8}、1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}、及び9×10^{13}である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、1×10^{6}～5×10^{6}、5×10^{6}～1×10^{7}、1×10^{7}～5×10^{7}、5×10^{7}～1×10^{8}、1×10^{8}～5×10^{8}、5×10^{8}～1×10^{9}、1×10^{9}～5×10^{9}、5×10^{9}～1×10^{10}、1×10^{10}～5×10^{10}、5×10^{10}～1×10^{11}、5×10^{11}～1×10^{12}、1×10^{12}～5×10^{12}、及び5×10^{12}～1×10^{13}の範囲内である。

【１５６１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約４．３ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約３．２ｍｇ／ｋｇ、約０．３５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．３ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約１．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１ｍｇ／ｋｇ、約０．５５ｍｇ／ｋｇ～約０．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．６５ｍｇ／ｋｇ～約０．８ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約０．７５ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．８５ｍｇ／ｋｇ～約２ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約１．８５ｍｇ／ｋｇ、約１．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約１．３ｍｇ／ｋｇ～約１．６ｍｇ／ｋｇ、約１．３５ｍｇ／ｋｇ～約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約２．

３ｍｇ／ｋｇ～約３．４ｍｇ／ｋｇ、約２．４ｍｇ／ｋｇ～約３．３ｍｇ／ｋｇ、約２．６ｍｇ／ｋｇ～約３．１５ｍｇ／ｋｇ、約２．７ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、約２．８ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、または約２．８５ｍｇ／ｋｇ～約２．９５ｍｇ／ｋｇの範囲内である。

【１５６２】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約１ｍｇ～約５００ｍｇ、約１０ｍｇ～約３００ｍｇ、約２０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約２５ｍｇ～約２００ｍｇ、約１ｍｇ～約５０ｍｇ、約５ｍｇ～約４５ｍｇ、約１０ｍｇ～約４０ｍｇ、約１５ｍｇ～約３５ｍｇ、約２０ｍｇ～約３０ｍｇ、約２３ｍｇ～約２８ｍｇ、約５０ｍｇ～約１５０ｍｇ、約６０ｍｇ～約１４０ｍｇ、約７０ｍｇ～約１３０ｍｇ、約８０ｍｇ～約１２０ｍｇ、約９０ｍｇ～約１１０ｍｇ、または約９５ｍｇ～約１０５ｍｇ、約９８ｍｇ～約１０２ｍｇ、約１５０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約１６０ｍｇ～約２４０ｍｇ、約１７０ｍｇ～約２３０ｍｇ、約１８０ｍｇ～約２２０ｍｇ、約１９０ｍｇ～約２１０ｍｇ、約１９５ｍｇ～約２０５ｍｇ、または約１９８～約２０７ｍｇの範囲内である。

【１５６３】

ＴＩＬの有効量は、鼻腔内経路及び経皮経路を含む、同様の有用性を有する薬剤の認められた投与様式のうちのいずれかによって、動脈内注射によって、静脈内、腹腔内、非経口、筋肉内、皮下、局所、移植によって、または吸入によって、単回用量または複数回用量のいずれかで投与され得る。

【１５６４】

ＶＩＩ．患者を治療する方法

治療方法は、最初のＴＩＬ収集及びＴＩＬの培養から始まる。かかる方法は両方とも、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｊｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，２０１２，３５（３）：２８３－２９２によって当該技術分野で説明されている。治療方法の実施形態は、実施例を含む以下の節全体に記載されている。

【１５６５】

本明細書に記載の方法に従って、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また例えば、図１及び／または図８に示されるように）産生される拡張ＴＩＬは、がんを有する患者の治療における特定の用途を見出す（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｇｏｆｆ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２０１６，３４（２０）：２３８９－２３９、及び補足内容に記載される）。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、以前に記載されたように、転移性黒色腫の切除された沈着物から増殖された（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００３，２６：３３２－３４２を参照されたい）。新鮮な腫瘍は、滅菌条件下で解剖され得る。代表的な試料は、正式な病理学的分析のために収集され得る。２ｍｍ^3～３ｍｍ^{3}の単一断片が使用され得る。いくつかの実施形態では、患者当たり５、１０、１５、２０、２５、または３０個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり２０、２５、または３０個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり２０、２２、２４、２６、または２８個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり２４個の試料が取得される。試料は、２４ウェルプレートの個々のウェル内に配置され、高用量ＩＬ－２（６，０００ＩＵ／ｍＬ）を含む成長培地中で維持され、腫瘍の破壊及び／またはＴＩＬの増殖について監視され得る。処理後に生細胞が残っている腫瘍は、本明細書に記載されるように、単一細胞懸濁液中に酵素的に消化され、凍結保存され得る。

【１５６６】

いくつかの実施形態では、成功裏に成長したＴＩＬは、表現型分析（ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、及びＣＤ５６）のためにサンプリングされ、利用可能な場合、自己腫瘍に対して試験され得る。一晩の共培養によりインターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）レベルが２００ｐｇ／ｍＬを超え、バックグラウンドの２倍になった場合、ＴＩＬは反応性があるとみ

なされ得る。（Ｇｏｆｆ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２０１０，３３：８４０－８４７、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態では、自己反応性または十分な成長パターンの証拠を有する培養物は、急速拡張（ＲＥＰ）と称されることもある第２の拡張を含む、第２の拡張（例えば、図１及び／または図８のステップＤに従って提供される第２の拡張）のために選択され得る。いくつかの実施形態では、高い自己反応性（例えば、第２の拡張中の高い増殖）を有する拡張ＴＩＬが、追加の第２の拡張のために選択される。いくつかの実施形態では、高い自己反応性（例えば、図１及び／または図８のステップＤで提供されるような第２の拡張中の高い増殖）を有するＴＩＬが、図１及び／または図８のステップＤに従って、追加の第２の拡張のために選択される。

【１５６７】

注入バッグＴＩＬの凍結保存試料の細胞表現型は、表面マーカーＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＣＲ７、及びＣＤ４５ＲＡ（ＢＤ　ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ）のフローサイトメトリー（例えば、ＦｌｏｗＪｏ）、ならびに本明細書に記載の方法のうちのいずれかによって分析され得る。血清サイトカインは、標準的な酵素結合免疫吸着アッセイ技術を使用することにより測定された。血清ＩＦＮ－ｇの上昇は、１００ｐｇ／ｍＬ超及び４　３ベースラインレベルを超えると定義された。

【１５６８】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図１及び／または図８に例示される方法によって産生されるＴＩＬは、ＴＩＬの臨床効果の驚くべき改善を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図１及び／または図８に例示される方法によって産生されるＴＩＬは、例えば、図１及び／または図８に例示されるもの以外の方法を含む、本明細書に記載されるもの以外の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、増加した臨床効果を示す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるもの以外の方法は、プロセス１Ｃ及び／または第１世代（Ｇｅｎ１）と称される方法を含む。いくつかの実施形態では、増加した有効性は、ＤＣＲ、ＯＲＲ、及び／または他の臨床応答によって測定される。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図１に例示される方法によって産生されるＴＩＬは、例えば、図１及び／または図８に例示されるもの以外の方法を含む、本明細書に記載されるもの以外の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、同様の応答時間及び安全性プロファイルを示す。

【１５６９】

いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）は、治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。いくつかの実施形態では、ＴＩＬで治療された対象の血液中のＩＦＮ－γは、活性なＴＩＬを示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ産生の効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能の別の尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、例えば、図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のエクスビボでの血液、血清、またはＴＩＬ中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することによって測定することができる。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γの増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬで治療された患者における治療有効性を示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、ＩＦＮ－γが１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／ま

たは例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、３倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、４倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ ＥＬＩＳＡキットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば、図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のエクスビボでのＴＩＬにおいて測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象の血液において測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば、図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のＴＩＬ血清において測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）は、がんの治療における治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。

【１５７０】

いくつかの実施形態では、例えば図１に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬ。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）は、治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。いくつかの実施形態では、ＴＩＬで治療された対象の血液中のＩＦＮ－γは、活性なＴＩＬを示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ産生の効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能の別の尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、例えば、図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のエクスビボでの血液、血清、またはＴＩＬ中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することによって測定することができる。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γの増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬで治療された患者における治療有効性を示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、ＩＦＮ－γが１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上増加する。

【１５７１】

いくつかの実施形態では、例えば図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されるＴＩＬは、例えばプロセス１Ｃ法と称される方法を含む、図１及び／または図８に例示されていないものを含む他の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、増加したポリクローン性を示す。いくつかの実施形態では、有意に改善されたポリクローン性及び／または増加したポリクローン性は、治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、Ｔ細胞レパートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性の増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬの投与に関する治療有効性を示すことができる。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、１倍、２倍、１０倍、１００倍、５００倍、または１０００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの

以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０００倍増加する。

【１５７２】

有効性の尺度には、当該技術分野で知られており、本明細書にも記載されている、疾患制御率（ＤＣＲ）ならびに全応答率（ＯＲＲ）が含まれ得る。

【１５７３】

Ａ．がんを治療する方法

本明細書に記載の組成物及び方法は、疾患を治療するための方法で使用され得る。いくつかの実施形態では、それらは、成人患者または小児患者における、がんなどの過剰増殖性障害の治療に使用するためのものである。それらは、本明細書及び以下の段落に記載される他の障害の治療にも使用され得る。

【１５７４】

いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、がんである。いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、固形腫瘍癌である。いくつかの実施形態では、固形腫瘍癌は、肛門癌、膀胱癌、乳癌（トリプルネガティブ乳癌を含む）、骨癌、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）によって引き起こされるがん、中枢神経系関連癌（上衣腫、髄芽腫、神経芽腫、松果体芽腫、及び未分化神経外胚葉性腫瘍を含む）、子宮頸癌（扁平上皮癌、腺扁平上皮癌、及び子宮頸部腺癌）、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、食道胃接合癌、胃癌、消火器癌、消化管間質腫瘍、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、下咽頭癌、喉頭癌、鼻咽頭癌、中咽頭癌、及び咽頭癌）、腎臓癌、肝臓癌、肺癌（非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）及び小細胞肺癌）、黒色腫（ブドウ膜黒色腫、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫を含む）、中皮腫（悪性胸膜中皮腫を含む）、卵巣癌、膵臓癌（膵管腺癌を含む）、陰茎癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉腫（ユーイング肉腫、骨肉腫、横紋筋肉腫、ならびに他の骨及び軟部組織肉腫を含む）、甲状腺癌（未分化甲状腺癌を含む）、子宮癌、ならびに膣癌からなる群から選択される。

【１５７５】

いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、慢性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、及び多発性骨髄腫からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、本発明は、がん患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＭＩＬまたはＰＢＬを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。

【１５７６】

いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、または免疫療法を含む少な

くとも１つの前療法による治療に対して再発するか、または不応性である、固形腫瘍癌及び血液学的悪性腫瘍を含む、前述のがんのうちの１つである。いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、及び／または免疫療法を含む少なくとも２つの以前の療法による治療に対して再発するか、または不応性である、前述のがんのうちの１つである。いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、及び／または免疫療法を含む少なくとも３つの以前の療法による治療に対して再発するか、または不応性である前述のがんのうちの１つである。

【１５７７】

いくつかの実施形態では、がんは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）癌である。したがって、ＭＳＩ－Ｈ及びｄＭＭＲ癌ならびに試験は、Ｋａｗａｋａｍｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｔｒｅａｔ．Ｏｐｔｉｏｎｓ　Ｏｎｃｏｌ．２０１５，１６，３０に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１５７８】

いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを使用してがんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、ヒトである。いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを使用してがんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、非ヒトである。いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを使用してがんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、伴侶動物である。

【１５７９】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ＢＲＡＦ阻害剤及び／またはＭＥＫ阻害剤による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ベムラフェニブ、ダブラフェニブ、エンコラフェニブ、ソラフェニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるＢＲＡＦ阻害剤による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、トラメチニブ、コビメチニブ、ビニメチニブ、セルメチニブ、ピマセルチニブ、レファメチニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるＭＥＫ阻害剤による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ベムラフェニブ、ダブラフェニブ、エンコラフェニブ、ソラフェニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるＢＲＡＦ阻害剤、ならびにトラメチニブ、コビメチニブ、ビニメチニブ、セルメチニブ、ピマセルチニブ、レファメチニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるＭＥＫ阻害剤による治療に対して不応性である。

【１５８０】

いくつかの実施形態では、本発明は、がん患者を治療する方法を含み、がんは、小児癌である。

【１５８１】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ブドウ膜黒色腫である。

【１５８２】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、ブドウ膜黒色腫は、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫である。

【１５８３】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児癌は、神経芽腫である。

【１５８４】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児癌は、肉腫である。

【１５８５】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、肉腫は、骨肉腫である。

【１５８６】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、肉腫は、軟部組織肉腫である。

【１５８７】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、軟部組織肉腫は、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、または未分化神経外胚葉性腫瘍（ＰＮＥＴ）である。

【１５８８】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児癌は、中枢神経系（ＣＮＳ）関連癌である。いくつかの実施形態では、小児癌は、化学療法による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、小児癌は、放射線療法による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、小児癌は、ジヌツキシマブによる治療に対して不応性である。

【１５８９】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、ＣＮＳ関連癌は、髄芽腫、松果芽腫、神経膠腫、上衣腫、または神経膠芽細胞腫である。

【１５９０】

本明細書に記載の組成物及び方法は、がんを治療するための方法において使用することができ、がんは、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体による治療に対して不応性または耐性である。いくつかの実施形態では、患者は、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対する一次不応性患者である。いくつかの実施形態では、患者は、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対する事前の応答を示さない。いくつかの実施形態では、患者は、患者のがんの進行に続く、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対する事前の応答を示す。いくつかの実施形態では、がんは、少なくとも１つの化学療法剤と組み合わせた抗ＣＴＬＡ－４抗体及び／または抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対して不応性である。いくつかの実施形態では、以前の化学療法剤は、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、及び／またはシスプラチンである。いくつかの実施形態では、化学療法剤（複数可）は、白金ダブレット化学療法剤である。いくつかの実施形態では、白金ダブレット療法は、シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤と、ビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはナブ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療法剤と、を含む。いくつかの実施形態では、白金ダブレット化学療法剤は、ペメトレキセドと組み合わされている。

【１５９１】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ＰＤ－Ｌ１陰性であり、及び／または本明細書の他の場所に記載されるように、腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）が１％未満でＰＤ－Ｌ１を発現するがんを有する患者に由来する。

【１５９２】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体及び白金ダブレット療法を含む併用療法に対して不応性であり、白金ダブレット療法は、

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

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

【１５９３】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体、ペメトレキセド、及び白金ダブレット療法を含む併用療法に対して不応性であり、白金ダブレット療法は、

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

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

【１５９４】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１抗体で処理されている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で処理されている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療ナイーブである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、以前に化学療法剤で治療されている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、以前に化学療法剤で治療されているが、もはや化学療法剤で治療されていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療ナイーブのＮＳＣＬＣを有するか、または化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療ナイーブまたは化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブであり、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。いくつかの実施形態では、対象は、ベースラインで巨大腫瘤病変を有し、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、検出可能なＰＤ－Ｌ１の発現を有しない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療ナイーブまたは化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブであり、検出可能なＰＤ－Ｌ１の発現を有しない。いくつかの実施形態では、患者は、ベースラインで巨大腫瘤病変を有し、検出可能なＰＤ－Ｌ１の発現を有しない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療ナイーブのＮＳＣＬＣまたは化学療法後（例えば、化学療法剤後）であるが、ＰＤ－Ｌ１の発現が低く、及び／またはベースラインで巨大腫瘤病変を有する抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブである。いくつかの実施形態では、最大腫瘍直径が横方向または冠状面のいずれかで測定された７ｃｍより大きい場合、巨大腫瘤病変が示される。いくつかの実施形態では、巨大腫瘤病変は、２０ｍｍ以上の短軸直径を有する腫れたリンパ節がある場合に示される。いくつかの実施形態では、化学療法剤は、ＮＳＣＬＣの標準治療の治療薬を含む。

【１５９５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１発現は、腫瘍割合スコアによって決定される。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象は、＜１％の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）を有する。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象は、≧１％　ＴＰＳを有する。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣを有する対象は、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、該抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣを有する対象は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、該抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。

【１５９６】

いくつかの実施形態では、例えば、図１または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されるＴＩＬは、例えば、プロセス１Ｃ法と称される方法などの、図１または図８に例示されていないものを含む他の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、増加したポリクローン性を示す。いくつかの実施形態では、有意に改善されたポリクローン性及び／または増加したポリクローン性は、がん治療に対する治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、Ｔ細胞レ

パートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性の増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬの投与に関する治療有効性を示すことができる。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、１倍、２倍、１０倍、１００倍、５００倍、または１０００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０００倍増加する。

【１５９７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１発現は、本明細書に記載の１つのさらなる試験方法を使用して、腫瘍割合スコアによって決定される。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象または患者は、＜１％の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ腫瘍は、≧１％　ＴＰＳを有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象または患者は、＜１％の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）を有する。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象または患者は、≧１％　ＴＰＳを有する。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。

【１５９８】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、１％未満（ＴＰＳ＜１％）のＰＤ－Ｌ１タンパク質についての任意の強度での部分的または完全な膜染色を示す、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１療法の前に採取された患者からの腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）または生存腫瘍細胞のパーセンテージを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、＜５０％、＜４５％、＜４０％、＜３５％、＜３０％、＜２５％、＜２０％、＜１５％、＜１０％、＜９％、＜８％、＜７％、＜６％、＜５％、＜４％、＜３％、＜２％、＜１％、＜０．９％、＜０．８％、＜０．７％、＜０．６％、＜０．５％、＜０．４％、＜０．３％、＜０．２％、＜０．１％、＜０．０９％、＜０．０８％、＜０．０７％、＜０．０６％、＜０．０５％、＜０．０４％、＜０．０３％、＜０．０２％、及び＜０．０１％か

らなる群から選択されるＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、約５０％、約４５％、約４０％、約３５％、約３０％、約２５％、約２０％、約１５％、約１０％、約９％、約８％、約７％、約６％、約５％、約４％、約３％、約２％、約１％、約０．９％、約０．８％、約０．７％、約０．６％、約０．５％、約０．４％、約０．３％、約０．２％、約０．１％、約０．０９％、約０．０８％、約０．０７％、約０．０６％、約０．０５％、約０．０４％、約０．０３％、約０．０２％，及び約０．０１％からなる群から選択されるＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～１％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．９％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．８％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．７％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．６％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．５％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．４％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．３％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．２％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．１％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。ＴＰＳは、当該技術分野で知られている方法、例えば、Ｈｉｒｓｃｈ，ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｔｈｏｒａｃ．Ｏｎｃｏｌ．２０１７，１２，２０８－２２２に記載される方法、あるいはペムブロリズマブまたは他の抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１療法による治療前のＴＰＳの決定に使用される方法によって測定され得る。米国食品医薬品局（Ｕ．Ｓ．Ｆｏｏｄ　ａｎｄ　Ｄｒｕｇ　Ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）によって承認されたＴＰＳの測定のための方法を使用することもできる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、エクソソームＰＤ－Ｌ１である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、循環腫瘍細胞上に見出される。

【１５９９】

いくつかの実施形態では、部分的な膜染色は、１％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、またはそれ以上を含む。いくつかの実施形態では、完了した膜染色は、およそ１００％の膜染色を含む。

【１６００】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１の試験は、患者の血清中のＰＤ－Ｌ１のレベルを測定することを伴い得る。これらの実施形態では、患者の血清中のＰＤ－Ｌ１の測定は、腫瘍の不均一性の不確実性及び連続生検の患者の不快感を除去する。

【１６０１】

いくつかの実施形態では、ベースラインまたは標準レベルと比較して、可溶性ＰＤ－Ｌ１の上昇は、ＮＳＣＬＣにおける予後の悪化と相関する。例えば、Ｏｋｕｍａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｌｕｎｇ　Ｃａｎｃｅｒ，２０１８，１９，４１０－４１７、Ｖｅｃｃｈｉａｒｅｌｌｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｏｎｃｏｔａｒｇｅｔ，２０１８，９，１７５５４－１７５６３を参照されたい。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、エクソソームＰＤ－Ｌ１である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、循環腫瘍細胞上に発現される。

【１６０２】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を投与することによって、ＮＳＣＬＣを治療する方法を提供し、対象または患者は、

ｉ．＜１％のＰＤ－Ｌ１の所定の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）、

ｉｉ．１％～４９％のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコア、または

ｉｉｉ．１つ以上のドライバー変異の所定の非存在のうちの少なくとも１つを有し、

ドライバー変異は、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＥＧＦＲエクソン２０、ＫＲＡＳ変

異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、ＲＥＴ融合、ＥＲＢＢ２変異、ＥＲＢＢ２増幅、ＢＲＣＡ変異、ＭＡＰ２Ｋ１変異、ＰＩＫ３ＣＡ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＰＴＥＮ変異、ＵＭＤ変異、ＮＲＡＳ変異、ＫＲＡＳ変異、ＮＦ１変異、ＭＥＴ変異、ＭＥＴスプライス及び／または変化したＭＥＴシグナル伝達、ＴＰ５３変異、ＣＲＥＢＢＰ変異、ＫＭＴ２Ｃ変異、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１変異、ＡＴＭ変異、ＳＥＴＤ２変異、ＦＬＴ３変異、ＰＴＰＮ１１変異、ＦＧＦＲ１変異、ＥＰ３００変異、ＭＹＣ変異、ＥＺＨ２変異、ＪＡＫ２変異、ＦＢＸＷ７変異、ＣＣＮＤ３変異、及びＧＮＡ１１変異からなる群から選択され、この方法は、

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

（ｂ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加することと、

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

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

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

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

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

（ｈ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｇ）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【１６０３】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を投与することによって、ＮＳＣＬＣを治療する方法を提供し、この方法は、

（ａ）ＰＤ－Ｌ１のＰＤ－Ｌ１発現及び腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）について患者の腫瘍を試験することと、

（ｂ）１つ以上のドライバー変異の所定の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＥＧＦＲエクソン２０、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、ＲＥＴ融合、ＥＲＢＢ２変異、ＥＲＢＢ２増幅、ＢＲＣＡ変異、ＭＡＰ２Ｋ１変異、ＰＩＫ３ＣＡ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＰＴＥＮ変異、ＵＭＤ変異、ＮＲＡＳ変異、ＫＲＡＳ変異、ＮＦ１変異、ＭＥＴ変異、ＭＥＴスプライス及び／または変化したＭＥＴシグナル伝達、ＴＰ５３変異、ＣＲＥＢＢＰ変異、ＫＭＴ２Ｃ変異、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１変異、ＡＴＭ変異、ＳＥＴＤ２変異、ＦＬＴ３変異、ＰＴＰＮ１１変異、ＦＧＦＲ１変異、ＥＰ３００変異、ＭＹＣ変異、ＥＺＨ２変異、ＪＡＫ２変異、ＦＢＸＷ７変異、ＣＣＮＤ３変異、及びＧＮＡ１１変異からなる群から選択される、試験することと、

（ｃ）患者が、約１％～約４９％のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、

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

たは患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｅ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加することと、
（ｆ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｉ）ステップ（ｈ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｉ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、
（ｋ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｊ）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【１６０４】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を投与することによって、ＮＳＣＬＣを治療する方法を提供し、この方法は、
（ａ）ＰＤ－Ｌ１のＰＤ－Ｌ１発現及び腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）について患者の腫瘍を試験することと、
（ｂ）１つ以上のドライバー変異の所定の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＥＧＦＲエクソン２０、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、ＲＥＴ融合、ＥＲＢＢ２変異、ＥＲＢＢ２増幅、ＢＲＣＡ変異、ＭＡＰ２Ｋ１変異、ＰＩＫ３ＣＡ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＰＴＥＮ変異、ＵＭＤ変異、ＮＲＡＳ変異、ＫＲＡＳ変異、ＮＦ１変異、ＭＥＴ変異、ＭＥＴスプライス及び／または変化したＭＥＴシグナル伝達、ＴＰ５３変異、ＣＲＥＢＢＰ変異、ＫＭＴ２Ｃ変異、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１変異、ＡＴＭ変異、ＳＥＴＤ２変異、ＦＬＴ３変異、ＰＴＰＮ１１変異、ＦＧＦＲ１変異、ＥＰ３００変異、ＭＹＣ変異、ＥＺＨ２変異、ＪＡＫ２変異、ＦＢＸＷ７変異、ＣＣＮＤ３変異、及びＧＮＡ１１変異からなる群から選択される、試験することと、
（ｃ）患者が、約１％未満のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、
（ｄ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｅ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加することと、
（ｆ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生する

ことであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

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

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

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

（ｋ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｊ）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【１６０５】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を投与することによって、ＮＳＣＬＣを治療する方法を提供し、この方法は、

（ａ）ＰＤ－Ｌ１のＰＤ－Ｌ１発現及び腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）について患者の腫瘍を試験することと、

（ｂ）１つ以上のドライバー変異の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、またはＲＥＴ融合からなる群から選択される、試験することと、

（ｃ）患者が、約１％～約４９％のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、

（ｄ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｅ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加することと、

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

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

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

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

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

（ｋ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｊ）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【１６０６】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団を投与することによって、ＮＳＣＬＣを治療する方法を提供し、この方法は、

（ａ）ＰＤ－Ｌ１のＰＤ－Ｌ１発現及び腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）について患者の腫瘍を試験することと、
（ｂ）１つ以上のドライバー変異の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、またはＲＥＴ融合からなる群から選択される、試験することと、
（ｃ）患者が、約１％未満のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、
（ｄ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｅ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加することと、
（ｆ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｉ）ステップ（ｈ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｉ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、
（ｋ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｊ）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【１６０７】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１６０８】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、本明細書に記載のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１６０９】
他の実施形態では、本発明は、それぞれ、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団及び本明細書に記載のＴＩＬ組成物を投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１６１０】
他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間のシクロホスファミドの投与に続いて、２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間のフルダラビンを投与するステップを含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１６１１】
他の実施形態では、本発明は、対象にＴＩＬ細胞を投与した翌日に開始する、高用量のＩＬ－２レジメンで対象を治療するステップをさらに含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１６１２】
他の実施形態では、本発明は、高用量ＩＬ－２レジメンが、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される６００，０００または７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【１６１３】
他の実施形態では、本発明は、がんが固形腫瘍であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【１６１４】
他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、または腎細胞癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【１６１５】
他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌、ＮＳＣＬＣ、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、及び胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【１６１６】
他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【１６１７】
他の実施形態では、本発明は、がんがＨＮＳＣＣであるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【１６１８】
他の実施形態では、本発明は、がんが子宮頸癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【１６１９】
他の実施形態では、本発明は、がんがＮＳＣＬＣであるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【１６２０】
他の実施形態では、本発明は、がんが神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【１６２１】
他の実施形態では、本発明は、がんが胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【１６２２】
他の実施形態では、本発明は、がんが高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【１６２３】
他の実施形態では、本発明は、がんが小児の高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【１６２４】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法で使用するための、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。
【１６２５】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法で使用するための、本明細書に記載のＴＩＬ組成物を提供する。

【１６２６】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団または本明細書に記載のＴＩＬ組成物を対象に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団または本明細書に記載のＴＩＬ組成物を提供する。
【１６２７】
他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間のシクロホスファミドの投与に続いて、２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間のフルダラビンを投与するステップを含むように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１６２８】
他の実施形態では、本発明は、ＴＩＬ細胞を患者に投与した翌日から開始する、高用量ＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含むように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１６２９】
他の実施形態では、本発明は、高用量ＩＬ－２レジメンが、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される６００，０００または７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含むように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１６３０】
他の実施形態では、本発明は、がんが固形腫瘍であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１６３１】
他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、または腎細胞癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１６３２】
他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌、ＮＳＣＬＣ、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、及び胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１６３３】
他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１６３４】
他の実施形態では、本発明は、がんがＨＮＳＣＣであるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１６３５】
他の実施形態では、本発明は、がんが子宮頸癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１６３６】
他の実施形態では、本発明は、がんがＮＳＣＬＣであるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１６３７】
他の実施形態では、本発明は、がんが、神経膠芽細胞腫であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１６３８】
他の実施形態では、本発明は、がんが胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。

【１６３９】
他の実施形態では、本発明は、がんが高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１６４０】
他の実施形態では、本発明は、がんが小児の高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１６４１】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法における本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団の使用を提供する。
【１６４２】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法における前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物の使用を提供する。
【１６４３】
他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンを対象に投与することと、次いで治療上有効な投与量の、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団または本明細書に記載のＴＩＬ組成物を対象に投与することと、を含む、患者におけるがんを治療する方法における、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団または本明細書に記載のＴＩＬ組成物の使用を提供する。
【１６４４】
１．ＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１阻害剤との併用
いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるＴＩＬ療法は、治療的ＴＩＬ集合単独による治療を含んでもよく、またはＴＩＬならびに１つ以上のＰＤ－１及び／またはＰＤ－Ｌ１阻害剤を含む併用治療を含んでもよい。
【１６４５】
プログラム死１（ＰＤ－１）は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）Ｔ細胞、活性化単球、及び樹状細胞によって発現される２８８アミノ酸の膜貫通免疫チェックポイント受容体タンパク質である。ＣＤ２７９としても知られるＰＤ－１は、ＣＤ２８ファミリーに属し、ヒトでは第２染色体上のＰｄｃｄ１遺伝子によってコードされる。ＰＤ－１は、１つの免疫グロブリン（Ｉｇ）スーパーファミリードメイン、膜貫通領域、ならびに免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ（ＩＴＩＭ）及び免疫受容体チロシンベースのスイッチモチーフ（ＩＴＳＭ）を含む細胞内ドメインからなる。ＰＤ－１とそのリガンド（ＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２）は、Ｋｅｉｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００８，２６，６７７－７０４に記載されるように、免疫寛容において重要な役割を果たすことが知られている。ＰＤ－１は、Ｔ細胞の免疫応答を負に調節する阻害シグナルを提供する。ＰＤ－Ｌ１（Ｂ７－Ｈ１またはＣＤ２７４としても知られる）及びＰＤ－Ｌ２（Ｂ７－ＤＣまたはＣＤ２７３としても知られる）は、腫瘍細胞及び間質細胞上に発現され、ＰＤ－１を発現する活性化Ｔ細胞が遭遇する可能性があり、Ｔ細胞の免疫抑制につながる。ＰＤ－Ｌ１は、ヒト第９染色体上のＣｄ２７４遺伝子によってコードされる２９０アミノ酸の膜貫通タンパク質である。例えば、Ｔｏｐａｌｉａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎ．Ｅｎｇ．Ｊ．Ｍｅｄ．２０１２，３６６，２４４３－５４に記載される最近の臨床研究で実証されているように、ＰＤ－１阻害剤、ＰＤ－Ｌ１阻害剤、及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤の使用による、ＰＤ－１とそのリガンドＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２との間の相互作用をブロックすることで、免疫抵抗を克服することができる。ＰＤ－Ｌ１は、多くの腫瘍細胞株上で発現されるが、ＰＤ－Ｌ２は、主に樹状細胞及びいくつかの腫瘍株上で発現される発現される。Ｔ細胞（活性化後にＰＤ－１を誘導的に発現する）に加えて、ＰＤ－１は、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、活性化単球、樹状細胞上でも発現される。
【１６４６】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ及びＰＤ－１阻害剤は、ＮＳＣＬＣの治療のための併用療法または共療法として投与される。

【１６４７】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、前療法を受けていない。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、フロントライン療法または初期療法として投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、本明細書に記載のＴＩＬと併用して、フロントライン療法または初期療法として投与される。

【１６４８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、当該技術分野で知られている任意のＰＤ－１阻害剤またはＰＤ－１遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるＰＤ－１阻害剤または遮断剤のうちの１つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、ＰＤ－１阻害剤に関して互換的に使用される。誤解を避けるために、抗体であるＰＤ－１阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリアント、複合体、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、ＰＤ－１阻害剤への本明細書での言及はまた、小分子化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【１６４９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、抗体（すなわち、抗ＰＤ－１抗体）、Ｆａｂ断片を含むその断片、またはその一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ＰＤ－１との結合について競合し、及び／またはＰＤ－１上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、ＰＤ－１との結合について競合し、及び／またはＰＤ－１上のエピトープに結合する。

【１６５０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ヒトＰＤ－１に約１００ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約９０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約８０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約７０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約６０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約５０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約４０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約３０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約２０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約１０ｐＭ以下のＫＤで結合する、またはヒトＰＤ－１に約１ｐＭ以下のＫＤで結合するものである。

【１６５１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ヒトＰＤ－１に約７．５×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約７．５×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約８×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約８．５×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約９×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約９．５×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、またはヒトＰＤ－１に約１×$10^6$１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合するものである。

【１６５２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ヒトＰＤ－１に約２×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．１×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．２×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．３×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．４×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．５×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．６×10^{-5}１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、またはヒトＰＤ－１に約２．７×10^{-5}１／

ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．８×１０－５１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．９×１０－５１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、またはヒトＰＤ－１に約３×１０－５１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合するものである。

【１６５３】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、約１０ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約９ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約８ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約７ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約６ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約５ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約４ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約３ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約２ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、または約１ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害するものである。

【１６５４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブ（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ　Ｃｏ．からＯＰＤＩＶＯとして市販されている）、またはそれらのバイオシミラー、抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。ニボルマブは、ＰＤ－１受容体を遮断する完全ヒトＩｇＧ４抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、免疫グロブリンＧ４カッパ、抗（ヒトＣＤ２７４）抗体である。ニボルマブには、Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ａｂｓｔｒａｃｔｓ　Ｓｅｒｖｉｃｅ（ＣＡＳ）登録番号９４６４１４－９４－４が割り当てられており、５Ｃ４、ＢＭＳ－９３６５５８、ＭＤＸ－１１０６、及びＯＮＯ－４５３８としても知られている。ニボルマブの調製及び特性は、米国特許第８，００８，４４９号及び国際特許公開第ＷＯ２００６／１２１１６８号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。様々な形態のがんにおけるニボルマブの臨床的安全性及び有効性は、Ｗａｎｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｓ．２０１４，２，８４６－５６、Ｐａｇｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．，２０１４，６５，１８５－２０２、及びＷｅｂｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２０１３，３１，４３１１－４３１８に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ニボルマブのアミノ酸配列を表１８に示す。ニボルマブは、２２－９６、１４０－１９６、２５４－３１４、３６０－４１８、２２’’－９６’’、１４０’’－１９６’’、２５４’’－３１４’’、及び３６０’’－４１８’’における重鎖内ジスルフィド結合；２３’－８８’、１３４’－１９４’、２３’’’－８８’’’、及び１３４’’’－１９４’’’における軽鎖内ジスルフィド結合；１２７－２１４’、１２７’’－２１４’’’における重鎖－軽鎖間ジスルフィド結合；２１９－２１９’’及び２２２－２２２’’における重鎖－重鎖間ジスルフィド結合；ならびに２９０、２９０’’におけるＮ－グリコシル化部位（Ｈ　ＣＨ２８４．４）を有する。

【１６５５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、配列番号１５８によって与えられる重鎖及び配列番号１５９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、

それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１６５６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１６０に示される配列を含み、ＰＤ－１阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１６１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【１６５７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号１６２、配列番号１６３、及び配列番号１６４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１６５、配列番号１６６、及び配列番号１６７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－１上の同じエピトープに結合する。

【１６５８】

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

るものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。

【１６５９】

【表１８】

表１８．ニボルマブに関連するＰＤ－１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 158 ニボルマブ 重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 440
配列番号 159 ニボルマブ 軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
配列番号 160 ニボルマブ 可変重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSS	60 113
配列番号 161 ニボルマブ 可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIK	60 107
配列番号 162 ニボルマブ 重鎖 CDR1	NSGMH	5
配列番号 163 ニボルマブ 重鎖 CDR2	VIWYDGSKRY YADSVKG	17
配列番号 164 ニボルマブ 重鎖 CDR3	NDDY	4
配列番号 165 ニボルマブ 軽鎖 CDR1	RASQSVSSYL A	11
配列番号 166 ニボルマブ 軽鎖 CDR2	DASNRAT	7
配列番号 167 ニボルマブ 軽鎖 CDR3	QQSSNWPRT	9

【１６６０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約３．５ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約４．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約５．５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約６．５ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約７．５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約８．５ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約９．５ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または

３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６６１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約２００ｍｇ～約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約２００ｍｇ、約２２０ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２６０ｍｇ、約２８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３２０ｍｇ、約３４０ｍｇ、約３６０ｍｇ、約３８０ｍｇ、約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４４０ｍｇ、約４６０ｍｇ、約４８０ｍｇ、または約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６６２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、または６週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６６３】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与され、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与され、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために、約１ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ３ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量、次いで２４０ｍｇを２週間毎、または４８０ｍｇを４週間毎に投与される。

【１６６４】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６６５】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、２週間毎に約３ｍｇ／ｋｇで、６週間毎に１ｍｇ／ｋｇのイピリムマブとともに投与され

る。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、３週間毎に約３６０ｍｇで、６週間毎に１ｍｇ／ｋｇのイピリムマブ及び２サイクルのプラチナダブレット化学療法とともに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇまたは４週間毎に４８０ｍｇ投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６６６】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、小細胞肺癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６６７】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、悪性胸膜中皮腫を治療するために、３週間毎に約３６０ｍｇ／ｋｇ、６週間毎に１ｍｇ／ｋｇのイピリムマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６６８】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約３ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ約１ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量、次いで２４０ｍｇを２週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約３ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ約１ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量、次いで２４０ｍｇを２週間毎、４８０ｍｇを４週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６６９】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的ホジキンリンパ腫を治療するために投

与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的ホジキンリンパ腫を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的ホジキンリンパ腫を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６７０】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６７１】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、局所進行性または転移性尿路上皮癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、局所進行性または転移性尿路上皮癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６７２】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性結腸直腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性結腸直腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、４０ｋｇ以上の成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性結腸直腸癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、４０ｋｇ以上の成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性結腸直腸癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与する

ことができる。

【１６７３】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、４０ｋｇ未満の小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性結腸直腸癌を治療するために、２週間毎に約３ｍｇ／ｋｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、４０ｋｇ以上の成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性結腸直腸癌を治療するために、約３ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ１ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量、次いで２４０ｍｇを２週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、４０ｋｇ以上の成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性結腸直腸癌を治療するために、約３ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ１ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量、次いで４８０ｍｇを４週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６７４】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、約１ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ３ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量、次いで２４０ｍｇを２週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、約１ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ３ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量、次いで４８０ｍｇを４週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６７５】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、食道扁平上皮癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、食道扁平上皮癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、食道扁平上皮癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６７６】

他の実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブ（Ｍｅｒｃｋ＆Ｃｏ．，Ｉｎｃ（Ｋｅｎｉｌｗｏｒｔｈ，ＮＪ，ＵＳＡ）からＫＥＹＴＲＵＤＡとして市販されている）、またはそれらの抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントを含む。ペムブロリズマ

ブには、ＣＡＳ登録番号１３７４８５３－９１－４が割り当てられており、ラムブロリズマブ、ＭＫ－３４７５、及びＳＣＨ－９００４７５としても知られている。ペムブロリズマブは、免疫グロブリンＧ４、抗（ヒトタンパク質ＰＤＣＤ１（プログラム細胞死１））（ヒト－ハツカネズミモノクローナル重鎖）、ヒト－ハツカネズミモノクローナル軽鎖、二量体構造を有するジスルフィドを有する。ペムブロリズマブの構造は、免疫グロブリンＧ４、抗（ヒトプログラム細胞死１）；ヒト化マウスモノクローナルκ軽鎖二量体（２２６－２２６′′：２２９－２２９′′）－ビスジスルフィドを有するヒト化マウスモノクローナル［２２８－Ｌ－プロリン（Ｈ１０－Ｓ＞Ｐ）］γ４重鎖（１３４－２１８′）－ジスルフィドとしても記載され得る。ペムブロリズマブの特性、使用、及び調製は、国際特許公開第ＷＯ２００８／１５６７１２Ａ１号、米国特許第８，３５４，５０９号、ならびに米国特許出願公開第ＵＳ２０１０／０２６６６１７Ａ１号、同第ＵＳ２０１３／０１０８６５１Ａ１号、及び同第ＵＳ２０１３／０１０９８４３Ａ２に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。様々な形態のがんにおけるペムブロリズマブの臨床的安全性及び有効性は、Ｆｕｅｒｓｔ，Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　Ｔｉｍｅｓ，２０１４，３６，３５－３６、Ｒｏｂｅｒｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ，２０１４，３８４，１１０９－１７、及びＴｈｏｍａｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｅｘｐ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．，２０１４，１４，１０６１－１０６４に記載されている。ペムブロリズマブのアミノ酸配列を表１９に示す。ペムブロリズマブは、ジスルフィド架橋：２２－９６、２２′′－９６′′、２３′－９２′、２３′′′－９２′′′、１３４－２１８′、１３４′′－２１８′′′、１３８′－１９８′、１３８′′′－１９８′′′、１４７－２０３、１４７′′－２０３′′、２２６－２２６′′、２２９－２２９′′、２６１－３２１、２６１′′－３２１′′、３６７－４２５、及び３６７′′－４２５′′、ならびにグリコシル化部位（Ｎ）：Ａｓｎ－２９７及びＡｓｎ－２９７′′を含む。ペムブロリズマブは、Ｆｃ領域に安定化Ｓ２２８Ｐ変異を有するＩｇＧ４／カッパアイソタイプであり、この変異をＩｇＧ４ヒンジ領域に挿入すると、ＩｇＧ４抗体で典型的に観察される半分子の形成が防止される。ペムブロリズマブは、各重鎖のＦｃドメイン内のＡｓｎ２９７で不均一にグリコシル化されており、無傷の抗体の分子量はおよそ１４９ｋＤａになる。ペムブロリズマブの優性グリコフォームは、フコシル化アガラクト二分性グリカンフォーム（Ｇ０Ｆ）である。

【１６７７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、配列番号１６８によって与えられる重鎖及び配列番号１６９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１６７８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１７０に示される配列を含み、ＰＤ－１阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１７１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１

７１に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶ$_H$及びＶ$_L$領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９８％同一であるＶ$_H$及びＶ$_L$領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９７％同一であるＶ$_H$及びＶ$_L$領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶ$_H$及びＶ$_L$領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶ$_H$及びＶ$_L$領域を含む。

【１６７９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号１７２、配列番号１７３、及び配列番号１７４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１７５、配列番号１７６、及び配列番号１７７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－１上の同じエピトープに結合する。

【１６８０】

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

【１６８１】

【表１９】

表１９．ペムブロリズマブに関連するＰＤ－１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 168 ペムブロリズマブ 重鎖	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF 60 NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS 120 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 180 GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV 240 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY 300 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK 360 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG 420 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK 447
配列番号 169 ペムブロリズ マブ軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF 120 IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS 180 STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC 218
配列番号 170 ペムブロリズマブ 可変重鎖	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF 60 NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS 120
配列番号 171 ペムブロリズマブ 可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI K 111
配列番号 172 ペムブロリズマブ 重鎖 CDR1	NYYMY 5
配列番号 173 ペムブロリズマブ 重鎖 CDR2	GINPSNGGTN FNEKFK 16
配列番号 174 ペムブロリズマブ 重鎖 CDR3	RDYRFDMGFD Y 11
配列番号 175 ペムブロリズマブ 軽鎖 CDR1	RASKGVSTSG YSYLH 15
配列番号 176 ペムブロリズマブ 軽鎖 CDR2	LASYLES 7
配列番号 177 ペムブロリズマブ 軽鎖 CDR3	QHSRDLPLT 9

【１６８２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約３．５ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約４．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約５．５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約６．５ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約７．５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約８．５ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約９．５ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患

者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。
【１６８３】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約２００ｍｇ～約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約２００ｍｇ、約２２０ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２６０ｍｇ、約２８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３２０ｍｇ、約３４０ｍｇ、約３６０ｍｇ、約３８０ｍｇ、約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４４０ｍｇ、約４６０ｍｇ、約４８０ｍｇ、または約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。
【１６８４】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、または６週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。
【１６８５】
いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、黒色腫を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、黒色腫を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。
【１６８６】
いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＮＳＣＬＣを治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＮＳＣＬＣを治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＮＳＣＬＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。
【１６８７】
いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、小細胞肺癌（ＳＣＬＣ）を治療するた

めに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＳＣＬＣを治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＳＣＬＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６８８】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＨＮＳＣＣを治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＨＮＳＣＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６８９】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、古典的ホジキンリンパ腫（ｃＨＬ）または原発性縦隔大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＰＭＢＣＬ）を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、古典的ホジキンリンパ腫（ｃＨＬ）または原発性縦隔大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＰＭＢＣＬ）を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。ペムブロリズマブは、古典的ホジキンリンパ腫（ｃＨＬ）または原発性縦隔大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＰＭＢＣＬ）を治療するために、小児の場合、３週間毎に約２ｍｇ／ｋｇ（最大２００ｍｇ）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６９０】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、尿路上皮癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、尿路上皮癌を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６９１】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（

ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＭＳＩ－ＨまたはｄＭＭＲ癌を治療するために、成人の場合、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＭＳＩ－ＨまたはｄＭＭＲ癌を治療するために、小児の場合、３週間毎に約２ｍｇ／ｋｇ（最大２００ｍｇ）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６９２】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損結腸直腸癌（ｄＭＭＲ　ＣＲＣを治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＭＳＩ－ＨまたはｄＭＭＲ　ＣＲＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６９３】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、胃癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、胃癌を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６９４】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、食道癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、食道癌を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６９５】
いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮頸癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮頸癌を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６９６】
いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、肝細胞癌（ＨＣＣ）を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＨＣＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６９７】
いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、メルケル細胞癌（ＭＣＣ）を治療するために、成人の場合、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＭＣＣを治療するために、成人の場合、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＭＣＣを治療するために、小児の場合、３週間毎に約２ｍｇ／ｋｇ（最大２００ｍｇ）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６９８】
いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、腎細胞癌（ＲＣＣ）を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＲＣＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで、経口で１日２回のアキシチニブ５ｍｇとともに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態

では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１６９９】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮内膜癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮内膜癌を治療するために、ＭＳＩ－ＨまたはｄＭＭＲではない腫瘍に対して、６週間毎に約４００ｍｇで、経口で１日１回のレンバチニブ２０ｍｇとともに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１７００】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高遺伝子変異量（ＴＭＢ－Ｈ）癌を治療するために、成人の場合、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＴＭＢ－Ｈ癌を治療するために、成人の場合、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＴＭＢ－Ｈ癌を治療するために、小児の場合、３週間毎に約２ｍｇ／ｋｇ（最大２００ｍｇ）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１７０１】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、皮膚扁平上皮癌（ｃＳＣＣ）を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ｃＳＣＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１７０２】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、トリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ）を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＴＮＢＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１７０３】

いくつかの実施形態では、患者または対象が成人である場合、すなわち、成人適応症の治療、及び６週間毎の４００ｍｇの追加の投薬レジメンが用いられ得る。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【１７０４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、抗ｍ－ＰＤ－１クローンＪ４３（カタログ番号ＢＥ００３３－２）及びＲＭＰ１－１４（カタログ番号ＢＥ０１４６）（ＢｉｏＸ　Ｃｅｌｌ，Ｉｎｃ．，Ｗｅｓｔ　Ｌｅｂａｎｏｎ，ＮＨ　ＵＳＡ）などの市販の抗ＰＤ－１モノクローナル抗体である。いくつかの市販の抗ＰＤ－１抗体が、当業者に知られている。

【１７０５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，３５４，５０９号または米国特許出願公開第２０１０／０２６６６１７　Ａ１号、同第２０１３／０１０８６５１Ａ１号、同第２０１３／０１０９８４３　Ａ２号に開示されている抗体であり、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，２８７，８５６号、同第８，５８０，２４７号、及び同第８，１６８，７５７号、ならびに米国特許出願公開第２００９／００２８８５７　Ａ１号、同第２０１０／０２８５０１３　Ａ１号、同第２０１３／００２２６００Ａ１号、及び同第２０１１／０００８３６９　Ａ１号に記載されている抗ＰＤ－１抗体であり、それらの教示は参照により本明細書に組み込まれる。他の実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，７３５，５５３　Ｂ１号に開示されている抗ＰＤ－１抗体であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ＣＴ－０１１としても知られるピジリズマブであり、これは米国特許第８，６８６，１１９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１７０６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，９０７，０５３号、同第９，０９６，６４２号、及び同第９，０４４，４４２号、ならびに米国特許出願公開第ＵＳ２０１５／００８７５８１号に記載されるものなどの小分子またはペプチドもしくはペプチド誘導体；米国特許出願公開第２０１５／００７３０２４号に記載されるものなどの１，２，４－オキサジアゾール化合物及び誘導体；米国特許出願公開第ＵＳ２０１５／００７３０４２号に記載されるものなどの環状ペプチド模倣化合物及び誘導体；米国特許出願公開第ＵＳ２０１５／０１２５４９１号に記載されるものなどの環状化合物及び誘導体；国際特許出願公開第ＷＯ２０１５／０３３３０１号に記載されるものなどの１，３，４－オキサジアゾール及び１，３，４－チアジアゾール化合物ならびに誘導体；国際特許出願公開第ＷＯ２０１５／０３６９２７号及びＷＯ２０１５／０４４９０号に記載されるものなどのペプチド系化合物及び誘導体、または米国特許出願公開第ＵＳ２０１４／０２９４８９８号に記載されるものなどの大環状ペプチド系化合物及び誘導体であり得、各々の開示は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ，Ｉｎｃ．から市販されているセミプリマブである。

【１７０７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ及びＰＤ－Ｌ１阻害剤またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ＮＳＣＬＣの治療のための併用療法または共療法として投与される。

【１７０８】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、前療法を受けていない。いくつかの実施形態

では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、フロントライン療法または初期療法として投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、本明細書に記載のＴＩＬと併用して、フロントライン療法または初期療法として投与される。

【１７０９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、当該技術分野で知られている任意のＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２阻害剤、アンタゴニスト、または遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２阻害剤、アンタゴニスト、または遮断剤のうちの１つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、ＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２阻害剤に関して交換可能に使用される。誤解を避けるために、抗体であるＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリアント、複合体、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【１７１０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物、プロセス、及び方法は、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、小分子である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、抗体（すなわち、抗ＰＤ－１抗体）、Ｆａｂ断片を含むその断片、またはその一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２との結合について競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、ＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２との結合について競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２上のエピトープに結合する。

【１７１１】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＰＤ－Ｌ１阻害剤は、化合物が、ＰＤ－Ｌ２受容体を含む他の受容体と結合または相互作用するよりも実質的に低い濃度でＰＤ－Ｌ１と結合または相互作用するという点で、ＰＤ－Ｌ１に対して選択的である。特定の実施形態では、化合物は、ＰＤ－Ｌ２受容体に対するより少なくとも約２倍高い濃度、約３倍高い濃度、約５倍高い濃度、約１０倍高い濃度、約２０倍高い濃度、約３０倍高い濃度、約５０倍高い濃度、約１００倍高い濃度、約２００倍高い濃度、約３００倍高い濃度、または約５００倍高い濃度である結合定数でＰＤ－Ｌ１受容体に結合する。

【１７１２】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＰＤ－Ｌ２阻害剤は、化合物が、ＰＤ－Ｌ１受容体を含む他の受容体と結合または相互作用するよりも実質的に低い濃度でＰＤ－Ｌ２と結合または相互作用するという点で、ＰＤ－Ｌ２に対して選択的である。特定の実施形態では、化合物は、ＰＤ－Ｌ１受容体に対するより少なくとも約２倍高い濃度、約３倍高い濃度、約５倍高い濃度、約１０倍高い濃度、約２０倍高い濃度、約３０倍高い濃度、約５０倍高い濃度、約１００倍高い濃度、約２００倍高い濃度、約３００倍高い濃度、または約５００倍高い濃度である結合定数でＰＤ－Ｌ２受容体に結合する。

【１７１３】

いかなる理論にも縛られることなく、腫瘍細胞はＰＤ－Ｌ１を発現し、Ｔ細胞はＰＤ－１を発現すると考えられている。しかしながら、腫瘍細胞によるＰＤ－Ｌ１の発現は、ＰＤ－１またはＰＤ－Ｌ１の阻害剤または遮断剤の有効性には必要とされない。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、ＰＤ－Ｌ１を発現する。他の実施形態では、腫瘍細胞は、ＰＤ－Ｌ１を発現しない。いくつかの実施形態では、方法は、ＴＩＬと組み合わせて、本明細書に記載されるものなどのＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１抗体の組み合わせを含むことができ

る。ＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１抗体とＴＩＬとの組み合わせの投与は、同時または連続的であり得る。

【１７１４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約１００ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約９０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約８０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約７０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約６０ｐＭ以下のＫＤで結合する、約５０ｐＭ以下のＫＤ、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約４０ｐＭ以下のＫＤで結合する、またはヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約３０ｐＭ以下のＫＤで結合するものである。

【１７１５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約７．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約８×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約８．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約９×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約９．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、またはヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約１×１０^{6}１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合するものである。

【１７１６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ヒトＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２に約２×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．１×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．２×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．３×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．４×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．５×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．６×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２に約２．７×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、またはヒトＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２に約３×１０$^{-5}$１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合するものである。

【１７１７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、約１０ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約９ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約８ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約７ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約６ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約５ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約４ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約３ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約２ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、またはヒトＰＤ－１を遮断し、または約１ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断するものである。

【１７１８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＭＥＤＩ４７３６としても知られるデュルバルマブ（これは、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ　ｐｌｃ．の子会社であるＭｅｄｉｍｍ

ｕｎｅ，ＬＬＣ（Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）から市販されている）、またはその抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許第８，７７９，１０８号または米国特許出願公開第２０１３／００３４５５９号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。デュルバルマブの臨床的有効性は、Ｐａｇｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．，２０１４，６５，１８５－２０２、Ｂｒａｈｍｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２０１４，３２，５ｓ（補足、要約８０２１）、及びＭｃＤｅｒｍｏｔｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ　Ｒｅｖ．，２０１４，４０，１０５６－６４に記載されている。デュルバルマブの調製及び特性は、米国特許第８，７７９，１０８号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。デュルバルマブのアミノ酸配列を表２０に示す。デュルバルマブモノクローナル抗体は、２２－９６、２２′′－９６′′、２３′－８９′、２３′′′－８９′′′、１３５′－１９５′、１３５′′′－１９５′′′、１４８－２０４、１４８′′－２０４′′、２１５′－２２４、２１５′′′－２２４′′′、２３０－２３０′′、２３３－２３３′′、２６５－３２５、２６５′′－３２５′′、３７１－４２９、及び３７１′′－４２９′におけるジスルフィド結合、ならびにＡｓｎ－３０１及びＡｓｎ－３０１′′におけるＮ－グリコシル化部位を含む。

【１７１９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、配列番号１７８によって与えられる重鎖及び配列番号１７９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１７２０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、デュルバルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１８０に示される配列を含み、ＰＤ－Ｌ１阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１８１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【１７２１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１８２、配列番号

１８３、及び配列番号１８４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１８５、配列番号１８６、及び配列番号１８７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１上の同じエピトープに結合する。

【１７２２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ペムブロリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－Ｌ１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－Ｌ１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－Ｌ１抗体であり、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。

【１７２３】

【表２０】

表２０．デュルバルマブに関連するＰＤ－Ｌ１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 178 デュルバルマブ 重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEFEG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPASIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	60 120 180 240 300 360 420 451
配列番号 179 デュルバルマブ 軽鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC	60 120 180 240 265
配列番号 180 デュルバルマブ 可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS S	60 120 121
配列番号 181 デュルバルマブ 可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIK	60 108
配列番号 182 デュルバルマブ 重鎖 CDR1	RYWMS	5
配列番号 183 デュルバルマブ 重鎖 CDR2	NIKQDGSEKY YVDSVKG	17
配列番号 184 デュルバルマブ 重鎖 CDR3	EGGWFGELAF DY	12
配列番号 185 デュルバルマブ 軽鎖 CDR1	RASQRVSSSY LA	12
配列番号 186 デュルバルマブ 軽鎖 CDR2	DASSRAT	7
配列番号 187 デュルバルマブ 軽鎖 CDR3	QQYGSLPWT	9

【１７２４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＭＳＢ００１０７１８Ｃ（ＭｅｒｃｋＫＧａＡ／ＥＭＤ　Ｓｅｒｏｎｏから市販されている）としても知られるアベルマブ、またはその抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。アベルマブの調製及び特性は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１４／０３４１９１７Ａ１号に記載されており、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。アベルマブのアミノ酸配列を表２１に示す。アベルマブは、２２－９６、１４７－２０３、２６４－３２４、３７０－４２８、２２’’－９６’’、１４７’’－２０３’’、２６４’’－３２４’’、及び３７０’’－４２８’’における重鎖内ジスルフィド結合（Ｃ２３－Ｃ１０４）；２２’－９０’、１３８’－１９７’、２２’’’－９０’’’、及び１３８’’’－１９７’’’における軽鎖内ジスルフィド結合（Ｃ２３－Ｃ１０４）；２２３－２１５’及び２２３’’－２１５’’’における重鎖－軽鎖内ジスルフィド結合（ｈ　５－ＣＬ　１２６）；２２９－２２９’’及び２３２－２３２’’における重鎖－重鎖内ジスルフィド結合（ｈ　１１、ｈ　１４）；３００、３００’’におけるＮ－グリコシル化部位（Ｈ　ＣＨ２　Ｎ８４

．４）；フコシル化複合体二分性ＣＨＯ型グリカン；ならびに４５０及び４５０′におけるＨ　ＣＨＳ　Ｋ２　Ｃ末端リジンクリッピングを有する。

【１７２５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、配列番号１８８によって与えられる重鎖及び配列番号１８９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１７２６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アベルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤重鎖可変領域（ＶＨ）は、配列番号１９０に示される配列を含み、ＰＤ－Ｌ１阻害剤軽鎖可変領域（ＶＬ）は、配列番号１９１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【１７２７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１９２、配列番号１９３、及び配列番号１９４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１９５、配列番号１９６、及び配列番号１９７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１上の同じエピトープに結合する。

【１７２８】

いくつかの複合体実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アベルマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－Ｌ１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの複合体実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－Ｌ１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつか

の実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－Ｌ１抗体であり、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。

【１７２９】

【表２１】

表２１．アベルマブに関連するＰＤ－Ｌ１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 188 アベルマブ 重鎖	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
配列番号 189 アベルマブ 軽鎖	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL GQPKANPTVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS	60 120 180 216
配列番号 190 アベルマブ 可変重鎖	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS	60 120
配列番号 191 アベルマブ 可変軽鎖	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL	60 110
配列番号 192 アベルマブ 重鎖 CDR1	SYIMM	5
配列番号 193 アベルマブ 重鎖 CDR2	SIYPSGGITF YADTVKG	17
配列番号 194 アベルマブ 重鎖 CDR3	IKLGTVTTVD Y	11
配列番号 195 アベルマブ 軽鎖 CDR1	TGTSSDVGGY NYVS	14
配列番号 196 アベルマブ 軽鎖 CDR2	DVSNRPS	7
配列番号 197 アベルマブ 軽鎖 CDR3	SSYTSSSTRV	10

【１７３０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＭＰＤＬ３２８０ＡまたはＲＧ７４４６としても知られるアテゾリズマブ（Ｒｏｃｈｅ　Ｈｏｌｄｉｎｇ　ＡＧ（Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）の子会社であるＧｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．からＴＥＣＥＮ

ＴＲＩＱとして市販されている）、またはその抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許第８，２１７，１４９号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許出願公開第２０１０／０２０３０５６Ａ１号、同第２０１３／００４５２００Ａ１号、同第２０１３／００４５２０１Ａ１号、同第２０１３／００４５２０２Ａ１号、または同第２０１４／００６５１３５Ａ１号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。アテゾリズマブの調製及び特性は、米国特許第８，２１７，１４９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。アテゾリズマブのアミノ酸配列を表２２に示す。アテゾリズマブは、２２－９６、１４５－２０１、２６２－３２２、３６８－４２６、２２′′－９６′′、１４５′′－２０１′′、２６２′′－３２２′′、及び３６８′′－４２６′′における重鎖内ジスルフィド結合（Ｃ２３－Ｃ１０４）；２３′－８８′、１３４′－１９４′、２３′′′－８８′′′、及び１３４′′′－１９４′′′における軽鎖内ジスルフィド結合（Ｃ２３－Ｃ１０４）；２２１－２１４′及び２２１′′－２１４′′′における重鎖－軽鎖内ジスルフィド結合（ｈ　５－ＣＬ　１２６）；２２７－２２７′′及び２３０－２３０′′における重鎖－重鎖内ジスルフィド結合（ｈ　１１、ｈ　１４）；ならびに２９８及び２９８′におけるＮ－グリコシル化部位（Ｈ　ＣＨ２　Ｎ８４．４＞Ａ）を有する。

【１７３１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、配列番号１９８によって与えられる重鎖及び配列番号１９９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１７３２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アテゾリズマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号２００に示される配列を含み、ＰＤ－Ｌ１阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号２０１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【１７３３】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号２０２、配列番号２０３、及び配列番号２０４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２０５、配列番号２０６、及び配列番号２０７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１上の同じエピトープに結合する。

【１７３４】

いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、アテゾリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－Ｌ１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－Ｌ１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－Ｌ１抗体であり、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。

【１７３５】

【表２２】

表２２．アテゾリズマブに関連するＰＤ－Ｌ１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 198 アテゾリズマブ 重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYAST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
配列番号 199 アテゾリズマブ 軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号 200 アテゾリズマブ 可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSA 118
配列番号 201 アテゾリズマブ 可変軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKR 108
配列番号 202 アテゾリズマブ 重鎖 CDR1	GFTFSDSWIH 10
配列番号 203 アテゾリズマブ 重鎖 CDR2	AWISPYGGST YYADSVKG 18
配列番号 204 アテゾリズマブ 重鎖 CDR3	RHWPGGFDY 9
配列番号 205 アテゾリズマブ 軽鎖 CDR1	RASQDVSTAV A 11
配列番号 206 アテゾリズマブ 軽鎖 CDR2	SASFLYS 7
配列番号 207 アテゾリズマブ 軽鎖 CDR3	QQYLYHPAT 9

【１７３６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１４／０３４１９１７Ａ１号に記載されている抗体を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。他の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１への結合についてこれらの抗体のうちのいずれかと競合する抗体も含まれる。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、ＢＭＳ－９３５５５９としても知られるＭＤＸ－１１０５であり、これは米国特許第７，９４３，７４３号に開示されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第７，９４３，７４３号に開示されている抗ＰＤ－Ｌ１抗体から選択される。

【１７３７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＩＮＶＩＶＯＭＡＢ抗ｍ－ＰＤ－Ｌ１クローン１０Ｆ．９Ｇ２（カタログ番号ＢＥ０１０１、Ｂｉｏ Ｘ Ｃｅｌｌ，Ｉｎｃ．，Ｗｅｓｔ Ｌｅｂａｎｏｎ，ＮＨ，ＵＳＡ）などの市販のモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、ＡＦＦＹＭＥＴＲＩＸ ＥＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥ（ＭＩＨ１）などの市販のモノクローナル抗体である。いくつかの市販の抗ＰＤ

－Ｌ１抗体が、当業者に知られている。
【１７３８】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ＢＩＯＬＥＧＥＮＤ２４Ｆ．１０Ｃ１２マウスＩｇＧ２ａ、κアイソタイプ（カタログ番号３２９６０２　Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、ＳＩＧＭＡ抗ＰＤ－Ｌ２抗体（カタログ番号ＳＡＢ３５００３９５，Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）、または当業者に知られている他の市販のＰＤ－Ｌ２抗体などの市販のモノクローナル抗体である。
【１７３９】
２．ＣＴＬＡ－４阻害剤との併用
いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるＴＩＬ療法は、治療的ＴＩＬ集合単独による治療を含んでもよく、またはＴＩＬ及び１つ以上のＣＴＬＡ－４阻害剤を含む併用治療を含んでもよい。
【１７４０】
細胞傷害性Ｔリンパ球抗原４（ＣＴＬＡ－４）は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、ヘルパーＴ細胞の表面で発現する。ＣＴＬＡ－４は、ＣＤ２８依存性Ｔ細胞活性化の負の制御因子であり、適応免疫応答のチェックポイントとして機能する。Ｔ細胞共刺激タンパク質ＣＤ２８と同様に、ＣＴＬＡ－４結合抗原は、細胞上でＣＤ８０及びＣＤ８６を提示する。ＣＴＬＡ－４は抑制シグナルをＴ細胞に伝達し、ＣＤ２８は刺激シグナルを伝達する。ヒトＣＴＬＡ－４に対するヒト抗体は、ウイルス感染及び細菌感染を治療または予防すること、ならびにがんを治療するためのものなど、多くの疾患状態における免疫刺激調節因子として記載されている（ＷＯ０１／１４４２４及びＷＯ００／３７５０４）。イピリムマブ（ＭＤＸ－０１０）及びトレメリムマブ（ＣＰ－６７５，２０６）を含むが、これらに限定されない、様々な種類の固形腫瘍の治療のためのいくつかの完全ヒト抗ヒトＣＴＬＡ－４モノクローナル抗体（ｍＡｂ）が、臨床試験で研究されている。
【１７４１】
いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、当技術分野で知られている任意のＣＴＬＡ－４阻害剤またはＣＴＬＡ－４遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるＣＴＬＡ－４阻害剤または遮断剤のうちの１つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、ＣＴＬＡ－４阻害剤に関して互換的に使用される。誤解を避けるために、抗体であるＣＴＬＡ－４阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリアント、複合体、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、ＣＴＬＡ－４阻害剤への本明細書での言及はまた、小分子化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。
【１７４２】
本発明の方法で使用するための好適なＣＴＬＡ－４阻害剤には、抗ＣＴＬＡ－４抗体、ヒト抗ＣＴＬＡ－４抗体、マウス抗ＣＴＬＡ－４抗体、哺乳動物抗ＣＴＬＡ－４抗体、ヒト化抗ＣＴＬＡ－４抗体、モノクローナル抗ＣＴＬＡ－４抗体、ポリクローナル抗ＣＴＬＡ－４抗体、キメラ抗ＣＴＬＡ－４抗体、ＭＤＸ－０１０（イピリムマブ）、トレメリムマブ、抗ＣＤ２８抗体、抗ＣＴＬＡ－４アドネクチン、抗ＣＴＬＡ－４ドメイン抗体、一本鎖抗ＣＴＬＡ－４断片、重鎖抗ＣＴＬＡ－４断片、軽鎖抗ＣＴＬＡ－４断片、共刺激経路を刺激するＣＴＬＡ－４の阻害剤、ＰＣＴ公開第ＷＯ２００１／０１４４２４号に開示される抗体、ＰＣＴ公開第ＷＯ２００４／０３５６０７号に開示される抗体、米国特許出願公開第２００５／０２０１９９４号に開示される抗体、ならびに付与された欧州特許第ＥＰ　１２１２４２２　Ｂ１号に開示された抗体が含まれるが、これらに限定されず、各々の開示が参照により本明細書に組み込まれる。さらなるＣＴＬＡ－４抗体は、米国特許第５，８１１，０９７号、同第５，８５５，８８７号、同第６，０５１，２２７号、及び同第６，９８４，７２０号、ＰＣＴ公開第ＷＯ０１／１４４２４号及び同第ＷＯ００／３

７５０４号、ならびに米国公開第２００２／００３９５８１号及び同第２００２／０８６０１４号に記載されており、各々の開示が参照により本明細書に組み込まれる。本発明の方法で使用することができる他の抗ＣＴＬＡ－４抗体には、例えば、ＷＯ９８／４２７５２、米国特許第６，６８２，７３６号及び同第６，２０７，１５６号、Ｈｕｒｗｉｔｚ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９５（１７）：１００６７－１００７１（１９９８）、Ｃａｍａｃｈｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２２（１４５）：Ａｂｓｔｒａｃｔ Ｎｏ．２５０５（２００４）（抗体ＣＰ－６７５２０６）、Ｍｏｋｙｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，５８：５３０１－５３０４（１９９８）、ならびに米国特許第５，９７７，３１８号、同第６，６８２，７３６号、同第７，１０９，００３号、及び同第７，１３２，２８１号に開示されるものが含まれ、これらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【１７４３】

さらなるＣＴＬＡ－４阻害剤には、ＣＤ２８抗原がその同族リガンドと結合する能力を妨害すること、ＣＴＬＡ－４がその同族リガンドと結合する能力を阻害すること、共刺激経路を介してＴ細胞応答を増強すること、Ｂ７がＣＤ２８及び／またはＣＴＬＡ－４と結合する能力を破壊すること、Ｂ７が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、ＣＤ８０がＣＤ２８及び／またはＣＴＬＡ－４と結合する能力を破壊すること、ＣＤ８０が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、ＣＤ８６がＣＤ２８及び／またはＣＴＬＡ－４と結合する能力を破壊すること、ＣＤ８６が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、及び共刺激経路を一般に活性化されることから破壊することが可能である任意の阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。これには、共刺激経路の他のメンバーのなかでもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４の小分子阻害剤、共刺激経路の他のメンバーのなかでもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４に対する抗体、共刺激経路の他のメンバーのなかでもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４に指向するアンチセンス分子、共刺激経路の他のメンバーのなかでもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４に指向するアドネクチン、他のＣＴＬＡ－４阻害剤のなかでも共刺激経路の他のメンバーのなかでもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４のＲＮＡｉ阻害剤（一本鎖及び二本鎖の両方）が必ず含まれる。

【１７４４】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、約10^{-6}Ｍ以下、約10^{-7}Ｍ以下、約10^{-8}Ｍ以下、約10^{-9}Ｍ以下、約10^{-10}Ｍ以下、約10^{-11}Ｍ以下、約10^{-12}Ｍ以下、例えば、約10^{-13}Ｍ～10^{-16}Ｍの間、またはエンドポイントとして前述の値のうちの任意の２つを有する任意の範囲内で、ＣＴＬＡ－４と結合する。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、同じアッセイを使用して比較した場合、イピリムマブのＫｄの１０倍以下のＫｄでＣＴＬＡ－４と結合する。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、同じアッセイを使用して比較した場合、イピリムマブとほぼ同じかまたはそれ以下（例えば、最大１０倍低いか、または最大１００倍低い）のＫｄでＣＴＬＡ－４と結合する。いくつかの実施形態では、ＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４結合のＣＴＬＡ－４阻害剤による阻害のＩＣ５０値は、同じアッセイを使用して比較した場合、それぞれＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４結合のイピリムマブ媒介阻害より１０倍以下で大きい。いくつかの実施形態では、ＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４結合のＣＴＬＡ－４阻害剤による阻害のＩＣ５０値は、同じアッセイを使用して比較した場合、それぞれＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４結合のイピリムマブ媒介性阻害とほぼ同じかまたはそれ以下（例えば、最大１０倍低い、または最大１００倍低い）である。

【１７４５】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、好適な対照と比較して、少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、または１００％、例えば、５０％～７５％、７５％～９０％、または９０％～１００％の間でＣＴＬＡ－４の発現を阻害する、及び／または生物学的活性を減少させるのに十分な量で使用

される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４経路阻害剤は、好適な対照と比較して、少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、または１００％、例えば、５０％～７５％、７５％～９０％、または９０％～１００％の間でＣＴＬＡ－４のＣＤ８０、ＣＤ８６、またはその両方との結合を減少させることにより、ＣＴＬＡ－４の生物学的活性を減少させるのに十分な量で使用される。対象となる薬剤の効果を評価または定量化する状況下における好適な対照は、典型的には、対象となる薬剤、例えば、ＣＴＬＡ－４経路阻害剤に曝露されていないか、または治療されていない（または僅かな量に曝露されているか、または治療されている）同等の生物学的システム（例えば、細胞または対象）である。いくつかの実施形態では、生物学的システムは、それ自体の対照として機能し得る（例えば、生物学的システムは、薬剤への曝露または治療の前に評価され得、曝露または治療が開始または終了した後の状態と比較され得る。いくつかの実施形態では、歴史的対照が使用され得る。

【１７４６】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブ（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ　Ｃｏ．からＹｅｒｖｏｙとして市販されている）、またはそのバイオシミラー、抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。当該技術分野で知られているように、イピリムマブは、機能的ヒトレパートリーを生成するための重鎖及び軽鎖をコードするヒト遺伝子を有するトランスジェニックマウスに由来する完全ヒトＩｇＧ　１κ抗体である、抗ＣＴＬＡ－４抗体を指す。イピリムマブは、そのＣＡＳ登録番号４７７２０２－００－９及びＰＣＴ公開第ＷＯ０１／１４４２４号で参照することもでき、その全体がすべての目的で参照により本明細書に組み込まれる。それは抗体１０ＤＩとして開示されている。具体的には、イピリムマブは、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域（配列番号２１１を含む軽鎖可変領域を有し、配列番号２１０を含む重鎖可変領域を有する）を含む。イピリムマブの薬学的組成物は、イピリムマブ及び１つ以上の希釈剤、ビヒクル、または賦形剤を含有するすべての薬学的に許容される組成物を含む。イピリムマブを含有する薬学的組成物の例は、国際特許出願公開第ＷＯ２００７／６７９５９号に記載されている。イピリムマブは、静脈内（ＩＶ）投与され得る。

【１７４７】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、配列番号２０８によって与えられる重鎖及び配列番号２０９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１７４８】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブの重鎖及び軽鎖のＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号２１０に示される配列を含み、ＣＴＬＡ－４阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号２１１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域

を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【１７４９】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２１２、配列番号２１３、及び配列番号２１４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２１５、配列番号２１６、及び配列番号２１７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＣＴＬＡ－４上の同じエピトープに結合する。

【１７５０】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブに関して薬物規制当局によって承認されたＣＴＬＡ－４バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、抗ＣＴＬＡ－４抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。イピリムマブのアミノ酸配列を表２３に示す。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＣＴＬＡ－４抗体であり、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。抗ＣＴＬＡ－４抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。

【１７５１】

【表２３】

表２３．イピリムマブのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号208 イピリムマブ 重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTH 225
配列番号209 イピリムマブ 軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP 120 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL 180 TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC 215
配列番号210 イピリムマブ 可変重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSS 118
配列番号211 イピリムマブ 可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIK 108
配列番号212 イピリムマブ 重鎖CDR1	GFTFSSYT 8
配列番号213 イピリムマブ 重鎖CDR2	TFISYDGNNK 10
配列番号214 イピリムマブ 重鎖CDR3	ARTGWLGPFD Y 11
配列番号215 イピリムマブ 軽鎖CDR1	QSVGSSY 7
配列番号216 イピリムマブ 軽鎖CDR2	GAF 3
配列番号217 イピリムマブ 軽鎖CDR3	QQYGSSPWT 9

【１７５２】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約３．５ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約４．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約５．５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約６．５ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約７．５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約８．５ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約９．５ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【１７５３】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約２００ｍｇ～約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約２００ｍｇ、約２２０ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２６０ｍｇ、約２

８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３２０ｍｇ、約３４０ｍｇ、約３６０ｍｇ、約３８０ｍｇ、約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４４０ｍｇ、約４６０ｍｇ、約４８０ｍｇ、または約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【１７５４】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、または６週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【１７５５】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために、３週間毎に約ｍｇ／ｋｇで最大４用量投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【１７５６】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、黒色腫のアジュバント治療のために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、約１０ｍｇ／ｋｇで３週間毎に４用量、続いて１０ｍｇ／ｋｇで１２週間毎に最大３年間投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【１７５７】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、進行性腎細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約１ｍｇ／ｋｇで投与され、直後に同じ日にニボルマブ３ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量投与される。いくつかの実施形態では、４用量の組み合わせを完了した後、ニボルマブは、進行性腎細胞癌及び／または腎細胞癌の標準的な投薬レジメンに従って単剤として投与され得る。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【１７５８】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性結腸直腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性結腸直腸癌を治療するために、約１ｍｇ／ｋｇで静脈内に３０分間にわたって投与され、直後に同じ日にイピリムマブ３ｍｇ／ｋｇを静脈内に３０分間にわたって３週間毎に４用量投与される。いくつかの実施形態では、４用量の組み合わせを完了した後、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性結腸直腸癌の標準的な投薬レジメンに従って推奨されるように単剤としてニボルマブを投与する。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象ま

たは患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【１７５９】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、肝細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、肝細胞癌を治療するために、約３ｍｇ／ｋｇで静脈内に３０分間にわたって投与され、直後に同じ日にニボルマブ１ｍｇ／ｋｇを静脈内に３０分間にわたって３週間毎に４用量投与される。いくつかの実施形態では、４用量の組み合わせを完了した後、肝細胞癌のための標準的な投薬レジメンに従って単剤としてニボルマブを投与する。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【１７６０】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、６週間毎に約１ｍｇ／ｋｇで、２週間毎に３ｍｇ／ｋｇのニボルマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、６週間毎に約１ｍｇ／ｋｇで、３週間毎に３６０ｍｇのニボルマブ及び２サイクルのプラチナダブレット化学療法とともに投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【１７６１】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、悪性胸膜中皮腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、悪性胸膜中皮腫を治療するために、６週間毎に約１ｍｇ／ｋｇで、３週間毎に３６０ｍｇのニボルマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【１７６２】

トレメリムマブ（ＣＰ－６７５，２０６としても知られる）は、完全ヒトＩｇＧ２モノクローナル抗体であり、ＣＡＳ番号７４５０１３－５９－６を有する。トレメリムマブは、米国特許第６，６８２，７３６号（参照により本明細書に組み込まれる）において抗体１１．２．１として開示されている。トレメリムマブの重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号２１８及び２１９に示す。トレメリムマブは、黒色腫及び乳癌を含む種々の腫瘍の治療のための臨床試験において研究されており、トレメリムマブは、０．０１及び１５ｍｇ／ｋｇの用量範囲で４週間または１２週間毎に単回用量または複数回用量として静脈内投与される。本発明によって提供されるレジメンでは、トレメリムマブは、局所的に、特に皮内または皮下に投与される。皮内または皮下投与されるトレメリムマブの有効量は、典型的には、人当たり５～２００ｍｇ／用量の範囲である。いくつかの実施形態では、トレメリムマブの有効量は、用量当たり人当たり１０～１５０ｍｇ／用量の範囲である。いくつかの特定の実施形態では、トレメリムマブの有効量は、人当たり約１０、２５、３７．５、４０、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５、または２００ｍｇ／用量である。

【１７６３】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、配列番号２１８によって与えられる重鎖及び配列番号２１９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴ

ＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１７６４】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブの重鎖及び軽鎖のＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号２２０に示される配列を含み、ＣＴＬＡ－４阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号２２１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【１７６５】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２２２、配列番号２２３、及び配列番号２２４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２２５、配列番号２２６、及び配列番号２２７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＣＴＬＡ－４上の同じエピトープに結合する。

【１７６６】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＣＴＬＡ－４バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、抗ＣＴＬＡ－４抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。トレメリムマブのアミノ酸配列を表２４に示す。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＣＴＬＡ－４抗体であり、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。抗ＣＴＬＡ－４抗体は、米国ＦＤＡ

及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。

【１７６７】

【表２４】

表２４．トレメリムマブのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号218 トレメリムマブ 重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP RGATLYYYYY GMDVWGQGTT 120 VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA 180 VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVERKCCVE CPPCPAPPVA 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF 300 NSTFRVVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
配列番号219 トレメリムマブ 軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIN SYLDWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYSTPFTFGP GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号220 トレメリムマブ 可変重鎖	GVVQPGRSLR LSCAASGFTF SSYGMHWVRQ APGKGLEWVA VIWYDGSNKY YADSVKGRFT 60 ISRDNSKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCARD PRGATLYYYY YGMDVWGQGT TVTVSSASTK 120 GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVH 167
配列番号221 トレメリムマブ 可変軽鎖	PSSLSASVGD RVTITCRASQ SINSYLDWYQ QKPGKAPKLL IYAASSLQSG VPSRFSGSGS 60 GTDFTLTISS LQPEDFATYY CQQYYSTPFT FGPGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS 120 GTASVVCLLN NFYPREAKV 139
配列番号222 トレメリムマブ 重鎖CDR1	GFTFSSYGMH 10
配列番号223 トレメリムマブ 重鎖CDR2	VIWYDGSNKY YADSV 15
配列番号224 トレメリムマブ 重鎖CDR3	DPRGATLYYY YYGMDV 16
配列番号225 トレメリムマブ 軽鎖CDR1	RASQSINSYL D 11
配列番号226 トレメリムマブ 軽鎖CDR2	AASSLQS 7
配列番号227 トレメリムマブ 軽鎖CDR3	QQYYSTPFT 9

【１７６８】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約３．５ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約４．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約５．５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約６．５ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約７．５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／

ｋｇ、約８．５ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約９．５ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【１７６９】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約２００ｍｇ～約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約２００ｍｇ、約２２０ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２６０ｍｇ、約２８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３２０ｍｇ、約３４０ｍｇ、約３６０ｍｇ、約３８０ｍｇ、約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４４０ｍｇ、約４６０ｍｇ、約４８０ｍｇ、または約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【１７７０】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、または６週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【１７７１】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、Ａｇｅｎｕｓからのザリフレリマブ、またはそのバイオシミラー、抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。ザリフレリマブは、完全ヒトモノクローナル抗体である。ザリフレリマブには、Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ａｂｓｔｒａｃｔｓ Ｓｅｒｖｉｃｅ（ＣＡＳ）登録番号２１４８３２１－６９－９が割り当てられており、ＡＧＥＮ１８８４としても知られている。ザリフレリマブの調製及び特性は、米国特許第１０，１４４，７７９号及び米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／００２４３５０　Ａ１号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１７７２】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、配列番号２２８によって与えられる重鎖及び配列番号２２９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１７７３】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ザリフレリマブの重鎖及び軽鎖のＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号２３０に示される配列を含み、ＣＴＬＡ－４阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号２３１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【１７７４】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２３１、配列番号２３３、及び配列番号２３４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２３５、配列番号２３６、及び配列番号２３７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＣＴＬＡ－４上の同じエピトープに結合する。

【１７７５】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ザリフレリマブに関して薬物規制当局によって承認されたＣＴＬＡ－４バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、抗ＣＴＬＡ－４抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。ザリフレリマブのアミノ酸配列を表２５に示す。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＣＴＬＡ－４抗体であり、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。抗ＣＴＬＡ－４抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。

【１７７６】

【表２５】

表２５．ザリフレリマブのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号228 ザリフレリマブ 重鎖	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
配列番号229 ザリフレリマブ 軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKP GQAPRLLIYG ASTRATGIPD 60 RFSGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号230 ザリフレリマブ 可変重鎖	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSS 118
配列番号231 ザリフレリマブ 可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKP GQAPRLLIYG ASTRATGIPD 60 RFSGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQ GTKVEIK 107
配列番号232 ザリフレリマブ 重鎖 CDR1	GFTFSSYS 8
配列番号233 ザリフレリマブ 重鎖 CDR2	ISSSSSYI 8
配列番号234 ザリフレリマブ 重鎖 CDR3	ARVGLMGPFD I 11
配列番号235 ザリフレリマブ 軽鎖 CDR1	QSVSRY 6
配列番号236 ザリフレリマブ 軽鎖 CDR	GAS 3
配列番号237 ザリフレリマブ 軽鎖 CDR3	QQYGSSPWT 9

【１７７７】

さらなる抗ＣＴＬＡ－４抗体の例には、ＡＧＥＮ１１８１、ＢＭＳ－９８６２１８、ＢＣＤ－１４５、ＯＮＣ－３９２、ＣＳ１００２、ＲＥＧＮ４６５９、及びＡＤＧ１１６が含まれるが、これらに限定されず、これらは当業者に即知である。

【１７７８】

いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、以下の特許公開のうちのいずれかに開示される抗ＣＴＬＡ－４抗体である：ＵＳ２０１９／００４８０９６Ａ１、ＵＳ２０２０／０２２３９０７、ＵＳ２０１９／０２０１３３４、ＵＳ２０１９／０２０１３３４、ＵＳ２００５／０２０１９９４、ＥＰ１２１２４２２Ｂ１、ＷＯ２０１８／２０４７６０、ＷＯ２０１８／２０４７６０、ＷＯ２００１／０１４４２４、ＷＯ２００４／０３５６０７、ＷＯ２００３／０８６４５９、ＷＯ２０１２／１２０１２５、ＷＯ２０００／０３７５０４、ＷＯ２００９／１００１４０、ＷＯ２００６／０９６４９、ＷＯ２００５／０９２３８０、ＷＯ２００７／１２３７３７、ＷＯ２００６／０２９２１９、ＷＯ２０１０／０９７９５９７、ＷＯ２００６／１２１６８、及びＷＯ１９９７／０２０５７４（これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる）。さらなるＣＴＬＡ－４抗体は、米国特

許第５，８１１，０９７号、同第５，８５５，８８７号、同第６，０５１，２２７号、及び同第６，９８４，７２０号、ＰＣＴ公開第ＷＯ０１／１４４２４号及び同第ＷＯ００／３７５０４号、ならびに米国公開第２００２／００３９５８１号及び同第２００２／０８６０１４号、及び／または米国特許第５，９７７，３１８号、同第６，６８２，７３６号、同第７，１０９，００３号、及び同第７，１３２，２８１号に記載されており、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、例えば、ＷＯ９８／４２７５２、米国特許第６，６８２，７３６号及び同第６，２０７，１５６号、Ｈｕｒｗｉｔｚ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９９８（９５）：１００６７－１００７１（１９９８）、Ｃａｍａｃｈｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．，２００４，２２，１４５（Ａｂｓｔｒａｃｔ Ｎｏ．２５０５（２００４）（抗体ＣＰ－６７５２０６）、またはＭｏｋｙｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，１９９８，５８，５３０１－５３０４（１９９８）に開示されており、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。

【１７７９】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ＷＯ１９９６／０４０９１５（参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるＣＴＬＡ－４リガンドである。

【１７８０】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ＣＴＬＡ－４発現の核酸阻害剤である。例えば、抗ＣＴＬＡ－４ＲＮＡｉ分子は、ＰＣＴ公開第ＷＯ１９９９／０３２６１９及びＷＯ２００１／０２９０５８、米国公開第２００３／００５１２６３号、同第２００３／００５５０２０号、同第２００３／００５６２３５号、同第２００４／２６５８３９号、同第２００５／０１００９１３号、同第２００６／００２４７９８号、同第２００８／００５０３４２号、同第２００８／００８１３７３号、同第２００８／０２４８５７６号、同第２００８／０５５４４３号、及び／または米国特許第６，５０６，５５９号、同第７，２８２，５６４号、同第７，５３８，０９５号、及び同第７，５６０，４３８号（参照により本明細書に組み込まれる）において記載された分子の形態を取り得る。いくつかの事例では、抗ＣＴＬＡ－４ＲＮＡｉ分子は、欧州特許第ＥＰ１３０９７２６号（参照により本明細書に組み込まれる）において記載された二本鎖ＲＮＡｉ分子の形態を取る。いくつかの事例では、抗ＣＴＬＡ－４ＲＮＡｉ分子は、米国特許第７，０５６，７０４号及び同第７，０７８，１９６号（参照により本明細書に組み込まれる）において記載された二本鎖ＲＮＡｉ分子の形態を取る。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、国際特許出願公開第ＷＯ２００４／０８１０２１（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されたアプタマーである。

【１７８１】

他の実施形態では、本発明の抗ＣＴＬＡ－４ＲＮＡｉ分子は、米国特許第５，８９８，０３１号、同第６，１０７，０９４号、同第７，４３２，２４９号、及び同第７，４３２，２５０号、ならびに欧州出願第ＥＰ０９２８２９０号（参照により本明細書に組み込まれる）において記載されたＲＮＡ分子である。

【１７８２】

３．患者のリンパ球枯渇プレコンディショニング

いくつかの実施形態では、本発明は、ＴＩＬ集団でがんを治療する方法を含み、患者は、本開示によるＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的化学療法で前治療された患者のがんの治療に使用するためのＴＩＬ集団を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、注入による投与用である。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド６０ｍｇ／ｋｇ／日で２日間（ＴＩＬ注入の２７日前及び２６日前）、ならびにフルダラビン２５ｍｇ／ｍ^2／日で５日間（ＴＩＬ注入の２７日前～２３日前）である。いくつかの実施形態では、本開示による骨髄非破壊的化学療法及びＴＩＬ注入（０日目）後、患者は、生理学的許容範囲まで８時間毎に７２０，０００ＩＵ／ｋｇで静脈内的にＩＬ－２（ＰＲＯＬＥＵＫＩＮとして市販されている、アルデスロイキン）の静脈内注入を受ける。ある特定

の実施形態では、ＴＩＬ集団は、ＩＬ－２と組み合わせてがんを治療する際に使用するためのものであり、ＩＬ－２は、ＴＩＬ集団の後に投与される。

【１７８３】

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

【１７８４】

一般に、リンパ球枯渇は、フルダラビンまたはシクロホスファミド（マホスファミドと称される活性形態）及びそれらの組み合わせの投与を使用して達成される。かかる方法は、Ｇａｓｓｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１１，６０，７５－８５、Ｍｕｒａｎｓｋｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｌｉｎ．Ｐｒａｃｔ．Ｏｎｃｏｌ．，２００６，３，６６８－６８１、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００８，２６，５２３３－５２３９、及びＤｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００５，２３，２３４６－２３５７に記載されており、これらはすべて、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【１７８５】

いくつかの実施形態では、フルダラビンは、０．５μｇ／ｍＬ～１０μｇ／ｍＬのフルダラビン濃度で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、１μｇ／ｍＬのフルダラビン濃度で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日以上投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、１０ｍｇ／ｋｇ／日、１５ｍｇ／ｋｇ／日、２０ｍｇ／ｋｇ／日、２５ｍｇ／ｋｇ／日、３０ｍｇ／ｋｇ／日、３５ｍｇ／ｋｇ／日、４０ｍｇ／ｋｇ／日、または４５ｍｇ／ｋｇ／日の投与量で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で２～７日間投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で４～５日間投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、２５ｍｇ／ｋｇ／日で４～５日間投与される。

【１７８６】

いくつかの実施形態では、シクロホスファミドの活性形態であるマホスファミドは、シクロホスファミドの投与により、０．５μｇ／ｍＬ～１０μｇ／ｍＬの濃度で取得される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドの活性形態であるマホスファミドは、シクロホスファミドの投与により、１μｇ／ｍＬの濃度で取得される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日以上投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、１００ｍｇ／ｍ^2／日、１５０ｍｇ／ｍ^2／日、１７５ｍｇ／ｍ^2／日、２００ｍｇ／ｍ^2／日、２２５ｍｇ／ｍ^2／日、２５０ｍｇ／ｍ^2／日、２７５ｍｇ／ｍ^2／日、または３００ｍｇ／ｍ^2／日の投与量で投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、静脈内（すなわち、ｉ．ｖ．）投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で２～７日間投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、２５０ｍｇ／ｍ^2／日で４～５日間ｉ．ｖ．投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、２５０ｍｇ／ｍ^2／日で４日間ｉ．ｖ．投与される。

【１７８７】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、患者にフルダラビンとシクロホスファミドを一緒に投与することによって行われる。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、２５ｍｇ／ｍ^2／日でｉ．ｖ．投与され、シクロホスファミドは、２５０ｍｇ／ｍ^2／日で４日間にわたってｉ．ｖ投与される。

【１７８８】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日

の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われる。

【１７８９】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【１７９０】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約５０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを約２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【１７９１】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約５０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを約２０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【１７９２】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約４０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを約２０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【１７９３】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約４０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを約１５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【１７９４】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与することによって行われる。

【１７９５】

いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。いくつかの実施形態では、メスナは、１５ｍｇ／ｋｇで投与される。メスナが注入されるいくつかの実施形態では、連続的に注入される場合、メスナは、約２時間にわたってシクロホスファミドを注入することができ（－５日目及び／または－４日目）、次いで、各シクロホスファミド用量と同時に開始する２４時間にわたって残りの２２時間で３ｍｇ／ｋｇ／時間の速度で注入することができる。

【１７９６】

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

【１７９７】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、第３のＴＩＬ集団を患者に投与したのと同じ日に開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。

【１７９８】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、５日間のプレコンディショニング治療を含む。いくつかの実施形態では、該日は、－５日から－１日、または０日から４日として示される。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－４日目（すなわち、０日目及び１日目）にシクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－４日目（すなわち、０日目及び１日目）に静脈内シクロホスファミドを含む

。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－４日目（すなわち、０日目及び１日目）に６０ｍｇ／ｋｇの静脈内シクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。いくつかの実施形態では、レジメンは、フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、静脈内フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、２５ｍｇ／ｍ^{2}の静脈内フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－１日目（すなわち、０～４日目）に２５ｍｇ／ｍ^{2}の静脈内フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－１日目（すなわち、０～４日目）に２５ｍｇ／ｍ^{2}の静脈内フルダラビンをさらに含む。

【１７９９】

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

【１８００】

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

【１８０１】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む。

【１８０２】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む。

【１８０３】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で１日間投与するステップを含む。

【１８０４】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む。

【１８０５】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む。

【１８０６】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表２６に従って投与される。

【１８０７】

【表２６】

表２６．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 25mg/m^2/日	X	X	X	X	X					
TIL 注入						X				

【１８０８】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表２７に従って投与される。
【１８０９】
【表２７】

表２７．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X							
メスナ(必要に応じて)	X	X							
フルダラビン 25mg/m^2/日	X	X	X	X					
TIL 注入					X				

【１８１０】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表２８に従って投与される。
【１８１１】
【表２８】

表２８．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X						
メスナ(必要に応じて)	X	X						
フルダラビン 25mg/m^2/日	X	X	X					
TIL 注入				X				

【１８１２】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表２９に従って投与

される。
【１８１３】
【表２９】

表２９．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 25mg/m^2/日			X	X	X					
TIL 注入						X				

【１８１４】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３０に従って投与される。
【１８１５】
【表３０】

表３０．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 30mg/m^2/日	X	X	X	X	X					
TIL 注入						X				

【１８１６】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３１に従って投与される。
【１８１７】
【表３１】

表３１．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X							
メスナ(必要に応じて)	X	X							
フルダラビン 30mg/m^2/日	X	X	X	X					
TIL 注入					X				

【１８１８】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３２に従って投与される。
【１８１９】
【表３２】

表３２．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X						
メスナ(必要に応じて)	X	X						
フルダラビン 30mg/m^2/日	X	X	X					
TIL 注入				X				

【１８２０】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３３に従って投与される。
【１８２１】
【表３３】

表３３．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 30mg/m^2/日			X	X	X					
TIL 注入						X				

【１８２２】
いくつかの実施形態では、骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンの前述の実施形態で使用されるＴＩＬ注入は、本明細書に記載の任意のＴＩＬ組成物であり得、また本明細書に記載されるようなＩＬ－２レジメンの追加及び併用療法（ＰＤ－１及び／またはＰＤ－Ｌ１阻害剤など）の投与であり得る。
【１８２３】
４．ＩＬ－２レジメン
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、高用量ＩＬ－２レジメンを含み、高用量ＩＬ－２レジメンは、治療的ＴＩＬ集団の治療有効分量を投与した翌日から静脈内投与されるアルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリアントを含み、アルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリアントは、許容範囲まで８時間毎に最大１４用量にわたって、０．０３７ｍｇ／ｋｇまたは０．０４４ｍｇ／ｋｇ　ＩＵ／ｋｇ（患者の体重）の用量で１５分のボーラス静脈内注入を使用して投与される。９日間の休止後、このスケジュールは、さらに１４用量、合計最大２８用量にわたって繰り返され得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、１、２、３、４、５、または６用量で投与され

る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、最大６用量の最大投与量で投与される。

【１８２４】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、デクレッシェンドＩＬ－２レジメンを含む。デクレッシェンドＩＬ－２レジメンは、Ｏ'Ｄａｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．１９９９，１７，２７５２－６１、及びＥｔｏｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　２０００，８８，１７０３－９に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、デクレッシェンドＩＬ－２レジメンは、６時間にわたって静脈内投与される１８×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}アルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアント、続いて１２時間にわたって静脈内投与される１８×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}、続いて２４時間にわたって静脈内投与される１８×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}、続いて７２時間かけて静脈内投与される４．５×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}を含む。この治療サイクルは、２８日毎に最大４サイクル繰り返され得る。いくつかの実施形態では、デクレッシェンドＩＬ－２レジメンは、１日目の１８，０００，０００ＩＵ／ｍ^{2}、２日目の９，０００，０００ＩＵ／ｍ^{2}、３日目及び４日目の４，５００，０００ＩＵ／ｍ^{2}を含む。

【１８２５】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、低用量ＩＬ－２レジメンを含む。Ｄｏｍｉｎｇｕｅｚ－Ｖｉｌｌａｒ　ａｎｄ　Ｈａｆｌｅｒ，Ｎａｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　２０００，１９，６６５－６７３、Ｈａｒｔｅｍａｎｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ　Ｄｉａｂｅｔｅｓ　Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．２０１３，１，２９５－３０５、及びＲｏｓｅｎｚｗａｉｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｈｅｕｍ．Ｄｉｓ．２０１９，７８，２０９－２１７（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている低用量ＩＬ－２レジメンを含む、当該技術分野で知られている任意の低用量ＩＬ－２レジメンを使用することができる。いくつかの実施形態では、低用量ＩＬ－２レジメンは、ｍ^{2}当たり１８×１０^{6}ＩＵのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを２４時間当たり５日間の連続的注入として、その後ＩＬ－２療法なしで２～６日間、その後任意選択でアルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリアントを静脈内にさらに５日間、２４時間当たりｍ^{2}当たり１８×１０^{6}ＩＵの連続的注入として、その後任意選択でＩＬ－２療法なしで３週間投与することを含み、その後追加のサイクルが投与され得る。

【１８２６】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、最大６用量の最大投与量で投与される。いくつかの実施形態では、高用量ＩＬ－２レジメンは、小児の使用に適合される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に６００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に５００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に４００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に５００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に３００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に２００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に１００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。

【１８２７】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４、または２１日毎にペグ化ＩＬ－２を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４、または２１日毎に、ベンペガルデスロイキン、また

はその断片、バリアント、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

【１８２８】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４、または２１日毎に、ＴＨＯＲ－７０７、またはその断片、バリアント、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

【１８２９】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、ＴＩＬの投与後に、ネムバロイキンアルファ、またはその断片、バリアント、もしくはバイオシミラーの投与を含む。ある特定の実施形態では、患者にネムバロイキンを１日、２日、４日、６日、７日、１４日または２１日毎に、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で投与される。

【１８３０】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、抗体骨格に移植されたＩＬ－２断片の投与を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、ＩＬ－２低親和性受容体と結合する抗体－サイトカイン移植タンパク質の投与を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（V_H）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（V_L）と、V_HまたはV_LのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含み、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（V_H）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（V_L）と、V_HまたはV_LのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含み、ＩＬ－２分子は、ムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４または２１日毎に、配列番号２９及び配列番号３８からなる群から選択される重鎖と、配列番号３７及び配列番号３９からなる群から選択される軽鎖と、を含む抗体、またはその断片、バリアント、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

【１８３１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質は、アルデスロイキン（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ（登録商標））または同等の分子などであるがこれらに限定されない野生型ＩＬ－２分子よりも長い血清半減期を有する。

【１８３２】

いくつかの実施形態では、骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンの前述の実施形態で使用されるＴＩＬ注入は、本明細書に記載の任意のＴＩＬ組成物であり得、また、ＴＩＬ注入の代わりにＭＩＬ及びＰＢＬの注入、ならびに本明細書に記載のＩＬ－２レジメンの追加及び併用療法（ＰＤ－１及び／またはＰＤ－Ｌ１阻害剤及び／またはＣＴＬＡ－４阻害剤など）の投与を含み得る。

【１８３３】

５．追加の治療方法

他の実施形態では、本発明は、上記の該当する前段落のうちのいずれか１つに記載の治療的ＴＩＬ集団の治療上有効な投与量を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１８３４】

他の実施形態では、本発明は、上記の該当する前段落のいずれかに記載のＴＩＬ組成物の治療上有効な投与量を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１８３５】

他の実施形態では、本発明は、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団の治療上有効な投与量、または上記の該当する前段落のいずれかに記載のＴＩＬ組成

物の治療上有効な投与量を投与する前に骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されているように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１８３６】

他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量でのシクロホスファミドの２日間の投与ステップの後に２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量でのフルダラビンの５日間の投与ステップを含むように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１８３７】

他の実施形態では、本発明は、対象へのＴＩＬ細胞の投与の翌日に開始される高用量ＩＬ－２レジメンで対象を治療するステップをさらに含むように修正された上記の該当する前段落のいずれかに記載の、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１８３８】

他の実施形態では、本発明は、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される６００，０００または７２０，０００ＩＵ／ｋｇを高用量ＩＬ－２レジメンが含むように修正された上記の該当する前段落のいずれかに記載の、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１８３９】

他の実施形態では、本発明は、がんが固形腫瘍であるように修正された上記の該当する前段落のいずれかに記載の、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１８４０】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、または腎細胞癌であるように修正された上記の該当する前段落のいずれかに記載の、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１８４１】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌、ＮＳＣＬＣ、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、及び胃腸癌であるように修正された上記の該当する前段落のいずれかに記載の、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１８４２】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫であるように修正された上記の該当する前段落のいずれかに記載の、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１８４３】

他の実施形態では、本発明は、がんがＨＮＳＣＣであるように修正された上記の該当する前段落のいずれかに記載の、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１８４４】

他の実施形態では、本発明は、がんが子宮頸癌であるように修正された上記の該当する前段落のいずれかに記載の、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１８４５】

他の実施形態では、本発明は、がんがＮＳＣＬＣであるように修正された上記の該当する前段落のいずれかに記載の、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１８４６】

他の実施形態では、本発明は、がんが神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）であるように修正された上記の該当する前段落のいずれかに記載の、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１８４７】

他の実施形態では、本発明は、がんが胃腸癌であるように修正された上記の該当する前段落のいずれかに記載の、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【１８４８】
他の実施形態では、本発明は、がんが高頻度変異癌であるように修正された上記の該当する前段落のいずれかに記載の、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【１８４９】
他の実施形態では、本発明は、がんが小児の高頻度変異癌であるように修正された上記の該当する前段落のいずれかに記載の、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【１８５０】
他の実施形態では、本発明は、肛門癌、膀胱癌、乳癌（トリプルネガティブ乳癌を含む）、骨癌、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）によって引き起こされるがん、中枢神経系関連癌（上衣腫、髄芽腫、神経芽腫、松果体芽腫、及び未分化神経外胚葉性腫瘍を含む）、子宮頸癌（子宮頸部扁平上皮癌、子宮頸部腺扁平上皮癌、及び子宮頸部腺癌を含む）、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、食道胃接合癌、胃癌、胃腸癌、消化管間質腫瘍、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）、下咽頭癌、喉頭癌、鼻咽頭癌、中咽頭癌、及び咽頭癌を含む）、腎臓癌、肝臓癌、肺癌（非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）及び小細胞肺癌を含む）、黒色腫（ブドウ膜黒色腫、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫を含む）、中皮腫（悪性胸膜中皮腫を含む）、卵巣癌、膵臓癌（膵管腺癌を含む）、陰茎癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉腫（ユーイング肉腫、骨肉腫、横紋筋肉腫、ならびに他の骨及び軟部組織肉腫を含む）、甲状腺癌（未分化甲状腺癌を含む）、子宮癌、ならびに膣癌からなる群からがんが選択されるように修正された上記の該当する前段落のいずれかに記載の、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【１８５１】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法における使用のための、上記の該当する前段落のうちのいずれか１つに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。
【１８５２】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法における使用のための、上記の該当する前段落のいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。
【１８５３】
他の実施形態では、本発明は、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団または上記の該当する前段落のいずれかに記載のＴＩＬ組成物の治療上有効な投与量を対象に投与する前に骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されているように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団または上記の該当する前段落のいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。
【１８５４】
他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量でのシクロホスファミドの２日間の投与ステップの後に２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量でのフルダラビンの５日間の投与ステップを含むように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１８５５】
他の実施形態では、本発明は、患者へのＴＩＬ細胞の投与の翌日に開始される高用量ＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含むように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団または上記の該当する前段落のいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。
【１８５６】
他の実施形態では、本発明は、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される６００，０００または７２０，０００ＩＵ／ｋｇを高用量ＩＬ－２レジメンが含むように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集

団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１８５７】
他の実施形態では、本発明は、がんが固形腫瘍であるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団または上記の該当する前段落のいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。
【１８５８】
他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、または腎細胞癌であるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団または上記の該当する前段落のいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。
【１８５９】
他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌、ＮＳＣＬＣ、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、及び胃腸癌であるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団または上記の該当する前段落のいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。
【１８６０】
他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫であるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団または上記の該当する前段落のいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。
【１８６１】
他の実施形態では、本発明は、がんがＨＮＳＣＣであるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１８６２】
他の実施形態では、本発明は、がんが子宮頸癌であるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１８６３】
他の実施形態では、本発明は、がんがＮＳＣＬＣであるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１８６４】
他の実施形態では、本発明は、がんが神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）であるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１８６５】
他の実施形態では、本発明は、がんが胃腸癌であるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１８６６】
他の実施形態では、本発明は、がんが高頻度変異癌であるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１８６７】
他の実施形態では、本発明は、がんが小児の高頻度変異癌であるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【１８６８】
他の実施形態では、本発明は、肛門癌、膀胱癌、乳癌（トリプルネガティブ乳癌を含む）、骨癌、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）によって引き起こされるがん、中枢神経系関連癌（上衣腫、髄芽腫、神経芽腫、松果体芽腫、及び未分化神経外胚葉性腫瘍を含む）、子宮頸癌（子宮頸部扁平上皮癌、子宮頸部腺扁平上皮癌、及び子宮頸部腺癌を含む）、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、食道胃接合癌、胃癌、胃腸癌、消化管間質腫

瘍、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）、下咽頭癌、喉頭癌、鼻咽頭癌、中咽頭癌、及び咽頭癌を含む）、腎臓癌、肝臓癌、肺癌（非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）及び小細胞肺癌を含む）、黒色腫（ブドウ膜黒色腫、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫を含む）、中皮腫（悪性胸膜中皮腫を含む）、卵巣癌、膵臓癌（膵管腺癌を含む）、陰茎癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉腫（ユーイング肉腫、骨肉腫、横紋筋肉腫、ならびに他の骨及び軟部組織肉腫を含む）、甲状腺癌（未分化甲状腺癌を含む）、子宮癌、ならびに膣癌からなる群からがんが選択されるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団または上記の該当する前段落のいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。

【１８６９】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む対象におけるがんの治療方法における上記の該当する前段落のうちのいずれか１つに記載の治療的ＴＩＬ集団の使用を提供する。

【１８７０】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む対象におけるがんの治療方法における上記の該当する前段落のいずれかに記載のＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１８７１】

他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンを対象に投与し、その後に上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団の治療上有効な投与量、または上記の該当する前段落のいずれかに記載のＴＩＬ組成物の治療上有効な投与量を対象に投与することを含む対象におけるがんの治療方法における上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団または上記の該当する前段落のいずれかに記載のＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１８７２】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団または治療上有効な投与量のＴＩＬ組成物を対象に投与する前に骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されているように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１８７３】

他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量でのシクロホスファミドの２日間の投与ステップの後に２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量でのフルダラビンの５日間の投与ステップを含むように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１８７４】

他の実施形態では、本発明は、患者へのＴＩＬ細胞の投与の翌日に開始される高用量ＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含むように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団の使用、または上記の該当する前段落のいずれかに記載のＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１８７５】

他の実施形態では、本発明は、高用量ＩＬ－２レジメンが許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される６００，０００または７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含むように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１８７６】

他の実施形態では、本発明は、がんが固形腫瘍であるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１８７７】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒトパピローマウ

イルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、または腎細胞癌であるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１８７８】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌、ＮＳＣＬＣ、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、及び胃腸癌であるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１８７９】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫であるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１８８０】

他の実施形態では、本発明は、がんがＨＮＳＣＣであるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１８８１】

他の実施形態では、本発明は、がんが子宮頸癌であるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１８８２】

他の実施形態では、本発明は、がんがＮＳＣＬＣであるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１８８３】

他の実施形態では、本発明は、がんが神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）であるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１８８４】

他の実施形態では、本発明は、がんが胃腸癌であるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１８８５】

他の実施形態では、本発明は、がんが高頻度変異癌であるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１８８６】

他の実施形態では、本発明は、がんが小児の高頻度変異癌であるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物の使用を提供する。

他の実施形態では、本発明は、肛門癌、膀胱癌、乳癌（トリプルネガティブ乳癌を含む）、骨癌、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）によって引き起こされるがん、中枢神経系関連癌（上衣腫、髄芽腫、神経芽腫、松果体芽腫、及び未分化神経外胚葉性腫瘍を含む）、子宮頸癌（子宮頸部扁平上皮癌、子宮頸部腺扁平上皮癌、及び子宮頸部腺癌を含む）、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、食道胃接合癌、胃癌、胃腸癌、消化管間質腫瘍、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）、下咽頭癌、喉頭癌、鼻咽頭癌、中咽頭癌、及び咽頭癌を含む）、腎臓癌、肝臓癌、肺癌（非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）及び小細胞肺癌を含む）、黒色腫（ブドウ膜黒色腫、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫を含む）、中皮腫（悪性胸膜中皮腫を含む）、卵巣癌、膵臓癌（膵管腺癌を含む）、陰茎癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉腫（ユーイング肉腫、骨肉腫、横紋筋肉腫、ならびに他の骨及び軟部組織肉腫を含む）、甲状腺癌（未分化甲状腺癌を含む）、子宮癌、ならびに膣癌からなる群からがんが選択されるように修正された、上記の該当する前段落のいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【実施例】

【１８８７】
本明細書に包含される実施形態は、これから以下の実施例を参照して説明される。これらの実施例は、例示のみを目的として提供されており、本明細書に包含される本開示は、決してこれらの実施例に限定されると解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書で提供される教示の結果として明らかになるありとあらゆる変形を包含すると解釈されるべきである。
【１８８８】
実施例１：ＲＥＰ前プロセス及びＲＥＰプロセス用の培地の調製
この実施例は、様々な固形腫瘍に由来する腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の培養を含むプロトコルで使用するための組織培養培地の調製のための手順を説明する。この培地を、本出願及び他の実施例に記載のＴＩＬのうちのいずれかの調製に使用することができる。
【１８８９】
ＣＭ１の調製。以下の試薬を冷蔵から取り出し、それらを３７℃の水浴中で温めた（ＲＰＭＩ１６４０、ヒトＡＢ血清、２００ｍＭ　Ｌ－グルタミン）。ろ過される容量に適した０．２μｍフィルターユニットの上部に各成分を添加することによって、以下の表３４に従ってＣＭ１培地を調製した。４℃で保存する。
【１８９０】
【表３４】

表３４．ＣＭ１の調製

成分	最終濃度	最終体積 500mL	最終体積 IL
RPMI1640	NA	450 mL	900 mL
ヒト AB 血清、 熱不活性化 10%	50 mL	100 mL	
200mM L-グルタミン	2 mM	5 mL	10 mL
55mM BME	55 μM	0.5 mL	1 mL
50mg/mL 硫酸ゲンタマイシン	50 μg/mL	0.5 mL	1 mL

【１８９１】
使用日に、３７℃の水浴中で必要量のＣＭ１を事前に温め、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を追加した。
【１８９２】
表３５に従って必要に応じて追加の補充を行った。
【１８９３】

【表３５】

表３５．必要に応じたＣＭ１の追加の補充。

サプリメント	ストック濃度	希釈	最終濃度
GlutaMAX(商標)	200 mM	1:100	2 mM
ペニシリン/ストレプトマイシン	10,000U/mL ペニシリン 10,000μg/mL ストレプトマイシン	1:100	100U/mL ペニシリン 100μg/mL ストレプトマイシン
アンホテリシンB	250 μg/mL	1:100	2.5 μg/mL

【１８９４】
ＣＭ２の調製
調製したＣＭ１を冷蔵庫から取り出すか、または新鮮なＣＭ１を調製した。ＡＩＭ－Ｖ（登録商標）を冷蔵庫から取り出し、調製したＣＭ１を滅菌培地ボトル内で同等体積のＡＩＭ－Ｖ（登録商標）と混合することによって、必要な量のＣＭ２を調製した。使用日に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をＣＭ２培地に追加した。使用日に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む十分な量のＣＭ２を作製した。ＣＭ２培地ボトルにその名前、調製者のイニシャル、濾過／調製日、２週間の有効期限をラベル付けし、組織培養に必要になるまで４℃で保存した。
【１８９５】
ＣＭ３の調製
使用が必要になった日にＣＭ３を調製した。ＣＭ３は、ＡＩＭ－Ｖ（登録商標）培地と同じであり、使用日に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した。ＩＬ－２ストック溶液をＡＩＭ－Ｖのボトルまたはバッグに直接追加することによって、実験のニーズに十分な量のＣＭ３を調製した。穏やかに振盪することによって十分に混合した。ボトルに、ＡＩＭ－Ｖに追加した直後に「３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２」とラベル付けする。過剰なＣＭ３が存在する場合は、培地名、調製者のイニシャル、培地を調製した日、及びその有効期限（調製後７日）でラベル付けしたボトル内で４℃で保管した。４℃で７日間保管した後、ＩＬ－２を補充した培地を廃棄した。
【１８９６】
ＣＭ４の調製
ＣＭ４は、ＣＭ３と同じであり、２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）（最終濃度）を追加で補充した。１ＬのＣＭ３毎に、１０ｍＬの２００ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）を添加する。ＩＬ－２ストック溶液及びＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）ストック溶液をＡＩＭ－Ｖのボトルまたはバッグに直接追加することによって、実験のニーズに十分な量のＣＭ４を調製する。穏やかに振盪することによって十分に混合した。ボトルに、ＡＩＭ－Ｖに追加した直後に「３０００ＩＬ／ｍＬ　ＩＬ－２及びＧｌｕｔａＭＡＸ」とラベル付けした。過剰なＣＭ４が存在する場合、培地名、「ＧｌｕｔａＭＡＸ」、及びその有効期限（調製後７日）でラベル付けしたボトル内で４℃で保管した。４℃で７日間保管した後、ＩＬ－２を補充した培地を廃棄した。
【１８９７】
実施例２：ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１サイトカインカクテルの使用
この実施例は、本明細書の実施例のうちのいずれかのＴＩＬプロセスと組み合わせた、追加のＴ細胞成長因子として機能するＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１サイトカインの使用を説明する。

【１８９８】
本明細書に記載のプロセスを使用して、ＴＩＬは、培養の開始時に、実験の一方のアームにおいてＩＬ－２の存在下で腫瘍から、及びもう一方のアームではＩＬ－２の代わりにＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の組み合わせから成長させることができる。ＲＥＰ前の完了時に、培養物を、拡張、表現型、機能（ＣＤ１０７ａ＋及びＩＦＮ－γ）、及びにＴＣＲ　Ｖβレパートリーについて評価した。ＩＬ－１５及びＩＬ－２１は、本明細書の他の場所及びＳａｎｔｅｇｏｅｔｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄ．，２０１３，１１，３７に記載されている。
【１８９９】
結果は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１処理条件でのＣＤ４$^+$及びＣＤ８$^+$細胞の両方で、ＩＬ－２のみの条件と比較して増強したＴＩＬ拡張（＞２０％）が観察できることを示し得る。ＩＬ－２単独培養物と比較して、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１で処理した培養物から取得されたＴＩＬには、歪んだＴＣＲ　Ｖβレパートリーを伴う主にＣＤ８$^+$集団への歪みがあった。ＩＦＮ－γ及びＣＤ１０７ａは、ＩＬ－２単独で処理したＴＩＬと比較して、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１で処理したＴＩＬで上昇した。
【１９００】
実施例３：ガンマ線照射末梢単核細胞の個々のロットを適格性確認する
この実施例は、本明細書に記載の例示的な方法において同種異系フィーダー細胞として使用するためのガンマ線照射末梢単核細胞（ＰＢＭＣ、単核細胞またはＭＮＣとしても知られる）の個々のロットを適格性確認するための簡略化された手順を説明する。
【１９０１】
照射された各ＭＮＣフィーダーロットは、個々のドナーから調製した。各ロットまたはドナーは、精製された抗ＣＤ３（クローンＯＫＴ３）抗体及びインターロイキン－２（ＩＬ－２）の存在下でＲＥＰ内のＴＩＬを拡張する能力について個々にスクリーニングした。さらに、フィーダー細胞の各ロットを、ＴＩＬを添加せずに試験し、受けたガンマ線の線量がそれらを複製不全にするのに十分であることを確認した。
【１９０２】
ＴＩＬのＲＥＰには、ガンマ線を照射し、成長を停止させたＭＮＣフィーダー細胞が必要である。フィーダーＭＮＣの膜受容体は、抗ＣＤ３（クローンＯＫＴ３）抗体に結合し、ＲＥＰフラスコ内のＴＩＬに架橋し、ＴＩＬを刺激して拡張させる。フィーダーロットは、個々のドナーから採取した全血の白血球アフェレーシスから調製した。白血球アフェレーシス産物を、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ上で遠心分離し、洗浄し、照射し、ＧＭＰ条件下で凍結保存した。
【１９０３】
ＴＩＬ療法を受けた患者には、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）を引き起こす可能性があるため、生存可能なフィーダー細胞を注入しないことが重要である。したがって、フィーダー細胞は、細胞にガンマ線を照射することによって成長を停止させ、再培養時に二本鎖ＤＮＡ切断が起こり、ＭＮＣ細胞の細胞生存性が喪失する。
【１９０４】
フィーダーロットを、２つの基準：１）共培養でＴＩＬを１００倍超拡張する能力、及び２）複製不全で評価した。
【１９０５】
フィーダーロットを、直立したＴ２５組織培養フラスコ内で培養された２つの主要なＲＥＰ前ＴＩＬ株を利用して、ｍｉｎｉ－ＲＥＰ形式で試験した。各ＴＩＬ株は、ＲＥＰでの活性化に応答して増殖する能力が独特であるため、フィーダーロットを、２つの異なるＴＩＬ株に対して試験した。対照として、上記の基準を満たすことが歴史的に示されている多くの照射されたＭＮＣフィーダー細胞を、試験ロットと並行して実行した。
【１９０６】
１回の実験で試験されたすべてのロットが同等の試験を受けることを保証するために、

すべての条件及びすべてのフィーダーロットを試験するために、同じＲＥＰ前ＴＩＬ株の十分なストックが利用可能であった。

【１９０７】

試験したフィーダー細胞の各ロットに、合計６つのＴ２５フラスコがあった：ＲＥＰ前ＴＩＬ株＃１（２フラスコ）、ＲＥＰ前ＴＩＬ株＃２（２フラスコ）、及びフィーダー対照（２フラスコ）。ＴＩＬ株番号１及び番号２を含むフラスコは、フィーダーロットがＴＩＬを拡張する能力を評価した。フィーダー対照フラスコは、フィーダーロットの複製不全を評価した。

【１９０８】

Ａ．実験プロトコル

－２／３日目、ＴＩＬ株の解凍ＣＭ２培地を調製し、３７℃の水浴中でＣＭ２を温める。３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した４０ｍＬのＣＭ２を調製する。使用まで保温する。ＩＬ－２を含まない２０ｍＬの予熱したＣＭ２を、使用したＴＩＬ株の名前がラベル付けされた２本の５０ｍＬコニカルチューブの各々に入れる。ＬＮ２ストレージから２つの指定されたＲＥＰ前ＴＩＬ株を取り出し、バイアルを組織培養室に移した。少量の氷が残るまで、３７℃の水浴内の密封されたジッパーストレージバッグ内にバイアルを入れて解凍した。

【１９０９】

無菌トランスファーピペットを使用して、各バイアルの内容物を、調製した、ラベル付けされた５０ｍＬのコニカルチューブ中の２０ｍＬのＣＭ２に直ちに移した。細胞を洗浄し、４００×ＣＦで５分間遠心分離するために、ＩＬ－２なしのＣＭ２を使用して４０ｍＬにＱＳ。上清を吸引し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補充された５ｍＬの温かいＣＭ２に再懸濁した。

【１９１０】

自動セルカウンターを使用して細胞を計数するために、少量のアリコート（２０μＬ）を重複して取り出した。計数を記録した。カウントしながら、ＴＩＬ細胞を含む５０ｍＬのコニカルチューブを、加湿した３７℃、５％ CO_2 インキュベーターに入れ、ガス交換を可能にするためにキャップを緩めた。細胞濃度を決定し、ＴＩＬを、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充したＣＭ２中で1×10^6細胞／ｍＬに希釈した。

【１９１１】

ｍｉｎｉ－ＲＥＰの０日目まで、加湿した３７℃のインキュベーターで必要な数のウェルにおいて、２４ウェル組織培養プレートの１ウェル当たり２ｍＬで培養した。混乱及び潜在的な相互汚染を避けるために、別々の２４ウェル組織培養プレートで異なるＴＩＬ株を培養した。

【１９１２】

０日目、Ｍｉｎｉ－ＲＥＰを開始する試験されるフィーダーロットの数に十分なＣＭ２培地を調製した。（例えば、一度に４つのフィーダーロットを試験するために、８００ｍＬのＣＭ２培地を調製した）。上記で調製したＣＭ２の一部を分注し、それを細胞の培養のために３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補充した。（例えば、一度に４つのフィーダーロットを試験するために、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む５００ｍＬのＣＭ２培地を調製する）。

【１９１３】

相互汚染を防ぐために各ＴＩＬ株を別々に操作し、ＴＩＬ培養物を入れた２４ウェルプレートをインキュベーターから取り出し、ＢＳＣに移した。

【１９１４】

無菌トランスファーピペットまたは１００～１０００μＬピペッター及びチップを使用して、約１ｍＬの培地を、使用されるＴＩＬの各ウェルから取り出し、２４ウェル組織培養プレートの未使用のウェルに入れる。

【１９１５】

新鮮な無菌トランスファーピペットまたは１００～１０００μＬピペッター及びチップ

を使用して、残りの培地をウェル内のＴＩＬと混合して細胞を再懸濁し、次いで細胞懸濁液を、ＴＩＬロット名のラベルが付いた５０ｍＬコニカルチューブに移し、容量を記録した。

【１９１６】

予備の培地でウェルを洗浄し、その容量を同じ５０ｍＬコニカルチューブに移した。細胞を４００×ＣＦで回転させて、細胞ペレットを収集する。培地上清を吸引除去し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含有する２～５ｍＬのＣＭ２培地に細胞ペレットを再懸濁し（採取したウェルの数及びペレットのサイズに基づいて使用される容量）、容量は、１．３×10^6細胞／ｍＬを超える濃度を保証するのに十分である必要がある。

【１９１７】

血清学的ピペットを使用して、細胞懸濁液を十分に混合し、容量を記録した。自動セルカウンターを使用して細胞を計数するために、２００μＬを取り出した。カウントしながら、ＴＩＬ細胞を含む５０ｍＬのコニカルチューブを、加湿した５％　CO_2、３７℃インキュベーターに入れ、ガス交換を可能にするためにキャップを緩めた。計数を記録した。

【１９１８】

ＴＩＬ細胞を含有する５０ｍＬのコニカルチューブをインキュベーターから取り出し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補充された温かいＣＭ２中、１．３×10^6細胞／ｍＬの濃度でそれらの細胞を再懸濁した。キャップを緩めた状態で、５０ｍＬのコニカルチューブをインキュベーターに戻した。

【１９１９】

第２のＴＩＬ株について、上記のステップを繰り返した。

【１９２０】

ＴＩＬを実験用のＴ２５フラスコに入れる直前に、ＴＩＬを、以下の通り１：１０に希釈して１．３×10^5細胞／ｍＬの最終濃度にした。

【１９２１】

ＭＡＣＳ　ＧＭＰ　ＣＤ３ピュア（ＯＫＴ３）作用溶液を調製するＯＫＴ３のストック溶液（１ｍｇ／ｍＬ）を４℃の冷蔵庫から取り出し、ＢＳＣに入れた。ｍｉｎｉ－ＲＥＰの培地では、最終濃度３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３を使用した。

【１９２２】

実験の各Ｔ２５フラスコ内の２０ｍＬに対して６００ｎｇのＯＫＴ３が必要であり、これは、２０ｍＬ毎に６０μＬの１０μｇ／ｍＬ溶液、または各フィーダーロットについて試験した６つのフラスコすべてで３６０μＬに相当する。

【１９２３】

試験した各フィーダーロットについて、４００μＬの１：１００希釈の１ｍｇ／ｍＬ　ＯＫＴ３を、１０μｇ／ｍＬの作業濃度で作製した（例えば、４つのフィーダーロットを一度に試験する場合、１６００μＬの１：１００希釈の１ｍｇ／ｍＬ　ＯＫＴ３：１６μＬの１ｍｇ／ｍＬ　ＯＫＴ３＋３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１．５８４ｍＬのＣＭ２培地を作製する）。

【１９２４】

Ｔ２５フラスコを調製するフィーダー細胞を調製する前に、各フラスコにラベルを付け、フラスコにＣＭ２培地を充填した。フラスコを３７℃の加湿した５％　CO_2インキュベーターに入れ、残りの成分を添加するのを待つ間、培地を保温した。一旦フィーダー細胞が調製されると、各フラスコ内のＣＭ２に成分が添加される。

【１９２５】

さらなる情報を表３６に提供する。

【１９２６】

【表３６】

表３６．溶液情報。

構成要素	共培養フラスコ内の容量	対照(フィーダーのみ)フラスコ内の容量
CM2 + 3000 IU/mL IL-2	18mL	19mL
MNC: CM2+3000IU IL-2 中 1.3×10^7/mL (最終濃度 1.3×10^7/フラスコ)	1mL	1mL
OKT3: CM2 中 10μL/mL=3000IU IL-2	60μL	60μL
TIL: 3000IU の IL-2 を含む CM2 中の 1.3×10^5/mL (最終濃度 1.3×10^5/フラスコ)	1mL	0

【１９２７】
フィーダー細胞を調製する。このプロトコルについて試験されたロット当たり７８×１０^{6}フィーダー細胞の最小値が必要であった。ＳＤＢＢによって凍結された各１ｍＬバイアルは、凍結時に１００×１０^{6}個の生細胞を有していた。液体N_2ストレージからの解凍時の５０％の回収率を仮定すると、ロット当たり少なくとも２つの１ｍＬバイアルのフィーダー細胞を解凍して、各ＲＥＰに推定１００×１０^{6}個の生細胞を与えることが推奨された。あるいは、１．８ｍＬバイアルで供給された場合、１つのバイアルだけで十分なフィーダー細胞が提供された。

【１９２８】
フィーダー細胞を解凍する前に、試験される各フィーダーロットにＩＬ－２を含まないおよそ５０ｍＬのＣＭ２を予熱した。指定されたフィーダーロットバイアルをＬＮ２ストレージから取り出し、ジッパーストレージバッグに入れ、氷上に置いた。３７℃の水浴に浸すことによって、閉じたジッパーストレージバッグ内のバイアルを解凍した。バイアルをジッパーバッグから取り出し、７０％　ＥｔＯＨでスプレーまたはワイプし、ＢＳＣに移した。

【１９２９】
トランスファーピペットを使用して、フィーダーバイアルの内容物を、５０ｍＬのコニカルチューブ中の３０ｍＬの温かいＣＭ２に直ちに移した。バイアルを少量のＣＭ２で洗浄して、バイアル内の残留細胞を除去し、４００×ＣＦで５分間遠心分離した。上清を吸引し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を加えた４ｍＬの温かいＣＭ２に再懸濁した。自動セルカウンターを使用して細胞を計数するために、２００μＬを取り出した。計数を記録した。

【１９３０】
３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を加えた温かいＣＭ２中、１．３×１０^{7}細胞／ｍＬで細胞を再懸濁した。ＴＩＬ細胞を１．３×１０^{6}細胞／ｍＬから１．３×１０^{5}細胞／ｍＬに希釈した。

【１９３１】
共培養物を準備する。ＴＩＬ細胞を１．３×１０^{6}細胞／ｍＬから１．３×１０^{5}細胞／ｍＬに希釈した。４．５ｍＬのＣＭ２培地を１５ｍＬのコニカルチューブに添加した。

インキュベーターからＴＩＬ細胞を取り出し、１０ｍＬの血清ピペットを使用して十分に再懸濁した。１．３×１０^{6}細胞／ｍＬのＴＩＬ懸濁液から０．５ｍＬの細胞を取り出し、１５ｍＬのコニカルチューブ中の４．５ｍＬの培地に添加した。ＴＩＬストックバイアルをインキュベーターに戻した。よく混ぜた。第２のＴＩＬ株に対して繰り返した。

【１９３２】

単一フィーダーロット用に予熱した培地を入れたフラスコを、インキュベーターからＢＳＣに移した。１ｍＬのピペットチップで数回上下にピペッティングすることによってフィーダー細胞を混合し、そのフィーダーロットの各フラスコに１ｍＬ（１．３×１０^{7}細胞）を移した。６０μＬのＯＫＴ３作用ストック（１０μｇ／ｍＬ）を各フラスコに追加した。２つの対照フラスコをインキュベーターに戻した。

【１９３３】

各ＴＩＬロットの１ｍＬ（１．３×１０^{5}）を、対応するラベルの付いたＴ２５フラスコに移した。フラスコをインキュベーターに戻し、直立させてインキュベートした。５日目まで乱さなかった。試験したすべてのフィーダーロットについて、この手順を繰り返した。

【１９３４】

５日目、培地変更３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含むＣＭ２を調製した。各フラスコに１０ｍＬが必要である。１０ｍＬピペットを使用して、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１０ｍＬの温かいＣＭ２を各フラスコに移した。フラスコをインキュベーターに戻し、７日目まで直立させてインキュベートした。試験したすべてのフィーダーロットについて繰り返した。

【１９３５】

７日目、採取インキュベーターからフラスコを取り出し、ＢＳＣに移し、フラスコの底部の細胞層を乱さないように注意する。フラスコの底部で成長する細胞を乱すことなく、各試験フラスコから１０ｍＬの培地を取り出し、対照フラスコの各々から１５ｍＬの培地を取り出した。

【１９３６】

１０ｍＬの血清ピペットを使用して、残りの培地に細胞を再懸濁し、よく混合して細胞の塊をすべて破壊した。ピペッティングすることによって細胞懸濁液を完全に混合した後、細胞計数のために２００μＬを取り出した。自動セルカウンター装置とともに適切な標準操作手順を使用して、ＴＩＬを計数した。７日目に計数を記録した。試験したすべてのフィーダーロットについて、この手順を繰り返した。

【１９３７】

フィーダー対照フラスコは、複製不全について評価し、ＴＩＬを含むフラスコは、０日目からの倍率拡張について評価した。

【１９３８】

７日目、フィーダー対照フラスコの１４日目までの継続フィーダー対照フラスコの７日目の計数を完了した後、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５ｍＬの新鮮なＣＭ２培地を対照フラスコの各々に追加した。対照フラスコをインキュベーターに戻し、１４日目まで直立位置でインキュベートした。

【１９３９】

１４日目、フィーダー対照フラスコの長期非増殖インキュベーターからフラスコを取り出し、ＢＳＣに移し、フラスコの底部の細胞層を乱さないように注意した。フラスコの底部で成長する細胞を乱すことなく、各対照フラスコからおよそ１７ｍＬの培地を取り出した。５ｍＬの血清ピペットを使用して、残りの培地に細胞を再懸濁し、よく混合して細胞の塊をすべて破壊した。各フラスコについて、容量を記録した。

【１９４０】

ピペッティングすることによって細胞懸濁液を完全に混合した後、細胞計数のために２００μＬを取り出した。ＴＩＬは、自動セルカウンター装置と併せて適切な標準操作手順を使用して計数し、計数を記録した。試験したすべてのフィーダーロットについて、この

手順を繰り返した。
【１９４１】
Ｂ．結果及び承認基準プロトコル
結果ガンマ線照射の線量は、フィーダー細胞を複製不全にするのに十分であった。すべてのロットは、評価基準を満たすことが予想され、また０日目と比較して、ＲＥＰ培養の７日目に残っているフィーダー細胞の総有効数の低減を示した。すべてのフィーダーロットは、ＲＥＰ培養の７日目までのＴＩＬ成長の１００倍拡張の評価基準を満たすことが予想された。フィーダー対照フラスコの１４日目の計数は、７日目に見られた非増殖傾向を継続すると予想された。
【１９４２】
承認基準フィーダー細胞の各ロットについて試験された各複製ＴＩＬ株について、以下の承認基準が満たされた。承認基準は、以下の表３７に示すように、２倍であった。
【１９４３】
【表３７】

表３７．承認基準の実施形態。

試験	承認基準
MNC の照射及び複製不全	7 日目及び 14 日目に成長は観察されなかった
TIL 拡張	各 TIL の少なくとも 100 倍の拡張(最低 1.3×10^7 個の生細胞)

【１９４４】
３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養した場合に、ＭＮＣフィーダー細胞の複製を不全にするのに十分な放射線量を評価した。複製不全は、ＲＥＰの７日目及び１４日目の自動細胞計数によって決定された総生細胞数（ＴＶＣ）によって評価した。
【１９４５】
承認基準は、「成長なし」であり、これは、ＲＥＰの０日目に培養された最初の生細胞数から７日目及び１４日目に総生細胞数が増加していないことを意味する。
【１９４６】
フィーダー細胞がＴＩＬ拡張をサポートする能力を評価した。ＴＩＬ成長は、ＲＥＰの０日目の培養開始からＲＥＰの７日目までの生細胞の倍率拡張の観点から測定された。自動細胞計数によって評価されるように、７日目に、ＴＩＬ培養物は最低１００倍の拡張を達成した（すなわち、ＲＥＰの０日目に培養された生ＴＩＬ細胞の総数の１００倍超）。
【１９４７】
承認基準を満たさないＭＮＣフィーダーロットの偶発性試験ＭＮＣフィーダーロットが上で概説された承認基準のうちのいずれかを満たさなかった場合は、以下のステップを実行してロットを再試験し、単純な実験者エラーを原因として除外する。
【１９４８】
ロットの衛星試験バイアルが２つ以上残っている場合は、ロットを再試験した。ロットの衛星試験バイアルが１つ残っているか、まったく残っていない場合、上記の承認基準に従ってロットは失敗であった。
【１９４９】
適格となるには、問題のロット及び対照ロットが、上記の承認基準を達成する必要があった。これらの基準を満たすと、ロットは使用のために放出される。
【１９５０】

実施例４：ＩＬ－２ストック溶液の調製

この実施例は、精製されて凍結乾燥された組換えヒトインターロイキン－２を、ｒｈＩＬ－２の使用を含むものを含む、本出願及び実施例に記載されるものすべてを含む、さらなる組織培養プロトコルでの使用に好適なストック試料に溶解するプロセスを説明する。

【１９５１】

手順。０．２％酢酸溶液（ＨＡｃ）を調製した。２９ｍＬの滅菌水を、５０ｍＬのコニカルチューブに移した。１ｍＬの１Ｎ酢酸を、５０ｍＬのコニカルチューブに追加した。チューブを２～３回反転させながら十分に混合した。Ｓｔｅｒｉｆｌｉｐフィルターを使用した濾過によってＨＡｃ溶液を滅菌した。

【１９５２】

ＰＢＳ中の１％　ＨＳＡを調製する。４ｍＬの２５％　ＨＳＡストック溶液を、１５０ｍＬの滅菌フィルターユニット内の９６ｍＬのＰＢＳに追加した。溶液を濾過した。４℃で保管した。調製したｒｈＩＬ－２の各バイアルについて、フォームに記入する。

【１９５３】

ｒｈＩＬ－２ストック溶液を調製した（最終濃度６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）。ｒｈＩＬ－２の各ロットは異なり、必要な情報は、以下のような製造業者の分析証明書（ＣＯＡ）に見出された：１）バイアル当たりのｒｈＩＬ－２の質量（ｍｇ）、２）ｒｈＩＬ－２の比活性（ＩＵ／ｍｇ）、及び３）推奨０．２％　ＨＡｃ再構成体積（ｍＬ）。

【１９５４】

以下の等式を使用して、ｒｈＩＬ－２ロットに必要な１％ＨＳＡの体積を計算した。

【１９５５】

【数１】

$$\left(\frac{\text{バイアル質量}(mg)\ x\ \text{生物活性}\left(\frac{IU}{mg}\right)}{6x10^{6}\ \frac{IU}{mL}}\right)-\text{ＨＡｃの体積}(mL)=\text{１％ＨＳＡ体積}(mL)$$

【１９５６】

例えば、ｒｈＩＬ－２ロット１０２００１２１（Ｃｅｌｌｇｅｎｉｘ）のＣＯＡによると、１ｍｇバイアルの比活性は、２５×１０^{6}ＩＵ／ｍｇである。ｒｈＩＬ－２を２ｍＬの０．２％ＨＡｃ中で再構成することが推奨される。

【１９５７】

【数２】

$$\left(\frac{1mg\ x\ 25x10^{6}\ \frac{IU}{mg}}{6x10^{6}\ \frac{IU}{mL}}\right)-2mL=2.167mL\ HSA$$

【１９５８】

ＩＬ－２バイアルのゴム栓をアルコールワイプで拭いた。３ｍＬシリンジに取り付けた

１６Ｇ針を使用して、推奨体積の０．２％　ＨＡｃをバイアルに注入した。針を抜くときに栓が外れないように注意した。バイアルを３回反転させ、すべての粉末が溶解するまで回転させた。栓を慎重に取り外し、アルコールワイプ上に置いた。計算された容量の１％ＨＳＡをバイアルに添加した。

【１９５９】

ｒｈＩＬ－２溶液の保管。短期保管（７２時間未満）の場合、４℃でバイアルを保管した。長期保管（７２時間超）の場合、バイアルをより小さい体積に等分し、使用の準備が整うまで－２０℃でクライオバイアル内で保管した。凍結／解凍サイクルを回避した。調製日から６ヶ月後に有効期限が切れた。Ｒｈ－ＩＬ－２ラベルに、ベンダー及びカタログ番号、ロット番号、有効期限、オペレーターのイニシャル、濃度、ならびにアリコート体積を含めた。

【１９６０】

実施例５：凍結保存プロセス

この実施例では、ＣｒｙｏＭｅｄ制御速度冷凍庫、モデル７４５４（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、本明細書に記載の手順で調製したＴＩＬの凍結保存プロセス方法について説明する。

【１９６１】

使用した機器は以下の通りであった：アルミニウムカセットホルダーラック（ＣＳ７５０フリーザーバッグに対応）、７５０ｍＬバッグ用凍結保存カセット、低圧（２２ｐｓｉ）液体窒素タンク、冷蔵庫、熱電対センサー（バッグ用リボンタイプ）、及びＣｒｙｏＳｔｏｒｅ　ＣＳ７５０冷凍バッグ（ＯｒｉＧｅｎ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。

【１９６２】

凍結プロセスは、核形成から－２０℃まで０．５℃の速度、及び－８０℃の終了温度まで毎分１℃の冷却速度を提供する。プログラムパラメータは、以下の通りである：ステップ１－４℃で待つ、ステップ２：－４℃まで１．０℃／分（試料温度）、ステップ３：－４５℃まで２０．０℃／分（チャンバ温度）、ステップ４：－１０．０℃まで１０．０℃／分（チャンバ温度）、ステップ５：－２０℃まで０．５℃／分（チャンバ温度）、及びステップ６：－８０℃まで１．０℃／分（試料温度）。

【１９６３】

実施例６：合成培地を用いた腫瘍拡張プロセス

上記で開示されるプロセスは、ＣＭ１培地及びＣＭ２培地を、合成培地（例えば、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、例えば、ＤＭ１及びＤＭ２を含むで置き換えることによって行われ得る。

【１９６４】

実施例７：凍結保存ＴＩＬ細胞療法の例示的ＧＥＮ２産生

この実施例は、Ｉｏｖａｎｃｅ　Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．のｃＧＭＰ製造を説明する。現在の適正組織基準及び現在の適正製造基準に従った、Ｇ－ＲＥＸフラスコ内のＴＩＬ細胞療法プロセス。この実施例は、現在の適正組織基準及び現在の適正製造基準に従った、Ｇ－ＲＥＸフラスコ内のＴＩＬ細胞療法プロセスの例示的なｃＧＭＰ製造を説明する。

【１９６５】

【表３８】

表３８．プロセス拡張の例示的な計画。

推定日 (播種後)	活性	標的基準	予想される容器	推定総体積 (mL)
0	腫瘍解剖	G-REX-100MCS 当たり ≦50 個の望ましい腫瘍断片	G-REX-100MCS 1 フラスコ	≦1000
11	REP 播種	G-REX-500MCS 当たり 5~200×10^6 個の生細胞	G-REX-500MCS 1 フラスコ	≦5000
16	REP 分割	G-REX-500MCS 当たり 1×10^9 個の生細胞	G-REX-500MCS≦5 フラスコ	≦25000
22	採取	全利用可能な細胞	3~4 つの CS-750 バッグ	≦530

【１９６６】

【表３９】

表３９．フラスコ容積。

フラスコタイプ	作業体積/ フラスコ (mL)
G-REX-100MCS	1000
G-REX-500MCS	5000

【１９６７】

０日目のＣＭ１培地の調製ＢＳＣ内で、試薬をＲＰＭＩ１６４０培地ボトルに追加した。ボトル当たり追加された以下の試薬を追加した：不活化ヒトＡＢ血清（１００．０ｍＬ）、ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）（１０．０ｍＬ）、硫酸ゲンタマイシン、５０ｍｇ／ｍＬ（１．０ｍＬ）、２－メルカプトエタノール（１．０ｍＬ）を加熱する

【１９６８】

ＢＳＣから不要な材料を取り出した。ＢＳＣから培地試薬を抜き取り、配合された洗浄培地の調製のために硫酸ゲンタマイシン及びＨＢＳＳをＢＳＣの中に残した。

【１９６９】

ＩＬ－２アリコートを解凍した。すべての氷が融解するまで、１つの１．１ｍＬのＩＬ－２アリコート（６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）（ＢＲ７１４２４）を解凍した。ＩＬ－２：ロット番号及び有効期限を記録した。

【１９７０】

ＩＬ－２ストック溶液を培地に移した。ＢＳＣ内で、１．０ｍＬのＩＬ－２ストック溶液を、調製されたＣＭ１の０日目培地ボトルに移した。ＣＭ１の０日目培地１ボトル及びＩＬ－２（６×１０６ＩＵ／ｍＬ）１．０ｍＬを追加した。

【１９７１】

Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳをＢＳＣの中に通過させた。無菌的にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ

（Ｗ３０１３１３０）をＢＳＣの中に通過させた。
【１９７２】
すべての完全なＣＭ１の０日目培地をＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコにポンプで注入した。組織断片円錐形またはＧＲｅｘ１００ＭＣＳ。
【１９７３】
０日目の腫瘍洗浄培地の調製ＢＳＣ内で、５．０ｍＬのゲンタマイシン（Ｗ３００９８３２またはＷ３０１２７３５）を１本の５００ｍＬのＨＢＳＳ培地（Ｗ３０１３１２８）ボトルに追加した。ボトル当たりの追加：ＨＢＳＳ（５００．０ｍＬ）、硫酸ゲンタマイシン、５０ｍｇ／ｍＬ（５．０ｍＬ）。１Ｌの０．２２ミクロンフィルターユニット（Ｗ１２１８８１０）をとおして調製されたゲンタマイシンを含有するＨＢＳＳを濾過した。
【１９７４】
０日目の腫瘍処理腫瘍検体を取得し、即時に処理のために２～８℃における部屋に移した。腫瘍洗浄培地を等分した。腫瘍洗浄１は、８インチ鉗子（Ｗ３００９７７１）を使用して行う。腫瘍を検体ボトルから取り出し、調製した「洗浄１」皿に移す。この後、腫瘍洗浄２及び腫瘍洗浄３が続く。腫瘍を測定し、評価した。腫瘍領域全体の３０％未満が壊死及び／または脂肪組織であることが観察されたかどうかを評価した。該当する場合、クリーンアップ解剖を行う。腫瘍が大きく、外部の組織の３０％未満が壊死／脂肪性であることが観察された場合、メス及び／または鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍の内側構造を温存しながら壊死／脂肪組織を除去することによって、「クリーンアップ解剖」を行った。腫瘍を切除した。メス及び／または鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍検体を均等で適切なサイズの断片（最大６つの中間断片）に切断した。中間腫瘍断片を移した。腫瘍断片を、およそ３×３×３ｍｍのサイズの小片に切除した。乾燥を防止するために中間断片を保存した。中間断片の解剖を繰り返した。収集された切片の数を決定した。望ましい組織が残っている場合、「好ましい中間断片」６ウェルプレートから追加の好ましい腫瘍片を選択し、最大５０片のために液滴を充填した。
【１９７５】
コニカルチューブを準備した。腫瘍片を５０ｍＬのコニカルチューブに移した。Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳのためのＢＳＣを準備した。インキュベーターからＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳを取り出した。無菌的にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコをＢＳＣの中に通過させた。腫瘍断片をＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコに追加した。切片を均等に分配した。
【１９７６】
以下のパラメータにおいてＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳをインキュベートした：Ｇ－ＲＥＸフラスコをインキュベートした：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５　％CO_2。計算：培養の時間、下限＝培養の時間＋２５２時間、上限＝培養の時間＋２７６時間。
【１９７７】
プロセスが完了した後、いずれの残りの温められた培地も廃棄し、ＩＬ－２のアリコートを解凍した。
【１９７８】
１１日目－培地の調製インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、ＣＯ２パーセンテージ：５．０±１．５％ＣＯ２。
【１９７９】
３本の１０００ｍＬのＲＰＭＩ　１６４０培地（Ｗ３０１３１１２）ボトル及び３本の１０００ｍＬのＡＩＭ－Ｖ（Ｗ３００９５０１）ボトルを、インキュベーター内で３０分間以上温めた。インキュベーターからＲＰＭＩ１６４０培地を取り出した。ＲＰＭＩ１６４０培地を調製した。培地を濾過した。３つのＩＬ－２の１．１ｍＬのアリコート（６×１０６ＩＵ／ｍＬ）（ＢＲ７１４２４）を解凍した。インキュベーターからＡＩＭ－Ｖ培地を取り出した。ＩＬ－２をＡＩＭ－Ｖに追加した。１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグ及びリピータポンプ移送セットを、ＢＳＣの中に無菌的に移した。

【１９８０】
１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒ培地バッグを準備した。Ｂａｘａポンプを準備した。１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒ培地バッグを準備した。培地を１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒにポンプで注入した。Ｌａｂｔａｉｎｅｒバッグからポンプマティックを取り出した。
【１９８１】
培地を混合した。バッグを穏やかにマッサージして混合した。試料計画に従って培地をサンプリングした。２０．０ｍＬの培地を取り出し、５０ｍＬのコニカルチューブに入れた。細胞計数希釈管を準備した。ＢＳＣに、「細胞計数希釈液用」及びロット番号でラベル付けされた４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地を、４本の１５ｍＬコニカルチューブに追加した。試薬をＢＳＣから２～８℃に移した。１Ｌ移送パックを準備した。（プロセス注記５．１１に従って）ＢＳＣ溶接の外側で、「完全なＣＭ２の１１日目培地」バッグに取り付けられた移送セットへの１Ｌ移送パックを準備した。フィーダー細胞移送パックを準備した。完全なＣＭ２の１１日目培地をインキュベートした。
【１９８２】
１１日目－ＴＩＬ採取前処理表。インキュベーターパラメータ：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５　％　CO_2．インキュベーターからＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳを取り出した。３００ｍＬ移送パックを準備した。移送パックをＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳに溶接した。
【１９８３】
ＴＩＬ採取及びＴＩＬ採取の開始のためにフラスコを準備する。ＴＩＬが採取された。ＧａｔｈｅＲｅｘを使用して、血液フィルターを介して細胞懸濁液を３００ｍＬの移送パックに移した。付着した細胞について膜を点検した。
【１９８４】
フラスコ膜をすすいだ。Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ上のクランプを閉じた。すべてのクランプが閉じられていることを確実にした。ＴＩＬ及び「上清」移送パックを熱融着した。ＴＩＬ懸濁液の体積を計算した。サンプリングのために上清移送パックを準備した。
【１９８５】
Ｂａｃ－Ｔ試料を引き出した。ＢＳＣ内で、１Ｌ「上清」移送パックからおよそ２０．０ｍＬの上清を引き上げ、無菌５０ｍＬコニカルチューブに分注する。
【１９８６】
試料計画に従ってＢａｃＴを接種した。適切なサイズのシリンジを使用して調製されたＢａｃＴとラベル付けされた５０ｍＬコニカルから１．０ｍＬの試料を取り出し、嫌気性ボトルに接種した。
【１９８７】
ＴＩＬをインキュベートした。必要とされるまで、ＴＩＬ移送パックをインキュベーターに入れた。細胞計数及び計算を行った。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。生存率÷２。生細胞濃度÷２。計数の上限及び下限を決定した。下限：生細胞濃度の平均×０．９。上限：生細胞濃度の平均×１．１。許容限界内の両方の計数を確認した。行われた４つすべての計数から平均生細胞濃度を決定した。
【１９８８】
ＴＩＬ懸濁液の調整された体積：細胞計数試料を取り出した後のＴＩＬ懸濁液の調整された体積を計算する。総ＴＩＬ細胞体積（Ａ）。取り出された細胞計数試料の体積（４．０ｍＬ）（Ｂ）調整された総ＴＩＬ細胞体積Ｃ＝Ａ－Ｂ。
【１９８９】
総生ＴＩＬ細胞を計算した。平均生細胞濃度＊：総体積、総生細胞：Ｃ＝Ａｘ Ｂ．
【１９９０】
フローサイトメトリーのための計算：総生ＴＩＬ細胞数が、４．０×10^7個以上であった場合、フローサイトメトリー試料のために１．０×10^7個の細胞を取得するための体積を計算した。
【１９９１】

フローサイトメトリーに必要とされる総生細胞：１．０×１０^{7}個の細胞。フローサイトメトリーに必要とされる細胞の体積：生細胞濃度を１．０×１０^{7}個の細胞Ａで割ったもの。

【１９９２】

２．０×１０^{8}個の生細胞に等しいＴＩＬ懸濁液の体積を計算した。必要に応じて、取り出すＴＩＬ細胞の過剰体積を計算し、過剰なＴＩＬを取り出し、必要に応じてＴＩＬをインキュベーターに入れた。必要に応じて、取り出された全過剰ＴＩＬを計算した。

【１９９３】

凍結のための標的細胞濃度が１．０×１０^{8}細胞／ｍＬである過剰なＴＩＬ細胞に追加するＣＳ－１０培地の量を計算した。必要に応じて、過剰なＴＩＬを遠心分離した。コニカルチューブを観察し、ＣＳ－１０を追加した。

【１９９４】

バイアルを充填した。１．０ｍＬの細胞懸濁液を、適切なサイズの凍結バイアルに等分した。残留体積を適切なサイズのクライオバイアルに等分した。体積が≦０．５ｍＬである場合、体積が０．５ｍＬになるまでＣＳ１０をバイアルに追加する。

【１９９５】

凍結保存のための１×１０^{7}個の細胞を取得するために必要とされる細胞の体積を計算した。凍結保存のために試料を取り出した。ＴＩＬをインキュベーターに入れた。

【１９９６】

試料の凍結保存コニカルチューブを観察し、ＣＳ－１０をゆっくりと追加し、追加された０．５ｍＬのＣＳ１０の体積を記録した。

【１９９７】

１１日目－フィーダー細胞フィーダー細胞を取得した。ＬＮ２冷凍庫から少なくとも２つの異なるロット番号を伴うフィーダー細胞の３つのバッグを取得した。解凍する準備が整うまで、細胞をドライアイス上で保管した。水浴またはｃｒｙｏｔｈｅｒｍを準備した。３７．０±２．０℃の水浴またはｃｙｏｔｈｅｒｍにおいて約３～５分間、または氷が消滅するまで、フィーダー細胞を解凍した。インキュベーターから培地を取り出した。解凍されたフィーダー細胞をプールした。フィーダー細胞を移送パックに追加した。シリンジから移送パックにフィーダー細胞を分注した。プールされたフィーダー細胞を混合し、移送パックをラベル付けした。

【１９９８】

移送パック内のフィーダー細胞懸濁液の総体積を計算した。細胞計数試料を取り出した。各試料に別個の３ｍＬシリンジを使用して、不要注入ポートを使用してフィーダー細胞懸濁液移送パックから４×１．０ｍＬの細胞計数試料を引き出した。各試料をラベル付けされたクライオバイアルに等分した。細胞計数を行い、増倍率を決定し、プロトコルを選択し、増倍率を入力した。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定し、限界内で確認した。

【１９９９】

フィーダー細胞懸濁液の調整された体積。細胞計数試料を取り出した後のフィーダー細胞懸濁液の調整された体積を計算した。総生フィーダー細胞を計算した。必要に応じて追加のフィーダー細胞を取得した。必要に応じて追加のフィーダー細胞を解凍した。第４のフィーダー細胞バッグをジップトップバッグに入れ、３７．０±２．０℃の水浴またはｃｙｏｔｈｅｒｍ内で約３～５分間解凍し、追加のフィーダー細胞をプールした。体積を測定した。シリンジ内のフィーダー細胞の体積を測定し、以下に記録した（Ｂ）。フィーダー細胞の新しい総体積を計算した。フィーダー細胞を移送パックに追加した。

【２０００】

必要に応じて希釈液を調製し、４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地を４本の１５ｍＬコニカルチューブに追加した。細胞計数を準備した。各試料に対して別個の３ｍＬシリンジを使用して、不要注入ポートを使用して、フィーダー細胞懸濁液移送パックから４×１．０ｍＬの細胞計数試料を取り出した。細胞計数及び計算を行った。行われた４つすべての計数か

ら平均生細胞濃度を決定した。フィーダー細胞懸濁液の体積を調整し、細胞計数試料を取り出した後のフィーダー細胞懸濁液の調整された体積を計算した。４．０ｍＬを差し引いた総フィーダー細胞体積が取り出された。５×１０^{9}個の生フィーダー細胞を取得するために必要とされたフィーダー細胞懸濁液の体積を計算した。過剰なフィーダー細胞体積を計算した。取り出す過剰なフィーダー細胞の体積を計算した。過剰なフィーダー細胞を取り出した。

【２００１】

１．０ｍＬシリンジ及び１６Ｇ針を使用して、０．１５ｍＬのＯＫＴ３を引き上げ、ＯＫＴ３を追加した。フィーダー細胞懸濁液移送パックを熱融着した。

【２００２】

１１日目　Ｇ－ＲＥＸ充填及びシード設定Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ。「完全なＣＭ２の１１日目培地」をインキュベーターから取り出し、培地をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳにポンプで注入した。４．５Ｌの培地をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳにポンプで注入し、フラスコ上にマークされたラインまで充填した。必要に応じてフラスコを熱融着し、インキュベートした。フィーダー細胞の懸濁液移送パックを、Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳに溶接した。フィーダー細胞をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳに追加した。熱融着した。ＴＩＬ懸濁液移送パックをフラスコに溶接した。ＴＩＬをＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳに追加した。熱融着した。Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを３７．０±２．０℃でインキュベートした。ＣＯ２パーセンテージ：５．０±１．５　％ＣＯ２。

【２００３】

インキュベーション時間帯を計算した。１６日目にインキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを取り出すための適切な時間を決定するための計算を行った。下限：インキュベーションの時間＋１０８時間。上限：インキュベーションの時間１３２時間。

【２００４】

１１日目の過剰ＴＩＬ凍結保存。該当：過剰ＴＩＬバイアルを凍結させた。凍結前にＣＲＦが設定されていることを検証した。凍結保存を行った。バイアルを速度制御された冷凍庫から適切な保管場所に移した。凍結の完了時に、バイアルをＣＲＦから適切な保管容器に移した。バイアルを適切な保管場所に移した。ＬＮ２における保管場所を記録した。

【２００５】

１６日目　培地の調製ＡＩＭ－Ｖ培地を事前に温めた。培地バッグ１、２、及び３について培地が温められた時間を計算した。すべてのバッグが１２～２４時間の持続時間にわたって温められていることを確実にした。上清用の１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを設定した。ルアーコネクタを使用して、流体ポンプ移送セットのより大きな直径の端部を１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグのメス型ポートのうちの１つに取り付けた。上清用の１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを設定し、ラベル付けした。上清用の１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを設定した。ＢＳＣから取り出す前に、すべてのクランプが閉じられていることを確実にした。注記：上清バッグは、培地調製と同時に行われ得るＴＩＬ採取中に使用された。

【２００６】

ＩＬ－２を解凍した。すべての氷が融解するまで、ＣＴＳ　ＡＩＭ　Ｖ培地の１バッグ当たりＩＬ－２（６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）（ＢＲ７１４２４）の５×１．１ｍＬアリコートを解凍した。１００．０ｍＬのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を等分した。ＩＬ－２をＧｌｕｔａＭａｘ（商標）に追加した。配合用のＣＴＳ　ＡＩＭ　Ｖ培地バッグを準備した。配合用のＣＴＳ　ＡＩＭ　Ｖ培地バッグを準備した。ステージＢａｘａポンプ。培地を配合することを準備した。ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）＋ＩＬ－２をバッグにポンプで注入した。パラメータを監視した：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５％　CO_2．完全なＣＭ４の１６日目培地を温めた。希釈液を調製した。

【２００７】

１６日目のＲＥＰ分割。インキュベーターパラメータを監視した：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５　％CO_2。インキ

ュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを取り出した。１Ｌの移送パックを準備し、ＴＩＬ懸濁液としてラベル付けし、１Ｌの重量を量った。

【２００８】

Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳの減容。約４．５Ｌの培養上清をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳから１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒに移した。

【２００９】

ＴＩＬ採取用のフラスコを準備した。上清を取り出した後に、赤色ラインへのすべてのクランプを閉じた。

【２０１０】

ＴＩＬ採取の開始。フラスコを激しく叩き、培地を旋回させて細胞を解放し、すべての細胞が引き離されていることを確実にする。

【２０１１】

ＴＩＬ採取。ＴＩＬ懸濁液移送パックにつながるすべてのクランプを解放した。ＧａｔｈｅＲｅｘを使用して、細胞懸濁液をＴＩＬ懸濁液移送パックの中に移した。注記：すべての細胞及び培地が収集されるまで、傾斜した縁を必ず維持すること。付着した細胞について膜を点検した。フラスコ膜をすすいだ。Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ上のクランプを閉じた。ＴＩＬを含む移送パックを熱融着した。上清を含む１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを熱融着した。細胞懸濁液を伴う移送パックの重量を記録し、細胞懸濁液を計算した。試料を取り出すための移送パックを準備した。細胞上清から試験試料を取り出した。

【２０１２】

無菌性及びＢａｃＴ試験サンプリング。調製したＢａｃＴラベル付けされた１５ｍＬのコニカルから１．０ｍＬの試料を取り出した。細胞計数試料を取り出した。ＢＳＣ内で、各試料に別個の３ｍＬシリンジを使用して、「ＴＩＬ懸濁液」移送パックから４×１．０ｍＬの細胞計数試料を取り出した。

【２０１３】

マイコプラズマ試料を取り出した。３ｍＬシリンジを使用して、ＴＩＬ懸濁液移送パックから１．０ｍＬを取り出し、調製された「マイコプラズマ希釈液」とラベル付けされた１５ｍＬコニカルチューブに入れた。

【２０１４】

播種用の移送パックを準備した。ＴＩＬをインキュベーターに入れた。細胞懸濁液をＢＳＣから取り出し、必要とされるまでインキュベーターに入れた。細胞計数及び計算を行った。最初に、０．５ｍＬの細胞懸濁液を調製された４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地に追加することによって、細胞計数試料を希釈し、１：１０希釈液を生じた。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。注記：希釈は、細胞の期待濃度に基づいて調整され得る。行われた４つすべての計数から平均生細胞濃度を決定した。ＴＩＬ懸濁液の調整された体積。細胞計数試料を取り出した後のＴＩＬ懸濁液の調整された体積を計算した。５．０ｍＬを差し引いた総ＴＩＬ細胞体積が試験のために取り出された。

【２０１５】

総生ＴＩＬ細胞を計算した。播種するフラスコの総数を計算した。注記：播種するＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコの最大数は５であった。播種するフラスコの計算された数が５つを超えた場合、５つのみが利用可能な細胞懸濁液の体積全体を使用して播種された。

【２０１６】

二次培養用のフラスコの数を計算した。準備されたバッグに加えて必要とされる培地バッグの数を計算した。計算されたように必要とされる２つのＧ－ＲＥＸ－５００Ｍフラスコ毎に「ＣＭ４の１６日目培地」の１つの１０Ｌバッグを準備した。追加の培地が調製され、温められている間に、続けて第１のＧＲＥＸ－５００Ｍフラスコ（複数可）を播種した。計算された数の決定された追加の培地バッグを調製し、温めた。Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを充填した。培地をポンプで注入するように準備し、４．５Ｌの培地をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳにポンプで注入した。熱融着した。充填を繰り返した。フラスコをインキュベ

ートした。新しいＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコに追加するＴＩＬ懸濁液の標的体積を計算した。フラスコの計算された数が５つを超える場合、５つのみが細胞懸濁液の体積全体を使用して播種されるであろう。播種用のフラスコを準備した。インキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを取り出した。ポンプで注入するためのＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを準備した。大型フィルターラインを除くすべてのクランプを閉じた。インキュベーターからＴＩＬを取り出した。播種用の細胞懸濁液を調製した。（プロセス注記５．１１に従って）「ＴＩＬ懸濁液」移送パックをポンプ入口ラインに滅菌溶接した。ＴＩＬ懸濁液バッグを秤の上に置いた。

【２０１７】

フラスコにＴＩＬ懸濁液を播種した。計算されたＴＩＬ懸濁液の体積をフラスコにポンプで注入した。熱融着した。残りのフラスコを充填した。

【２０１８】

インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５％　CO_2．フラスコをインキュベートした。

【２０１９】

２２日目にインキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを取り出す時間範囲を決定した。

【２０２０】

２２日目　洗浄緩衝液の調製１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグを準備した。ＢＳＣ内で、ルアー接続を介して４インチ血漿移送セットを１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグに取り付けた。１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグを準備した。ＢＳＣから外に移す前に、すべてのクランプを閉じた。注記：採取される２つのＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコ毎に、１つの１０Ｌ　Ｌａｂｔａｉｎｅｒバッグを準備した。Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅを３０００ｍＬバッグにポンプで注入し、ポンプを反転させてバッグの位置を操作することによって、３０００ｍＬのＯｒｉｇｅｎバッグから空気を除去した。ヒトアルブミン２５％を３０００ｍＬのバッグに追加した。１２０．０ｍＬの最終体積のヒトアルブミン２５％を取得する。

【２０２１】

ＩＬ－２希釈液を調製した。１０ｍＬシリンジを使用して、ＬＯＶＯ洗浄緩衝液バッグ上の無針注入ポートを使用して、５．０ｍＬのＬＯＶＯ洗浄緩衝液を取り出した。ＬＯＶＯ洗浄緩衝液を５０ｍＬのコニカルチューブに分注した。

【２０２２】

等分されたＣＲＦブランクバッグＬＯＶＯ洗浄緩衝液。１００ｍＬのシリンジを使用して、無針注入ポートから７０．０ｍＬのＬＯＶＯ洗浄緩衝液を引き上げた。

【２０２３】

すべての氷が融解するまで、１つの１．１ｍＬのＩＬ－２（６×１０６ＩＵ／ｍＬ））を解凍した。５０μＬのＩＬ－２ストック（６×10^6ＩＵ／ｍＬ）を「ＩＬ－２希釈液」とラベル付けされた５０ｍＬのコニカルチューブに追加した。

【２０２４】

凍結保存調製。５つのクライオカセットを２～８℃に置き、最終製品の凍結保存のためにそれらを前調整した。

【２０２５】

細胞計数希釈液を調製した。ＢＳＣ内で、ロット番号及び「細胞計数希釈液用」でラベル付けされた４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地を、４本の別個の１５ｍＬコニカルチューブに追加した。細胞計数を準備した。４つのクライオバイアルをバイアル番号（１～４）でラベル付けした。使用されるＢＳＣの下でバイアルを保存した。

【２０２６】

２２日目　ＴＩＬ採取インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ温度ＬＥＤディスプレイ：３７±２．０℃、ＣＯ２パーセンテージ：５％±１．５％．インキ

ュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコを取り外した。ＴＩＬ収集バッグを準備し、ラベル付けした。余分な接続を密封した。減容：約４．５Ｌの上清をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳから上清バッグに移した。

【２０２７】

ＴＩＬ採取用のフラスコを準備した。ＴＩＬの収集を開始した。フラスコを激しく叩き、培地旋回させて細胞を解放した。すべての細胞が引き離されていることを確実にした。ＴＩＬの収集を開始した。ＴＩＬ懸濁液収集バッグにつながるすべてのクランプを解放した。ＴＩＬ採取。ＧａｔｈｅＲｅｘを使用して、ＴＩＬ懸濁液を３０００ｍＬの収集バッグに移した。付着した細胞について膜を点検した。フラスコ膜をすすいだ。Ｇ－Ｒｅｘ５００ＭＣＳ上のクランプを閉じ、すべてのクランプが閉じていることを確実にした。細胞懸濁液をＬＯＶＯソースバッグの中に移した。すべてのクランプを閉じた。熱融着した。４×１．０ｍＬの細胞計数試料を取り出した。

【２０２８】

細胞計数を行った。ＮＣ－２００及びプロセス注記５．１４を利用して、細胞計数及び計算を行った。最初に、０．５ｍＬの細胞懸濁液を調製された４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地に追加することによって、細胞計数試料を希釈した。これは、１：１０希釈液を生じた。行われた細胞計数の平均生存率、生細胞濃度、及び総有核細胞濃度を決定した。計数の上限及び下限を決定した。行われた細胞計数の平均生存率、生細胞濃度、及び総有核細胞濃度を決定した。ＬＯＶＯソースバッグの重量を量った。総生ＴＩＬ細胞を計算した。総有核細胞を計算した。

【２０２９】

マイコプラズマ希釈液を調製した。ルアー試料ポートを介して１つの上清バッグから１０．０ｍＬを取り出し、１５ｍＬコニカルに入れた。

【２０３０】

「ＴＩＬ　Ｇ－ＲＥＸ採取」プロトコルを行い、最終製品の標的体積を決定した。使い捨てキットを装填した。濾液バッグを取り出した。濾液容量を入力した。濾液容器をベンチトップの上に置いた。ＰｌａｓｍａＬｙｔｅを取り付けた。ＰｌａｓｍａＬｙｔｅが取り付けられていることを検証し、ＰｌａｓｍａＬｙｔｅが動いていることを観察した。ソース容器をチューブに取り付け、ソース容器が取り付けられていることを検証した。ＰｌａｓｍａＬｙｔｅが動いていることを確認した。

【２０３１】

最終製剤及び充填標的体積／バッグの計算。ブランクバッグを配合するためのＣＳ－１０及びＬＯＶＯ洗浄緩衝液の体積を計算した。ＣＲＦブランクを調製した。

【２０３２】

最終製品に追加するＩＬ－２の体積を計算した。所望される最終ＩＬ－２濃度（ＩＵ／ｍＬ）－３００ＩＵ／ｍＬ。ＩＬ－２作業ストック：６×10^4ＩＵ／ｍＬ．接続装置を組み立てた。４Ｓ－４Ｍ６０をＣＣ２細胞接続に滅菌溶接した。ＣＳ７５０クライオバッグを準備したハーネスに滅菌溶接した。ＣＳ－１０バッグを４Ｓ－４Ｍ６０のスパイクに溶接した。ＩＬ－２とともにＴＩＬ調製した。適切なサイズのシリンジを使用して、「ＩＬ－２　６×10^4」アリコートから決定されたＩＬ－２の量を取り出した。配合されたＴＩＬバッグをラベル付けした。配合されたＴＩＬバッグを装置に追加した。ＣＳ１０を追加した。シリンジを交換した。約１０ｍＬの空気を１００ｍＬのシリンジに引き込み、装置上の６０ｍＬシリンジを交換した。ＣＳ１０を追加した。ＣＳ－７５０バッグを準備した。細胞を分注した。

【２０３３】

最終製品バッグから空気を除去し、保持液を得た。最後の最終製品バッグが充填されると、すべてのクランプを閉じた。１０ｍＬの空気を新しい１００ｍＬシリンジに引き込み、装置のシリンジを交換する。保持液を５０ｍＬコニカルチューブに分注し、管を「保持液」及びロット番号としてラベル付けした。各バッグについて空気除去ステップを繰り返した。

【２０３４】
目視検査を含み、凍結保存のための最終製品を調製した。凍結保存までクライオバッグを低温パック上で、または２～８℃で保持した。
【２０３５】
細胞計数試料を取り出した。適切なサイズのピペットを使用して、２．０ｍＬの保持液を取り出し、細胞計数に使用されるように１５ｍＬコニカルチューブに入れる。細胞計数及び計算を行った。注記：１つだけの試料を適切な希釈に希釈し、希釈が十分であることを検証した。追加の試料を適切な希釈倍率に希釈し、計数を進めた。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。注記：希釈は、細胞の期待濃度に基づいて調整され得る。生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。ＩＦＮ－γを計算した。最終製品バッグを熱融着した。
【２０３６】
以下の例示的試料計画に従って試料をラベル付けし、収集した。
【２０３７】
【表４０】

表４０．試料計画。

試料	容器の数	各々に追加する試料体積	容器タイプ
*マイコプラズマ	1	1.0 mL	15mL コニカル
内毒素	2	1.0 mL	2mL クライオバイアル
グラム染色	1	1.0 mL	2mL クライオバイアル
IFN-γ	1	1.0 mL	2mL クライオバイアル
フローサイトメトリー	1	1.0 mL	2mL クライオバイアル
**Bac-T 無菌性	2	1.0 mL	Bac-T ボトル
QC 保持	4	1.0 mL	2mL クライオバイアル
サテライトバイアル	10	0.5 mL	2mL クライオバイアル

【２０３８】
無菌性及びＢａｃＴ試験。試験サンプリング。ＢＳＣ内で、適切なサイズのシリンジを使用して収集された保持細胞懸濁液から１．０ｍＬの試料を取り出し、嫌気性ボトルに接種する。好気性ボトルについて上記を繰り返す。
【２０３９】
最終製品の凍結保存。制御速度冷凍庫（ＣＲＦ）を準備した。ＣＲＦが設定されていることを検証した。ＣＲＦプローブを設定した。最終製品及び試料をＣＲＦに入れた。４℃±１．５℃に達し、ＣＲＦ実行を進めるために必要な時間を決定した。ＣＲＦが完了し、保管された。実行の完了後にＣＲＦを停止させた。カセット及びバイアルをＣＲＦから取り出した。保存のためにカセット及びバイアルを蒸気相ＬＮ２に移した。保管場所を記録した。
【２０４０】

最終医薬品の後処理及び分析には、以下の試験が含まれた：（２２日目）フローサイトメトリーによる２２日目ＲＥＰのＣＤ３＋細胞の決定、（２２日目）グラム染色法（ＧＭＰ）、（２２日目）ゲルクロットＬＡＬアッセイ（ＧＭＰ）による細菌内毒素試験、（１６日目）ＢａｃＴ滅菌アッセイ（ＧＭＰ）、（１６日目）ＴＤ－ＰＣＲによるマイコプラズマＤＮＡ検出（ＧＭＰ）、許容される外観属性、（２２日目）ＢａｃＴ滅菌アッセイ（ＧＭＰ）（２２日目）、（２２日目）ＩＦＮ－ガンマアッセイ。本明細書に記載の他の効力アッセイもまた、ＴＩＬ製品を分析するために用いられる。

【２０４１】

実施例８：ＧＥＮ３拡張プラットフォームの例示的な実施形態

０日目

腫瘍洗浄培地を調製した。培地を開始前に温めた。５ｍＬのゲンタマイシン（５０ｍｇ／ｍＬ）を５００ｍＬボトルのＨＢＳＳに添加した。５ｍＬの腫瘍洗浄培地を、ＯＫＴ３希釈に使用する１５ｍＬのコニカルチューブに添加した。フィーダー細胞バッグを調製した。フィーダー細胞をフィーダー細胞バッグに無菌で移し、使用するまで３７℃で保管するか、または凍結させた。３７℃の場合、フィーダー細胞をカウントした。凍結した場合は、解凍した後、フィーダー細胞をカウントした。

【２０４２】

フィーダー細胞濃度の最適範囲は、5×10^{4}～5×10^{6}細胞／ｍＬである。４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖを含む４つのコニカルチューブを準備した。各細胞計数について０．５ｍＬの細胞画分を追加した。総生フィーダー細胞数が1×10^{9}細胞以上であった場合、進んでフィーダー細胞濃度を調整した。フィーダー細胞の体積を計算し、第１のフィーダー細胞バッグから取り出して、1×10^{9}細胞を第２のフィーダー細胞バッグに添加した。

【２０４３】

ｐ１０００マイクロピペットを使用して、９００μＬの腫瘍洗浄培地をＯＫＴ３アリコート（１００μＬ）に移した。シリンジ及び滅菌技法を使用して、０．６ｍＬのＯＫＴ３を吸引し、第２のフィーダー細胞バッグに添加した。培地体積を全体積２Ｌに調整した。第２のフィーダー細胞バッグをインキュベーターに移した。

【２０４４】

ＯＫＴ３製剤の詳細：ＯＫＴ３は、１００μＬアリコート中のバイアル（１ｍｇ／ｍＬ）からの元のストック濃度でアリコートされ、凍結されてもよい。１ｍＬバイアル当たり約１０×アリコート。－８０℃で保管した。０日目：１５μｇ／フラスコ、すなわち５００ｍＬ中３０ｎｇ／ｍＬ～６０μＬ最大約１アリコート。

【２０４５】

５ｍＬの腫瘍洗浄培地を、過剰腫瘍片とラベル付けした６ウェルプレートのすべてのウェルに添加した。解剖中に腫瘍を水和状態に保持する際に、腫瘍洗浄培地をさらなる使用のために利用可能にした。５０ｍＬの腫瘍洗浄培地を、各１００ｍｍペトリ皿に追加した。

【２０４６】

解剖皿のふたの下の定規を参照として使用して、腫瘍を２７mm^{3}断片（３×３×３ｍｍ）に解剖した。６０個の断片に達するまで中間断片を解剖した。生成した最終断片の数に応じて、最終断片の総数を計数し、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコを調製した（一般に、１フラスコ当たり６０個の断片）。

【２０４７】

断片チューブ１～断片チューブ４とラベル付けしたコニカルチューブ内に好ましい組織断片を保持した。起源とする断片チューブの数に応じて、フィーダー細胞懸濁液を播種するＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコの数を計算した。

【２０４８】

フィーダー細胞バッグをインキュベーターから取り出し、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳを播種する。Ｄ０（０日目）とラベル付けする。

【２０４９】
Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ中の培養物への腫瘍断片の追加滅菌条件下で、腫瘍断片培養物（Ｄ０）１とラベル付けしたＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ及び断片チューブとラベル付けした５０ｍＬのコニカルチューブのキャップを緩めた。開いた断片チューブ１を回転させ、同時にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳのキャップをわずかに持ち上げた。断片を含む培地を、回転している間にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳに追加した。Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳに移送された断片の数を記録した。
【２０５０】
断片がＧＲＥＸフラスコの底に配置された時点で、７ｍＬの培地を吸引し、７つの１ｍＬアリコートを作製した（拡張された特徴付け用に５ｍＬ、滅菌試料用に２ｍＬ）。拡張された特徴付け用の５つのアリコート（最終断片培養上清）を、必要になるまで－２０℃で保管した。
【２０５１】
１本の嫌気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトル及び１本の好気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトルに各々１ｍＬの最終断片培養上清を接種した。サンプリングしたフラスコ毎に繰り返す。
【２０５２】
７日目～８日目
フィーダー細胞バッグを調製した。凍結時に３７℃の水浴中で３～５分間フィーダーバッグを解凍した。凍結している場合、フィーダー細胞を計数した。フィーダー細胞濃度の最適範囲は、5×10^{4}～5×10^{6}細胞／ｍＬである。４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖを含む４つのコニカルチューブを準備した。各細胞計数について０．５ｍＬの細胞画分を新しいクライオバイアル管に追加した。試料を十分に混合し、細胞計数を続けた。
【２０５３】
総生フィーダー細胞数が2×10^{9}細胞以上であった場合、次のステップに進んでフィーダー細胞濃度を調整した。フィーダー細胞の体積を計算し、第１のフィーダー細胞バッグから取り出して、2×10^{9}細胞を第２のフィーダー細胞バッグに追加した。
【２０５４】
ｐ１０００マイクロピペットを使用して、９００μＬのＨＢＳＳを１００μＬのＯＫＴ３アリコートに移す。上下に３回ピペッティングして混合する。２つのアリコートを調製した。
【２０５５】
ＯＫＴ３製剤の詳細：ＯＫＴ３は、１００μＬアリコート中のバイアル（１ｍｇ／ｍＬ）からの元のストック濃度でアリコートされ、凍結されてもよい。１ｍＬバイアル当たり約１０×アリコート。－８０℃で保管した。７日目／８日目：３０μｇ／フラスコ、すなわち５００ｍＬ中６０ｎｇ／ｍＬ～１２０μｌ最大約２アリコート。
【２０５６】
シリンジ及び滅菌技法を使用して、０．６ｍＬのＯＫＴ３を吸引し、フィーダー細胞バッグに添加して、すべて添加されたことを確認した。培地量を合計２Ｌに調整した。第２のＯＫＴ３アリコートで繰り返し、フィーダー細胞バッグに追加した。第２のフィーダー細胞バッグをインキュベーターに移した。
【２０５７】
フィーダー細胞懸濁液を含むＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコの準備。０日目に生成されたＧ－ＲＥＸフラスコの数に従って処理するためにＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコの数を記録した。Ｇ－ＲＥＸフラスコをインキュベーターから取り出し、第２のフィーダー細胞バッグをインキュベーターから取り出した。
【２０５８】
フィーダー細胞懸濁液を添加する前の上清の除去：１本の１０ｍＬシリンジをＧ－ＲＥＸ１００フラスコに接続し、５ｍＬの培地を引き上げた。５つの１ｍＬアリコート（拡張された特徴付け用に５ｍＬ）を作製し、治験依頼者からの要求があるまで、拡張された特

徴付け用に５つのアリコート（最終断片培養上清）を－２０℃で保管した。各Ｇ－ＲＥＸ１００フラスコにラベル付けし、繰り返した。

【２０５９】

フラスコの数に応じた、特徴付け用の５～２０×１ｍＬ試料：

●５ｍＬ＝１フラスコ

●１０ｍＬ＝２フラスコ

●１５ｍＬ＝３フラスコ

●２０ｍＬ＝４フラスコ

【２０６０】

フィーダー細胞をＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳに播種し続け、Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコ毎に繰り返した。無菌移送法を使用して、各Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコに重量で５００ｍＬの第２のフィーダー細胞バッグを重力移送し（１ｇ＝１ｍＬと想定）、量を記録した。７日目培養とラベル付けし、Ｇ－ＲＥＸ１００フラスコ毎に繰り返した。Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコをインキュベーターに移した。

【２０６１】

１０～１１日目

第１のＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコを取り出し、滅菌条件を使用して、１０ｍＬシリンジを使用して７ｍＬの前処理培養上清を取り出した。７つの１ｍＬアリコートを作製した（拡張された特徴付け用に５ｍＬ、滅菌試料用に２ｍＬ）。

【２０６２】

フラスコを注意深く混合し、新たな１０ｍＬシリンジを使用して１０ｍＬの上清を取り出し、Ｄ１０／１１マイコプラズマ上清とラベル付けした１５ｍＬのチューブに移す。

【２０６３】

フラスコを注意深く混合し、新しい注射器を使用して、処理されるフラスコの数に応じて以下の量を除去した。

●１フラスコ＝４０ｍＬ

●２フラスコ＝２０ｍＬ／フラスコ

●３フラスコ＝１３．３ｍＬ／フラスコ

●４フラスコ＝１０ｍＬ／フラスコ

【２０６４】

合計４０ｍＬをすべてのフラスコから取り出し、「１０／１１日目ＱＣ試料」とラベル付けした５０ｍＬのコニカルチューブにプールし、必要になるまでインキュベーター内で保管すべきである。細胞計数を行い、細胞を割り当てた。

【２０６５】

必要になるまで－２０℃以下で拡張された特徴付けのために５つのアリコート（前処理培養上清）を保管した。１本の嫌気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトル及び１本の好気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトルに各々１ｍＬの前処理培養上清を接種した。

【２０６６】

細胞懸濁液をＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳに移し、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ毎に繰り返した。滅菌条件を使用して、各Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳの内容物をＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳに移し、一度に約１００ｍＬの液体移送を監視した。Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳの容量が５００ｍＬに低減したとき、移送を停止した。

【２０６７】

移送ステップ中、１０ｍＬシリンジを使用し、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳからシリンジに１０ｍＬの細胞懸濁液を引き上げた。培養中のフラスコの数に従って指示に従った。１つのフラスコのみの場合：２つのシリンジを使用して合計２０ｍＬを取り出した。フラスコが２つの場合：１フラスコ当たり１０ｍＬを取り出した。フラスコが３つの場合：１フラスコ当たり７ｍＬを取り出した。フラスコが４つの場合：１フラスコ当たり５ｍＬを取り出した。細胞懸濁液を１本の一般的な５０ｍＬのコニカルチューブに移した。細胞計数ステップ及びＱＣ試料までインキュベーター内で保管する。ＱＣに必要な細胞の総数は、

約２０ｅ６細胞であった：４×０．５ｍＬの細胞数（細胞数を最初に希釈しなかった）。
【２０６８】
アッセイに必要な細胞の量は、以下の通りである。
１．本明細書に記載されるものなどの効力アッセイ、またはＩＦＮ－γもしくはグランザイムＢアッセイのための最小１０×１０^{6}細胞
２．マイコプラズマのための１×１０^{6}細胞
３．ＣＤ３＋／ＣＤ４５＋のためのフローサイトメトリーのための５×１０^{6}細胞
【２０６９】
Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコをインキュベーターに移した。
【２０７０】
ＱＣ試料を調製した。この実施形態のアッセイには少なくとも１５×１０^{8}細胞が必要であった。アッセイは、細胞数及び生存率、マイコプラズマ（１×１０^{6}細胞／平均生存濃度）、フロー（５×１０^{6}細胞／平均生存濃度）及びＩＦＮ－ｇアッセイ（５×１０^{6}細胞～１×１０^{6}細胞を含み、８～１０×１０^{6}細胞が、ＩＦＮ－γアッセイに必要である。
【２０７１】
１０×１０^{6}細胞／ｍＬで凍結保存のための細胞画分の体積を計算し、調製するバイアルの数を計算した。
【２０７２】
１６～１７日目
洗浄緩衝液の調製（１％　ＨＳＡ　Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅ　Ａ）。ＨＳＡ及びＰｌａｓｍａｌｙｔｅを５Ｌバッグに移して、ＬＯＶＯ洗浄緩衝液を作製した。滅菌条件を使用して、総体積１２５ｍＬの２５％ＨＳＡを５Ｌバッグに移した。１０ｍＬまたは４０ｍＬの洗浄緩衝液を取り出し、「ＩＬ－２　６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ」チューブに移した（ＩＬ－２を事前に調製した場合は１０ｍＬ、ＩＬ－２を新たに調製した場合は４０ｍＬ）。
【２０７３】
Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅ＋１％　ＨＳＡに添加する再構成ＩＬ－２の量を計算した：再構成ＩＬ－２の量＝（ＩＬ－２の最終濃度×最終量）／ＩＬ－２の比活性（標準アッセイに基づく）。ＩＬ－２の最終濃度は、６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬであった。最終体積は、４０ｍＬであった。
【２０７４】
再構成ＩＬ－２に必要なＩＬ－２の計算された初期体積を取り出し、「ＩＬ－２　６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ」チューブに移した。事前に調製したアリコートから１００μＬのＩＬ－２　６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬを、１０ｍＬのＬＯＶＯ洗浄緩衝液を含有する「ＩＬ－２　６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ」とラベル付けしたチューブに追加した。
【２０７５】
約４５００ｍＬの上清をＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコから取り出した。残りの上清を回転させ、細胞を細胞収集プールバッグに移した。すべてのＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコで繰り返した。
【２０７６】
６０ｍＬの上清を除去し、マイコプラズマ検出を含む品質管理アッセイのために上清チューブに添加した。＋２～８℃で保管した。
【２０７７】
細胞収集細胞を計数した。４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖを含む４つの１５ｍＬコニカルチューブを準備する。これらは、事前に準備してもよい。最適な範囲は、５×１０^{4}～５×１０^{6}細胞／ｍＬである。（１：１０希釈が推奨された）。１：１０希釈の場合、事前に調製した４５００μＬのＡＩＭ Ｖに、５００μＬのＣＦを追加する。希釈倍率を記録した。
ＴＣ（総細胞）ＬＯＶＯ前（生＋死）を計算した＝
平均総細胞
濃度（ＴＣ濃度ＬＯＶＯ前）

（生＋死）
X
ソースバッグの体積
ＴＶＣ（総生細胞）ＬＯＶＯ前（生）を計算した＝
平均総生細胞
濃度（ＴＶＣ　ＬＯＶＯ前）
（生）
X
ＬＯＶＯソースバッグの体積
【２０７８】
　総細胞（ＴＣ）数が５×１０^{9}超であった場合、５×１０^{8}細胞を取り出して、ＭＤＡ保持試料として凍結保存する。５×１０^{8}÷平均ＴＣ濃度（ステップ１４．４４）＝取り出す体積
【２０７９】
　総細胞（ＴＣ）数が５×１０^{9}以下であった場合、４×１０^{6}細胞を取り出して、ＭＤＡ保持試料として凍結保存する。４×１０^{6}÷平均ＴＣ濃度＝取り出す体積。
【２０８０】
　総細胞数が決定された場合、取り出す細胞の数は、１５０×１０^{9}生細胞の保持を可能にすべきである。ＴＶＣ　ＬＯＶＯ前５×１０^{8}もしくは４×１０^{6}を確認するか、または該当なしである。取り出す細胞の体積量を計算した。
【２０８１】
　バッグに残っている残りの総細胞を計算した。ＴＣ（総細胞）ＬＯＶＯ前を計算した。［平均総細胞濃度×残りの体積＝残りのＴＣ　ＬＯＶＯ前］を計算した。
【２０８２】
　残存する細胞の総数に従って、表４１の対応するプロセスを選択する。
【２０８３】
【表４１】

表４１．セルの総数。

総細胞:	保持液(mL)
0<総細胞≦31×10^{9}	115
31×10^{9}<総細胞≦71×10^{9}	165
71×10^{9}<総細胞≦110×10^{9}	215
110×10^{9}<総細胞≦115×10^{9}	265

【２０８４】
　使用したプロセスに対応して添加するＩＬ－２の量を選択する。次のように計算された体積：保持量×２×３００ＩＵ／ｍＬ＝必要とされるＩＬ－２のＩＵ。必要なＩＬ－２のＩＵ／６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ＝ＬＯＶＯ後バッグに追加するＩＬ－２の体積。添加したすべての体積を記録した。さらなる分析のために試料をクライオバイアル内に得た。
【２０８５】

細胞製品を十分に混合した。該当する場合、凍結保存を含むさらなる処理のためにすべてのバッグを密封した。

【２０８６】

得られたクライオバイアル試料に対して、内毒素、ＩＦＮ－γ、無菌性、及び必要に応じて他のアッセイを行った。

【２０８７】

実施例９：ＧＥＮ２及びＧＥＮ３の例示的なプロセス

この実施例は、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３のプロセスを示す。Ｇｅｎ２プロセス及びＧｅｎ３プロセスのＴＩＬは、一般に腫瘍の外科的切除によって個々の患者から得られ、その後、エクスビボで拡張された自己ＴＩＬで構成されている。Ｇｅｎ３プロセスのプライミングによる第１の拡張ステップは、インターロイキン－２（ＩＬ－２）及びモノクローナル抗体ＯＫＴ３の存在下での細胞培養であり、放射線照射された末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）の足場上のＴ細胞共受容体ＣＤ３を標的とする。

【２０８８】

Ｇｅｎ２　ＴＩＬ製品の製造は、２つの相からなる：１）急速拡張前（ＲＥＰ前）及び２）急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）。ＲＥＰ前中に、切除腫瘍を、各寸法２～３ｍｍの５０個以下の断片に切断し、血清含有培養培地（１０％ＨｕＳＡＢを補充したＲＰＭＩ１６４０培地）及び６，０００ＩＵ／ｍＬのインターロイキン－２（ＩＬ－２）で１１日間培養した。１１日目にＴＩＬを採取し、大規模二次ＲＥＰ拡張に導入した。ＲＥＰは、５日間の３０００ＩＵ／ｍＬのｒｈＩＬ－２を補充した５Ｌ体積のＣＭ２中の１５０μｇのモノクローナル抗ＣＤ３抗体（ＯＫＴ３）を装填した5×10^{9}個の放射線照射された同種異系ＰＢＭＣフィーダー細胞の共培養におけるＲＥＰ前由来の200×10^{6}個以下の生細胞の活性化からなる。１６日目に、培養物の体積を９０％減少させ、細胞画分を１フラスコ当たり1×10^{9}個以上の生リンパ球で複数のＧ－ＲＥＸ－５００フラスコに分割し、ＣＭ４で５ＬにＱＳする。ＴＩＬをさらに６日間インキュベートする。ＲＥＰを２２日目に採取し、洗浄し、製剤化し、凍結保存した後に、注入のために臨床現場に－１５０℃で発送する。

【２０８９】

Ｇｅｎ３　ＴＩＬ製品の製造は、３つの相からなる：１）プライミングによる第１の拡張プロトコル、２）急速な第２の拡張プロトコル（急速拡張相またはＲＥＰとも称される）、及び３）継代培養分割。プライミングによる第１の拡張ＴＩＬ増殖を行うために、切除した腫瘍を各寸法２～３ｍｍ以下の１２０個以下の断片に切断した。プライミングによる第１の拡張の０日目に、ＯＫＴ－３を装填したおよそ2.5×10^{8}個の照射された同種異系ＰＢＭＣフィーダー細胞のフィーダー層を、３つの１００ＭＣＳ容器の各々内のおよそ$100\ cm^{2}$の表面積上に確立した。腫瘍断片を、各々が５００ｍＬの血清含有ＣＭ１培養培地及び６，０００ＩＵ／ｍＬのインターロイキン－２（ＩＬ－２）及び１５ｕｇのＯＫＴ－３を含む３つの１００ＭＣＳ容器に分布し、その中で７日間培養した。７日目に、ＯＫＴ－３を負荷したおよそ5×10^{8}個の同種異系の放射線照射されたＰＢＭＣフィーダー細胞の追加のフィーダー細胞層を、３つの１００ＭＣＳ容器の各々において腫瘍断片化培養相に組み込み、５００ｍＬのＣＭ２培養培地及び６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０μｇのＯＫＴ－３で培養することによってＲＥＰを開始した。ＲＥＰの開始を、１００ＭＣＳ容器へのＯＫＴ３を装填したフィーダー細胞の閉鎖系流体移送を使用して、同じ容器内のプライミングによる第１の拡張培養物全体を活性化することによって増強した。Ｇｅｎ３の場合、ＴＩＬのスケールアップまたは分割に、細胞培養物全体を閉鎖系流体移送によってより大きい容器にスケーリングし、移し（１００Ｍフラスコから５００Ｍフラスコに）、追加の４ＬのＣＭ４培地を添加するプロセスステップを含めた。１６日目にＲＥＰ細胞を採取し、洗浄し、製剤化し、凍結保存した後に、注入のために臨床現場に－１５０℃で発送する。

【２０９０】

全体として、Ｇｅｎ３プロセスは、より短く、よりスケーラブルであり、かつ簡単に修

正可能な拡張プラットフォームであり、堅牢な製造及びプロセス比較可能性に適するように適応する。

【２０９１】

【表４２】

表５０．例示的なＧｅｎ２及び例示的なＧｅｎ３製造プロセスの比較。

ステップ	プロセス(Gen2)	プロセス(Gen3)
REP 前- 0 日目	最大 50 個の断片、1 つの G-REX-100MCS 11 日 1L の CM1 培地 + IL-2 (6000 IU/mL)	全腫瘍最大 120 個の断片を最大 3 つのフラスコに均等に分割した。1 つのフラスコ:1~60 個の断片 2 つのフラスコ 61~89 個の断片 3 つのフラスコ:90~120 個の断片 500mL の CM1 培地中、7 日間 + IL-2 (6000 IU/mL) 2.5×10^8 フィーダー細胞/フラスコ 15ug OKT-3/フラスコ
REP 開始	REP に指向する、11 日目、 $<200\times10^6$ TIL (1)5L CM2 培地中の G-REX-500MCS IL-2 (3000 IU/mL) 5×10^9 フィーダー細胞 150ug OKT-3	REP に指向する、7 日目、すべての細胞、同じ G-REX-100MCS 500CM2 培地を添加する IL-2(6000IU/mL) 5×10^8 フィーダー細胞/フラスコ 30ug OKT-3/flask
TIL の増殖またはスケールアップ	減容し、細胞画分を最大 5 つの G-REX-500MCS に分割する 4.5L CM4 培地+IL-2(3000IU/mL) $\geqq1\times10^9$ TVC/フラスコ 16 日目に分割する	各 G-REX-100MCS(1L)が 1 つの G-REX-500MCS に移行する 4L の CM4 培地+IL-2(3000IU/mL)を添加する 9~11 日目にスケールアップする
採取	22 日目に採取する LOVO-自動細胞洗浄機	16 日目に採取する LOVO 自動細胞洗浄機
最終製剤	凍結保存した製品 LN_2 中の 300IU/mL の IL2-CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品 LN_2 中 300IU/mL の IL-2-CS10、 複数のアリコート
プロセス時間	22 日	16 日

【２０９２】

０日目に、両方のプロセスについて、腫瘍を３回洗浄し、断片をランダム化し、２つのプールに分けた（プロセス毎に１つのプール）。Ｇｅｎ２プロセスの場合、断片を、６，０００ＩＵ／ｍＬのｒｈＩＬ－２を含有する１ＬのＣＭ１培地を含む１つのＧＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコに移した。Ｇｅｎ３プロセスでは、断片を、６，０００ＩＵ／ｍＬのｒｈＩＬ－２、１５ｕｇのＯＫＴ－３及び２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞を含有する５

００ｍＬのＣＭ１を含む１つのＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコに移した。Ｒｅｐ開始日のＴＩＬの播種は、各プロセスに従って異なる日に起こった。Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコを９０％減容させたＧｅｎ２プロセスの場合、収集した細胞懸濁液を新たなＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳに移して、ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）＋５×１０^{9}フィーダー細胞及びＯＫＴ－３（３０ｎｇ／ｍＬ）を含有するＣＭ２培地中で１１日目にＲＥＰを開始した。細胞が拡張し、プロトコルに従って１６日目にＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）を有するＣＭ４培地を含む複数のＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコに分割した。その後、培養物を採取し、プロトコルに従って２２日目に凍結保存した。Ｇｅｎ３プロセスの場合、ＲＥＰの開始は７日目に起こり、同じＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳをＲＥＰの開始に使用した。簡潔には、ＩＬ－２（６０００ＩＵ／ｍＬ）及び５×１０^{8}個のフィーダー細胞を３０ｕｇのＯＫＴ－３とともに含有する５００ｍＬのＣＭ２培地を各フラスコに添加した。９～１１日目に、培養をスケールアップした。Ｇ－ＲＥＸ１００Ｍの全体積（１Ｌ）をＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳに移し、ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）を含有する４ＬのＣＭ４を添加した。フラスコを５日間インキュベートした。培養物を採取し、１６日目に凍結保存した。

【２０９３】

比較には、２つの肺腫瘍（Ｌ４０５４及びＬ４０５５）と１つの黒色腫腫瘍（Ｍ１０８５Ｔ）の３つの異なる腫瘍を含めた。

【２０９４】

Ｌ４０５４及びＬ４０５５の場合、ＣＭ１培地（培養培地１）、ＣＭ２培地（培養培地２）、及びＣＭ４培地（培養培地４）を事前に調製し、４℃で保持した。ＣＭ１培地及びＣＭ２培地を、培地を濾過した場合の細胞増殖と培地を濾過しなかった場合の細胞増殖を比較するために、濾過せずに調製した。

【２０９５】

Ｌ４０５５腫瘍の場合、ＲＥＰの開始及びスケールアップ時に、培地を事前に３７℃で最大２４時間温めた。

【２０９６】

結果達成された生細胞の総数について、Ｇｅｎ３の結果はＧｅｎ２の３０％以内であった。Ｇｅｎ３最終製品は、再刺激後により高いＩＮＦ－γ産生を示した。Ｇｅｎ３最終製品は、存在する固有の全ＣＤＲ３配列によって測定される、増加したクローンの多様性を示した。Ｇｅｎ３最終製品は、より長い平均テロメア長を示した。

【２０９７】

Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスでのＲＥＰ前及びＲＥＰ拡張は、上記の手順に従った。各腫瘍について、２つのプールに同数の断片を含めた。腫瘍のサイズが小さいため、１フラスコ当たりの最大断片数は達成されなかった。総ＲＥＰ前細胞（ＴＶＣ）を採取し、Ｇｅｎ２プロセスの場合は１１日目に、Ｇｅｎ３プロセスの場合は７日目に計数した。２つのＲＥＰ前群を比較するために、細胞計数を培養物中に提供された断片の数で割り、１断片当たりの平均生細胞を計算した。以下の表５１に示されるように、Ｇｅｎ２プロセスは、Ｇｅｎ３プロセスと比較して、１断片当たりより多くの細胞を一貫して成長させた。ＲＥＰ前ＴＶＣを７で割り、その後、１１を掛けて計算した、１１日目にＧｅｎ３プロセスで予想されるＴＶＣ数の外挿計算。

【２０９８】

【表４３】

表５１．ＲＥＰ前の細胞計数

腫瘍 ID	L4054		L4055*		M1085T	
プロセス	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
REP 前 TVC	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
断片数	21	21	24	24	16	16
REP 前における断片当たりの平均 TVC	6.65E+06	2.06E+06	1.12E+06	5.75E+05	7.66E+05	2.18E+05
11 日目の REP 前における Gen3 外挿値	N/A	6.79E+07	N/A	2.17E+07	N/A	5.49E+06

*Ｌ４０５５、濾過されていない培地。

【２０９９】

Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスの場合、ＴＶＣをプロセス条件毎に計数し、生細胞パーセントをプロセス日毎に生成した。採取時に、２２日目（Ｇｅｎ２）及び１６日目（Ｇｅｎ３）の細胞を収集し、ＴＶＣ数を確立した。その後、ＴＶＣを０日目に提供された断片の数で割り、１断片当たりの平均生細胞を計算した。倍率拡張を、採取したＴＶＣをＲＥＰ開始ＴＶＣで割ることによって計算した。表５２に示されるように、Ｇｅｎ２とＧｅｎ３を比較すると、倍率拡張はＬ４０５４の場合では同様であり、Ｌ４０５５の場合、倍率拡張はＧｅｎ２プロセスの方が高かった。具体的には、この場合、培地をＲＥＰ開始日の前に２４温めた。Ｍ１０８５Ｔの場合のＧｅｎ３でもより高い倍率拡張が観察された。ＲＥＰ　ＴＶＣを１６で割り、その後、２２を掛けて計算した、２２日目にＧｅｎ３プロセスで予想されるＴＶＣ数の外挿計算。

【２１００】

【表４４】

表５２．ＴＩＬ最終製品の総生細胞数及び倍率拡張。

腫瘍ID	L4054		L4055		M1085T	
プロセス	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
断片数	21	21	24	24	16	16
TVC/断片(採取時)	3.18E+09	8.77E+08	2.30E+09	3.65E+08	7.09E+08	4.80E+08
REP 開始	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
スケールアップ	3.36E+09	9.35E+08	3.49E+09	8.44E+08	1.99E+09	3.25E+08
採取	6.67E+10	1.84E+10	5.52E+10	8.76E+09	1.13E+10	7.68E+09
倍率拡張 採取/ REP 開始	468.4	425.9	2056.8	634.6	925.0	2197.2
22 日目の REP 採取における Gen3 外挿値	N/A	2.53E+10	N/A	1.20E+10	N/A	1.06E+10

*Ｌ４０５５、濾過されていない培地。

【２１０１】

表５３：ＴＩＬ最終製品の生存率％：採取時に、最終ＴＩＬ　ＲＥＰ製品を生存率％の放出基準と比較した。Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスのすべての条件は、７０％の生存率基準を超えており、プロセス及び腫瘍間で同等であった。

【２１０２】

採取時に、最終ＴＩＬ　ＲＥＰ製品を生存率％の放出基準と比較した。Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスのすべての条件は、７０％の生存率基準を超えており、プロセス及び腫瘍間で同等であった。

【２１０３】

【表４５】

表５３．ＲＥＰの生存率（ＴＩＬ最終製品）

腫瘍ID	L4054		L4055		M1085T	
プロセス	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
REP 開始	98.23%	97.97%	97.43%	92.03%	81.85%	68.27%
スケールアップ	94.00%	93.57%	90.50%	95.93%	78.55%	71.15%
採取	87.95%	89.85%	87.50%	86.70%	86.10%	87.45%

【２１０４】
１フラスコ当たりの断片の数が最大必要数未満であったため、採取日の推定細胞計数を腫瘍毎に計算した。推定は、臨床腫瘍が０日目に２つまたは３つのフラスコに播種するのに十分な大きさであるという予想に基づいた。
【２１０５】
【表４６】

表５４．Ｇｅｎ３プロセスでのフルスケール２及び３フラスコへの外挿推定細胞数計算。

腫瘍 ID	L4054		L4055		M1085T	
Gen3 プロセス	2フラスコ	3フラスコ	2フラスコ	3フラスコ	2フラスコ	3フラスコ
推定採取	3.68E+10	5.52E+10	1.75E+10	2.63E+10	1.54E+10	2.30E+10

【２１０６】
免疫表現型決定－ＴＩＬ最終製品の表現型マーカー比較。３つの腫瘍Ｌ４０５４、Ｌ４０５５、及びＭ１０８５Ｔは、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスの両方でＴＩＬ拡張を受けた。採取時に、ＲＥＰ　ＴＩＬ最終製品をフローサイトメトリー分析にかけ、純度、分化、及びメモリーマーカーを試験した。すべての条件で、ＴＣＲ　ａ／ｂ＋細胞パーセンテージは９０％超であった。
【２１０７】
Ｇｅｎ３プロセスから採取したＴＩＬは、Ｇｅｎ２プロセスから採取したＴＩＬと比較して、より高いＣＤ８及びＣＤ２８発現を示した。Ｇｅｎ２プロセスは、より高いＣＤ４＋パーセンテージを示した。
【２１０８】
Ｇｅｎ３プロセスから採取したＴＩＬは、Ｇｅｎ２プロセス由来のＴＩＬと比較して、セントラルメモリー区画でより高い発現を示した。
【２１０９】
活性化及び疲弊マーカーを２つの腫瘍Ｌ４０５４及びＬ４０５５由来のＴＩＬで分析して、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３　ＴＩＬ拡張プロセス由来の最終ＴＩＬ製品を比較した。活性化及び疲弊マーカーは、Ｇｅｎ２プロセスとｇｅｎ３プロセスとの間で同等であった。
【２１１０】
再刺激時のインターフェロンガンマ分泌採取日、Ｇｅｎ２の場合は２２日目、Ｇｅｎ３の場合は１６日目に、ＴＩＬは、Ｌ４０５４及びＬ４０５５の場合、コーティングした抗ＣＤ３プレートで一晩再刺激を受けた。Ｍ１０８５Ｔでの再刺激は、抗ＣＤ３、ＣＤ２８、及びＣＤ１３７ビーズを使用して行った。すべての条件で再刺激の２４時間後に上清を収集し、上清を凍結させた。ＥＬＩＳＡによるＩＦＮγ分析を、同じＥＬＩＳＡプレートを使用して両方のプロセス由来の上清で同時に評価した。分析した３つの腫瘍で、Ｇｅｎ３プロセス由来のＩＦＮγのより高い産生が観察された。
【２１１１】
培養培地中のＩＬ－２レベルの測定Ｇｅｎ２プロセスとｇｅｎ３プロセスとの間のＩＬ－２消費量を比較するために、腫瘍Ｌ４０５４及びＬ４０５５で、ＲＥＰの開始時、スケールアップ時、及び採取日に細胞上清を収集した。細胞培養上清中のＩＬ－２の量を、Ｒ＆Ｄ製の定量化ＥＬＩＳＡキットによって測定した。一般的な傾向は、Ｇｅｎ２プロセスと比較して、Ｇｅｎ３プロセスではＩＬ－２濃度が高いままであることを示す。これは、プロセス全体を通して培地のキャリーオーバーと相まってＧｅｎ３のＲＥＰ開始時のＩＬ

－２濃度がより高い（６０００ＩＵ／ｍＬ）ことに起因する可能性がある。
【２１１２】
代謝基質及び代謝物分析Ｄ－グルコース及びＬ－グルタミンなどの代謝基質のレベルを、全培地消費量の代わりに測定した。乳酸及びアンモニアなどのそれらの相互代謝物を測定した。グルコースは、ＡＴＰの形態でエネルギーを産生するためにミトコンドリアによって利用される培地中の単糖である。グルコースが酸化されると、乳酸が産生される（乳酸塩は乳酸のエステルである）。乳酸塩は、細胞の指数関数的成長期中に強く産生される。高レベルの乳酸塩は、細胞培養プロセスに悪影響を及ぼす。
【２１１３】
Ｌ４０５４及びＬ４０５５の使用済み培地を、Ｇｅｎ２プロセス及びＧｅｎ３プロセスの両方で、ＲＥＰ開始時、スケールアップ時、及び採取日に収集した。使用済み培地の収集は、Ｇｅｎ２の場合は１１日目、１６日目、及び２２日目、Ｇｅｎ３の場合は７日目、１１日目、及び１６日目であった。上清を、グルコース、乳酸、グルタミン、ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）、及びアンモニアの濃度についてＣＥＤＥＸバイオアナライザーで分析した。
【２１１４】
Ｌ－グルタミンは、細胞培養培地製剤に必要な不安定な必須アミノ酸である。グルタミンにはアミンが含まれており、このアミド構造基は、窒素を細胞に輸送して送達することができる。Ｌ－グルタミンが酸化すると、細胞によって有毒なアンモニア副産物が産生される。Ｌ－グルタミンの分解に対抗するために、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスの培地に、水溶液中でより安定しており、かつ自発的に分解しないＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を補充した。２つの腫瘍株では、Ｇｅｎ３アームは、プロセス中のＬ－グルタミン及びＧｌｕｔａＭａｘ（商標）の減少、ならびにＲＥＰ全体でアンモニアの増加を示した。Ｇｅｎ２アームでは、Ｌ－グルタミン及びＧｌｕｔａＭａｘ（商標）の濃度が一定であり、アンモニア産生のわずかな増加が観察された。Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３のプロセスは、アンモニアについて採取日に同等であり、Ｌ－グルタミン分解にわずかな違いが見られた。
【２１１５】
テロメアは、Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨによって繰り返される。Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨ技術を使用して、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスでのＬ４０５４及びＬ４０５５のテロメア反復の平均長を測定した。相対テロメア長（ＲＴＬ）の決定を、ＤＡＫＯ製のフローサイトメトリー分析用Ｔｅｌｏｍｅｒｅ　ＰＮＡキット／ＦＩＴＣを使用して計算した。Ｇｅｎ３は、Ｇｅｎ２と同等のテロメア長を示した。
【２１１６】
ＣＤ３分析各プロセスで生成された細胞製品のクローン多様性を決定するために、Ｌ４０５４及びＬ４０５５の採取したＴＩＬ最終製品をサンプリングし、Ｔ細胞受容体のＣＤＲ３部分の配列決定によるクローン多様性分析についてアッセイした。
【２１１７】
表５５は、採取したＴＩＬ細胞製品のＬ４０５４における共有される固有のＣＤＲ３配列パーセンテージに関するＧｅｎ２とＧｅｎ３との比較を示す。１９９個の配列がＧｅｎ３最終製品とＧｅｎ２最終製品との間で共有され、Ｇｅｎ３最終製品と共有されるＧｅｎ２由来の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の９７．０７％に相当する。
【２１１８】

【表４７】

表５５．Ｌ４０５４のＧｅｎ２プロセスとＧｅｎ３プロセスとの間で共有されるｕＣＤＲ３配列の比較。

#uCDR3 (重複%)	すべての uCDR3		uCDR3 の上位 80%	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4054	8915	4355 (48.85%)	205	199 (97.07%)
Gen 3-L4054	-	18130	-	223

【２１１９】
表５６は、採取したＴＩＬ細胞製品のＬ４０５５における共有される固有のＣＤＲ３配列パーセンテージに関するＧｅｎ２とＧｅｎ３との比較を示す。１８３３個の配列がＧｅｎ３最終製品とＧｅｎ２最終製品との間で共有され、Ｇｅｎ３最終製品と共有されるＧｅｎ２由来の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の９９．４５％に相当する。
【２１２０】
【表４８】

表５６．Ｌ４０５５のＧｅｎ２プロセスとＧｅｎ３プロセスとの間で共有されるｕＣＤＲ３配列の比較。

#uCDR3 (重複%)	すべての uCDR3		uCDR3 の上位 80%	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4055	12996	6599 (50.77%)	1843	1833 (99.45%)
Gen 3-L4055	-	27246	-	2616

【２１２１】
ＣＭ１及びＣＭ２培地は、濾過せずに事前に調製し、腫瘍Ｌ４０５５の場合、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスで使用するまで４℃で保持した。
【２１２２】
Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスのＲＥＰ開始日に、腫瘍Ｌ４０５５の場合、培地を３７℃で事前に２４時間温めた。
【２１２３】
これらのプロセスで収集した上清中にＬＤＨは測定されなかった。
【２１２４】
Ｍ１０８５Ｔ　ＴＩＬ細胞計数を、Ｋ２　ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ細胞カウンターを使用して実行した。
【２１２５】
腫瘍Ｍ１０８５Ｔでは、代謝分析用の上清、活性化及び疲弊マーカー分析用のＴＩＬ製品、テロメア長、及びＣＤ３－ＴＣＲｖｂ分析などの試料は入手できなかった。
【２１２６】
結論この実施例では、３つの独立したドナー腫瘍組織を、機能的品質属性に加えて、拡

張された表現型特徴付け、ならびにＧｅｎ２プロセス及びＧｅｎ３プロセス間の培地消費に関して比較する。

【２１２７】

Ｇｅｎ２とＧｅｎ３のＲＥＰ前及びＲＥＰ拡張比較を、生成された全生細胞及び全有核細胞集団の生存率に関して評価した。採取日のＴＶＣ細胞用量は、Ｇｅｎ２（２２日）とＧｅｎ３（１６日）との間で同等ではなかった。Ｇｅｎ３細胞用量は、採取時に収集した全生細胞の約４０％であり、Ｇｅｎ２よりも低かった。

【２１２８】

ＲＥＰ前採取は、７日目ではなく１１日目に起こり、ＲＥＰ採取は、１６日目ではなく２２日目に起こると仮定して、Ｇｅｎ３プロセスの外挿細胞数を計算した。どちらの場合も、Ｇｅｎ３は、Ｇｅｎ２プロセスと比較してＴＶＣの数値が近いことを示し、初期活性化により、ＴＩＬの成長が増強したことを示す。

【２１２９】

Ｇｅｎ３プロセスでの追加フラスコ（２つまたは３つ）の外挿値の場合、処理される腫瘍サイズがより大きいと仮定し、記載されるようにプロセス毎に必要な最大断片数に到達する。２２日目のＧｅｎ２プロセスと比較して、Ｇｅｎ３プロセスの１６日目の採取時にＴＶＣで同様の用量に到達可能であり得ることが観察された。この観察は重要であり、培養物の早期活性化がＴＩＬ処理時間を短縮したことを示す。

【２１３０】

Ｇｅｎ２とＧｅｎ３のＲＥＰ前及びＲＥＰ拡張比較を、生成された全生細胞及び全有核細胞集団の生存率に関して評価した。採取日のＴＶＣ細胞用量は、Ｇｅｎ２（２２日）とＧｅｎ３（１６日）との間で同等ではなかった。Ｇｅｎ３細胞用量は、採取時に収集した全生細胞の約４０％であり、Ｇｅｎ２よりも低かった。

【２１３１】

表現型特徴付けに関して、Ｇｅｎ２プロセスと比較してＧｅｎ３プロセスでの３つの腫瘍でより高いＣＤ８＋及びＣＤ２８＋発現が観察された。

【２１３２】

Ｇｅｎ３プロセスは、Ｇｅｎ２プロセスと比較してわずかに高いセントラルメモリー区画を示した。

【２１３３】

Ｇｅｎ２プロセス及びＧｅｎ３プロセスは、Ｇｅｎ３プロセスの持続期間がより短いにもかかわらず、同等の活性化及び疲弊マーカーを示した。

【２１３４】

ＩＦＮガンマ（ＩＦＮγ）産生は、分析した３つの腫瘍において、Ｇｅｎ２と比較してＧｅｎ３最終製品において３倍高かった。このデータは、Ｇｅｎ３プロセスがプロセスと比較して高機能でより強力なＴＩＬ製品を生成したことを示し、Ｇｅｎ３でのＣＤ８及びＣＤ２８発現がより高いことに起因する可能性がある。表現型特徴付けは、Ｇｅｎ２プロセスと比較して３つの腫瘍でＣＤ８＋、ＣＤ２８＋発現へのＧｅｎ３の肯定的な傾向を示唆した。

【２１３５】

Ｇｅｎ２とＧｅｎ３との間のＴＩＬ最終製品のテロメア長は同等であった。

【２１３６】

グルコース及び乳酸塩レベルは、Ｇｅｎ２最終製品とＧｅｎ３最終製品との間で同等であり、プロセス日毎に減容除去が実行されなかったこと、及びＧｅｎ２と比較してプロセスにおける培地全体の体積が少ないことに起因して、Ｇｅｎ３プロセスの培地の栄養素レベルが影響されなかったことを示唆する。

【２１３７】

全体として、Ｇｅｎ３プロセスは、Ｇｅｎ２プロセスと比較してほぼ２倍の処理時間の短縮を示し、これにより、Ｇｅｎ３プロセスによって拡張されたＴＩＬ製品の売上原価（ＣＯＧ）の有意な削減がもたらされるであろう。

【２１３８】
ＩＬ－２消費は、Ｇｅｎ２プロセスでのＩＬ－２消費の一般的な傾向を示しており、Ｇｅｎ３プロセスでは、古い培地が除去されなかったため、ＩＬ－２が高かった。
【２１３９】
Ｇｅｎ３プロセスは、ＣＤＲ３　ＴＣＲａｂ配列分析によって測定されたより高いクローン多様性を示した。
【２１４０】
Ｇｅｎ３プロセスを使用して、ＲＥＰ前の０日目のフィーダー及びＯＫＴ－３の追加により、ＴＩＬの初期活性化が可能になり、ＴＩＬ成長が可能になった。
【２１４１】
表５７は、現在のＧｅｎ２プロセスと比較したＧｅｎ３プロセスの様々な実施形態及び成果を説明する。
【２１４２】

【表４９】

表５７．例示的なＧｅｎ３プロセス特徴。

ステップ	プロセス Gen2 の実施形態	プロセス Gen3 の実施形態
REP 前- 0 日目	50 個以下の断片 1X G-REX-100MCS 1L 培地 IL-2(6000IU/mL) 11 日	240 個以下の断片 60 個以下の断片/フラスコ 4 つ以下のフラスコ 2L 以下の培地(500mL/フラスコ) IL-2 (6000 IU/mL) 2.5×10^8 個のフィーダー細胞/フラスコ 15ug の OKT3/フラスコ
REP 開始	REP に指向した新鮮な TIL 11 日目 $200e^6$ 個以下の生細胞 5×10^9 フィーダー細胞 G-REX-500MCS 5L CM2 培地+IL-2(3000IU/mL) 150μg の OKT3	REP に指向した新鮮な TIL 7 日目 培養物全体を活性化する 5×10^8 フィーダー細胞 30μg の OKT3/フラスコ G-REX-100MCS 500mL 培地+IL-2(6000IU/mL)
TIL 継代培養 またはスケー ルアップ	5 つ以下の G-REX-500MCS 1×10 個以下の生細胞/フラスコ 5L/フラスコ 16 日目	4 つ以下の G-REX-500MCS 培養物全体をスケールアップする 4L/フラスコ 10~11 日目
採取	22 日目に採取 LOVO-自動細胞洗浄機 2 回の洗浄サイクル	16 日目に採取する LOVO-自動細胞洗浄機 5 回の洗浄サイクル
最終製剤	凍結保存した製品 LN_2 中の 300IU/mL の IL2-CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品 LN_2 中 300IU/mL の IL-2-CS10 複数のアリコート
プロセス 時間	22 日	16 日

【２１４３】

実施例１０：例示的なＧＥＮ３プロセス（ＧＥＮ３．１とも称される）

この実施例は、「ＴＩＬ拡張のためのＧｅｎ２プロセスとＧｅｎ３プロセスとの間の比較可能性」に関するさらなる研究について説明する。Ｇｅｎ３プロセスを、表現型及び機能プロファイルを維持しながら、最終総生細胞（ＴＶＣ）出力を増やすことを目的として、プロセスの初期に活性化ステップを含むように修正した。以下に記載されるように、Ｇｅｎ３実施形態をさらなる実施形態として修正し、本明細書におけるこの実施例ではＧｅｎ３．１と称する。

【２１４４】

いくつかの実施形態では、Ｇｅｎ３．１　ＴＩＬ製造プロセスは、以下の４つのオペレーター介入を有する。

１．腫瘍断片の単離及び活性化：プロセスの０日目に腫瘍を解剖し、最終断片を各々約３×３ｍｍ（合計で最大２４０個の断片）を生成し、１～４つのＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコ内で培養した。各フラスコは、最大６０個の断片、６，０００ＩＵのｒｈＩＬ－２、１５μｇのＯＫＴ３、及び２．５×10^8個の放射線照射した同種異系単核細胞を補充した５００ｍＬのＣＭ１またはＤＭ１培地を含んだ。培養物を３７℃で６～８日間インキュベートした。

２である。ＴＩＬ培養再活性化：７～８日目に、いずれの場合も６，０００ＩＵのｒｈＩＬ－２、３０μｇのＯＫＴ３、及び５×10^8個の放射線照射した同種異系単核細胞を補充したＣＭ２またはＤＭ１培地をゆっくり添加することによって、培養物を補充した。フラスコの底にある既存の細胞を乱さないように注意した。培養物を３７℃で３～４日間インキュベートした。

３．培養のスケールアップ：１０～１１日目に生じる。培養のスケールアップ中に、Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳの全内容物を、いずれの場合も３，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した４ＬのＣＭ４またはＤＭ２を含むＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコに移した。採取するまでフラスコを３７℃で５～６日間インキュベートした。

４．採取／洗浄／製剤化：１６～１７日目に、フラスコを減容させ、プールする。細胞を濃縮し、１％ＨＳＡを含有するＰｌａｓｍａＬｙｔｅ　Ａ　ｐＨ７．４で洗浄した。洗浄した細胞懸濁液を、ＣｒｙｏＳｔｏｒ１０と１：１の比で配合し、３００ＩＵ／ｍＬの最終濃度までｒｈＩＬ－２を補充した。

【２１４５】

ＤＰを制御された速度の凍結で凍結保存し、気相液体窒素中で保管した。＊完全標準ＴＩＬ培地１、２、または４（ＣＭ１、ＣＭ２、ＣＭ４）は、上記のように、合成培地（ＤＭ１またはＤＭ２）と称されるＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞無血清拡張培地の代用となり得た。

【２１４６】

プロセスの説明０日目に、腫瘍を３回洗浄し、その後、３×３×３の最終断片に断片化した。全腫瘍を断片化した時点で、最終断片を均等にランダム化し、３つのプールに分割した。１つのランダム化断片プールを各群に導入し、３つの実験マトリックス毎に同じ数の断片を添加した。

【２１４７】

全ＴＩＬ拡張プロセスにわたって、腫瘍Ｌ４０６３拡張を標準培地で行い、腫瘍Ｌ４０６４拡張を合成培地（ＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒ）で行った。培地の成分を本明細書に記載する。

【２１４８】

ＣＭ１完全培地１：２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）、１０％ヒトＡＢ血清、ゲンタマイシン（５０ｕｇ／ｍＬ）、２－メルカプトエタノール（５５ｕＭ）を補充したＲＰＭＩ＋グルタミン。６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終培地製剤

【２１４９】

ＣＭ２完全培地２：５０％　ＣＭ１培地＋５０％　ＡＩＭ－Ｖ培地。６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終培地製剤

【２１５０】

ＣＭ４完全培地４：ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）（２ｍＭ）を補充したＡＩＭ－Ｖ。３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終培地製剤。

【２１５１】

ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（２６ｍＬ／Ｌ）を補充したＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒ　ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　Ｂａｓａｌ　Ｍｅｄｉｕｍ。

【２１５２】

ＤＭ１：ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（２６ｍＬ／Ｌ）、及びＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ ＳＲ（３％）をＧｌｕｔａＭａｘ（商標）（２ｍＭ）とともに補充したＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ。６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終製剤。

【２１５３】

ＤＭ２：ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（２６ｍＬ／Ｌ）、及びＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ ＳＲ（３％）をＧｌｕｔａＭａｘ（商標）（２ｍＭ）とともに補充したＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ。３，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終製剤。

【２１５４】

使用したすべてのタイプの培地、すなわち、完全培地（ＣＭ）及び合成培地（ＤＭ）を事前に調製し、使用前日まで４℃で保持し、プロセス日前に事前に最長２４時間にわたってインキュベーター内で３７℃で温めた。

【２１５５】

ＴＩＬ培養再活性化は、両方の腫瘍で７日目に起こった。スケールアップは、Ｌ４０６３では１０日目、Ｌ４０６４では１１日目に起こった。両方の培養物を採取し、１６日目に凍結保存した。

【２１５６】

達成した結果Ｇｅｎ３．０プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスの細胞計数及び生存率％を決定した。すべての条件下での拡張は、この実施例に説明される詳細に従った。

【２１５７】

腫瘍毎に、断片を同数の３つのプールに分割した。腫瘍のサイズが小さいため、１フラスコ当たりの断片の最大数は達成されなかった。３つの異なるプロセスについて、総生細胞及び細胞生存率を条件毎に評価した。細胞数を、７日目の再活性化のＴＶＣ、１０日目（Ｌ４０６４）または１１日目（Ｌ４０６３）のスケールアップのＴＶＣ、及び１６／１７日目の採取時のＴＶＣとして決定した。

【２１５８】

７日目及び１０／１１日目の細胞計数をＦＩＯで測定した。倍率拡張を、１６／１７日目の採取時のＴＶＣを７日目の再活性化日のＴＶＣで割ることによって計算した。３つの群を比較するために、採取日のＴＶＣを、０日目の培養物中に添加した断片の数で割って、１断片当たりの生細胞の平均を計算した。

【２１５９】

Ｌ４０６３及びＬ４０６４について、細胞計数及び生存率アッセイを行った。Ｇｅｎ３．１－試験プロセスは、両方の腫瘍でＧｅｎ３．０プロセスよりも多くの１断片当たりの細胞数をもたらした。

【２１６０】

総生細胞数及び倍率拡張、プロセス中の生存率％再活性化時に、スケールアップして採取し、すべての条件で生存率％を行った。１６／１７日目の採取日に、最終ＴＶＣを生存率％の放出基準と比較した。評価したすべての条件は、７０％の生存率基準を超え、プロセス及び腫瘍全体で同等であった。

【２１６１】

免疫表現型決定－ＴＩＬ最終製品の表現型特徴付け。最終製品をフローサイトメトリー分析にかけ、純度、分化、及びメモリーマーカーを試験した。集団の割合は、すべての条件で、ＴＣＲα／β細胞、ＣＤ４＋細胞、及びＣＤ８＋細胞で一貫していた。

【２１６２】

ＲＥＰ ＴＩＬの拡張表現型分析を行った。ＴＩＬ製品は、両方の腫瘍でＧｅｎ３．０と比較してＧｅｎ３．１条件でより高いＣＤ４＋細胞パーセンテージを示し、両方の条件でＧｅｎ３．１条件と比較してＧｅｎ３．０でより高いＣＤ８＋集団由来のＣＤ２８＋細

胞パーセンテージを示した。
【２１６３】
Ｇｅｎ３．０プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスから採取したＴＩＬは、ＣＤ４＋細胞及びＣＤ８＋細胞でのＣＤ２７及びＣＤ５６発現、ならびにＣＤ４＋ゲート細胞集団での同等のＣＤ２８発現と同等の表現型マーカーを示した。ＴＩＬ最終製品のメモリーマーカーの比較：
【２１６４】
１６日目に採取したＴＩＬの凍結試料を分析のために染色した。ＴＩＬメモリーステータスは、Ｇｅｎ３．０プロセスとＧｅｎ３．１プロセスとの間で同等であった。ＴＩＬ最終製品の活性化及び疲弊マーカーの比較：
【２１６５】
活性化及び疲弊マーカーは、ＣＤ４＋細胞及びＣＤ８＋細胞上でゲートされたＧｅｎ３．０プロセスとＧｅｎ３．１プロセスとの間で同等であった。
【２１６６】
再刺激時のインターフェロンガンマ分泌採取したＴＩＬは、Ｌ４０６３及びＬ４０６４用のコーティングされた抗ＣＤ３プレートで一晩再刺激を受けた。Ｇｅｎ３．０プロセスと比較して、分析した２つの腫瘍で、より高いＧｅｎ３．１プロセスからのＩＦＮγ産生が観察された。
【２１６７】
培養培地中のＩＬ－２レベルの測定すべての条件及びプロセス間のＩＬ－２消費レベルを比較するために、細胞上清を、７日目の再活性化の開始時、１０日目（Ｌ４０６４）／１１日目（Ｌ４０６３）のスケールアップ時、及び１６／１７日目の採取及び凍結時に収集した。その後、上清を解凍し、分析した。細胞培養上清中のＩＬ－２の量を、製造業者のプロトコルによって測定した。
【２１６８】
全体的なＧｅｎ３プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスは、同じ培地条件で評価した全プロセス中のＩＬ－２消費に関して同等であった。Ｌ４０６３及びＬ４０６４用に収集した使用済み培地のＩＬ－２濃度（ｐｇ／ｍＬ）分析。
【２１６９】
代謝物分析使用済み培地の上清を、Ｌ４０６３及びＬ４０６４について、すべての条件で、７日目の再活性化の開始時、１０日目（Ｌ４０６４）または１１日目（Ｌ４０６３）のスケールアップ時、及び１６／１７日目の採取時に、Ｌ４０６３及びＬ４０６４から収集した。上清をＣＥＤＥＸバイオアナライザーでグルコース、乳酸塩、グルタミン、ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）、及びアンモニアの濃度について分析した。
【２１７０】
合成培地は、完全培地（２ｇ／Ｌ）と比較してより高いグルコース濃度４．５ｇ／Ｌを有する。全体として、グルコースの濃度及び消費量は、各培地タイプ内でＧｅｎ３．０プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスにおいて同等であった。
【２１７１】
乳酸塩の増加が観察され、乳酸塩の増加は、Ｇｅｎ３．０条件とＧｅｎ３．１条件との間、及び再活性化拡張に使用した２つの培地（完全培地と合成培地）間で同等であった。
【２１７２】
いくつかの場合において、標準基礎培地は、２ｍＭのＬ－グルタミンを含有し、培養条件下でＬ－グルタミンのＬ－グルタミン酸塩及びアンモニアへの自然分解を補うために、２ｍＭのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）で補充された。
【２１７３】
いくつかの場合において、使用した合成（無血清）培地は、基礎培地にＬ－グルタミンを含有せず、最終濃度が２ｍＭになるまでＧｌｕｔａＭａｘ（商標）のみで補充された。ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）は、Ｌ－アラニンとＬ－グルタミンのジペプチドであり、水溶液中でＬ－グルタミンよりも安定しており、グルタミン酸塩及びアンモニアに自発的に分

解しない。代わりに、ジペプチドは、個々のアミノ酸に徐々に解離し、それにより、より低いが十分な濃度のＬ－グルタミンを維持して、強力な細胞成長を維持する。

【２１７４】

いくつかの場合において、グルタミン濃度及びＧｌｕｔａＭａｘ（商標）濃度は、スケールアップ日にわずかに減少したが、採取日には再活性化日と比較して同様またはより近いレベルへの増加を示した。Ｌ４０６４の場合、グルタミン濃度及びＧｌｕｔａＭａｘ（商標）濃度は、全プロセス中、異なる条件間で同様の速度でわずかな分解を示した。

【２１７５】

アンモニア濃度は、２ｍＭのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を含有する合成培地中で成長させた試料よりも、２ｍＭのグルタミン＋２ｍＭのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を含有する標準培地中で成長させた試料で高かった。さらに、予想通り、培養の過程にわたってアンモニアの段階的増加または蓄積があった。３つの異なる試験条件間でアンモニア濃度に差はなかった。

【２１７６】

Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨによるテロメア反復：Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨ技術を使用して、Ｇｅｎ３プロセス及びＧｅｎ３．１プロセス下でのＬ４０６３及びＬ４０６４のテロメア反復の平均長を測定した。相対テロメア長（ＲＴＬ）の決定を、ＤＡＫＯ製のフローサイトメトリー分析用Ｔｅｌｏｍｅｒｅ　ＰＮＡキット／ＦＩＴＣを使用して計算した。テロメアアッセイを行った。試料のテロメア長を、対照細胞株（１３０１白血病）と比較した。対照細胞株は、長くて安定したテロメアを有する四倍体細胞株であり、相対テロメア長の計算を可能にする。両方の腫瘍で評価したＧｅｎ３プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスは、同等のテロメア長を示した。

【２１７７】

ＴＣＲ　Ｖβレパートリー分析

各プロセスで生成された細胞製品のクローン多様性を決定するために、ＴＩＬ最終製品をＴ細胞受容体のＣＤＲ３部分の配列決定によるクローン多様性分析のためにアッセイした。

【２１７８】

３つのパラメータを３つの条件間で比較した。

●固有のＣＤＲ３（ｕＣＤＲ３）の多様性指数

●ｕＣＤＲ３共有％

●ｕＣＤＲ３の上位８０％の場合：

○共有されるｕＣＤＲ３コピーの％を比較する

○固有のクロノタイプの頻度を比較する

【２１７９】

対照及びＧｅｎ３．１試験、ＴＩＬで採取した細胞製品で共有される固有のＣＤＲ３配列パーセンテージ：９７５個の配列がＧｅｎ３試験最終製品とＧｅｎ３．１試験最終製品との間で共有され、Ｇｅｎ３．１と共有されるＧｅｎ３由来の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の８８％に相当する。

【２１８０】

対照及びＧｅｎ３．１試験、ＴＩＬで採取した細胞製品で共有される固有のＣＤＲ３配列パーセンテージ：２１６３個の配列がＧｅｎ３試験最終製品とＧｅｎ３．１試験最終製品との間で共有され、Ｇｅｎ３．１と共有されるＧｅｎ３由来の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の８７％に相当する。

【２１８１】

異なるプロセスについて、１６日目の採取時に収集した1×10^{6}個の細胞から特定された固有のＣＤ３配列の数。Ｇｅｎ３．１試験条件は、試料内の固有のペプチドＣＤＲの数に基づいて、Ｇｅｎ３．０と比較してわずかに高いクローン多様性を示した。

【２１８２】

シャノンエントロピー多様性指数は、比較のための信頼性の高い一般的なメトリックで

あり、両方の腫瘍に対するＧｅｎ３．１条件は、Ｇｅｎ３．０プロセスよりもわずかに高い多様性を示し、Ｇｅｎ３．１試験条件のＴＣＲ　Ｖβレパートリーがｇｅｎ３．０プロセスよりもポリクローナルであることを示唆する。

【２１８３】

加えて、Ｇｅｎ３．１試験条件のＴＣＲ　Ｖβレパートリーは、腫瘍Ｌ４０６３及びＬ４０６４の両方でＧｅｎ３．０プロセスの対応するレパートリーと８７％を超える重複を示した。

【２１８４】

再活性化日のＧｅｎ３．１試験Ｌ４０６４の使用済み培地のＩＬ－２濃度の値は、期待値を下回った（Ｇｅｎ３．１対照及びＧｅｎ３．０条件と同様であった）。

【２１８５】

低い値はピペッティングエラーに起因した可能性があったが、最小限の試料しか採取できなかったため、アッセイを繰り返すことができなかった。

【２１８６】

結論０日目のフィーダー及びＯＫＴ－３を含むＧｅｎ３．１試験条件は、Ｇｅｎ３．０及びＧｅｎ３．１対照と比較して、１６日目の採取時の細胞用量のＴＶＣがより高いことを示した。Ｇｅｎ３．１試験条件のＴＶＣ最終製品は、Ｇｅｎ３．０よりも約２．５倍高かった。

【２１８７】

試験した腫瘍試料の両方について、０日目にＯＫＴ－３及びフィーダーを添加したＧｅｎ３．１試験条件は、採取時にフラスコの最大容量に達した。これらの条件下で、０日目に最大４つのフラスコを開始した場合、最終細胞用量は、８０～１００×10^9ＴＩＬである可能性があった。

【２１８８】

最終ＴＩＬ製品の純度、疲弊、活性化、及びメモリーマーカーを含む表現型特徴付けなどのすべての品質属性が、Ｇｅｎ３．１試験とＧｅｎ３．０プロセスとの間で維持された。

【２１８９】

最終ＴＩＬ製品のＩＦＮ－γ産生は、分析した２つの腫瘍において、Ｇｅｎ３．０と比較して、０日目にフィーダー及びＯＫＴ－３を添加したＧｅｎ３．１で３倍高く、Ｇｅｎ３．１プロセスが強力なＴＩＬ製品を生成したことを示唆する。

【２１９０】

試験条件にわたって、グルコースまたは乳酸塩レベルに差異は観察されなかった。培地条件にわたって、Ｇｅｎ３．０プロセスとＧｅｎ３．１プロセスとの間でグルタミン及びアンモニアに差異は観察されなかった。培地上の低レベルのグルタミンは、細胞増殖を制限しておらず、培地へのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）のみの添加が、細胞を増殖させるのに必要な栄養素を与えるのに十分であることを示唆する。

【２１９１】

１１日目及び１０日目のスケールアップは、それぞれ、プロセスの採取日に到達した細胞数に関して大きな差異を示さず、代謝物の消費量は、全プロセスにわたって両方の場合で同等であった。この観察結果は、Ｇｅｎ３．０最適化プロセスが処理日に柔軟性を有し、それにより、製造スケジュールの柔軟性を促進することができることを示唆している。

【２１９２】

０日目にフィーダー及びＯＫＴ－３を添加したＧｅｎ３．１プロセスは、Ｇｅｎ３．０と比較して、ＣＤＲ３　ＴＣＲａｂ配列分析によって測定されたより高いクローン多様性を示した。

【２１９３】

図３２は、Ｇｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３最適化プロセス）の実施形態を説明する。標準培地及びＣＴＳ　Ｏｐｔｉｍｉｚｅｒ無血清培地を、Ｇｅｎ３最適化プロセスＴＩＬ拡張に使用することができる。ＣＴＳ　Ｏｐｔｉｍｉｚｅｒの場合、培地のＧｌｕｔａＭａｘ

（商標）を最終濃度４ｍＭに増加させるために無血清培地が推奨される。

【２１９４】

実施例１１：腫瘍のＣＤ８造影

Ｔ細胞浸潤組織を確実に採取する上でどの腫瘍位置、転移性病変、またはリンパ節を優先すべきかの決定における指針とするためにＣＤ８造影を使用する。ＴＩＬ製造のための出発材料としてのコア生検の生検位置の指針とするためにもＣＤ８造影を使用する。具体的には、異なる腫瘍位置の間及び個々の位置の中でのＣＤ８浸潤及び腫瘍炎症における不均一性を特定するためにＣＤ８造影を使用する。どの病変及び病変内のどの場所を生検するかの決定時にこの情報を考慮する。

【２１９５】

概念実証試験例は、以下に記載のように実施されることになる。抗ＣＤ８ミニボディ検出剤（ＩｍａｇｉｎＡｂから供給される^{89}Ｚｒ－Ｄｆ－ＩＡＢ２２Ｍ２Ｃ抗ＣＤ８ミニボディなど）を各患者に投与し、その後に患者の体を走査することによって１０人の患者のそれぞれに単回の生検前ＣＤ８走査を実施して、生検用のＣＤ８＋がん病変を特定し、及び／または各病変内でのＣＤ８＋シグナル濃縮場所を特定して病変内生検の指針とする。対照群は、検出剤で処置されるが、ＣＤ８＋走査は受けない１０人の患者の生検を含む。

【２１９６】

生検試料は、本明細書に記載のＴＩＬの製造方法において使用する。製造したＴＩＬを使用して、本明細書に記載の治療方法に従って患者を治療する。解析エンドポイントには、ＴＩＬ製造の成功率及び奏功率を含める。ＴＩＬ投与後にＣＤ８走査を実施して薬力学を調べる。

【２１９７】

上記の実施例は、当業者に対して、本発明の組成物、システム及び方法の実施形態の作製方法及び使用方法の完全な開示及び説明を提供するために提示されており、本発明者らが自身の発明とみなすものの範囲を限定することを意図しない。当業者に明らかな、本発明を実施するための上記のモードの修正は、添付の特許請求の範囲内にあることを意図している。本明細書で言及するすべての特許及び刊行物は、本発明が属する分野の当業者のレベルを示す。

【２１９８】

すべての見出し及びセクションの指定は、明確化及び参照の目的のみのために使用されており、いかなる方法でも限定するものとしてみなされない。例えば、当業者は、本明細書に記載の本発明の趣旨及び範囲に従って異なる見出し及びセクションから様々な態様を適宜組み合わせることの有用性を理解する。

【２１９９】

本明細書で引用されたすべての参考文献は、各個々の刊行物または特許もしくは特許出願がすべての目的のためにその全体が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されているのと同じ程度にすべての目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【２２００】

当業者に明らかであるように、本出願の趣旨及び範囲から逸脱することなく、本出願の多くの修正及び変形が加えられてもよい。本明細書に記載の特定の実施形態及び実施例はほんの一例として提供されており、本出願は、特許請求の範囲が権利を与えられる等価物の全範囲に加えて、添付の特許請求の範囲の用語によってのみ限定されるべきである。

【図面】

【図１】

プロセス2A：ステップA～Eから約22日

1. ステップ A

患者の腫瘍試料を取得する

2. ステップ B

断片化及び第1の拡張
3日～14日

3. ステップ C

第1の拡張から第2の拡張へと移行
ストレージ及び閉鎖系なし

4. ステップ D

第2の拡張
IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞
閉鎖系

5. ステップ E

ステップDからのTILを採取する
閉鎖系

6. ステップ F

最終製剤及び/または注入バッグへの移行
（任意選択で凍結保存）

【図２Ａ】

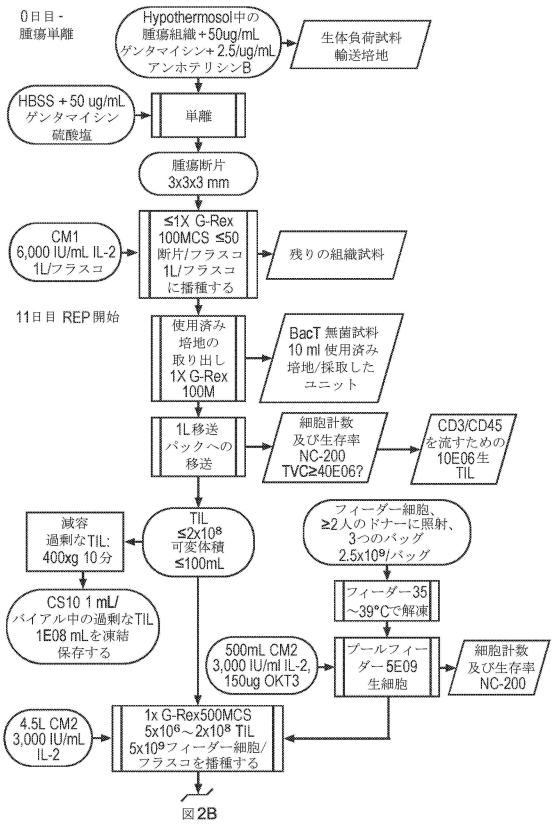
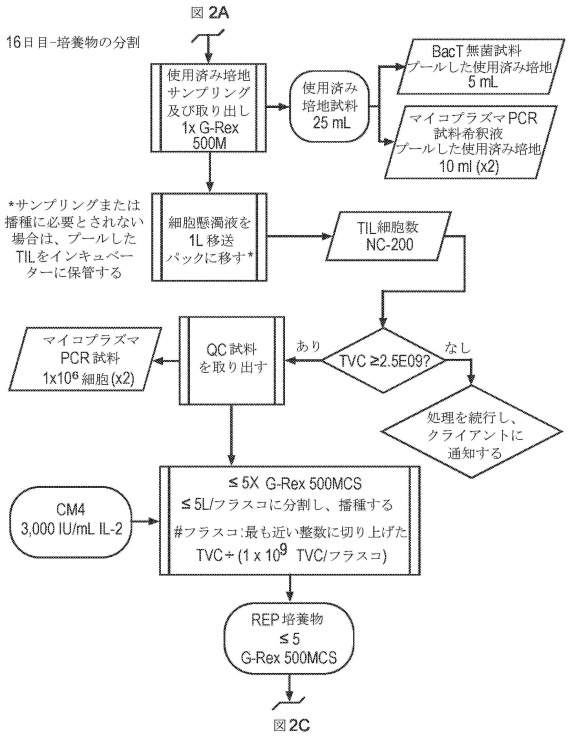
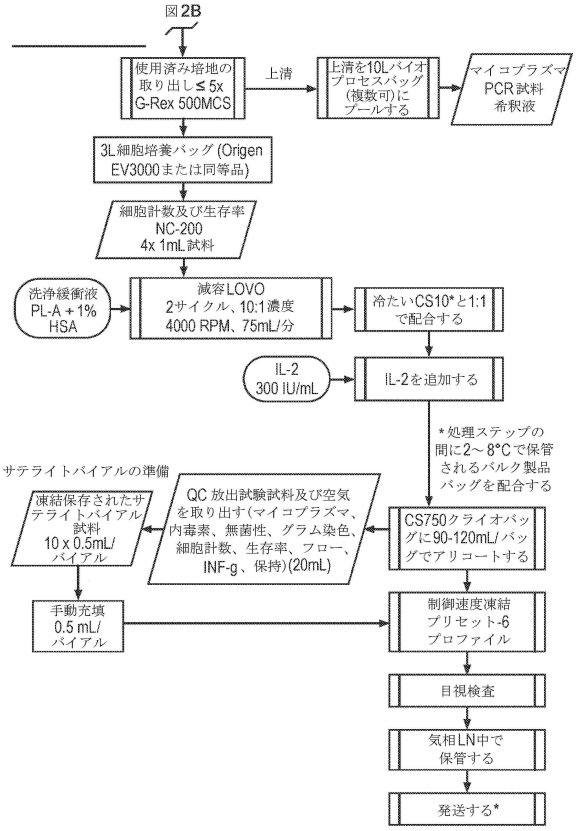


図2B

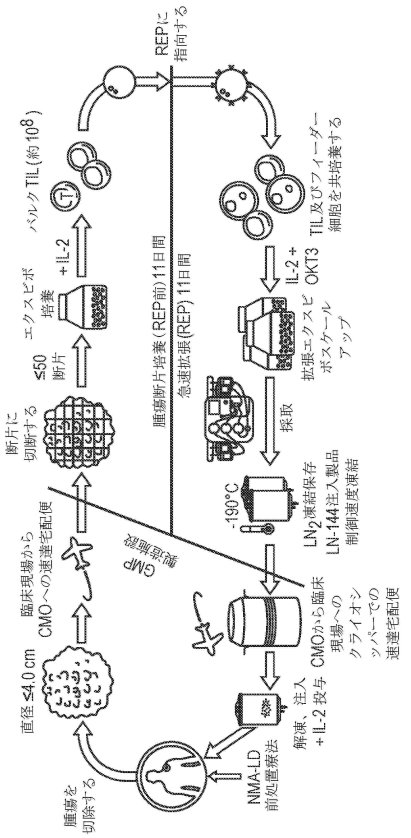
【図２Ｂ】


図 2A
16日目−培養物の分割
使用済み培地サンプリング及び取り出し 1x G-Rex 500M
使用済み培地試料 25 mL
BacT無菌試料 プールした使用済み培地 5 mL
マイコプラズマPCR試料希釈液 プールした使用済み培地 10 ml (x2)
*サンプリングまたは播種に必要とされない場合は、プールしたTILをインキュベーターに保管する
細胞懸濁液を1L移送パックに移す*
TIL細胞数 NC-200
マイコプラズマ PCR試料 1x10⁶ 細胞(x2)
QC試料を取り出す
あり
TVC ≥2.5E09?
なし
処理を続行し、クライアントに通知する
CM4 3,000 IU/mL IL-2
≤ 5X G-Rex 500MCS
≤ 5L/フラスコに分割し、播種する
#フラスコ:最も近い整数に切り上げた TVC÷(1 x 10⁹ TVC/フラスコ)
REP培養物 ≤ 5 G-Rex 500MCS
図2C

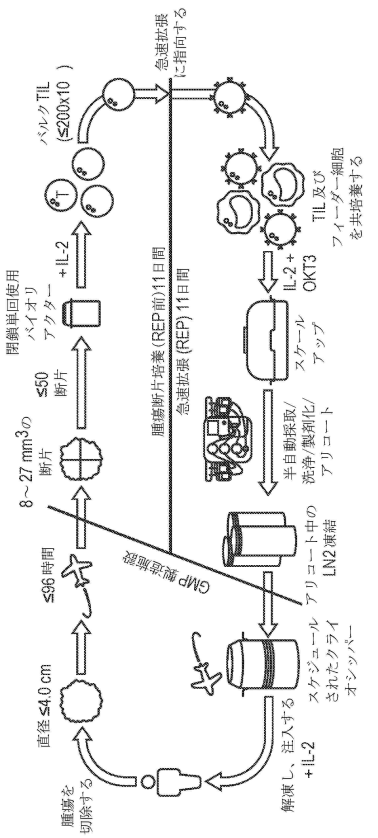
【図２Ｃ】


図2B
使用済み培地の取り出し≤ 5x G-Rex 500MCS
上清
上清を10Lバイオプロセスバッグ(複数可)にプールする
マイコプラズマ PCR試料 希釈液
3L細胞培養バッグ (Origen EV3000または同等品)
細胞計数及び生存率 NC-200 4x 1mL試料
洗浄緩衝液 PL-A + 1% HSA
減容LOVO 2サイクル、10:1濃度 4000 RPM、75mL/分
冷たいCS10*と1:1で配合する
IL-2 300 IU/mL
IL-2を追加する
*処理ステップの間に2～8°Cで保管されるバルク製品バッグを配合する
サテライトバイアルの準備
凍結保存されたサテライトバイアル試料 10 x 0.5mL/バイアル
QC 放出試験試料及び空気を取り出す(マイコプラズマ、内毒素、無菌性、グラム染色、細胞計数、生存率、フロー、INF-g、保持)(20mL)
CS750クライオバッグに90-120mL/バッグでアリコートする
手動充填 0.5 mL/バイアル
制御速度凍結 プリセット-6 プロファイル
目視検査
気相LN中で保管する
発送する*

【図３】


REPに指向する
バルクTIL (約10⁸)
+IL-2
エクスビボ培養
≤50 断片
断片に切断する
腫瘍断片培養 (REP前) 11日間
急速拡張 (REP) 11日間
TIL及びフィーダー細胞を共培養する
IL-2 + OKT3
拡張エクスビボスケールアップ
採取
-190°C
LN2凍結保存 LN-144注入製品 制御速度凍結
GMP製造施設
臨床現場からCMOへの速達宅配便
直径 ≤4.0 cm
腫瘍を切除する
NMA-LD 前処置療法
解凍、注入 + IL-2 投与
CMOから臨床現場への クライオシッパーでの 速達宅配便

【図４】


急速拡張に指向する
バルクTIL (≤200x10⁹)
閉鎖単回使用バイオリアクター
+IL-2
≤50 断片
8～27 mm³の断片
腫瘍断片培養 (REP前) 11日間
急速拡張 (REP) 11日間
TIL及びフィーダー細胞を共培養する
IL-2 + OKT3
スケールアップ
半自動採取/洗浄/製剤化/アリコート
アリコート中のLN2凍結
GMP製造施設
≤96時間
直径 ≤4.0 cm
腫瘍を切除する
解凍し、注入する +IL-2
スケジュールされたクライオシッパー

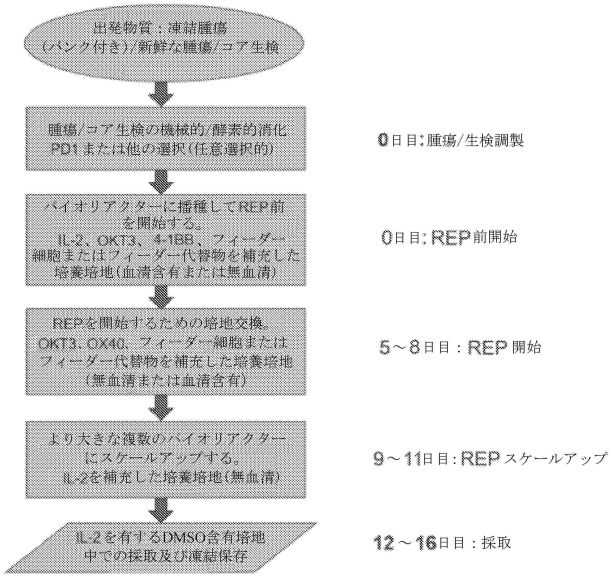
【図５】

プロセス1C：ステップA～Eについて43～55日	プロセス2A：ステップA～Eから約22日
1. ステップ**A** 患者の腫瘍試料を取得する	**1.** ステップ**A** 患者の腫瘍試料を取得する
2. ステップ**B** 断片化及び第**1** の拡張 **11**日～**21**日	**2.** ステップ**B** 断片化及び第**1** の拡張 **3**日～**14**日
3. ステップ**C** 第1の拡張から第2の拡張への移行 選択までの任意選択のストレージ	**3.** ステップ**C** 第1の拡張から第2の拡張への移行 ストレージなし及び閉鎖系
4. ステップ**D** 第2の拡張 **IL-2**、**OKT-3**、抗原提示フィーダー細胞 任意選択で１回以上繰り返す	**4.** ステップ**D** 第2の拡張 **IL-2**、**OKT-3**、及び抗原提示フィーダー細胞 閉鎖系
5. ステップ**E** ステップ**D**からの**TIL**を採取する	**5.** ステップ**E** ステップ**D**からの**TIL**を採取する 閉鎖系
6. ステップ**F** 最終製剤及び/または注入バッグへの移行	**6.** ステップ**F** 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 （任意選択で凍結保存）

【図６】

プロセスステップ	プロセス1C実施形態	プロセス2A実施形態	利点
REP前	• **10**個の**GREX-10**フラスコ当たり**4**個の断片 • **11**～**21**日間	• **1**つの**GREX-100M**フラスコ当たり**40**個の断片 • **11**日間	•フラスコ当たりの腫瘍断片の増加 •培養時間の短縮 •ステップ数の削減 •閉鎖系に適している
REP前から**REP**への移行	• **REP**前**TIL**を選択のために表現型決定されるまで凍結し、次いで解凍して**REP**に進む(約**30**日目) • **REP**は、**>40×10^6 TIL**を必要とする	• **REP**前**TIL**は、**11**日目に直接**REP**に移動する • **REP**は、**25**～**200×10^6 TIL**を必要とする	• **REP**前から**REP**プロセスの短縮 • ステップ数の削減 • 表現型決定選択の排除 • 閉鎖系に適している
REP	• **REP 0**日目に**6**つの**GREX-100M**フラスコ • **REP 0**日目に**5×10^6 TIL**及び**5×10^8 PBMC**フィーダー/フラスコ • **REP 7**日目に**18**～**36**個のフラスコに分割する • **14**日間	• **11**日目に**1**つの**GREX-500M**フラスコ • **11**日目に**25**～**200×10^6 TIL**及び**5x10^9 PBMC**フィーダー • **16**日目に**6**つ以下の**GREX- 500M**フラスコに分割する • **11**日間	• ステップ数の削減 • **REP**期間の短縮 • フラスコ間の**TIL**の閉鎖系移送 • 閉鎖系培地交換
採取	• 遠心分離によって採取した**TIL**	•**LOVO**自動細胞洗浄システムを介して採取した**TIL**	• ステップ数の削減 • 自動細胞洗浄 • 閉鎖系 •洗浄中の製品損失の低減
最終製剤化	• **Hypothermosol**中の新鮮な製品 • 単回注入バッグ • 限定された発送安定性	• **LN$_2$**中で保管された**PlasmaLyte-A +1% HSA**及び**CS10**中の凍結保存製品 •複数のアリコート •より長い発送安定性	• 発送の柔軟性 • 柔軟な患者スケジューリング • よりタイムリーな放出試験
全体の推定プロセス時間	• **43**～**55**日	• **22**日	• 患者へのより速い転向

【図７】



【図８Ａ】

プロセス2A/GEN2：ステップA～Eまで約22日	プロセスGEN3：ステップA～Eまで約14～18日
ステップA 患者の腫瘍試料を取得する （任意選択で、ステップB前に凍結され得る）	ステップA 患者の腫瘍試料を取得する （任意選択で、ステップB前に凍結され得る）
ステップB 第1の拡張 （IL-2を含む培地による約3日～14日間成長させた容器につき少なくとも40個の断片への物理的断片化）	ステップB プライミングによる第1の拡張 （IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む培地による約1日～7日間成長させた容器当たり最大60個の断片の物理的断片化）
ステップC 第1の拡張から第2の拡張へと移行 （ステップBのTIL は、任意にステップBの11日目に、ステップDに直接移動）	ステップC プライミングによる第1の拡張から急速な第2の拡張への移行 （ステップBのTILは、7日目にステップDに直接移動）
ステップD 第2の拡張 （密閉容器内にIL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地(medium)において成長したTIL）	ステップD 急速な第2の拡張 （IL-2、OKT-3、及び2倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地(medium)において成長したTIL:10～11日目にスケールアップ及びさらなるIL-2を添加）
ステップE ステップDからのTILを採取する （閉鎖系を介して採取されたTIL）	ステップE ステップDからのTILを採取する
ステップF 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 （任意選択で凍結保存）	ステップF 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 （任意選択で凍結保存）

【図８Ｂ】

プロセスGEN3:ステップA～Eまで約14～18日

ステップA
患者の腫瘍試料を取得する
(任意選択で、ステップB前に凍結され得る)

ステップB
プライミングによる第1の拡張
(IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む培地による約1日～7日間成長させた容器当たり最大60個の断片の物理的断片化)

ステップC
プライミングによる第1の拡張から急速な第2の拡張への移行
(ステップBのTILは、7日目にステップDに直接移動)

ステップD
急速な第2の拡張
(IL-2、OKT-3、及び2倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地(medium)において成長したTIL;10～11日目にスケールアップ及びさらなるIL-2を添加)

ステップE
ステップDからのTILを採取する

ステップF
最終製剤及び/または注入バッグへの移行
(任意選択で凍結保存)

【図８Ｃ】

実施形態GEN 3.0: ステップA～Eまで約14～18日	実施形態GEN 3.1対照: ステップA～Eまで約14～18日	実施形態GEN 3.1試験/F: ステップA～Eから約14～18日
ステップA 患者の腫瘍試料を取得する (任意選択で、ステップB前に凍結され得る)	ステップA 患者の腫瘍試料を取得する (任意選択で、ステップB前に凍結され得る)	ステップA 患者の腫瘍試料を取得する (任意選択で、ステップB前に凍結され得る)
ステップB プライミングによる第1の拡張 (１Ｌ－２を含む培地による約１日～７／８日間成長させた容器につき最大６０個の断片の物理的断片化)	ステップB プライミングによる第1の拡張 (IL-2及びOKT-3を含む培地による約1日～7/8日間成長させた容器につき最大60個の断片の物理的断片化)	ステップB プライミングによる第1の拡張 (IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む培地による約1日～7/8日間成長させた容器につき最大60個の断片の物理的断片化)
ステップC プライミングによる第1の拡張から急速な第2の拡張への移行 (ステップBのTILは、7日目/8日目にステップDに直接移動)	ステップC プライミングによる第1の拡張から急速な第2の拡張への移行 (ステップBのTILは、7日目/8日目にステップDに直接移動)	ステップC プライミングによる第1の拡張から急速な第2の拡張への移行 (ステップBのTILは、7日目/8日目にステップDに直接移動)
ステップD 急速な第2の拡張 (IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地(medium)において成長したTIL;10～11日目にスケールアップ及びさらなるIL-2を添加)	ステップD 急速な第2の拡張 (IL-2、OKT-3、及び2倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地(medium)において成長したTIL;10～11日目にスケールアップ及びさらなるIL-2を添加)	ステップD 急速な第2の拡張 (IL-2、OKT-3、及び2倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地(medium)において成長したTIL;10～11日目にスケールアップ及びさらなるIL-2を添加)
ステップE ステップDからのTILを採取する	ステップE ステップDからのTILを採取する	ステップE ステップDからのTILを採取する
ステップF 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 (任意選択で凍結保存)	ステップF 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 (任意選択で凍結保存)	ステップF 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 (任意選択で凍結保存)

【図８Ｄ】

修正したGen2様プロセス:ステップA～Eまで約22日

ステップA
患者の腫瘍試料を取得する
(任意に、ステップB前に凍結され得;任意に、腫瘍試料は、コア/小生検であり得る)

ステップB1
初期培養
容器当たり最大60個の腫瘍断片または最大10個のコア/小生検の物理的断片化、IL-2を含む成長培地中で3日間成長したTIL

ステップB2
プライミングによる第1の拡張
IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地中で8日間成長したTIL)

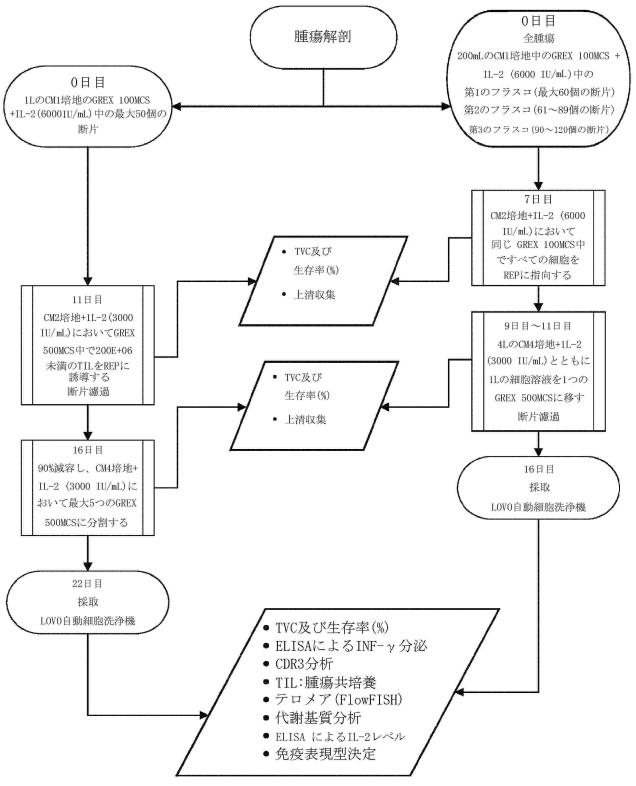
ステップC
プライミングによる第1の拡張から急速な第2の拡張への移行
(ステップBのTILは、11日目にステップDに直接移動)

ステップD
急速な第2の拡張
(体積を低下させ、IL-2、OKT-3、及び50倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地において成長したTIL、16日目にスケールアップし、追加のIL-2を添加する)

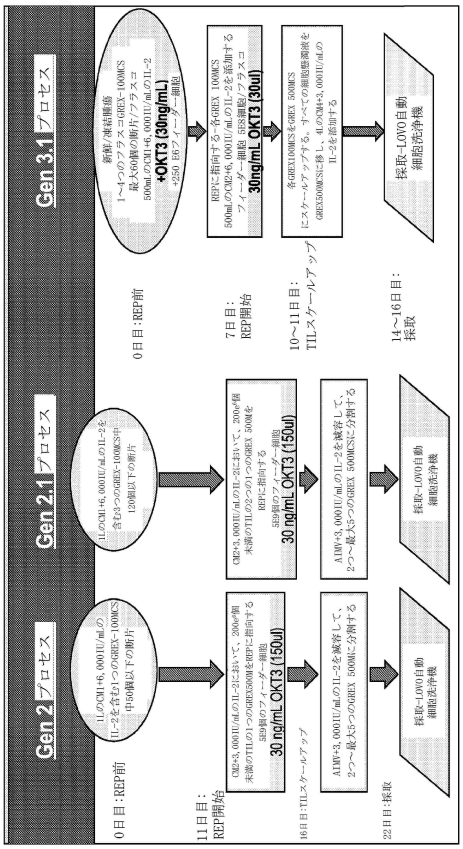
ステップE
ステップDからのTILを採取する

ステップF
最終製剤及び/または注入バッグへの移行
(任意選択で凍結保存)

【図９】



【図１０】



【図１１】

ステップ	Gen 2	Gen 2.1	最適化されたGen 3.0
REP前-0日目	50個以下の断片/1つのG-Rex 100MCS-11日	180個以下の断片/3つのG-Rex、事前配合されたCM1加温培地 100MCS-11日	新鮮または凍結腫瘍 1G-Rex当たり30以下の断片から最大60の断片を有する全腫瘍。 100MCS(最大4つのG-Rex)、事前に配合された加温培地-7日間、REP前、フィーダー2.5 E8細胞+OKT-3(30ng/mL)
REP開始	REPに指向-11日目- <200 E6 TIL 1つのG-Rex500MCS	REPに指向-11日目- <200 E6 TIL 1つのG-Rex 500MCS中の事前配合されたCM2加温培地	REPに指向-7日目-すべての細胞TIL一同にG-Rex 100MCS(100MCS 最大4つのGREX)、標準培地または合成培地(無血清)、フィーダー-5E8細胞+OKT-3(30ng/mL)を添加
TILの増殖またはスケールアップ	1~5つのG-REX 500MCS 16日目に分割する	2~5つのG-REX 500MCS 事前配合されたCM4加温培地 16日目に分割する	G-REX100MCSから、TIL懸濁液をG-REX 500MCS、最大4つのGREX 500MCSに移す-標準培地または合成培地(無血清) 10日目または11日目にスケールアップする
採取	22日目に採取する、 LOVO自動細胞洗浄機	22日目に採取する、 LOVO自動細胞洗浄機 (5回の洗浄サイクル)	14日目または16日目に採取する LOVO自動細胞洗浄機(5回の洗浄サイクル)
最終製剤	凍結保存した製品 LN_中の3000IU/mlのIL2-CS10、 複数のアリコート	凍結保存した製品 LN_中の3000IU/mlのIL2-CS10、 複数のアリコート	凍結保存した製品 LN_中の3000IU/mlのIL-2-CS10、 複数のアリコート
プロセス時間	22日	22日	16日

【図１２】

プロセス日	条件	Gen 3.1
0日目-REP前開始	培地CM1	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	OKT-3 (30ng/mL)	+
	フィーダー (250 E+06)	+

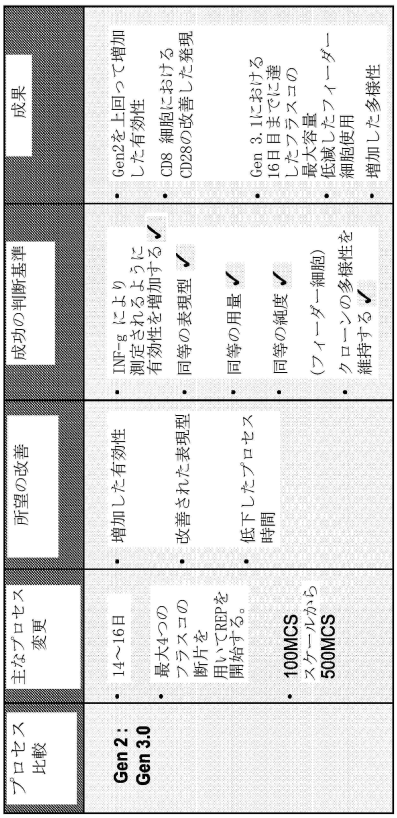
プロセス日	条件	Gen 3.1
7日目-REP開始	培地 CM2	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	7日目に追加されたOKT-3 (30ng/mL)	+
	7日目に追加されたフィーダー	500 E06
	日数での総フィーダー	750 E+06

プロセス日	条件	Gen 3.1
9~11日目-スケールアップ	G-REX 100MCSから、TIL懸濁液を1つのG-REX 500MCS(最大3つのGREX 500MCS)に移す	あり
16日目-採取	LOVO 自動細胞洗浄機	あり

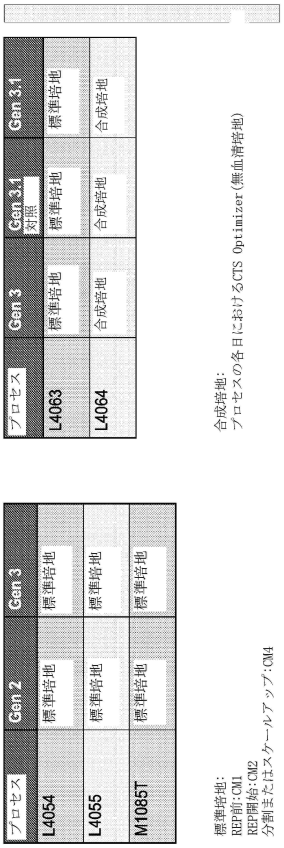
【図１３】

プロセス比較	主なプロセス変更	利点
Gen 2：Gen 2.1	• 1つのフラスコの代わりに2つのフラスコを用いたプロセスを開始する • 2つのG-Rex500MCSフラスコ間でREP開始のフィーダー層を分割する • 使用前に培地を事前に製剤化し、加温する	• 増加したTILレパートリーを用いた最終細胞計数(用量)の倍加の可能性。 • プロセス中のプロセス冗長性
Gen 2.1：Gen 3.1	• 新鮮または凍結腫瘍 • 14~16日のプロセス(22日から) • プロセス中の全フィーダー層を低減する • 0日目に存在するフィーダー層及びOKT3 • 断片で開始したREP • 100MCSスケールから500MCS • REP前フラスコを複数にスケールアップする • 標準培地及び合成培地(無血清)	• 増加した有効性 • 改善された表現型 • 低下したプロセス時間 • 低減した試薬試験 • 低下したプロセス変動 • 合成された試薬 • 増加したレパートリー • 不純物を低減する(フィーダー) • 同等またはより高い用量

【図１４】



【図１５】



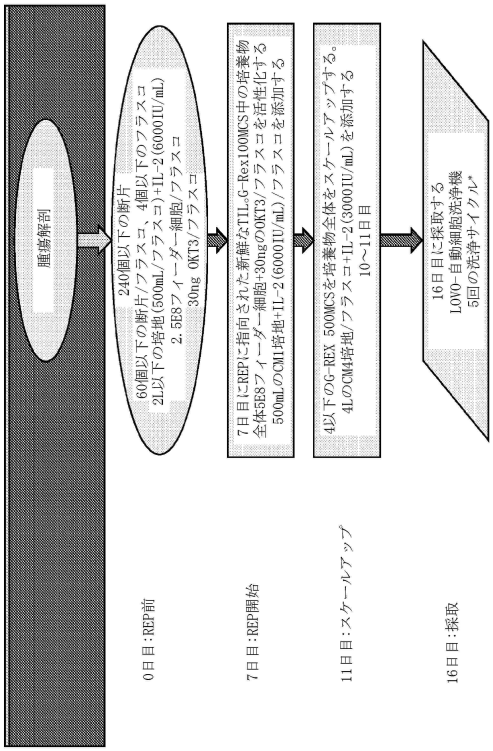
プロセス	Gen 2	Gen 3	
L4054	標準培地	標準培地	
L4055	標準培地	標準培地	
M1085T	標準培地	標準培地	

プロセス	Gen 3	Gen 3.1 対照	Gen 3.1
L4063	標準培地	標準培地	標準培地
L4064	合成培地	合成培地	合成培地

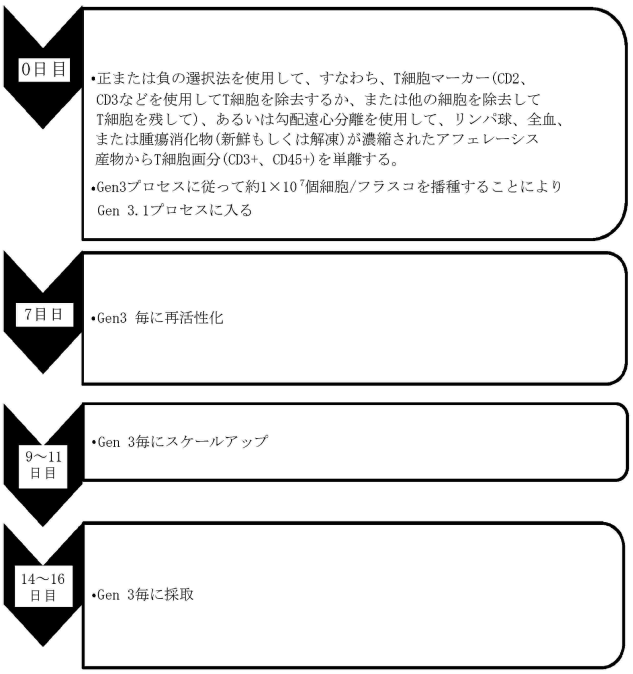
標準培地:
REP前:CM1
REP開始:CM2
分割またはスケールアップ:CM4

合成培地:
プロセスの各日におけるCTS Optimizer(無血清培地)

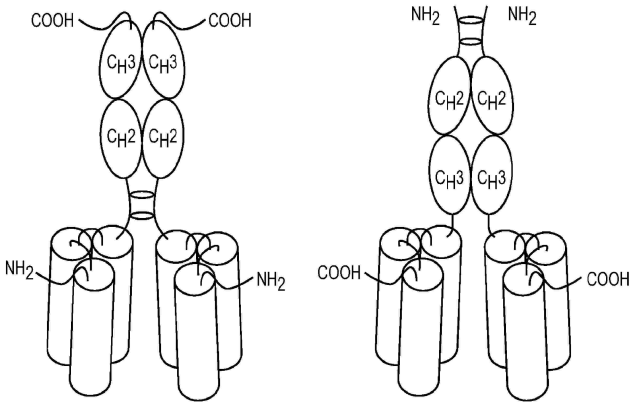
【図１６】



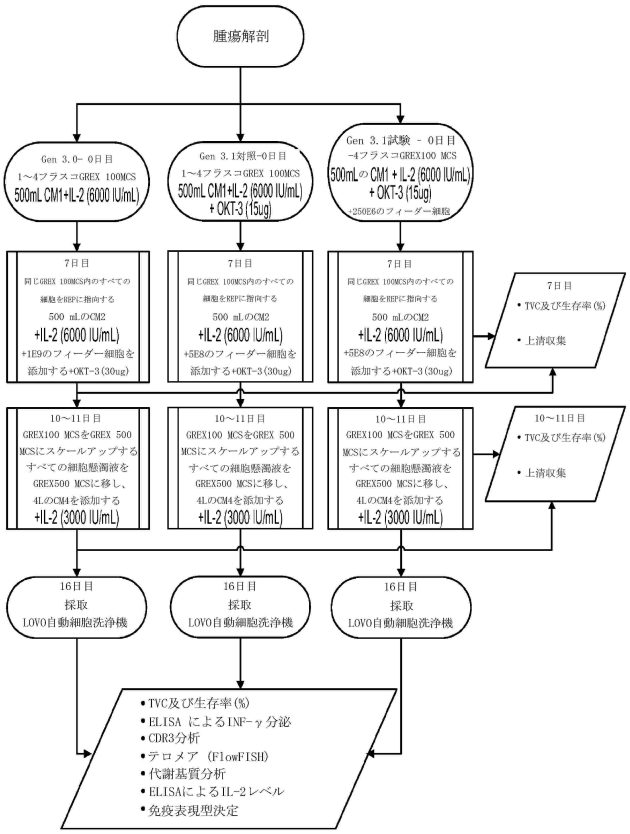
【図１７】



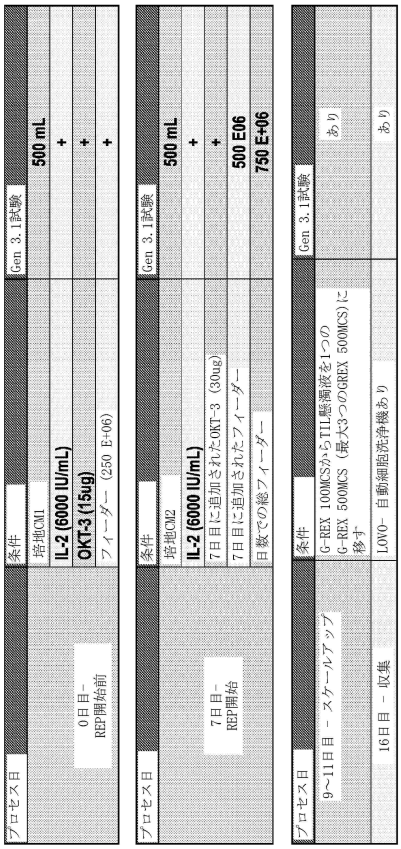
【図１８】



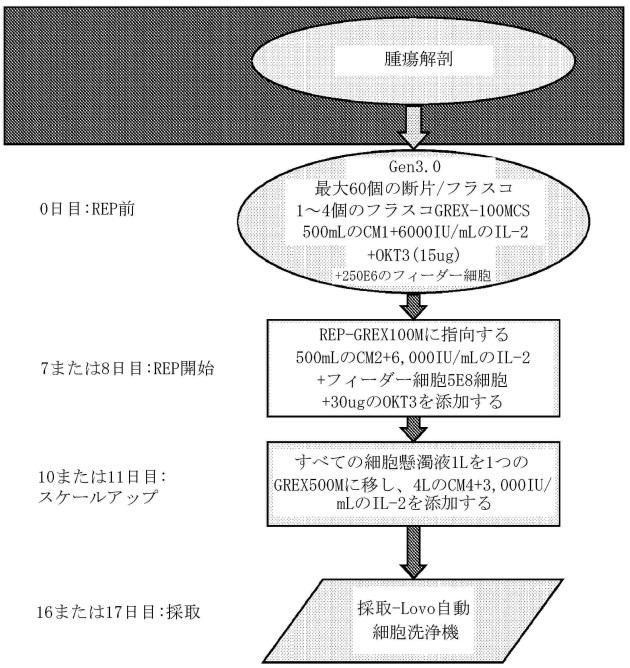
【図１９】



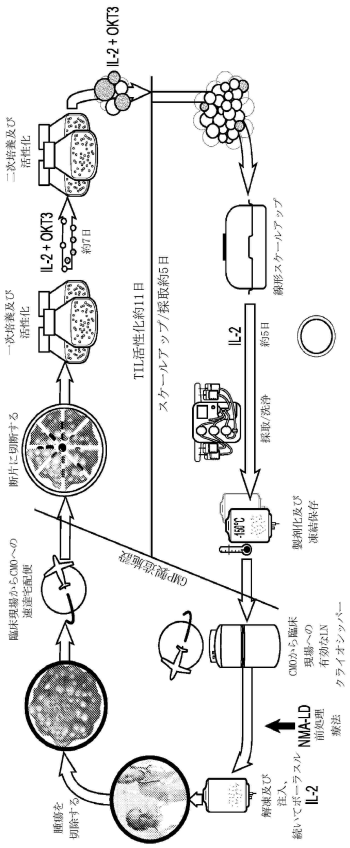
【図２０】



【図２１】



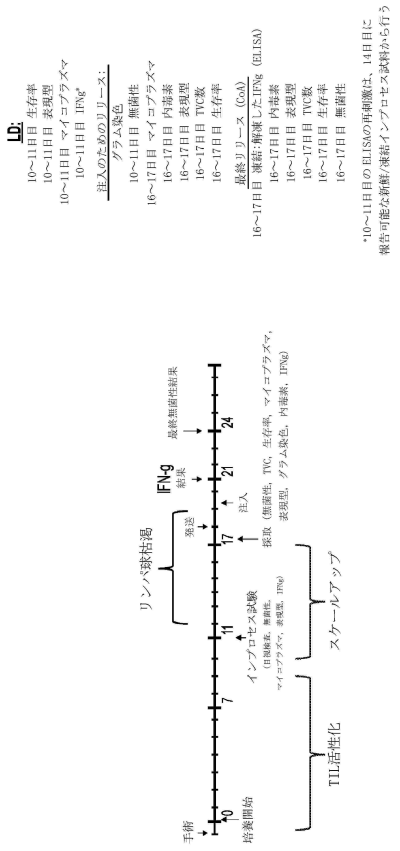
【図２２】



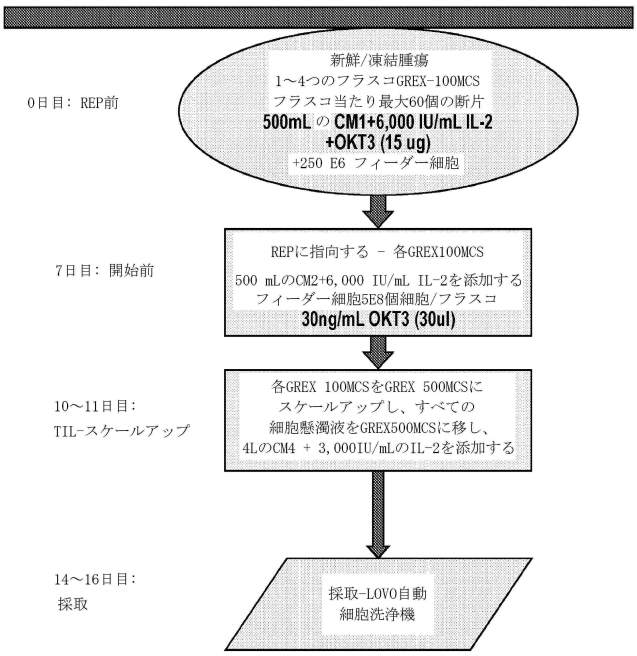
【図２３】

		Gen 2	Gen 3
合計培養時間		22日	16-17日（または16日）
REP前			
断片/フラスコ		1つのフラスコ中の60個以下の断片	最大4つのフラスコ中の≦ 60個の断片
培地体積		IL-2 ± 一単一の追加	IL-2 × 500 mLの追加
標的REP前細胞数		$<200 \times 10^6$ TIL	すべての細胞は連続的な/プロセスを通じて運ばれた
スクリーニング		スクリーニングなし	スクリーニングなし
フラスコの選択		選択なし	Bact-T無菌性，汚染物質の目視検査
REP/スケールアップ			
フィーダー			≥ 40%抵抗
培地		HSABを含有する	合成培地
スケールアップ		プールされた培養物5日目に500mLまで減容し、最大5つのフラスコに分割する（2500 cm^2）	フラスコは梯形にスケーリングされ、サブコンポーネントとして扱われる
OKT3		150 µg	≤ 180 µg
IL-2		高用量	高用量
フラスコの数		1-5	1-4
最終ステップ			
抗凝-減容		閉鎖10:1	閉鎖10:1
濃縮/洗浄		LOVO 100-1	LOVO 1000-1
製剤化条件		1:1 CS10 (5% DMSO)	1:1 CS10 (5% DMSO)
発送条件		気相液体窒素	気相液体窒素
注入		解凍したTV重力	解凍したTV重力

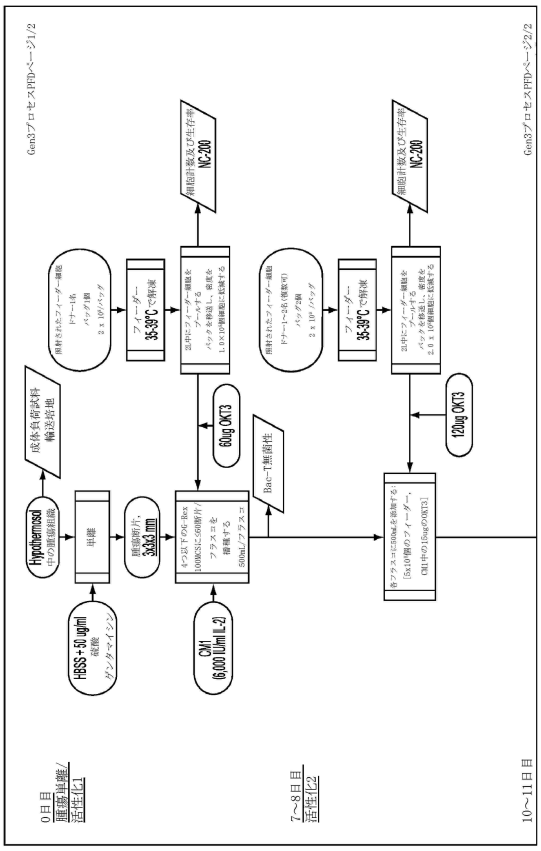
【図２４】



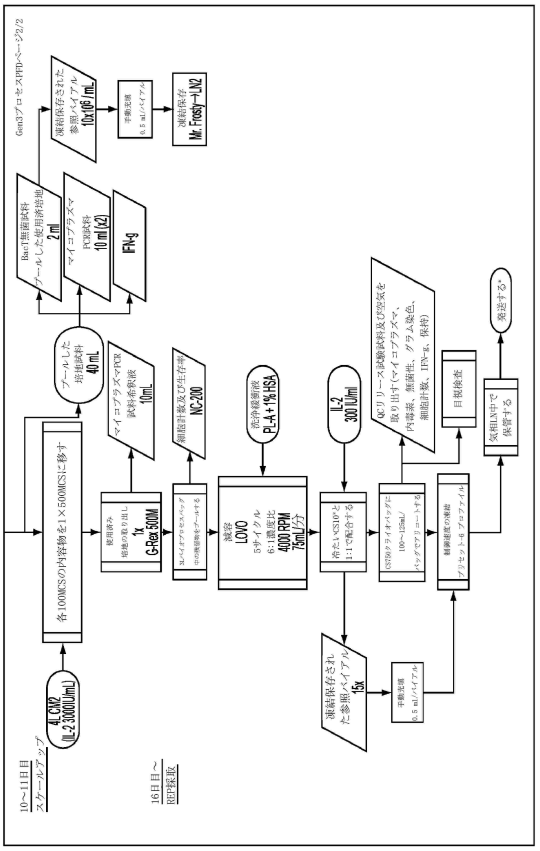
【図２５】



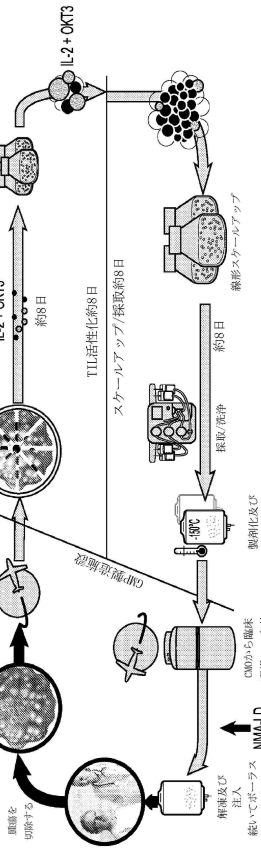
【図２６Ａ】



【図２６Ｂ】



【図２７】



【図２８】

ステップ	Gen 2	Gen 2.1	Gen 3.0
REP前-0日目	50個以下の断片/1つのG-Rex 100MCS-11日	180個以下の断片/3つのG-Rex、事前配合されたCM1加温培地 100MCS-11日	新鮮または凍結腫瘍 1G-Rex当たり30以下の断片から最大60の断片を有する全腫瘍 100MCS(最大4つのG-Rex)、事前に配合された加温培地-7日。 REP前、フィーダー-250e⁸個細胞+ OKT-3（15ug）
REP開始	REPに指向する-11日目-<200e⁸ TIL 1 G-Rex 500MCS	REPに指向する-11日目-<200e⁸ TIL 1つのG-Rex 500MCS中の事前配合されたCM2加温培地	REPに指向-7日目-すべての細胞TIL-同じG-Rex 100MCS(100MCS 最大4つのGREX)、標準培地または合成培地(無血清)、 フィーダー-500e⁸個細胞+OKT-3（30ug）の添加
TILの増殖またはスケールアップ	1～5つのG-REX 500MCS 16日目に分割する	2～5つのG-REX 500MCS 事前配合されたCM4加温培地 16日目に分割する	G-REX100MCSから、TIL懸濁液をG-REX 500MCS最大4つのG-REX500 MCSに移す-標準培地または合成培地(無血清) 10日目または11日目にスケールアップする
採取	22日目に採取する、 LOVO自動細胞洗浄機	22日目に採取する、 LOVO自動細胞洗浄機 (5回の洗浄サイクル)	14日目または16日目に採取する LOVO自動細胞洗浄機（5回の洗浄サイクル）
最終製剤	凍結保存した製品 LN 中の3300IU/mlのIL2-CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品 LN 中の3300IU/mlのIL2-CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品 LN 中の3300IU/mlの IL-2-CS10、複数のアリコート
プロセス時間	22日	22日	16日

【図２９】

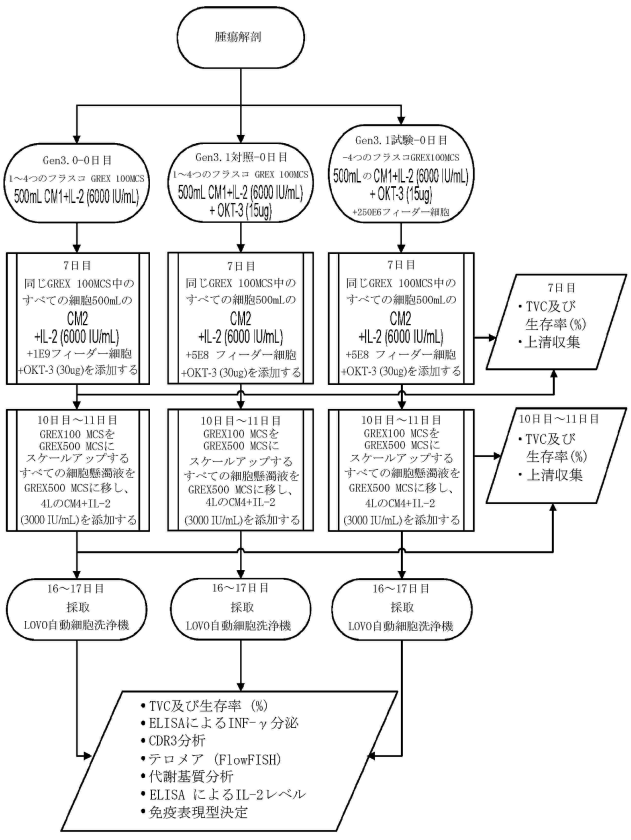
プロセス比較	プロセス変更	差異
Gen 2： Gen 2.1	• 1つのフラスコの代わりに2つのフラスコを用いたプロセスを開始する • 2つのG-Rex500MCSフラスコ間でREP開始のフィーダー層を分割する • 使用前に培地を事前に製剤化し、加温する	• 増加したTILレパートリーを用いた最終細胞計数(用量)の倍加の可能性。 • プロセス中のプロセス冗長性
Gen 2.1： Gen 3.1	• 新鮮または凍結腫瘍 • 14～16日のプロセス(22日から) • プロセス中の全フィーダー層を低減する • 0日目に存在するフィーダー層及びOKT3 • 断片で開始したREP • 100MCSスケールから500MCS • REP前フラスコを複数にスケールアップする • 標準培地及び合成培地(無血清)	• 増加した有効性 • 改善された表現型 • 低下したプロセス時間 • 低減した試薬試験 • 低下したプロセス変動 • 合成された試薬 • 増加したレパートリー • 不純物を低減する(フィーダー) • 同等またはより高い用量。

【図３０】

プロセス	条件	Gen 3.0	Gen 3.1 対照	Gen 3.1 試験
0日目： 腫瘍断片の 単離及び活性化	培地(*)	500 mL	500 mL	500 mL
	IL-2	6000 IU/mL	6000 IU/mL	6000 IU/mL
	OKT-3	-	15 ug	15 ug
	フィーダー	-	-	2.5E+06
プロセス	条件	Gen 3.0	Gen 3.1 対照	Gen 3.1 試験
7～8日目： TIL培養再活性化	培地(*)	500 mL	500 mL	500 mL
	IL-2	6000 IU/mL	6000 IU/mL	6000 IU/mL
	OKT-3	30 ug	30 ug	30 ug
	フィーダー	1 E+09	500 E+06	500E+06
	7日目までに添加されたフィーダーの合計	1 E+09	500 E+06	750E+06
プロセス	条件	Gen 3.0	Gen 3.1 対照	Gen 3.1 試験
10～11日目： 培養スケールアップ	GREX 100から、IL-2(3000 IU/mL)を含む4L培地を含有する1つのGREX 500 に、全TIL懸濁液を移す			
プロセス	条件	Gen 3.0	Gen 3.1 対照	Gen 3.1 試験
16～17日目： 採取/洗浄/製剤化	LOVO自動細胞洗浄機及びCS10による凍結保存。			

(*)培地は、標準培地またはCTS無血清培地であり得る。

【図３１】



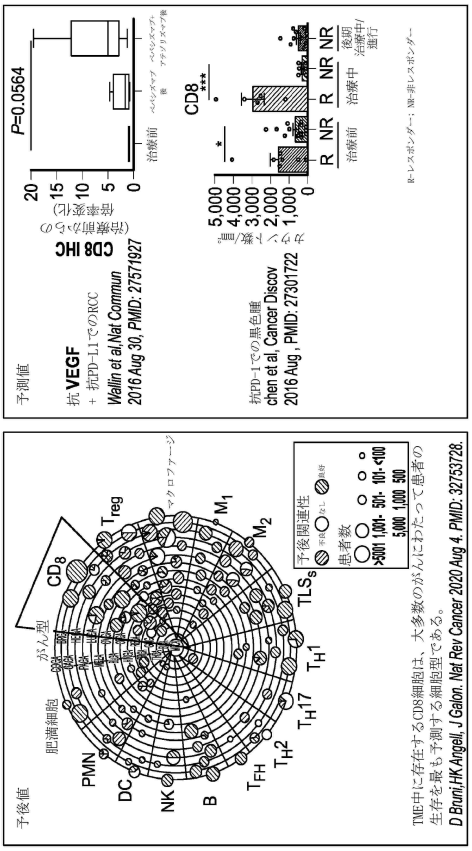
【図３２】

ステップ	Gen 3プロセス-最適化
0日目 腫瘍単離及び活性化	24個以下の断片 60個以下の断片/フラスコ 4つ以下のフラスコ 2L以下の培地(500mL/フラスコ) IL-2 (6000IU/mL) 2.5×10⁸個のフィーダー細胞/フラスコ 15ug OKT3/フラスコ
7～8日目 再活性化	REPに指向した新鮮なTIL 培養物全体を活性化する 5×10⁸個のフィーダー細胞 30 ug OKT3/フラスコ G-Rex 100MCS 500mLの培地+IL-2を添加する(6000IU/mL)
10～11日目 スケールアップ またはTIL 継代培養	4つ以下のG-REX 500MCS 1LをGREX 100MCSからGREX 500MCSに移して培養物全体をスケールアップし、 4Lの培地+IL-2(3000 IU/mL)/フラスコを添加する
16～17日目 採取	採取 LOVO自動細胞洗浄機 Plasmalyte 1% HSAで凍結保存:CS10

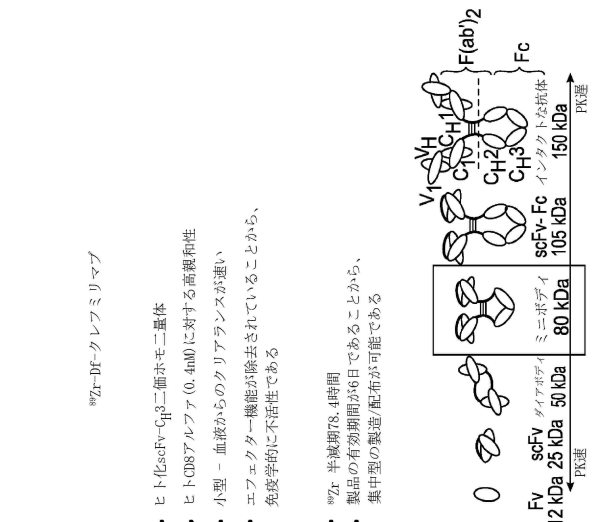
【図３３】

試験	承認基準	Gen 3.1試験対Gen 3.0プロセス
細胞計数(TVC)	Gen 3.1 > 30%対プロセスGen 3.0	Met
生存率(%)	≥70%の生存率	Met
免疫表現型決定 (%CD3+/ %CD45+)	Gen3.1と Gen 3.0プロセスとの 間の差が≤5%	Met
IFNγ分析	Gen 3.1 ≥ 対プロセスGen 3.0	Met

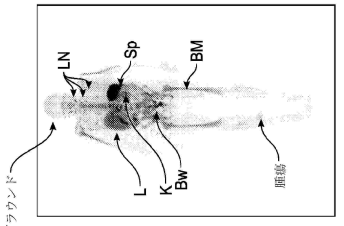
【図３４】



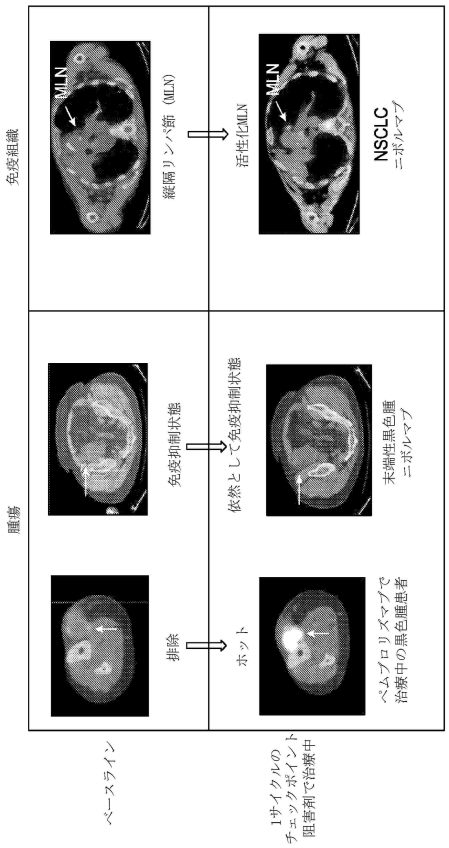
【図３５】



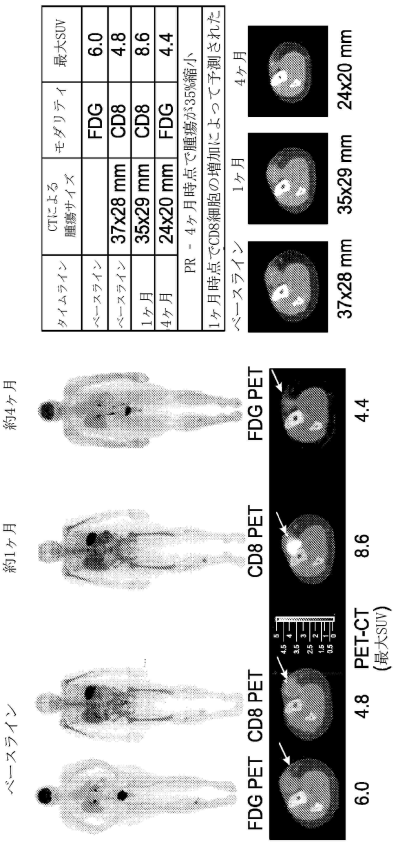
【図３６】



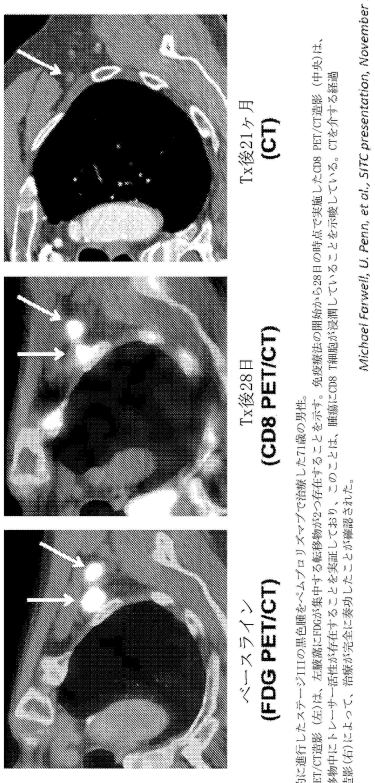
【図３７】



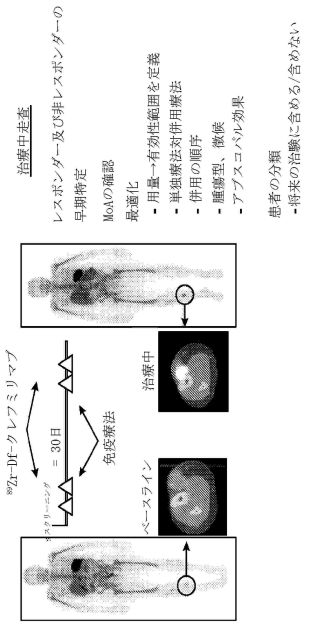
【図３８】



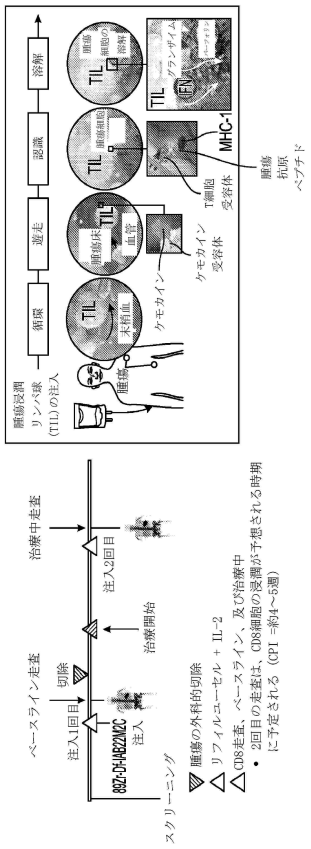
【図３９】



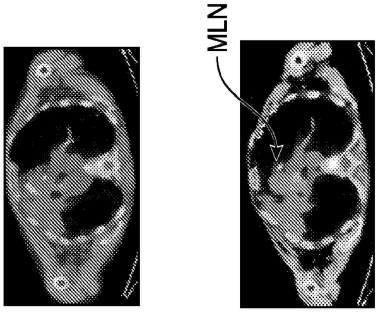
【図４０】



【図４１Ａ】



【図４１Ｂ】



ベースライン走査
- すべての腫瘍の免疫状態の評価
- 外科的切除のための腫瘍の選択

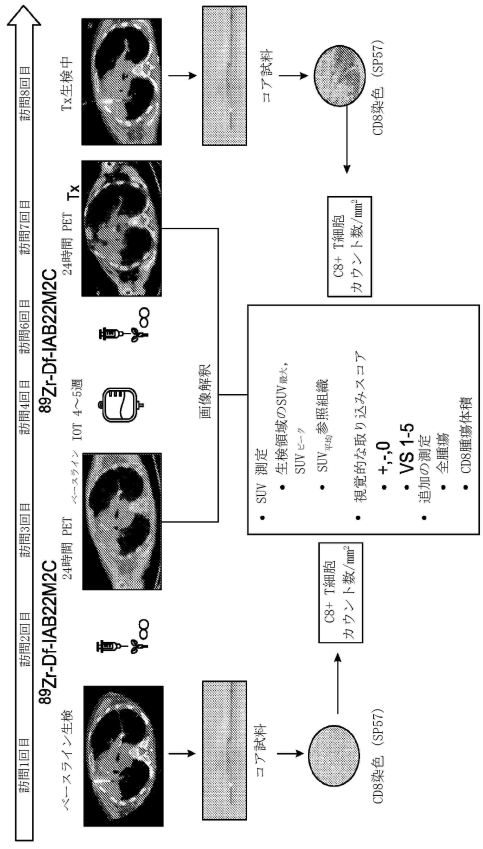
治療中スキャン
- 腫瘍及びリンパ節へのCD8輸送の監視

- コホートの比較
  単独療法
  併用療法
  異なる腫瘍型

- レスポンダーと非レスポンダーでのCD8変化の役割の対比

- 次世代TIL製品

【図４２】



【配列表】
20245448670000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/079519

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/0783 A61K35/17
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 2018/207201 A1 (WARDELL SETH [US] ET AL) 26 July 2018 (2018-07-26) claims; figures; examples	73,74,76 1-72
X	WO 2020/096988 A2 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 14 May 2020 (2020-05-14) cited in the application claims; figures; examples	1-74,76
X Y	WO 2019/100023 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 23 May 2019 (2019-05-23) claims; figures; examples	73,74,76 1-72

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
7 March 2023	20/03/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Armandola, Elena

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/079519

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☐ forming part of the international application as filed.

   b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/079519

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Krishna Sri ET AL: "Stem-like CD8 T cells mediate response of adoptive cell immunotherapy against human cancer", Science (American Association for the Advancement of Science), 11 December 2020 (2020-12-11), pages 1328-1334, XP055856073, United States DOI: 10.1126/science.abb9847 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8883579/ [retrieved on 2021-10-28] materials and methods; figures -----	1-18, 26-72
Y	PU XINGXIANG ET AL: "Patient-derived tumor immune microenvironments in patient-derived xenografts of lung cancer", JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 16, no. 1, 26 November 2018 (2018-11-26), XP093029328, DOI: 10.1186/s12967-018-1704-3 Retrieved from the Internet: URL:http://link.springer.com/content/pdf/10.1186/s12967-018-1704-3.pdf> Materials and methods -----	1-18, 26-72
Y	NAGLE VERONICA L. ET AL: "Imaging Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Brain Tumors with [64Cu]Cu-NOTA-anti-CD8 PET", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 27, no. 7, 25 January 2021 (2021-01-25), pages 1958-1966, XP093029583, US ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3243 Retrieved from the Internet: URL:https://aacrjournals.org/clincancerres/article-pdf/27/7/1958/3089188/1958.pdf> materials and methods; figures -----	1-72
	-/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/079519

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	R. TAVARE ET AL: "An Effective Immuno-PET Imaging Method to Monitor CD8-Dependent Responses to Immunotherapy", CANCER RESEARCH, vol. 76, no. 1, 16 November 2015 (2015-11-16), pages 73-82, XP055514277, US ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1707 Materials and methods; figures -----	1-72

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/079519

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2018207201 A1	26-07-2018	AU 2018243355 A1	31-10-2019
		BR 112019020326 A2	28-04-2020
		CA 3057975 A1	04-10-2018
		CL 2019002769 A1	08-05-2020
		CL 2020002737 A1	05-03-2021
		CN 110785486 A	11-02-2020
		CO 2019011995 A2	18-02-2020
		CR 20190487 A	17-03-2020
		DK 3601533 T3	03-05-2021
		EC SP19077884 A	31-01-2020
		EP 3601533 A1	05-02-2020
		EP 3722415 A1	14-10-2020
		EP 3730608 A1	28-10-2020
		EP 3766964 A1	20-01-2021
		EP 3910055 A1	17-11-2021
		ES 2874335 T3	04-11-2021
		HR P20210677 T1	25-06-2021
		HU E054829 T2	28-10-2021
		IL 269543 A	28-11-2019
		JP 7169291 B2	10-11-2022
		JP 2020515257 A	28-05-2020
		JP 2021519582 A	12-08-2021
		JP 2023011778 A	24-01-2023
		JP 2023012510 A	25-01-2023
		JP 2023012511 A	25-01-2023
		KR 20190142342 A	26-12-2019
		LT 3601533 T	10-06-2021
		MD 3601533 T2	31-07-2021
		PE 20191841 A1	31-12-2019
		PH 12019502247 A1	29-06-2020
		PL 3601533 T3	16-08-2021
		PT 3601533 T	24-05-2021
		RS 61863 B1	30-06-2021
		SG 11201908994R A	30-10-2019
		SI 3601533 T1	30-09-2021
		TN 2019000273 A1	07-01-2021
		TW 201839129 A	01-11-2018
		US 11202803 B1	21-12-2021
		US 11517592 B1	06-12-2022
		US 11529372 B1	20-12-2022
		US 2018207201 A1	26-07-2018
		US 2018280436 A1	04-10-2018
		US 2018282694 A1	04-10-2018
		US 2018325954 A1	15-11-2018
		US 2019000882 A1	03-01-2019
		US 2019000883 A1	03-01-2019
		US 2019070222 A1	07-03-2019
		US 2019083536 A1	21-03-2019
		US 2019083538 A1	21-03-2019
		US 2019083539 A1	21-03-2019
		US 2019358259 A1	28-11-2019
		US 2019358260 A1	28-11-2019
		US 2019358261 A1	28-11-2019
		US 2020155601 A1	21-05-2020
		US 2020246384 A1	06-08-2020
		US 2020276241 A1	03-09-2020
		US 2020276242 A1	03-09-2020
		US 2020281978 A1	10-09-2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/079519

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2020289569 A1	17-09-2020
		US 2020306306 A1	01-10-2020
		US 2020306307 A1	01-10-2020
		US 2021079348 A1	18-03-2021
		US 2021100842 A1	08-04-2021
		US 2021100843 A1	08-04-2021
		US 2021106625 A1	15-04-2021
		US 2021128620 A1	06-05-2021
		US 2021128621 A1	06-05-2021
		US 2021128622 A1	06-05-2021
		US 2021128623 A1	06-05-2021
		US 2021128624 A1	06-05-2021
		US 2021128625 A1	06-05-2021
		US 2021137984 A1	13-05-2021
		US 2021207091 A1	08-07-2021
		US 2021207092 A1	08-07-2021
		US 2021214685 A1	15-07-2021
		US 2021353677 A1	18-11-2021
		US 2021361712 A1	25-11-2021
		US 2021361713 A1	25-11-2021
		US 2021379111 A1	09-12-2021
		US 2022000923 A1	06-01-2022
		US 2022000924 A1	06-01-2022
		US 2022000925 A1	06-01-2022
		US 2022008469 A1	13-01-2022
		US 2022362301 A1	17-11-2022
		US 2022387494 A1	08-12-2022
		US 2022387495 A1	08-12-2022
		US 2022387496 A1	08-12-2022
		US 2022387497 A1	08-12-2022
		US 2022387498 A1	08-12-2022
		US 2022395533 A1	15-12-2022
		US 2023012086 A1	12-01-2023
		US 2023015649 A1	19-01-2023
		US 2023045899 A1	16-02-2023
		WO 2018182817 A1	04-10-2018
WO 2020096988 A2	14-05-2020	AU 2019374761 A1	10-06-2021
		CA 3118624 A1	14-05-2020
		CL 2021001178 A1	21-01-2022
		CN 113272421 A	17-08-2021
		CO 2021007362 A2	30-08-2021
		CR 20210295 A	09-07-2021
		EP 3877513 A2	15-09-2021
		IL 282919 A	30-06-2021
		JP 2022506586 A	17-01-2022
		KR 20210091213 A	21-07-2021
		PE 20211292 A1	20-07-2021
		PH 12021551033 A1	14-02-2022
		SG 11202104615V A	29-06-2021
		TW 202039830 A	01-11-2020
		US 2022090018 A1	24-03-2022
		WO 2020096988 A2	14-05-2020
WO 2019100023 A1	23-05-2019	AU 2018368786 A1	18-06-2020
		BR 112020009663 A2	10-11-2020
		CA 3082484 A1	23-05-2019
		CN 111601883 A	28-08-2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/079519

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CR 20200251 A	17-07-2020
		EP 3710576 A1	23-09-2020
		IL 274584 A	30-06-2020
		JP 2021503281 A	12-02-2021
		KR 20200100060 A	25-08-2020
		PH 12020550642 A1	22-03-2021
		SG 11202004457X A	29-06-2020
		TW 201932594 A	16-08-2019
		US 2020277573 A1	03-09-2020
		US 2021309968 A1	07-10-2021
		WO 2019100023 A1	23-05-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*31/7076(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7076		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｋ	*38/20 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/20		
Ｃ１２Ｎ	*5/0783(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0783	ＺＮＡ	
Ｃ０７Ｋ	*16/28 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/28		

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ドリヒ グラフ フィンク

アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０７０ サン カルロス ドーバー コート １９

Ｆターム（参考） 4B065 AA90X AC20 BA30 BB19 BB40 BD39 BD50 CA44
4C084 AA02 BA44 DA14 MA02 MA66 NA05 ZB261 ZB262 ZC751
4C085 HH03 KA29 KB02 KB82 LL18
4C086 AA01 AA02 DA35 EA18 MA02 MA04 NA05 ZB26 ZC75
4C087 AA01 AA02 BB43 MA02 MA66 NA05 NA14 ZB26 ZC75
4H045 AA11 AA30 BA71 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74 GA26