202208617

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202208617 A

(43)公開日： 中華民國 111 (2022) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：110116078 (22)申請日： 中華民國 110 (2021) 年 05 月 04 日

(51)Int. Cl.： *C12N5/0783 (2010.01)* *A61K35/17 (2015.01)*
A61K38/20 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2020/05/04 美國 63/019,917
2020/05/12 美國 63/023,666
2021/02/05 美國 63/146,405
2021/03/17 美國 63/162,441

(71)申請人：美商艾歐凡斯生物治療公司 (美國) IOVANCE BIOTHERAPEUTICS, INC. (US)
美國

(72)發明人：沃錐 賽斯 WARDELL, SETH (US)；莫雷諾 馬里察 MORENO, MARITZA LIENLAF (CL)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：426 項 圖式數：28 共 1081 頁

(54)名稱

用於產生腫瘤浸潤性淋巴球的過程及其在免疫療法中的用途

(57)摘要

本發明提供用於擴增 TIL 及產生治療性 TIL 群體的改良及/或縮短方法，其包含用於在密閉系統中擴增 TIL 群體的新穎方法，該方法在允許降低微生物污染以及減少成本之同時在較短時段內使得 TIL 之功效改良、表型改良且代謝健康增強。此類 TIL 可用於治療性治療方案中。

The present invention provides improved and/or shortened methods for expanding TILs and producing therapeutic populations of TILs, including novel methods for expanding TIL populations in a closed system that lead to improved efficacy, improved phenotype, and increased metabolic health of the TILs in a shorter time period, while allowing for reduced microbial contamination as well as decreased costs. Such TILs find use in therapeutic treatment regimens.

指定代表圖：

步驟	Gen 2	Gen 2.1	Gen 3.0
預REP - 第0天	≤50個碎片/1個G-Rex 100MCS – 11天	≤180個碎片/3個G-Rex， 預先調配之CM1溫熱培養基 100MCS – 11天	新鮮或冷凍腫瘤 全腫瘤，≤30個碎片， 至多60個碎片/1個G-Rex。 100MCS（至多4個G-Rex）， 預先調配之溫熱培養基 - 7天，預REP， 飼養細胞2.5 E8個細胞+ OKT-3（30ng/mL）
REP起始	直接進行REP – 第11天- <200 E6個TIL 1 G-Rex 500MCS	直接進行REP – 第11天- <200 E6個TIL 預先調配之CM2溫熱培養基於 一個G-Rex 500MCS中	直接進行REP – 第7天 – 所有細胞TIL – 同一 G-Rex 100MCS（100MCS至多4個GREX）， 標準培養基或確定培養基（無血清）。 添加飼養細胞5 E8個細胞+OKT-3（30ng/mL）
TIL增殖或規模縱向擴大	1至5個G-REX 500MCS 分瓶第16天	2至5個G-REX 500MCS 預先調配之CM4溫熱培養基 分瓶第16天	自G-REX 100MCS將TIL懸浮液轉移至G-REX 500 MCS，至多4個GREX 500 MCS - 標準培養基 或確定培養基（無血清） 在第10天或第11天規模縱向擴大
收集	收集第22天， LOVO-自動化細胞洗滌器	收集第22天， LOVO-自動化細胞洗滌器 （5個洗滌循環）	收集第14天或第16天 LOVO-自動化細胞洗滌器（5個洗滌循環）
最終調配物	冷凍保存產物 300IU/ml IL2- CS10於LN_2中， 多個等分試樣	冷凍保存產物 300IU/ml IL2- CS10於LN_2中， 多個等分試樣	冷凍保存產物 300IU/ml IL2- CS10於LN_2中， 多個等分試樣
處理時間	22天	22天	16天

【圖 4】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於產生腫瘤浸潤性淋巴球的過程及其在免疫療法中的用途

【英文發明名稱】

PROCESSES FOR PRODUCTION OF TUMOR INFILTRATING LYMPHOCYTES AND USES OF THE SAME IN IMMUNOTHERAPY

【中文】

本發明提供用於擴增TIL及產生治療性TIL群體的改良及/或縮短方法，其包含用於在密閉系統中擴增TIL群體的新穎方法，該方法在允許降低微生物污染以及減少成本之同時在較短時段內使得TIL之功效改良、表型改良且代謝健康增強。此類TIL可用於治療性治療方案中。

【英文】

The present invention provides improved and/or shortened methods for expanding TILs and producing therapeutic populations of TILs, including novel methods for expanding TIL populations in a closed system that lead to improved efficacy, improved phenotype, and increased metabolic health of the TILs in a shorter time period, while allowing for reduced microbial contamination as well as decreased costs. Such TILs find use in therapeutic treatment regimens.

【指定代表圖】圖4

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於產生腫瘤浸潤性淋巴球的過程及其在免疫療法中的用途

【英文發明名稱】

PROCESSES FOR PRODUCTION OF TUMOR INFILTRATING LYMPHOCYTES AND USES OF THE SAME IN IMMUNOTHERAPY

【技術領域】

相關申請案之交叉引用

【0001】本申請案主張2020年5月4日申請之美國臨時專利申請案第63/019,917號、2020年5月12日申請之美國臨時專利申請案第63/023,666號、2021年2月5日申請之美國臨時專利申請案第63/146,405號及2021年3月17日申請之美國臨時專利申請案第63/162,441號的優先權，該等申請案之揭示內容出於所有目的特此以全文引用之方式併入。

【先前技術】

【0002】使用過繼性轉移腫瘤浸潤性淋巴球(tumor infiltrating lymphocyte；TIL)治療大型(bulky)、難治性癌症表示對於不良預後患者的一種強大的治療方案。Gattinoni等人，《自然免疫學評論(*Nat. Rev. Immunol.*)》**2006,** *6,* 383-393。成功免疫療法需要大量TIL，且商業化需要強健且可靠

的製程。由於細胞擴增之技術、邏輯及法規問題，要達成此是一項挑戰。基於IL-2之TIL擴增及隨後的「快速擴增過程」(REP)已因其速度及效率而成為TIL擴增之較佳方法。Dudley等人，《科學(Science)》**2002**，298, 850-54；Dudley等人，《臨床腫瘤學雜誌(*J. Clin. Oncol.*)》**2005,** *23,* 2346-57；Dudley等人，《臨床腫瘤學雜誌》**2008**, *26,* 5233-39；Riddell等人，《科學》**1992,** *257,* 238-41；Dudley等人，《免疫療法雜誌(*J. Immunother.*)》**2003**, *26,* 332-42。REP可在14天期間導致1,000倍的TIL擴增，儘管其需要大量過量(例如200倍)的經照射的通常來自多個供體之同種異體周邊血液單核細胞(PBMC，亦稱為單核細胞(MNC))作為飼養細胞，還需要抗CD3抗體(OKT3)及高劑量之IL-2。Dudley等人，《免疫療法雜誌》**2003,** *26,* 332-42。已經歷REP程序之TIL已在宿主免疫抑制後的黑色素瘤患者中產生成功的過繼細胞療法。目前的輸注接受性參數依賴於TIL之組成的讀數(例如CD28、CD8或CD4陽性率)及REP產物之擴增倍數及存活率。

【0003】當前的TIL製造過程受限於長度、成本、無菌性考量及本文所描述之其他因素。迫切需要提供TIL製造過程及基於此類過程之療法，其特徵在於在製造中改良之成本效益及可擴展性，以及針對在多個臨床中心治療人類患者所產生之TIL製劑的更強抗癌表型。本發明藉由提供一種新穎的TIL擴增過程來滿足這一需求，該過程包含來自擴增起始之抗原呈現飼養細胞，以便引發TIL用於擴

增，而不包含傳統的預REP擴增步驟，因此允許擴增過程之總體時間顯著減少。

【發明內容】

【0004】本發明提供用於擴增TIL及產生治療性TIL群體的改良及/或縮短方法。

【0005】本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包括：

(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得及/或接受來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)藉由在包括第一細胞培養基、IL-2及以下中任一者之第一TIL細胞培養物中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增：

i)獲自抗原呈現飼養細胞(APC)之第一培養物之第一培養物上清液，其中該第一培養物上清液包括OKT-3，或

ii)APC及OKT-3，

其中藉由在包括第一透氣表面區域之第一容器中培養該第一TIL細胞培養物持續約1天至7天或8天之第一時段來進行該初始第一擴增，以獲得第二TIL群體，且其中該第二TIL群體於數目上大於該第一TIL群體；

(c)藉由用另外的第一細胞培養基、IL-2及以下中任一者補充第一TIL細胞培養物來進行快速第二擴增：

i)獲自APC之第二培養物之第二培養物上清液，其中該第二培養物上清液包括OKT-3，或

ii)APC及OKT-3；

以形成第二TIL細胞培養物，其中藉由培養第二TIL細胞培養物持續約1天至11天之第二時段來進行快速第二擴增，以獲得第三TIL群體，且其中該第三TIL群體為治療性TIL群體；其中第一TIL細胞培養物不包括第一培養物上清液及APC兩者；其中第二TIL細胞培養物不包括第二培養物上清液及補充APC兩者；且其中第一TIL細胞培養物不包括APC及/或第二TIL細胞培養物不包括補充APC；

(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體；及

(e)將來自步驟(d)之經收集之TIL群體轉移至輸注袋。

【0006】在方法的一些實施例中，在步驟(b)之初始第一擴增中，第一TIL細胞培養物包括第一培養物上清液，且其中在步驟(c)之快速第二擴增中，用OKT-3及APC補充第一TIL細胞培養物以形成第二TIL細胞培養物。

【0007】在方法的一些實施例中，在步驟(b)之初始第一擴增中，第一TIL細胞培養物包括OKT-3及APC，且其中在步驟(c)之快速第二擴增中，用第二培養物上清液補充第一TIL細胞培養物以形成第二TIL細胞培養物。

【0008】在方法的一些實施例中，在步驟(b)之初始第一擴增中，第一TIL細胞培養物包括第一培養物上清液，且其中在步驟(c)之快速第二擴增中，用第二培養物上清液補充第一TIL細胞培養物以形成第二TIL細胞培養物。

【0009】在方法的一些實施例中，獲得用於步驟(b)中之第一培養物上清液包括：

1)提供包括IL-2及OKT-3之APC細胞培養基；

2)在來自1)之APC細胞培養基中培養至少約5×10^8個APC持續約3天至4天，以產生第一培養物上清液；及

3)自2)中的細胞培養物收集第一培養物上清液。

【0010】在方法的一些實施例中，獲得用於步驟(c)中之第二培養物上清液包括：

1)提供包括IL-2及OKT-3之APC細胞培養基；

2)在來自1)的APC細胞培養基中培養至少約1×10^7個APC持續約3天至4天，以產生第二培養物上清液；及

3)自2)中的細胞培養物收集第二培養物上清液。

【0011】在方法的一些實施例中，步驟(c)之快速第二擴增進一步包括以下步驟：

i) 在步驟(c)中第二時段開始之後約3天或4天，用另外的IL-2補充第二TIL細胞培養物。

【0012】在方法的一些實施例中，APC對於個體為外源性的。

【0013】在方法的一些實施例中，APC為周邊血液單核細胞(PBMC)。

【0014】在方法的一些實施例中，步驟(c)之快速第二擴增進一步包括以下步驟：

i)在第二時段開始之後剛好或大約3天或4天，將第二TIL細胞培養物自第一容器轉移至複數個第二容器中，以在複數個第二容器中之每一者中形成第二TIL細胞培養物的繼代培養物；及

ii)在第二時段之剩餘時間中，在複數個第二容器中之

每一者中培養第二TIL細胞培養物之繼代培養物。

【0015】在方法的一些實施例中，在步驟i)中，將等體積之第二TIL細胞培養物轉移至複數個第二容器中。

【0016】在方法的一些實施例中，各第二容器的大小與第一容器相等。

【0017】在方法的一些實施例中，各第二容器比第一容器大。

【0018】在方法的一些實施例中，第二容器的大小相等。

【0019】在方法的一些實施例中，第二容器比第一容器大。

【0020】在方法的一些實施例中，第二容器比第一容器小。

【0021】在方法的一些實施例中，第一容器為G-Rex 100培養瓶。

【0022】在方法的一些實施例中，第一容器為G-Rex 100培養瓶且複數個第二容器中之每一者為G-Rex 100培養瓶。

【0023】在方法的一些實施例中，複數個第二容器係選自由以下組成之群組：2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19及20個第二容器。

【0024】在方法的一些實施例中，複數個第二容器為5個第二容器。

【0025】在方法的一些實施例中，在步驟ii)之前，該

方法進一步包括用另外的IL-2補充第二TIL細胞培養物之各繼代培養物。

【0026】在方法的一些實施例中，在步驟ii)之前，該方法進一步包括用第二細胞培養基及IL-2補充第二TIL細胞培養物之各繼代培養物。

【0027】在方法的一些實施例中，第一細胞培養基與第二細胞培養基相同。

【0028】在方法的一些實施例中，第一細胞培養基與第二細胞培養基不同。

【0029】在方法的一些實施例中，第一細胞培養基為DM1且第二細胞培養基為DM2。

【0030】本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包括：

(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得及/或接受來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)藉由在包括IL-2、視情況選用之OKT-3及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)及/或包括OKT-3的來自APC之第一培養物之培養物上清液的細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中在包括第一透氣表面區域之容器中進行該初始第一擴增，其中該初始第一擴增進行約1天至7天/8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體於數目上大於第一TIL群體；

(c)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及抗原呈

現細胞(APC)及/或包括OKT-3的來自APC之第二培養物之培養物上清液補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中在快速第二擴增中添加之APC的數目為步驟(b)中添加之APC的數目的至少兩倍，其中快速第二擴增進行約1天至11天之第二時段以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體，其中在包括第二透氣表面區域之容器中進行快速第二擴增；

(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體；及

(e)將來自步驟(d)之經收集之TIL群體轉移至輸注袋。

【0031】本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包括：

(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得及/或接受來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)藉由在包括IL-2、視情況選用之OKT-3且視情況包括抗原呈現細胞(APC)及/或包括OKT-3的來自APC之第一培養物之培養物上清液的細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中初始第一擴增進行約1天至7天/8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體於數目上大於第一TIL群體；

(c)藉由使第二TIL群體與包括IL-2、視情況選用之OKT-3及抗原呈現細胞(APC)及/或包括OKT-3的來自APC之第二培養物之培養物上清液的細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中快速第二擴增

進行約1天至11天之第二時段以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及

(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體。

【0032】在一些實施例中，「獲得」指示在方法及/或過程中採用的TIL可作為方法及/或過程步驟之部分而直接來源於樣本(包含來源於手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或其他樣本)。在一些實施例中，「接受」指示方法及/或過程中採用的TIL可間接來源於樣本(包含來源於手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或其他樣本)且隨後用於方法及/或過程中(例如，在步驟(a)開始時，TIL將藉由不包含於部分(a)中的獨立過程而來源於樣本，此類TIL可稱為「經接受」)。

【0033】在方法的一些實施例中，在步驟(b)中，細胞培養基進一步包括抗原呈現細胞(APC)，且其中步驟(c)中的培養基中之APC之數目大於步驟(b)中的培養基中之APC之數目。

【0034】本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包括：

(a)藉由在包括IL-2、視情況選用之OKT-3及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)及/或包括OKT-3的來自APC之第一培養物之培養物上清液的細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，該第一TIL群體可藉由將來自個體所切除之腫瘤的腫瘤樣本處理

成多個腫瘤碎片而獲得，其中在包括第一透氣表面區域之容器中進行初始第一擴增，其中初始第一擴增進行約1天至7天/8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體於數目上大於第一TIL群體；

(b)藉由使第二TIL群體與含另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及抗原呈現細胞(APC)及/或包括OKT-3的來自APC之第二培養物之培養物上清液的第二TIL群體之細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中在快速第二擴增中APC的數目為步驟(a)中APC的數目的至少兩倍，其中快速第二擴增進行約1天至11天之第二時段以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體，其中在包括第二透氣表面區域之容器中進行快速第二擴增；及

(c)收集獲自步驟(b)之治療性TIL群體。

【0035】本發明亦提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包括：

(a)藉由在包括IL-2、視情況選用之OKT-3且視情況包括抗原呈現細胞(APC)及/或包括OKT-3的來自APC之第一培養物之培養物上清液的細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中初始第一擴增進行約1天至7天/8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體於數目上大於第一TIL群體；

(b)藉由使第二TIL群體與包括IL-2、視情況選用之OKT-3及抗原呈現細胞(APC)及/或包括OKT-3的來自APC

之第二培養物之培養物上清液的細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中快速第二擴增進行約1天至11天之第二時段以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及

(c)收集獲自步驟(b)之治療性TIL群體。

【0036】在方法的一些實施例中，在步驟(a)中，細胞培養基進一步包括抗原呈現細胞(APC)，且其中步驟(c)中的培養基中之APC之數目大於步驟(b)中的培養基中之APC之數目。

【0037】在一些實施例中，快速第二擴增中APC之數目與初始第一擴增中APC之數目的比率係選自約1.5:1至約20:1之範圍。

【0038】在一些實施例中，快速第二擴增中APC之數目與初始第一擴增中APC之數目的比率在約1.5:1至約10:1之範圍內。

【0039】在一些實施例中，快速第二擴增中APC之數目與初始第一擴增中APC之數目的比率在約2:1至約5:1之範圍內。

【0040】在一些實施例中，快速第二擴增中APC之數目與初始第一擴增中APC之數目的比率在約2:1至約3:1之範圍內。

【0041】在一些實施例中，快速第二擴增中APC之數目與初始第一擴增中APC之數目的比率為約2:1。

【0042】在一些實施例中，初始第一擴增中APC之數

目係選自約1.0×10^6個APC/cm^2至約4.5×10^6個APC/cm^2的範圍，且其中快速第二擴增中APC之數目係選自約2.5×10^6個APC/cm^2至約7.5×10^6個APC/cm^2的範圍。

【0043】在一些實施例中，初始第一擴增中APC之數目係選自約1.5×10^6個APC/cm^2至約3.5×10^6個APC/cm^2的範圍，且其中快速第二擴增中APC之數目係選自約3.5×10^6個APC/cm^2至約6.0×10^6個APC/cm^2的範圍。

【0044】在一些實施例中，初始第一擴增中APC之數目係選自約2.0×10^6個APC/cm^2至約3.0×10^6個APC/cm^2的範圍，且其中快速第二擴增中APC之數目係選自約4.0×10^6個APC/cm^2至約5.5×10^6個APC/cm^2的範圍。

【0045】在一些實施例中，初始第一擴增中APC之數目係選自約1×10^8個APC至約3.5×10^8個APC之範圍，且其中快速第二擴增中APC之數目係選自約3.5×10^8個APC至約1×10^9個APC之範圍。

【0046】在一些實施例中，初始第一擴增中APC之數目係選自約1.5×10^8個APC至約3×10^8個APC之範圍，且其中快速第二擴增中APC之數目係選自約4×10^8個APC至約7.5×10^8個APC之範圍。

【0047】在一些實施例中，初始第一擴增中APC之數目係選自約2×10^8個APC至約2.5×10^8個APC的範圍，且其中快速第二擴增中APC之數目係選自約4.5×10^8個APC至約5.5×10^8個APC的範圍。

【0048】在一些實施例中，將約2.5×10^8個APC添加至

初始第一擴增且將5×10^8個APC添加至快速第二擴增。

【0049】在一些實施例中，第二TIL群體中TIL之數目與第一TIL群體中TIL之數目的比率為約1.5:1至約100:1。

【0050】在一些實施例中，第二TIL群體中TIL之數目與第一TIL群體中TIL之數目的比率為約50:1。

【0051】在一些實施例中，第二TIL群體中TIL之數目與第一TIL群體中TIL之數目的比率為約25:1。

【0052】在一些實施例中，第二TIL群體中TIL之數目與第一TIL群體中TIL之數目的比率為約20:1。

【0053】在一些實施例中，第二TIL群體中TIL之數目與第一TIL群體中TIL之數目的比率為約10:1。

【0054】在一些實施例中，第二TIL群體在數目上比第一TIL群體大至少50倍。

【0055】在一些實施例中，該方法包括在收集治療性TIL群體的步驟之後進行以下另一步驟：

將經收集之治療性TIL群體轉移至輸注袋。

【0056】在一些實施例中，將多個腫瘤碎片分佈至複數個分開的容器中，在每個分開的容器中，第二TIL群體係獲自初始第一擴增步驟中的第一TIL群體，且第三TIL群體係獲自快速第二擴增步驟中的第二TIL群體，且其中獲自第三TIL群體之治療性TIL群體係自該複數個容器中之每一者中收集且經合併以產生經收集之TIL群體。

【0057】在一些實施例中，複數個分開的容器包括至少兩個分開的容器。

【0058】在一些實施例中，複數個分開的容器包括兩個至二十個分開的容器。

【0059】在一些實施例中，複數個分開的容器包括兩個至十個分開的容器。

【0060】在一些實施例中，複數個分開的容器包括兩個至五個分開的容器。

【0061】在一些實施例中，分開的容器各包括第一透氣表面區域。

【0062】在一些實施例中，多個腫瘤碎片分佈於單一容器中。

【0063】在一些實施例中，單一容器包括第一透氣表面區域。

【0064】在一些實施例中，在初始第一擴增步驟中，細胞培養基包括抗原呈現細胞(APC)，且APC係以約一個細胞層至約三個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【0065】在一些實施例中，在初始第一擴增步驟中，APC係以約1.5個細胞層至約2.5個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【0066】在一些實施例中，在初始第一擴增步驟中，APC係以約2個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【0067】在一些實施例中，在快速第二擴增步驟中，APC係以約3個細胞層至約5個細胞層之厚度層疊至第一透

氣表面區域上。

【0068】在一些實施例中，在快速第二擴增中，APC係以約3.5個細胞層至約4.5個細胞層之厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【0069】在一些實施例中，在快速第二擴增中，APC係以約4個細胞層之厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【0070】在一些實施例中，在初始第一擴增步驟中，初始第一擴增係在包括第一透氣表面區域之第一容器中進行，且在快速第二擴增步驟中，快速第二擴增係在包括第二透氣表面區域之第二容器中進行。

【0071】在一些實施例中，第二容器比第一容器大。

【0072】在一些實施例中，在初始第一擴增步驟中，細胞培養基包括抗原呈現細胞(APC)，且APC係以約一個細胞層至約三個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【0073】在一些實施例中，在初始第一擴增步驟中，APC係以約1.5個細胞層至約2.5個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【0074】在一些實施例中，在初始第一擴增步驟中，APC係以約2個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【0075】在一些實施例中，在快速第二擴增中，APC係以約3個細胞層至約5個細胞層之平均厚度層疊至第二透氣表面區域上。

【0076】在一些實施例中，在快速第二擴增中，APC係以約3.5個細胞層至約4.5個細胞層之平均厚度層疊至第二透氣表面區域上。

【0077】在一些實施例中，在快速第二擴增步驟中，APC係以約4個細胞層之平均厚度層疊至第二透氣表面區域上。

【0078】在一些實施例中，在各容器中對第一TIL群體進行初始第一擴增，在同一容器中對自該第一TIL群體產生之第二TIL群體進行快速第二擴增。

【0079】在一些實施例中，各容器包括第一透氣表面區域。

【0080】在一些實施例中，在初始第一擴增步驟中，細胞培養基包括抗原呈現細胞(APC)，且APC係以約一個細胞層至約三個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【0081】在一些實施例中，在初始第一擴增步驟中，APC係以約1.5個細胞層至約2.5個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【0082】在一些實施例中，在初始第一擴增步驟中，APC係以約2個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【0083】在一些實施例中，在快速第二擴增步驟中，APC係以約3個細胞層至約5個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【0084】在一些實施例中，在快速第二擴增步驟中，APC係以約3.5個細胞層至約4.5個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【0085】在一些實施例中，在快速第二擴增步驟中，APC係以約4個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【0086】在一些實施例中，其中在初始第一擴增步驟中，在各容器中對第一TIL群體進行初始第一擴增，該第一容器包括第一表面區域，該細胞培養基包括抗原呈現細胞(APC)，且APC層疊至第一透氣表面區域上，且其中在初始第一擴增步驟中層疊之APC的平均層數與在快速第二擴增步驟中層疊之APC的平均層數的比率係選自約1:1.1至約1:10之範圍。

【0087】在一些實施例中，在初始第一擴增步驟中層疊之APC的平均層數與在快速第二擴增步驟中層疊之APC的平均層數的比率係選自約1:1.2至約1:8之範圍。

【0088】在一些實施例中，在初始第一擴增步驟中層疊之APC的平均層數與在快速第二擴增步驟中層疊之APC的平均層數的比率係選自約1:1.3至約1:7之範圍。

【0089】在一些實施例中，在初始第一擴增步驟中層疊之APC的平均層數與在快速第二擴增步驟中層疊之APC的平均層數的比率係選自約1:1.4至約1:6之範圍。

【0090】在一些實施例中，在初始第一擴增步驟中層疊之APC的平均層數與在快速第二擴增步驟中層疊之APC

的平均層數的比率係選自約1:1.5至約1:5之範圍。

【0091】在一些實施例中，在初始第一擴增步驟中層疊之APC的平均層數與在快速第二擴增步驟中層疊之APC的平均層數的比率係選自約1:1.6至約1:4之範圍。

【0092】在一些實施例中，在初始第一擴增步驟中層疊之APC的平均層數與在快速第二擴增步驟中層疊之APC的平均層數的比率係選自約1:1.7至約1:3.5之範圍。

【0093】在一些實施例中，在初始第一擴增步驟中層疊之APC的平均層數與在快速第二擴增步驟中層疊之APC的平均層數的比率係選自約1:1.8至約1:3之範圍。

【0094】在一些實施例中，在初始第一擴增步驟中層疊之APC的平均層數與在快速第二擴增步驟中層疊之APC的平均層數的比率係選自約1:1.9至約1:2.5之範圍。

【0095】在一些實施例中，在初始第一擴增步驟中層疊之APC的平均層數與在快速第二擴增步驟中層疊之APC的平均層數的比率為約1:2。

【0096】在一些實施例中，在快速第二擴增步驟中2天至3天之後，用另外的IL-2補充細胞培養基。

【0097】在一些實施例中，該方法進一步包括使用冷凍保存過程冷凍保存在收集治療性TIL群體之步驟中收集之TIL群體。

【0098】在一些實施例中，該方法進一步包括冷凍保存輸注袋之步驟。

【0099】在一些實施例中，使用1:1比率之經收集之

TIL群體與冷凍保存培養基來進行冷凍保存過程。

【0100】在一些實施例中，抗原呈現細胞為周邊血液單核細胞(PBMC)。

【0101】在一些實施例中，PBMC經照射且為同種異體。

【0102】在一些實施例中，在初始第一擴增步驟中，細胞培養基包括周邊血液單核細胞(PBMC)，且其中在初始第一擴增步驟中添加至細胞培養基中之PBMC的總數為約2.5×10^8。

【0103】在一些實施例中，在快速第二擴增步驟中，細胞培養基中之抗原呈現細胞(APC)為周邊血液單核細胞(PBMC)，且其中在快速第二擴增步驟中添加至細胞培養基中之PBMC的總數為約5×10^8。

【0104】在一些實施例中，抗原呈現細胞為人工抗原呈現細胞。

【0105】在一些實施例中，在收集治療性TIL群體之步驟中，收集係使用基於膜之細胞處理系統進行。

【0106】在一些實施例中，在收集治療性TIL群體之步驟中，收集係使用LOVO細胞處理系統進行。

【0107】在一些實施例中，在初始第一擴增步驟中，多個片段包括每容器約60個碎片，其中各碎片之體積為約27 mm^3。

【0108】在一些實施例中，多個碎片包括約30個至約60個碎片，其總體積為約1300 mm^3至約1500 mm^3。

【0109】在一些實施例中，多個碎片包括約50個碎片，其總體積為約1350 mm^3。

【0110】在一些實施例中，多個碎片包括約50個碎片，其總質量為約1公克至約1.5公克。

【0111】在一些實施例中，細胞培養基提供於選自由以下組成之群組的容器中：G容器及Xuri細胞袋。

【0112】在一些實施例中，IL-2濃度為約10,000 IU/mL至約5,000 IU/mL。

【0113】在一些實施例中，IL-2濃度為約6,000 IU/mL。

【0114】在一些實施例中，在將經收集之治療性TIL群體轉移至輸注袋之步驟中，輸注袋為含有HypoThermosol之輸注袋。

【0115】在一些實施例中，冷凍保存培養基包括二甲亞碸(DMSO)。

【0116】在一些實施例中，冷凍保存培養基包括7%至10% DMSO。

【0117】在一些實施例中，初始第一擴增步驟中之第一時段及快速第二擴增步驟中之第二時段各自個別地在5天、6天或7天之時段內進行。

【0118】在一些實施例中，初始第一擴增步驟中之第一時段係在5天、6天或7天之時段內進行。

【0119】在一些實施例中，快速第二擴增步驟中之第二時段係在7天、8天或9天之時段內進行。

【0120】在一些實施例中，初始第一擴增步驟中之第一時段及快速第二擴增步驟中之第二時段各自個別地在7天之時段內進行。

【0121】在一些實施例中，初始第一擴增步驟至收集治療性TIL群體之步驟係在約14天至約16天之時段內進行。

【0122】在一些實施例中，初始第一擴增步驟至收集治療性TIL群體之步驟係在約15天至約16天之時段內進行。

【0123】在一些實施例中，初始第一擴增步驟至收集治療性TIL群體之步驟係在約14天之時段內進行。

【0124】在一些實施例中，初始第一擴增步驟至收集治療性TIL群體之步驟係在約15天之時段內進行。

【0125】在一些實施例中，初始第一擴增步驟至收集治療性TIL群體之步驟係在約16天之時段內進行。

【0126】在一些實施例中，該方法進一步包括使用冷凍保存過程冷凍保存經收集之治療性TIL群體的步驟，其中初始第一擴增步驟至收集治療性TIL群體之步驟及冷凍保存步驟係在16天內或少於16天內進行。

【0127】在一些實施例中，在收集治療性TIL群體之步驟中收集的治療性TIL群體包括足以用於TIL之治療有效劑量的TIL。

【0128】在一些實施例中，足以用於治療有效劑量的TIL之數目為約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}。

【0129】在一些實施例中，快速第二擴增步驟中的第三TIL群體提供增加之功效、增加之干擾素-γ產生及/或增加之多株性。

【0130】在一些實施例中，快速第二擴增步驟中的第三TIL群體相較於藉由長於18天之過程製備的TIL提供至少一倍至五倍或更多倍的干擾素-γ產生。

【0131】在一些實施例中，獲自快速第二擴增步驟中的第三TIL群體之效應T細胞及/或中央記憶T細胞相對於獲自在初始第一擴增步驟中的第二TIL群體之效應T細胞及/或中央記憶T細胞展現增加的CD8及CD28表現。

【0132】在一些實施例中，將來自收集治療性TIL群體之步驟的治療性TIL群體輸注至患者中。

【0133】本發明亦提供一種用於治療患有癌症之個體的方法，該方法包括投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，其包括：

(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得及/或接受來自個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)藉由在包括IL-2、視情況選用之OKT-3及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)及/或包括OKT-3的來自APC之第一培養物之培養物上清液的細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中初始第一擴增係在包括第一透氣表面區域之容器中進行，其中初始第一擴增進行約1天至7天/8天以獲得第二TIL群體；

(c)藉由用另外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)及/或包括OKT-3的來自APC之第二培養物的培養物上清液補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中添加至快速第二擴增之APC的數目為步驟(b)中添加之APC的數目的至少兩倍，其中快速第二擴增進行約1天至11天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體，其中在包括第二透氣表面區域之容器中進行快速第二擴增；

(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體；

(e)將來自步驟(d)之經收集之TIL群體轉移至輸注袋；及

(f)向個體投予治療有效劑量之來自步驟(e)之TIL。

【0134】在一些實施例中，足以用於投予步驟(f)中之治療有效劑量的TIL之數目為約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}。

【0135】在一些實施例中，抗原呈現細胞(APC)為PBMC。

【0136】在一些實施例中，在步驟(f)中投予治療有效劑量之TIL細胞之前，已向患者投予非骨髓清除式淋巴球耗盡方案。

【0137】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱(fludarabine)五天。

【0138】在一些實施例中，該方法進一步包括包括以

下步驟：始於步驟(f)中向患者投予TIL細胞之後當天，用高劑量IL-2方案治療患者。

【0139】在一些實施例中，高劑量IL-2方案包括每八小時以15分鐘推注靜脈內輸注(bolus intravenous infusion)投予600,000或720,000 IU/kg直至耐受為止。

【0140】在一些實施例中，步驟(b)中之第三TIL群體提供增加之功效、增加之干擾素-γ產生及/或增加之多株性。

【0141】在一些實施例中，步驟(c)中之第三TIL群體相較於藉由長於16天之過程製備之TIL提供至少一倍至五倍或更多倍的干擾素-γ產生。

【0142】在一些實施例中，獲自步驟(c)中之第三TIL群體之效應T細胞及/或中央記憶T細胞相對於獲自步驟(b)中之第二細胞群體之效應T細胞及/或中央記憶T細胞展現增加之CD8及CD28表現。

【0143】在一些實施例中，癌症為實體腫瘤。

【0144】在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。

【0145】在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠

母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【0146】在一些實施例中，癌症為黑色素瘤。

【0147】在一些實施例中，癌症為HNSCC。

【0148】在一些實施例中，癌症為子宮頸癌。

【0149】在一些實施例中，癌症為NSCLC。

【0150】在一些實施例中，癌症為神經膠母細胞瘤(包含GBM)。

【0151】在一些實施例中，癌症為胃腸癌。

【0152】在一些實施例中，癌症為高突變癌症。

【0153】在一些實施例中，癌症為小兒高突變癌症。

【0154】在一些實施例中，容器為密閉容器。

【0155】在一些實施例中，容器為G容器。

【0156】在一些實施例中，容器為GREX-10。

【0157】在一些實施例中，密閉容器包括GREX-100。

【0158】在一些實施例中，密閉容器包括GREX-500。

【0159】本發明亦提供一種藉由如本文所揭示之方法製得的治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體。

【0160】本發明亦提供由患者之腫瘤組織製備的治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中治療性TIL群體提供增加之功效、增加之干擾素-γ產生及/或增加之多株性。

【0161】在一些實施例中，如本文所揭示之治療性TIL群體提供增加之干擾素-γ產生。

【0162】在一些實施例中，如本文所揭示之治療性TIL群體提供增加之多株性。

【0163】在一些實施例中，如本文所揭示之治療性TIL群體提供增加之功效。

【0164】在一些實施例中，如本文所描述之治療性TIL群體相較於藉由長於16天之過程製備之TIL能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【0165】在一些實施例中，如本文所描述之治療性TIL群體相較於藉由長於16天之過程製備之TIL能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。

【0166】在一些實施例中，如本文所描述之治療性TIL群體相較於藉由長於16天之過程製備之TIL能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。

【0167】在一些實施例中，本發明提供一種治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的抗原呈現細胞(APC)之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【0168】在一些實施例中，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的APC之情況下進行之過程製備的TIL，如本文所描述之治療性TIL群體能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。

【0169】在一些實施例中，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的APC之情況下進行之過程製備的TIL，如本文所描述之治療性TIL群體能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。

【0170】在一些實施例中，本發明提供一種治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【0171】在一些實施例中，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，如本文所描述之治療性TIL群體能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。

【0172】在一些實施例中，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，如本文所描述之治療性TIL群體能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。

【0173】在一些實施例中，本發明提供一種治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無添加的抗原呈現細胞(APC)及無添加的OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【0174】在一些實施例中，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無添加的抗原呈現細胞(APC)及無添加的OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，如本文所描述之治療性TIL群體能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。

【0175】在一些實施例中，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無添加的抗原呈現細胞(APC)及無添加的OKT3

之情況下進行之過程製備的TIL，如本文所描述之治療性TIL群體能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。

【0176】本發明亦提供一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其包括如本文所描述之治療性TIL群體及醫藥學上可接受之載劑。

【0177】本發明亦提供一種無菌輸注袋，其包括如本文所描述之TIL組成物。

【0178】本發明亦提供一種如本文所描述之治療性TIL群體的冷凍保存製劑。

【0179】本發明亦提供一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其包括如本文所描述之治療性TIL群體及冷凍保存培養基。

【0180】在一些實施例中，冷凍保存培養基含有DMSO。

【0181】在一些實施例中，冷凍保存培養基含有7-10% DMSO。

【0182】本發明亦提供一種如本文所描述之TIL組成物的冷凍保存製劑。

【0183】在一些實施例中，如本文所描述之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物係用作藥物。

【0184】在一些實施例中，如本文所描述之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物係用於治療癌症。

【0185】在一些實施例中，如本文所描述之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物係用於治療實體腫瘤癌症。

【0186】在一些實施例中，如本文所描述之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物係用於治療選自由以下組成之群組的癌症：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。

【0187】在一些實施例中，如本文所描述之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物係用於治療選自由以下組成之群組的癌症：黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【0188】在一些實施例中，如本文所描述之TIL組成物係用於治療癌症，其中癌症為黑色素瘤。

【0189】在一些實施例中，如本文所描述之TIL組成物係用於治療癌症，其中癌症為HNSCC。

【0190】在一些實施例中，如本文所描述之TIL組成物係用於治療癌症，其中子宮頸癌。

【0191】在一些實施例中，如本文所描述之TIL組成物係用於治療癌症，其中癌症為NSCLC。

【0192】在一些實施例中，如本文所描述之TIL組成物係用於治療癌症，其中癌症為神經膠母細胞瘤(包含GBM)。

【0193】在一些實施例中，如本文所描述之TIL組成物係用於治療癌症，其中癌症為胃腸癌。

【0194】在一些實施例中，如本文所描述之TIL組成物係用於治療癌症，其中癌症為高突變癌症。

【0195】在一些實施例中，如本文所描述之TIL組成物係用於治療癌症，其中癌症為小兒高突變癌症。

【0196】在一些實施例中，本發明提供如本文所描述之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物在治療個體之癌症之方法中的用途，該方法包括向個體投予治療有效劑量之TIL組成物。在一些實施例中，癌症為實體腫瘤。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。在一些實施例中，癌症為黑色素瘤。在一些實施例中，癌症為HNSCC。在一些實施例中，癌症為子宮頸癌。在一些實施例中，癌症為NSCLC。在一些實施例中，癌症為神經膠母細胞瘤(包含GBM)。在一些實施例中，癌症為胃腸癌。在一些實施例中，癌症為高突變癌症。在一些實施例中，癌症為小兒高突變癌症。

【0197】在一些實施例中，如本文所描述之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物係用於治療個體之癌症之方法中，該方法包括向個體投予治療有效劑量之TIL組成物。在一

些實施例中，癌症為實體腫瘤。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【0198】本發明亦提供一種治療個體之癌症的方法，其包括向個體投予治療有效劑量的如本文所描述之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物。

【0199】在一些實施例中，癌症為實體腫瘤。

【0200】在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。

【0201】在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。在一些實施例中，癌症為黑色素瘤。在一些實施例中，癌症為HNSCC。在一些實施例中，癌症為子宮頸癌。在一些實施例中，癌症為NSCLC。在一些實施例中，癌症為神經膠母細胞瘤(包含

GBM)。在一些實施例中，癌症為胃腸癌。在一些實施例中，癌症為高突變癌症。在一些實施例中，癌症為小兒高突變癌症。

【0202】本發明亦提供一種擴增T細胞的方法，其包括：

(a)藉由培養獲自供體之第一T細胞群體以實現生長及起動第一T細胞群體之活化來對第一T細胞群體進行初始第一擴增；

(b)在步驟(a)中起動活化的第一T細胞群體開始衰變之後，藉由培養第一T細胞群體以實現生長及加強第一T細胞群體之活化來進行第一T細胞群體之快速第二擴增以獲得第二T細胞群體；及

(c)收集第二T細胞群體。

【0203】在一些實施例中，步驟(a)之初始第一擴增係在至多7天之時段內進行。

【0204】在一些實施例中，步驟(b)之快速第二擴增係在至多11天之時段內進行。

【0205】在一些實施例中，步驟(b)之快速第二擴增係在至多9天之時段內進行。

【0206】在一些實施例中，步驟(a)之初始第一擴增係在7天之時段內進行且步驟(b)之快速第二擴增係在9天之時段內進行。

【0207】在一些實施例中，步驟(a)之初始第一擴增係在至多8天之時段內進行。

【0208】在一些實施例中，步驟(b)之快速第二擴增係在至多8天之時段內進行。

【0209】在一些實施例中，步驟(a)之初始第一擴增係在8天之時段內進行且步驟(b)之快速第二擴增係在8天之時段內進行。

【0210】在方法的一些實施例中，在步驟(a)中，第一T細胞群體係在包括OKT-3及IL-2的第一培養基中培養。

【0211】在一些實施例中，第一培養基包括OKT-3、IL-2及抗原呈現細胞(APC)。

【0212】在方法之一些實施例中，在步驟(b)中，第一T細胞群體係在包括OKT-3、IL-2及抗原呈現細胞(APC)之第二培養基中培養。

【0213】在方法的一些實施例中，在步驟(a)中，第一T細胞群體係在包括第一透氣表面之容器中於第一培養基中培養，其中第一培養基包括視情況選用之OKT-3、IL-2及視情況選用之第一抗原呈現細胞(APC)群體或包括OKT-3的來自APC之第一培養物之培養物上清液，其中第一APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第一APC群體層疊至第一透氣表面上，其中在步驟(b)中，第一T細胞群體係在容器中於第二培養基中培養，其中第二培養基包括OKT-3、IL-2及第二APC群體或包括OKT-3的來自APC之第二培養物之培養物上清液，其中第二APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第二APC群體層疊至第一透氣表面上，且其中第二APC群體比第一APC群體

大。

【0214】在一些實施例中，第二APC群體中APC之數目與第一APC群體中APC之數目的比率為約2:1。

【0215】在一些實施例中，第一APC群體中APC之數目為約2.5×10^8且第二APC群體中APC之數目為約5×10^8。

【0216】在方法的一些實施例中，在步驟(a)中，第一APC群體係以2個APC層之平均厚度層疊至第一透氣表面上。

【0217】在方法的一些實施例中，在步驟(b)中，第二APC群體係以選自4個至8個APC層之範圍的平均厚度層疊至第一透氣表面上。

【0218】在一些實施例中，在步驟(b)中層疊至第一透氣表面上之APC層的平均數目與在步驟(a)中層疊至第一透氣表面上之APC層的平均數目的比率為2:1。

【0219】在一些實施例中，APC為周邊血液單核細胞(PBMC)。

【0220】在一些實施例中，APC包括PBMC，其中PBMC經照射且對於第一T細胞群體之供體為外源性的。

【0221】在一些實施例中，T細胞為腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)。

【0222】在一些實施例中，T細胞為骨髓浸潤性淋巴球(MIL)。

【0223】在一些實施例中，T細胞為周邊血液淋巴球(PBL)。

【0224】在一些實施例中，細胞培養基為確定培養基及/或無血清培養基。

【0225】在一些實施例中，確定培養基包括(視情況重組之)運鐵蛋白、(視情況重組之)胰島素及(視情況重組之)白蛋白。

【0226】在一些實施例中，無血清或確定培養基包括基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。

【0227】在一些實施例中，基礎細胞培養基包含但不限於CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CTS™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【0228】在一些實施例中，血清補充劑或血清替代物係選自由以下組成之群組：CTS™ OpTmizer T細胞擴增血清補充劑及CTS™免疫細胞血清替代物。

【0229】在一些實施例中，細胞培養基包括一種或多種白蛋白或白蛋白取代物。

【0230】在一些實施例中，細胞培養基包括一種或多種胺基酸。

【0231】在一些實施例中，細胞培養基包括一種或多

種維生素、一種或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物。

【0232】在一些實施例中，細胞培養基包括一種或多種抗氧化劑、一種或多種胰島素或胰島素取代物。

【0233】在一些實施例中，細胞培養基包括一種或多種膠原蛋白前驅物、一種或多種抗生素及一種或多種微量元素。在

【0234】在一些實施例中，細胞培養基包括白蛋白。

【0235】在一些實施例中，細胞培養基包括白蛋白及一種或多種選自由以下組成之群組的成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分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Zr^{4+}之化合物。

【0236】在一些實施例中，細胞培養基進一步包括L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或2-巰基乙醇。

【0237】在一些實施例中，細胞培養基包括以細胞培養基之體積計總濃度(vol%)為約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%之血清替代物。

【0238】在一些實施例中，細胞培養基包括總濃度為細胞培養基總體積之約3%、約5%或約10%的血清替代

物。

【0239】在一些實施例中，細胞培養基進一步包括濃度為約0.1 mM至約10 mM、0.5 mM至約9 mM、1 mM至約8 mM、2 mM至約7 mM、3 mM至約6 mM或4 mM至約5 mM的麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。

【0240】在一些實施例中，細胞培養基進一步包括濃度為約2 mM之麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。

【0241】在一些實施例中，細胞培養基進一步包括濃度為約5 mM至約150 mM、10 mM至約140 mM、15 mM至約130 mM、20 mM至約120 mM、25 mM至約110 mM、30 mM至約100 mM、35 mM至約95 mM、40 mM至約90 mM、45 mM至約85 mM、50 mM至約80 mM、55 mM至約75 mM、60 mM至約70 mM或約65 mM的2-巰基乙醇。

【0242】在一些實施例中，細胞培養基進一步包括濃度為約55 mM之2-巰基乙醇。

【0243】在一些實施例中，細胞培養基包括國際PCT公開案第WO/1998/030679號中所描述之確定培養基。

【0244】在一些實施例中，細胞培養基包括約5至200 mg/L範圍內之甘胺酸、約5至250 mg/L範圍內之L-組胺酸、約5至300 mg/L範圍內之L-異白胺酸、約5至200 mg/L範圍內之L-甲硫胺酸、約5至400 mg/L範圍內之L-苯丙胺酸、約1至1000 mg/L範圍內之L-脯胺酸、約1至45 mg/L範圍內之L-羥基脯胺酸、約1至250 mg/L範圍內之L-絲胺酸、約10至500 mg/L範圍內之L-蘇胺酸、約2至110mg/L範

圍內之L-色胺酸、約3至175 mg/L範圍內之L-酪胺酸、約5至500 mg/L範圍內之L-纈胺酸、約1至20 mg/L範圍內之硫胺素、約1至20 mg/L範圍內之還原麩胱甘肽、約1至200 mg/L範圍內之L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、約1至50 mg/L範圍內之鐵飽和運鐵蛋白、約1至100 mg/L範圍內之胰島素、約0.000001至0.0001 mg/L範圍內之亞硒酸鈉及/或約5000至50,000 mg/L範圍內之白蛋白(例如AlbuMAX® I)。

【0245】在一些實施例中，細胞培養基包括確定培養基中的非微量元素部分成分中之一或多者，其以本文提供之表4中標題「1X培養基中之濃度範圍」欄中列出之濃度範圍存在。

【0246】在一些實施例中，細胞培養基之滲透壓介於約260與350 mOsmol之間。

【0247】在一些實施例中，細胞培養基進一步包括約3.7 g/L或約2.2 g/L碳酸氫鈉。

【0248】在一些實施例中，細胞培養基進一步包括L-麩醯胺酸(最終濃度為約2 mM)、一種或多種抗生素、非必需胺基酸(NEAA；最終濃度為約100 μM)及/或2-巰基乙醇(最終濃度為約100 μM)。

【0249】在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基缺乏β-巰基乙醇(BME或βME；亦稱為2-巰基乙醇，CAS 60-24-2)。

【0250】在一些實施例中，細胞培養基包括CTS OpTmizer T細胞擴增SFM、3% CTS免疫細胞血清替代物、

55 mM BME及視情況選用之麩醯胺酸。

【0251】在一些實施例中，細胞培養基包括補充有CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑(26 mL/L)及3% CTS™免疫細胞SR的CTS™OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基以及2 mM Glutamax，其視情況進一步包括6,000 IU/mL IL-2。

【0252】在一些實施例中，細胞培養基包括補充有CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑(26 mL/L)及3% CTS™免疫細胞SR的CTS™OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、2 mM Glutamax且視情況進一步包括3,000 IU/mL IL-2。

【0253】在一些實施例中，腫瘤樣本為個體之腫瘤的一個或多個小活體組織切片、粗針活體組織切片或針吸活體組織切片。

【0254】本發明亦提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包括：

(i)藉由在包括IL-2之第一細胞培養基中培養獲自個體之腫瘤的一個或多個小活體組織切片、粗針活體組織切片或針吸活體組織切片的腫瘤樣本約3天而自該腫瘤樣本獲得及/或接受第一TIL群體；

(ii)藉由在包括IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中初始第一擴增係在包括第一透氣表面區域之容器中進行，其中初始第一擴增進行約7天或8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中第二TIL

群體於數目上大於第一TIL群體；

(iii)藉由用另外的IL-2、OKT-3及APC補充第二TIL群體的第二細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中在快速第二擴增中添加之APC的數目為步驟(ii)中添加之APC的數目的至少兩倍，其中快速第二擴增進行約11天之第二時段以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體，其中在包括第二透氣表面區域之容器中進行快速第二擴增；

(iv)收集獲自步驟(iii)之治療性TIL群體；及

(v)將來自步驟(iv)之經收集之TIL群體轉移至輸注袋。

【0255】本發明亦提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包括：

(i)藉由在包括IL-2之第一細胞培養基中培養獲自個體之腫瘤的一個或多個小活體組織切片、粗針活體組織切片或針吸活體組織切片的腫瘤樣本約3天而自該腫瘤樣本獲得及/或接受第一TIL群體；

(ii)藉由在包括IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中初始第一擴增進行約7天或8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體於數目上大於第一TIL群體；

(iii)藉由使第二TIL群體與包括IL-2、OKT-3及APC之第三細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中快速第二擴增進行約11天之第二時段以獲

得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及

(iv)收集獲自步驟(iii)之治療性TIL群體。

【0256】在一些實施例中，在第二時段之第5天後，將培養物分成2個或更多個繼代培養物，且各繼代培養物補充有另外量之第三培養基且培養約6天。

【0257】在一些實施例中，在第二時段之第5天後，將培養物分成至多5個繼代培養物。

【0258】在一些實施例中，方法中之所有步驟在約22天內完成。

【0259】本發明亦提供一種擴增T細胞的方法，其包括：

(i)藉由培養來自獲自供體之腫瘤之一個或多個小活體組織切片、粗針活體組織切片或針吸活體組織切片之腫瘤樣本的第一T細胞群體以實現生長及起始第一T細胞群體之活化，進行第一T細胞群體之初始第一擴增；

(ii)在步驟(a)中起動活化的第一T細胞群體開始衰變之後，藉由培養第一T細胞群體以實現生長及加強第一T細胞群體之活化來進行第一T細胞群體之快速第二擴增以獲得第二T細胞群體；及

(iv)收集第二T細胞群體。

【0260】在一些實施例中，腫瘤樣本係自複數個粗針活體組織切片獲得。

【0261】在一些實施例中，複數個粗針活體組織切片係選自由以下組成之群組：2、3、4、5、6、7、8、9及10

個粗針活體組織切片。

【0262】本發明亦提供一種經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其包括：

i)治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，及

ii)確定培養基或無血清培養基，其視情況包括(視情況重組之)運鐵蛋白、(視情況重組之)胰島素及(視情況重組之)白蛋白。

【0263】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基包括(視情況重組之)運鐵蛋白、(視情況重組之)胰島素及(視情況重組之)白蛋白。

【0264】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基包括基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。

【0265】在一些實施例中，基礎細胞培養基包含但不限於CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CTS™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【0266】在一些實施例中，血清補充劑或血清替代物係選自由以下組成之群組：CTS™ OpTmizer T細胞擴增血清補充劑及CTS™免疫細胞血清替代物。

【0267】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基包括一種或多種白蛋白或白蛋白取代物。

【0268】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基包括一種或多種胺基酸。

【0269】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基包括一種或多種維生素、一種或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物。

【0270】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基包括一種或多種抗氧化劑、一種或多種胰島素或胰島素取代物。

【0271】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基包括一種或多種膠原蛋白前驅物、一種或多種抗生素及一種或多種微量元素。

【0272】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基包括白蛋白。

【0273】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基包括白蛋白及一種或多種選自由以下組成之群組的成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分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Zr^{4+}之化合物。

【0274】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基進一步包括L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或2-巰基乙醇。

【0275】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基包括以細胞培養基之體積計總濃度(vol%)為約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%之血清替代物。

【0276】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基包括總濃度為細胞培養基總體積之約3%、約5%或約10%的血清替代物。

【0277】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基進一步包括濃度為約0.1 mM至約10 mM、0.5 mM至約9 mM、1 mM至約8 mM、2 mM至約7 mM、3 mM至約6 mM或4 mM至約5 mM的麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。

【0278】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基進一步包括濃度為約2 mM之麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。

【0279】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基進一步包括濃度為約5 mM至約150 mM、10 mM至約140 mM、15 mM至約130 mM、20 mM至約120 mM、25 mM至約110 mM、30 mM至約100 mM、35 mM至約95 mM、40 mM至約90 mM、45 mM至約85 mM、50 mM至約80 mM、55 mM至約75 mM、60 mM至約70 mM或約65 mM的2-巰基乙醇。

【0280】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基進一步包括濃度為約55 mM之2-巰基乙醇。

【0281】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基包括國際PCT公開案第WO/1998/030679號中所描述之確定培養基。

【0282】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基包括約5至200 mg/L範圍內之甘胺酸、約5至250 mg/L範圍內之L-組胺酸、約5至300 mg/L範圍內之L-異白胺酸、約5至200 mg/L範圍內之L-甲硫胺酸、約5至400 mg/L範圍內之L-苯丙胺酸、約1至1000 mg/L範圍內之L-脯胺酸、約1至45 mg/L範圍內之L-羥基脯胺酸、約1至250 mg/L範圍內之L-絲胺酸、約10至500 mg/L範圍內之L-蘇胺酸、約2至110mg/L範圍內之L-色胺酸、約3至175 mg/L範圍內之L-酪胺酸、約5至500 mg/L範圍內之L-纈胺酸、約1至20 mg/L範圍內之硫胺素、約1至20 mg/L範圍內之還原麩胱甘肽、約1至200 mg/L範圍內之L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、約1至50 mg/L範圍內之鐵飽和運鐵蛋白、約1至100 mg/L範圍內之胰島素、約0.000001至0.0001 mg/L範圍內之亞硒酸鈉及/或約5000至50,000 mg/L範圍內之白蛋白(例如AlbuMAX® I)。

【0283】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基包括確定培養基中的非微量元素部分成分中之一或多者，其以本文提供之表4中標題「1X培養基中之濃度範圍」欄中列出之濃度範圍存在。

【0284】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基之滲透壓介於約260與350 mOsmol之間。

【0285】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基進一步包括約3.7 g/L或約2.2 g/L碳酸氫鈉。

【0286】在一些實施例中，確定培養基或無血清培養基進一步包括L-麩醯胺酸(最終濃度為約2 mM)、一種或多種抗生素、非必需胺基酸(NEAA；最終濃度為約100 μM)及/或2-巰基乙醇(最終濃度為約100 μM)。

【0287】在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之確定培養基或無血清培養基缺乏β-巰基乙醇(BME或βME；亦稱為2-巰基乙醇，CAS 60-24-2)。

【0288】在一些實施例中，細胞培養基包括CTS OpTmizer T細胞擴增SFM、3% CTS免疫細胞血清替代物、55 mM BME及視情況選用之麩醯胺酸。

【0289】在一些實施例中，細胞培養基包括補充有CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑(26 mL/L)及3% CTS™免疫細胞SR的CTS™OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基以及2 mM Glutamax，其視情況進一步包括6,000 IU/mL IL-2。

【0290】在一些實施例中，細胞培養基包括補充有CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑(26 mL/L)及3% CTS™免疫細胞SR的CTS™OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、2 mM Glutamax且視情況進一步包括3,000 IU/mL IL-2。

【0291】在一些實施例中，TIL群體為治療性TIL群

體。

【0292】在一些實施例中，治療性TIL群體展現血清IFN-γ之升高，其中IFN-γ之升高大於200 pg/ml、大於250 pg/ml、大於300 pg/ml、大於350 pg/ml、大於400 pg/ml、大於450 pg/ml、大於500 pg/ml、大於550 pg/ml、大於600 pg/ml、大於650 pg/ml、大於700 pg/ml、大於750 pg/ml、大於800 pg/ml、大於850 pg/ml、大於900 pg/ml、大於950 pg/ml或大於1000 pg/ml。

【0293】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包括：

(a)藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，或

藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)視情況將腫瘤碎片或腫瘤碎解物添加至密閉系統中；

(c)藉由在包括IL-2、抗原呈現細胞(APC)及視情況選用之OKT-3的細胞培養基中培養第一TIL群體來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中初始第一擴增進行約5天至9天以獲得第二TIL群體，其中第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發

生；

(d) 藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約1天至5天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)藉由將第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中第三擴增進行約4天至8天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f)收集獲自步驟(e)之第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(e)至步驟(f)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(g)將來自步驟(g)之經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(f)至(g)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【0294】在一些實施例中，本發明提供一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其包括治療性浸潤性淋巴球(TIL)

群體，其中TIL組成物係藉由包括以下之方法產生：

(a)藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，或

藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)視情況將腫瘤碎片或腫瘤碎解物添加至密閉系統中；

(c)藉由在包括IL-2、抗原呈現細胞(APC)及視情況選用之OKT-3的細胞培養基中培養第一TIL群體來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中初始第一擴增進行約5天至9天以獲得第二TIL群體，其中第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約1天至5天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)藉由將第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添

加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中第三擴增進行約4天至8天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f)收集獲自步驟(e)之第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(e)至步驟(f)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(g)將來自步驟(g)之經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(f)至(g)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【0295】在一些實施例中，TIL組成物為冷凍保存組成物，且其中方法進一步包括(h)使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(g)之包括經收集之TIL群體的輸注袋。

【0296】在一些實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體的方法，該方法包括投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，其包括：

(a)藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，或

藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)視情況將腫瘤碎片或腫瘤碎解物添加至密閉系統中；

(c)藉由在包括IL-2、抗原呈現細胞(APC)及視情況選用之OKT-3的細胞培養基中培養第一TIL群體來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中初始第一擴增進行約5天至9天以獲得第二TIL群體，其中第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約1天至5天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)藉由將第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中第三擴增進行約4天至8天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f)收集獲自步驟(e)之第二複數個TIL亞群，其中當視

情況在密閉系統中進行時，自步驟(e)至步驟(f)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(g)將來自步驟(g)之經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(f)至(g)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(h)向個體投予治療有效劑量之來自步驟(g)中之輸注袋的第三TIL群體。

【0297】在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增進行約6天至8天。

【0298】在一些實施例中，快速第二擴增進行約2天至4天。

【0299】在一些實施例中，第三擴增各進行約5天至7天。

【0300】在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增進行約7天，快速第二擴增進行約3天，且第三擴增進行約6天。

【0301】在一些實施例中，步驟(c)至(e)係在約14天至18天內進行。

【0302】在一些實施例中，步驟(c)至(e)係在約16天內進行。

【0303】在一些實施例中，步驟(c)至(e)係在約18天或少於18天內進行。

【0304】在一些實施例中，步驟(c)至(e)係在約16天或少於16天內進行。

【0305】在一些實施例中，步驟(e)包括將第一複數個TIL亞群中之每個亞群以約2×10^6個細胞/平方公分之接種密度接種至提供第三透氣表面區域之分開的容器中。

【0306】在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。

【0307】在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【0308】在一些實施例中，癌症為黑色素瘤。

【0309】在一些實施例中，癌症為HNSCC。

【0310】在一些實施例中，癌症為子宮頸癌。

【0311】在一些實施例中，癌症為NSCLC。

【0312】在一些實施例中，癌症為神經膠母細胞瘤(包含GBM)。

【0313】在一些實施例中，癌症為胃腸癌。

【0314】在一些實施例中，癌症為高突變癌症。

【0315】在一些實施例中，癌症為小兒高突變癌症。

【0316】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包括：

(a)藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，或藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)視情況將腫瘤碎片或腫瘤碎解物添加至密閉系統中；

(c)藉由在包括IL-2、抗原呈現細胞(APC)及視情況選用之OKT-3的細胞培養基中培養第一TIL群體來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中第一擴增或初始第一擴增進行約5天至9天以獲得第二TIL群體，其中第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約5天至9天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)藉由將第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進

行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中第三擴增進行約5天至9天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f)收集獲自步驟(f)之第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(e)至步驟(f)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(g)將來自步驟(f)之經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(f)至(g)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【0317】在一些實施例中，本發明提供一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其包括治療性浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中TIL組成物係藉由包括以下之方法產生：

(a)藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，或藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)視情況將腫瘤碎片或腫瘤碎解物添加至密閉系統中；

(c)藉由在包括IL-2、抗原呈現細胞(APC)及視情況選用之OKT-3的細胞培養基中培養第一TIL群體來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中第一擴增或初始第一擴增進行約5天至9天以獲得第二TIL群

體，其中第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約5天至9天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)藉由將第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中第三擴增進行約5天至9天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f)收集獲自步驟(f)之第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(e)至步驟(f)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(g)將來自步驟(f)之經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(f)至

(g)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【0318】在一些實施例中，TIL組成物為冷凍保存組成物，且其中方法進一步包括(h)使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(g)之包括經收集之TIL群體的輸注袋。

【0319】在一些實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體的方法，該方法包括投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，其包括：

(a)藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，或藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)視情況將腫瘤碎片或腫瘤碎解物添加至密閉系統中；

(c)藉由在包括IL-2、抗原呈現細胞(APC)及視情況選用之OKT-3的細胞培養基中培養第一TIL群體來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中第一擴增或初始第一擴增進行約5天至9天以獲得第二TIL群體，其中第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約5天至9天以獲得

第三TIL群體，其中第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)藉由將第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中第三擴增進行約5天至9天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f)收集獲自步驟(f)之第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(e)至步驟(f)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(g)將來自步驟(f)之經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(f)至(g)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(h)向個體投予治療有效劑量之來自步驟(g)中之輸注袋的第三TIL群體。

【0320】在一些實施例中，在步驟(a)中，藉由以下將獲自患者之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片：(i)冷凍保存腫瘤樣本以產生冷凍保存之腫瘤樣本；(ii)解凍冷凍保存之腫瘤樣本以產生解凍之腫瘤樣本；及(iii)將解凍之腫瘤樣

本碎斷成多個腫瘤碎片。

【0321】在一些實施例中，在步驟(a)中，藉由以下將獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物：(i)冷凍保存腫瘤樣本以產生冷凍保存之腫瘤樣本；(ii)解凍冷凍保存之腫瘤樣本以產生解凍之腫瘤樣本；及(iii)碎解解凍之腫瘤樣本以產生腫瘤碎解物。

【0322】在一些實施例中，在步驟(a)中，藉由以下將獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物：(i)冷凍保存腫瘤樣本以產生冷凍保存之腫瘤樣本；(ii)解凍冷凍保存之腫瘤樣本以產生解凍之腫瘤樣本；(iii)將解凍腫瘤樣本碎斷成多個腫瘤碎片；及(iv)碎解多個腫瘤碎片以產生腫瘤碎解物。

【0323】在一些實施例中，步驟(e)包括將第一複數個TIL亞群中之每個亞群以約2×10^6個細胞/平方公分之接種密度接種至提供第三透氣表面區域之分開的容器中。

【0324】在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。

【0325】在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【0326】在一些實施例中，癌症為黑色素瘤。

【0327】在一些實施例中，癌症為HNSCC。

【0328】在一些實施例中，癌症為子宮頸癌。

【0329】在一些實施例中，癌症為NSCLC。

【0330】在一些實施例中，癌症為神經膠母細胞瘤(包含GBM)。

【0331】在一些實施例中，癌症為胃腸癌。

【0332】在一些實施例中，癌症為高突變癌症。

【0333】在一些實施例中，癌症為小兒高突變癌症。

【0334】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包括：

(a)藉由以下進行第一擴增或初始第一擴增從而產生第二TIL群體：(i)解凍包括來自個體所切除、在切除之後碎解以及在碎解之後冷凍保存的腫瘤的第一TIL群體的冷凍保存之腫瘤碎解物；及(ii)在包括IL-2、抗原呈現細胞(APC)及視情況選用之OKT-3的細胞培養基中培養第一TIL群體，其中第一擴增或初始第一擴增進行約5天至9天以獲得第二TIL群體，其中第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域的密閉容器中進行；

(b)藉由用另外的IL-2、APC及視情況選用之OKT-3補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約5天至9天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係視情況在提供第二透氣表

面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(a)至步驟(b)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(c)藉由將第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中第三擴增進行約5天至9天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)收集獲自步驟(c)之第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(e)將來自步驟(d)之經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(d)至(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【0335】在一些實施例中，本發明提供一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其包括治療性浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中TIL組成物係藉由包括以下之方法產生：

(a)藉由以下進行第一擴增或初始第一擴增從而產生第二TIL群體：(i)解凍包括來自個體所切除及在切除之後冷凍保存的腫瘤的第一TIL群體的冷凍保存之腫瘤碎解物；及(ii)在包括IL-2、抗原呈現細胞(APC)及視情況選用之

OKT-3的細胞培養基中培養第一TIL群體，其中第一擴增或初始第一擴增進行約5天至9天以獲得第二TIL群體，其中第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域的密閉容器中進行；

(b)藉由用另外的IL-2、APC、視情況選用之OKT-3補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約5天至9天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(a)至步驟(b)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(c)藉由將第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中第三擴增進行約5天至9天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)收集獲自步驟(c)之第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(e)將來自步驟(d)之經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(d)

至(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【0336】在一些實施例中，TIL組成物為冷凍保存組成物，且其中方法進一步包括(f)使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(e)之包括經收集之TIL群體的輸注袋。

【0337】在一些實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體的方法，該方法包括投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，其包括：

(a)藉由以下進行第一擴增或初始第一擴增從而產生第二TIL群體：(i)解凍包括來自個體所切除、在切除之後碎解以及在碎解之後冷凍保存的腫瘤的第一TIL群體的冷凍保存之腫瘤碎解物；及(ii)在包括IL-2及視情況選用之OKT-3以及抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養第一TIL群體，其中第一擴增或初始第一擴增進行約5天至9天以獲得第二TIL群體，其中第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域的密閉容器中進行；

(b)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約5天至9天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(a)至步驟(b)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(c)藉由將第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添

加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中第三擴增進行約5天至9天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)收集獲自步驟(c)之第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)將來自步驟(d)之經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(d)至(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f)向個體投予治療有效劑量之來自步驟(e)中之輸注袋的經收集之TIL群體。

【0338】在一些實施例中，步驟(a)(ii)包括解凍包括來自個體所切除且在切除之後冷凍保存的腫瘤的第一TIL群體的冷凍保存之腫瘤以產生解凍之腫瘤，及將解凍之腫瘤碎斷成多個腫瘤碎片，且其中步驟(a)(ii)包括培養包括第一TIL群體之多個腫瘤碎片。

【0339】在一些實施例中，步驟(c)包括將第一複數個TIL亞群中之每個亞群以約2×10^6個細胞/平方公分之接種密度接種至提供第三透氣表面區域之分開的容器中。

【0340】在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增進行約6天至8天。

【0341】在一些實施例中，快速第二擴增進行約6天至8天。

【0342】在一些實施例中，第三擴增進行約6天至8天。

【0343】在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增、快速第二擴增及第三擴增係在約18天至24天內進行。

【0344】在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增、快速第二擴增及第三擴增係在約20天至22天內進行。

【0345】在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增、快速第二擴增及第三擴增係在約21天內進行。

【0346】在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增、快速第二擴增及第三擴增係在約24天或少於24天內進行。

【0347】在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增、快速第二擴增及第三擴增係在約22天或少於22天內進行。

【0348】在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增、快速第二擴增及第三擴增係在約21天或少於21天內進行。

【0349】在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及

腎細胞癌。

【0350】在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【0351】在一些實施例中，癌症為黑色素瘤。

【0352】在一些實施例中，癌症為HNSCC。

【0353】在一些實施例中，癌症為子宮頸癌。

【0354】在一些實施例中，癌症為NSCLC。

【0355】在一些實施例中，癌症為神經膠母細胞瘤(包含GBM)。

【0356】在一些實施例中，癌症為胃腸癌。

【0357】在一些實施例中，癌症為高突變癌症。

【0358】在一些實施例中，癌症為小兒高突變癌症。

【0359】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包括：

(a)藉由在包括IL-2、抗原呈現細胞(APC)及視情況選用之OKT-3的細胞培養基中培養包括來自患者所切除之腫瘤的第一TIL群體的腫瘤樣本來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中初始第一擴增進行約5天至9天以獲得第二TIL群體，其中第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行；

(b)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增，從而

產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約1天至5天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(a)至步驟(b)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(c)藉由將第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中第三擴增進行約4天至8天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)收集獲自步驟(c)之第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(e)將來自步驟(d)之經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(d)至(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【0360】在一些實施例中，本發明提供一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其包括治療性浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中TIL組成物係藉由包括以下之方法產生：

(a)藉由在包括IL-2、抗原呈現細胞(APC)及視情況選用之OKT-3的細胞培養基中培養包括來自患者所切除之腫

瘤的第一TIL群體的腫瘤樣本來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中初始第一擴增進行約5天至9天以獲得第二TIL群體，其中第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行；

(b)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約1天至5天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(a)至步驟(b)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(c)藉由將第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中第三擴增進行約4天至8天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)收集獲自步驟(c)之第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(e)將來自步驟(d)之經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(d)

至(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【0361】在一些實施例中，TIL組成物為冷凍保存組成物，且其中方法進一步包括(f)使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(e)之包括經收集之TIL群體的輸注袋。

【0362】在一些實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體的方法，該方法包括投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，其包括：

(a)藉由在包括IL-2、抗原呈現細胞(APC)及視情況選用之OKT-3的細胞培養基中培養包括來自患者所切除之腫瘤的第一TIL群體的腫瘤樣本來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中初始第一擴增進行約5天至9天以獲得第二TIL群體，其中第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行；

(b)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約1天至5天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(a)至步驟(b)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(c)藉由將第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，

其中第三擴增進行約4天至8天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)收集獲自步驟(c)之第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)將來自步驟(d)之經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(d)至(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(f)向個體投予治療有效劑量之來自步驟(e)中之輸注袋的第三TIL群體。

【0363】在一些實施例中，在步驟(a)中之培養之前，將腫瘤樣本碎斷成包括第一TIL群體的多個腫瘤碎片。

【0364】在一些實施例中，在步驟(a)中之培養之前，碎解腫瘤樣本以產生包括第一TIL群體的腫瘤碎解物。

【0365】在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增進行約6天至8天。

【0366】在一些實施例中，快速第二擴增進行約2天至4天。

【0367】在一些實施例中，第三擴增各進行約5天至7天。

【0368】在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增進行約7天，快速第二擴增進行約3天，且第三擴增進行約

6天。

【0369】在一些實施例中，步驟(a)至(c)係在約14天至18天內進行。

【0370】在一些實施例中，步驟(a)至(c)係在約16天內進行。

【0371】在一些實施例中，步驟(a)至(c)係在約18天或少於18天內進行。

【0372】在一些實施例中，步驟(a)至(c)係在約16天或少於16天內進行。

【0373】在一些實施例中，步驟(c)包括將第一複數個TIL亞群中之每個亞群以約2×10^6個細胞/平方公分之接種密度接種至提供第三透氣表面區域之分開的容器中。

【0374】在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。

【0375】在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【0376】在一些實施例中，癌症為黑色素瘤。

【0377】在一些實施例中，癌症為HNSCC。

【0378】在一些實施例中，癌症為子宮頸癌。

【0379】在一些實施例中，癌症為NSCLC。

【0380】在一些實施例中，癌症為神經膠母細胞瘤(包含GBM)。

【0381】在一些實施例中，癌症為胃腸癌。

【0382】在一些實施例中，癌症為高突變癌症。

【0383】在一些實施例中，癌症為小兒高突變癌症。

【0384】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包括：

(a)藉由在包括IL-2、抗原呈現細胞(APC)及視情況選用之OKT-3的細胞培養基中培養包括來自患者所切除之腫瘤的第一TIL群體的腫瘤樣本來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中初始第一擴增進行約5天至9天以獲得第二TIL群體，其中第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行；

(b)藉由用另外的IL-2、APC及視情況選用之OKT-3補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約5天至9天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(a)至步驟(b)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(c)藉由將第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添

加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中第三擴增進行約5天至9天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)收集獲自步驟(f)之第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(e)將來自步驟(d)之經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(d)至(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【0385】在一些實施例中，本發明提供一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其包括治療性浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中TIL組成物係藉由包括以下之方法產生：

(a)藉由在包括IL-2、抗原呈現細胞(APC)及視情況選用之OKT-3的細胞培養基中培養包括來自患者所切除之腫瘤的第一TIL群體的腫瘤樣本來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中初始第一擴增進行約5天至9天以獲得第二TIL群體，其中第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行；

(b)藉由用另外的IL-2、APC及視情況選用之OKT-3補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約5天至9天以獲得

第三TIL群體，其中第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(a)至步驟(b)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(c)藉由將第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中第三擴增進行約5天至9天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)收集獲自步驟(f)之第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(e)將來自步驟(d)之經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(d)至(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【0386】在一些實施例中，TIL組成物為冷凍保存組成物，且其中方法進一步包括(f)使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(e)之包括經收集之TIL群體的輸注袋。

【0387】在一些實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體的方法，該方法包括投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，其包括：

(a)藉由在包括IL-2及抗原呈現細胞(APC)以及視情況選用之OKT-3的細胞培養基中培養包括來自患者所切除之腫瘤的第一TIL群體的腫瘤樣本來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中初始第一擴增進行約5天至9天以獲得第二TIL群體，其中第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行；

(b)藉由用另外的IL-2、APC及視情況選用之OKT-3補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約5天至9天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(a)至步驟(b)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(c)藉由將第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中第三擴增進行約5天至9天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)收集獲自步驟(f)之第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係

在不打開該系統的情況下發生；

(e)將來自步驟(d)之經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(d)至(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(f)向個體投予治療有效劑量之來自步驟(e)中之輸注袋的第三TIL群體。

【0388】在一些實施例中，在步驟(a)中之培養之前，將腫瘤樣本碎斷成包括第一TIL群體的多個腫瘤碎片。

【0389】在一些實施例中，在步驟(a)中之培養之前，碎解腫瘤樣本以產生包括第一TIL群體的腫瘤碎解物。

【0390】在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增進行約6天至8天。

【0391】在一些實施例中，快速第二擴增進行約6天至8天。

【0392】在一些實施例中，第三擴增進行約6天至8天。

【0393】在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增、快速第二擴增及第三擴增係在約18天至24天內進行。

【0394】在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增、快速第二擴增及第三擴增係在約20天至22天內進行。

【0395】在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增、快速第二擴增及第三擴增係在約21天內進行。

【0396】在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增、快速第二擴增及第三擴增係在約24天或少於24天內進

行。

【0397】在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增、快速第二擴增及第三擴增係在約22天或少於22天內進行。

【0398】在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增、快速第二擴增及第三擴增係在約21天或少於21天內進行。

【0399】在一些實施例中，步驟(c)包括將第一複數個TIL亞群中之每個亞群以約2×10^6個細胞/平方公分之接種密度接種至提供第三透氣表面區域之分開的容器中。

【0400】在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。

【0401】在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【0402】在一些實施例中，癌症為黑色素瘤。

【0403】在一些實施例中，癌症為HNSCC。

【0404】在一些實施例中，癌症為子宮頸癌。

【0405】在一些實施例中，癌症為NSCLC。

【0406】在一些實施例中，癌症為神經膠母細胞瘤(包

含GBM)。

【0407】在一些實施例中，癌症為胃腸癌。

【0408】在一些實施例中，癌症為高突變癌症。

【0409】在一些實施例中，癌症為小兒高突變癌症。

【圖式簡單說明】

【0410】[**圖1A至圖1G**]：**A)**顯示2A過程(大約22天過程)與用於TIL製造之Gen 3過程實施例(大約14天至18天過程)之間的比較。**B)**例示性Gen3過程圖，其提供步驟A至F之概述(大約14天至18天過程)。**C)**該圖提供三種例示性Gen 3過程，其中概述步驟A至F(大約14天或18天過程)的三種過程變化中之每一者。**D)**例示性經修改類Gen 2過程，其提供步驟A至F之概述(大約22天過程)。**E)**例示性第二代Gen3過程圖，其提供步驟A至F之概述(大約14天至18天過程)。**F)**例示性第二代Gen3過程圖，其提供步驟A至F之概述(大約14天至18天過程)。**G)**例示性第二代Gen3過程圖，其提供步驟A至F之概述(大約14天至18天過程)。

【0411】[**圖2**]：提供Gen 2(2A過程)與Gen 3之間的可比較性之實驗流程圖。

【0412】[**圖3**]：顯示各種Gen 2(2A過程)與Gen 3.1過程實施例之間的比較。

【0413】[**圖4**]：描述Gen 2、Gen 2.1及Gen 3.0過程之實施例之各種特徵的表。

【0414】[**圖5**]：Gen 3過程(被稱作Gen 3.1)之實施例

之培養基條件的概述。

【0415】[**圖6**]：Gen 3過程(16天過程)之例示性實施例之示意圖。

【0416】[**圖7**]：使用Gen 3過程擴增來自血液惡性病之TIL之例示性實施例的示意圖。在第0天，使用正向或負向選擇方法(亦即使用T細胞標誌(CD2、CD3等)來移除T細胞，或移除其他細胞從而留下T細胞)或梯度離心將T細胞級份(CD3+、CD45+)與富集淋巴球之血球分離產物、全血或(新鮮或經解凍)腫瘤碎解物分離。

【0417】[**圖8**]：Gen 3過程(16天過程)之例示性實施例之示意圖。

【0418】[**圖9**]：Gen 3.1測試(最佳化Gen 3.1)過程(16天至17天過程)之例示性實施例之示意圖。

【0419】[**圖10A至圖10B**]：Gen 3過程(16天過程)之例示性實施例之示意圖。

【0420】[**圖11**]：Gen 3過程(16天/17天過程)製備時刻表之例示性實施例之示意圖。

【0421】[**圖12**]：Gen 3過程(14天至16天過程)之例示性實施例之示意圖。

【0422】[**圖13A至圖13B**]：Gen 3過程(16天過程)之例示性實施例之示意圖。

【0423】[**圖14**]：Gen 2、Gen 2.1及Gen 3過程(16天過程)之實施例之比較。

【0424】[**圖15**]：Gen 3實施例流程圖比較(Gen 3.0、

Gen 3.1對照、Gen 3.1測試)。

【0425】[**圖16**]：顯示Gen 3過程(最佳化Gen 3，16天至17天過程)之例示性實施例之組分。

【0426】[**圖17**]：提供結構I-A及I-B，圓柱係指個別多肽結合域。結構I-A及I-B包括三個線性連接的衍生自例如4-1BBL或結合4-1BB的抗體的TNFRSF結合域，其摺疊形成三價蛋白質，該三價蛋白質接著經由IgG1-Fc(包含CH3及CH2域)與第二三價蛋白質連接，該IgG1-Fc隨後經由雙硫鍵(小長橢圓形)將兩個三價蛋白質連接在一起，從而穩定結構並提供能夠將六個受體之細胞內傳訊域與傳訊蛋白集合在一起以形成傳訊複合物的促效劑。表示為圓柱體之TNFRSF結合域可為scFv域，其包括例如由連接子連接之V_H及V_L鏈，該連接子可包括親水性殘基及提供柔性的Gly與Ser序列以及提供溶解性的Glu與Lys。

【0427】[**圖18**]：使用活體組織切片樣本之Gen 2及Gen 3過程之概述。

【0428】[**圖19**]：Gen 3過程之例示性實施例。

【0429】[**圖20**]：當前Gen 3過程之例示性實施例。

【0430】[**圖21**]：例示性Gen 3過程及三個例示性第二代Gen 3過程中之建議飼養細胞條件。

【0431】[**圖22**]：使用各種起始物質之Gen 2及Gen 3過程之例示性實施例。

【0432】[**圖23**]：如圖18所例示之過程的CD3+CD45+核心與切除樣本%。

【0433】[**圖24**]：如圖18所例示之過程的核心與切除樣本的IFNγ資料。

【0434】[**圖25**]：如圖18所例示之過程的總活細胞及產物屬性之概述。

【0435】[**圖26**]：如圖18所例示之過程的與純度、鑑別性及記憶相關之擴展表型特徵。注意：偵測到< 3%之B細胞或單核球或NK細胞。

【0436】[**圖27**]：如圖18所例示之過程之表型比較。

【0437】[**圖28A至圖28B**]：如圖18所例示之過程的與分化、活化及耗竭相關之擴展表型特徵。

【實施方式】

序列表之簡要說明

【0438】SEQ ID NO:1為莫羅單抗(muromonab)之重鏈之胺基酸序列。

【0439】SEQ ID NO:2為莫羅單抗之輕鏈之胺基酸序列。

【0440】SEQ ID NO:3為重組人類IL-2蛋白之胺基酸序列。

【0441】SEQ ID NO:4為阿地介白素之胺基酸序列。

【0442】SEQ ID NO:5為重組人類IL-4蛋白之胺基酸序列。

【0443】SEQ ID NO:6為重組人類IL-7蛋白之胺基酸序列。

【0444】SEQ ID NO:7為重組人類IL-15蛋白之胺基酸序列。

【0445】SEQ ID NO:8為重組人類IL-21蛋白之胺基酸序列。

【0446】SEQ ID NO:9為人類4-1BB之胺基酸序列。

【0447】SEQ ID NO:10為鼠類4-1BB之胺基酸序列。

【0448】SEQ ID NO:11為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(utomilumab)(PF-05082566)之重鏈。

【0449】SEQ ID NO:12為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈。

【0450】SEQ ID NO:13為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈可變區(V_H)。

【0451】SEQ ID NO:14為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈可變區(V_L)。

【0452】SEQ ID NO:15為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈CDR1。

【0453】SEQ ID NO:16為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈CDR2。

【0454】SEQ ID NO:17為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈CDR3。

【0455】SEQ ID NO:18為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈CDR1。

【0456】SEQ ID NO:19為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈CDR2。

【0457】SEQ ID NO:20為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈CDR3。

【0458】SEQ ID NO:21為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(urelumab)(BMS-663513)之重鏈。

【0459】SEQ ID NO:22為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈。

【0460】SEQ ID NO:23為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈可變區(V_H)。

【0461】SEQ ID NO:24為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈可變區(V_L)。

【0462】SEQ ID NO:25為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈CDR1。

【0463】SEQ ID NO:26為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈CDR2。

【0464】SEQ ID NO:27為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈CDR3。

【0465】SEQ ID NO:28為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈CDR1。

【0466】SEQ ID NO:29為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈CDR2。

【0467】SEQ ID NO:30為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈CDR3。

【0468】SEQ ID NO:31為TNFRSF促效劑融合蛋白之Fc域。

【0469】SEQ ID NO:32為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0470】SEQ ID NO:33為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0471】SEQ ID NO:34為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0472】SEQ ID NO:35為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0473】SEQ ID NO:36為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0474】SEQ ID NO:37為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0475】SEQ ID NO:38為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0476】SEQ ID NO:39為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0477】SEQ ID NO:40為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0478】SEQ ID NO:41為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0479】SEQ ID NO:42為TNFRSF促效劑融合蛋白之Fc域。

【0480】SEQ ID NO:43為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0481】SEQ ID NO:44為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0482】SEQ ID NO:45為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0483】SEQ ID NO:46為4-1BB配體(4-1BBL)胺基酸序列。

【0484】SEQ ID NO:47為4-1BBL多肽之可溶部分。

【0485】SEQ ID NO:48為4-1BB促效劑抗體4B4-1-1型式1之重鏈可變區(V_H)。

【0486】SEQ ID NO:49為4-1BB促效劑抗體4B4-1-1型式1之輕鏈可變區(V_L)。

【0487】SEQ ID NO:50為4-1BB促效劑抗體4B4-1-1型式2之重鏈可變區(V_H)。

【0488】SEQ ID NO:51為4-1BB促效劑抗體4B4-1-1型式2之輕鏈可變區(V_L)。

【0489】SEQ ID NO:52為4-1BB促效劑抗體H39E3-2之重鏈可變區(V_H)。

【0490】SEQ ID NO:53為4-1BB促效劑抗體H39E3-2之輕鏈可變區(V_L)。

【0491】SEQ ID NO:54為人類OX40之胺基酸序列。

【0492】SEQ ID NO:55為鼠類OX40之胺基酸序列。

【0493】SEQ ID NO:56為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(tavolixizumab)(MEDI-0562)之重鏈。

【0494】SEQ ID NO:57為OX40促效劑單株抗體塔沃西

單抗(MEDI-0562)之輕鏈。

【0495】SEQ ID NO:58為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之重鏈可變區(V_H)。

【0496】SEQ ID NO:59為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之輕鏈可變區(V_L)。

【0497】SEQ ID NO:60為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之重鏈CDR1。

【0498】SEQ ID NO:61為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之重鏈CDR2。

【0499】SEQ ID NO:62為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之重鏈CDR3。

【0500】SEQ ID NO:63為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之輕鏈CDR1。

【0501】SEQ ID NO:64為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之輕鏈CDR2。

【0502】SEQ ID NO:65為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之輕鏈CDR3。

【0503】SEQ ID NO:66為OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈。

【0504】SEQ ID NO:67為OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈。

【0505】SEQ ID NO:68為OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈可變區(V_H)。

【0506】SEQ ID NO:69為OX40促效劑單株抗體11D4

之輕鏈可變區(V_L)。

【0507】SEQ ID NO:70為OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈CDR1。

【0508】SEQ ID NO:71為OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈CDR2。

【0509】SEQ ID NO:72為OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈CDR3。

【0510】SEQ ID NO:73為OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈CDR1。

【0511】SEQ ID NO:74為OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈CDR2。

【0512】SEQ ID NO:75為OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈CDR3。

【0513】SEQ ID NO:76為OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈。

【0514】SEQ ID NO:77為OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈。

【0515】SEQ ID NO:78為OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈可變區(V_H)。

【0516】SEQ ID NO:79為OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈可變區(V_L)。

【0517】SEQ ID NO:80為OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈CDR1。

【0518】SEQ ID NO:81為OX40促效劑單株抗體18D8

之重鏈CDR2。

【0519】SEQ ID NO:82為OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈CDR3。

【0520】SEQ ID NO:83為OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈CDR1。

【0521】SEQ ID NO:84為OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈CDR2。

【0522】SEQ ID NO:85為OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈CDR3。

【0523】SEQ ID NO:86為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之重鏈可變區(V_H)。

【0524】SEQ ID NO:87為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之輕鏈可變區(V_L)。

【0525】SEQ ID NO:88為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之重鏈CDR1。

【0526】SEQ ID NO:89為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之重鏈CDR2。

【0527】SEQ ID NO:90為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之重鏈CDR3。

【0528】SEQ ID NO:91為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之輕鏈CDR1。

【0529】SEQ ID NO:92為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之輕鏈CDR2。

【0530】SEQ ID NO:93為OX40促效劑單株抗體Hu119-

122之輕鏈CDR3。

【0531】SEQ ID NO:94為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之重鏈可變區(V_H)。

【0532】SEQ ID NO:95為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之輕鏈可變區(V_L)。

【0533】SEQ ID NO:96為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之重鏈CDR1。

【0534】SEQ ID NO:97為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之重鏈CDR2。

【0535】SEQ ID NO:98為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之重鏈CDR3。

【0536】SEQ ID NO:99為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之輕鏈CDR1。

【0537】SEQ ID NO:100為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之輕鏈CDR2。

【0538】SEQ ID NO:101為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之輕鏈CDR3。

【0539】SEQ ID NO:102為OX40配體(OX40L)胺基酸序列。

【0540】SEQ ID NO:103為OX40L多肽之可溶部分。

【0541】SEQ ID NO:104為OX40L多肽之替代性可溶性部分。

【0542】SEQ ID NO:105為OX40促效劑單株抗體008之重鏈可變區(V_H)。

【0543】SEQ ID NO:106為OX40促效劑單株抗體008之輕鏈可變區(V_L)。

【0544】SEQ ID NO:107為OX40促效劑單株抗體011之重鏈可變區(V_H)。

【0545】SEQ ID NO:108為OX40促效劑單株抗體011之輕鏈可變區(V_L)。

【0546】SEQ ID NO:109為OX40促效劑單株抗體021之重鏈可變區(V_H)。

【0547】SEQ ID NO:110為OX40促效劑單株抗體021之輕鏈可變區(V_L)。

【0548】SEQ ID NO:111為OX40促效劑單株抗體023之重鏈可變區(V_H)。

【0549】SEQ ID NO:112為OX40促效劑單株抗體023之輕鏈可變區(V_L)。

【0550】SEQ ID NO:113為OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0551】SEQ ID NO:114為OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0552】SEQ ID NO:115為OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0553】SEQ ID NO:116為OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0554】SEQ ID NO:117為人源化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0555】SEQ ID NO:118為人源化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0556】SEQ ID NO:119為人源化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0557】SEQ ID NO:120為人源化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0558】SEQ ID NO:121為人源化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0559】SEQ ID NO:122為人源化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0560】SEQ ID NO:123為人源化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0561】SEQ ID NO:124為人源化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0562】SEQ ID NO:125為OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0563】SEQ ID NO:126為OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0564】SEQ ID NO:127-462當前未分配。

【0565】SEQ ID NO:463為PD-1抑制劑納武單抗之重鏈胺基酸序列。

【0566】SEQ ID NO:464為PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0567】SEQ ID NO:465為PD-1抑制劑納武單抗之重

鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0568】SEQ ID NO:466為PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0569】SEQ ID NO:467為PD-1抑制劑納武單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0570】SEQ ID NO:468為PD-1抑制劑納武單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0571】SEQ ID NO:469為PD-1抑制劑納武單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0572】SEQ ID NO:470為PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0573】SEQ ID NO:471為PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0574】SEQ ID NO:472為PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0575】SEQ ID NO:473為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之重鏈胺基酸序列。

【0576】SEQ ID NO:474為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0577】SEQ ID NO:475為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0578】SEQ ID NO:476為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0579】SEQ ID NO:477為PD-1抑制劑帕博利珠單抗

之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0580】SEQ ID NO:478為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0581】SEQ ID NO:479為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0582】SEQ ID NO:480為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0583】SEQ ID NO:481為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0584】SEQ ID NO:482為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0585】SEQ ID NO:483為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗(durvalumab)之重鏈胺基酸序列。

【0586】SEQ ID NO:484為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0587】SEQ ID NO:485為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0588】SEQ ID NO:486為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0589】SEQ ID NO:487為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0590】SEQ ID NO:488為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0591】SEQ ID NO:489為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之

重鏈CDR3胺基酸序列。

【0592】SEQ ID NO:490為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0593】SEQ ID NO:491為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0594】SEQ ID NO:492為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0595】SEQ ID NO:493為PD-L1抑制劑阿維魯單抗(avelumab)之重鏈胺基酸序列。

【0596】SEQ ID NO:494為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0597】SEQ ID NO:495為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0598】SEQ ID NO:496為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0599】SEQ ID NO:497為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0600】SEQ ID NO:498為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0601】SEQ ID NO:499為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0602】SEQ ID NO:500為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0603】SEQ ID NO:501為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之

輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0604】SEQ ID NO:502為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0605】SEQ ID NO:503為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗(atezolizumab)之重鏈胺基酸序列。

【0606】SEQ ID NO:504為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0607】SEQ ID NO:505為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0608】SEQ ID NO:506為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0609】SEQ ID NO:507為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0610】SEQ ID NO:508為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0611】SEQ ID NO:509為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0612】SEQ ID NO:510為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0613】SEQ ID NO:511為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0614】SEQ ID NO:512為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0615】SEQ ID NO:513為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗

(ipilimumab)之重鏈胺基酸序列。

【0616】SEQ ID NO:514為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0617】SEQ ID NO:515為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0618】SEQ ID NO:516為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0619】SEQ ID NO:517為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0620】SEQ ID NO:518為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0621】SEQ ID NO:519為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0622】SEQ ID NO:520為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0623】SEQ ID NO:521為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0624】SEQ ID NO:522為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0625】SEQ ID NO:523為CTLA-4抑制劑曲美單抗(tremelimumab)之重鏈胺基酸序列。

【0626】SEQ ID NO:524為CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0627】SEQ ID NO:525為CTLA-4抑制劑曲美單抗之

重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0628】SEQ ID NO:526為CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0629】SEQ ID NO:527為CTLA-4抑制劑曲美單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0630】SEQ ID NO:528為CTLA-4抑制劑曲美單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0631】SEQ ID NO:529為CTLA-4抑制劑曲美單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0632】SEQ ID NO:530為CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0633】SEQ ID NO:531為CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0634】SEQ ID NO:532為CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0635】SEQ ID NO:533為CTLA-4抑制劑澤氟利單抗(zalifrelimab)之重鏈胺基酸序列。

【0636】SEQ ID NO:534為CTLA-4抑制劑澤氟利單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0637】SEQ ID NO:535為CTLA-4抑制劑澤氟利單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0638】SEQ ID NO:536為CTLA-4抑制劑澤氟利單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0639】SEQ ID NO:537為CTLA-4抑制劑澤氟利單抗

之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0640】SEQ ID NO:538為CTLA-4抑制劑澤氟利單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0641】SEQ ID NO:539為CTLA-4抑制劑澤氟利單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0642】SEQ ID NO:540為CTLA-4抑制劑澤氟利單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0643】SEQ ID NO:541為CTLA-4抑制劑澤氟利單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0644】SEQ ID NO:542為CTLA-4抑制劑澤氟利單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0645】SEQ ID NO:543為IL-2序列。

【0646】SEQ ID NO:544為IL-2突變蛋白序列。

【0647】SEQ ID NO:545為IL-2突變蛋白序列。

【0648】SEQ ID NO:546為IgG.IL2R67A.H1的HCDR1_IL-2。

【0649】SEQ ID NO:547為IgG.IL2R67A.H1的HCDR2。

【0650】SEQ ID NO:548為IgG.IL2R67A.H1的HCDR3。

【0651】SEQ ID NO:549為IgG.IL2R67A.H1的HCDR1_IL-2 kabat。

【0652】SEQ ID NO:550為IgG.IL2R67A.H1的HCDR2 kabat。

【0653】SEQ ID NO:551為IgG.IL2R67A.H1的HCDR3 kabat。

【0654】SEQ ID NO:552為IgG.IL2R67A.H1的HCDR1_IL-2 clothia。

【0655】SEQ ID NO:553為IgG.IL2R67A.H1的HCDR2 clothia。

【0656】SEQ ID NO:554為IgG.IL2R67A.H1的HCDR3 clothia。

【0657】SEQ ID NO:555為IgG.IL2R67A.H1的HCDR1_IL-2 IMGT。

【0658】SEQ ID NO:556為IgG.IL2R67A.H1的HCDR2 IMGT。

【0659】SEQ ID NO:557為IgG.IL2R67A.H1的HCDR3 IMGT。

【0660】SEQ ID NO:558為IgG.IL2R67A.H1的V_H鏈。

【0661】SEQ ID NO:559為IgG.IL2R67A.H1之重鏈。

【0662】SEQ ID NO:560為IgG.IL2R67A.H1的LCDR1 kabat。

【0663】SEQ ID NO:561為IgG.IL2R67A.H1的LCDR2 kabat。

【0664】SEQ ID NO:562為IgG.IL2R67A.H1的LCDR3 kabat。

【0665】SEQ ID NO:563為IgG.IL2R67A.H1的LCDR1 chothia。

【0666】SEQ ID NO:564為IgG.IL2R67A.H1的LCDR2 chothia。

【0667】SEQ ID NO:565為IgG.IL2R67A.H1的LCDR3 chothia。

【0668】SEQ ID NO:566為V_L鏈。

【0669】SEQ ID NO:567為輕鏈。

【0670】SEQ ID NO:568為輕鏈。

【0671】SEQ ID NO:569為輕鏈。

【0672】SEQ ID NO: 570為IL-2形式。

【0673】SEQ ID NO: 571為IL-2形式。

【0674】SEQ ID NO: 572為IL-2形式。

【0675】SEQ ID NO: 573為黏蛋白域多肽。

I. 定義

【0676】除非另有定義，否則本文所用的所有技術及科學術語具有與本發明所屬領域的技術人員通常所理解的含義相同的含義。本文所提及之所有專利及公開案均以全文引用的方式併入本文中。

【0677】術語「活體內」係指發生於個體體內之事件。

【0678】術語「活體外」係指發生於個體體外之事件。活體外分析涵蓋採用活細胞或死細胞的基於細胞之分析，且亦可涵蓋不採用完整細胞的不含細胞之分析。

【0679】術語「離體」係指涉及對已自個體身體移除的細胞、組織及/或器官進行治療或執行程序的事件。適

當地，細胞、組織及/或器官可利用手術或治療方法返回至個體體內。

【0680】術語「快速擴增」意謂抗原特異性TIL之數目在一週時間內增加至少約3倍(或4倍、5倍、6倍、7倍、8倍或9倍)，更佳地在一週時間內增加至少約10倍(或20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍或90倍)，或最佳在一週時間內增加至少約100倍。下文概述多個快速擴增方案。

【0681】本文中「腫瘤浸潤性淋巴球」或「TIL」意謂最初作為已離開個體血流且遷移至腫瘤中的白血球獲得之細胞群體。TIL包含(但不限於)$CD8^+$細胞毒性T細胞(淋巴球)、Th1及Th17 $CD4^+$ T細胞、自然殺手細胞、樹突狀細胞及M1巨噬細胞。TIL包含初代TIL及繼代TIL兩者。「初代TIL」係如本文所概述之獲自患者組織樣本的TIL(有時稱為「新鮮獲得」或「新鮮分離」)，且「繼代TIL」係任何如本文所論述之經擴增或增殖的TIL細胞群體，包含(但不限於)主體TIL(bulk TIL)及經擴增TIL(「REP TIL」或「REP後TIL」)。TIL細胞群體可包含經遺傳修飾之TIL。

【0682】本文中之「細胞群體」(包含TIL)意指許多具有共同特質之細胞。一般而言，群體數目在1×10^6至1×10^{10}之範圍內，其中不同的TIL群體包括不同數目。例如，初代TIL在IL-2的存在下的初始生長產生大約1×10^8個細胞之主體TIL群體。一般進行REP擴增以提供1.5×10^9至1.5×10^{10}

個細胞群體用於輸注。在一些實施例中，進行REP擴增以提供2.3×10^{10}至13.7×10^{10}個群體。

【0683】本文中「冷凍保存之TIL」意謂在約-150℃至-60℃之範圍內處理且儲存TIL，無論係初代的、主體的或經擴增的(REP TIL)。用於冷凍保存之通用方法亦描述於本文別處，包含在實例中描述。為了清楚起見，「冷凍保存之TIL」可與可用作初代TIL來源之冷凍組織樣本區分。

【0684】本文中「解凍之冷凍保存之TIL」意謂先前經冷凍保存且隨後處理以恢復至室溫或更高溫度(包含但不限於細胞培養溫度或可向患者投予TIL之溫度)的TIL群體。

【0685】TIL通常可經生物化學(使用細胞表面標誌)或功能性(根據其浸潤腫瘤及實現治療之能力)定義。TIL通常可藉由表現以下生物標誌中之一或多者分類：CD4、CD8、TCR αβ、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1及CD25。另外及替代地，TIL可藉由其重新引入患者中後浸潤實體腫瘤之能力來進行功能性定義。TIL可進一步藉由效力表徵 - 例如若例如干擾素(IFN)釋放大於約50 pg/mL、大於約100 pg/mL、大於約150 pg/mL或大於約200 pg/mL，則TIL可視為強效的。若例如干擾素(IFNγ)釋放大於約50 pg/mL、大於約100 pg/mL、大於約150 pg/mL或大於約200 pg/mL、大於約300 pg/mL、大於約400 pg/mL、大於約500 pg/mL、大於約600 pg/mL、大於約700 pg/mL、大於約800 pg/mL、大於約900 pg/mL、大於約

1000 pg/mL，則TIL可視為強效的。

【0686】術語「冷凍保存培養基(cryopreservation media/ cryopreservation medium)」係指可用於冷凍保存細胞之任何培養基。此類培養基可包含包括7%至10% DMSO之培養基。例示性培養基包含CryoStor CS10、HypoThermosol以及其組合。術語「CS10」係指獲自幹細胞科技公司(Stemcell Technologies)或Biolife Solutions之冷凍保存培養基。CS10培養基可以商品名「CryoStor® CS10」來指代。CS10培養基為包括DMSO之無血清、無動物成分的培養基。

【0687】術語「中央記憶T細胞」係指在人類中為CD45R0+且組成性表現CCR7($CCR7^{hi}$)及CD62L($CD62^{hi}$)之T細胞子集。中央記憶T細胞之表面表型亦包含TCR、CD3、CD127 (IL-7R)及IL-15R。中央記憶T細胞之轉錄因子包含BCL-6、BCL-6B、MBD2及BMI1。中央記憶T細胞在TCR引發之後主要分泌IL-2及CD40L作為效應分子。中央記憶T細胞主要存在於血液的CD4隔室中，且在人類中按比例富集於淋巴結及扁桃體中。

【0688】術語「效應記憶T細胞」係指人類或哺乳動物T細胞之子集，如中央記憶T細胞，為CD45R0+，但已經失去對CCR7的組成性表現($CCR7^{lo}$)並且對於CD62L表現而言為異質的或低的($CD62L^{lo}$)。中央記憶T細胞的表面表型亦包含TCR、CD3、CD127(IL-7R)及IL-15R。中央記憶T細胞之轉錄因子包含BLIMP1。效應記憶T細胞在抗原刺激之

後快速分泌高含量發炎性細胞介素，包含干擾素-γ、IL4-及IL-5。效應記憶T細胞主要存在於血液的CD8隔室中，且在人類中按比例富集於肺、肝臟及腸道中。CD8+效應記憶T細胞攜帶大量的穿孔素。

【0689】術語「密閉系統」係指對外部環境密閉之系統。適用於細胞培養方法之任何密閉系統均可用於本發明之方法。密閉系統包含例如(但不限於)密閉G容器。一旦將腫瘤區段添加至密閉系統中，該系統不對外部環境開放，直至TIL準備好向患者投予為止。

【0690】如本文所用，術語「碎斷(fragmenting)」、「碎片(fragment)」及「碎斷的(fragmented)」描述將腫瘤破壞之過程，包含機械碎斷方法，諸如壓碎、切片、分割及粉碎腫瘤組織，以及任何其他用於破壞腫瘤組織之物理結構的方法。

【0691】術語「細針抽吸(fine needle aspirate)」或FNA係指一種活體組織切片程序，其可用於取樣或診斷程序，包含腫瘤取樣，其中獲取樣本但不移除或切除腫瘤。在細針抽吸中，將空心針(例如25-18規格)插入至腫瘤中或至含有腫瘤之區域中，且獲得流體及細胞(包含組織)以用於如本文所描述之進一步分析或擴增。使用FNA，移除細胞而無需保留組織細胞之組織學架構。FNA可包括TIL。在一些情況下，使用超音波導引細針抽吸活體組織切片針進行細針抽吸活體組織切片。FNA針可購自碧迪醫療公司(Becton Dickinson)、柯惠醫療公司等。

【0692】術語「粗針活體組織切片(core biopsy)或芯針活體組織切片(core needle biopsy)」係指一種活體組織切片程序，其可用於取樣或診斷程序，包含腫瘤取樣，其中獲取樣本但不移除或切除腫瘤。在粗針活體組織切片中，將空心針(例如16-11規格)插入至腫瘤中或至含有腫瘤之區域中，且獲得流體及細胞(包含組織)以用於如本文所描述之進一步分析或擴增。使用粗針活體組織切片，鑒於其針之大小比FNA大，可在保留組織細胞之一些組織學架構的情況下移除細胞。粗針活體組織切片針一般具有能夠保留腫瘤之組織學架構之至少某一部分的規格大小。粗針活體組織切片可包括TIL。在一些情況下，使用可購自Bard Medical、碧迪醫療公司等的活體組織切片儀器、真空輔助芯針活體組織切片儀器、立體定向導引芯針活體組織切片儀器、超音波導引芯針活體組織切片儀器、MRI導引芯針活體組織切片儀器進行芯針活體組織切片。

【0693】術語「周邊血液單核細胞」及「PBMC」係指具有圓形細胞核之周邊血液細胞，包含淋巴球(T細胞、B細胞、NK細胞)及單核球。當用作抗原呈現細胞(PBMC為一種類型之抗原呈現細胞)時，周邊血液單核細胞為經照射之同種異體周邊血液單核細胞。

【0694】術語「周邊血液淋巴球」及「PBL」係指自周邊血液擴增的T細胞。在一些實施例中，PBL係與來自供體之全血或血球分離術產物分離。在一些實施例中，PBL係藉由正向或負向選擇T細胞表型(諸如CD3+ CD45+之

T細胞表型)而與來自供體之全血或血球分離術產物分離。

【0695】術語「抗CD3抗體」係指針對成熟T細胞之T細胞抗原受體中之CD3受體的抗體或其變體，例如單株抗體，且包含人類、人源化、嵌合、鼠類或哺乳動物抗體。抗CD3抗體包含OKT-3，亦稱為莫羅單抗。抗CD3抗體亦包含UHCT1選殖株，亦稱為T3及CD3ε。其他抗CD3抗體包含例如奧昔珠單抗(otelixizumab)、替利珠單抗(teplizuma)及維西珠單抗(visilizumab)。

【0696】術語「OKT-3」(在本文中亦被稱作「OKT3」)係指針對成熟T細胞之T細胞抗原受體中之CD3受體的單株抗體或其生物類似物或變體，包含人類、人源化、嵌合或鼠類抗體，且包含市售形式，諸如OKT-3(30 ng/mL，MACS GMP CD3純，美國加利福尼亞州聖地亞哥美天旎生物技術公司(Miltenyi Biotech, Inc, San Diego, CA, USA))及莫羅單抗或其變體、保守胺基酸取代、糖化形式或生物類似物。莫羅單抗之重鏈及輕鏈之胺基酸序列在表1中給出(SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:2)。能夠產生OKT-3之融合瘤寄存於美國菌種保藏中心(美國菌種保藏中心)且所指派之ATCC寄存號為CRL 8001。能夠產生OKT-3之融合瘤亦寄存於歐洲認證細胞培養物保藏中心(European Collection of Authenticated Cell Cultures；ECACC)且所指派之目錄號為86022706。

表 1.莫羅單抗（例示性 OKT-3 抗體）之胺基酸序列。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:1 莫羅單抗重鏈	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY 60 NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA 120 KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL 180 YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO:2 莫羅單抗輕鏈	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH 60 FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS 120 SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL 180 TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213

【0697】術語「IL-2」(在本文中亦稱為「IL2」)係指稱為介白素-2之T細胞生長因子，且包含所有形式之IL-2，包含人類及哺乳動物形式、保守胺基酸取代、糖化形式、生物類似物及其變體。IL-2係描述於例如Nelson的

《免疫學雜誌(*J. Immunol.*)》**2004,** *172,* 3983-88及Malek,《免疫學年度評論(*Annu. Rev. Immunol.*)》**2008,** *26,* 453-79，其揭示內容以引用之方式併入本文中。適用於本發明之重組人類IL-2之胺基酸序列於表2中給出(SEQ ID NO:3)。舉例而言，術語IL-2涵蓋人類重組形式之IL-2，諸如阿地介白素(PROLEUKIN，可購自多個供應商，每單次使用小瓶含22百萬IU)以及由美國新罕布什爾州次茅斯的CellGenix, Inc.或美國新澤西州東不倫瑞克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目錄號CYT-209-b)供應的重組IL-2形式及來自其他供應商的其他商業等效物。阿地介白素(去丙胺醯基-1，絲胺酸-125人類IL-2)為分子量大約15 kDa之非糖基化人類重組形式的IL-2。適用於本發明之阿地介白素之胺基酸序列於表2中給出(SEQ ID NO:4)。術語IL-2亦涵蓋如本文所描述之聚乙二醇化形式的IL-2，包含聚乙二醇化IL2前藥貝培阿地介白素(bempegaldesleukin)(NKTR-214，如同SEQ ID NO:4之聚乙二醇化人類重組IL-2，其中平均6個離胺酸殘基係經[(2,7-雙{[甲基聚(氧乙烯)]胺基甲醯基}-9H-芴-9-基)甲氧基]羰基取代的N^6)，其可購自美國加利福尼亞州南舊金山的Nektar Therapeutics，或可藉由本領域中已知之方法製備，諸如國際專利申請公開案第WO 2018/132496 A1號之實例19中描述之方法或美國專利申請公開案第US 2019/0275133 A1號之實例1中描述之方法，該等公開案之揭示內容以引用之方式併入本文中。適用於本發明之貝培阿地白介素(NKTR-214)及其他聚乙二醇化IL2

分子描述於美國專利申請公開案第US 2014/0328791 A1號及國際專利申請公開案第WO 2012/065086 A1號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。適用於本發明之替代形式的結合IL-2描述於美國專利第4,766,106號、第5,206,344號、第5,089,261號及第4,902,502號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。適用於本發明之IL-2調配物描述於美國專利第6,706,289號中，其揭示內容以引用的方式併入本文中。

【0698】在一些實施例中，適合用於本發明之IL-2形式為可購自Synthorx,Inc.之THOR-707。THOR-707及適用於本發明之另外替代形式之IL-2的製備及特性描述於美國專利申請公開案第US 2020/0181220 A1號及第US 2020/0330601 A1號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為介白素2(IL-2)結合物，其包括：分離及純化之IL-2多肽；及在選自以下之胺基酸位置結合至分離及純化之IL-2多肽的結合部分：K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72及Y107，其中胺基酸殘基之編號對應於SEQ ID NO:5。在一些實施例中，胺基酸位置選自T37、R38、T41、F42、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72及Y107。在一些實施例中，胺基酸位置選自T37、R38、T41、F42、F44、Y45、E61、E62、E68、P65、V69、L72及Y107。在一些實施例中，胺基酸位置選自T37、T41、F42、F44、Y45、P65、

V69、L72及Y107。在一些實施例中，胺基酸位置選自R38及K64。在一些實施例中，胺基酸位置選自E61、E62及E68。在一些實施例中，胺基酸位置在E62。在一些實施例中，選自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72及Y107之胺基酸殘基進一步突變成離胺酸、半胱胺酸或組胺酸。在一些實施例中，胺基酸殘基突變成半胱胺酸。在一些實施例中，胺基酸殘基突變成離胺酸。在一些實施例中，選自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72及Y107之胺基酸殘基進一步突變成非天然胺基酸。在一些實施例中，非天然胺基酸包括N6-疊氮基乙氧基-L-離胺酸(AzK)、N6-炔丙基乙氧基-L-離胺酸(PraK)、BCN-L-離胺酸、降冰片烯離胺酸、TCO-離胺酸、甲基四嗪離胺酸、烯丙氧基羰基離胺酸、2-胺基-8-側氧基壬酸、2-胺基-8-側氧基辛酸、對乙醯基-L-苯丙胺酸、對疊氮基甲基-L-苯丙胺酸(pAMF)、對碘-L-苯丙胺酸、間乙醯基苯丙胺酸、2-胺基-8-側氧基壬酸、對炔丙基氧基苯丙胺酸、對炔丙基-苯丙胺酸、3-甲基-苯丙胺酸、L-多巴(L-Dopa)、氟化苯丙胺酸、異丙基-L-苯丙胺酸、對疊氮基-L-苯丙胺酸、對醯基-L-苯丙胺酸、對苯甲醯基-L-苯丙胺酸、對溴苯基丙胺酸、對胺基-L-苯丙胺酸、異丙基-L-苯丙胺酸、O-烯丙基酪胺酸、O-甲基-L-酪胺酸、O-4-烯丙基-L-酪胺酸、4-丙基-L-酪胺酸、膦醯基酪胺酸、三-O-乙醯基-GlcNAcp-絲胺酸、L-磷絲胺酸、膦

醯基絲胺酸、L-3-(2-萘基)丙胺酸、2-胺基-3-((2-((3-(苯甲氧基)-3-側氧基丙基)胺基)乙基)硒烷基)丙酸、2-胺基-3-(苯基硒烷基)丙酸或硒半胱胺酸。在一些實施例中，相對於野生型IL-2多肽，IL-2結合物與IL-2受體α(IL-2Rα)次單元之親和力降低。在一些實施例中，相對於野生型IL-2多肽，降低之親和力係與IL-2Rα之結合親和力降低約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或大於99%。在一些實施例中，相對於野生型IL-2多肽，降低之親和力係約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倍或更大。在一些實施例中，結合部分削弱或阻斷IL-2與IL-2Rα之結合。在一些實施例中，結合部分包括水溶性聚合物。在一些實施例中，另外的結合部分包括水溶性聚合物。在一些實施例中，水溶性聚合物各獨立地包括聚乙二醇(PEG)、聚(丙二醇)(PPG)、乙二醇及丙二醇之共聚物、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯吡咯啶酮)、聚(羥烷基甲基丙烯醯胺)、聚(羥烷基甲基丙烯酸酯)、聚(醣)、聚(α-羥基酸)、聚(乙烯醇)、聚磷氮烯、聚噁唑啉(POZ)、聚(N-丙烯醯嗎啉)或其組合。在一些實施例中，水溶性聚合物各獨立地包括PEG。在一些實施例中，PEG為線性PEG或分支鏈PEG。在一些實施例中，水溶性聚合物各獨立地包括多醣。在一些實施例中，多醣包括聚葡萄糖、聚唾液酸(PSA)、玻尿酸(HA)、直鏈澱粉、肝素、硫酸乙醯肝素(HS)、糊精或羥乙基澱粉

(HES)。在一些實施例中，水溶性聚合物各獨立地包括聚醣。在一些實施例中，水溶性聚合物各獨立地包括多元胺。在一些實施例中，結合部分包括蛋白質。在一些實施例中，另外的結合部分包括蛋白質。在一些實施例中，蛋白質各獨立地包括白蛋白、轉鐵蛋白(transferrin)或運甲狀腺素蛋白(transthyretin)。在一些實施例中，蛋白質各獨立地包括Fc部分。在一些實施例中，蛋白質各獨立地包括IgG之Fc部分。在一些實施例中，結合部分包括多肽。在一些實施例中，另外的結合部分包括多肽。在一些實施例中，多肽各獨立地包括XTEN肽、富甘胺酸高胺基酸聚合物(HAP)、PAS多肽、彈性蛋白樣多肽(ELP)、CTP肽或明膠樣蛋白質(GLK)聚合物。在一些實施例中，分離及純化之IL-2多肽藉由麩胺醯化修飾。在一些實施例中，結合部分直接結合至分離及純化之IL-2多肽。在一些實施例中，結合部分經由連接子間接結合至分離及純化之IL-2多肽。在一些實施例中，連接子包括同型雙官能連接子。在一些實施例中，同型雙官能連接子包括羅曼特氏試劑(Lomant's reagent)二硫代雙(琥珀醯亞胺基丙酸酯)DSP、3'3'-二硫代雙(丙酸磺基琥珀醯亞胺酯)(DTSSP)、辛二酸二琥珀醯亞胺酯(DSS)、辛二酸雙(磺基琥珀醯亞胺酯)(BS)、酒石酸二琥珀醯亞胺酯(DST)、酒石酸二磺基琥珀醯亞胺酯(磺基DST)、糖基雙(琥珀醯亞胺基丁二酸)伸乙酯(EGS)、戊二酸二琥珀醯亞胺酯(DSG)、碳酸N,N'-二琥珀醯亞胺酯(DSC)、二亞胺代二酸二甲酯(DMA)、庚二亞胺酸二甲酯

(DMP)、辛二亞胺酸二甲酯(DMS)、二甲基-3,3'-二硫代雙丙醯亞胺酸酯(DTBP)、1,4-二(3'-(2'-吡啶基二硫基)丙醯胺基)丁烷(DPDPB)、雙順丁烯二醯亞胺基己烷(BMH)、含有芳基鹵化物之化合物(DFDNB)(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯或1,3-二氟-4,6-二硝基苯)、4,4'-二氟-3,3'-二硝基苯基碸(DFDNPS)、雙-[β-(4-疊氮基柳基醯胺基)乙基]二硫化物(BASED)、甲醛、戊二醛、1,4-丁二醇二縮水甘油醚、己二酸二醯肼、碳醯肼、鄰甲苯胺、3,3'-二甲基聯苯胺、聯苯胺、α,α'-對二胺基聯苯、二碘-對二甲苯磺酸、N,N'-伸乙基-雙(碘乙醯胺)或N,N'-六亞甲基-雙(碘乙醯胺)。在一些實施例中，連接子包括異型雙官能連接子。在一些實施例中，異型雙官能連接子包括3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-琥珀醯亞胺酯(sPDP)、長鏈3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-琥珀醯亞胺酯(LC-sPDP)、水溶性長鏈3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-琥珀醯亞胺酯(磺基-LC-sPDP)、琥珀醯亞胺基氧基羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基二硫基)甲苯(sMPT)、磺基琥珀醯亞胺基-6-[α-甲基-α-(2-吡啶基二硫基)甲苯醯胺基]己酸酯(磺基-LC-sMPT)、琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(sMCC)、磺基琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)、間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基琥珀醯亞胺酯(MBs)、間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-MBs)、(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸N-琥珀醯亞胺酯(sIAB)、(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-

sIAB)、琥珀醯亞胺基-4-(對順丁烯二醯亞胺基苯基)丁酸酯(sMPB)、磺基琥珀醯亞胺基-4-(對順丁烯二醯亞胺基苯基)丁酸酯(磺基-sMPB)、N-(γ-順丁烯二醯亞胺基丁醯氧基)琥珀醯亞胺酯(GMBs)、N-(γ-順丁烯二醯亞胺基丁醯氧基)磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-GMBs)、6-((碘乙醯基)胺基)己酸琥珀醯亞胺酯(sIAX)、6-[6-(((碘乙醯基)胺基)己醯基)胺基]己酸琥珀醯亞胺酯(sIAXX)、4-(((碘乙醯基)胺基)甲基)環己烷-1-甲酸琥珀醯亞胺酯(sIAC)、6-(((((4-碘乙醯基)胺基)甲基)環己烷-1-羰基)胺基)己酸琥珀醯亞胺酯(sIACX)、碘乙酸對硝苯酯(NPIA)、羰基反應性及硫氫基反應性交聯劑，諸如4-(4-N-順丁烯二醯亞胺基苯基)丁酸醯肼(MPBH)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-羧基-醯肼-8(M_2C_2H)、3-(2-吡啶基二硫基)丙醯基醯肼(PDPH)、N-羥基琥珀醯亞胺基-4-疊氮柳酸(NHs-AsA)、N-羥基磺基琥珀醯亞胺基-4-疊氮水楊酸(磺基-NHs-AsA)、磺基琥珀醯亞胺基-(4-疊氮柳基醯胺基己酸酯(磺基-NHs-LC-AsA)、磺基琥珀醯亞胺基-2-(對疊氮柳基醯胺基)乙基-1,3'-二硫丙酸酯(sAsD)、N-羥基琥珀醯亞胺基-4-疊氮苯甲酸酯(HsAB)、N-羥基磺基琥珀醯亞胺基-4-疊氮苯甲酸酯(磺基-HsAB)、N-琥珀醯亞胺基-6-(4'-疊氮基-2'-硝基苯基胺基)己酸酯(sANPAH)、磺基琥珀醯亞胺基-6-(4'-疊氮基-2'-硝基苯基胺基)己酸酯(磺基-sANPAH)、N-5-疊氮基-2-硝基苯甲醯氧基丁二醯亞胺(ANB-NOs)、磺基琥珀醯亞胺基-2-(間疊氮基-鄰硝基苯甲醯胺基)-乙基-1,3'-二硫丙酸酯

(sAND)、N-琥珀醯亞胺基-4(4-疊氮苯基)1,3'-二硫丙酸酯(sADP)、(4-疊氮苯基)-1,3'-二硫丙酸N-磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-sADP)、4-(對疊氮苯基)丁酸磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-sAPB)、2-(7-疊氮基-4-甲基香豆素-3-乙醯胺)乙基-1,3'-二硫丙酸磺基琥珀醯亞胺酯(sAED)、7-疊氮基-4-甲基香豆素-3-乙酸磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-sAMCA)、重氮丙酮酸對硝苯酯(ρNPDP)、對硝苯基-2-重氮-3,3,3-三氟丙酸酯(PNP-DTP)、1-(對疊氮基柳基醯胺基)-4-(碘乙醯胺基)丁烷(AsIB)、N-[4-(對疊氮基柳基醯胺基)丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫基)丙醯胺(APDP)、二苯甲酮-4-碘乙醯胺、對疊氮基苯甲醯基醯肼(ABH)、4-(對疊氮基柳基醯胺基)丁胺(AsBA)或對疊氮苯基乙二醛(APG)。在一些實施例中，連接子包括可裂解連接子，視情況包括二肽連接子。在一些實施例中，二肽連接子包括Val-Cit、Phe-Lys、Val-Ala或Val-Lys。在一些實施例中，連接子包括不可裂解連接子。在一些實施例中，連接子包括順丁烯二醯亞胺基，視情況包括順丁烯二醯亞胺基己醯基(mc)、琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(sMCC)或磺基琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)。在一些實施例中，連接子進一步包括間隔子。在一些實施例中，間隔子包括對胺基苯甲基醇(PAB)、對胺基苯甲氧基羰基(PABC)、其衍生物或類似物。在一些實施例中，結合部分能夠延長IL-2結合物之血清半衰期。在一些實施例中，另外的結合部分能夠延長

IL-2結合物之血清半衰期。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為本文所描述之任一種IL-2形式的片段。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式係如美國專利申請公開案US 2020/0181220 A1號及美國專利申請公開案US 2020/0330601 A1號中所揭示般聚乙二醇化。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為IL-2結合物，其包括：IL-2多肽，其包括N6-疊氮基乙氧基-離胺酸(AzK)，其共價連接於包括聚乙二醇(PEG)之結合部分，其中：IL-2多肽包括與SEQ ID NO:5具有至少80%序列一致性之胺基酸序列；及參照SEQ ID NO:5中的胺基酸位置對於位置K35、F42、F44、K43、E62、P65、R38、T41、E68、Y45、V69或L72處的胺基酸的AzK取代物。在一些實施例中，IL-2多肽包括相對於SEQ ID NO:5之一個殘基的N端缺失。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式缺乏IL-2R α鏈接合，但保持與中間親和力IL-2R β-γ傳訊複合物的正常結合。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為IL-2結合物，其包括：IL-2多肽，其包括N6-疊氮基乙氧基-離胺酸(AzK)，其共價連接於包括聚乙二醇(PEG)之結合部分，其中：IL-2多肽包括與SEQ ID NO:5具有至少90%序列一致性之胺基酸序列；及參照SEQ ID NO:5中的胺基酸位置對於位置K35、F42、F44、K43、E62、P65、R38、T41、E68、Y45、V69或L72處的胺基酸的AzK取代物。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為IL-2結合物，其包括：IL-2多肽，其包括N6-疊氮基乙氧基-離胺酸(AzK)，

其共價連接於包括聚乙二醇(PEG)之結合部分，其中：IL-2多肽包括與SEQ ID NO:5具有至少95%序列一致性之胺基酸序列；及參照SEQ ID NO:5中的胺基酸位置對於位置K35、F42、F44、K43、E62、P65、R38、T41、E68、Y45、V69或L72處的胺基酸的AzK取代物。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為IL-2結合物，其包括：IL-2多肽，其包括N6-疊氮基乙氧基-離胺酸(AzK)，其共價連接於包括聚乙二醇(PEG)之結合部分，其中：IL-2多肽包括與SEQ ID NO:5具有至少98%序列一致性之胺基酸序列；及參照SEQ ID NO:570中的胺基酸位置對於位置K35、F42、F44、K43、E62、P65、R38、T41、E68、Y45、V69或L72處的胺基酸的AzK取代物。

【0699】在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式之內維介白素α(nemvaleukin nemvaleukin)(亦稱為ALKS-4230(SEQ ID NO:571)，其購自阿爾凱默斯公司(Alkermes, Inc.))。內維介白素α亦被稱為人類介白素2片段(1-59)變體($Cys^{125}>Ser^{51}$)，其經由肽基連接子($^{60}GG^{61}$)融合至人類介白素2片段(62-132)，經由肽基連接子($^{133}GSGGGS^{138}$)融合至人類介白素2受體α鏈片段(139-303)，在中國倉鼠卵巢(CHO)細胞中產生，經糖基化；人類介白素2(IL-2)(75-133)-肽[Cys^{125}(51)>Ser]-突變體(1-59)，其經由G_2肽連接子(60-61)融合至人類介白素2(IL-2)(4-74)-肽(62-132)且經由GSG_3S肽連接子(133-138)融合至人類介白素2受體α鏈(IL2R次單位α、IL2Rα、IL2RA)(1-165)-肽(139-303)，在

中國倉鼠卵巢(CHO)細胞中產生，糖化形式α。內維介白素α之胺基酸序列係SEQ ID NO:571中所載。在一些實施例中，內維介白素α展現以下轉譯後修飾：在以下位置處之雙硫鍵：31-116、141-285、184-242、269-301、166-197或166-199、168-199或168-197(使用SEQ ID NO: 571中之編號)，及使用SEQ ID NO: 571中之編號在位置N187、N206、T212處之糖基化位點。內維介白素α以及適用於本發明之另外替代形式的IL-2之製備及特性描述於美國專利申請公開案第US 2021/0038684 A1號及美國專利第10,183,979號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為與SEQ ID NO: 571具有至少80%、至少90%、至少95%或至少90%序列一致性的蛋白質。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式具有SEQ ID NO: 571中所載之胺基酸序列或其保守胺基酸取代。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為包括SEQ ID NO:572之胺基酸24-452或其變體、片段或衍生物的融合蛋白。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為包括與SEQ ID NO: 572之胺基酸24-452或其變體、片段或衍生物具有至少80%、至少90%、至少95%或至少90%序列一致性之胺基酸序列的融合蛋白。適合用於本發明之其他IL-2形式描述於美國專利第10,183,979號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。視情況，在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為包括第一融合搭配物之融合蛋白，該第一融合搭配物藉由黏蛋白域多肽連

接子與第二融合搭配物連接，其中該第一融合搭配物為IL-1Rα或與IL-1Rα具有至少98%胺基酸序列一致性並且具有IL-Rα的受體拮抗劑活性的蛋白質，並且其中該第二融合搭配物包括全部或部分包括Fc區的免疫球蛋白，其中該黏蛋白域多肽連接子包括SEQ ID NO:573或與SEQ ID NO:573具有至少90%序列一致性的胺基酸序列，並且其中融合蛋白的半衰期與第一融合搭配物在沒有黏蛋白域多肽連接子的情況下與第二融合搭配物的融合相比有所改良。

表 2.介白素的胺基酸序列。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:3 重組人類 IL-2 （rhIL-2）	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
SEQ ID NO:4 阿地介白素	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
SEQ ID NO:5 重組人類 IL-4 （rhIL-4）	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREKYSKCSS 130
SEQ ID NO:6 重組人類 IL-7 （rhIL-7）	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH 153
SEQ ID NO:7 重組人類 IL-15 （rhIL-15）	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115
SEQ ID NO:8 重組人類 IL-21 （rhIL-21）	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132
SEQ ID NO: 570 IL-2 形式	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLT 133

SEQ ID NO：571 IL-2 形式	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
SEQ ID NO：572 IL-2 形式	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 QPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK 420 SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK 453
SEQ ID NO: 573 黏蛋白域多肽	SESSASSDGP HPVITP 16

【0700】在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式包含抗體細胞介素移植蛋白，該抗體細胞介素移植蛋白包括：重鏈可變區(V_H)，其包括互補決定區HCDR1、HCDR2、HCDR3；輕鏈可變區(V_L)，其包括LCDR1、

LCDR2、LCDR3；及IL-2分子或其片段，其移植至V_H或V_L之CDR中，其中該抗體細胞介素移植蛋白優先於調節性T細胞擴增T效應細胞。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括重鏈可變區(V_H)，其包括互補決定區HCDR1、HCDR2、HCDR3；輕鏈可變區(V_L)，其包括LCDR1、LCDR2、LCDR3；及IL-2分子或其片段，其移植至V_H或V_L之CDR中，其中該IL-2分子為突變蛋白，並且其中該抗體細胞介素移植蛋白優先於調節性T細胞擴增T效應細胞。在一些實施例中，IL-2方案包括投予美國專利申請公開案第US 2020/0270334 A1號中所描述之抗體，該公開案之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括：重鏈可變區(V_H)，其包括互補決定區HCDR1、HCDR2、HCDR3；輕鏈可變區(V_L)，其包括LCDR1、LCDR2、LCDR3；及IL-2分子或其片段，其移植至V_H或V_L之CDR中；其中該IL-2分子為突變蛋白(mutein)，其中該抗體細胞介素移植蛋白優先於調節性T細胞擴增T效應細胞，並且其中該抗體進一步包括IgG類重鏈及IgG類輕鏈，其選自由以下組成之群組：包括SEQ ID NO:569之IgG類輕鏈及包括SEQ ID NO:568之IgG類重鏈；包括SEQ ID NO:567之IgG類輕鏈及包括SEQ ID NO:559之IgG類重鏈；包括SEQ ID NO:569之IgG類輕鏈及包括SEQ ID NO:559之IgG類重鏈；以及包括SEQ ID NO:37之IgG類輕鏈及包括SEQ ID NO:568之IgG類重鏈。

【0701】在一些實施例中，IL-2分子或其片段移植至

V_H之HCDR1中，其中IL-2分子為突變蛋白。在一些實施例中，IL-2分子或其片段移植至V_H之HCDR2中，其中IL-2分子為突變蛋白。在一些實施例中，IL-2分子或其片段移植至V_H之HCDR3中，其中IL-2分子為突變蛋白。在一些實施例中，IL-2分子或其片段移植至V_L之LCDR1中，其中IL-2分子為突變蛋白。在一些實施例中，IL-2分子或其片段移植至V_L之LCDR2中，其中IL-2分子為突變蛋白。在一些實施例中，IL-2分子或其片段移植至V_L之LCDR3中，其中IL-2分子為突變蛋白。

【0702】IL-2分子之插入可在CDR之N端區處或附近，在CDR之中間區中，或在CDR之C端區處或附近。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白質包括併入CDR中之IL-2分子，其中IL2序列不會將CDR序列框移。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括併入CDR中之IL-2分子，其中IL-2序列置換CDR序列之全部或一部分。IL-2分子置換可在CDR之N端區處，在CDR之中間區中，或在CDR之C端區處或附近。IL-2分子置換可少至CDR序列或整個CDR序列之一或兩個胺基酸。

【0703】在一些實施例中，IL-2分子直接移植至無肽連接子之CDR中，其中在CDR序列與IL-2序列之間沒有另外的胺基酸。在一些實施例中，IL-2分子間接移植至具有肽連接子之CDR中，其中CDR序列與IL-2序列之間存在一個或多個另外的胺基酸。

【0704】在一些實施例中，本文所描述之IL-2分子為

IL-2突變蛋白。在一些情況下，IL-2突變蛋白包括R67A取代。在一些實施例中，IL-2突變蛋白包括胺基酸序列SEQ ID NO:544或SEQ ID NO:545。在一些實施例中，IL-2突變蛋白包括美國專利申請公開案第US 2020/0270334 A1號中表1中的胺基酸序列，該公開案之揭示內容以引用之方式併入本文。

【0705】在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括選自由SEQ ID NO:546、SEQ ID NO:549、SEQ ID NO:552及SEQ ID NO:555組成之群組的HCDR1。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白質包括選自由SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:543及SEQ ID NO:546組成之群組的HCDR1。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括HCDR1，其選自由以下組成之群組：選自由SEQ ID NO:547、SEQ ID NO:550、SEQ ID NO:553及SEQ ID NO:556組成之群組的HCDR2。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括選自由SEQ ID NO:548、SEQ ID NO:551、SEQ ID NO:554及SEQ ID NO:557組成之群組的HCDR3。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括V_H區，其包括SEQ ID NO:558之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括重鏈，其包括SEQ ID NO:559之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括V_L區，其包括SEQ ID NO:566之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括輕鏈，其包括SEQ ID NO:567之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體

細胞介素移植蛋白包括V_H區，其包括SEQ ID NO:28之胺基酸序列；及V_L區，其包括SEQ ID NO:566之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括重鏈區，其包括SEQ ID NO:559之胺基酸序列；及輕鏈區，其包括SEQ ID NO:567之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括重鏈區，其包括SEQ ID NO:559之胺基酸序列；及輕鏈區，其包括SEQ ID NO:569之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括重鏈區，其包括SEQ ID NO:568之胺基酸序列；及輕鏈區，其包括SEQ ID NO:567之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括重鏈區，其包括SEQ ID NO:568之胺基酸序列；及輕鏈區，其包括SEQ ID NO:569之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括美國專利申請公開案第2020/0270334 A1號之IgG.IL2F71A.H1或IgG.IL2R67A.H1或其變體、衍生物或片段，或其保守胺基酸取代，或與其具有至少80%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的蛋白質。在一些實施例中，本文所描述之抗體細胞介素移植蛋白之抗體組分包括帕利珠單抗之免疫球蛋白序列、構架序列或CDR序列。在一些實施例中，本文所描述之抗體細胞介素移植蛋白的血清半衰期比野生型IL-2分子(諸如但不限於阿地介白素或可比分子)長。

表 3：例示性帕利珠單抗抗體-IL-2 移植蛋白之序列

識別號 US 2020/0270334	SEQ ID NO:	序列
SEQ ID NO:2 IL-2	SEQ ID NO:543 IL-2	MYRMQLLSCI ALSLALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN 50 YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL 100 RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS 150 TLT 153

SEQ ID NO:4 IL-2 突變蛋白	SEQ ID NO:544 IL-2 突變蛋白	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA 50 TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE 100 TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT 133
SEQ ID NO:6 IL-2 突變蛋白	SEQ ID NO:545 IL-2 突變蛋白	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TAKFYMPKKA 50 TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE 100 TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT 133
IgG.IL2R67A.H1	IgG.IL2R67A.H1	
SEQ ID NO:7 HCDR1_IL-2	SEQ ID NO:546 HCDR1_IL-2	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM 50 PKKATELKHL QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL 100 KGSETTFMCE YADETATIVE FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMSVG 145
SEQ ID NO:8 HCDR2	SEQ ID NO:547 HCDR2	DIWWDDKKDY NPSLKS 16
SEQ ID NO:9 HCDR3	SEQ ID NO:548 HCDR3	SMITNWYFDV 10
SEQ ID NO:10 HCDR1_IL-2 kabat	SEQ ID NO:549 HCDR1_IL-2 kabat	TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE 100 TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLTSTSGMSV G 141
SEQ ID NO:11 HCDR2 kabat	SEQ ID NO:550 HCDR2 kabat	DIWWDDKKDY NPSLKS 16

SEQ ID NO:12 HCDR3 kabat	SEQ ID NO:551 HCDR3 kabat	SMITNWYFDV 10
SEQ ID NO:13 HCDR1_IL-2 clothia	SEQ ID NO:552 HCDR1_IL-2 clothia	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM 50 PKKATELKHL QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL 100 KGSETTFMCE YADETATIVE FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GM 142
SEQ ID NO:14 HCDR2 clothia	SEQ ID NO:553 HCDR2 clothia	WWDDK 5
SEQ ID NO:15 HCDR3 clothia	SEQ ID NO:554 HCDR3 clothia	SMITNWYFDV 10
SEQ ID NO:16 HCDR1_IL-2 IMGT	SEQ ID NO:555 HCDR1_IL-2 IMGT	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM 50 PKKATELKHL QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL 100 KGSETTFMCE YADETATIVE FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMS 143
SEQ ID NO:17 HCDR2 IMGT	SEQ ID NO:556 HCDR2 IMGT	IWWDDKK 7
SEQ ID NO:18 HCDR3 IMGT	SEQ ID NO:557 HCDR3 IMGT	ARSMITNWYF DV 12

SEQ ID NO:19 VH	SEQ ID NO:558 VH	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL 50 QMILNGINNY KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN 100 LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 150 ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL EWLADIWWDD KKDYNPSLKS 200 RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWYF DVWGAGTTVT 250 VSS 253

SEQ ID NO:21 重鏈	SEQ ID NO:559 重鏈	QMILNGINNY KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN 100 LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 150 ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL EWLADIWWDD KKDYNPSLKS 200 RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWYF DVWGAGTTVT 250 VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT 300 SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR 350 VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV 400 AVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL 450 NGKEYKCKVS NKALAAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS 500 LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK 550 SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK 583
SEQ ID NO:26 LCDR1 kabat	SEQ ID NO:560 LCDR1 kabat	KAQLSVGYMH 10
SEQ ID NO:27 LCDR2 kabat	SEQ ID NO:561 LCDR2 kabat	DTSKLAS 7

SEQ ID NO:28 LCDR3 kabat	SEQ ID NO:562 LCDR3 kabat	FQGSGYPFT 9
SEQ ID NO:29 LCDR1 chothia	SEQ ID NO:563 LCDR1 chothia	QLSVGY 6
SEQ ID NO:30 LCDR2 chothia	SEQ ID NO:564 LCDR2 chothia	DTS 3
SEQ ID NO:31 LCDR3 chothia	SEQ ID NO:565 LCDR3 chothia	GSGYPF 6
SEQ ID NO:35 VL	SEQ ID NO:566 VL	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT 50 SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG 100 TKLEIK 106
SEQ ID NO:37 輕鏈	SEQ ID NO:567 輕鏈	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT 50 SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG 100 TKLEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD 150 NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL 200 SSPVTKSFNR GEC 213

SEQ ID NO:53 輕鏈	SEQ ID NO:568 輕鏈	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL 50 QMILNGINNY KNPKLTRMLT AKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN 100 LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 150 ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL EWLADIWWDD KKDYNPSLKS 200 RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWYF DVWGAGTTVT 250 VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT 300 SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR 350 VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV 400 AVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL 450 NGKEYKCKVS NKALAAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS 500 LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK 550 SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK 583

SEQ ID NO:69 輕鏈	SEQ ID NO:569 輕鏈	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT 50 SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG 100 TKLEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD 150 NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL 200 SSPVTKSFNR GEC 213

【0706】術語「IL-4」(在本文中亦稱「IL4」)係指被稱為介白素4之細胞介素，其由Th2 T細胞及嗜酸性球、嗜鹼性球及肥大細胞產生。IL-4調節初始輔助T細胞(Th0細胞)分化成Th2 T細胞。Steinke及Borish，《呼吸研究(*Respir. Res.*)》**2001,** *2,* 66-70。在由IL-4活化後，Th2 T細胞隨後以正回饋迴路產生另外IL-4。IL-4亦刺激B細胞增殖及II類MHC表現，且誘導來自B細胞之類別轉換至IgE及IgG1表現。適用於本發明之重組人類IL-4可購自多個供應商，包含美國新澤西州東不倫瑞克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目錄號CYT-211)及美國馬薩諸塞州沃爾瑟姆的賽默飛世爾科技公司(ThermoFisher Scientific，Inc.)(人類IL-15重組蛋白，目錄號Gibco CTP0043)。適用於本發明之重組人類IL-4之胺基酸序列於表2中給出(SEQ ID NO:5)。

【0707】術語「IL-7」(在本文中亦稱為「IL7」)係指稱為介白素7的糖基化的組織衍生性細胞介素，其可獲自基質及上皮細胞以及樹突狀細胞。Fry及Mackall，《血液

(*Blood*)》**2002**，*99*，*3892-904*。IL-7可以刺激T細胞的發育。IL-7與IL-7受體(一種由IL-7受體α及共同γ鏈受體組成之異二聚體)結合，其屬於對於T細胞在胸腺內之發育及在周邊內之存活而言重要之一系列信號。適用於本發明之重組人類IL-7可購自多個供應商，包含美國新澤西州東不倫瑞克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目錄號CYT-254)及美國馬薩諸塞州沃爾瑟姆的賽默飛世爾科技公司(人類IL-15重組蛋白，目錄號Gibco PHC0071)。適用於本發明之重組人類IL-7之胺基酸序列於表2中給出(SEQ ID NO:6)。

【0708】術語「IL-15」(在本文中亦稱為「IL15」)係指稱為介白素-15之T細胞生長因子，且包含所有形式之IL-2，包含人類及哺乳動物形式、保守胺基酸取代、糖化形式、生物類似物及其變體。IL-15描述於例如Fehniger及Caligiuri的《血液》**2001**, 97, 14-32中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。IL-15與IL-2共用β及γ傳訊受體次單位。重組人類IL-15為分子質量為12.8 kDa的含有114個胺基酸(及N端甲硫胺酸)的單一非糖基化多肽鏈。重組人類IL-15可購自多個供應商，包含美國新澤西州東不倫瑞克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目錄號CYT-230-b)及美國馬薩諸塞州沃爾瑟姆的賽默飛世爾科技公司(人類IL-15重組蛋白，目錄號34-8159-82)。適用於本發明之重組人類IL-15之胺基酸序列於表2中給出(SEQ ID NO:7)。

【0709】術語「IL-21」(在本文中亦稱為「IL21」)係指稱為介白素-21之多效性細胞介素蛋白，且包含所有形

式之IL-21，包含人類及哺乳動物形式、保守胺基酸取代、糖化形式、生物類似物及其變體。IL-21描述於例如Spolski及Leonard，《自然綜述：藥物發現(*Nat. Rev. Drug. Disc.*)》**2014,** *13*, 379-95，其揭示內容以引用之方式併入本文中。IL-21主要藉由自然殺手T細胞及經活化之人類$CD4^+$ T細胞產生。重組人類IL-21為分子質量為15.4 kDa之含有132個胺基酸的單一非糖基化多肽鏈。重組人類IL-21可購自多個供應商，包含美國新澤西州東不倫瑞克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目錄號CYT-408-b)及美國馬薩諸塞州沃爾瑟姆的賽默飛世爾科技公司(人類IL-21重組蛋白，目錄號14-8219-80)。適用於本發明之重組人類IL-21之胺基酸序列於表2中給出(SEQ ID NO:8)。

【0710】當指示「抗腫瘤有效量」、「腫瘤抑制有效量」或「治療量」時，本發明組成物待投予的精確量可由醫師考慮患者(個體)之年齡、體重、腫瘤大小、感染或轉移程度及病狀的個別差異來確定。通常可說明本文所描述之包括腫瘤浸潤性淋巴球(例如繼代TIL或遺傳修飾之細胞毒性淋巴球)的醫藥組成物可以10^4至10^{11}個細胞/公斤體重(例如，10^5至10^6、10^5至10^{10}、10^5至10^{11}、10^6至10^{10}、10^6至10^{11}、10^7至10^{11}、10^7至10^{10}、10^8至10^{11}、10^8至10^{10}、10^9至10^{11}或10^9至10^{10}個細胞/公斤體重)的劑量投予，包含在彼等範圍內之所有整數值。腫瘤浸潤性淋巴球(在一些情況下包含經遺傳修飾之細胞毒性淋巴球)組成物亦可以此等劑量多次投予。腫瘤浸潤性淋巴球(在一些情況下，

包含經遺傳修飾之細胞毒性淋巴球)可藉由使用免疫療法中通常已知之輸注技術進行投予(參見例如Rosenberg等人，《新英格蘭醫學雜誌(*New Eng. J. of Med.*)》319: 1676, 1988)。特定患者之最佳劑量及治療方案可容易由所屬醫藥領域的技術人員藉由監測患者之疾病病徵且相應地調整治療來確定。

【0711】術語「血液惡性病(hematological malignancy/ hematologic malignancy)」或有相關意義之術語係指哺乳動物造血及淋巴組織(包含但不限於血液、骨髓、淋巴結及淋巴系統之組織)的癌症及腫瘤。血液惡性病亦稱為「液體腫瘤」。血液惡性病包含但不限於急性淋巴母細胞白血病(ALL)、慢性淋巴球性淋巴瘤(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤(SLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性單核球性白血病(AMoL)、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)及非霍奇金氏淋巴瘤。術語「B細胞惡性血液病」係指影響B細胞之血液惡性病。

【0712】術語「實體腫瘤」係指通常不含囊腫或液體區域的異常組織團塊。實體腫瘤可為良性或惡性的。術語「實體腫瘤癌症」係指惡性、贅生性或癌性實體腫瘤。實體腫瘤癌症包含但不限於肉瘤、癌瘤及淋巴瘤，諸如肺癌、乳癌、前列腺癌、結腸癌、直腸癌及膀胱癌。實體腫瘤之組織結構包含相互相依組織隔室，包含實質(癌細胞)及有癌細胞分散其中且可提供支援性微環境之支援性基質細胞。

【0713】術語「液體腫瘤」係指性質上為流體的異常細胞團塊。液體腫瘤癌症包含(但不限於)白血病、骨髓瘤及淋巴瘤，以及其他血液惡性病。獲自液體腫瘤之TIL在本文中亦可稱為骨髓浸潤性淋巴球(MIL)。獲自液體腫瘤(包含在周邊血液中循環之液體腫瘤)之TIL在本文中亦可稱為PBL。術語MIL、TIL及PBL在本文中可互換使用且僅基於衍生細胞之組織類型而有所不同。

【0714】如本文所用，術語「微環境」可指作為整體之實體或血液腫瘤微環境或可指在微環境內之個別細胞子集。如本文所用，腫瘤微環境係指以下之複雜混合物：「促進贅生性轉化、支援腫瘤生長及侵襲、保護腫瘤不受宿主免疫力影響、鼓勵治療抗性且提供顯性轉移茁壯成長之生態棲位(niche)之細胞、可溶因子、傳訊分子、細胞外基質及機械信號」，如Swartz等人，《癌症研究(*Cancer Res.*)》, **2012**, *72*, 2473中所描述。儘管腫瘤表現應由T細胞識別之抗原，但由於微環境之免疫抑制，免疫系統清除腫瘤的情況係罕見的。

【0715】在一些實施例中，本發明包含一種用TIL群體治療癌症之方法，其中患者在輸注根據本發明之TIL之前經非骨髓清除式化療預治療。在一些實施例中，可提供TIL群體，其中患者在輸注根據本發明之TIL之前經非骨髓清除式化療預治療。在一些實施例中，非骨髓清除式化療為環磷醯胺60 mg/kg/d持續2天(在TIL輸注前第27及26天)及氟達拉濱25毫克/平方公尺/天持續5天(在TIL輸注前第27

至23天)。在一些實施例中，非骨髓清除式化療為環磷醯胺60 mg/kg/d持續2天(在TIL輸注前第27及26天)及氟達拉濱25毫克/平方公尺/天持續3天(在TIL輸注前第27至25天)。在一些實施例中，非骨髓清除式化療為環磷醯胺60 mg/kg/d持續2天(在TIL輸注前第27及26天)，然後氟達拉濱25毫克/平方公尺/天持續3天(在TIL輸注前第25至23天)。在一些實施例中，在根據本發明之非骨髓清除式化療及TIL輸注之後(第0天)，患者每8小時以720,000 IU/kg靜脈內接受IL-2的靜脈內輸注以達到生理耐受。

【0716】實驗發現表明，在過繼性轉移腫瘤特異性T淋巴球之前，淋巴球耗盡藉由消除調節性T細胞且競爭免疫系統之元件(「細胞介素庫」)在增強治療功效方面發揮關鍵作用。因此，本發明之一些實施例在引入本發明之rTIL之前在患者身上採用淋巴球耗盡步驟(有時亦稱為「免疫抑制性調節」)。

【0717】如本文所用，術語「共同投予(co-administration/co-administering)」、「與...組合投予(administered in combination with/administering in combination with)」、「同時(simultaneous)」及「併發(concurrent)」涵蓋向個體投予兩種或更多種活性醫藥成分(在本發明之一較佳實施例中，例如至少一種鉀通道促效劑與複數個TIL之組合)，以使得活性醫藥成分及/或其代謝物兩者同時存在於個體中。共同投予包含以分開的組成物同時投給予、以分開的組成物在不同時間投予或以其中存在兩種或更多種活性醫藥成分之組成物之形式

投予。以分開的組成物同時投予及以其中存在兩種試劑之組成物之形式投予為較佳的。

【0718】術語「有效量」或「治療有效量」係指如本文所描述之化合物或化合物組合之量，其足以實現所預期應用，包含但不限於疾病治療。治療有效量可視預期應用(活體外或活體內)或所治療之個體及疾病病狀(例如，個體之體重、年齡及性別)、疾病病狀之嚴重程度或投給、予方式而變化。該術語亦適用於將誘發目標細胞中之特定反應(例如血小板黏附及/或細胞遷移減少)之劑量。特定劑量將視以下而變化：所選特定化合物、所依循之給藥方案、化合物是否與其他化合物組合投予、投予時序、其所投予之組織及其中攜帶化合物之物理遞送系統。

【0719】術語「治療(treatment/treating/treat)」及其類似術語係指獲得所要的藥理學及/或生理學效應。該效應就完全或部分預防疾病或其症狀而言可具預防性，且/或就部分或完全治癒疾病及/或可歸因於該疾病之不良影響而言可具治療性。如本文所用，「治療」涵蓋哺乳動物、尤其人類之疾病之任何治療，且包含：(a)預防可能易患疾病但尚未診斷出患有該疾病之個體中出現該疾病；(b)抑制疾病，亦即遏制其發展或進展；及(c)緩解疾病，亦即促使疾病消退及/或緩解一或多種疾病症狀。「治療」亦意欲涵蓋遞送試劑以便提供藥理學效應，即使在不存在疾病或病狀之情況下亦如此。舉例而言，「治療」涵蓋可在不存在疾病病狀之情況下(例如在疫苗

之情況下)引發免疫反應或賦予免疫性的組成物之遞送。

【0720】當參考核酸或蛋白質之部分使用時，術語「異源」指示核酸或蛋白質包括兩個或更多個在自然界中發現彼此之間沒有相同關係的子序列。舉例而言，通常以重組方式產生核酸，其具有兩個或更多個來自無關基因的經佈置以製造新的功能性核酸序列的序列，例如來自一個來源之啟動子及來自另一來源之編碼區或來自不同來源之編碼區。類似地，異源蛋白指示蛋白質包括兩個或更多個在自然界中未發現彼此呈相同關係之子序列(例如融合蛋白)。

【0721】在兩個或更多個核酸或多肽之上下文中，術語「序列一致性(sequence identity)」、「一致性百分比(percent identity)」及「序列一致性百分比(sequence percent identity)」(或其同義詞，例如「99%一致」)係指兩個或更多個序列或子序列在進行比較及排比(需要時引入間隔)以達到最大對應性且不將任何保守胺基酸取代視為序列一致性之部分時，該兩個或更多個序列或子序列係相同的或具有相同的特定百分比之核苷酸或胺基酸殘基。一致性百分比可使用序列比較軟體或演算法或藉由目視檢查來量測。所屬領域中已知可用於獲得胺基酸或核苷酸序列之排比的各種演算法及軟體。用以判定序列一致性百分比之適合的程式包含例如可購自美國政府的國家生物技術資訊中心(U.S. Government's National Center for Biotechnology

Information)BLAST網站之BLAST套裝程式。兩個序列之間的比較可使用BLASTN或BLASTP演算法進行。BLASTN用於比較核酸序列，而BLASTP用於比較胺基酸序列。ALIGN、ALIGN-2(美國加利福尼亞州南舊金山的基因泰克(Genentech))或MegAlign(可購自DNASTAR)係另外的可用於排比序列之可供大眾使用的軟體程式。本領域技術人員可以藉由特定的比對軟體來判定用於最大比對的適當參數。在某些實施例中，使用排比軟體的預設參數。

【0722】如本文所用，術語「變體」涵蓋但不限於包括與參考蛋白質、抗體或融合蛋白之胺基酸序列不同之胺基酸序列的蛋白質、抗體或融合蛋白，不同之處在於在參考抗體、蛋白質或融合蛋白之胺基酸序列之內或相鄰的某些位置有一個或多個取代、缺失及/或添加。與參考抗體之胺基酸序列相比，變體可以在其胺基酸序列中包括一個或多個保守取代。保守取代可涉及例如類似帶電或不帶電胺基酸之取代。變體保留與參考抗體、蛋白質或融合蛋白之抗原特異性結合的能力。術語變體亦包含聚乙二醇化抗體或蛋白質。

【0723】本文中「腫瘤浸潤性淋巴球」或「TIL」意謂最初作為已離開個體血流且遷移至腫瘤中的白血球獲得之細胞群體。TIL包含(但不限於)$CD8^+$細胞毒性T細胞(淋巴球)、Th1及Th17 $CD4^+$ T細胞、自然殺手細胞、樹突狀細胞及M1巨噬細胞。TIL包含初代TIL及繼代TIL兩者。「初代TIL」係如本文所概述之獲自患者組織樣本的

TIL(有時稱為「新鮮獲得」或「新鮮分離」)，且「繼代TIL」係任何如本文所論述之經擴增或增殖的TIL細胞群體，包含但不限於如本文所論述之主體TIL、經擴增之TIL(「REP TIL」)以及「reREP TIL」)。reREP TIL可包含例如第二擴增TIL或第二另外擴增TIL(諸如例如於圖1之步驟D中描述的TIL，包含稱為reREP TIL之TIL)。

【0724】TIL通常可經生物化學(使用細胞表面標誌)或功能性(根據其浸潤腫瘤及實現治療之能力)定義。TIL通常可藉由表現以下生物標誌中之一或多者分類：CD4、CD8、TCR αβ、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1及CD25。另外及替代地，TIL可藉由其重新引入患者中後浸潤實體腫瘤之能力來進行功能性定義。TIL可進一步藉由效力表徵 - 例如若例如干擾素(IFN)釋放大於約50 pg/mL、大於約100 pg/mL、大於約150 pg/mL或大於約200 pg/mL，則TIL可視為強效的。若例如干擾素(IFNγ)釋放大於約50 pg/mL、大於約100 pg/mL、大於約150 pg/mL或大於約200 pg/mL、大於約300 pg/mL、大於約400 pg/mL、大於約500 pg/mL、大於約600 pg/mL、大於約700 pg/mL、大於約800 pg/mL、大於約900 pg/mL、大於約1000 pg/mL，則TIL可視為強效的。

【0725】術語「醫藥學上可接受之載劑」或「醫藥學上可接受之賦形劑」意欲包含任何及全部溶劑、分散介質、包衣、抗細菌劑及抗真菌劑、等滲劑及吸收延遲劑，以及惰性成分。此類醫藥學上可接受之載劑或醫藥學上可

接受之賦形劑用於活性醫藥成分之用途為本領域中所熟知的。除非任何習知醫藥學上可接受之載劑或醫藥學上可接受之賦形劑與活性醫藥成分不相容，否則考慮其在本發明之治療組成物中之用途。諸如其他藥物之另外活性醫藥成分亦可併入所描述之組成物及方法中。

【0726】術語「約」或「大約」意指在值之統計學上有意義的範圍內。此範圍可在既定值或範圍之一數量級內，較佳地50%內，更佳地20%內，再更佳地10%內，且甚至更佳地5%內。由術語「約」或「大約」涵蓋之允許差異取決於研究下之特定系統，且可由所屬領域中具有通常知識者容易地理解。此外，如本文所用，術語「約」及「大約」意指尺寸、大小、調配物、參數、形狀及其他數量(quantity)及特徵並不精確且不需要精確，而是可以視需要為近似值及/或較大或較小的，反映出公差、轉換因子、四捨五入、量測誤差等，以及本領域的技術人員已知的其他因素。一般而言，無論是否如此明確說明，尺寸、大小、調配物、參數、形狀或其他數量或特徵皆為「約」或「大約」的。應注意，大小、形狀及尺寸非常不同之實施例可採用所描述之佈置。

【0727】當以原始及修改形式用於所附申請專利範圍中時，過渡術語「包括(comprising)」、「基本上由...組成(consisting essentially of)」及「由...組成(consisting of)」相對於哪些未敍述之另外的請求項要素或步驟(若存在)被排除在申請專利範圍之範疇之外來定義請求項範疇。術語

「包括」意欲為包括性的或開放性的，且不排除任何另外的、未敍述之要素、方法、步驟或材料。術語「由...組成」不包括除申請專利範圍中指定之要素、步驟或材料以外的任何要素、步驟或材料，且在後一情況中排除與指定材料一般相關之雜質。術語「基本上由...組成」將請求項之範疇限於所指定要素、步驟或材料及實質上不影響所主張發明之基礎及新穎特徵的要素、步驟或材料。在替代實施例中，本文所描述之體現本發明之所有組成物、方法及套組可由任何過渡術語「包括」、「基本上由...組成」及「由...組成」更具體地定義。

II. TIL製造過程(Gen 3過程之實施例，視情況包含確定培養基)

【0728】除本文所描述之方法以外，國際申請案第PCT/US2019/059718號出於所有目的以全文引用的方式併入本文中。在不受任何特定理論限制的情況下，咸信如本發明方法中所描述之起動T細胞活化的初始第一擴增及隨後的加強T細胞活化的快速第二擴增，允許製備保留「較年輕」表型之經擴增T細胞，且因此預期本發明之經擴增T細胞相較於藉由其他方法擴增之T細胞可對癌細胞展現較高細胞毒性。特定言之，咸信如本發明方法所教示之藉由暴露於抗CD3抗體(例如OKT-3)、IL-2及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)或暴露於IL-2及獲自補充有抗CD3抗體(例如OKT-3)之APC之第一培養物的第一培養物上清液來起動

T細胞活化且接著藉由後續暴露於另外的抗CD-3抗體(例如OKT-3)、IL-2及APC或暴露於另外的IL-2及獲自補充有抗CD3抗體(例如OKT-3)之APC之第二培養物的第二培養物上清液來加強，其限制或避免培養物中之T細胞的成熟，從而產生具有較不成熟表型之T細胞群體，該等T細胞因培養擴增而耗竭較少且對癌細胞展現較高細胞毒性。在一些實施例中，快速第二擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下達成培養規模縱向擴大(scaling up)：(a)藉由在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中的小規模培養中培養T細胞約3天至4天之時段來進行快速第二擴增；且接著(b)實現將小規模培養中的T細胞轉移至比第一容器大的第二容器(例如G-REX 500MCS容器)並且在第二容器中的較大規模培養中培養來自小規模培養的T細胞約4天至7天的時段。在一些實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大(scaling out)：(a)藉由在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中的第一小規模培養中培養T細胞約3天至4天之時段來進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自第一小規模培養的T細胞轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小與第一容器相等的第二容器之中，其中在各第二容器中，經轉移至此類第二容器的來自第一小規模培養的T細胞部分係於第二小規模培養中培養約4天至7天之時段。在一些實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴

大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中的小規模培養中培養T細胞約3天至4天之時段來進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養中的T細胞轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大的第二容器(例如G-REX 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，經轉移至此類第二容器的來自小規模培養的T細胞部分係於較大規模培養中培養約4天至7天之時段。在一些實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中的小規模培養中培養T細胞約4天之時段來進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養中的T細胞轉移且分配至2、3或4個大小比第一容器大的第二容器(例如G-REX 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，經轉移至此類第二容器的來自小規模培養的T細胞部分係於較大規模培養中培養約5天之時段。

【0729】在一些實施例中，快速第二擴增係在藉由初始第一擴增所實現之T細胞活化開始降低、趨緩、衰退或消退之後進行。

【0730】在一些情況下，快速第二擴增係在藉由初始第一擴增實現之T細胞活化已降低剛好或大約(at or about)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或100%之後進行。

【0731】在一些實施例中，快速第二擴增係在藉由初始第一擴增所實現之T細胞活化已降低剛好或大約1%至100%之範圍中的百分比之後進行。

【0732】在一些實施例中，快速第二擴增係在藉由初始第一擴增實現之T細胞活化已降低剛好或大約1%至10%、10%至20%、20%至30%、30%至40%、40%至50%、50%至60%、60%至70%、70%至80%、80%至90%或90%至100%之範圍中之百分比之後進行。

【0733】在一些實施例中，快速第二擴增係在藉由初始第一擴增實現之T細胞活化已降低在至少或約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或99%之後進行。

【0734】在一些情況下，快速第二擴增係在藉由初始第一擴增實現之T細胞活化已降低剛好或大約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或100%之後進行。

【0735】在一些實施例中，藉由初始第一擴增實現之T細胞活化之降低係藉由T細胞回應於抗原刺激而釋放之干擾素γ之量的減少來判定。

【0736】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係於至多剛好或大約7天或大約8天之時段內進行。

【0737】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係於至多剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天之時段內進行。

【0738】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係在1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天之時段內進行。

【0739】在一些實施例中，T細胞之快速第二擴增係於至多剛好或大約11天之時段內進行。

【0740】在一些實施例中，T細胞之快速第二擴增係於至多剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天之時段內進行。

【0741】在一些實施例中，T細胞之快速第二擴增係在1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天之時段內進行。

【0742】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係於在剛好或大約1天至剛好或大約7天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係在剛好或大約1天至剛好或大約11天之時段內進行。

【0743】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係於至多剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係於至多剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天之時段內進行。

【0744】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係於在剛好或大約1天至剛好或大約8天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係在剛好或大約1天至剛好或大約9天之時段內進行。

【0745】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係在8天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係在9天之時段內進行。

【0746】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係於在剛好或大約1天至處於或約7天之時段內進行且T細胞

之快速第二擴增係在處於或約1天至處於或約9天之時段內進行。

【0747】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係在7天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係在9天之時段內進行。

【0748】在一些實施例中，T細胞為腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)。

【0749】在一些實施例中，T細胞為骨髓浸潤性淋巴球(MIL)。

【0750】在一些實施例中，T細胞為周邊血液淋巴球(PBL)。

【0751】在一些實施例中，T細胞獲自罹患癌症之供體。

【0752】在一些實施例中，T細胞為獲自罹患癌症之患者所切除之腫瘤的TIL。

【0753】在一些實施例中，T細胞為獲自罹患血液惡性病之患者之骨髓的MIL。

【0754】在一些實施例中，T細胞為獲自供體之周邊血液單核細胞(PBMC)的PBL。在一些實施例中，供體罹患癌症。在一些實施例中，癌症係癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮內膜癌、甲狀腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含

GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。在一些實施例中，供體罹患腫瘤。在一些實施例中，腫瘤為液體腫瘤。在一些實施例中，腫瘤為實體腫瘤。在一些實施例中，供體罹患血液惡性病。

【0755】在本發明之某些態樣中，免疫效應細胞(例如T細胞)可使用本領域技術人員已知之任何數目之技術(諸如FICOLL分離)自收集自個體之血液單元獲得。在一個較佳態樣中，藉由血球分離術獲得來自個體之循環血液的細胞。血球分離術產物通常含有淋巴球，包含T細胞、單核球、顆粒球、B細胞、其他成核白血球、紅血球及血小板。在一態樣中，藉由血球分離術收集之細胞可經洗滌以移除血漿級份且視情況將細胞置於適當緩衝液或培養基中以用於後續處理步驟。在一個實施例中，細胞係用磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)洗滌。在一替代實施例中，洗滌溶液缺乏鈣，且可能缺乏鎂或可能缺乏許多(若並非全部)二價陽離子。在一個態樣中，藉由溶解紅血球及例如藉由經由PERCOLL梯度離心或藉由逆流離心淘析耗盡單核球，自周邊血液淋巴球分離T細胞。

【0756】在一些實施例中，T細胞為自供體之全血或

富含淋巴球之血球分離術產物分離的PBL。在一些實施例中，供體罹患癌症。在一些實施例中，癌症係癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮內膜癌、甲狀腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。在一些實施例中，供體罹患腫瘤。在一些實施例中，腫瘤為液體腫瘤。在一些實施例中，腫瘤為實體腫瘤。在一些實施例中，供體罹患血液惡性病。在一些實施例中，PBL係藉由使用正向或負向選擇方法而自全血或富含淋巴球之血球分離術產物分離，亦即使用T細胞表型標誌(例如CD3+CD45+)移除PBL，或移除非T細胞表型細胞而留下PBL。在其他實施例中，PBL係藉由梯度離心分離。在自供體組織分離PBL後，PBL之初始第一擴增可根據本文所描述之任何方法之初始第一擴增步驟，藉由將適合數目之經分離PBL(在一些實施例中，約1×10^7個PBL)接種於初始第一擴增培養物中來起始。

【0757】含有一些此等特徵的稱為過程3(在本文中亦

稱作GEN 3或Gen 3)之例示性TIL過程描繪於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中，且本發明之此實施例在過程2A中的一些優勢描述於圖1及圖2(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中。過程3之兩個實施例顯示於圖1及圖30(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中。過程2A或Gen 2亦描述於以全文引用之方式併入本文中的美國專利公開案第2018/0280436號及第2019/0231820號中。

【0758】如本文中所論述及大體上概述，TIL係取自患者樣本，並且使用本文所描述且稱為Gen 3之TIL擴增過程操作以在移植至患者中之前擴增其數目。在一些實施例中，TIL可視情況如下文所論述經基因操作。在一些實施例中，TIL可在擴增之前或之後冷凍保存。解凍後，其亦可經再刺激以在輸注至患者中之前增加其代謝。

【0759】在一些實施例中，初始第一擴增(包含本文中稱為預快速擴增(預REP)的過程，以及圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中示為步驟B之過程)縮短為1至8天，且快速第二擴增(包含在本文中稱為快速擴增方案(REP)的過程以及圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中示為步驟D的過程)縮短為1至9天，如以下及實例及圖式中所詳細論述。在一些實施例中，初始第一擴增(包含本文中稱為預快速擴增(預REP)的過程，以及圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中示為步驟B之過程)縮短

為1至8天，且快速第二擴增(包含在本文中稱為快速擴增方案(REP)的過程以及圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中示為步驟D的過程)縮短為1至8天，如以下及實例及圖式中所詳細論述。在一些實施例中，初始第一擴增(包含本文中稱為預快速擴增(預REP)的過程，以及圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中示為步驟B之過程)縮短為1至7天，且快速第二擴增(包含在本文中稱為快速擴增方案(REP)的過程以及圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中示為步驟D的過程)縮短為1至9天，如以下及實例及圖式中所詳細論述。在一些實施例中，初始第一擴增(包含本文中稱為預快速擴增(預REP)的過程，以及圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中示為步驟B之過程)縮短為1至7天，且快速第二擴增(包含在本文中稱為快速擴增方案(REP)的過程以及圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中示為步驟D的過程)為1至10天，如以下及實例及圖式中所詳細論述。在一些實施例中，初始第一擴增(例如，圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中描述為步驟B之擴增)縮短為8天，且快速第二擴增(例如，如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中的步驟D中所描述之擴增)為7天至9天。在一些實施例中，初始第一擴增(例如，圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中描述為

步驟B之擴增)為8天，且快速第二擴增(例如，如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中的步驟D中所描述之擴增)為8天至9天。在一些實施例中，初始第一擴增(例如，圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中描述為步驟B之擴增)縮短為7天，且快速第二擴增(例如，如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中的步驟D中所描述之擴增)為7天至8天。在一些實施例中，初始第一擴增(例如，圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中描述為步驟B之擴增)縮短為8天，且快速第二擴增(例如，如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中的步驟D中所描述之擴增)為8天。在一些實施例中，初始第一擴增(例如，圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中描述為步驟B之擴增)為8天，且快速第二擴增(例如，如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中的步驟D中所描述之擴增)為9天。在一些實施例中，初始第一擴增(例如，圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中描述為步驟B之擴增)為8天，且快速第二擴增(例如，如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中的步驟D中所描述之擴增)為10天。在一些實施例中，初始第一擴增(例如，圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中描述為步驟B之擴增)為7天，且快速第二擴增(例

如，如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中的步驟D中所描述之擴增)為7天至10天。在一些實施例中，初始第一擴增(例如，圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中描述為步驟B之擴增)為7天，且快速第二擴增(例如，如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中的步驟D中所描述之擴增)為8天至10天。在一些實施例中，初始第一擴增(例如，圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中描述為步驟B之擴增)為7天，且快速第二擴增(例如，如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中的步驟D中所描述之擴增)為9天至10天。在一些實施例中，初始第一擴增(例如，圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中描述為步驟B之擴增)縮短為7天，且快速第二擴增(例如，如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中的步驟D中所描述之擴增)為7天至9天。在一些實施例中，初始第一擴增及快速第二擴增(例如，在圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中描述為步驟B及步驟D之擴增)之組合為14天至16天，如以下及實例及圖式中所詳細論述。特定言之，認為本發明之某些實施例包括初始第一擴增步驟，其中TIL藉由在IL-2存在下暴露於抗CD3抗體(例如OKT-3)或在至少IL-2及抗CD3抗體(例如OKT-3)存在下暴露於抗原而活化。在某些實施例中，在如上文所描述之初始第一擴增

步驟中活化之TIL為第一TIL群體，亦即，其為初代細胞群體。

【0760】以下的「步驟」標識A、B、C等參考圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之非限制性實例且參考本文所描述之某些非限制性實施例。以下及圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中的步驟次序為例示性的，且本申請案及本文中所揭示之方法涵蓋步驟之任何組合或次序，以及另外的步驟、步驟重複及/或步驟省略。

A. 步驟A：獲得患者腫瘤樣本

【0761】一般而言，TIL最初係獲自患者腫瘤樣本(「初代TIL」)或獲自循環淋巴球(諸如周邊血液淋巴球，包含具有TIL樣特徵之周邊血液淋巴球)，且接著擴增成較大群體以進行如本文所描述之進一步操作，視情況經冷凍保存且視情況評估表型及代謝參數作為TIL保健的指標。

【0762】患者腫瘤樣本可使用本領域中已知之方法獲得，通常經由手術切除、針吸活體組織切片或其他用於獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物之樣本的手段獲得。一般而言，腫瘤樣本可來自任何實體腫瘤，包含原發性腫瘤、侵襲性腫瘤或轉移性腫瘤。腫瘤樣本亦可為液體腫瘤，諸如獲自血液惡性病之腫瘤。實體腫瘤可為任何癌症類型，包含但不限於乳癌、胰臟癌、前列腺癌、結腸直腸癌、肺癌、腦癌、腎癌、胃癌及皮膚癌(包含但不限於鱗狀細胞

癌、基底細胞癌及黑色素瘤)。在一些實施例中，癌症係選自子宮頸癌、頭頸癌(包含例如頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(GBM)、胃腸癌、卵巢癌、肉瘤、胰臟癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌及非小細胞肺癌。在一些實施例中，適用的TIL係獲自惡性黑色素瘤腫瘤，因為報告指出此等腫瘤具有特別高含量之TIL。

【0763】一旦獲得，腫瘤樣本通常使用銳器分割碎斷成1 mm^3至約8 mm^3之間的塊，其中約2 mm^3至3 mm^3為尤其適用的。TIL係自此等碎片使用酶素性腫瘤碎解物培養。此類腫瘤碎解物可藉由在酶素性培養基(例如羅斯威爾公園癌症研究所(Roswell Park Memorial Institute；RPMI)1640緩衝液、2 mM麩胺酸、10 mcg/mL建它黴素(gentamicine)、30單位/mL DNA酶及1.0 mg/mL膠原蛋白酶)中培育，接著進行機械解離(例如使用組織解離器)來產生。腫瘤碎解物可藉由以下產生：將腫瘤置放於酶素性培養基中且機械解離腫瘤大約1分鐘，隨後在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘，隨後在前述條件下重複機械解離及培育循環，直至僅存在小組織塊。在此過程結束時，若細胞懸浮液含有大量紅血球或死細胞，則可進行使用FICOLL分支鏈親水性多醣之密度梯度分離以移除此等細胞。可使用本領域中已知之替代方法，諸如美國專利申請公開案第2012/0244133 A1號中所描述之方法，該公開案之揭示內容以引用之方式併入本文中。任何前述方法可用於本文所描述之任何實施例中擴增TIL之方法或治療癌症之方法。

【0764】腫瘤解離酶混合物可包含一或多種解離(消化)酶，諸如但不限於膠原蛋白酶(包含任何摻合或類型之膠原蛋白酶)、Accutase™、Accumax™、玻尿酸酶(hyaluronidase)、中性蛋白酶(分散酶)、胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)、木瓜凝乳蛋白酶(chymopapain)、胰蛋白酶(trypsin)、酪蛋白酶(caseinase)、彈性蛋白酶(elastase)、木瓜酶(papain)、XIV型蛋白酶(鏈蛋白酶(pronase))、去氧核糖核酸酶I(DNA酶)、胰蛋白酶抑制劑、任何其他解離或蛋白分解酶，及其任何組合。

【0765】在一些實施例中，解離酶係自凍乾酶重構。在一些實施例中，凍乾酶係在一定量之無菌緩衝液(諸如HBSS)中重構。

【0766】在一些情況下，膠原蛋白酶(諸如無動物源1型膠原蛋白酶)係在10 ml無菌HBSS或另一緩衝液中重構。凍乾儲備酶之濃度可為每小瓶2892 PZ U。在一些實施例中，膠原蛋白酶係在5 ml至15 ml緩衝液中重構。在一些實施例中，在重構後，膠原蛋白酶儲備液的範圍為約100 PZ U/ml至約400 PZ U/ml，例如，約100 PZ U/ml至約400 PZ U/ml、約100 PZ U/ml至約350 PZ U/ml、約100 PZ U/ml至約300 PZ U/ml、約150 PZ U/ml至約400 PZ U/ml、約100 PZ U/ml、約150 PZ U/ml、約200 PZ U/ml、約210 PZ U/ml、約220 PZ U/ml、約230 PZ U/ml、約240 PZ U/ml、約250 PZ U/ml、約260 PZ U/ml、約270 PZ U/ml、約280 PZ U/ml、約289.2 PZ U/ml、約300 PZ U/ml、約350 PZ

U/ml或約400 PZ U/ml。

【0767】在一些實施例中，中性蛋白酶係在1 ml無菌HBSS或另一緩衝液中重構。凍乾儲備酶之濃度可為每小瓶175 DMC U。凍乾儲備酶之濃度可為175 DMC/mL。在一些實施例中，在重構後，中性蛋白酶儲備液之範圍為100 DMC/ml至約400 DMC/ml，例如，約100 DMC/ml至約400 DMC/ml、約100 DMC/ml至約350 DMC/ml、約100 DMC/ml至約300 DMC/ml、約150 DMC/ml至約400 DMC/ml、約100 DMC/ml、約110 DMC/ml、約120 DMC/ml、約130 DMC/ml、約140 DMC/ml、約150 DMC/ml、約160 DMC/ml、約170 DMC/ml、約175 DMC/ml、約180 DMC/ml、約190 DMC/ml、約200 DMC/ml、約250 DMC/ml、約300 DMC/ml、約350 DMC/ml或約400 DMC/ml。

【0768】在一些實施例中，DNA酶I係在1 ml無菌HBSS或另一緩衝液中重構。凍乾儲備酶之濃度為每小瓶4 KU。在一些實施例中，在重構後，DNA酶I儲備液的範圍為約1 KU/ml至10 KU/ml，例如約1 KU/ml、約2 KU/ml、約3 KU/ml、約4 KU/ml、約5 KU/ml、約6 KU/ml、約7 KU/ml、約8 KU/ml、約9 KU/ml或約10 KU/ml。

【0769】在一些實施例中，酶儲備液會發生變化，因此請驗證凍乾儲備液之濃度，並相應地修改添加至碎解混合物中的酶之最終量。

【0770】在一些實施例中，酶混合物包含中性蛋白

酶、DNA酶及膠原蛋白酶。

【0771】在一些實施例中，酶混合物包含約4.7 ml無菌HBSS中的約10.2 μl中性蛋白酶(0.36 DMC U/ml)、21.3 μl膠原蛋白酶(1.2 PZ/ml)及250 μl DNA酶I(200 U/ml)。

【0772】如上文所指出，在一些實施例中，TIL係衍生自實體腫瘤。在一些實施例中，實體腫瘤未經碎斷。在一些實施例中，實體腫瘤未經碎斷且以全腫瘤進行酶素性碎解。在一些實施例中，腫瘤係在包括膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中碎解。在一些實施例中，腫瘤係在包括膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中碎解1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2下在包括膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中碎解1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2、旋轉下在包括膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中碎解1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在恆定旋轉下碎解隔夜。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2、恆定旋轉下碎解隔夜。在一些實施例中，整個腫瘤與酶組合以形成腫瘤碎解反應混合物。

【0773】在一些實施例中，在無菌緩衝液中用凍乾酶重構腫瘤。在一些實施例中，緩衝液為無菌HBSS。

【0774】在一些實施例中，酶混合物包括膠原蛋白酶。在一些實施例中，膠原蛋白酶為膠原蛋白酶IV。在一些實施例中，膠原蛋白酶之工作儲備液為100 mg/ml 10×工作儲備液。

【0775】在一些實施例中，酶混合物包括DNA酶。在一些實施例中，DNA酶之工作儲備液為10,000IU/ml 10×工作儲備液。

【0776】在一些實施例中，酶混合物包括玻尿酸酶。在一些實施例中，玻尿酸酶之工作儲備液為10 mg/ml 10×工作儲備液。

【0777】在一些實施例中，酶混合物包括10 mg/ml膠原蛋白酶、1000 IU/ml DNA酶及1 mg/ml玻尿酸酶。

【0778】在一些實施例中，酶混合物包括10 mg/ml膠原蛋白酶、500 IU/ml DNA酶及1 mg/ml玻尿酸酶。

【0779】一般而言，獲自腫瘤之細胞懸浮液稱為「初代細胞群體」或「新鮮獲得的」或「新鮮分離的」細胞群體。在某些實施例中，新鮮獲得之TIL細胞群體暴露於包括抗原呈現細胞、IL-12及OKT-3之細胞培養基。

【0780】在一些實施例中，碎斷包含物理碎斷，包含例如分割以及碎解。在一些實施例中，碎斷為物理碎斷。在一些實施例中，碎斷為分割。在一些實施例中，碎斷係藉由碎解。在一些實施例中，TIL最初可自獲自患者之酶素性腫瘤碎解物及腫瘤碎片培養。在一些實施例中，TIL最初可自獲自患者之酶素性腫瘤碎解物及腫瘤碎片培養。

【0781】在一些實施例中，當腫瘤為實體腫瘤時，在例如步驟A(如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所提供)中獲得腫瘤樣本之後，腫瘤進行物理碎段。在一些實施例中，碎斷發生在冷凍保存之

前。在一些實施例中，碎斷發生在冷凍保存之後。在一些實施例中，碎斷在獲得腫瘤之後並且在不進行任何冷凍保存的情況下發生。在一些實施例中，碎斷步驟係活體外或離體過程。在一些實施例中，將腫瘤碎斷且將10、20、30、40或更多個碎片或塊置於各容器中進行初始第一擴增。在一些實施例中，將腫瘤碎斷且將30或40個碎片或塊置於各容器中進行初始第一擴增。在一些實施例中，將腫瘤碎斷且將40個碎片或塊置於各容器中進行初始第一擴增。在一些實施例中，多個碎片包括約4個至約50個碎片，其中各碎片之體積為約27 mm^3。在一些實施例中，多個碎片包括約30個至約60個碎片，其總體積為約1300 mm^3至約1500 mm^3。在一些實施例中，多個碎片包括約50個碎片，其總體積為約1350 mm^3。在一些實施例中，多個碎片包括約50個碎片，其總質量為約1公克至約1.5公克。在一些實施例中，多個片段包括約4個碎片。

【0782】在一些實施例中，TIL係獲自腫瘤碎片。在一些實施例中，腫瘤碎片係藉由銳器分割獲得。在一些實施例中，腫瘤碎片在約1 mm^3與10 mm^3之間。在一些實施例中，腫瘤碎片在約1 mm^3與8 mm^3之間。在一些實施例中，腫瘤碎片為約1 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約2 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約3 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約4 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約5 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約6 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約7 mm^3。在一些實施例

中，腫瘤碎片為約8 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約9 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約10 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為1至4 mm×1至4 mm×1至4 mm。在一些實施例中，腫瘤碎片為1 mm×1 mm×1 mm。在一些實施例中，腫瘤碎片為2 mm×2 mm×2 mm。在一些實施例中，腫瘤碎片為3 mm×3 mm×3 mm。在一些實施例中，腫瘤碎片為4 mm×4 mm×4 mm。

【0783】在一些實施例中，腫瘤經碎斷以使各塊上出血性、壞死及/或脂肪組織之量減至最小。在一些實施例中，腫瘤經碎斷以使各塊上出血性組織之量減至最小。在一些實施例中，腫瘤經碎斷以使各塊上壞死組織之量減至最小。在一些實施例中，腫瘤經碎斷以使各塊上脂肪組織之量減至最小。在某些實施例中，腫瘤碎斷步驟係活體外或離體方法。

【0784】在一些實施例中，進行腫瘤碎斷以便維持腫瘤內部結構。在一些實施例中，在不使用解剖刀進行鋸切動作的情況下進行腫瘤碎斷。在一些實施例中，TIL係獲自腫瘤碎解物。在一些實施例中，藉由在酶培養基(例如但不限於RPMI 1640、2 mM GlutaMAX、10 mg/mL建它黴素、30 U/mL DNA酶及1.0 mg/mL膠原蛋白酶)中培育，隨後進行機械解離(加利福尼亞州奧本美天旎生物技術的GentleMACS)來產生腫瘤碎解物。在將腫瘤置於酶培養基中之後，可以機械方式將腫瘤解離大約1分鐘。隨後可將溶液在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘，且接著再次機械破

壞大約1分鐘。在37℃下在5% CO_2中再培育30分鐘之後，可將腫瘤第三次機械破壞大約1分鐘。在一些實施例中，在第三次機械破壞後若大塊組織仍存在，則施加1或2次另外機械解離至樣本，不論是否再在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘。在一些實施例中，在最終培育結束時，若細胞懸浮液含有大量紅血球或死細胞，則可進行使用Ficoll之密度梯度分離以移除此等細胞。

【0785】在一些實施例中，將初始第一擴增步驟之前的細胞懸浮液稱為「初代細胞群體」或「新鮮獲得的」或「新鮮分離的」細胞群體。

【0786】在一些實施例中，細胞可視情況在樣本分離之後(例如在獲得腫瘤樣本後及/或在自腫瘤樣本獲得細胞懸浮液後)冷凍，且在進入步驟B中所描述之擴增之前冷凍儲存，該步驟B進一步詳細描述於下文且例示於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中。

1. 粗針/小活體組織切片衍生之TIL

【0787】在一些實施例中，TIL最初係獲自藉由粗針活體組織切片或類似程序獲得之患者腫瘤樣本(「初代TIL」)且隨後擴增成較大群體以進行如本文所描述之進一步操作，視情況經冷凍保存且視情況評估表型及代謝參數。

【0788】在一些實施例中，患者腫瘤樣本可使用本領

域中已知之方法獲得，通常經由小活體組織切片、粗針活體組織切片或細針活體組織切片、針吸活體組織切片或其他用於獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物之樣本的手段獲得。一般而言，腫瘤樣本可來自任何實體腫瘤，包含原發性腫瘤、侵襲性腫瘤或轉移性腫瘤。腫瘤樣本亦可為液體腫瘤，諸如獲自血液惡性病之腫瘤。在一些實施例中，樣本可來自多個小腫瘤樣本或活體組織切片。在一些實施例中，樣本可包括來自同一患者之單一腫瘤的多個腫瘤樣本。在一些實施例中，樣本可包括來自同一患者之一個、兩個、三個或四個腫瘤的多個腫瘤樣本。在一些實施例中，樣本可包括來自同一患者之多個腫瘤的多個腫瘤樣本。實體腫瘤可為任何癌症類型，包含但不限於乳癌、胰臟癌、前列腺癌、結腸直腸癌、肺癌、腦癌、腎癌、胃癌及皮膚癌(包含但不限於鱗狀細胞癌、基底細胞癌及黑色素瘤)。在一些實施例中，癌症係選自子宮頸癌、頭頸癌(包含例如頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(GBM)、胃腸癌、卵巢癌、肉瘤、胰臟癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌及非小細胞肺癌(NSCLC)。在一些實施例中，適用的TIL係獲自惡性黑色素瘤腫瘤，因為報告指出此等腫瘤具有特別高含量之TIL。

【0789】一般而言，獲自腫瘤核心或碎片之細胞懸浮液稱為「初代細胞群體」或「新鮮獲得的」或「新鮮分離的」細胞群體。在某些實施例中，新鮮獲得之TIL細胞群體暴露於包括抗原呈現細胞、IL-2及OKT-3之細胞培養

基。

【0790】在一些實施例中，若腫瘤為轉移性腫瘤且在過去已有效治療/移除原發性病灶，則可能需要移除一個轉移性病灶。在一些實施例中，若可用，微創方法係移除皮膚病灶或頸部或腋窩區域上的淋巴結。在一些實施例中，移除皮膚病灶或移除其小活體組織切片。在一些實施例中，移除淋巴結或其小活體組織切片。在一些實施例中，可採用肺或肝轉移性病灶或其腹部內或胸部淋巴結或其小活體組織切片。

【0791】在一些實施例中，腫瘤為黑色素瘤。在一些實施例中，黑色素瘤之小活體組織切片包括黑痣或其一部分。

【0792】在一些實施例中，小活體組織切片為穿孔活體組織切片。在一些實施例中，穿孔活體組織切片係以圓形刀片壓入皮膚中獲得。在一些實施例中，穿孔活體組織切片係以圓形刀片壓入可疑黑痣周圍的皮膚中獲得。在一些實施例中，穿孔活體組織切片係以圓形刀片壓入皮膚中獲得，並且移除一塊圓形皮膚。在一些實施例中，小活體組織切片為穿孔活體組織切片且移除圓形部分的腫瘤。

【0793】在一些實施例中，小活體組織切片為切除式活體組織切片。在一些實施例中，小活體組織切片為切除式活體組織切片且移除整個黑痣或生長物。在一些實施例中，小活體組織切片為切除式活體組織切片且連同小邊緣之正常外觀皮膚移除整個黑痣或生長物。

【0794】在一些實施例中，小活體組織切片為切開式活體組織切片。在一些實施例中，小活體組織切片為切開式活體組織切片且僅採集最不規則部分之黑痣或生長物。在一些實施例中，小活體組織切片為切開式活體組織切片，且該切開式活體組織切片係在其他技術無法完成時使用，諸如當可疑黑痣非常大時使用。

【0795】在一些實施例中，小活體組織切片為肺活體組織切片。在一些實施例中，小活體組織切片係藉由支氣管鏡檢獲得。一般而言，支氣管鏡檢係在患者麻醉下使小工具通過鼻或口、下至咽喉且進入支氣管通道，其中小工具係用於移除一些組織。在一些實施例中，在無法經由支氣管鏡檢達到腫瘤或生長物的情況下，可以採用經胸針吸活體組織切片。一般而言，對於經胸針吸活體組織切片，患者亦處於麻醉下且將針穿過皮膚直接插入可疑位點以移除小樣本的組織。在一些實施例中，經胸針吸活體組織切片可能需要介入性放射線學(例如使用x射線或CT掃描引導針頭)。在一些實施例中，小活體組織切片係藉由針吸活體組織切片獲得。在一些實施例中，小活體組織切片係經內視鏡超音波獲得(例如，內視鏡附燈且經口置於食道中)。在一些實施例中，小活體組織切片係經手術獲得。

【0796】在一些實施例中，小活體組織切片為頭頸活體組織切片。在一些實施例中，小活體組織切片為切開式活體組織切片。在一些實施例中，小活體組織切片為切開式活體組織切片，其中自外觀異常區域切除一小塊組織。

在一些實施例中，若容易接近異常區，則無需住院即可採集樣本。在一些實施例中，若腫瘤在口腔或咽喉內部較深處，則活體組織切片可能需要在手術室全身麻醉進行。在一些實施例中，小活體組織切片為切除式活體組織切片。在一些實施例中，小活體組織切片為切除式活體組織切片，其中移除整個區域。在一些實施例中，小活體組織切片為細針抽吸(FNA)。在一些實施例中，小活體組織切片為細針抽吸(FNA)，其中使用附接至注射器之非常細的針頭自腫瘤或腫塊抽取(抽吸)細胞。在一些實施例中，小活體組織切片為穿孔活體組織切片。在一些實施例中，小活體組織切片為穿孔活體組織切片，其中使用穿孔鑷移除一塊可疑區域。

【0797】在一些實施例中，小活體組織切片為子宮頸活體組織切片。在一些實施例中，小活體組織切片係經由陰道鏡獲得。通常，陰道鏡方法採用附接至雙目放大鏡的附燈放大儀器(陰道鏡)，接著用於對一小部分之子宮頸進行活體組織切片檢查。在一些實施例中，小活體組織切片為子宮頸錐狀切除/錐狀活體組織切片。在一些實施例中，小活體組織切片為子宮頸錐狀切除/錐狀活體組織切片，其中可能需要門診手術以自子宮頸移除較大塊組織。在一些實施例中，除了有助於確診之外，錐狀活體組織切片亦可以用作初始治療。

【0798】術語「實體腫瘤」係指通常不含囊腫或液體區域的異常組織團塊。實體腫瘤可為良性或惡性的。術語

「實體腫瘤癌症」係指惡性、贅生性或癌性實體腫瘤。實體腫瘤癌包含但不限於肉瘤、癌瘤及淋巴瘤，諸如肺癌、乳癌、三陰性乳癌、前列腺癌、結腸癌、直腸癌及膀胱癌。在一些實施例中，癌症係選自子宮頸癌、頭頸癌、神經膠母細胞瘤、卵巢癌、肉瘤、胰臟癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌及非小細胞肺癌。實體腫瘤之組織結構包含相互相依組織隔室，包含實質(癌細胞)及有癌細胞分散其中且可提供支援性微環境之支援性基質細胞。

【0799】在一些實施例中，來自腫瘤之樣本係以細針抽吸物(FNA)、粗針活體組織切片、小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)形式獲得。在一些實施例中，首先將樣本置於G-Rex 10中。在一些實施例中，當有1個或2個粗針活體組織切片及/或小活體組織切片樣本時，首先將樣本置於G-Rex 10中。在一些實施例中，當有3個、4個、5個、6個、8個、9個或10個或更多個粗針活體組織切片及/或小活體組織切片樣本時，首先將樣本置於G-Rex 100中。在一些實施例中，當有3個、4個、5個、6個、8個、9個或10個或更多個粗針活體組織切片及/或小活體組織切片樣本時，首先將樣本置於G-Rex 500中。

【0800】FNA可獲自選自由以下組成之群組的腫瘤：肺腫瘤、黑色素瘤、頭頸腫瘤、子宮頸腫瘤、卵巢腫瘤、胰臟腫瘤、神經膠母細胞瘤、結腸直腸腫瘤及肉瘤。在一些實施例中，FNA係獲自肺腫瘤，諸如來自非小細胞肺癌(NSCLC)患者的肺腫瘤。在一些情況下，NSCLC患者先前

已經受外科治療。

【0801】本文所描述之TIL可獲自FNA樣本。在一些情況下，FNA樣本係使用在18號針頭至25號針頭範圍中的細號規針頭自患者獲得或分離。細號規針頭可為18號、19號、20號、21號、22號、23號、24號或25號。在一些實施例中，來自患者之FNA樣本可含有至少400,000個TIL，例如400,000個TIL、450,000個TIL、500,000個TIL、550,000個TIL、600,000個TIL、650,000個TIL、700,000個TIL、750,000個TIL、800,000個TIL、850,000個TIL、900,000個TIL、950,000個TIL或更多。

【0802】在一些情況下，本文所描述之TIL係獲自粗針活體組織切片樣本。在一些情況下，粗針活體組織切片樣本係使用在11號針頭至16號針頭範圍中的外科或醫用針頭自患者獲得或分離。針頭可為11號、12號、13號、14號、15號或16號。在一些實施例中，來自患者之粗針活體組織切片樣本可含有至少400,000個TIL，例如400,000個TIL、450,000個TIL、500,000個TIL、550,000個TIL、600,000個TIL、650,000個TIL、700,000個TIL、750,000個TIL、800,000個TIL、850,000個TIL、900,000個TIL、950,000個TIL或更多。

【0803】一般而言，經收集之細胞懸浮液被稱為「初代細胞群體」或「新鮮收集的」細胞群體。

【0804】在一些實施例中，TIL並非獲自腫瘤碎解物。在一些實施例中，實體腫瘤核心未經碎斷。

【0805】在一些實施例中，TIL係獲自腫瘤碎解物。在一些實施例中，藉由在酶培養基(例如但不限於RPMI 1640、2 mM GlutaMAX、10 mg/mL建它黴素、30 U/mL DNA酶及1.0 mg/mL膠原蛋白酶)中培育，隨後進行機械解離(加利福尼亞州奧本美天旎生物技術的GentleMACS)來產生腫瘤碎解物。在將腫瘤置於酶培養基中之後，可以機械方式將腫瘤解離大約1分鐘。隨後可將溶液在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘，且接著再次機械破壞大約1分鐘。在37℃下在5% CO_2中再培育30分鐘之後，可將腫瘤第三次機械破壞大約1分鐘。在一些實施例中，在第三次機械破壞後若大塊組織仍存在，則施加1或2次另外機械解離至樣本，不論是否再在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘。在一些實施例中，在最終培育結束時，若細胞懸浮液含有大量紅血球或死細胞，則可進行使用Ficoll之密度梯度分離以移除此等細胞。

【0806】在一些實施例中，獲得第一TIL群體包括多病灶取樣方法。

【0807】腫瘤解離酶混合物可包含一或多種解離(消化)酶，諸如但不限於膠原蛋白酶(包含任何摻合或類型之膠原蛋白酶)、Accutase™、Accumax™、玻尿酸酶、中性蛋白酶(分散酶)、胰凝乳蛋白酶、木瓜凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、酪蛋白酶、彈性蛋白酶、木瓜酶、XIV型蛋白酶(鏈蛋白酶)、去氧核糖核酸酶I(DNA酶)、胰蛋白酶抑制劑、任何其他解離或蛋白分解酶，及其任何組合。

【0808】在一些實施例中，解離酶係自凍乾酶重構。在一些實施例中，凍乾酶係在一定量之無菌緩衝液(諸如HBSS)中重構。

【0809】在一些情況下，膠原蛋白酶(諸如無動物源1型膠原蛋白酶)係在10 ml無菌HBSS或另一緩衝液中重構。凍乾儲備酶之濃度可為每小瓶2892 PZ U。在一些實施例中，膠原蛋白酶係在5 ml至15 ml緩衝液中重構。在一些實施例中，在重構後，膠原蛋白酶儲備液的範圍為約100 PZ U/ml至約400 PZ U/ml，例如，約100 PZ U/ml至約400 PZ U/ml、約100 PZ U/ml至約350 PZ U/ml、約100 PZ U/ml至約300 PZ U/ml、約150 PZ U/ml至約400 PZ U/ml、約100 PZ U/ml、約150 PZ U/ml、約200 PZ U/ml、約210 PZ U/ml、約220 PZ U/ml、約230 PZ U/ml、約240 PZ U/ml、約250 PZ U/ml、約260 PZ U/ml、約270 PZ U/ml、約280 PZ U/ml、約289.2 PZ U/ml、約300 PZ U/ml、約350 PZ U/ml或約400 PZ U/ml。

【0810】在一些實施例中，中性蛋白酶係在1 ml無菌HBSS或另一緩衝液中重構。凍乾儲備酶之濃度可為每小瓶175 DMC U。凍乾儲備酶之濃度可為175 DMC/mL。在一些實施例中，在重構後，中性蛋白酶儲備液之範圍為100 DMC/ml至約400 DMC/ml，例如，約100 DMC/ml至約400 DMC/ml、約100 DMC/ml至約350 DMC/ml、約100 DMC/ml至約300 DMC/ml、約150 DMC/ml至約400 DMC/ml、約100 DMC/ml、約110 DMC/ml、約120

DMC/ml、約130 DMC/ml、約140 DMC/ml、約150 DMC/ml、約160 DMC/ml、約170 DMC/ml、約175 DMC/ml、約180 DMC/ml、約190 DMC/ml、約200 DMC/ml、約250 DMC/ml、約300 DMC/ml、約350 DMC/ml或約400 DMC/ml。

【0811】在一些實施例中，DNA酶I係在1 ml無菌HBSS或另一緩衝液中重構。凍乾儲備酶之濃度為每小瓶4 KU。在一些實施例中，在重構後，DNA酶I儲備液的範圍為約1 KU/ml至10 KU/ml，例如約1 KU/ml、約2 KU/ml、約3 KU/ml、約4 KU/ml、約5 KU/ml、約6 KU/ml、約7 KU/ml、約8 KU/ml、約9 KU/ml或約10 KU/ml。

【0812】在一些實施例中，酶儲備液會發生變化，因此請驗證凍乾儲備液之濃度，並相應地修改添加至碎解混合物中的酶之最終量。

【0813】在一些實施例中，酶混合物包含中性蛋白酶、膠原蛋白酶及DNA酶。

【0814】在一些實施例中，酶混合物包含約4.7 ml無菌HBSS中的約10.2 μl中性蛋白酶(0.36 DMC U/ml)、21.3 μl膠原蛋白酶(1.2 PZ/ml)及250 μl DNA酶I(200 U/ml)。

2. 胸膜滲出液TIL

【0815】在一些實施例中，樣本為胸膜液樣本。在一些實施例中，根據本文所描述之過程的用於擴增之TIL的來源為胸膜液樣本。在一些實施例中，樣本為源於胸膜滲

出液之樣本。在一些實施例中，根據本文所描述之過程的用於擴增之TIL的來源為源於胸膜滲出液之樣本。參見例如美國專利公開案US 2014/0295426中所描述之方法，其出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

【0816】在一些實施例中，可以採用疑似及/或含有TIL之任何胸膜液或胸膜滲出液。此類樣本可來源於原發性或轉移性肺癌，諸如NSCLC或SCLC。在一些實施例中，樣本可為來源於另一器官(例如乳房、卵巢、結腸或前列腺)之繼發轉移性癌細胞。在一些實施例中，用於本文所描述之擴增方法中之樣本為胸膜滲出物(pleural exudate)。在一些實施例中，用於本文所描述之擴增方法中之樣本為胸膜溢出物(pleural transudate)。其他生物樣本可包含含有TIL之其他漿液，包含例如來自腹部之腹水液或胰囊腫液。腹水液及胸膜液涉及非常類似的化學系統；腹部及肺兩者在相同的惡性腫瘤事件中於胸腔及腹腔中皆具有間皮細胞株及流體形式，且在一些實施例中，此類流體含有TIL。在本發明例示胸膜液的一些實施例中，可以使用含有TIL之腹水或其他囊腫液進行相同的方法以得到類似結果。

【0817】在一些實施例中，胸膜液呈未經處理之形式直接自患者移除。在一些實施例中，在接觸步驟之前，將未經處理之胸膜液置於標準血液收集管(諸如EDTA或肝素管)中。在一些實施例中，在接觸步驟之前，將未經處理之胸膜液置於標準CellSave®管(Veridex)中。在一些實施

例中，在自患者收集之後立即將樣本置於CellSave管中，以避免活TIL之數目減少。若保留在未經處理之胸膜液中，即使在4℃下，活TIL之數目可能在24小時內顯著降低。在一些實施例中，樣本係在自患者移除之後1小時、5小時、10小時、15小時或至多24小時內置於適當收集管中。在一些實施例中，樣本係在4℃下自患者移除之後1小時、5小時、10小時、15小時或至多24小時內置於適當收集管中。

【0818】在一些實施例中，可以稀釋來自所選個體之胸膜液樣本。在一個實施例中，稀釋度為1:10胸膜液比稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:9胸膜液比稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:8胸膜液比稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:5胸膜液比稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:2胸膜液比稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:1胸膜液比稀釋劑。在一些實施例中，稀釋劑包含鹽水、磷酸鹽緩衝鹽水、另一緩衝液或生理學上可接受之稀釋劑。在一些實施例中，樣本係在自患者收集及稀釋之後立即置於CellSave管中，以避免活TIL減少，若保留在未經處理之胸膜液中，則即使在4℃下，活TIL可能在24至48小時內顯著減少。在一些實施例中，胸膜液樣本係在自患者移除且稀釋之後1小時、5小時、10小時、15小時、24小時、36小時、至多48小時內置於適當收集管中。在一些實施例中，胸膜液樣本係在自患者移除且在4℃下稀釋之後1小時、5小時、10小時、15小時、24小時、36小時、

至多48小時內置於適當收集管中。

【0819】在一些實施例中，在進一步的處理步驟之前，藉由習知手段濃縮胸膜液樣本。在一些實施例中，在胸膜液必須冷凍保存以便運送至進行該方法之實驗室或用於後續分析(例如，在收集後24至48小時之後)之情形下，此胸膜液之預處理較佳。在一些實施例中，藉由在將胸膜液樣本自個體中取出後將其離心並將離心液或沈澱物再懸浮於緩衝液中來製備胸膜液樣本。在一些實施例中，對胸膜液樣本進行多次離心及再懸浮，隨後將其冷凍保存以用於運輸或以後的分析及/或處理。

【0820】在一些實施例中，在進一步的處理步驟之前，藉由使用過濾方法濃縮胸膜液樣本。在一些實施例中，在接觸步驟中使用之胸膜液樣本係藉由將流體經由含有已知且基本均勻的孔徑的過濾器過濾而製備的，該孔徑允許胸膜液通過膜但保留腫瘤細胞。在一些實施例中，膜中的孔之直徑可為至少4 μM。在其他實施例中，孔徑可為5 μM或更大，且在其他實施例中，可為6 μM、7 μM、8 μM、9 μM或10 μM中之任一者。過濾之後，可將被膜保留之細胞(包含TIL)自膜上衝出至適合的生理學上可接受之緩衝液中。然後可以將以此方式濃縮之細胞(包含TIL)用於該方法之接觸步驟中。

【0821】在一些實施例中，使胸膜液樣本(包含例如未經處理之胸膜液)、經稀釋之胸膜液或再懸浮之細胞沈澱物與溶解試劑接觸，該溶解試劑係差異性地溶解樣本中存

在之無核紅血球。在一些實施例中，在胸膜液含有大量RBC之情形下，此步驟係在進一步的處理步驟之前進行。適合的溶解試劑包含單一溶解試劑或溶解試劑及淬滅試劑，或溶解試劑、淬滅試劑及固定試劑。適合的溶解系統為市售的，且包含BD Pharm Lyse™系統(碧迪醫療公司(Becton Dickenson))。其他溶解系統包含Versalyse™系統、FACSlyse™系統(碧迪醫療公司)、Immunoprep™系統或Erythrolyse II系統(貝克曼庫爾特公司(Beckman Coulter, Inc.))或氯化銨系統。在一些實施例中，溶解試劑可隨主要需求而變化，該等需求為紅血球之有效溶解及TIL之保守性及胸膜液中TIL之表型特性。除採用單一試劑用於溶解之外，適用於本文所描述之方法的溶解系統可包含第二試劑，例如在該方法之剩餘步驟期間淬滅或延遲溶解試劑之效應的第二試劑，例如Stabilyse™試劑(貝克曼庫爾特公司)。視溶解試劑之選擇或該方法之較佳實施而定，亦可採用習知固定試劑。

【0822】在一些實施例中，在約-140℃之溫度下冷凍保存如上文所描述之未經處理、稀釋或多次離心或處理的胸膜液樣本，隨後如本文所提供進行進一步處理及/或擴增。

3. 擴增來自周邊血液之周邊血液淋巴球(PBL)之方法

【0823】PBL方法1。在本發明之一些實施例中，PBL係使用本文所描述之方法擴增。在本發明之一些實施例

中，該方法包括獲得來自全血之PBMC樣本。在一些實施例中，該方法包括藉由使用非CD19+級份之負向選擇以自PBMC中分離純T細胞來富集T細胞。在一些實施例中，該方法包括藉由使用非CD19+級份之基於磁珠之負向選擇以自PBMC中分離純T細胞來富集T細胞。

【0824】在本發明之一些實施例中，PBL方法1如下進行：在第0天，將冷凍保存之PBMC樣本解凍且計算PBMC之數目。使用人類泛T細胞分離套組與LS管柱(美天旎生物技術)分離T細胞。

【0825】PBL方法2。在本發明之一些實施例中，PBL係使用PBL方法2擴增，該方法包括獲得來自全血之PBMC樣本。藉由在37℃下培育PBMC至少三小時且接著分離非附著細胞來富集來自PBMC之T細胞。

【0826】在本發明之一些實施例中，PBL方法2如下進行：在第0天，將經冷凍保存之PMBC樣本解凍，且將PBMC細胞以每孔6百萬個細胞接種於CM-2培養基中之6孔盤中並且在37℃下培育3小時。3小時後，移除非附著細胞(其係PBL)且計算其數目。

【0827】PBL方法3。在本發明之一些實施例中，PBL係使用PBL方法3擴增，該方法包括獲得來自周邊血液之PBMC樣本。B細胞係使用CD19+選擇分離且T細胞係使用負向選擇PBMC樣本之非CD19+級份來選擇。

【0828】在本發明之一些實施例中，PBL方法3如下進行：在第0天，將來源於周邊血液的冷凍保存之PBMC解凍

且計算其數目。使用CD19多分選人類套組(美天旎生物技術)分選CD19+ B細胞。在非CD19+細胞級份中，使用人類泛T細胞分離套組及LS管柱(美天旎生物技術)純化T細胞。

【0829】在一些實施例中，PBMC係自全血樣本分離。在一些實施例中，使用PBMC樣本作為擴增PBL之起始物質。在一些實施例中，樣本在擴增過程之前經冷凍保存。在其他實施例中，使用新鮮樣本作為擴增PBL之起始物質。在本發明之一些實施例中，使用本領域中已知之方法自PBMC分離T細胞。在一些實施例中，使用人類泛T細胞分離套組及LS管柱分離T細胞。在本發明之一些實施例中，使用本領域中已知之抗體選擇方法(例如CD19負向選擇)自PBMC分離T細胞。

【0830】在本發明之一些實施例中，PBMC樣本係在有效鑑別非附著細胞之所需溫度下培育一段時間。在本發明之一些實施例中，培育時間為約3小時。在本發明之一些實施例中，溫度為約37℃。接著使用上述過程擴增非附著細胞。

【0831】在一些實施例中，PBMC樣本係來自視情況已經用包括激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療之個體或患者。在一些實施例中，腫瘤樣本係來自已經用包括激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療之個體或患者。在一些實施例中，PBMC樣本係來自已經用包括激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療之個體或患者，其已進行治療至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少4個

月、至少5個月、至少6個月或1年或更長。在其他實施例中，PBMC係來源於當前進行ITK抑制劑方案(諸如伊布替尼(ibrutinib))之患者。

【0832】在一些實施例中，PBMC樣本係來自已用包括激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療且難以用激酶抑制劑或ITK抑制劑(諸如伊布替尼)治療之個體或患者。

【0833】在一些實施例中，PBMC樣本係來自已經用包括激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療但不再進行激酶抑制劑或ITK抑制劑治療之個體或患者。在一些實施例中，PBMC樣本係來自已經用包括激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療但不再進行激酶抑制劑或ITK抑制劑治療並且尚未進行治療達至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少4個月、至少5個月、至少6個月或至少1年或更長之個體或患者。在其他實施例中，PBMC來源於先前暴露於ITK抑制劑但在至少3個月、至少6個月、至少9個月或至少1年內尚未經治療之患者。

【0834】在本發明之一實施例中，在第0天，針對CD19+選擇細胞且據此分選。在本發明之一些實施例中，使用抗體結合珠粒進行選擇。在本發明之一些實施例中，在第0天自PBMC分離純T細胞。

【0835】在本發明之一些實施例中，對於未經伊布替尼或其他ITK抑制劑預治療之患者，10 ml至15 ml白血球層將產生約5×10^9個PBMC，其又將產生約5.5×10^7個PBL。

【0836】在本發明之一些實施例中，對於經伊布替尼或其他ITK抑制劑預治療之患者，擴增過程將產生約20×10^9個PBL。在本發明之一些實施例中，40.3×10^6個PBMC將產生約4.7×10^5個PBL。

【0837】在任何前述實施例中，PBMC可來源於全血樣本，藉由血球分離術獲得，來源於白血球層，或自本領域中已知之用於獲得PBMC之任何其他方法獲得。

4. 擴增來自骨髓衍生之PBMC的骨髓浸潤性淋巴球(MIL)的方法

【0838】MIL方法3。在本發明之一些實施例中，該方法包括獲得來自骨髓之PBMC。在第0天，針對CD3+/CD33+/ CD20+/CD14+選擇PBMC且分選，且將非CD3+/CD33+/CD20+/ CD14+細胞級份進行音波處理且將一部分經音波處理之細胞級份添加回至所選細胞級份中。

【0839】在本發明之一些實施例中，MIL方法3如下進行：在第0天，將冷凍保存之PBMC樣本解凍且計算PBMC之數目。將細胞用CD3、CD33、CD20及CD14抗體染色且使用S3e細胞分選器(Bio-Rad)分選。將細胞分選成兩種級份：免疫細胞級份(MIL部分)(CD3+CD33+CD20+CD14+)及AML胚細胞級份(非CD3+CD33+CD20+CD14+)。

【0840】在本發明之一些實施例中，PBMC係獲自骨髓。在一些實施例中，PBMC係經由血球分離術、抽吸、針吸活體組織切片或本領域中已知之其他類似方式獲自骨

髓。在一些實施例中，PBMC為新鮮的。在其他實施例中，PBMC經冷凍保存。

【0841】在本發明之一些實施例中，MIL係自10 ml至50 ml骨髓抽吸物擴增。在本發明之一些實施例中，自患者獲得10 ml骨髓抽吸物。在其他實施例中，自患者獲得20 ml骨髓抽吸物。在其他實施例中，自患者獲得30 ml骨髓抽吸物。在其他實施例中，自患者獲得40 ml骨髓抽吸物。在其他實施例中，自患者獲得50 ml骨髓抽吸物。

【0842】在本發明之一些實施例中，自約10 ml至50 ml骨髓抽吸物產生之PBMC的數目為約5×10^7至約10×10^7個PBMC。在其他實施例中，產生之PMBC之數目為約7×10^7個PBMC。

【0843】在本發明之一些實施例中，約5×10^7至約10×10^7個PBMC產生約0.5×10^6至約1.5×10^6個MIL。在本發明之一些實施例中，產生約1×10^6個MIL。

【0844】在本發明之一些實施例中，來源於骨髓抽吸物之12×10^6個PBMC產生大約1.4×10^5個MIL。

【0845】在任何前述實施例中，PBMC可來源於全血樣本、骨髓、藉由血球分離術獲得，來源於白血球層，或自本領域中已知之用於獲得PBMC之任何其他方法獲得。

B.步驟B：初始第一擴增

【0846】在一些實施例中，本發明方法提供較年輕TIL，該等較年輕TIL相較於較老TIL(亦即，在向個體/患

者投予之前已進一步進行更多次複製的TIL)可能提供額外治療益處。年輕TIL之特徵已在文獻中描述，例如Donia等人，《斯堪的納維亞免疫學雜誌(*Scandinavian Journal of Immunology*)》，75:157-167(2012)；Dudley等人，《臨床癌症研究(*Clin Cancer Res*)》，16:6122-6131(2010)；Huang等人，《免疫療法雜誌》，28(3):258-267(2005)；Besser等人，《臨床癌症研究》，19(17):OF1-OF9(2013)；Besser等人，《免疫療法雜誌》 32:415-423(2009)；Robbins等人，《免疫學雜誌(*J Immunol*)》 2004; 173:7125-7130；Shen等人，《免疫療法雜誌》，30:123-129(2007)；Zhou等人，《免疫療法雜誌》，28:53-62(2005)；及Tran等人，《免疫療法雜誌》，31:742-751(2008)，其皆以全文引用之方式併入本文中。

【0847】在例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)之步驟A中所描述的腫瘤碎片及/或腫瘤碎片之分割或碎解之後，將所得細胞在有利於TIL但不利於腫瘤及其他細胞生長的條件下培養於含有IL-2、OKT-3及飼養細胞(例如抗原呈現飼養細胞)及/或包括OKT-3之來自APC之第一培養物之培養物上清液的血清中。在一些實施例中，IL-2、OKT-3及飼養細胞在培養起始時(例如在第0天)與腫瘤碎解物及/或腫瘤碎片一起添加。在一些實施例中，腫瘤碎解物及/或腫瘤碎片以每容器至多60個碎片培育於容器中。在一些實施例中，腫瘤碎解物及/或腫瘤碎片以每容器至多80個碎片培育於容器中。在一些實施例中，腫瘤碎解物及/或腫瘤碎片以每容器至多100個

碎片培育於容器中。在一些實施例中，腫瘤碎解物及/或腫瘤碎片以每容器至多60個碎片及6000 IU/mL IL-2培育於容器中。在一些實施例中，腫瘤碎解物及/或腫瘤碎片以每容器至多80個碎片及6000 IU/mL IL-2培育於容器中。在一些實施例中，腫瘤碎解物及/或腫瘤碎片以每容器至多100個碎片及6000 IU/mL IL-2培育於容器中。在一些實施例中，將此初代細胞群體培養數天之時段，通常1至8天，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此時段稱為活化I。在一些實施例中，將此初代細胞群體培養數天之時段，通常1至7天，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，初始第一擴增發生1至8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，初始第一擴增發生1至7天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，初始第一擴增發生1至3天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，初始第一擴增發生1至4天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，初始第一擴增發生1至5天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，初始第一擴增發生1至6天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生5至8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生5

至7天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約6至8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約6至7天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約7至8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約7天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約6至11天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約7至11天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約8至11天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約9至11天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約10至11天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約9天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約10天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，

此初始第一擴增發生約11天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。

【0848】在一些實施例中，TIL之擴增可使用如下文及本文所描述之初始第一擴增步驟(例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)之步驟B中所描述之彼等者，其可包含稱為預REP或初始REP之過程且其自第0天及/或自培養起始含有飼養細胞培養物上清液)進行，接著進行如下文步驟D及本文所描述之快速第二擴增(步驟D，包含稱為快速擴增方案(REP)步驟之過程)，隨後進行視情況選用之冷凍保存，且接著進行如下文及本文所描述之第二步驟D(包含稱為再刺激REP步驟之過程)。獲自此過程之TIL可視情況針對如本文所描述之表型特徵及代謝參數進行表徵。在一些實施例中，腫瘤碎片在約1 mm^3與10 mm^3之間。

【0849】在一些實施例中，第一擴增培養基稱為「CM」(培養基之縮寫)。在一些實施例中，步驟B之CM由補充有10%人類AB血清、25 mM Hepes及10 mg/mL建它黴素的含GlutaMAX之RPMI 1640組成。

【0850】在一些實施例中，有少於或等於240個腫瘤碎片。在一些實施例中，有少於或等於240個腫瘤碎片被放入少於或等於4個容器中。在一些實施例中，容器為GREX100 MCS培養瓶。在一些實施例中，少於或等於60個腫瘤碎片被放入1個容器中。在一些實施例中，有少於或等於200個腫瘤碎片。在一些實施例中，有少於或等於

200個腫瘤碎片被放入少於或等於5個容器中。在一些實施例中，少於或等於50個腫瘤碎片被放入1個容器中。在一些實施例中，各容器包括每容器少於或等於500 mL培養基。在一些實施例中，培養基包括IL-2。在一些實施例中，培養基包括6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，培養基包括抗原呈現飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)。在一些實施例中，培養基包括每容器2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包括OKT-3。在一些實施例中，培養基包括每容器30 ng/mL OKT-3。在一些實施例中，容器為GREX100 MCS培養瓶。在一些實施例中，培養基包括6000 IU/mL IL-2、30 ng OKT-3及2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包括每容器6000 IU/mL IL-2、30 ng/mL OKT-3及2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。

【0851】在製備腫瘤碎片之後，將所得細胞(亦即，為初代細胞群體之碎片)在有利TIL但不利腫瘤及其他細胞生長的條件下培養於含有IL-2、抗原呈現飼養細胞及OKT-3之培養基中，且其允許自第0天培養起始開始TIL起動及加速生長。在一些實施例中，腫瘤碎解物及/或腫瘤碎片與6000 IU/mL IL-2以及抗原呈現飼養細胞及OKT-3一起培育。將此初代細胞群體培養數天之時段，通常1至8天，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，在初始第一擴增期間的生長培養基包括IL-2或其變體以及抗原呈現飼養細胞及OKT-3。在一些實施例中，

將此初代細胞群體培養數天之時段，通常1至7天，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，在初始第一擴增期間的生長培養基包括IL-2或其變體以及抗原呈現飼養細胞及OKT-3。在一些實施例中，IL-2為重組人類IL-2(rhIL-2)。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備液具有20至30×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備液具有20×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備液具有25×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備液具有30×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，IL-2儲備液具有4至8×10^6 IU/mg IL-2之最終濃度。在一些實施例中，IL-2儲備液具有5至7×10^6 IU/mg IL-2之最終濃度。在一些實施例中，IL-2儲備液具有6×10^6 IU/mg IL-2之最終濃度。在一些實施例中，IL-2儲備液如實例C中所描述製備。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約10,000 IU/mL IL-2、約9,000 IU/mL IL-2、約8,000 IU/mL IL-2、約7,000 IU/mL IL-2、約6000 IU/mL IL-2或約5,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約9,000 IU/mL IL-2至約5,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約8,000 IU/mL IL-2至約6,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約7,000 IU/mL IL-2至約6,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約6,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，細胞培養基進一步包括IL-2。在一些實施例中，初始

第一擴增細胞培養基包括約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基進一步包括IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括約1000 IU/mL、約1500 IU/mL、約2000 IU/mL、約2500 IU/mL、約3000 IU/mL、約3500 IU/mL、約4000 IU/mL、約4500 IU/mL、約5000 IU/mL、約5500 IU/mL、約6000 IU/mL、約6500 IU/mL、約7000 IU/mL、約7500 IU/mL或約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括1000至2000 IU/mL、2000至3000 IU/mL、3000至4000 IU/mL、4000至5000 IU/mL、5000至6000 IU/mL、6000至7000 IU/mL、7000至8000 IU/mL或約8000 IU/mL IL-2。

【0852】在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約500 IU/mL IL-15、約400 IU/mL IL-15、約300 IU/mL IL-15、約200 IU/mL IL-15、約180 IU/mL IL-15、約160 IU/mL IL-15、約140 IU/mL IL-15、約120 IU/mL IL-15或約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約500 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約400 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約300 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約200 IU/mL IL-15。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括約180 IU/mL

IL-15。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基進一步包括IL-15。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括約180 IU/mL IL-15。

【0853】在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約20 IU/mL IL-21、約15 IU/mL IL-21、約12 IU/mL IL-21、約10 IU/mL IL-21、約5 IU/mL IL-21、約4 IU/mL IL-21、約3 IU/mL IL-21、約2 IU/mL IL-21、約1 IU/mL IL-21或約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約20 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約15 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約12 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約10 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約5 IU/mL IL-21至約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約2 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基進一步包括IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括約1 IU/mL IL-21。

【0854】在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括OKT-3抗體。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括約30 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，初始

第一擴增細胞培養基包括約0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL及約1 μg/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包括0.1 ng/mL至1 ng/mL、1 ng/mL至5 ng/mL、5 ng/mL至10 ng/mL、10 ng/mL至20 ng/mL、20 ng/mL至30 ng/mL、30 ng/mL至40 ng/mL、40 ng/mL至50 ng/mL、及50 ng/mL至100 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包括15 ng/ml至30 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包括30 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，OKT-3抗體為莫羅單抗。參見上文表1。

【0855】在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基在細胞培養基中包括一種或多種TNFRSF促效劑。在一些實施例中，TNFRSF促效劑包括4-1BB促效劑。在一些實施例中，TNFRSF促效劑為4-1BB促效劑，且該4-1BB促效劑選自由以下組成之群組：烏瑞魯單抗、烏圖木單抗、EU-101、融合蛋白及其片段、衍生物、變體、生物類似物及組合。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成0.1 μg/mL至100 μg/mL之濃度。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成20 μg/mL至40 μg/mL之濃度。

【0856】在一些實施例中，除了一種或多種TNFRSF促效劑之外，初始第一擴增細胞培養基進一步包括初始濃度約3000 IU/mL之IL-2及初始濃度約30 ng/mL之OKT-3抗體，且其中該一種或多種TNFRSF促效劑包括4-1BB促效劑。在一些實施例中，除了一種或多種TNFRSF促效劑之外，初始第一擴增細胞培養基進一步包括初始濃度約6000 IU/mL之IL-2及初始濃度約30 ng/mL之OKT-3抗體，且其中該一種或多種TNFRSF促效劑包括4-1BB促效劑。

【0857】在一些實施例中，初始第一擴增培養基稱為「CM」(培養基之縮寫)。在一些實施例中，其稱為CM1(培養基1)。在一些實施例中，CM由補充有10%人類AB血清、25 mM Hepes及10 mg/mL建它黴素的含GlutaMAX之RPMI 1640組成。在一些實施例中，CM為實例(參見實例A)中所描述之CM1。在一些實施例中，初始第一擴增在初始細胞培養基或第一細胞培養基中發生。在一些實施例中，初始第一擴增培養基或初始細胞培養基或第一細胞培養基包括IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞(在本文中亦稱為飼養細胞)。

【0858】在一些實施例中，本文揭示之擴增過程中使用的培養基為無血清培養基或確定培養基。在一些實施例中，無血清或確定培養基包括基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，無血清或確定培養基用於防止及/或減少部分因含血清培養基之批次間變化所致之實驗變化。

【0859】在一些實施例中，無血清或確定培養基包括基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，基礎細胞培養基包含但不限於CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CTS™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【0860】在一些實施例中，血清補充劑或血清替代物包含但不限於以下中之一者或多者：CTS™ OpTmizer T細胞擴增血清補充劑、CTS™免疫細胞血清替代物、一種或多種白蛋白或白蛋白取代物、一種或多種胺基酸、一種或多種維生素、一種或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一種或多種抗氧化劑、一種或多種胰島素或胰島素取代物、一種或多種膠原蛋白前驅物、一種或多種抗生素及一種或多種微量元素。在一些實施例中，確定培養基包括白蛋白及一種或多種選自由以下組成之群組的成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部

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Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，確定培養基進一步包括L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或2-巰基乙醇。

【0861】在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞免疫細胞血清替代物與習知生長培養基一起使用，該習知生長培養基包含但不限於CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CST™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【0862】在一些實施例中，以無血清或確定培養基之總體積計，無血清或確定培養基中之總血清替代物濃度(vol%)為約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約3%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約5%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約10%。

【0863】在一些實施例中，無血清或確定培養基為

CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1 L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基及26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑在使用前混合在一起之組合。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(Serum Replacement；SR)(賽默飛世爾科技)。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)，且2-巰基乙醇於培養基中之最終濃度為55 μM。

【0864】在一些實施例中，確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1 L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基及26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑在使用前混合在一起之組合。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM的2-巰基乙醇及2 mM的L-麩醯胺酸。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T

細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包括約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包括約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包括約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包括約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包括約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包括約1000 IU/mL至約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包括約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默

飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包括約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包括約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)，且2-巰基乙醇於培養基中之最終濃度為55 μM。

【0865】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約0.1 mM至約10 mM、0.5 mM至約9 mM、1 mM至約8 mM、2 mM至約7 mM、3 mM至約6 mM或4 mM至約5 mM的麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約2 mM之麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。

【0866】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約5 mM至約150 mM、10 mM至約140 mM、15 mM至約130 mM、20 mM至約120 mM、25 mM至約110 mM、30 mM至約100 mM、35 mM至約95 mM、40 mM至約90 mM、45 mM至約85 mM、50 mM至約80 mM、55 mM至約75 mM、60 mM至約70 mM或約65 mM之2-巰基乙醇。在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約55 mM之2-巰基乙醇。在一些實施例中，2-巰基乙醇於培養基中之最終濃度為55 μM。

【0867】在一些實施例中，以引用之方式併入本文中

的國際PCT公開案第WO/1998/030679號中所描述之確定培養基可用於本發明。在該公開案中，描述無血清真核細胞培養基。無血清真核細胞培養基包含補充有能夠支持細胞在無血清培養中生長之無血清補充劑的基礎細胞培養基。無血清真核細胞培養基補充劑包括一種或多種選自由以下組成之群組的成分，或藉由組合一種或多種選自由以下組成之群組的成分而獲得：一種或多種白蛋白或白蛋白取代物、一種或多種胺基酸、一種或多種維生素、一種或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一種或多種抗氧化劑、一種或多種胰島素或胰島素取代物、一種或多種膠原蛋白前驅物、一種或多種微量元素及一種或多種抗生素。在一些實施例中，確定培養基進一步包括L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或β-巰基乙醇。在一些實施例中，確定培養基包括白蛋白或白蛋白取代物及一種或多種選自由以下組成之群組的成分：一種或多種胺基酸、一種或多種維生素、一種或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一種或多種抗氧化劑、一種或多種胰島素或胰島素取代物、一種或多種膠原蛋白前驅物及一種或多種微量元素。在一些實施例中，確定培養基包括白蛋白及一種或多種選自由以下組成之群組的成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分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Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，基礎細胞培養基係選自由以下組成之群組：達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【0868】在一些實施例中，確定培養基中甘胺酸之濃度在約5至200 mg/L之範圍內，L-組胺酸之濃度為約5至250 mg/L，L-異白胺酸之濃度為約5至300 mg/L，L-甲硫胺酸之濃度為約5至200 mg/L，L-苯丙胺酸之濃度為約5至400 mg/L，L-脯胺酸之濃度為約1至1000 mg/L，L-羥基脯胺酸之濃度為約1至45 mg/L，L-絲胺酸之濃度為約1至250 mg/L，L-蘇胺酸之濃度為約10至500 mg/L，L-色胺酸之濃度為約2至110 mg/L，L-酪胺酸之濃度為約3至175 mg/L，L-纈胺酸之濃度為約5至500 mg/L，硫胺素之濃度為約1至20 mg/L，還原麩胱甘肽之濃度為約1至20 mg/L，L-抗壞血酸-2-磷酸鹽之濃度為約1至200 mg/L，鐵飽和運鐵蛋白之濃度為約1至50 mg/L，胰島素之濃度為約1至100 mg/L，亞硒酸鈉之濃度為約0.000001至0.0001 mg/L，且白蛋白(例如AlbuMAX® I)之濃度為約5000至50,000 mg/L。

【0869】在一些實施例中，確定培養基中之非微量元素部分成分係以表4中標題「1X培養基中之濃度範圍」欄中列出之濃度範圍存在。在其他實施例中，確定培養基中

之非微量元素部分成分係以表4中標題「1X培養基之較佳實施例」欄中列出之最終濃度存在。在其他實施例中，確定培養基為包括無血清補充劑之基礎細胞培養基。在一些此等實施例中，無血清補充劑包括表4中的類型及標題「補充劑之較佳實施例」欄中列出之濃度的非微量部分成分。

表4：非微量元素部分成分之濃度

成分	補充劑之較佳實施例（mg/L）（約）	1X培養基中之濃度範圍（mg/L）（約）	1X培養基之較佳實施例（mg/L）（約）
甘胺酸	150	5-200	53
L-組胺酸	940	5-250	183
L-異白胺酸	3400	5-300	615
L-甲硫胺酸	90	5-200	44
L-苯丙胺酸	1800	5-400	336
L-脯胺酸	4000	1-1000	600
L-羥基脯胺酸	100	1-45	15
L-絲胺酸	800	1-250	162
L-蘇胺酸	2200	10-500	425
L-色胺酸	440	2-110	82
L-酪胺酸	77	3-175	84
L-纈胺酸	2400	5-500	454
硫胺素	33	1-20	9
還原麩胱甘肽	10	1-20	1.5
抗壞血酸-2-PO_4（Mg鹽）	330	1-200	50
運鐵蛋白（鐵飽和）	55	1-50	8
胰島素	100	1-100	10
亞硒酸鈉	0.07	0.000001-0.0001	0.00001
AlbuMAX®I	83,000	5000-50,000	12,500

【0870】在一些實施例中，確定培養基之滲透壓介於約260與350 mOsmol之間。在一些實施例中，滲透壓介於約280與310 mOsmol之間。在一些實施例中，確定培養基補充有至多約3.7 g/L或約2.2 g/L碳酸氫鈉。確定培養基可進一步補充有L-麩醯胺酸(最終濃度為約2 mM)、一種或多種抗生素、非必需胺基酸(NEAA；最終濃度為約100 μM)、2-巰基乙醇(最終濃度為約100 μM)。

【0871】在一些實施例中，Smith等人，《使用新穎無Xeno CTS免疫細胞血清替代物離體擴增人類T細胞以用於過繼免疫療法》，《臨床轉化免疫學》，4(1) 2015(數位物件識別碼：10.1038/cti.2014.31)中所描述之確定培養基可用於本發明。簡言之，RPMI或CTS™ OpTmizer™用作基礎細胞培養基且補充有0、2%、5%或10% CTS™免疫細胞血清替代物。

【0872】在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基為未經過濾的。使用未經過濾之細胞培養基可簡化擴增細胞數目所需之程序。在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基缺乏β-巰基乙醇(BME或βME；亦稱為2-巰基乙醇，CAS 60-24-2)。

【0873】在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為1至8天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖

1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為2至8天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為3至8天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為4至8天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為1至7天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為2至8天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為2至7天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP

或初始REP之彼等過程)為3至8天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為3至7天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為4至8天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為4至7天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為5至8天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為5至7天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為6至8天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等過程，

其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為6至7天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為7至8天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所提供之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為8天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所提供之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為7天。

【0874】在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行1天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行1天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行2天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行2天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行3天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行3天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增

步驟起始後進行4天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行4天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行5天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行5天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行6天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行6天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行7至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行7天。

【0875】在一些實施例中，TIL之初始第一擴增可進行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行1天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行1天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行2天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行2天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行3天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行3天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行4天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行4天至7天。在一些實

施例中，第一TIL擴增可進行5天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行5天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行6天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行6天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行7天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行7天。

【0876】在一些實施例中，採用IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21之組合作為在初始第一擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21以及其任何組合可包含在初始第一擴增期間，包含例如在根據圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)以及本文所描述之步驟B過程期間。在一些實施例中，採用IL-2、IL-15及IL-21之組合作為在初始第一擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-15及IL-21以及其任何組合可包含在根據圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)以及如本文所描述之步驟B過程期間。

【0877】在一些實施例中，初始第一擴增(例如根據圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)之步驟B)係在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用生物反應器。在一些實施例中，採用生物反應器作為容器。在一些實施例中，所採用的生物反應器為例如G-REX-10或G-REX-100。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-REX-100。在一些實施例中，所採

用的生物反應器為G-REX-10。

1.飼養細胞及抗原呈現細胞

【0878】在一些實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序(例如包含如下擴增，諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而是在初始第一擴增期間添加。在一些實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序(例如包含如下擴增，諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而是在初始第一擴增期間第4至8天期間的任何時間添加。在一些實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序(例如包含如下擴增，諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而是在初始第一擴增期間第4至7天期間的任何時間添加。在一些實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序(例如包含如下擴增，諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預

REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」),而是在初始第一擴增期間第5至8天期間的任何時間添加。在一些實施例中,本文所描述之初始第一擴增程序(例如包含如下擴增,諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」),而是在初始第一擴增期間第5至7天期間的任何時間添加。在一些實施例中,本文所描述之初始第一擴增程序(例如包含如下擴增,諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」),而是在初始第一擴增期間第6至8天期間的任何時間添加。在一些實施例中,本文所描述之初始第一擴增程序(例如包含如下擴增,諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」),而是在初始第一擴增期間第6至7天期間的任何時間添加。在一些實施例中,本文所描述之初始第一擴增程序(例如包含如下擴增,諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預

REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而是在初始第一擴增期間第7或8天期間的任何時間添加。在一些實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序(例如包含如下擴增，諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而是在初始第一擴增期間第7天期間的任何時間添加。在一些實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序(例如包含如下擴增，諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而是在初始第一擴增期間第8天期間的任何時間添加。

【0879】在一些實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序(例如包含如下擴增，諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時及初始第一擴增期間需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)。在許多實施例中，飼養細胞係獲自同種異體健康血液供體之標準全血單位的周邊血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。在一些實施例中，初始第一擴增期間使

用2.5×10^8個飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增期間使用1×10^9個飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增期間使用1.25×10^9個飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增期間使用每容器2.5×10^8個飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增期間使用每容器1×10^9個飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增期間使用每容器1.25×10^9個飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增期間使用每GREX-10 2.5×10^8個飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增期間使用每GREX-10 1×10^9個飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增期間使用每GREX-10 1.25×10^9個飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增期間使用每GREX-100 2.5×10^8個飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增期間使用每GREX-100 1×10^9個飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增期間使用每GREX-100 1.25×10^9個飼養細胞。

【0880】一般而言，同種異體PBMC經由照射或熱處理去活化，且如實例中所描述用於REP程序，其提供用於評估經照射同種異體PBMC之複製非勝任之例示性方案。

【0881】在一些實施例中，若第14天活細胞總數小於在初始第一擴增第0天放入培養的初始活細胞數目，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。

【0882】在一些實施例中，若第7天在OKT3及IL-2存在下培養的活細胞總數與在初始第一擴增第0天放入培養

的初始活細胞數目相比並未增加，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。在一些實施例中，PBMC在30 ng/ml OKT3抗體及3000 IU/ml IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30 ng/ml OKT3抗體及6000 IU/ml IL-2存在下培養。

【0883】在一些實施例中，若第7天在OKT3及IL-2存在下培養的活細胞總數與在初始第一擴增第0天放入培養的初始活細胞數目相比並未增加，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。在一些實施例中，PBMC在5至60 ng/mL OKT3抗體及1000至6000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在10至50 ng/mL OKT3抗體及2000至5000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在20至40 ng/mL OKT3抗體及2000至4000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在25至35 ng/mL OKT3抗體及2500至3500 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30 ng/mL OKT3抗體及6000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在15 ng/mL OKT3抗體及3000 IU/ml IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在15 ng/mL OKT3抗體及6000 IU/mL IL-2存在下培養。

【0884】在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為PBMC。在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為人工抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率為約1比25、約1比50、約1比100、

約1比125、約1比150、約1比175、約1比200、約1比225、約1比250、約1比275、約1比300、約1比325、約1比350、約1比375、約1比400或約1比500。在一些實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比50與1比300之間。在一些實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比100與1比200之間。

【0885】在一些實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序需要約2.5×10^8個飼養細胞與約100×10^6個TIL之比率。在其他實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序需要約2.5×10^8個飼養細胞與約50×10^6個TIL之比率。在又一實施例中，本文所描述之初始第一擴增需要約2.5×10^8個飼養細胞與約25×10^6個TIL。在又一實施例中，本文所描述之初始第一擴增需要約2.5×10^8個飼養細胞。在又一實施例中，初始第一擴增需要四分之一、三分之一、十二分之五或二分之一的用於快速第二擴增之飼養細胞數目。

【0886】在一些實施例中，初始第一擴增中之培養基包括IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增中之培養基包括6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增中之培養基包括抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增中之培養基包括每容器2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增中之培養基包括OKT-3。在一些實施例中，培養基包括每容器30 ng OKT-3。在一些實施例中，容器為GREX100 MCS培養瓶。在一些實施例中，培養基包括6000 IU/mL IL-2、30 ng/mL

OKT-3及2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包括每容器6000 IU/mL IL-2、30 ng/mL OKT-3及2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包括每容器每2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞500 mL培養基及15 μg OKT-3。在一些實施例中，培養基包括每容器500 mL培養基及15 μg OKT-3。在一些實施例中，容器為GREX100 MCS培養瓶。在一些實施例中，培養基包括500 mL培養基及6000 IU/mL IL-2、30 ng/mL OKT-3及2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包括每容器500 mL培養基及6000 IU/mL IL-2、15 μg OKT-3及2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包括每容器每2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞500 mL培養基及15 μg OKT-3。

【0887】在一些實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序在第二擴增期間需要多於TIL的過量飼養細胞。在許多實施例中，飼養細胞係獲自同種異體健康血液供體之標準全血單位的周邊血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。在一些實施例中，使用人工抗原呈現細胞(aAPC)代替PBMC。

【0888】一般而言，同種異體PBMC經由照射或熱處理去活化，且用於本文所描述之TIL擴增程序，包含圖式及實例中所描述之例示性程序。

【0889】在一些實施例中，在初始第一擴增中使用人工抗原呈現細胞來替代PBMC或與PBMC組合使用。

【0890】在一些實施例中，本文中所描述之初始第一擴增程序以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而是需要獲自抗原呈現飼養細胞之培養物之含有OKT-3的培養物上清液。在一些實施例中，培養物上清液係獲自在補充有IL-2及OKT-3之培養基中之PBMC培養物。在一些實施例中，培養物上清液係獲自在補充有IL-2及OKT-3之培養基中培養約3或4天後之PBMC培養物。在一些實施例中，培養物上清液係獲自在培養中之PMBC之生長速率開始下降之後，在補充有IL-2及OKT-3之培養基中培養的PBMC培養物。在一些實施例中，培養物上清液係獲自在培養中之PMBC之生長速率已下降約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多之後，在補充有IL-2及OKT-3之培養基中培養的PBMC培養物。在一些實施例中，培養物上清液係獲自在培養基耗竭或消耗之後，在補充有IL-2及OKT-3之培養基中培養之PBMC培養物。在一些實施例中，培養物上清液係獲自在培養基耗竭或消耗至少約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多之後，在補充有IL-2及OKT-3之培養基中培養之PBMC培養物。

2. 細胞介素

【0891】本文所描述之擴增方法通常使用具有高劑量

細胞介素(特別是IL-2)之培養基，如本領域中所已知。

【0892】替代地，使用細胞介素之組合用於TIL之初始第一擴增係另外可能的，其中IL-2、IL-15及IL-21中之兩者或更多者之組合如國際公開案第WO 2015/189356及WO 2015/189357號中大體上所概述，在此明確地以全文引用之方式併入。因此，可能組合包含IL-2及IL-15、IL-2及IL-21、IL-15及IL-21以及IL-2、IL-15及IL-21，其中後者在許多實施例中具有特定用途。使用細胞介素之組合特別有利於產生淋巴球，且特別是如其中所描述的T細胞。

表 4：介白素之胺基酸序列。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:3 重組人類 IL-2 （rhIL-2）	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
SEQ ID NO:4 阿地介白素	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
SEQ ID NO:5 重組人類 IL-4 （rhIL-4）	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREKYSKCSS 130
SEQ ID NO:6 重組人類 IL-7 （rhIL-7）	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH 153
SEQ ID NO:7 重組人類 IL-15 （rhIL-15）	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115
SEQ ID NO:8 重組人類 IL-21 （rhIL-21）	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132

C. 步驟C：初始第一擴增至快速第二擴增之轉變

【0893】在一些情況下，獲自初始第一擴增(其可包含有時稱為預REP之擴增)之主體TIL群體，包含例如獲自例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所指示之步驟B的TIL群體，可經歷快速第二擴增(其可包含有時稱為快速擴增方案(REP)之擴增)且接著如下文所論述冷凍保存。類似地，在經遺傳修飾之TIL將用於療法的情況下，來自初始第一擴增之經擴增TIL群體或來自快速第二擴增之經擴增TIL群體可在擴增步驟之前或在初始第一擴增之後且在快速第二擴增之前進行遺傳修飾以用於合適治療。

【0894】在一些實施例中，獲自初始第一擴增(例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所指示之步驟B)之TIL經儲存直至為了選擇而測定表型。在一些實施例中，獲自初始第一擴增(例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所指示之步驟B)之TIL不經儲存且直接進行快速第二擴增。在一些實施例中，獲自初始第一擴增之TIL在初始第一擴增之後且在快速第二擴增之前不經冷凍保存。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在腫瘤碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約3天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初

始擴增步驟起始後約3天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約4天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約4天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約5天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約5天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約6天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約6天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約7天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約8天發生。

【0895】在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後1天至7天發生。在一

些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後1天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後2天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後2天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後3天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後3天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後4天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後4天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後5天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後5天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後6天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後6天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後7天至8天

發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後8天發生。

【0896】在一些實施例中，TIL在初級(primary)第一擴增之後且在快速第二擴增之前不經儲存，且TIL直接進行快速第二擴增(例如在一些實施例中，在如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所顯示的步驟B至步驟D之轉變期間不經儲存)。在一些實施例中，轉變在如本文所描述之密閉系統中發生。在一些實施例中，來自初始第一擴增之TIL(第二TIL群體)直接進行快速第二擴增而無轉變期。

【0897】在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變(例如根據圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)之步驟C)係在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用單一生物反應器。在一些實施例中，所採用的單一生物反應器為例如GREX-10或GREX-100。在一些實施例中，密閉系統生物反應器為單一生物反應器。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變涉及容器大小之規模縱向擴大。在一些實施例中，初始第一擴增與快速第二擴增相比係在較小容器中進行。在一些實施例中，初始第一擴增在GREX-100中進行且快速第二擴增在GREX-500中進行。

D.步驟D：快速第二擴增

【0898】在一些實施例中，TIL細胞群體在如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所指示之腫瘤收集及碎段以及初始第一擴增(步驟A及步驟B)及稱為步驟C之轉變之後進一步擴增數目。此進一步擴增在本文中稱為快速第二擴增，其可包含在本領域中通常稱為快速擴增過程(快速擴增方案或REP)之擴增過程；以及如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)之步驟D中所指示之過程。快速第二擴增通常使用包括多種組分(包含飼養細胞及/或飼養細胞培養物上清液、細胞介素來源及抗CD3抗體)之培養基在透氣容器中完成。在一些實施例中，在快速第二擴增起始後1天、2天、3天或4天(亦即，在整體Gen 3過程之第8、9、10或11天)，將TIL轉移至較大體積容器。在一些實施例中，此快速第二擴增稱為活化II。

【0899】在一些實施例中，TIL之快速第二擴增(其可包含有時稱為REP之擴增；以及如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)之步驟D中所指示之過程)可使用本領域中熟習此項技術者已知之任何TIL培養瓶或容器進行。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約1天至約9天。在一些實施例

中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約1天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約2天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約2天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約3天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約3天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約4天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約4天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約5天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約5天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約6天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約6天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約7天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約7天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約8天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約8天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約9天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約1天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約2

天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約3天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約4天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約5天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約6天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約7天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約8天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約10天。

【0900】在一些實施例中，快速第二擴增可在透氣容器中使用本揭示案之方法(包含例如稱為REP之擴增；以及如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)之步驟D中所指示之過程)進行。在一些實施例中，TIL在快速第二擴增中在IL-2、OKT-3及飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)存在下擴增。在一些實施例中，TIL在快速第二擴增中在IL-2、OKT-3及飼養細胞存在下擴增，其中將飼養細胞添加至最終濃度，該最終濃度為存在於初始第一擴增中之飼養細胞濃度的兩倍、2.4倍、2.5倍、3倍、3.5倍或4倍。舉例而言，TIL可在介白素-2(IL-2)或介白素-15(IL-15)存在下使用非特異性T細胞受體刺激而快速擴增。非特異性T細胞受體刺激物可包含例如抗CD3抗體，諸如約30 ng/ml OKT3、小鼠單株抗CD3抗體(可購自新澤西州拉里坦市的Ortho-McNeil或加利福尼亞

州奧本市的美天旎生物技術公司)或UHCT-1(可購自美國加利福尼亞州聖地亞哥市的BioLegend)。TIL可藉由在第二擴增期間包含一種或多種癌症之抗原(包含其抗原部分，諸如抗原決定基)來擴增以誘導進一步TIL活體外刺激，該等抗原可視情況在T細胞生長因子(諸如300 IU/mL IL-2或IL-15)存在下視情況自載體表現，該載體諸如人類白血球抗原A2(HLA-A2)結合肽，例如0.3 μM MART-1 :26-35(27L)或gpl 00:209-217(210M)。其他適合抗原可包含例如NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、酪胺酸酶癌症抗原、MAGE-A3、SSX-2及VEGFR2或其抗原部分。TIL亦可藉由用脈衝至表現HLA-A2之抗原呈現細胞上的相同癌症抗原再刺激而快速擴增。替代地，TIL可進一步用例如實例經照射之自體淋巴球或用經照射之HLA-A2+同種異體淋巴球及IL-2再刺激。在一些實施例中，再刺激作為第二擴增之部分發生。在一些實施例中，第二擴增在經照射之自體淋巴球或經照射之HLA-A2+同種異體淋巴球及IL-2存在下發生。

【0901】在一些實施例中，細胞培養基進一步包括IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包括約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包括約1000 IU/mL、約1500 IU/mL、約2000 IU/mL、約2500 IU/mL、約3000 IU/mL、約3500 IU/mL、約4000 IU/mL、約4500 IU/mL、約5000 IU/mL、約5500 IU/mL、約6000 IU/mL、約6500 IU/mL、約7000 IU/mL、約7500 IU/mL或約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包括1000至2000

IU/mL、2000至3000 IU/mL、3000至4000 IU/mL、4000至5000 IU/mL、5000至6000 IU/mL、6000至7000 IU/mL、7000至8000 IU/mL、或8000 IU/mL IL-2。

【0902】在一些實施例中，細胞培養基包括OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包括約30 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包括約0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL及約1 μg/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包括0.1 ng/mL至1 ng/mL、1 ng/mL至5 ng/mL、5 ng/mL至10 ng/mL、10 ng/mL至20 ng/mL、20 ng/mL至30 ng/mL、30 ng/mL至40 ng/mL、40 ng/mL至50 ng/mL、及50 ng/mL至100 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包括30 ng/ml至60 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包括約60 ng/mL OKT-3。在一些實施例中，OKT-3抗體為莫羅單抗。

【0903】在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括IL-2。在一些實施例中，培養基包括6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括每容器7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施

例中，快速第二擴增中之培養基包括OKT-3。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括每容器500 mL培養基及30 μg OKT-3。在一些實施例中，容器為GREX100 MCS培養瓶。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括6000 IU/mL IL-2、60 ng/mL OKT-3及7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包括每容器500 mL培養基及6000 IU/mL IL-2、30 μg OKT-3及7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。

【0904】在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括IL-2。在一些實施例中，培養基包括6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包括每容器5×10^8至7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括OKT-3。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括每容器500 mL培養基及30 μg OKT-3。在一些實施例中，容器為GREX100 MCS培養瓶。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括6000 IU/mL IL-2、60 ng/mL OKT-3及5×10^8至7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括每容器500 mL培養基及6000 IU/mL IL-2、30 μg OKT-3及5×10^8至7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。

【0905】在一些實施例中，細胞培養基包括一種或多種TNFRSF促效劑於細胞培養基中。在一些實施例中，TNFRSF促效劑包括4-1BB促效劑。在一些實施例中，

TNFRSF促效劑為4-1BB促效劑，且該4-1BB促效劑選自由以下組成之群組：烏瑞魯單抗、烏圖木單抗、EU-101、融合蛋白及其片段、衍生物、變體、生物類似物及組合。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成0.1 μg/mL至100 μg/mL之濃度。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成20 μg/mL至40 μg/mL之濃度。

【0906】在一些實施例中，除了一種或多種TNFRSF促效劑之外，細胞培養基進一步包括初始濃度約3000 IU/mL之IL-2及初始濃度約30 ng/mL之OKT-3抗體，且其中該一種或多種TNFRSF促效劑包括4-1BB促效劑。

【0907】在一些實施例中，採用IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21之組合作為在第二擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21以及其任何組合可包含在第二擴增期間，包含例如在根據圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)以及本文所描述之步驟D過程期間。在一些實施例中，採用IL-2、IL-15及IL-21之組合作為在第二擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-15及IL-21以及其任何組合可包含在根據圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)及如本文所描述之步驟D過程期間。

【0908】在一些實施例中，第二擴增可在包括IL-2、OKT-3、抗原呈現飼養細胞且視情況包括TNFRSF促效劑之補充細胞培養基中進行。在一些實施例中，第二擴增在

補充細胞培養基中發生。在一些實施例中，補充細胞培養基包括IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，第二細胞培養基包括IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC；亦稱為抗原呈現飼養細胞)及/或來自包括OKT-3之APC培養物之培養物上清液。在一些實施例中，第二擴增在包括IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞(亦即抗原呈現細胞)之細胞培養基中發生。

【0909】在一些實施例中，第二擴增培養基包括約500 IU/mL IL-15、約400 IU/mL IL-15、約300 IU/mL IL-15、約200 IU/mL IL-15、約180 IU/mL IL-15、約160 IU/mL IL-15、約140 IU/mL IL-15、約120 IU/mL IL-15或約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約500 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約400 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約300 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約200 IU/mL IL-15。在一些實施例中，細胞培養基包括約180 IU/mL IL-15。在一些實施例中，細胞培養基進一步包括IL-15。在一些實施例中，細胞培養基包括約180 IU/mL IL-15。

【0910】在一些實施例中，第二擴增培養基包括約20 IU/mL IL-21、約15 IU/mL IL-21、約12 IU/mL IL-21、約10 IU/mL IL-21、約5 IU/mL IL-21、約4 IU/mL IL-21、約3 IU/mL IL-21、約2 IU/mL IL-21、約1 IU/mL IL-21或約

0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約20 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約15 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約12 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約10 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約5 IU/mL IL-21至約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約2 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包括約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包括約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基進一步包括IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包括約1 IU/mL IL-21。

【0911】在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞(APC)為PBMC。在一些實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中TIL與PBMC及/或抗原呈現細胞之比率為約1比10、約1比15、約1比20、約1比25、 約1比30、約1比35、約1比40、約1比45、約1比50、約1比75、約1比100、約1比125、約1比150、約1比175、約1比200、約1比225、約1比250、約1比275、約1比300、約1比325、約1比350、約1比375、約1比400、或約1比500。在一些實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中TIL與PBMC之比率介於1比50與1比300之間。在一些實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中TIL與PBMC之比率介於1比100與1比200之間。

【0912】在一些實施例中，REP及/或快速第二擴增在培養瓶中進行，其中主體TIL與100倍或200倍過量的去活化飼養細胞、30 ng/mL OKT3抗CD3抗體及6000 IU/mL IL-2混合於150 ml培養基中，其中飼養細胞濃度係初始第一擴增中之飼養細胞濃度的至少1.1倍(1.1X)、1.2X、1.3X、1.4X、1.5X、1.6X、1.7X、1.8X、1.8X、2X、2.1X、2.2X、2.3X、2.4X、2.5X、2.6X、2.7X、2.8X、2.9X、3.0X、3.1X、3.2X、3.3X、3.4X、3.5X、3.6X、3.7X、3.8X、3.9X或4.0X。替換培養基(通常經由抽取2/3用過的培養基且用相等體積的新鮮培養基替換來替換2/3培養基)直至細胞轉移至替代生長箱室。替代生長箱室包含G-REX培養瓶及透氣容器，如下文更充分論述。

【0913】在一些實施例中，快速第二擴增(其可包含稱為REP過程之過程)為7至9天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，第二擴增為7天。在一些實施例中，第二擴增為8天。在一些實施例中，第二擴增為9天。

【0914】在一些實施例中，第二擴增(其可包含稱為REP之擴增，以及在圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)之步驟D中提及之彼等者)可在500 mL容量的具有100 cm透氣矽底之透氣培養瓶(G-Rex 100，可購自美國明尼蘇達州新布賴頓市的威爾遜狼製造公司(Wilson Wolf Manufacturing Corporation))中進行，5×10^6或10×10^6個TIL可與PBMC在400 mL的補充有5%人類AB血清、3000 IU/mL IL-2及30 ng/ml 抗CD3(OKT3)之

50/50培養基中培養。G-Rex 100培養瓶可在37℃下在5% CO_2中培育。在第5天，可將250 mL上清液移除並放入離心瓶中且以1500 rpm(491×g)離心10分鐘。可將TIL沈澱物用150 mL的含有5%人類AB血清、6000 IU/mL IL-2之新鮮培養基再懸浮，且添加回原始GREX-100培養瓶中。當TIL在GREX-100培養瓶中連續擴增時，在第10或11天可將TIL移至較大培養瓶，諸如GREX-500。細胞可在培養的第14天收集。細胞可在培養的第15天收集。細胞可在培養的第16天收集。在一些實施例中，替換培養基直至細胞轉移至替代生長箱室。在一些實施例中，藉由抽取用過的培養基且用相等體積的新鮮培養基替換來替換2/3培養基。在一些實施例中，替代生長箱室包含GREX培養瓶及透氣容器，如下文更充分論述。

【0915】在一些實施例中，在快速擴增之第10或11天，藉由將培養物轉移至一個或多個新的培養容器中來橫向擴大及/或縱向擴大培養規模。

【0916】在一些實施例中，在快速擴增之第10或11天，藉由將培養物轉移至複數個大小與其中起始快速擴增之初始培養容器相等之新的培養容器中來橫向擴大培養規模。在一些實施例中，每一新的培養容器為G-rex 10M培養容器，且初始培養容器為G-rex 10M培養容器。在一些實施例中，每一新的培養容器為G-rex 100M培養容器，且初始培養容器為G-rex 100M培養容器。

【0917】在一些實施例中，在快速擴增之第10或11

天，藉由將培養物轉移至大小比其中起始快速擴增之初始培養容器更大之新的培養容器中來縱向擴大培養規模。

【0918】在一些實施例中，在快速擴增之第10或11天，藉由將培養物轉移至複數個大小比其中起始快速擴增之初始培養容器更大之新的培養容器中來橫向擴大及縱向擴大培養規模。

【0919】在一些實施例中，在快速擴增之第10或11天，藉由將培養物轉移至2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小與其中起始快速擴增之初始培養容器相等之新的培養容器中來橫向擴大培養規模。

【0920】在一些實施例中，初始培養容器中之培養物係均勻分佈至新的培養容器中。

【0921】在一些實施例中，在快速擴增之第10或11天，藉由將培養物轉移至5個大小與其中起始快速擴增之初始培養容器相等之新的培養容器中來橫向擴大培養規模。在一些實施例中，初始培養容器中之培養物係均勻分佈至5個新的培養容器中。

【0922】在一些實施例中，在快速擴增之第10或11天，藉由將培養物轉移至一個或多個含有補充有IL-2之新鮮培養基之新的培養容器中來橫向擴大及/或縱向擴大培養規模。在一些實施例中，每一新的培養容器含有與其中起始快速擴增之初始培養容器中之培養基相同或不同的新鮮培養基。在一些實施例中，每一新的培養容器含有與初

始培養容器中之培養基不同的新鮮培養基。在一些實施例中，每一新的培養容器含有新鮮DM2培養基，且初始培養容器含有DM1培養基。

【0923】在一些實施例中，本文揭示之擴增過程中使用的培養基為無血清培養基或確定培養基。在一些實施例中，無血清或確定培養基包括基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，無血清或確定培養基用於防止及/或減少部分因含血清培養基之批次間變化所致之實驗變化。

【0924】在一些實施例中，無血清或確定培養基包括基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，基礎細胞培養基包含但不限於CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CTS™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【0925】在一些實施例中，血清補充劑或血清替代物包含但不限於以下中之一者或多者：CTS™ OpTmizer T細胞擴增血清補充劑、CTS™免疫細胞血清替代物、一種或多種白蛋白或白蛋白取代物、一種或多種胺基酸、一種或

多種維生素、一種或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一種或多種抗氧化劑、一種或多種胰島素或胰島素取代物、一種或多種膠原蛋白前驅物、一種或多種抗生素及一種或多種微量元素。在一些實施例中，確定培養基包括白蛋白及一種或多種選自由以下組成之群組的成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分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Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，確定培養基進一步包括L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或2-巰基乙醇。

【0926】在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞免疫細胞血清替代物與習知生長培養基一起使用，該習知生長培養基包含但不限於CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CST™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【0927】在一些實施例中，以無血清或確定培養基之

總體積計，無血清或確定培養基中之總血清替代物濃度(vol%)為約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約3%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約5%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約10%。

【0928】在一些實施例中，無血清或確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1 L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基及26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑在使用前混合在一起之組合。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)，且2-巰基乙醇於培養基中之最終濃度為55 μM。

【0929】在一些實施例中，確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T

細胞擴增SFM為1 L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基及26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑在使用前混合在一起之組合。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM的2-巰基乙醇及2 mM的L-麩醯胺酸。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包括約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包括約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包括約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包括約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包

括約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包括約1000 IU/mL至約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包括約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包括約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包括約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)，且2-巰基乙醇於培養基中之最終濃度為55 μM。

【0930】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約0.1 mM至約10 mM、0.5 mM至約9 mM、1 mM至約8 mM、2 mM至約7 mM、3 mM至約6 mM或4 mM至約5 mM的麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約2 mM之麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。

【0931】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養

基補充有濃度約5 mM至約150 mM、10 mM至約140 mM、15 mM至約130 mM、20 mM至約120 mM、25 mM至約110 mM、30 mM至約100 mM、35 mM至約95 mM、40 mM至約90 mM、45 mM至約85 mM、50 mM至約80 mM、55 mM至約75 mM、60 mM至約70 mM或約65 mM之2-巰基乙醇。在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約55 mM之2-巰基乙醇。

【0932】在一些實施例中，以引用之方式併入本文中的國際PCT公開案第WO/1998/030679號中所描述之確定培養基可用於本發明。在該公開案中，描述無血清真核細胞培養基。無血清真核細胞培養基包含補充有能夠支持細胞在無血清培養中生長之無血清補充劑的基礎細胞培養基。無血清真核細胞培養基補充劑包括一種或多種選自由以下組成之群組的成分，或藉由組合一種或多種選自由以下組成之群組的成分而獲得：一種或多種白蛋白或白蛋白取代物、一種或多種胺基酸、一種或多種維生素、一種或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一種或多種抗氧化劑、一種或多種胰島素或胰島素取代物、一種或多種膠原蛋白前驅物、一種或多種微量元素及一種或多種抗生素。在一些實施例中，確定培養基進一步包括L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或β-巰基乙醇。在一些實施例中，確定培養基包括白蛋白或白蛋白取代物及一種或多種選自由以下組成之群組的成分：一種或多種胺基酸、一種或多種維生素、一種或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一種或多種抗氧化劑、一

種或多種胰島素或胰島素取代物、一種或多種膠原蛋白前驅物及一種或多種微量元素。在一些實施例中，確定培養基包括白蛋白及一種或多種選自由以下組成之群組的成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分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Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，基礎細胞培養基係選自由以下組成之群組：達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【0933】在一些實施例中，確定培養基中甘胺酸之濃度在約5至200 mg/L之範圍內，L-組胺酸之濃度為約5至250 mg/L，L-異白胺酸之濃度為約5至300 mg/L，L-甲硫胺酸之濃度為約5至200 mg/L，L-苯丙胺酸之濃度為約5至400 mg/L，L-脯胺酸之濃度為約1至1000 mg/L，L-羥基脯胺酸之濃度為約1至45 mg/L，L-絲胺酸之濃度為約1至250 mg/L，L-蘇胺酸之濃度為約10至500 mg/L，L-色胺酸之濃度為約2至110 mg/L，L-酪胺酸之濃度為約3至175 mg/L，L-纈胺酸之濃度為約5至500 mg/L，硫胺素之濃度為約1至

20 mg/L，還原麩胱甘肽之濃度為約1至20 mg/L，L-抗壞血酸-2-磷酸鹽之濃度為約1至200 mg/L，鐵飽和運鐵蛋白之濃度為約1至50 mg/L，胰島素之濃度為約1至100 mg/L，亞硒酸鈉之濃度為約0.000001至0.0001 mg/L，且白蛋白(例如AlbuMAX® I)之濃度為約5000至50,000 mg/L。

【0934】在一些實施例中，確定培養基中之非微量元素部分成分係以表4中標題「1X培養基中之濃度範圍」欄中列出之濃度範圍存在。在其他實施例中，確定培養基中之非微量元素部分成分係以表4中標題「1X培養基之較佳實施例」欄中列出之最終濃度存在。在其他實施例中，確定培養基為包括無血清補充劑之基礎細胞培養基。在一些此等實施例中，無血清補充劑包括表4中的類型及標題「補充劑之較佳實施例」欄中列出之濃度的非微量部分成分。

【0935】在一些實施例中，確定培養基之滲透壓介於約260與350 mOsmol之間。在一些實施例中，滲透壓介於約280與310 mOsmol之間。在一些實施例中，確定培養基補充有至多約3.7 g/L或約2.2 g/L碳酸氫鈉。確定培養基可進一步補充有L-麩醯胺酸(最終濃度為約2 mM)、一種或多種抗生素、非必需胺基酸(NEAA；最終濃度為約100 μM)、2-巰基乙醇(最終濃度為約100 μM)。

【0936】在一些實施例中，Smith等人，《使用新穎無Xeno CTS免疫細胞血清替代物離體擴增人類T細胞以用於過繼免疫療法》，《臨床轉化免疫學》，4(1) 2015(數位物

件識別碼：10.1038/cti.2014.31)中所描述之確定培養基可用於本發明。簡言之，RPMI或CTS™ OpTmizer™用作基礎細胞培養基且補充有0、2%、5%或10% CTS™免疫細胞血清替代物。

【0937】在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基為未經過濾的。使用未經過濾之細胞培養基可簡化擴增細胞數目所需之程序。在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基缺乏β-巰基乙醇(BME或βME；亦稱為2-巰基乙醇，CAS 60-24-2)。

【0938】在一些實施例中，進行快速第二擴增(包含稱為REP之擴增)，且其進一步包括其中選擇具有優異腫瘤反應性之TIL之步驟。可使用本領域中已知之任何選擇方法。舉例而言，美國專利申請公開案第2016/0010058 A1號(其揭示內容以引用之方式併入本文中)中所描述之方法可用於選擇具有優異腫瘤反應性之TIL。

【0939】視情況，可在快速第二擴增(包含稱為REP擴增之擴增)之後使用本領域中已知之標準分析來進行細胞存活性分析。舉例而言，可在主體TIL樣本上進行台盼藍排除分析，其選擇性標記死細胞且允許存活性評定。在一些實施例中，TIL樣本可使用Cellometer K2自動化細胞計數器(馬薩諸塞州勞倫斯市的Nexcelom Bioscience)計算及判定存活性。在一些實施例中，存活性係根據標準Cellometer K2 Image Cytometer自動化細胞計數器方案判定。

【0940】T及B淋巴球之多樣抗原受體係藉由有限但大量的基因區段之體細胞重組產生。此等基因區段：V(可變區)、D(多樣區)、J(聯結區)及C(恆定區)決定免疫球蛋白及T細胞受體(TCR)之結合特異性及下游應用。本發明提供一種用於產生展現且增加T細胞貯庫多樣性之TIL的方法。在一些實施例中，藉由本發明方法獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，在第二擴增中獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，增加多樣性係增加免疫球蛋白多樣性及/或T細胞受體多樣性。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白重鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白輕鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於T細胞受體中。在一些實施例中，多樣性存在於選自由α、β、γ及δ受體組成之群組的T細胞受體中之一者中。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α及/或β之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)β之表現增加。在一些實施例中，TCRab(即，TCRα/β)之表現增加。

【0941】在一些實施例中，快速第二擴增培養基(例如有時稱為CM2或第二細胞培養基)包括IL-2、OKT-3以及抗原呈現飼養細胞(APC)及/或如下文更詳細論述之來自包括OKT-3之APC培養物的培養物上清液。在一些實施例中，快速第二擴增培養基(例如有時稱為CM2或第二細胞培養基)包括6000 IU/mL IL-2、30 μg/培養瓶OKT-3以及如下文

更詳細論述之7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞(APC)。在一些實施例中，快速第二擴增培養基(例如有時稱為CM2或第二細胞培養基)包括IL-2、OKT-3以及如下文更詳細論述之抗原呈現飼養細胞(APC)。在一些實施例中，快速第二擴增培養基(例如有時稱為CM2或第二細胞培養基)包括6000 IU/mL IL-2、30 μg/培養瓶OKT-3以及如下文更詳細論述之5×10^8個抗原呈現飼養細胞(APC)。

【0942】在一些實施例中，快速第二擴增(例如根據圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)之步驟D)係在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用生物反應器。在一些實施例中，採用生物反應器作為容器。在一些實施例中，所採用的生物反應器為例如G-REX-100或G-REX-500。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-REX-100。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-REX-500。

1. 飼養細胞及抗原呈現細胞以及培養物上清液

【0943】在一些實施例中，本文所描述之快速第二擴增程序(例如包含如下擴增，諸如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)步驟D中所描述之彼等擴增以及稱為REP之彼等擴增)在REP TIL擴增期間及/或在快速第二擴增期間需要過量的飼養細胞及/或來自包括OKT-3之飼養細胞(例如APC)培養物的培養物上清液。

在許多實施例中，飼養細胞係獲自健康血液供體之標準全血單位的周邊血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。

【0944】一般而言，同種異體PBMC經由照射或熱處理去活化，且如實例中所描述用於REP程序，其提供用於評估經照射同種異體PBMC之複製非勝任之例示性方案。

【0945】在一些實施例中，若第7或14天活細胞總數小於在REP第0天及/或第二擴增第0天(亦即第二擴增之起始日)放入培養的初始活細胞數目，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。

【0946】在一些實施例中，若第7天及第14天在OKT3及IL-2存在下培養的活細胞總數與在REP第0天及/或第二擴增第0天(亦即第二擴增之起始日)放入培養的初始活細胞數目相比並未增加，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。在一些實施例中，PBMC在30 ng/ml OKT3抗體及3000 IU/ml IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在60 ng/ml OKT3抗體及6000 IU/ml IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在60 ng/ml OKT3抗體及3000 IU/ml IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30 ng/ml OKT3抗體及6000 IU/ml IL-2存在下培養。

【0947】在一些實施例中，若第7天及第14天在OKT3及IL-2存在下培養的活細胞總數與在REP第0天及/或第二擴增第0天(亦即第二擴增之起始日)放入培養的初始活細

胞數目相比並未增加，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。在一些實施例中，PBMC在30至60 ng/ml OKT3抗體及1000至6000 IU/ml IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30至60 ng/ml OKT3抗體及2000至5000 IU/ml IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30至60 ng/ml OKT3抗體及2000至4000 IU/ml IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30至60 ng/ml OKT3抗體及2500至3500 IU/ml IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30至60 ng/ml OKT3抗體及6000 IU/ml IL-2存在下培養。

【0948】在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為PBMC。在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為人工抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率為約1比10、約1比25、約1比50、約1比100、約1比125、約1比150、約1比175、約1比200、約1比225、約1比250、約1比275、約1比300、約1比325、約1比350、約1比375、約1比400或約1比500。在一些實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比50與1比300之間。在一些實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比100與1比200之間。

【0949】在一些實施例中，在快速第二擴增過程期間使用5×10^8個飼養細胞。在一些實施例中，在快速第二擴增過程期間使用2×10^9個飼養細胞。在一些實施例中，在快速第二擴增過程期間使用2.5×10^9個飼養細胞。

【0950】在一些實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約5×10^8個飼養細胞與約100×10^6個TIL之比率。在一些實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約7.5×10^8個飼養細胞與約100×10^6個TIL之比率。在其他實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約5×10^8個飼養細胞與約50×10^6個TIL之比率。在其他實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約7.5×10^8個飼養細胞與約50×10^6個TIL之比率。在又一實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約5×10^8個飼養細胞與約25×10^6個TIL。在又一實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約7.5×10^8個飼養細胞與約25×10^6個TIL。在又一實施例中，快速第二擴增需要快速第二擴增的兩倍數目的飼養細胞。在又一實施例中，當本文所描述之初始第一擴增需要約2.5×10^8個飼養細胞時，快速第二擴增需要約5×10^8個飼養細胞。在又一實施例中，當本文所描述之初始第一擴增需要約2.5×10^8個飼養細胞時，快速第二擴增需要約7.5×10^8個飼養細胞。在又一實施例中，快速第二擴增需要初始第一擴增的兩倍(2.0X)、2.5X、3.0X、3.5X或4.0X數目的飼養細胞。

【0951】在一些實施例中，本文所描述之快速第二擴增程序在快速第二擴增期間需要過量的飼養細胞。在許多實施例中，飼養細胞係獲自同種異體健康血液供體之標準全血單位的周邊血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。在一些實施例中，使用人工抗原呈現細胞(aAPC)代替PBMC。在一些實

施例中，使用來自包括OKT-3之APC培養物之培養物上清液。在一些實施例中，PBMC以添加至初始第一擴增之PBMC濃度的兩倍添加至快速第二擴增。

【0952】一般而言，同種異體PBMC經由照射或熱處理去活化，且用於本文所描述之TIL擴增程序，包含圖式及實例中所描述之例示性程序。

【0953】在一些實施例中，在快速第二擴增中使用人工抗原呈現細胞來替代PBMC或與PBMC組合使用。

【0954】在一些實施例中，本文中所描述之快速第二擴增程序以及稱為REP過程之彼等擴增不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而是需要獲自含有OKT-3之抗原呈現飼養細胞培養物的培養物上清液。在一些實施例中，培養物上清液係獲自在補充有IL-2及OKT-3之培養基中之PBMC培養物。在一些實施例中，培養物上清液係獲自在補充有IL-2及OKT-3之培養基中培養約3或4天後之PBMC培養物。在一些實施例中，培養物上清液係獲自在培養中之PMBC之生長速率開始下降之後，在補充有IL-2及OKT-3之培養基中培養的PBMC培養物。在一些實施例中，培養物上清液係獲自在培養中之PMBC之生長速率已下降約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多之後，在補充有IL-2及OKT-3之培養基中培養的PBMC培養物。在一些實施例中，培養物上清液係獲自在培養基耗竭或消耗之後，在補充有IL-2及

OKT-3之培養基中培養之PBMC培養物。在一些實施例中，培養物上清液係獲自在培養基耗竭或消耗至少約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多之後，在補充有IL-2及OKT-3之培養基中培養之PBMC培養物。

【0955】在一個實施例中，初始第一擴增程序及快速第二擴增程序均不需要飼養細胞，而是需要獲自含有OKT-3之飼養細胞培養物的培養物上清液。在一個實施例中，初始第一擴增程序及快速第二擴增程序均不需要飼養細胞，而是初始第一擴增需要獲自含有OKT-3之飼養細胞之第一培養物的第一培養物上清液，且快速第二擴增需要獲自含有OKT-3之飼養細胞之第二培養物的第二培養物上清液。在其他實施例中，初始第一擴增程序需要飼養細胞，而快速第二擴增程序需要獲自含有OKT-3之飼養細胞培養物的培養物上清液。在又另一實施例中，初始第一擴增程序需要獲自含有OKT-3之飼養細胞培養物的培養物上清液，而快速第二擴增程序需要飼養細胞。在又另一實施例中，初始第一擴增程序及快速第二擴增程序均需要飼養細胞。

【0956】本文所描述之快速第二擴增方法通常使用具有高劑量細胞介素(特別是IL-2)之培養基，如本領域中所已知。

【0957】替代地，使用細胞介素之組合用於TIL之快速第二擴增係另外可能的，其中IL-2、IL-15及IL-21中之

兩者或更多者之組合如WO 2015/189356及WO 2015/189357中大體上所概述，該等文獻在此明確地以全文引用之方式併入。因此，可能組合包含IL-2及IL-15、IL-2及IL-21、IL-15及IL-21以及IL-2、IL-15及IL-21，其中後者在許多實施例中具有特定用途。使用細胞介素之組合特別有利於產生淋巴球，且特別是如其中所描述的T細胞。

E.步驟E：收集TIL

【0958】在快速第二擴增步驟之後，可收集細胞。在一些實施例中，在例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所提供之一、二、三、四個或更多個擴增步驟之後收集TIL。在一些實施例中，在例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所提供之兩個擴增步驟之後收集TIL。在一些實施例中，在例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所提供之兩個擴增步驟(一個初始第一擴增及一個快速第二擴增)之後收集TIL。

【0959】TIL可以任何適當且無菌之方式收集，包含例如離心。收集TIL之方法為本領域中熟知的且任何此類已知方法均可與本發明過程一起使用。在一些實施例中，使用自動化系統收集TIL。

【0960】細胞收集器及/或細胞處理系統可購自各種來源，包含例如費森尤斯卡比(Fresenius Kabi)、Tomtec Life Science、珀金埃爾默(Perkin Elmer)及Inotech Biosystems

International, Inc.。本發明方法可採用任何基於細胞之收集器。在一些實施例中，細胞收集器及/或細胞處理系統為基於膜之細胞收集器。在一些實施例中，細胞收集係經由細胞處理系統，諸如LOVO系統(由費森尤斯卡比製造)進行。術語「LOVO細胞處理系統」亦係指由任何供應商製造之任何可在無菌及/或密閉系統環境中將包括細胞之溶液泵送通過膜或過濾器(諸如旋轉膜或旋轉過濾器)的儀器或裝置，從而允許連續流動及細胞處理以移除上清液或細胞培養基而不發生團塊化。在一些實施例中，細胞收集器及/或細胞處理系統可在密閉無菌系統中進行細胞分離、洗滌、流體交換、濃縮及/或其他細胞處理步驟。

【0961】在一些實施例中，快速第二擴增(例如根據圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)之步驟D)係在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用生物反應器。在一些實施例中，採用生物反應器作為容器。在一些實施例中，所採用的生物反應器為例如G-REX-100或G-REX-500。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-REX-100。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-REX-500。

【0962】在一些實施例中，根據圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)之步驟E係根據本文所描述之過程進行。在一些實施例中，密閉系統係在無菌條件下經由注射器進入以維持系統之無菌性及密閉性

質。在一些實施例中，採用如本文所描述之密閉系統。

【0963】在一些實施例中，根據本文所描述之方法收集TIL。在一些實施例中，使用如本文所描述之方法收集第14與16天之間的TIL。在一些實施例中，使用如本文所描述之方法在第14天收集TIL。在一些實施例中，使用如本文所描述之方法在第15天收集TIL。在一些實施例中，使用如本文所描述之方法在第16天收集TIL。

F.步驟F：最終調配/轉移至輸注袋

【0964】在如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中以例示性次序提供且如上文及本文中所概述之步驟A至E完成之後，將細胞轉移至容器以用於向患者投予。在一些實施例中，一旦使用上文所描述之擴增方法獲得治療足夠數目之TIL後，將其轉移至容器以用於向患者投予。

【0965】在一些實施例中，使用本揭示案之方法擴增之TIL係以醫藥組成物之形式向患者投予。在一些實施例中，醫藥組成物為TIL於無菌緩衝液中之懸浮液。如本文所揭示擴增之TIL可藉由如本領域中已知之任何合適途徑投予。在一些實施例中，TIL係以單一動脈內或靜脈內輸注之形式投予，其較佳持續大約30至60分鐘。其他合適的投予途徑包含腹膜內、鞘內及淋巴內。

G.PBMC飼養細胞比

【0966】在一些實施例中，用於本文所描述之擴增方法(參見例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G))的培養基包含抗CD3抗體，例如OKT-3。抗CD3抗體與IL-2之組合在TIL群體中誘導T細胞活化及細胞分裂。此效應可見於全長抗體以及Fab及F(ab')2片段，前者通常較佳；參見例如Tsoukas等人，《免疫學雜誌》 **1985,** *135*, 1719，特此以全文引用之方式併入。

【0967】在一些實施例中，PBMC飼養細胞層之數目如下計算：

A. T細胞體積(直徑10 μm)：$V = (4/3)\ \pi r^3 = 523.6\ \mu m^3$

B. 具有40 μm(4個細胞)高度之G-Rex 100(M)體積：$V = (4/3)\ \pi r^3 = 4\times10^{12}\ \mu m^3$

C. 填滿體積B所需的細胞數目：$4\times10^{12}\ \mu m^3/523.6\ \mu m^3 = 7.6\times10^{8}\ \mu m^3\times0.64 = 4.86\times10^{8}$

D. 可在4D空間中被最佳活化的細胞數目：$4.86\times10^{8}/24 = 20.25\times10^{6}$

E. 外推至G-Rex 500之飼養細胞及TIL數目：TIL：100×10^{6}及飼養細胞：2.5×10^{9}

在此計算中，使用在具有100 cm^2基底的圓柱體中提供TIL活化之二十面體幾何學所需的單核細胞近似數目。計算得到約5×10^{8}之實驗結果為T細胞活化臨限，其密切反映NCI實驗資料。(1)(C)乘數(0.64)係如Jaeger及Nagel在1992年計算的當量球體隨機填充密度(2)。(D)除數24係4維空間中可接觸類似物體的當量球體數目「牛頓數」。(3)

(1)Jin, Jianjian等人，《透氣培養瓶中人類腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)生長至患者治療所需數目之簡化方法(Simplified Method of the Growth of Human Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) in Gas-Permeable Flasks to Numbers Needed for Patient Treatment)》. 《免疫療法雜誌》 2012年4月; 35(3): 283-292。

(2) Jaeger HM, Nagel SR. 《顆粒狀態之物理學(Physics of the granular state)》. 《科學(Science)》. 1992年3月20日;255(5051):1523-31。

(3) O. R. Musin (2003). 《二十五個球體之問題(The problem of the twenty-five spheres)》. 《俄羅斯數學評論(Russ. Math. Surv.)》 58 (4): 794-795。

【0968】在一些實施例中，在初始第一擴增期間外源供應的抗原呈現飼養細胞數目大約為在快速第二擴增期間外源供應的抗原呈現飼養細胞數目的一半。在某些實施例中，方法包括在相較於快速第二擴增之細胞培養基包括大約50%較少抗原呈現細胞的細胞培養基中進行初始第一擴增。

【0969】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的抗原呈現飼養細胞(APC)數目大於在初始第一擴增期間外源供應的APC數目。

【0970】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約20:1之範圍

內。

【0971】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約10:1之範圍內。

【0972】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約9:1之範圍內。

【0973】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約8:1之範圍內。

【0974】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約7:1之範圍內。

【0975】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約6:1之範圍內。

【0976】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約5:1之範圍

內。

【0977】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約4:1之範圍內。

【0978】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約3:1之範圍內。

【0979】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.9:1之範圍內。

【0980】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.8:1之範圍內。

【0981】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.7:1之範圍內。

【0982】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.6:1之範圍

內。

【0983】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.5:1之範圍內。

【0984】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.4:1之範圍內。

【0985】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.3:1之範圍內。

【0986】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.2:1之範圍內。

【0987】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.1:1之範圍內。

【0988】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2:1之範圍

內。

【0989】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約10:1之範圍內。

【0990】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約5:1之範圍內。

【0991】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約4:1之範圍內。

【0992】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約3:1之範圍內。

【0993】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約2.9:1之範圍內。

【0994】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約2.8:1之範圍內。

【0995】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約2.7:1之範圍

內。

【0996】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約2.6:1之範圍內。

【0997】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約2.5:1之範圍內。

【0998】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約2.4:1之範圍內。

【0999】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約2.3:1之範圍內。

【1000】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約2.2:1之範圍內。

【1001】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約2.1:1之範圍

內。

【1002】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係剛好或大約2:1。

【1003】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係剛好或大約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或5:1。

【1004】在其他實施例中，在初始第一擴增期間外源供應的APC數目係剛好或大約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或3.5×10^8個APC，且在快速第二擴增期間外源供應的APC數目係剛好或大約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或1×10^9個APC。

【1005】在其他實施例中，在初始第一擴增期間外源供應的APC數目係在剛好或大約1.5×10^8個APC至剛好或大約3×10^8個APC之範圍內，且在快速第二擴增期間外源供應的APC數目係在剛好或大約4×10^8個APC至剛好或大約7.5×10^8個APC之範圍內。

【1006】在其他實施例中，在初始第一擴增期間外源供應的APC數目係在剛好或大約2×10^8個APC至剛好或大約2.5×10^8個APC之範圍內，且在快速第二擴增期間外源供應的APC數目係在剛好或大約4.5×10^8個APC至剛好或大約5.5×10^8個APC之範圍內。

【1007】在其他實施例中，在初始第一擴增期間外源供應的APC數目係剛好或大約2.5×10^8個APC，且在快速第二擴增期間外源供應的APC數目係剛好或大約5×10^8個APC。

【1008】在一些實施例中，在初始第一擴增第0天添加的APC(包含例如PBMC)數目係在初始第一擴增第7天(例如方法之第7天)添加的PBMC數目的大約一半。在某些實施例中，方法包括在初始第一擴增第0天添加抗原呈現細

胞至第一TIL群體且在第7天添加抗原呈現細胞至第二TIL群體，其中在第0天添加之抗原呈現細胞的數目係在初始第一擴增第7天(例如方法之第7天)添加之抗原呈現細胞數目的大約50%。

【1009】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目大於在初始第一擴增第0天外源供應的PBMC數目。

【1010】在其他實施例中，在初始第一擴增外源供應的APC係以在剛好或大約1.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約4.5×10^6個APC/cm^2之範圍內之密度接種於培養瓶中。

【1011】在其他實施例中，在初始第一擴增外源供應的APC係以在剛好或大約1.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2之範圍內之密度接種於培養瓶中。

【1012】在其他實施例中，在初始第一擴增外源供應的APC係以在剛好或大約2×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3×10^6個APC/cm^2之範圍內之密度接種於培養瓶中。

【1013】在其他實施例中，在初始第一擴增外源供應的APC係以剛好或大約2×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中。

【1014】在其他實施例中，在初始第一擴增外源供應的APC係以剛好或大約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或4.5×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中。

【1015】在其他實施例中，在快速第二擴增外源供應的APC係以在剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約7.5×10^6個APC/cm^2之範圍內之密度接種於培養瓶中。

【1016】在其他實施例中，在快速第二擴增外源供應的APC係以在剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約6.0×10^6個APC/cm^2之範圍內之密度接種於培養瓶中。

【1017】在其他實施例中，在快速第二擴增外源供應的APC係以在剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約5.5×10^6個APC/cm^2之範圍內之密度接種於培養瓶中。

【1018】在其他實施例中，在快速第二擴增外源供應的APC係以在剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2之範圍內之密度接種於培養瓶中。

【1019】在其他實施例中，在快速第二擴增外源供應的APC係以剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2、2.6×10^6個APC/cm^2、2.7×10^6個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或7.5×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中。

【1020】在其他實施例中，在初始第一擴增外源供應的APC係以剛好或大約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或4.5×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中，且在快速第二擴增外源供應的APC係以剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2、2.6×10^6個APC/cm^2、2.7×10^6個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或7.5×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中。

【1021】在其他實施例中，在初始第一擴增外源供應的APC係以在剛好或大約1.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約4.5×10^6個APC/cm^2之範圍內之密度接種於培養瓶中，且在快速第二擴增外源供應的APC係以在剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約7.5×10^6個APC/cm^2之範圍內之密度接種於培養瓶中。

【1022】在其他實施例中，在初始第一擴增外源供應的APC係以在剛好或大約1.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2之範圍內之密度接種於培養瓶中，且在快速第二擴增外源供應的APC係以在剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約6×10^6個APC/cm^2之範圍內之密度接種於培養瓶中。

【1023】在其他實施例中，在初始第一擴增外源供應的APC係以在剛好或大約2×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3×10^6個APC/cm^2之範圍內之密度接種於培養瓶中，且在快速第二擴增外源供應的APC係以在剛好或大約4×10^6個APC/cm^2至剛好或大約5.5×10^6個APC/cm^2之範圍內之密度接種於培養瓶中。

【1024】在其他實施例中，在初始第一擴增外源供應的APC係以剛好或大約2×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中，且在快速第二擴增外源供應的APC係以剛好或大約4×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中。

【1025】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0

天外源供應的PBMC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約20:1之範圍內。

【1026】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的PBMC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約10:1之範圍內。

【1027】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的PBMC數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約9:1之範圍內。

【1028】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約8:1之範圍內。

【1029】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約7:1之範圍內。

【1030】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約6:1之範圍內。

【1031】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0

天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約5:1之範圍內。

【1032】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約4:1之範圍內。

【1033】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約3:1之範圍內。

【1034】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.9:1之範圍內。

【1035】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.8:1之範圍內。

【1036】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.7:1之範圍內。

【1037】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0

天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.6:1之範圍內。

【1038】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.5:1之範圍內。

【1039】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.4:1之範圍內。

【1040】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.3:1之範圍內。

【1041】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.2:1之範圍內。

【1042】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.1:1之範圍內。

【1043】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0

天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2:1之範圍內。

【1044】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約10:1之範圍內。

【1045】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約5:1之範圍內。

【1046】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約4:1之範圍內。

【1047】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約3:1之範圍內。

【1048】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約2.9:1之範圍內。

【1049】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0

天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約2.8:1之範圍內。

【1050】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約2.7:1之範圍內。

【1051】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約2.6:1之範圍內。

【1052】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約2.5:1之範圍內。

【1053】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約2.4:1之範圍內。

【1054】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約2.3:1之範圍內。

【1055】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0

天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約2.2:1之範圍內。

【1056】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係在剛好或大約2:1至剛好或大約2.1:1之範圍內。

【1057】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係剛好或大約2:1。

【1058】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係剛好或大約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或5:1。

【1059】在其他實施例中，在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目係剛好或大約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或3.5×10^8個APC(包含例如PBMC)，且在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目係剛好或大約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或1×10^9個APC(包含例如PBMC)。

【1060】在其他實施例中，在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目係在剛好或大約1×10^8個APC(包含例如PBMC)至剛好或大約3.5×10^8個APC(包含例如PBMC)之範圍內，且在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目係在剛好或大約3.5×10^8個APC(包含例如PBMC)至剛好或大約1×10^9個APC(包含例如PBMC)之範圍內。

【1061】在其他實施例中，在初始第一擴增第0天外

源供應的APC(包含例如PBMC)數目係在剛好或大約1.5×10^{8}個APC至剛好或大約3×10^{8}個APC(包含例如PBMC)之範圍內，且在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目係在剛好或大約4×10^{8}個APC(包含例如PBMC)至剛好或大約7.5×10^{8}個APC(包含例如PBMC)之範圍內。

【1062】在其他實施例中，在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目係在剛好或大約2×10^{8}個APC(包含例如PBMC)至剛好或大約2.5×10^{8}個APC(包含例如PBMC)之範圍內，且在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目係在剛好或大約4.5×10^{8}個APC(包含例如PBMC)至剛好或大約5.5×10^{8}個APC(包含例如PBMC)之範圍內。

【1063】在其他實施例中，在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目係剛好或大約2.5×10^{8}個APC(包含例如PBMC)，且在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目係剛好或大約5×10^{8}個APC(包含例如PBMC)。

【1064】在一些實施例中，在初始第一擴增第0天添加的APC(包含例如PBMC)層數係在快速第二擴增第7天添加的APC(包含例如PBMC)層數的大約一半。在某些實施例中，方法包括在初始第一擴增第0天添加抗原呈現細胞層至第一TIL群體且在第7天添加抗原呈現細胞層至第二TIL群體，其中在第0天添加之抗原呈現細胞層的數目係在第7

天添加之抗原呈現細胞層的數目的大約50%。

【1065】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)層數大於在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)層數。

【1066】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約2個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約4個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生。

【1067】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約一個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約3個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生。

【1068】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約1.5個細胞層至剛好或大約2.5個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約3個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生。

【1069】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約一個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約2個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生。

【1070】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約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或3個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約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或8個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生。

【1071】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約1個細胞層至剛好或大約2個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約3個細胞層至剛好或大約10個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生。

【1072】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約2個細胞層至剛好或大約3個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約4個細胞層至剛好或大約8個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生。

【1073】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約2個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度

剛好或大約4個細胞層至剛好或大約8個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生。

【1074】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約1、2或3個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約3、4、5、6、7、8、9或10個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生。

【1075】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係在剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:10之範圍內。

【1076】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係在剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:8之範圍內。

【1077】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在

具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係在剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:7之範圍內。

【1078】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係在剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:6之範圍內。

【1079】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係在剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:5之範圍內。

【1080】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在

具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係在剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:4之範圍內。

【1081】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係在剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:3之範圍內。

【1082】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係在剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:2之範圍內。

【1083】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在

具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係在剛好或大約1:1.2至剛好或大約1:8之範圍內。

【1084】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係在剛好或大約1:1.3至剛好或大約1:7之範圍內。

【1085】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係在剛好或大約1:1.4至剛好或大約1:6之範圍內。

【1086】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在

具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係在剛好或大約1:1.5至剛好或大約1:5之範圍內。

【1087】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係在剛好或大約1:1.6至剛好或大約1:4之範圍內。

【1088】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係在剛好或大約1:1.7至剛好或大約1:3.5之範圍內。

【1089】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在

具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係在剛好或大約1:1.8至剛好或大約1:3之範圍內。

【1090】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係在剛好或大約1:1.9至剛好或大約1:2.5之範圍內。

【1091】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係剛好或大約1:2。

【1092】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層

狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係剛好或大約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或1:10。

【1093】在一些實施例中，初始第一擴增中之APC數目係在約1.0×10^6個APC/cm^2至約4.5×10^6個APC/cm^2之範圍內，且快速第二擴增中之APC數目係在約2.5×10^6個APC/cm^2至約7.5×10^6個APC/cm^2之範圍內。

【1094】在一些實施例中，初始第一擴增中之APC數目係在約1.5×10^6個APC/cm^2至約3.5×10^6個APC/cm^2之範圍內，且快速第二擴增中之APC數目係在約3.5×10^6個APC/cm^2至約6.0×10^6個APC/cm^2之範圍內。

【1095】在一些實施例中，初始第一擴增中之APC數目係在約2.0×10^6個APC/cm^2至約3.0×10^6個APC/cm^2之範圍內，且快速第二擴增中之APC數目係在約4.0×10^6個APC/cm^2至約5.5×10^6個APC/cm^2之範圍內。

H. 視情況選用的細胞培養基組分

1. 抗CD3抗體

【1096】在一些實施例中，用於本文所描述之擴增方法(參見例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G))的培養基包含抗CD3抗體。抗CD3抗體與IL-2之組合在TIL群體中誘導T細胞活化及細胞分裂。此效應可見於全長抗體以及Fab及F(ab')2片段，前者通常較佳；參見例如Tsoukas等人，《免疫學雜誌》 **1985,** *135*, 1719，特此以全文引用之方式併入。

【1097】如本領域中熟習此項技術者將瞭解，一些合適的抗人類CD3抗體可用於本發明，包含來自各種哺乳動物之抗人類CD3多株及單株抗體，包含但不限於鼠類、人類、靈長類動物、大鼠及犬科動物抗體。在特定實施例中，使用OKT3抗CD3抗體(可購自新澤西州拉里坦市的Ortho-McNeil或加利福尼亞州奧本市的美天旎生物技術公司)。參見*表*1。

2. 4-1BB(CD137)促效劑

【1098】在一些實施例中，初始第一擴增及/或快速第

二擴增之細胞培養基包括TNFRSF促效劑。在一些實施例中，TNFRSF促效劑為4-1BB(CD137)促效劑。4-1BB促效劑可為本領域中已知之任何4-1BB結合分子。4-1BB結合分子可為能夠與人類或哺乳動物4-1BB結合之單株抗體或融合蛋白。4-1BB促效劑或4-1BB結合分子可包括免疫球蛋白分子之任何同型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、類別(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或子類之免疫球蛋白重鏈。4-1BB促效劑或4-1BB結合分子可具有重鏈及輕鏈。如本文所用，術語結合分子亦包含抗體(包含全長抗體)、單株抗體(包含全長單株抗體)、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)、人類抗體、人源化或嵌合抗體及抗體片段，例如Fab片段、F(ab')片段、由Fab表現文庫產生的片段、任何上述者之抗原決定基結合片段，以及與4-1BB結合之抗體之經工程改造形式，例如scFv分子。在一些實施例中，4-1BB促效劑為一種完全人類抗體之抗原結合蛋白。在一些實施例中，4-1BB促效劑為一種人源化抗體之抗原結合蛋白。在一些實施例中，用於本發明所揭示之方法及組成物中之4-1BB促效劑包含抗4-1BB抗體、人類抗4-1BB抗體、小鼠抗4-1BB抗體、哺乳動物抗4-1BB抗體、單株抗4-1BB抗體、多株抗4-1BB抗體、嵌合抗4-1BB抗體、抗4-1BB阿德奈汀(adnectin)、抗4-1BB域抗體、單鏈抗4-1BB片段、重鏈抗4-1BB片段、輕鏈抗4-1BB片段、抗4-1BB融合蛋白，及其片段、衍生物、結合物、變體或生物類似物。已知促效性

抗4-1BB抗體誘導強烈免疫反應。Lee等人，《公共科學圖書館·綜合(*PLOS One*)》 **2013**, *8*, e69677。在一些實施例中，4-1BB促效劑為促效性抗4-1BB人源化或完全人類單株抗體(亦即，衍生自單一細胞株之抗體)。在一些實施例中，4-1BB促效劑為EU-101(Eutilex Co. Ltd.)、烏圖木單抗或烏瑞魯單抗或其片段、衍生物、結合物、變體或生物類似物。在一些實施例中，4-1BB促效劑為烏圖木單抗或烏瑞魯單抗或其片段、衍生物、結合物、變體或生物類似物。

【1099】在一些實施例中，4-1BB促效劑或4-1BB結合分子亦可為融合蛋白。在一些實施例中，相較於通常具有兩個配體結合域之促效性單株抗體，多聚4-1BB促效劑，諸如三聚或六聚4-1BB促效劑(具有三個或六個配體結合域)可誘導優良受體(4-1BBL)聚類及內部細胞傳訊複合物形成。包括三個TNFRSF結合域及IgG1-Fc且視情況進一步連接兩個或更多個此等融合蛋白之三聚(三價)或六聚(或六價)或更大融合蛋白係描述於例如Gieffers等人，《分子癌症治療學(*Mol. Cancer Therapeutics*)》 **2013,** *12*, 2735-47中。

【1100】已知促效性4-1BB抗體及融合蛋白誘導強烈免疫反應。在一些實施例中，4-1BB促效劑係以足以減少毒性之方式與4-1BB抗原特異性結合的單株抗體或融合蛋白。在一些實施例中，4-1BB促效劑係消除抗體依賴性細胞毒性(ADCC)(例如NK細胞細胞毒性)之促效性4-1BB單株

抗體或融合蛋白。在一些實施例中，4-1BB促效劑係消除抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)之促效性4-1BB單株抗體或融合蛋白。在一些實施例中，4-1BB促效劑係消除補體依賴性細胞毒性(CDC)之促效性4-1BB單株抗體或融合蛋白。在一些實施例中，4-1BB促效劑係消除Fc區功能性之促效性4-1BB單株抗體或融合蛋白。

【1101】在一些實施例中，4-1BB促效劑之特徵為以高親和力及促效活性與人類4-1BB(SEQ ID NO:9)結合。在一些實施例中，4-1BB促效劑為與人類4-1BB(SEQ ID NO:9)結合之結合分子。在一些實施例中，4-1BB促效劑為與鼠類4-1BB(SEQ ID NO:10)結合之結合分子。4-1BB促效劑或結合分子所結合之4-1BB抗原的胺基酸序列概述於表6中。

表6：4-1BB抗原之胺基酸序列。

識別號	序列（一字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:9 人類 4-1BB，腫瘤壞死因子受體超家族成員9（智人）	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRFPEEEE GGCEL 255
SEQ ID NO:10 鼠類 4-1BB，腫瘤壞死因子受體超家族成員9（家鼷鼠）	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 60 CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG 180 GHSLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKTT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGGYEL 256

【1102】在一些實施例中，所描述之組成物、過程及方法包含如下4-1BB促效劑，該4-1BB促效劑以約100 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約90 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約80 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約70 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約60 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約50 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約40 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、或以約30 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB。

【1103】在一些實施例中，所描述之組成物、過程及方法包含以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約8×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約8.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約9×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約9.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、或以約1×10^6 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合的4-1BB促效劑。

【1104】在一些實施例中，所描述之組成物、過程及方法包含以約2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.1×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.4×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.5×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.6×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、或以約2.7×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.8×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.9×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、或以約3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合的4-1BB促效劑。

【1105】在一些實施例中，所描述之組成物、過程及方法包含4-1BB促效劑，該4-1BB促效劑以約10 nM或更低

之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約9 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約8 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約7 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約6 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約5 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約4 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約3 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、或以約1 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合。

【1106】在一些實施例中，4-1BB促效劑為烏圖木單抗(亦稱為PF-05082566或MOR-7480)或其片段、衍生物、變體或生物類似物。烏圖木單抗可購自輝瑞公司(Pfizer, Inc.)。烏圖木單抗為免疫球蛋白G2-λ抗[*智人*TNFRSF9(腫瘤壞死因子受體(TNFR)超家族成員9，4-1BB，T細胞抗原ILA，CD137)]*智人*(完全人類)單株抗體。烏圖木單抗之胺基酸序列闡述於表7中。烏圖木單抗包括位於Asn59及Asn292之糖基化位點；位於位置22-96(V_H-V_L)、143-199(C_H1-CL)、256-316(C_H2)及362-420(C_H3)之重鏈鏈內雙硫鍵；位於位置22'-87'(V_H-V_L)及136'-195'(C_H1-CL)之輕鏈鏈內雙硫鍵；位於IgG2A異型體位置218-218、219-219、222-222及225-225、位於IgG2A/B異型體位置218-130、219-219、222-222及225-225及位於IgG2B異型體位置219-130(2)、222-222及225-225之鏈間重鏈-重鏈雙硫鍵；以及位於IgG2A異型體位置130-213'(2)、IgG2A/B異型體位置

218-213'及130-213'及位於IgG2B異型體位置218-213'(2)之鏈間重鏈-輕鏈雙硫鍵。烏圖木單抗及其變體及片段之製備及性質描述於美國專利第8,821,867、8,337,850及9,468,678號及國際專利申請公開案第WO 2012/032433 A1號中，其中每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。烏圖木單抗之臨床前特徵描述於Fisher等人，《癌症免疫學及免疫治療(*Cancer Immunolog. & Immunother.*)》 **2012,** *61,* 1721-33中。目前烏圖木單抗在多種血液及實體腫瘤適應症之臨床試驗包含美國國家衛生研究院(U.S. National Institutes of Health)clinicaltrials.gov識別號NCT02444793、NCT01307267、NCT02315066及NCT02554812。

【1107】在一些實施例中，4-1BB促效劑包括SEQ ID NO:11所載之重鏈及SEQ ID NO:12所載之輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括分別具有SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12所示序列之重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12所示序列至少99%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12所示序列至少98%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12所示序列至少97%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12所示序列至少96%一致之重鏈及

輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12所示序列至少95%一致之重鏈及輕鏈。

【1108】在一些實施例中，4-1BB促效劑包括烏圖木單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，4-1BB促效劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:13所示之序列，且4-1BB促效劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:14所示之序列，及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14所示序列至少99%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14所示序列至少98%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14所示序列至少97%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14所示序列至少96%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14所示序列至少95%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括scFv抗體，該scFv抗體包括各自與SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14所示序列至少99%一致之V_H及V_L區。

【1109】在一些實施例中，4-1BB促效劑包括分別具有SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16及SEQ ID NO:17中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3

域；及分別具有SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:20中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1110】在一些實施例中，4-1BB促效劑為藥物管理機構參考烏圖木單抗批准之4-1BB促效劑生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物單株抗體包括4-1BB抗體，該4-1BB抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其與該參考藥品或參考生物產品相比包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為烏圖木單抗。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之4-1BB促效劑抗體，其中4-1BB促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中參考藥品或參考生物產品為烏圖木單抗。4-1BB促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包括之賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為烏圖木單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包括之賦形劑相同或

不同，其中該參考藥品或參考生物產品為烏圖木單抗。

表 7.參考烏圖木單抗之 4-1BB 促效劑抗體的胺基酸序列。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:11 烏圖木單抗重鏈	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTNY 60 SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK 120 GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS 180 LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP 240 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV 300 LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL 360 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC 420 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G 441
SEQ ID NO:12 烏圖木單抗輕鏈	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF 120 PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL 180 SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS 214
SEQ ID NO:13 烏圖木單抗重鏈可變區	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN 60 YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS 118
SEQ ID NO:14 烏圖木單抗輕鏈可變區	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL 108

SEQ ID NO:15 烏圖木單抗重鏈 CDR1	STYWIS	6
SEQ ID NO:16 烏圖木單抗重鏈 CDR2	KIYPGDSYTN YSPSFQG	17
SEQ ID NO:17 烏圖木單抗重鏈 CDR3	RGYGIFDY	8
SEQ ID NO:18 烏圖木單抗輕鏈 CDR1	SGDNIGDQYA H	11
SEQ ID NO:19 烏圖木單抗輕鏈 CDR2	QDKNRPS	7
SEQ ID NO:20 烏圖木單抗輕鏈 CDR3	ATYTGFGSLA V	11

【1111】在一些實施例中，4-1BB促效劑為單株抗體烏瑞魯單抗(亦稱為BMS-663513及20H4.9.h4a)或其片段、衍生物、變體或生物類似物。烏瑞魯單抗可購自百時美施貴寶公司及Creative Biolabs, Inc.。烏瑞魯單抗為免疫球蛋白G4-κ抗[*智人*TNFRSF9(腫瘤壞死因子受體超家族成員9，4-1BB，T細胞抗原ILA，CD137)]*智人*(完全人類)單株

抗體。烏瑞魯單抗之胺基酸序列闡述於表8中。烏瑞魯單抗包括位於位置298(及298'')之N-糖基化位點；位於位置22-95(V_H-V_L)、148-204(C_H1-CL)、262-322(C_H2)及368-426(C_H3)(及位於位置22''-95''、148''-204''、262''-322''及368''-426'')之重鏈鏈內雙硫鍵；位於位置23'-88'(V_H-V_L)及136'-196'(C_H1-CL)(及位於位置23'''-88'''及136'''-196''')之輕鏈鏈內雙硫鍵；位於位置227-227''及230-230''之鏈間重鏈-重鏈雙硫鍵；及位於135-216'及135''-216'''之鏈間重鏈-輕鏈雙硫鍵。烏瑞魯單抗及其變體及片段之製備及性質描述於美國專利第7,288,638及8,962,804號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。烏瑞魯單抗之臨床前及臨床特徵描述於Segal等人，《臨床癌症研究(*Clin. Cancer Res.*)》 **2016**, 請訪問http:/dx.doi.org/ 10.1158/1078-0432.CCR-16-1272。目前烏瑞魯單抗在多種血液及實體腫瘤適應症之臨床試驗包含美國國家衛生研究院clinicaltrials.gov識別號NCT01775631、NCT02110082、NCT02253992及NCT01471210。

【1112】在一些實施例中，4-1BB促效劑包括SEQ ID NO:21所載之重鏈及SEQ ID NO:22所載之輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括分別具有SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:22所示序列之重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:22所示序列至少99%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:21

及SEQ ID NO:22所示序列至少98%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:22所示序列至少97%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:22所示序列至少96%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:22所示序列至少95%一致之重鏈及輕鏈。

【1113】在一些實施例中，4-1BB促效劑包括烏瑞魯單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，4-1BB促效劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:23中所示序列，且4-1BB促效劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:24中所示序列，及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:24中所示序列至少99%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:24中所示序列至少98%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:24中所示序列至少97%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:24中所示序列至少96%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:24中所示序列至少95%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包括含有V_H及

V_L區之scFv抗體，該等區各自分別與SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:24中所示序列至少99%一致。

【1114】在一些實施例中，4-1BB促效劑包括分別具有SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26及SEQ ID NO:27中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29及SEQ ID NO:30中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1115】在一些實施例中，4-1BB促效劑為藥物管理機構參考烏瑞魯單抗核准之4-1BB促效劑生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物單株抗體包括4-1BB抗體，該4-1BB抗體包括與參考藥品或參考生物學產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為烏瑞魯單抗。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之4-1BB促效劑抗體，其中4-1BB促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為烏瑞魯單抗。4-1BB促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，

其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為烏瑞魯單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為烏瑞魯單抗。

表 8：參考烏瑞魯單抗之 4-1BB 促效劑抗體之胺基酸序列。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:21 烏瑞魯單抗之重鏈	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN 60 PSLESRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK 448
SEQ ID NO:22 烏瑞魯單抗之輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF 120 PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST 180 LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC 216
SEQ ID NO:23 烏瑞魯單抗之可變重鏈	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP 60 EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP 120
SEQ ID NO:24 烏瑞魯單抗之可變輕鏈	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP 60 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ 110

SEQ ID NO:25 烏瑞魯單抗之重鏈 CDR1	GYYWS	5
SEQ ID NO:26 烏瑞魯單抗之重鏈 CDR2	EINHGGYVTY NPSLES	16
SEQ ID NO:27 烏瑞魯單抗之重鏈 CDR3	DYGPGNYDWY FDL	13
SEQ ID NO:28 烏瑞魯單抗之輕鏈 CDR1	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID NO:29 烏瑞魯單抗之輕鏈 CDR2	DASNRAT	7
SEQ ID NO:30 烏瑞魯單抗之輕鏈 CDR3	QQRSDWPPAL T	11

【1116】在一些實施例中，4-1BB促效劑係選自由以下組成之群組：1D8、3Elor、4B4(BioLegend 309809)、H4-1BB-M127(BD Pharmingen 552532)、BBK2(賽默飛世爾(Thermo Fisher)MS621PABX)、145501(Leinco Technologies B591)、藉由寄存為ATCC第HB-11248號之細胞株產生且美國專利第6,974,863號中揭示之抗體、

5F4(BioLegend 31 1503)、C65-485(BD Pharmingen 559446)、美國專利申請公開案第US 2005/0095244號中揭示之抗體、美國專利第7,288,638號中揭示之抗體(諸如20H4.9-IgG1(BMS-663031))、美國專利第6,887,673號中揭示之抗體(諸如4E9或BMS-554271)、美國專利第7,214,493號中揭示之抗體、美國專利第6,303,121號中揭示之抗體、美國專利第6,569,997號中揭示之抗體、美國專利第6,905,685號中揭示之抗體(諸如4E9或BMS-554271)、美國專利第6,362,325號中揭示之抗體(諸如1D8或BMS-469492；3H3或BMS-469497；或3E1)、美國專利第6,974,863號中揭示之抗體(諸如53A2)；美國專利第6,210,669號中揭示之抗體(諸如1D8、3B8或3E1)、美國專利第5,928,893號中描述之抗體、美國專利第6,303,121號中揭示之抗體、美國專利第6,569,997號中揭示之抗體、國際專利申請公開案第WO 2012/177788、WO 2015/119923及WO 2010/042433號中揭示之抗體，及其片段、衍生物、結合物、變體或生物類似物，其中前述專利或專利申請公開案中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1117】在一些實施例中，4-1BB促效劑為以下中描述之4-1BB促效融合蛋白：國際專利申請公開案第WO 2008/025516 A1號、第WO 2009/007120 A1號、第WO 2010/003766 A1號、第WO 2010/010051 A1號及第WO 2010/078966 A1號；美國專利申請公開案第US 2011/0027218 A1號、第US 2015/0126709 A1號、第US

2011/0111494 A1號、第US 2015/0110734 A1號及第US 2015/0126710 A1號；及美國專利第9,359,420號、第9,340,599, 8,921,519號及第8,450,460號，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1118】在一些實施例中，4-1BB促效劑為如結構I-A(C端Fc-抗體片段融合蛋白)或結構I-B(N端Fc-抗體片段融合蛋白)中所描繪之4-1BB促效融合蛋白，或其片段、衍生物、結合物、變體或生物類似物，如圖17中提供。

【1119】在結構I-A及I-B(參見圖17)中，圓柱體係指個體多肽結合域。結構I-A及I-B包括三個線性連接的TNFRSF結合域，該等TNFRSF結合域衍生自例如4-1BBL(4-1BB配體、CD137配體(CD137L)或腫瘤壞死因子超家族成員9(tumor necrosis factor superfamily member 9；TNFSF9)或結合4-1BB之抗體，該等TNFRSF結合域摺疊以形成三價蛋白質，接著該三價蛋白質經由IgG1-Fc(包含C_H3及C_H2域)與第二三價蛋白質連接，隨後該IgG1-Fc用於經由二硫鍵(細長小橢圓)將兩個三價蛋白質連接在一起，從而使結構穩定且提供能夠將六個受體之細胞內傳訊域放在一起且傳訊蛋白質以形成傳訊複合物的促效劑。表示為圓柱體之TNFRSF結合域可為包括例如由連接子連接之V_H及V_L鏈的scFv域，該連接子可包括親水性殘基及提供柔性的Gly與Ser序列以及提供溶解性的Glu與Lys。可使用任何scFv域設計，諸如以下中描述之彼等scFv域：de Marco,《微生物細胞工廠(*Microbial Cell Factories*)》, **2011**, *10*, 44；

Ahmad等人，《臨床及發育免疫學(*Clin. & Dev. Immunol.*)》**2012**, 980250；Monnier等人，《抗體(*Antibodies*)》，**2013**, *2*, 193-208；或本文中別處併入之參考文獻。此形式之融合蛋白結構描述於美國專利第9,359,420號、第9,340,599號、第8,921,519號及第8,450,460號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1120】表9中給出了結構I-A之其他多肽域之胺基酸序列。Fc域較佳包括完整恆定域(SEQ ID NO:31之胺基酸17-230)、完整鉸鏈域(SEQ ID NO:31之胺基酸1-16)或鉸鏈域之一部分(例如SEQ ID NO:31之胺基酸4-16)。用於連接C端Fc-抗體之較佳的連接子可選自SEQ ID NO:32至SEQ ID NO:41中所載之實施例，包含適合於融合其他多肽之連接子。

表 9：具有 C 端 Fc-抗體片段融合蛋白設計（結構 I-A）之 TNFRSF 促效劑融合蛋白（包含 4-1BB 促效劑融合蛋白）之胺基酸序列。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:31 Fc 域	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 60 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS 120 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 180 LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 230
SEQ ID NO:32 連接子	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
SEQ ID NO:33 連接子	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
SEQ ID NO:34 連接子	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
SEQ ID NO:35 連接子	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
SEQ ID NO:36 連接子	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
SEQ ID NO:37 連接子	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
SEQ ID NO:38 連接子	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE 24
SEQ ID NO:39 連接子	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE 23
SEQ ID NO:40 連接子	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E 21
SEQ ID NO:41 連接子	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE 25

【1121】表 10 中給出了結構 I-B 之其他多肽域之胺基

酸序列。若Fc抗體片段如在結構I-B中與TNRFSF促效劑融合蛋白之N端融合，則Fc模組之序列較佳地為SEQ ID NO:42中顯示之彼序列，且連接子序列較佳地係選自SED ID NO: 43至SEQ ID NO:45中所闡述之彼等實施例。

表 10：具有 N 端 Fc-抗體片段融合蛋白設計（結構 I-B）之 TNFRSF 促效劑融合蛋白（包含 4-1BB 促效劑融合蛋白）之胺基酸序列。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:42 Fc域	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT 60 CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK 120 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE 180 WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS 240 LSLSPG 246
SEQ ID NO:43 連接子	SGSGSGSGSG S 11
SEQ ID NO:44 連接子	SSSSSSGSGS GS 12
SEQ ID NO:45 連接子	SSSSSSGSGS GSGSGS 16

【1122】在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包括一個或多個選自由以下組成之群組之4-1BB結合域：烏圖木單抗之可變重鏈及可變輕鏈、烏瑞魯單抗之可變重鏈及可變輕鏈、烏圖木單抗之可變重鏈及可變輕鏈、選自表11中描述之可變重鏈及可變輕鏈的可變重鏈及可變輕鏈、前述可變重鏈及可變輕鏈之任何組合，

及其片段、衍生物、結合物、變體及生物類似物。

【1123】在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包括一個或多個含有4-1BBL序列的4-1BB結合域。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包括一個或多個含有根據SEQ ID NO:46之序列的4-1BB結合域。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包括一個或多個含有可溶性4-1BBL序列的4-1BB結合域。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包括一個或多個包含根據SEQ ID NO:47之序列的4-1BB結合域。

【1124】在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包括一個或多個4-1BB結合域，該4-1BB結合域為包括各自分別與SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區的scFv域，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包括一個或多個4-1BB結合域，該4-1BB結合域為包括各自分別與SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:24中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區的scFv域，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包括一個或多個4-1BB結合域，該4-1BB結合域為包括各自與表11中給出之V_H及V_L序列至少95%一致之V_H及V_L區的scFv域，其中V_H及V_L域由連接子連接。

表 11：適用作融合蛋白中之 4-1BB 結合域或適用作 scFv 4-1BB 促效劑抗體之其他多肽域。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:46 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA 60 SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL 120 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA 180 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV 240 TPEIPAGLPS PRSE 254
SEQ ID NO:47 4-1BBL 可溶性域	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYYVFFQ 60 LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL 120 SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE 168
SEQ ID NO:48 4B4-1-1 型式 1 之可變重鏈	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS 118
SEQ ID NO:49 4B4-1-1 型式 1 之可變輕鏈	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:50 4B4-1-1 型式 2 之可變重鏈	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA 119
SEQ ID NO:51 4B4-1-1 型式 2 之可變輕鏈	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR 108

SEQ ID NO:52 H39E3-2之可變重鏈	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP 60 GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT 120
SEQ ID NO:53 H39E3-2之可變輕鏈	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL 60 WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA 110

【1125】在一些實施例中，4-1BB促效劑為4-1BB促效單鏈融合多肽，其包括(i)第一可溶性4-1BB結合域，(ii)第一肽連接子，(iii)第二可溶性4-1BB結合域，(iv)第二肽連接子，及(v)第三可溶性4-1BB結合域，進一步包括在N端及/或C端之另外域，且其中該另外域為Fab或Fc片段域。在一些實施例中，4-1BB促效劑為4-1BB促效單鏈融合多肽，其包括(i)第一可溶性4-1BB結合域，(ii)第一肽連接子，(iii)第二可溶性4-1BB結合域，(iv)第二肽連接子，及(v)第三可溶性4-1BB結合域，進一步包括在N端及/或C端之另外域，且其中該另外域為Fab或Fc片段域，其中可溶性4-1BB域中之各者缺乏莖區(其促成三聚作用且提供距離細胞膜的某一距離，但不為4-1BB結合域之一部分)且該第一及第二肽連接子獨立地具有3-8個胺基酸的長度。

【1126】在一些實施例中，4-1BB促效劑為4-1BB促效單鏈融合多肽，其包括(i)第一可溶性腫瘤壞死因子(TNF)超家族細胞介素域，(ii)第一肽連接子，(iii)第二可溶性TNF超家族細胞介素域，(iv)第二肽連接子，及(v)第三可

溶性TNF超家族細胞介素域，其中可溶性TNF超家族細胞介素域中之各者缺乏莖區且該第一及第二肽連接子獨立地具有3-8個胺基酸的長度，且其中各TNF超家族細胞介素域為4-1BB結合域。

【1127】在一些實施例中，4-1BB促效劑為4-1BB促效scFv抗體，其包括與任一前述V_L域連接之任一前述V_H域。

【1128】在一些實施例中，4-1BB促效劑為BPS Bioscience 4-1BB促效劑抗體，目錄號79097-2，可購自美國加利福尼亞州聖地亞哥之BPS Bioscience(BPS Bioscience, San Diego, CA, USA)。在一些實施例中，4-1BB促效劑為Creative Biolabs 4-1BB促效劑抗體，目錄號MOM-18179，可購自美國紐約州雪利市之Creative Biolabs(Creative Biolabs, Shirley, NY, USA)。

3. OX40(CD134)促效劑

【1129】在一些實施例中，TNFRSF促效劑為OX40(CD134)促效劑。OX40促效劑可為本領域已知的任何OX40結合分子。OX40結合分子可以為能夠與人類或哺乳動物OX40結合之單株抗體或融合蛋白。OX40促效劑或OX40結合分子可包括免疫球蛋白分子之任何同型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、類別(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或子類之免疫球蛋白重鏈。OX40促效劑或OX40結合分子可具有重鏈及輕鏈。如本文所用，術語結合分子亦包含抗體(包含全長抗體)、單

株抗體(包含全長單株抗體)、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)、人類抗體、人源化或嵌合抗體及抗體片段，例如Fab片段、F(ab')片段、由Fab表現文庫產生之片段、任一上述者之抗原決定基-結合片段及與OX40結合之抗體之經工程改造形式，例如scFv分子。在一些實施例中，OX40促效劑為一種完全人類抗體之抗原結合蛋白。在一些實施例中，OX40促效劑為一種人源化抗體之抗原結合蛋白。在一些實施例中，用於本揭示方法及組成物中之OX40促效劑包含抗OX40抗體、人類抗OX40抗體、小鼠抗OX40抗體、哺乳動物抗OX40抗體、單株抗OX40抗體、多株抗OX40抗體、嵌合抗OX40抗體、抗OX40阿德奈汀(adnectin)、抗OX40域抗體、單鏈抗OX40片段、重鏈抗OX40片段、輕鏈抗OX40片段、抗OX40融合蛋白，及其片段、衍生物、結合物、變體或生物類似物。在一些實施例中，OX40促效劑為促效性抗OX40人源化或完全人類單株抗體(亦即，源自單個細胞株的抗體)。

【1130】在一些實施例中，OX40促效劑或OX40結合分子亦可為融合蛋白。包括與OX40L融合之Fc域之OX40融合蛋白描述於例如Sadun等人，《免疫療法雜誌》2009, 182, 1481-89。在一些實施例中，相較於通常具有兩個配體結合域之促效性單株抗體，多聚OX40促效劑，諸如三聚或六聚OX40促效劑(具有三個或六個配體結合域)可誘導優良受體(OX40L)聚類及內部細胞傳訊複合物形成。包括三個TNFRSF結合域及IgG1-Fc且視情況進一步連接兩個或

更多個此等融合蛋白之三聚(三價)或六聚(或六價)或更大融合蛋白描述於例如Gieffers等人，《分子癌症治療學》**2013**, *12*, 2735-47中。

【1131】已知促效性OX40抗體及融合蛋白可誘導強烈免疫反應。Curti等人，《癌症研究》 **2013**, *73*, 7189-98。在一些實施例中，OX40促效劑為以足夠減少毒性之方式與OX40抗原特異性結合之單株抗體或融合蛋白。在一些實施例中，OX40促效劑為消除抗體依賴性細胞毒性(ADCC)，例如NK細胞細胞毒性之促效性OX40單株抗體或融合蛋白。在一些實施例中，OX40促效劑為消除抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)之促效性OX40單株抗體或融合蛋白。在一些實施例中，OX40促效劑為消除補體依賴性細胞毒性(CDC)之促效性OX40單株抗體或融合蛋白。在一些實施例中，OX40促效劑為消除Fc區功能之促效性OX40單株抗體或融合蛋白。

【1132】在一些實施例中，OX40促效劑之特徵為以高親及力及促效性活性與人類OX40(SEQ ID NO:54)結合。在一些實施例中，OX40促效劑為與人類OX40(SEQ ID NO:54)結合之結合分子。在一些實施例中，OX40促效劑為與鼠類OX40(SEQ ID NO:55)結合之結合分子。表12中概述與OX40促效劑或結合分子結合之OX40抗原之胺基酸序列。

表 12：OX40 抗原之胺基酸序列。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:54 人類 OX40（智人）	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
SEQ ID NO:55 鼠類 OX40（家鼷鼠）	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

【1133】在一些實施例中，所描述組成物、過程及方法包含如下OX40促效劑，該OX40促效劑以約100 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約90 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約80 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約70 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約60 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約50 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約40 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40或以約30 pM或更低之K_D結合人類或鼠

類OX40。

【1134】在一些實施例中，所描述之組成物、過程及方法包含如下OX40促效劑，該OX40促效劑以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合、以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合、以約8×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合、以約8.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合、以約9×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合、以約9.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合或以約1×10^6 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合。

【1135】在一些實施例中，所描述之組成物、過程及方法包含如下OX40促效劑，該OX40促效劑以約2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.1×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.4×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.5×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.6×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.7×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.8×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.9×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合或以約3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合。

【1136】在一些實施例中，所描述之組成物、過程及

方法包含如下OX40促效劑，該OX40促效劑以約10 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約9 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約8 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約7 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約6 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約5 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約4 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約3 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約2 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合或以約1 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合。

【1137】在一些實施例中，OX40促效劑為塔沃西單抗，亦稱為MEDI0562或MEDI-0562。塔沃西單抗可獲自阿斯利康公司(AstraZeneca，Inc.)之醫學免疫子公司(MedImmune subsidiary)。塔沃西單抗為免疫球蛋白G1-κ抗[智人TNFRSF4(腫瘤壞死因子受體(TNFR)超家族成員4，OX40，CD134)]人源化及嵌合單株抗體。塔沃西單抗之胺基酸序列闡述於表13中。塔沃西單抗包括在位置301及301''處之N-糖基化位點，具有岩藻糖基化複合物二觸角CHO型聚醣；在位置22-95(V_H-V_L)、148-204((C_H1-C_L)、265-325(C_H2)及371-429(C_H3)處(及在位置22''-95''、148''-204''、265''-325''及371''-429''處)之重鏈鏈內雙硫鍵；在位置23'-88'(V_H-V_L)及134'-194'(C_H1-C_L)處(及在位置23'''-88'''及134'''-194'''處)之輕鏈鏈內雙硫鍵；在位置230-230''及233-233''處之鏈間重鏈-重鏈雙硫鍵；及在224-214'及

224''-214'''處之鏈間重鏈-輕鏈雙硫鍵。塔沃西單抗在各種實體腫瘤適應症中之當前臨床試驗包含美國國家衛生研究院clinicaltrials.gov識別號NCT02318394及NCT02705482。

【1138】在一些實施例中，OX40促效劑包括SEQ ID NO:56所載之重鏈及SEQ ID NO:57所載之輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包括分別具有SEQ ID NO:56及SEQ ID NO:57中所示序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:56及SEQ ID NO:57中所示序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:56及SEQ ID NO:57中所示序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:56及SEQ ID NO:57中所示序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:56及SEQ ID NO:57中所示序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:56及SEQ ID NO:57中所示序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1139】在一些實施例中，OX40促效劑包括塔沃西單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:58中所示序列，且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:59中所示序列，及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，OX40

促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:58及SEQ ID NO:59中所示序列至少99%一致的V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:58及SEQ ID NO:59中所示序列至少98%一致的V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:58及SEQ ID NO:59中所示序列至少97%一致的V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:58及SEQ ID NO:59中所示序列至少96%一致的V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:58及SEQ ID NO:59中所示序列至少95%一致的V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包括scFv抗體，該scFv抗體包括各自分別與SEQ ID NO:58及SEQ ID NO:59中所示序列至少99%一致的V_H及V_L區。

【1140】在一些實施例中，OX40促效劑包括分別具有SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61及SEQ ID NO:62中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64及SEQ ID NO:65中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1141】在一些實施例中，OX40促效劑為藥物管理機構參考塔沃西單抗核准之OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物單株抗體包括OX40抗體，該OX40抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或

100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為塔沃西單抗。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之OX40促效劑抗體，其中OX40促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為塔沃西單抗。OX40促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為塔沃西單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為塔沃西單抗。

表 13：參考塔沃西單抗之 OX40 促效劑抗體之胺基酸序列。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:56 塔沃西單抗之重鏈	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

SEQ ID NO:57 塔沃西單抗之輕鏈	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
SEQ ID NO:58 塔沃西單抗之重鏈可變區	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT 118
SEQ ID NO:59 塔沃西單抗之輕鏈可變區	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR 108
SEQ ID NO:60 塔沃西單抗之重鏈 CDR1	GSFSSGYWN 9
SEQ ID NO:61 塔沃西單抗之重鏈 CDR2	YIGYISYNGI TYH 13
SEQ ID NO:62 塔沃西單抗之重鏈 CDR3	RYKYDYDGGH AMDY 14
SEQ ID NO:63 塔沃西單抗之輕鏈 CDR1	QDISNYLN 8
SEQ ID NO:64 塔沃西單抗之輕鏈 CDR2	LLIYYTSKLH S 11

SEQ ID NO:65 塔沃西單抗之輕鏈 CDR3	QQGSALPW	8

【1142】在一些實施例中，OX40促效劑為11D4，其為可獲自輝瑞公司之完全人類抗體。11D4之製備及特性描述於美國專利第7,960,515號、第8,236,930號及第9,028,824號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。11D4之胺基酸序列闡述於表14中。

【1143】在一些實施例中，OX40促效劑包括SEQ ID NO:66所載之重鏈及SEQ ID NO:67所載之輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包括分別具有SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:67中所示序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:67中所示序列至少99%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:67中所示序列至少98%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:67中所示序列至少97%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:67中所示序列至少96%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:67中所示序列至少95%一致之重鏈及輕鏈。

【1144】在一些實施例中，OX40促效劑包括11D4之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:68中所示序列，且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:69中所示序列，及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:68及SEQ ID NO:69中所示序列至少99%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:68及SEQ ID NO:69中所示序列至少98%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:68及SEQ ID NO:69中所示序列至少97%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:68及SEQ ID NO:69中所示序列至少96%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:68及SEQ ID NO:69中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區。

【1145】在一些實施例中，OX40促效劑包括分別具有SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71及SEQ ID NO:72中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74及SEQ ID NO:75中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1146】在一些實施例中，OX40促效劑為藥物管理機構參考11D4核准之OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物單株抗體包括OX40抗體，該

OX40抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為11D4。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之OX40促效劑抗體，其中OX40促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為11D4。OX40促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為11D4。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為11D4。

表 14：參考 11D4 之 OX40 促效劑抗體之胺基酸序列。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:66 11D4 之重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPPCPAP PVAGPSVFLF 240 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV 300 SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV 360 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF 420 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK 444
SEQ ID NO:67 11D4 之輕鏈	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:68 11D4 之重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS 118

SEQ ID NO:69 11D4之輕鏈可變區	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK 107
SEQ ID NO:70 11D4之重鏈CDR1	SYSMN 5
SEQ ID NO:71 11D4之重鏈CDR2	YISSSSSTID YADSVKG 17
SEQ ID NO:72 11D4之重鏈CDR3	ESGWYLFDY 9
SEQ ID NO:73 11D4之輕鏈CDR1	RASQGISSWL A 11
SEQ ID NO:74 11D4之輕鏈CDR2	AASSLQS 7
SEQ ID NO:75 11D4之輕鏈CDR3	QQYNSYPPT 9

【1147】在一些實施例中，OX40促效劑為18D8，其為可獲自輝瑞公司之完全人類抗體。18D8之製備及特性描述於美國專利第7,960,515號、第8,236,930號及第9,028,824號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。18D8之胺基酸序列闡述於表15中。

【1148】在一些實施例中，OX40促效劑包括SEQ ID NO:76所載之重鏈及SEQ ID NO:77所載之輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包括分別具有SEQ ID NO:76及SEQ

ID NO:77中所示序列之重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:76及SEQ ID NO:77中所示序列至少99%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:76及SEQ ID NO:77中所示序列至少98%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:76及SEQ ID NO:77中所示序列至少97%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:76及SEQ ID NO:77中所示序列至少96%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:76及SEQ ID NO:77中所示序列至少95%一致之重鏈及輕鏈。

【1149】在一些實施例中，OX40促效劑包括18D8之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:78中所示序列，且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:79中所示序列，及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:78及SEQ ID NO:79中所示序列至少99%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:78及SEQ ID NO:79中所示序列至少98%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:78及SEQ ID NO:79中所示序列至少97%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，

OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:78及SEQ ID NO:79中所示序列至少96%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:78及SEQ ID NO:79中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區。

【1150】在一些實施例中，OX40促效劑包括分別具有SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81及SEQ ID NO:82中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84及SEQ ID NO:85中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1151】在一些實施例中，OX40促效劑為藥物管理機構參考18D8核准之OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物單株抗體包括OX40抗體，該OX40抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為18D8。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之OX40促效劑抗體，其中OX40促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為18D8。OX40促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟

EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為18D8。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為18D8。

表 15：參考 18D8 之 OX40 促效劑抗體之胺基酸序列。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:76 18D8 之重鏈	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV 120 TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV 180 LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN 300 STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE 360 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO:77 18D8 之輕鏈	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213
SEQ ID NO:78 18D8 之重鏈 可變區	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV 120 TVSS 124
SEQ ID NO:79 18D8 之輕鏈 可變區	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK 106

SEQ ID NO:80 18D8之重鏈 CDR1	DYAMH	5
SEQ ID NO:81 18D8之重鏈 CDR2	GISWNSGSIG YADSVKG	17
SEQ ID NO:82 18D8之重鏈 CDR3	DQSTADYYFY YGMDV	15
SEQ ID NO:83 18D8之輕鏈 CDR1	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID NO:84 18D8之輕鏈 CDR2	DASNRAT	7
SEQ ID NO:85 18D8之輕鏈 CDR3	QQRSNWPT	8

【1152】在一些實施例中，OX40促效劑為Hu119-122，其為可獲自葛蘭素史克公共有限公司(GlaxoSmithKline plc)之人源化抗體。Hu119-122之製備及特性描述於美國專利第9,006,399號及第9,163,085號以及國際專利公開案第WO 2012/027328號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。Hu119-122之胺基酸序列闡述於表16中。

【1153】在一些實施例中，OX40促效劑包括Hu119-122之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:86中所示序列，且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:87中所

示序列，及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:86及SEQ ID NO:87中所示序列至少99%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:86及SEQ ID NO:87中所示序列至少98%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:86及SEQ ID NO:87中所示序列至少97%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:86及SEQ ID NO:87中所示序列至少96%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:86及SEQ ID NO:87中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區。

【1154】在一些實施例中，OX40促效劑包括分別具有SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92及SEQ ID NO:93中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1155】在一些實施例中，OX40促效劑為藥物管理機構參考Hu119-122核准之OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物單株抗體包括OX40抗體，該OX40抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考

藥品或參考生物產品為Hu119-122。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之OX40促效劑抗體，其中OX40促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu119-122。OX40促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu119-122。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu119-122。

表 16：參考 Hu119-122 之 OX40 促效劑抗體之胺基酸序列。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:86 Hu119-122 之重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS 120
SEQ ID NO:87 Hu119-122 之輕鏈可變區	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO:88 Hu119-122 之重鏈 CDR1	SHDMS 5
SEQ ID NO:89 Hu119-122 之重鏈 CDR2	AINSDGGSTY YPDTMER 17
SEQ ID NO:90 Hu119-122 之重鏈 CDR3	HYDDYYAWFA Y 11
SEQ ID NO:91 Hu119-122 之輕鏈 CDR1	RASKSVSTSG YSYMH 15
SEQ ID NO:92 Hu119-122 之輕鏈 CDR2	LASNLES 7
SEQ ID NO:93 Hu119-122 之輕鏈 CDR3	QHSRELPLT 9

【1156】在一些實施例中，OX40促效劑為Hu106-222，其為可獲自葛蘭素史克公共有限公司之人源化抗體。Hu106-222之製備及特性描述於美國專利第9,006,399號及第9,163,085號以及國際專利公開案第WO 2012/027328

號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。Hu106-222之胺基酸序列闡述於表17中。

【1157】在一些實施例中，OX40促效劑包括Hu106-222之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:94中所示序列，且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:95中所示序列，及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:94及SEQ ID NO:95中所示序列至少99%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:94及SEQ ID NO:95中所示序列至少98%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:94及SEQ ID NO:95中所示序列至少97%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:94及SEQ ID NO:95中所示序列至少96%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:94及SEQ ID NO:95中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區。

【1158】在一些實施例中，OX40促效劑包括分別具有SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:97及SEQ ID NO:98中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:100及SEQ ID NO:101中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1159】在一些實施例中，OX40促效劑為藥物管理機

構參考Hu106-222核准之OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物單株抗體包括OX40抗體，該OX40抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu106-222。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之OX40促效劑抗體，其中OX40促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu106-222。OX40促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu106-222。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu106-222。

表 17：參考 Hu106-222 之 OX40 促效劑抗體之胺基酸序列。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:94 Hu106-222 之重鏈可變區	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS 122
SEQ ID NO:95 Hu106-222 之輕鏈可變區	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK 107
SEQ ID NO:96 Hu106-222 之重鏈 CDR1	DYSMH 5
SEQ ID NO:97 Hu106-222 之重鏈 CDR2	WINTETGEPT YADDFKG 17
SEQ ID NO:98 Hu106-222 之重鏈 CDR3	PYYDYVSYYA MDY 13
SEQ ID NO:99 Hu106-222 之輕鏈 CDR1	KASQDVSTAV A 11
SEQ ID NO:100 Hu106-222 之輕鏈 CDR2	SASYLYT 7
SEQ ID NO:101 Hu106-222 之輕鏈 CDR3	QQHYSTPRT 9

【1160】在一些實施例中，OX40 促效劑抗體為 MEDI6469（亦稱為 9B12）。MEDI6469 為鼠類單株抗體。

Weinberg等人,《免疫療法雜誌》**2006**, *29*, 575-585。在一些實施例中，OX40促效劑為由9B12雜交瘤產生，由Biovest Inc.(美國馬薩諸塞州馬爾文(Malvern, MA, USA))寄存的抗體，如Weinberg等人,《免疫療法雜誌》**2006**, *29*, 575-585中所描述，其揭示內容以全文引用之方式併入本文中。在一些實施例中，抗體包括MEDI6469之CDR序列。在一些實施例中，抗體包括MEDI6469之重鏈可變區序列及/或輕鏈可變區序列。

【1161】在一些實施例中，OX40促效劑為L106 BD (Pharmingen，產品號340420)。在一些實施例中，OX40促效劑包括抗體L106(BD Pharmingen，產品號340420)之CDR。在一些實施例中，OX40促效劑包括抗體L106(BD Pharmingen，產品號340420)之重鏈可變區序列及/或輕鏈可變區序列。在一些實施例中，OX40促效劑為ACT35(Santa Cruz Biotechnology，目錄號20073)。在一些實施例中，OX40促效劑包括抗體ACT35(Santa Cruz Biotechnology，目錄號20073)之CDR。在一些實施例中，OX40促效劑包括抗體ACT35(Santa Cruz Biotechnology，目錄號20073)之重鏈可變區序列及/或輕鏈可變區序列。在一些實施例中，OX40促效劑為鼠類單株抗體抗mCD134/mOX40(純系OX86)，可購自新罕布什爾州西黎巴嫩之BioXcell Inc之InVivoMAb。

【1162】在一些實施例中，OX40促效劑係選自以下中描述之OX40促效劑：國際專利申請公開案第WO 95/12673號、第WO 95/21925號、第WO 2006/121810號、第WO

2012/027328號、第WO 2013/028231號、第WO 2013/038191號及第WO 2014/148895號；歐洲專利申請案EP 0672141；美國專利申請公開案第US 2010/136030號、第US 2014/377284號、第US 2015/190506號及第US 2015/132288號(包含純系20E5及12H3)；及美國專利第7,504,101號、第7,550,140號、第7,622,444號、第7,696,175號、第7,960,515號、第7,961,515號、第8,133,983號、第9,006,399號及第9,163,085號，其中之每一者之揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

【1163】在一些實施例中，OX40促效劑為如結構I-A(C端Fc-抗體片段融合蛋白)或結構I-B(N端Fc-抗體片段融合蛋白)中所描繪之OX40促效性融合蛋白，或其片段、衍生物、結合物、變體或生物類似物。結構I-A及I-B之特性已在上文及美國專利第9,359,420號、第9,340,599號、第8,921,519號及第8,450,460號中描述，其揭示內容以引用之方式併入本文中。表9中給出了結構I-A之多肽域之胺基酸序列。Fc域較佳包括完整恆定域(SEQ ID NO:31之胺基酸17-230)、完整鉸鏈域(SEQ ID NO:31之胺基酸1-16)或鉸鏈域之一部分(例如SEQ ID NO:31之胺基酸4-16)。用於連接C端Fc-抗體之較佳的連接子可選自SEQ ID NO:32至SEQ ID NO:41中所載之實施例，包含適合於融合其他多肽之連接子。同樣，表10中給出了結構I-B之多肽域之胺基酸序列。若Fc抗體片段如在結構I-B中與TNRFSF融合蛋白之N端融合，則Fc模組之序列較佳地為SEQ ID NO:42中所示之

彼序列，且連接子序列較佳地係選自SED ID NO:43至SEQ ID NO:45中所闡述之彼等實施例。

【1164】在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個選自由以下組成之群組之OX40結合域：塔沃西單抗的可變重鏈及可變輕鏈、11D4的可變重鏈及可變輕鏈、18D8的可變重鏈及可變輕鏈、Hu119-122的可變重鏈及可變輕鏈、Hu106-222的可變重鏈及可變輕鏈、選自表18中描述之可變重鏈及可變輕鏈的可變重鏈及可變輕鏈、前述之可變重鏈及可變輕鏈的任何組合，及其片段、衍生物、結合物、變體及生物類似物。

【1165】在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個含有OX40L序列之OX40結合域。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個含有根據SEQ ID NO:102之序列的OX40結合域。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個含有可溶性OX40L序列之OX40結合域。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個含有根據SEQ ID NO:103之序列的OX40結合域。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個含有根據SEQ ID NO:104之序列的OX40結合域。

【1166】在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個OX40結合域，該OX40結合域為scFv域，該scFv域包括各自分別與SEQ ID NO:58及

SEQ ID NO:59中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個OX40結合域，該OX40結合域為scFv域，該scFv域包括各自分別與SEQ ID NO:68及SEQ ID NO:69中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個OX40結合域，該OX40結合域為scFv域，該scFv域包括各自分別與SEQ ID NO:78及SEQ ID NO:79中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個OX40結合域，該OX40結合域為scFv域，該scFv域包括各自分別與SEQ ID NO:86及SEQ ID NO:87中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個OX40結合域，該OX40結合域為scFv域，該scFv域包括各自分別與SEQ ID NO:94及SEQ ID NO:95中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個OX40結合域，該OX40結合域為scFv域，該scFv域包括各自與表18中給出之V_H及V_L序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。

表 18：適用作融合蛋白（例如結構 I-A 及 I-B）中之 OX40 結合域或適用作 scFv OX40 促效劑抗體之另外多肽域。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:102 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ 60 SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ 120 KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF 180 CVL 183
SEQ ID NO:103 OX40L 可溶域	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE 60 VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL 120 IHQNPGEFCV L 131
SEQ ID NO:104 OX40L 可溶性域（替代）	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI 60 SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ 120 NPGEFCVL 128
SEQ ID NO:105 008之可變重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS 120
SEQ ID NO:106 008之可變輕鏈	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO:107 011之可變重鏈	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD 60 SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA 120

SEQ ID NO:108 011之可變輕鏈	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO:109 021之可變重鏈	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS 120
SEQ ID NO:110 021之可變輕鏈	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK 108
SEQ ID NO:111 023之可變重鏈	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA 60 DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS 120
SEQ ID NO:112 023之可變輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR 108
SEQ ID NO:113 重鏈可變區	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY 60 NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS 119
SEQ ID NO:114 輕鏈可變區	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:115 重鏈可變區	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY 60 NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS 120 P 121

SEQ ID NO:116 輕鏈可變區	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD 60 RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:117 人源化抗體之 重鏈可變區	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV 120 SS 122
SEQ ID NO:118 人源化抗體之 重鏈可變區	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV 120 SS 122
SEQ ID NO:119 人源化抗體之 輕鏈可變區	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:120 人源化抗體之 輕鏈可變區	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:121 人源化抗體之 重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA 120
SEQ ID NO:122 人源化抗體之 重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS 120
SEQ ID NO:123 人源化抗體之 輕鏈可變區	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K 111

SEQ ID NO:124 人源化抗體之 輕鏈可變區	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO:125 重鏈可變區	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP 60 EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG 120 EVFYFDYWGQ GTTLTVSS 138
SEQ ID NO:126 輕鏈可變區	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP 60 GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG 120 TKLELK 126

【1167】在一些實施例中，OX40促效劑為OX40促效性單鏈融合多肽，其包括：(i)第一可溶性OX40結合域；(ii)第一肽連接子；(iii)第二可溶性OX40結合域；(iv)第二肽連接子；及(v)第三可溶性OX40結合域，其進一步包括在N端及/或C端處之另外域，且其中該另外域為Fab或Fc片段域。在一些實施例中，OX40促效劑為OX40促效性單鏈融合多肽，其包括：(i)第一可溶性OX40結合域；(ii)第一肽連接子；(iii)第二可溶性OX40結合域；(iv)第二肽連接子；及(v)第三可溶性OX40結合域，其進一步包括在N端及/或C端處之另外域，其中該另外域為Fab或Fc片段域，其中可溶性OX40結合域中之各者缺乏莖區(其促成三聚作用且提供距離細胞膜之某一距離，但不為OX40結合域之一部分)且該第一及第二肽連接子獨立地具有3-8個胺基酸的長度。

【1168】在一些實施例中，OX40促效劑為OX40促效性單鏈融合多肽，其包括：(i)第一可溶性腫瘤壞死因子(TNF)超家族細胞介素域；(ii)第一肽連接子；(iii)第二可溶性TNF超家族細胞介素域；(iv)第二肽連接子；及(v)第三可溶性TNF超家族細胞介素域，其中可溶性TNF超家族細胞介素域中之各者缺乏莖區且該第一及第二肽連接子獨立地具有3-8個胺基酸的長度，且其中TNF超家族細胞介素域為OX40結合域。

【1169】在一些實施例中，OX40促效劑為MEDI6383。MEDI6383為OX40促效性融合蛋白且可如美國專利第6,312,700號中所描述來製備，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1170】在一些實施例中，OX40促效劑為OX40促效性scFv抗體，其包括與任一前述V_L域連接之任一前述V_H域。

【1171】在一些實施例中，OX40促效劑為Creative Biolabs OX40促效劑單株抗體MOM-18455，可購自美國紐約州雪利市之Creative Biolabs，Inc.。

【1172】在一些實施例中，OX40促效劑為OX40促效性抗體純系Ber-ACT35，可購自美國加利福尼亞州聖地亞哥之BioLegend, Inc.。

I. 視情況選用之細胞存活性分析

【1173】視情況，在初始第一擴增(有時稱為初始主體

擴增(initial bulk expansion))之後，可使用本領域已知之標準分析進行細胞存活性分析。因此，在某些實施例中，方法包括在初始第一擴增之後進行細胞存活性分析。舉例而言，可在主體TIL樣本上進行台盼藍排除分析，其選擇性標記死細胞且允許存活性評定。其他用於測試存活性之分析可包含但不限於阿爾瑪藍(Alamar blue)分析及MTT分析。

1. 細胞計數、存活性、流動式細胞測量術

【1174】在一些實施例中，量測細胞計數及/或存活性。標誌(諸如但不限於CD3、CD4、CD8及CD56以及本文所揭示或描述之任何其他標誌)之表現可藉由流動式細胞測量術，使用FACSCanto™流動式細胞儀(碧迪生物科學(BD Biosciences))，用抗體，例如但不限於可購自碧迪生物科學之彼等者(碧迪生物科學，加利福尼亞州聖荷西)量測。細胞可使用拋棄式c-晶片血球計(VWR，伊利諾伊州巴達維亞)手動計算，且存活性可使用本領域中已知之任何方法，包含但不限於台盼藍染色評定。細胞存活性亦可基於USSN15/863,634分析，其以全文引用之方式併入本文中。細胞存活性亦可基於美國專利公開案第2018/0280436號或國際專利公開案第WO/2018/081473號分析，兩者全文均出於所有目的併入本文中。

【1175】在一些情況下，主體TIL群體可使用下文論述之方案立即冷凍保存。替代地，主體TIL群體可進行

REP且接著如下文所論述冷凍保存。類似地，在其中遺傳修飾的TIL將用於療法中之情況下，主體或REP TIL群體可進行遺傳修飾以用於合適治療。

2. 細胞培養

【1176】在一些實施例中，用於擴增TIL之方法(包含上文所論述以及圖1，特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G中例示之彼等方法)可包含使用約5,000 mL至約25,000 mL之細胞培養基、約5,000 mL至約10,000 mL之細胞培養基或約5,800 mL至約8,700 mL之細胞培養基。在一些實施例中，培養基為不含血清培養基。在一些實施例中，初始第一擴增中之培養基不含血清。在一些實施例中，第二擴增中之培養基不含血清。在一些實施例中，初始第一擴增及第二擴增(亦稱為快速第二擴增)中之培養基均不含血清。在一些實施例中，擴增TIL數目使用不超過一種類型之細胞培養基。可使用任何合適的細胞培養基，例如AIM-V細胞培養基(L-麩醯胺酸、50 μM鏈黴素硫酸鹽及10 μM建它黴素硫酸鹽)細胞培養基(英傑公司(Invitrogen)，加利福尼亞州喀斯巴德(Carlsbad CA))。就此而言，本發明方法有利地減少擴增TIL數目所需之培養基的量及培養基類型的數目。在一些實施例中，擴增TIL數目可包括頻繁性不超過每三或四天一次地餵養細胞。在透氣容器中擴增細胞數目藉由減少擴增細胞所需之餵養頻率，簡化擴增細胞數目所需之程序。

【1177】在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基為未經過濾的。使用未經過濾之細胞培養基可簡化擴增細胞數目所需之程序。在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基缺乏β-巰基乙醇(BME)。

【1178】在一些實施例中，方法期間包括獲得來自哺乳動物之腫瘤組織樣本；在第一透氣容器中培養腫瘤組織樣本持續約1至8天(例如約8天)之期間作為初始第一擴增，該第一透氣容器含有包含IL-2、1X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基；將TIL轉移至第二透氣容器且在第二透氣容器中擴增TIL數目持續約7至9天(例如約7天、約8天或約9天)之期間，該第二透氣容器含有包含IL-2、2X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基。

【1179】在一些實施例中，方法期間包括獲得來自哺乳動物之腫瘤組織樣本；在第一透氣容器中培養腫瘤組織樣本持續約1至7天(例如約7天)之期間作為初始第一擴增，該第一透氣容器含有包含IL-2、1X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基；將TIL轉移至第二透氣容器且在第二透氣容器中擴增TIL數目持續約7至9天(例如約7天、約8天或約9天)之期間，該第二透氣容器含有包含IL-2、2X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基。

【1180】在一些實施例中，方法期間包括獲得來自哺乳動物之腫瘤組織樣本；在第一透氣容器中培養腫瘤組織樣本持續約1至7天(例如約7天)之期間作為初始第一擴

增，該第一透氣容器含有包含IL-2、1X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基；將TIL轉移至第二透氣容器且在第二透氣容器中擴增TIL數目持續約7至10天(例如約7天、約8天、約9天或約10天)之期間，該第二透氣容器含有包含IL-2、2X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基。

【1181】在一些實施例中，TIL係在透氣容器中擴增。已使用透氣容器來擴增TIL，使用PBMC，使用本領域中已知之方法、組成物及裝置，包含美國專利申請案公開案第2005/0106717 A1號中描述之彼等，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，TIL係在透氣袋中擴增。在一些實施例中，TIL使用在透氣袋中擴增TIL之細胞擴增系統(諸如Xuri細胞擴增系統W25(GE Healthcare))擴增。在一些實施例中，TIL使用在透氣袋中擴增TIL之細胞擴增系統(諸如WAVE生物反應器系統，亦稱為Xuri細胞擴增系統W5(GE Healthcare))擴增。在一些實施例中，細胞擴增系統包含透氣細胞袋，該透氣細胞袋之容積選自由以下組成之群組：約100 mL、約200 mL、約300 mL、約400 mL、約500 mL、約600 mL、約700 mL、約800 mL、約900 mL、約1 L、約2 L、約3 L、約4 L、約5 L、約6 L、約7 L、約8 L、約9 L及約10 L。

【1182】在一些實施例中，TIL可在G-Rex培養瓶(可購自威爾遜狼製造公司)中擴增。此類實施例允許細胞群體自約5×10^5個細胞/平方公分擴增至介於10×10^6與30×10^6個細胞/平方公分之間。在一些實施例中，此係未進行餵

養。在一些實施例中，此係未進行餵養，只要G-Rex培養瓶中之培養基位於約10 cm之高度。在一些實施例中，此係未進行餵養但添加一種或多種細胞介素。在一些實施例中，細胞介素可作為推注添加，不需要將細胞介素與培養基混合。此類容器、裝置及方法為本領域中已知的且已用於擴增TIL，且包含以下中描述之彼等者：美國專利申請公開案第US 2014/0377739A1號、國際公開案第WO 2014/210036 A1號、美國專利申請公開案第us 2013/0115617 A1號、國際公開案第WO 2013/188427 A1號、美國專利申請公開案第US 2011/0136228 A1號、美國專利第US 8,809,050 B2號、國際公開案第WO 2011/072088 A2號、美國專利申請公開案第US 2016/0208216 A1號、美國專利申請公開案第US 2012/0244133 A1號、國際公開案第WO 2012/129201 A1號、美國專利申請公開案第US 2013/0102075 A1號、美國專利第US 8,956,860 B2號、國際公開案第WO 2013/173835 A1號、美國專利申請公開案第US 2015/0175966 A1號，其揭示內容以引用之方式併入本文中。此類過程亦描述於Jin等人，《免疫療法雜誌》，**2012**, 35:283-292中。

J. 視情況選用之TIL之基因工程改造

【1183】在一些實施例中，本發明之經擴增之TIL在擴增步驟之前、期間或之後，包含在密閉無菌製造過程期間(各者如本文所提供)經進一步操作，以用暫時性方式改

變蛋白質表現。在一些實施例中，暫時性改變的蛋白質表現係因為暫時性基因編輯。在一些實施例中，本發明之經擴增之TIL用轉錄因子(transcription factor；TF)及/或其他能夠暫時性改變TIL中之蛋白質表現的分子處理。在一些實施例中，TF及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現之分子提供TIL群體中改變的腫瘤抗原表現及/或改變腫瘤抗原特異性T細胞之數目。

【1184】在某些實施例中，方法包括基因編輯TIL群體。在某些實施例中，方法包括基因編輯第一TIL群體、第二TIL群體及/或第三TIL群體。

【1185】在一些實施例中，本發明包含經由核苷酸插入，諸如經由核糖核酸(RNA)插入，包含插入信使RNA(mRNA)或小(或短)干擾RNA(siRNA)至TIL群體中進行基因編輯，以促進一種或多種蛋白質之表現或抑制一種或多種蛋白質之表現以及同時促進一組蛋白質與抑制另一組蛋白質之組合。

【1186】在一些實施例中，本發明之經擴增之TIL經歷暫時性改變蛋白質表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現發生在第一擴增之前的主體TIL群體，包含例如獲自例如如圖1(尤其圖1B及圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所指示之步驟A的TIL群體中。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現發生在第一擴增期間，包含例如獲自例如如圖1(例如圖1B及圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所指示之步驟B的TIL群體中。在一些實施例

中，暫時性改變蛋白質表現發生在第一擴增之後，包含例如在第一與第二擴增之間轉變的TIL群體(例如如本文所描述之第二TIL群體)、獲自例如如圖1中所指示之步驟B且包含於步驟C中的TIL群體中。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現發生在第二擴增之前的主體TIL群體中，包含例如在獲自例如如圖1中所指示之步驟C且在步驟D中其擴增之前的TIL群體中。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現發生在第二擴增期間，包含例如在例如如圖1中所指示之步驟D中擴增之TIL群體(例如第三TIL群體)中。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現發生在第二擴增之後，包含例如在獲自例如如圖1中所指示之步驟D中之擴增的TIL群體中。

【1187】在一些實施例中，暫時性改變TIL群體中之蛋白質表現之方法包含電穿孔之步驟。電穿孔方法為本領域中已知的，且描述於例如以下中：Tsong, 《生物物理學雜誌(Biophys. 雜誌》 **1991**, *60*, 297-306及美國專利申請公開案第2014/0227237 A1號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，暫時性改變TIL群體中之蛋白質表現之方法包含磷酸鈣轉染之步驟。磷酸鈣轉染方法(磷酸鈣DNA沈澱、細胞表面包覆及胞吞作用)為本領域中已知的且描述於以下中：Graham及van der Eb, 《病毒學(*Virology*)》 **1973**, *52*, 456-467；Wigler等人, 《美國國家科學院院刊》 **1979**, *76*, 1373-1376；及Chen及Okayarea, 《分子細胞生物學(*Mol. Cell. Biol.*)》

1987, *7*, 2745-2752；及美國專利第5,593,875號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，暫時性改變TIL群體中之蛋白質表現之方法包含脂質體轉染之步驟。脂質體轉染方法，諸如採用陽離子脂質*N*-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-*n*,*n*,*n*-三甲基氯化銨(DOTMA)及二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)於過濾水中之1:1(w/w)脂質體調配物之方法為本領域中已知的且描述於以下中：Rose等人，《生物技術(*Biotechniques*)》 **1991**, *10*, 520-525及Felgner等人，《美國國家科學院院刊(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*)》, **1987**, *84*, 7413-7417以及美國專利第5,279,833號、第5,908,635號、第6,056,938號、第6,110,490號、第6,534,484號及第7,687,070號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，暫時性改變TIL群體中之蛋白質表現之方法包含使用以下中描述之方法之轉染步驟：美國專利第5,766,902號、第6,025,337號、第6,410,517號、第6,475,994 號及第7,189,705號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1188】在一些實施例中，使用國際專利申請案第WO 2019/136456 A1或WO 2019/210131 A1號(其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中)中描述之方法，包含其中用於基因編輯TIL以基因剔除特定目標基因，諸如編碼PD-1及CTLA-4之基因所描述之方法，本發明之TIL經進一步修飾以暫時性或永久性抑制一個或多個基因。

【1189】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致幹記憶T細胞(Stem Memory T cell；TSCM)增加。TSCM為抗原經歷中樞記憶T細胞之早期前驅細胞。TSCM一般呈現定義幹細胞之長期存活、自我更新及多效能能力，且一般為產生有效TIL產物所需的。TSCM在授受性細胞轉移之小鼠模型中已顯示相較於其他T細胞子集之增強的抗腫瘤活性(Gattinoni等人《自然醫學》2009, 2011；Gattinoni,《自然癌症綜述(Nature Rev. Cancer)》, 2012；Cieri等人《血液》 2013)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致具有包括高比例之TSCM之組成的TIL群體。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TSCM百分比增加至少5%、至少10%、至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TIL群體中之TSCM增加至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍或10倍。在一些實施例中，蛋白質表現之暫時性導致具有至少至少5%、至少10%、至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95% TSCM之TIL群體。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致具有至少至少5%、至少10%、至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少

40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95% TSCM之治療性TIL群體。

【1190】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致抗原經歷T細胞回春(rejuvenation)。在一些實施例中，回春包含例如增加增殖、增加T細胞活化及/或增加抗原識別。

【1191】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現改變一大部分T細胞之表現，以保留腫瘤衍生之TCR貯庫。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現不改變腫瘤衍生之TCR貯庫。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現維持腫瘤衍生之TCR貯庫。

【1192】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質導致改變特定基因之表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向包含但不限於以下之基因：PD-1(亦稱為PDCD1或CC279)、TGFBR2、CCR4/5、CBLB(CBL-B)、CISH、嵌合共刺激受體(chimeric co-stimulatory receptor；CCR)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2 ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TGFβ、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1α)、CCL4(MIP1-β)、CCL5(RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、V_HL、CD44、PIK3CD、SOCS1、胸腺細胞選擇相關高遷移率群組(high mobility group；HMG)匣(TOX)、錨蛋白重複域11(ANKRD11)、BCL6共抑制子

(BCOR)及/或cAMP蛋白激酶A(protein kinase A；PKA)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向選自由以下組成之群組之基因：PD-1、TGFBR2、CCR4/5、CBLB(CBL-B)、CISH、嵌合共刺激受體(CCR)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2 ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TGFβ、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1α)、CCL4(MIP1-β)、CCL5(RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1、胸腺細胞選擇相關高遷移率群組(HMG)匣(TOX)、錨蛋白重複域11(ANKRD11)、BCL6共抑制子(BCOR)及/或cAMP蛋白激酶A(PKA)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向PD-1。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向TGFBR2。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR4/5。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CBLB。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CISH。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR(嵌合共刺激受體)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向IL-2。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向IL-12。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向IL-15。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向IL-21。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向NOTCH 1/2 ICD。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向TIM3。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向

LAG3。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向TIGIT。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向TGFβ。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR1。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR2。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR4。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR5。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CXCR1。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CXCR2。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CSCR3。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL2(MCP-1)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL3(MIP-1α)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL4(MIP1-β)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL5(RANTES)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CXCL1。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CXCL8。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL22。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL17。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向VHL。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CD44。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向PIK3CD。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向SOCS1。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向胸腺細胞選擇相關之高遷移率群組(HMG)匣(TOX)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向錨蛋白重複域11 (ANKRD11)。在

一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向BCL6輔抑制物(BCOR)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向cAMP蛋白激酶A(PKA)。

【1193】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致趨化激素受體增加及/或過度表現。在一些實施例中，因暫時性蛋白質表現而過度表現之趨化激素受體包含具有配體之受體，該配體包含但不限於CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1α)、CCL4(MIP1-β)、CCL5(RANTES)、CXCL1、CXCL8、CCL22及/或CCL17。

【1194】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1、CTLA-4、TIM-3、LAG-3、TIGIT、TGFβR2及/或TGFβ之表現降低及/或減少(包含導致例如TGFβ路徑阻斷)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CBLB(CBL-B)之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CISH之表現降低及/或減少。

【1195】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致趨化激素受體增加及/或過度表現，以例如改善TIL運輸或運動至腫瘤部位。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致嵌合共刺激受體(CCR)增加及/或過度表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由以下組成之群組之趨化激素受體增加及/或過度表現：CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2及/或CSCR3。

【1196】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致介白素增加及/或過度表現。在一些實施例中，暫時性

改變蛋白質表現導致選自由以下組成之群組之介白素增加及/或過度表現：IL-2、IL-12、IL-15及/或IL-21。

【1197】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致NOTCH 1/2 ICD增加及/或過度表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致VHL增加及/或過度表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CD44增加及/或過度表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PIK3CD增加及/或過度表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致SOCS1增加及/或過度表現，

【1198】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致cAMP蛋白激酶A(PKA)之表現降低及/或減少。

【1199】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由以下組成之群組之分子之表現降低及/或減少：PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由以下組成之群組之兩種分子之表現降低及/或減少：PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及選自由以下組成之群組之一種分子之表現降低及/或減少：LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致以下之表現降低及/或減少：PD-1、LAG-3、CISH、CBLB、

TIM3及其組合。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及以下中之一者之表現降低及/或減少：LAG3、CISH、CBLB、TIM3及其組合。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及LAG3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及CISH之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及CBLB之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致LAG3及CISH之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致LAG3及CBLB之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CISH及CBLB之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TIM3及PD-1之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TIM3及LAG3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TIM3及CISH之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TIM3及CBLB之表現降低及/或減少。

【1200】在一些實施例中，選自由CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及其組合組成之群組之黏著分子藉由γ逆轉錄病毒或慢病毒方法插入第一TIL群體、第二TIL群體或所收集TIL群體中(例如黏著分子之表現增加)。

【1201】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導

致選自由PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合組成之群組之分子的表現降低及/或減少，及CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及其組合的表現增加及/或增強。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由PD-1、LAG3、TIM3、CISH、CBLB及其組合組成之群組之分子的表現降低及/或減少，及CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及其組合的表現增加及/或增強。

【1202】在一些實施例中，表現減少約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%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約80%。在一些實施例中，表現減少至少約85%。在一些實施例中，表現減少至少約90%。在一些實施例中，表現減少至少約95%。在一些實施例中，表現減少至少約99%。

【1203】在一些實施例中，表現增加約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%或約95%。在一些實施例中，表現增加至少約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現增加至少約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現增加至少約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現增加至少約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現增加至少約80%。在一些實施例中，表現增加至少約85%。在一些實施例中，表現增加至少約90%。在一些實施例中，表現增加至少約95%。在一些實施例中，表現增加至少約99%。

【1204】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現藉由用轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時性改變TIL中之蛋白質表現之分子處理TIL來誘導。在一些實施例中，採用無SQZ載體之微流體平台進行轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現之分子的細胞內遞送。證明將包含轉錄因子之蛋白質遞送至多種初代人類細胞(包含T細胞)之能力的此類方法已描述於以下中：美國專利申請公開案第US 2019/0093073 A1號、第US 2018/0201889 A1號及第US 2019/0017072 A1號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。此類方法可用於本發明中，以將TIL群體暴露於轉錄因子(TF)及/或其他能夠誘導暫時性蛋白質表現之分子，其中該等TF及/或其他能夠誘導暫時性蛋白質表現之分子提供TIL群體中之腫瘤抗原之表現增加及/或腫

瘤抗原特異性T細胞之數目增加，從而導致TIL群體重新程式化及重新程式化TIL群體之治療功效相較於非重新程式化TIL群體增加。在一些實施例中，重新程式化導致相對於開始或先前TIL群體(亦即，在重新程式化之前)，效應T細胞及/或中樞記憶T細胞亞群增加，如本文所描述。

【1205】在一些實施例中，轉錄因子(TF)包含但不限於TCF-1、NOTCH 1/2 ICD及/或MYB。在一些實施例中，轉錄因子(TF)為TCF-1。在一些實施例中，轉錄因子(TF)為NOTCH 1/2 ICD。在一些實施例中，轉錄因子(TF)為MYB。在一些實施例中，轉錄因子(TF)與誘導性富潛能幹細胞培養物(iPSC)，諸如市售KNOCKOUT血清替代品(Gibco/賽默飛世爾)一起投予，以誘導另外TIL重新程式化。在一些實施例中，轉錄因子(TF)與iPSC混合物一起投予，以誘導另外TIL重新程式化。在一些實施例中，轉錄因子(TF)不與iPSC混合物一起投予。在一些實施例中，重新程式化導致TSCM之百分比增加。在一些實施例中，重新程式化導致TSCM之百分比增加約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%或約95%之TSCM。

【1206】在一些實施例中，如上文所描述之暫時性改變蛋白質表現之方法可與遺傳修飾TIL群體之方法組合，包含穩定併入基因以產生一種或多種蛋白質之步驟。在某些實施例中，方法包括遺傳修飾TIL群體之步驟。在某些

實施例中，方法包括遺傳修飾第一TIL群體、第二TIL群體及/或第三TIL群體。在一些實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包含逆轉錄病毒轉導之步驟。在一些實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包含慢病毒轉導之步驟。慢病毒轉導系統為本領域中已知的且描述於例如以下中：Levine等人，《美國國家科學院院刊》 **2006**, *103*, 17372-77；Zufferey等人，《自然生物技術學(*Nat. Biotechnol.*)》 **1997**, *15*, 871-75；Dull等人，《病毒學雜誌(*J. Virology*)》 **1998**, *72*, 8463-71及美國專利第6,627,442號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包含γ-逆轉錄病毒轉導之步驟。γ-逆轉錄病毒轉導系統為本領域中已知的且描述於例如Cepko及Pear, 《分子生物學中之當前方案(*Cur. Prot. Mol. Biol.*)》 **1996**, 9.9.1-9.9.16，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包含轉位子介導之基因轉移之步驟。轉位子介導之基因轉移系統為本領域中已知的，且包含其中轉位酶作為DNA表現載體或作為可表現的RNA或蛋白質提供，使得轉位酶之長期表現不發生在轉殖基因細胞中，例如提供為mRNA(例如包括帽及多腺苷酸尾之mRNA)的轉位酶。包含類鮭魚型Tel樣轉位酶(SB或睡美人轉位酶)，諸如SB10、SB11及SB100x；及酶活性增加之經工程改造酶之合適的轉位子介導之基因轉移系統描述於例如以下中：Hackett等人，《分子療法(*Mol. Therapy*)》 **2010**, *18*, 674-83及美國

專利第6,489,458號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1207】在一些實施例中，暫時性改變TIL中之蛋白質表現係由小干擾RNA(small interfering RNA；siRNA)誘導，該小干擾RNA有時稱為短干擾RNA或靜默RNA，其為雙股RNA分子，長度一般為19-25個鹼基對。siRNA用於RNA干擾(RNA interference；RNAi)中，其中siRNA干擾具有互補核苷酸序列之特定基因之表現。siRNA可用於暫時性減弱TIL中根據本發明亦經修飾為CCR之基因。

【1208】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現係由自我遞送RNA干擾(self-delivering RNA interference；sdRNA)誘導，該自我遞送RNA干擾為具有高百分比之2'-OH取代(通常氟或-OCH_3)之化學上合成的不對稱siRNA雙螺旋，其包括20個核苷酸之反義(引導)股及使用四乙基乙二醇(TEG)連接子在其3'端處與膽固醇結合之13至15個鹼基有義(乘客)股。小干擾RNA(siRNA)，有時稱為短干擾RNA或靜默RNA，為雙股RNA分子，長度一般為19-25個鹼基對。siRNA用於RNA干擾(RNAi)中，其中siRNA干擾具有互補核苷酸序列之特定基因之表現。sdRNA為進入細胞不需要遞送媒介之共價及疏水性修飾之RNAi化合物。sdRNA一般為具有極小雙股區之不對稱化學修飾核酸分子。sdRNA分子通常含有單股區及雙股區，且可在分子之單股及雙股區內含有各種化學修飾。另外，如本文所描述，sdRNA分子可與疏水性結合物，諸如習知及高級固醇

型分子連接。sdRNA及製備此類sdRNA之相關方法亦已廣泛描述於例如以下中：美國專利申請公開案第US 2016/0304873 A1號、第US 2019/0211337 A1號、第US 2009/0131360 A1號及第US 2019/0048341 A1號，及美國專利第10,633,654號及第10,913,948B2號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。為了最佳化sdRNA結構、化學性質、靶向位置、序列偏好及其類似者，已開發一種演算法且將其用於sdRNA效能預測。基於此等分析，功能性sdRNA序列一般定義為在1 μM濃度下表現減少超過70%，其中概率超過40%。

【1209】雙股DNA(dsRNA)可通常用以定義包括一對互補RNA股，一般有義(乘客)及反義(引導)股之任何分子，且可包含單股懸垂臂區。與siRNA不同，術語dsRNA一般係指包含siRNA分子之序列之前驅物分子，該siRNA分子藉由裂解酶系統(包含Dicer)之作用自較大dsRNA分子釋放。

【1210】在一些實施例中，包括暫時性改變TIL群體中之蛋白質表現之方法包括使用siRNA或sdRNA。使用sdRNA之方法已描述於以下中：Khvorova及Watts, 《自然生物技術學》 **2017**, *35*, 238-248；Byrne等人, 《眼藥理學與治療學雜誌(*J. Ocul. Pharmacol. Ther.*)》 **2013**, *29*, 855-864；及Ligtenberg等人, 《分子療法》 **2018**(印製中)，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，siRNA之遞送係使用電穿孔或細胞膜破壞(諸如擠壓或SQZ法)來完成。在一

些實施例中，遞送sdRNA至TIL群體不需要使用電穿孔、SQZ或其他方法來完成，實際上使用1至3天時段使TIL群體暴露於濃度為1 μM/10,000個TIL於培養基中之sdRNA。在某些實施例中，方法包括遞送siRNA或sdRNA至TIL群體，其包括將TIL群體暴露於濃度為1 μM/10,000個TIL於培養基中之siRNA或sdRNA持續1至3天之間的時段。在一些實施例中，遞送siRNA或sdRNA至TIL群體係使用1至3天時段使TIL群體暴露於濃度為10 μM/10,000個TIL於培養基中之siRNA或sdRNA來完成。在一些實施例中，遞送siRNA或sdRNA至TIL群體係使用1至3天時段使TIL群體暴露於濃度為50 μM/10,000個TIL於培養基中之siRNA或sdRNA來完成。在一些實施例中，遞送siRNA或sdRNA至TIL群體係使用1至3天時段使TIL群體暴露於濃度為介於0.1 μM/10,000個TIL與50 μM/10,000個TIL於培養基中之間的sdRNA來完成。在一些實施例中，遞送siRNA或sdRNA至TIL群體係使用1至3天時段使TIL群體暴露於濃度為介於0.1 μM/10,000個TIL與50 μM/10,000個TIL於培養基中之間的siRNA或sdRNA來完成，其中暴露於siRNA或sdRNA藉由添加新鮮siRNA或sdRNA至培養基來進行兩次、三次、四次或五次。其他合適過程描述於例如以下中：美國專利申請公開案第US 2011/0039914 A1號、第US 2013/0131141 A1號及第US 2013/0131142 A1號，及美國專利第9,080,171號，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1211】在一些實施例中，在製造期間將siRNA或

sdRNA插入TIL群體中。在一些實施例中，siRNA或sdRNA編碼干擾以下之RNA：NOTCH 1/2 ICD、PD-1、CTLA-4 TIM-3、LAG-3、TIGIT、TGFβ、TGFBR2、cAMP蛋白激酶A(PKA)、BAFF BR3、CISH及/或CBLB。在一些實施例中，表現減少係基於例如如藉由流動式細胞測量術及/或qPCR評定之基因靜默之百分比而判定。在一些實施例中，表現減少約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%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約80%。在一些實施例中，表現減少至少約85%。在一些實施例中，表現減少至少約90%。在一些實施例中，表現減少至少約95%。在一些實施例中，表現減少至少約99%。

【1212】基於化學修飾siRNA或sdRNA之自我可遞送RNAi技術可用於本發明之方法中，以成功遞送siRNA或sdRNAs至如本文所描述之TIL。具有不對稱siRNA或sdRNA結構之主鏈修飾與疏水性配體之組合(參見例如Ligtenberg等人，《分子療法》 **2018**及US20160304873)允

許sdRNA或sd RNA藉由簡單添加至培養基而穿透培養的哺乳動物細胞而不需要另外的調配物及方法，從而利用siRNA或sdRNA之核酸酶穩定性。此穩定性允許僅藉由維持siRNA或sdRNA於培養基中之有效濃度，支持恆定含量之RNAi介導之目標基因活性減少。儘管不受理論束縛，但siRNA或sdRNA之主鏈穩定化提供延長減少基因表現效應，其在非分裂細胞中可持續數月。

【1213】在一些實施例中，超過95%之TIL轉染效率及目標之表現減少藉由各種特定siRNA或sdRNA發生。在一些實施例中，含有若干未經修飾之核糖殘基之siRNA或sdRNA經完全修飾的序列置換，以增加RNAi效應之效能及/或壽命。在一些實施例中，表現減少效應維持12小時、24小時、36小時、48小時、5天、6天、7天或8天或更久。在一些實施例中，表現減少效應在siRNA或sdRNA處理TIL 10天或更久後降低。在一些實施例中，目標表現維持超過70%之表現減少。在一些實施例中，TIL中之目標表現維持超過70%之表現減少。在一些實施例中，PD-1/PD-L1路徑中之表現減少允許TIL展現更強效的活體內效應，此在一些實施例中係因為避免PD-1/PD-L1路徑之抑制效應。在一些實施例中，因siRNA或sdRNA之PD-1之表現減少導致增加TIL增殖。

【1214】在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列展現70%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列展現75%之目標

基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列展現80%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列展現85%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列展現90%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列展現95%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列展現99%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列當以約0.25 μM至約4 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列當以約0.25 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列當以約0.5 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列當以約0.75 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列當以約1.0 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列當以約1.25 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列當以約1.5 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列當以約1.75 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之

siRNA或sdRNA序列當以約2.0 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列當以約2.25 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列當以約2.5 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列當以約2.75 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列當以約3.0 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列當以約3.25 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列當以約3.5 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列當以約3.75 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之siRNA或sdRNA序列當以約4.0 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。

【1215】在一些實施例中，siRNA或sdRNA寡核苷酸劑包括一種或多種修飾以增加治療劑之穩定性及/或有效性及實現寡核苷酸至待治療之細胞或組織之有效遞送。此類修飾可包含2'-O-甲基修飾、2'-O-氟修飾、二硫代磷酸酯修飾、2' F修飾的核苷酸、2'-O-甲基修飾的及/或2'去氧核苷酸。在一些實施例中，寡核苷酸經修飾以包含一個或多個疏水性修飾，包含例如固醇、膽固醇、維生素D、萜

基、異丁基、苯甲基、吲哚、色胺酸及/或苯基。在另一特定實施例中，化學修飾的核苷酸為硫代磷酸酯、2'-O-甲基、2'去氧、疏水性修飾及硫代磷酸酯之組合。在一些實施例中，糖可經修飾且經修飾的糖可包含但不限於D-核糖、2'-O-烷基(包含2'-O-甲基及2'-0-乙基)，亦即2'-烷氧基、2'-胺基、2'-S-烷基、2'-鹵基(包含2'-氟)、T-甲氧基乙氧基、2'-烯丙氧基(-$OCH_2CH=CH_2$)、2'-炔丙基、2'-丙基、乙炔基、乙烯基、丙烯基及氰基及其類似者。在一個實施例中，糖部分可為己醣且併入寡核苷酸中，如Augustyns等人，《核酸研究(Nucl. Acids. Res.)》18:4711(1992)，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1216】在一些實施例中，本發明之雙股siRNA或sdRNA寡核苷酸在其整個長度上為雙股，亦即在分子之任一端處無懸垂單股序列，亦即為鈍端。在一些實施例中，個別核酸分子可具有不同長度。換言之，本發明之雙股寡核苷酸在其整個長度上不為雙股。舉例而言，當使用兩個分開的核酸分子時，分子中之一者，例如包括反義序列之第一分子可比與其雜交之第二分子更長(留下一部分之分子為單股)。在一些實施例中，當使用單核酸分子時，在任一端處之一部分之分子可保持單股。

【1217】在一些實施例中，本發明之雙股siRNA或sdRNA寡核苷酸含有錯配及/或環或凸起，但在至少約70%之寡核苷酸長度上為雙股的。在一些實施例中，本發明之雙股siRNA或sdRNA寡核苷酸在至少約80%之寡核苷酸長

度上為雙股的。在其他實施例中，本發明之雙股寡核苷酸在至少約90%-95%之寡核苷酸長度上為雙股的。在一些實施例中，本發明之雙股siRNA或sdRNA寡核苷酸在至少約96%-98%之寡核苷酸長度上為雙股的。在一些實施例中，本發明之雙股siRNA或sdRNA寡核苷酸含有至少或至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個錯配。

【1218】在一些實施例中，siRNA或sdRNA寡核苷酸可例如藉由修飾3'或5'鍵聯而實質上保護免受核酸酶影響(例如美國專利第5,849,902號及WO 98/13526)。舉例而言，寡核苷酸可藉由納入「阻斷基團」而具有抗性。如本文所用之術語「阻斷基團」係指可作為用於合成之保護基或偶合基團與寡核苷酸或核單體連接之取代基(例如除OH基團以外)(例如FITC、丙基(CH_2-CH_2-CH_3)、二醇(-0-CH_2-CH_2-O-)磷酸鹽($PO_3^{2"}$)、膦酸氫鹽或胺基亞磷酸酯)。「阻斷基團」亦可包含「末端阻斷基團」或「核酸外切酶阻斷基團」，其保護寡核苷酸之5'及3'端，其包含經修飾的核苷酸及非核苷酸核酸外切酶抗性結構。

【1219】在一些實施例中，siRNA或sdRNA內之至少一部分連續多核苷酸藉由取代基鍵聯，例如硫代磷酸酯鍵聯連接。

【1220】在一些實施例中，化學修飾可導致至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、

100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500細胞攝取siRNA或sdRNA增強。在一些實施例中，C或U殘基中之至少一者包含疏水性修飾。在一些實施例中，複數個C及U含有疏水性修飾。在一些實施例中，至少10%、15%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或至少95%之C及U可含有疏水性修飾。在一些實施例中，所有C及U均含有疏水性修飾。

【1221】在一些實施例中，siRNA或sdRNA分子經由併入可質子化胺展現增強的胞內體釋放。在一些實施例中，將可質子化胺併入有義股中(在RISC裝載後被捨棄的分子部分中)。在一些實施例中，本發明之siRNA或sdRNA化合物包括不對稱化合物，該不對稱化合物包括雙螺旋區(有效RISC進入所需，10-15個鹼基長)及4-12個核苷酸長之單股區；具有13個核苷酸的雙螺旋。在一些實施例中，採用6個核苷酸的單股區。在一些實施例中，siRNA或sdRNA之單股區包括2-12個硫代磷酸酯核苷酸間鍵聯(稱為硫代磷酸酯修飾)。在一些實施例中，採用6-8個硫代磷酸酯核苷酸間鍵聯。在一些實施例中，本發明之siRNA或sdRNA化合物亦包含獨特的化學修飾模式，其提供穩定性且與RISC進入相容。舉例而言，引導股亦可藉由任何證實穩定性而不干擾RISC進入之化學修飾來修飾。在一些實施例

中，引導股中之化學修飾模式包含大部分為2' F修飾且5'端經磷酸化之C及U核苷酸。

【1222】在一些實施例中，siRNA或sdRNA中至少30%之核苷酸為經修飾的。在一些實施例中，siRNA或sdRNA中至少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%或99%之核苷酸為經修飾的。在一些實施例中，siRNA或sdRNA中100%之核苷酸為經修飾的。

【1223】在一些實施例中，siRNA或sdRNA分子具有極少雙股區。在一些實施例中，分子之雙股區介於8-15個核苷酸長範圍內。在一些實施例中，分子之雙股區為8、9、10、11、12、13、14或15個核苷酸長。在一些實施例中，雙股區為13個核苷酸長。引導股與乘客股之間可有100%互補性，或引導股與乘客股之間可存在一個或多個錯配。在一些實施例中，在雙股分子之一端上，分子為鈍端或具有一個核苷酸之懸垂臂。分子之單股區在一些實施例中係介於4-12個核苷酸長。在一些實施例中，單股區可為4、5、6、7、8、9、10、11或12個核苷酸長。在一些實

施例中，單鏈區亦可小於4個核苷酸或大於12個核苷酸長。在某些實施例中，單股區為6或7個核苷酸長。

【1224】在一些實施例中，siRNA或sdRNA分子具有增加的穩定性。在一些情況下，化學修飾的siRNA或sdRNA分子在培養基中之半衰期長於1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或超過24小時，包含任何中間值。在一些實施例中sd-rxRNA在培養基中之半衰期長於12小時。

【1225】在一些實施例中，對siRNA或sdRNA進行最佳化以增加效能及/或減少毒性。在一些實施例中，引導股及/或乘客股之核苷酸長度及/或引導股及/或乘客股中硫代磷酸酯修飾之數目在一些態樣中可影響RNA分子之效能，而用2'-0-甲基(2'OMe)修飾置換2'-氟(2'F)修飾在一些態樣中可影響分子之毒性。在一些實施例中，預期減少分子之2'F含量將減少分子之毒性。在一些實施例中，RNA分子中硫代磷酸酯修飾之數目可影響攝取分子至細胞中，例如被動攝取分子至細胞中之效率。在一些實施例中，sdRNA不具有2'F修飾，但其特徵為細胞攝取與組織滲透方面之功效相等。

【1226】在一些實施例中，引導股之長度為大約18-19個核苷酸且具有大約2-14個磷酸酯修飾。舉例而言，引導股可含有2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或超過14個經磷酸酯修飾之核苷酸。引導股可含有一個或多個賦予增加的穩定性而不干擾RISC進入之修飾。磷酸酯

修飾的核苷酸，諸如硫代磷酸酯修飾的核苷酸，可在3'端、5'端或遍佈於整個引導股中。在一些實施例中，引導股之3'端10個核苷酸含有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個硫代磷酸酯修飾的核苷酸。引導股亦可含有2'F及/或2'OMe修飾，其可位於整個分子中。在一些實施例中，引導股中位置一之核苷酸(引導股之最5'位置中之核苷酸)經2'OMe修飾及/或磷酸化。引導股內之C及U核苷酸可經2'F修飾。舉例而言，19個核苷酸之引導股之位置2-10(或不同長度之引導股中之對應位置)中之C及U核苷酸可經2'F修飾。引導股內之C及U核苷酸亦可經2'OMe修飾。舉例而言，19個核苷酸之引導股之位置11-18(或不同長度之引導股中之對應位置)中之C及U核苷酸可經2'OMe修飾。在一些實施例中，在引導股之最3'端處之核苷酸未經修飾。在某些實施例中，引導股內之大部分C及U經2'F修飾，且引導股之5'端經磷酸化。在其他實施例中，位置1及位置11-18中之C或U經2'OMe修飾，且引導股之5'端經磷酸化。在其他實施例中，位置1及位置11-18中之C或U經2'OMe修飾，引導股之5'端經磷酸化，且位置2-10中之C或U經2'F修飾。

【1227】自我可遞送RNAi技術提供一種直接用RNAi劑(無論是siRNA、sdRNA或是其他RNAi劑)轉染細胞而無需另外調配物或技術之方法。轉染難以轉染細胞株之能力、高活體內活性及使用簡單為該等組成物及方法之特徵，其相對於基於siRNA之傳統技術存在顯著的功能優

勢，且因此在關於減少本發明之TIL中目標基因表現之方法之若干實施例中採用sdRNA方法。sdRNAi方法允許直接遞送化學合成化合物至廣泛範圍之離體及活體內初代細胞及組織。在本文中本發明之一些實施例中描述之sdRNA可購自美國馬薩諸塞州伍斯特之Advirna LLC。

【1228】siRNA及sdRNA形成為疏水性修飾的siRNA-反義寡核苷酸雜交結構，且揭示於例如Byrne等人，2013年12月，《眼科藥理學及治療雜誌(J. Ocular Pharmacology and Therapeutics)》，29(10): 855-864中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1229】在一些實施例中，siRNA或sdRNA寡核苷酸可使用無菌電穿孔遞送至本文所描述之TIL。在某些實施例中，方法包括無菌電穿孔TIL群體以遞送siRNA或sdRNA寡核苷酸。

【1230】在一些實施例中，寡核苷酸可與跨膜遞送系統組合遞送至細胞。在一些實施例中，此跨膜遞送系統包括脂質、病毒載體及其類似者。在一些實施例中，寡核苷酸劑為不需要任何遞送劑之自我遞送RNAi劑。在某些實施例中，方法包括使用跨膜遞送系統來遞送siRNA或sdRNA寡核苷酸至TIL群體。

【1231】使寡核苷酸及寡核苷酸組成物與本文所描述之TIL接觸(例如使其接觸，在本文中亦稱為投予或遞送至)且被攝入，包含經由TIL被動攝取。siRNA或sdRNA可在以下時添加至如本文所描述之TIL：在第一擴增期間(例

如步驟B)、在第一擴增之後(例如在步驟C期間)、在第二擴增之前或期間(例如在步驟D之前或期間)、在步驟D之後且在步驟E中收集之前、在步驟F中收集期間或之後、在步驟F中最終調配及/或轉移至輸注袋之前或期間、以及在步驟F中任何視情況選用之冷凍保存步驟之前。此外，siRNA或sdRNA可在自步驟F中任何冷凍保存步驟解凍之後添加。在一些實施例中，可將一個或多個靶向如本文中所描述之基因(包含PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB)之siRNA或sdRNA，以選自由100 nM至20 mM、200 nM至10 mM、500 nm至1 mM、1 μM至100 μM及1 μM至100 μM組成之群組之濃度，添加至包括TIL及其他藥劑之細胞培養基。在一些實施例中，可將一個或多個靶向如本文中所描述之基因(包含PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB)之siRNA或sdRNA，以選自由以下組成之群組之量添加至包括TIL及其他藥劑之細胞培養基：0.1 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、0.5 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、0.75 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、1 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、1.25 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、1.5 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、2 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、5 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基或10 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基。在一些實施例中，可將一個或多個

靶向如本文中所描述之基因(包含PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH及CBLB)之sdRNA，在REP前或REP階段期間一天兩次、一天一次、每兩天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次或每七天一次添加至TIL培養物。

【1232】本發明之寡核苷酸組成物，包含siRNA或sdRNA，可在擴增過程期間，例如藉由將高濃度siRNA或sdRNA溶解於細胞培養培養基中及允許足夠時間發生被動攝取而與如本文所描述之TIL接觸。在某些實施例中，本發明方法包括使TIL群體與如本文所描述之寡核苷酸組成物接觸。在某些實施例中，方法包括將寡核苷酸，例如siRNA或sdRNA，溶解於細胞培養基中，且使細胞培養基與TIL群體接觸。TIL可為如本文所描述之第一群體、第二群體及/或第三群體。

【1233】在一些實施例中，遞送siRNA或sdRNA寡核苷酸至細胞中可藉由合適的本領域公認方法增強，包含磷酸鈣、DMSO、甘油或聚葡萄糖、電穿孔或藉由轉染，例如使用陽離子、陰離子或中性脂質組成物或脂質體，使用本領域中已知的方法(參見例如WO 90/14074、WO 91/16024、WO 91/17424、美國專利第4,897,355號；Bergan等人1993.《核酸研究(Nucleic Acids Research.)》21 :3567)。

【1234】在一些實施例中，使用超過一種siRNA或sdRNA來減少目標基因表現。在一些實施例中，靶向

siRNA或sdRNA之PD-1、TIM-3、CBLB、LAG3及/或CISH中之一者或多者一起使用。在一些實施例中，PD-1 siRNA或sdRNA與TIM-3、CBLB、LAG3及/或CISH中之一者或多者一起使用，以減少超過一種基因目標之表現。在一些實施例中，LAG3 siRNA或sdRNA與靶向siRNA或sdRNA之CISH組合使用，以減少兩種目標之基因表現。在一些實施例中，本文中靶向PD-1、TIM-3、CBLB、LAG3及/或CISH中之一者或多者之siRNA或sdRNA可購自美國馬薩諸塞州伍斯特的Advirna LLC。

【1235】在一些實施例中，siRNA或sdRNA靶向選自由以下組成之群組之基因：PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，siRNA或sdRNA靶向選自由以下組成之群組之基因：PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向PD-1，且另一種siRNA或sdRNA靶向選自由以下組成之群組之基因：LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，siRNA或sdRNA靶向選自以下之基因：PD-1、LAG-3、CISH、CBLB、TIM3及其組合。在一些實施例中，siRNA或sdRNA靶向選自PD-1及以下中之一者之基因：LAG3、CISH、CBLB、TIM3及其組合。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向PD-1，且一種siRNA或sdRNA靶向

LAG3。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向PD-1，且一種siRNA或sdRNA靶向CISH。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向PD-1，且一種siRNA或sdRNA靶向CBLB。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向LAG3，且一種siRNA或sdRNA靶向CISH。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向LAG3，且一種siRNA或sdRNA靶向CBLB。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CISH，且一種siRNA或sdRNA靶向CBLB。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向TIM3，且一種siRNA或sdRNA靶向PD-1。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向TIM3，且一種siRNA或sdRNA靶向LAG3。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向TIM3，且一種siRNA或sdRNA靶向CISH。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向TIM3，且一種siRNA或sdRNA靶向CBLB。

【1236】如上文所論述，本發明之實施例提供已經由基因編輯進行遺傳修飾以增強其治療效果之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)。本發明之實施例涵蓋經由核苷酸插入(RNA或DNA)TIL群體中進行之基因編輯，以促進一種或多種蛋白質之表現及抑制一種或多種蛋白質之表現以及其組合本發明之實施例亦提供用於將TIL擴增為治療性群體之方法，其中該等方法包括基因編輯TIL。存在若干種可用於遺傳修飾TIL群體之基因編輯技術，該等基因編輯技術適合於根據本發明使用。

【1237】在一些實施例中，方法包括遺傳修飾TIL群

體之方法，該TIL群體例如如本文所描述之第一群體、第二群體及/或第三群體。在一些實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包含穩定併入用於產生或抑制(例如靜默)一種或多種蛋白質之基因之步驟。在一些實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包含電穿孔之步驟。電穿孔方法為本領域中已知的，且描述於例如以下中：Tsong, 《生物物理雜誌》 **1991,** *60*, 297-306及美國專利申請公開案第2014/0227237 A1號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。可使用本領域中已知之其他電穿孔方法，諸如以下中描述之彼等電穿孔方法：美國專利第5,019,034號、第5,128,257號、第5,137,817號、第5,173,158號、第5,232,856號、第5,273,525號、第5,304,120號、第5,318,514號、第6,010,613號及第6,078,490號，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，電穿孔方法為無菌電穿孔方法。在一些實施例中，電穿孔方法為脈衝電穿孔方法。在一些實施例中，電穿孔方法為脈衝電穿孔方法，其包括用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包括向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該一系列至少三個DC電脈衝具有一個、兩個或三個以下特徵：(1)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝振幅上彼此不同；(2)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝寬度上彼此不同；及(3)第一組該至少三個脈衝中兩者的第

一脈衝間隔與第二組該至少三個脈衝中兩者的第二脈衝間隔不同。在一些實施例中，電穿孔方法為脈衝電穿孔方法，其包括用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包括向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝振幅上彼此不同。在一些實施例中，電穿孔方法為脈衝電穿孔方法，其包括用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包括向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝寬度上彼此不同。在一些實施例中，電穿孔方法為脈衝電穿孔方法，其包括用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包括向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中第一組該至少三個脈衝中兩者的第一脈衝間隔與第二組該至少三個脈衝中兩者的第二脈衝間隔不同。在一些實施例中，電穿孔方法為脈衝電穿孔方法，其包括用脈衝電場處理TIL以誘導TIL中孔形成之步驟，包括向TIL施加一系列至少三個DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該一系列至少三個DC電脈衝具有一個、兩個或三個以下特徵：(1)該至少三個脈衝

中之至少兩者在脈衝振幅上彼此不同；(2)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝寬度上彼此不同；及(3)第一組該至少三個脈衝中兩者的第一脈衝間隔與第二組該至少三個脈衝中兩者的第二脈衝間隔不同，使得所誘導的孔持續相對長的時段，及使得維持TIL之存活性。在一些實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包含磷酸鈣轉染之步驟。磷酸鈣轉染方法(磷酸鈣DNA沈澱、細胞表面包覆及胞吞作用)為本領域中已知的且描述於以下中：Graham及van der Eb, 《病毒學》 **1973**, *52*, 456-467；Wigler等人, 《美國國家科學院院刊》 **1979**, *76*, 1373-1376；及Chen及Okayarea, 《分子細胞生物學》**1987**, *7*, 2745-2752；及美國專利第5,593,875號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包含脂質體轉染之步驟。脂質體轉染方法，諸如採用陽離子脂質*N*-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-*n*,*n*,*n*-三甲基氯化銨(DOTMA)及二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)於過濾水中之1:1(w/w)脂質體調配物之方法為本領域中已知的且描述於以下中：Rose等人, 《生物技術》 **1991**, *10*, 520-525及Felgner等人, 《美國國家科學院院刊》, **1987**, *84*, 7413-7417以及美國專利第5,279,833號、第5,908,635號、第6,056,938號、第6,110,490號、第6,534,484號及第7,687,070號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包含使用以下中描述之方法進行轉染之步驟：美國專利第

5,766,902號、第6,025,337號、第6,410,517號、第6,475,994號及第7,189,705號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。TIL可為如本文所描述之第一TIL群體、第二TIL群體及/或第三TIL群體。

【1238】根據一實施例，基因編輯方法可包括使用介導在一個或多個免疫檢查點基因處產生雙股或單股斷裂之可程式化核酸酶。此類可程式化核酸酶藉由在特定基因體基因座處引入斷裂而能夠進行精確基因體編輯，亦即其依賴於識別基因體內之特定DNA序列以將核酸酶域靶向此位置且介導在目標序列處產生雙股斷裂。DNA中之雙股斷裂隨後將內源性修復機制募集至斷裂位點，以藉由非同源末端連接(NHEJ)或同源定向修復(HDR)來介導基因體編輯。因此，斷裂之修復可導致引入擾亂(例如靜默、抑制或增強)目標基因產物之插入/缺失突變。

【1239】經開發而使得能夠進行位點特異性基因體編輯之核酸酶之主要類別包含鋅指核酸酶(zinc finger nuclease；ZFN)、轉錄活化因子樣核酸酶(transcription activator-like nucleases；TALEN)及CRISPR相關核酸酶(例如CRISPR/ Cas9)。此等核酸酶系統可基於其DNA識別模式而大致分類為兩類：ZFN及TALEN經由蛋白質-DNA相互作用達成特定DNA結合，而CRISPR系統，諸如Cas9，藉由與目標DNA直接鹼基配對之短RNA引導分子及藉由蛋白質-DNA相互作用而靶向特定DNA序列。參見例如Cox等人，《自然醫學(*Nature Medicine*)》，2015，第21卷，第2期。

【1240】可根據本發明之TIL擴增方法使用之基因編輯方法之非限制性實例包含CRISPR方法、TALE方法及ZFN方法，該等方法在下文更詳細地描述。根據一實施例，將TIL擴增為治療性群體之方法可根據本文所描述之方法(例如Gen 3過程)之任何實施例或如美國專利申請公開案第US 2020/0299644 A1號及第US 2020/0121719 A1號以及美國專利第10,925,900號中所描述進行，其揭示內容以引用之方式併入本文中，其中該方法進一步包括藉由CRISPR方法、TALE方法或ZFN方法中之一者或多者基因編輯至少一部分的TIL，以產生可提供增強治療效果的TIL。根據一實施例，可藉由活體外比較基因編輯的TIL與未經修飾的TIL，例如藉由評估相較於未經修飾的TIL之活體外效應功能、細胞介素概況等，來評估基因編輯的TIL之改善的治療效果。在某些實施例中，方法包括使用CRISPR、TALE及/或ZFN方法來基因編輯TIL群體。

【1241】在本發明之一些實施例中，使用電穿孔來遞送基因編輯系統，諸如CRISPR、TALEN及ZFN系統。在本發明之一些實施例中，電穿孔系統為流式電穿孔系統。適用於本發明之一些實施例之合適的流式電穿孔系統之實例為市售MaxCyte STX系統。有若干種可能適用於本發明之替代性市售電穿孔儀器，諸如可獲自BTX-Harvard Apparatus之AgilePulse系統或ECM 830、Cellaxess Elektra(Cellectricon)、Nucleofector(龍沙(Lonza)/Amaxa)、GenePulser MXcell(伯樂(BIORAD)、iPorator-96(Primax)或

siPORTer96(Ambion)。在本發明之一些實施例中，電穿孔系統與TIL擴增方法之其餘部分一起形成密閉無菌系統。在本發明之一些實施例中，電穿孔系統為如本文中所描述之脈衝電穿孔系統，且與TIL擴增方法之其餘部分一起形成密閉無菌系統。

【1242】用於將TIL擴增為治療性群體之方法可根據本文所描述之方法(例如過程Gen 3)之任何實施例或如美國專利申請公開案第US 2020/0299644 A1號及第US 2020/0121719 A1號以及美國專利第10,925,900號中所描述進行，其揭示內容以引用之方式併入本文中，其中該方法進一步包括藉由CRISPR方法(例如CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1)基因編輯至少一部分的TIL。根據特定實施例，在TIL擴增過程期間使用CRISPR方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一種或多種免疫檢查點基因之表現靜默或減少。替代地，在TIL擴增過程期間使用CRISPR方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一種或多種免疫檢查點基因之表現增強。

【1243】CRISPR代表「成簇規律間隔短回文重複序列(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)」。使用CRISPR系統進行基因編輯之方法在本文中亦稱為CRISPR方法。有三種類型之併入RNA及Cas蛋白且可根據本發明使用之CRISPR系統：I、II及III型。II型CRISPR(藉由Cas9例示)為最充分表徵之系統之一。

【1244】CRISPR技術係改編自細菌及古菌(單細胞微

生物之域)之天然防禦機制。此等生物體使用CRISPR衍生之RNA及各種Cas蛋白(包含Cas9)，藉由切碎及破壞外來入侵者之DNA來阻止病毒及其他外來體的攻擊。CRISPR為具有兩個獨特特徵之DNA特化區：存在核苷酸重複序列及間隔子。核苷酸之重複序列分佈在整個CRISPR區中，其中短外來DNA區段(間隔子)穿插在重複序列中。在II型CRISPR/Cas系統中，間隔子整合於CRISPR基因體基因座內且轉錄並加工成短CRISPR RNA(crRNA)。此等crRNA退火成反式活化crRNA(tracrRNA)，且引導Cas蛋白進行序列特異性裂解及靜默病原性DNA。Cas9蛋白進行之目標識別需要crRNA內之「種子」序列及crRNA結合區上游之含有二核苷酸的保守原間隔序列相鄰模體(PAM)序列。藉此CRISPR/Cas系統可藉由重新設計crRNA而重新靶向以裂解幾乎任何DNA序列。原生系統中之crRNA及tracrRNA可簡化為大約100個核苷酸之單引導RNA(sgRNA)以用於基因工程改造。CRISPR/Cas系統藉由共同遞送表現Cas9核酸內切酶及必需crRNA組分之質體可直接攜帶入人類細胞。可使用不同的Cas蛋白變體來減少靶向限制(例如Cas9之異種同源物，諸如Cpf1)。

【1245】可經由CRISPR方法永久性基因編輯TIL而靜默或抑制之基因之非限制性實例包含PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、

SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11及BCOR。

【1246】可經由CRISPR方法永久性基因編輯TIL而增強之基因之非限制性實例包含CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15及IL-21。

【1247】藉由CRISPR方法來改變目標基因序列之表現且可根據本發明之實施例使用之系統、方法及組成物之實例描述於以下中：美國專利第8,697,359號、第8,993,233號、第8,795,965號、第8,771,945號、第8,889,356號、第8,865,406號、第8,999,641號、第8,945,839號、第8,932,814號、第8,871,445號、第8,906,616號及第8,895,308號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。用於進行CRISPR方法之資源，諸如用於表現CRISPR/Cas9及CRISPR/Cpf1之質體，可購自公司，諸如金斯瑞(GenScript)。

【1248】在一些實施例中，遺傳修飾如本文中所描述之TIL群體可使用如美國專利第US 9790490號中所描述之CRISPR/Cpf1系統進行，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1249】用於將TIL擴增為治療性群體之方法可根據本文所描述之方法(例如過程2A)之任何實施例或如美國專利申請公開案第US 2020/0299644 A1號及第US 2020/0121719 A1號以及美國專利第10,925,900號中所描述進行，其揭示內容以引用之方式併入本文中，其中該方法進一步包括藉由TALE方法基因編輯至少一部分的TIL。根據特定實施例，在TIL擴增過程期間使用TALE方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一種或多種免疫檢查點基因之表現靜默或減少。替代地，在TIL擴增過程期間使用TALE方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一種或多種免疫檢查點基因之表現增強。

【1250】TALE代表「轉錄活化因子樣效應」蛋白，其包含TALEN(「轉錄活化因子樣效應核酸酶」)。使用TALE系統來基因編輯之方法在本文中亦稱為TALE方法。TALE為來自植物病原細菌黃單孢菌屬(*Xanthomonas*)之天然存在蛋白質，且含有由一系列各自識別單鹼基對之33-35個胺基酸之重複域構成之DNA結合域。TALE特異性係藉由被稱為重複可變二殘基(repeat-variable di-residue；RVD)之兩個高變胺基酸判定。模組化TALE重複序列連接在一起以識別連續DNA序列。DNA結合域中之特異性RVD識別目標基因座中之鹼基，從而提供結構特徵以組裝可預測的DNA結合域。將TALE之DNA結合域與IIS型FokI核酸內切酶之催化域融合，以製備可靶向的TALE核酸酶。為了誘導位點特異性突變，由14-20個鹼基對間隔區域分開之兩

個個別TALEN臂將FokI單體拉近以二聚合及產生靶向的雙股斷裂。

【1251】若干個利用各種組裝方法之大的系統性研究指示，可併入TALE重複序列以識別幾乎任何使用者定義的序列。定製設計的TALE陣列亦由Cellectis Bioresearch(法國巴黎)、Transposagen Biopharmaceuticals(美國肯塔基州列克星敦(Lexington, KY, USA))及Life Technologies(美國紐約州格蘭德島(Grand Island, NY, USA))市售。適用於本發明之TALE及TALEN方法描述於以下中：美國專利申請公開案第US 2011/0201118 A1號、第US 2013/0117869 A1號、第US 2013/0315884 A1號、第US 2015/0203871 A1號及第US 2016/0120906 A1號，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1252】可經由TALE方法永久性基因編輯TIL而靜默或抑制之基因之非限制性實例包含PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、

TOX、SOCS1、ANKRD11及BCOR。

【1253】可經由TALE方法永久性基因編輯TIL而增強之基因之非限制性實例包含CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15及IL-21。

【1254】藉由TALE方法來改變目標基因序列之表現且可根據本發明之實施例使用之系統、方法及組成物之實例描述於美國專利第8,586,526號中，其以引用之方式併入本文中。

【1255】用於將TIL擴增為治療性群體之方法可根據本文所描述之方法(例如過程Gen 3)之任何實施例或如美國專利申請公開案第US 2020/0299644 A1號及第US 2020/0121719 A1號以及美國專利第10,925,900號中所描述進行，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中，其中該方法進一步包括藉由鋅指或鋅指核酸酶方法基因編輯至少一部分的TIL。根據特定實施例，在TIL擴增過程期間使用鋅指方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一種或多種免疫檢查點基因之表現靜默或減少。替代地，在TIL擴增過程期間使用鋅指方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一種或多種免疫檢查點基因之表現增強。

【1256】呈保守ββα組態之個別鋅指含有大約30個胺基酸。α-螺旋表面上之幾個胺基酸通常以不同的選擇性水準接觸DNA主溝槽中的3 bp。鋅指具有兩個蛋白域。第一域為DNA結合域，其包含真核轉錄因子且含有鋅指。第二域為核酸酶域，其包含FokI限制酶且負責催化裂解DNA。

【1257】個別ZFN之DNA結合域通常含有介於三個與六個之間的個別鋅指重複且各自可識別介於9個與18個之間的鹼基對。若鋅指域對其預期目標位點具有特異性，則甚至一對識別總共18個鹼基對之3指ZFN理論上可靶向哺乳動物基因體中之單個基因座。一個產生新的鋅指陣列之方法為組合具有已知特異性之較小鋅指「模組」。最常見的模組組裝過程涉及組合三個分開的可各自識別3個鹼基對DNA序列之鋅指，以產生可識別9個鹼基對目標位點之3指陣列。替代地，可使用基於選擇之方法，諸如寡聚池工程改造(oligomerized pool engineering；OPEN)，來自隨機分組文庫選擇新的鋅指陣列，該等隨機分組文庫考慮介於鄰近指之間的上下文依賴性相互作用(context-dependent interaction)。工程改造的鋅指為可商購的；Sangamo Biosciences(美國加利福尼亞州里奇蒙(Richmond))已與西格瑪奧瑞奇(Sigma-Aldrich)(美國密蘇里州聖路易斯(St.Louis, MO, USA))合作開發一種用於鋅指構築之專用平台(CompoZr®)。

【1258】可經由鋅指方法永久性基因編輯TIL而靜默或抑制之基因之非限制性實例包含PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、

SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11及BCOR。

【1259】可經由鋅指方法永久性基因編輯TIL而增強之基因之非限制性實例包含CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15及IL-21。

【1260】藉由鋅指方法來改變目標基因序列之表現且可根據本發明之實施例使用之系統、方法及組成物之實例描述於以下中：美國專利第6,534,261號、第6,607,882號、第6,746,838號、第6,794,136號、第6,824,978號、第6,866,997號、第6,933,113號、第6,979,539號、第7,013,219號、第7,030,215號、第7,220,719號、第7,241,573號、第7,241,574號、第7,585,849號、第7,595,376號、第6,903,185號及第6,479,626號，其以引用之方式併入本文中。

【1261】藉由鋅指方法來改變目標基因序列之表現且可根據本發明之實施例使用之系統、方法及組成物之其他實例描述於Beane等人，《分子療法》，**2015**, 23 1380-1390中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1262】在一些實施例中，TIL視情況經基因工程改造以包含另外官能性，該等官能性包含但不限於高親和力T細胞受體(T cell receptor；TCR)，例如靶向腫瘤相關抗

原(MAGE-1、HER2或NY-ESO-1)處之TCR，或與腫瘤相關細胞表面分子(例如間皮素)或譜系限制細胞表面分子(例如CD19)結合的嵌合抗原受體(chimeric antigen receptor；CAR)。在某些實施例中，方法包括基因工程改造TIL群體以包含高親和力T細胞受體(TCR)，例如靶向腫瘤相關抗原(諸如MAGE-1、HER2或NY-ESO-1)處之TCR，或與腫瘤相關細胞表面分子(例如間皮素)或譜系限制細胞表面分子(例如CD19)結合的嵌合抗原受體(CAR)。適當地，TIL群體可為如本文所描述之第一群體、第二群體及/或第三群體。

K. 用於TIL製造之密閉系統

【1263】本發明提供在TIL培養過程期間使用密閉系統。此類密閉系統允許預防及/或減少微生物污染、允許使用較少培養瓶且允許成本降低。在一些實施例中，密閉系統使用兩個容器。

【1264】此類密閉系統為本領域中熟知的且可見於例如http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm及https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm處。

【1265】無菌連接裝置(Sterile connecting device；STCD)在兩件相容性管之間產生無菌熔接部分(weld)。此程序允許無菌連接多個容器及管直徑。在一些實施例中，密閉系統包含魯爾鎖(luer lock)及熱封系統，如例如實例

12中所描述。在一些實施例中，密閉系統係在無菌條件下經由注射器進入以維持系統之無菌性及密閉性質。在一些實施例中，採用如實例12中所描述之密閉系統。在一些實施例中，根據實例12「最終調配及填充」部分中所描述之方法，將TIL調配至最終產物調配容器中。

【1266】在一些實施例中，自獲得腫瘤碎片之時間至準備向患者投予TIL或冷凍保存為止，密閉系統使用一個容器。在一些實施例中，當使用兩個容器時，第一容器為密閉G容器，且在不打開第一密閉G容器之情況下離心TIL群體且將其轉移至輸注袋。在一些實施例中，當使用兩個容器時，輸注袋為含有HypoThermosol之輸注袋。密閉系統或密閉TIL細胞培養系統之特徵在於，一旦已添加腫瘤樣本及/或腫瘤碎片，則系統自外部緊密密封以形成密閉環境，不受細菌、真菌及/或任何其他微生物污染入侵。

【1267】在一些實施例中，微生物污染減少介於約5%與約100%之間。在一些實施例中，微生物污染減少介於約5%與約95%之間。在一些實施例中，微生物污染減少介於約5%與約90%之間。在一些實施例中，微生物污染減少介於約10%與約90%之間。在一些實施例中，微生物污染減少介於約15%與約85%之間。在一些實施例中，微生物污染減少為約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%或約100%。

【1268】密閉系統允許TIL在不存在微生物污染下及/或在微生物污染顯著減少下生長。

【1269】此外，TIL細胞培養環境之pH、二氧化碳分壓及氧氣分壓各自隨細胞培養而變化。因此，即使適合於細胞培養之培養基經循環，但密閉環境仍需要不斷地維持為TIL增殖之最佳環境。為了此目的，合乎需要的是，藉助於感測器監測密閉環境之培養液內之pH、二氧化碳分壓及氧氣分壓之物理因素，其訊號用於控制安設在培養環境之入口處的氣體交換器，及根據培養液中之變化實時調整密閉環境之氣體分壓以便最佳化細胞培養環境。在一些實施例中，本發明提供密閉細胞培養系統，其在至密閉環境之入口處併入配備有量測密閉環境之pH、二氧化碳分壓及氧氣分壓之監測裝置的氣體交換器，且藉由基於來自監測裝置之訊號自動調整氣體濃度來最佳化細胞培養環境。

【1270】在一些實施例中，連續地或間歇地控制密閉環境內之壓力。即，密閉環境中之壓力可藉助於例如壓力維持裝置來改變，從而確保空間在正壓力狀態下適合於TIL生長或促進在負壓力狀態下滲出流體且因此促進細胞增殖。此外，藉由間歇性地施加負壓力，有可能藉助於暫時性縮小密閉環境之容積而均勻且有效地置換密閉環境中之循環液體。

【1271】在一些實施例中，可替換或添加TIL增殖之最佳培養物組分，且可添加包含諸如IL-2及/或OKT3以及組合之因子。

L. 視情況選用之TIL之冷凍保存

【1272】主體TIL群體(例如第二TIL群體)或擴增TIL群體(例如第三TIL群體)可視情況進行冷凍保存。在一些實施例中，冷凍保存發生於治療性TIL群體。在一些實施例中，冷凍保存發生於在第二擴增後收集之TIL。在一些實施例中，冷凍保存發生於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)之例示性步驟F中之TIL。在一些實施例中，TIL係冷凍保存於輸注袋中。在一些實施例中，TIL係在置於輸注袋中之前冷凍保存。在一些實施例中，冷凍保存TIL且不將其置於輸注袋中。在一些實施例中，使用冷凍保存培養基進行冷凍保存。在一些實施例中，冷凍保存培養基含有二甲基亞碸(DMSO)。此一般藉由將TIL群體放置於冷凍溶液(例如85%補體去活化AB血清及15%二甲基亞碸(DMSO))中來完成。將溶液中之細胞置放於低溫小瓶中且儲存在-80℃ 24小時，其中視情況轉移至氣態氮冷凍器用於冷凍保存。參見Sadeghi等人，《腫瘤學報(Acta Oncologica)》 2013, 52, 978-986。

【1273】在適當時，自冷凍器取出細胞且在37℃水浴中解凍直至大約4/5之溶液解凍。一般將細胞再懸浮於完全培養基中且視情況洗滌一次或多次。在一些實施例中，可計算解凍的TIL且如本領域中已知的來評定存活性。

【1274】在一些實施例中，TIL群體係使用CS10冷凍保存培養基(CryoStor 10，BioLife Solutions)冷凍保存。在

一些實施例中，TIL群體係使用含有二甲基亞碸(DMSO)之冷凍保存培養基冷凍保存。在一些實施例中，TIL群體係使用1:1(vol:vol)比率之CS10與細胞培養基冷凍保存。在一些實施例中，TIL群體係使用約1:1(vol:vol)比率之CS10與細胞培養基(進一步包括另外IL-2)冷凍保存。

【1275】如上文所論述且如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中提供之步驟A至E中所例示，冷凍保存可發生在TIL擴增過程中的多個點。在一些實施例中，在第二擴增後之擴增TIL群體(如例如根據圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)之步驟D所提供)可進行冷凍保存。冷凍保存一般可藉由將TIL群體置放於冷凍溶液(例如85%補體去活化AB血清及15%二甲基亞碸(DMSO))中來完成。將溶液中之細胞置放於低溫小瓶中且儲存在-80℃ 24小時，其中視情況轉移至氣態氮冷凍器用於冷凍保存。參見Sadeghi等人，《腫瘤學報》 **2013**, *52*, 978-986。在一些實施例中，TIL係冷凍保存於5% DMSO中。在一些實施例中，TIL係冷凍保存於細胞培養基加5% DMSO中。在一些實施例中，TIL係根據實例D中提供之方法冷凍保存。

【1276】在適當時，自冷凍器取出細胞且在37℃水浴中解凍直至大約4/5之溶液解凍。一般將細胞再懸浮於完全培養基中且視情況洗滌一次或多次。在一些實施例中，可計算解凍的TIL且如本領域中已知的來評定存活性。

【1277】在一些情況下，步驟B TIL群體可使用下文論

述之方案立即冷凍保存。替代地，主體TIL群體可進行步驟C及步驟D且接著在步驟D後冷凍保存。類似地，在其中遺傳修飾TIL將用於療法中之情況下，步驟B或步驟D TIL群體可進行遺傳修飾以用於合適的治療。

M. 擴增TIL之表型特徵

【1278】在一些實施例中，分析TIL在擴增後之多種表型標誌之表現，該等標誌包含本文及實例中所描述之彼等者。在一些實施例中，檢查一種或多種表型標誌之表現。在一些實施例中，在步驟B中之第一擴增後分析TIL之表型特徵。在一些實施例中，在步驟C中之轉變期間分析TIL之表型特徵。在一些實施例中，在根據步驟C之轉變期間及在冷凍保存後分析TIL之表型特徵。在一些實施例中，在根據步驟D之第二擴增後分析TIL之表型特徵。在一些實施例中，在根據步驟D之兩次或更多次擴增後分析TIL之表型特徵。

【1279】在一些實施例中，標誌係選自由CD8及CD28組成之群組。在一些實施例中，檢查CD8之表現。在一些實施例中，檢查CD28之表現。在一些實施例中，相較於其他過程(例如如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所提供之Gen 3過程)，相較於如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所提供之2A過程，根據本發明過程產生之TIL上之CD8及/或CD28的表現更高。在一些實施例中，相

較於其他過程(例如如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所提供之Gen 3過程)，相較於如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所提供之2A過程，根據本發明過程產生之TIL上之CD8的表現更高。在一些實施例中，相較於其他過程(例如如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所提供之Gen 3過程)，相較於如例如圖1(特別是例如圖1A)中所提供之2A過程，根據本發明過程產生之TIL上之CD28的表現更高。在一些實施例中，高CD28表現指示較年輕、更持久的TIL表型。在一些實施例中，量測一種或多種調節標誌之表現。

【1280】在一些實施例中，在用於擴增本文所描述之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法之任一步驟期間，未基於CD8及/或CD28表現選擇第一TIL群體、第二TIL群體、第三TIL群體或所收集TIL群體。

【1281】在一些實施例中，相較於其他過程(例如如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中提供之Gen 3過程)，相較於如例如圖1(特別是例如圖1A)中提供之2A過程，關於根據本發明過程產生之TIL之中央記憶細胞的百分比更高。在一些實施例中，中央記憶細胞之記憶標誌係選自由CCR7及CD62L組成之群組。

【1282】在一些實施例中，CD4+及/或CD8+ TIL記憶子集可分為不同記憶子集。在一些實施例中，CD4+及/或

CD8+ TIL包括初始(CD45RA+CD62L+)TIL。在一些實施例中，CD4+及/或CD8+ TIL包括中樞記憶(central memory，CM；CD45RA-CD62L+)TIL。在一些實施例中，CD4+及/或CD8+ TIL包括效應記憶(effector memory，EM；CD45RA-CD62L-)TIL。在一些實施例中，CD4+及/或CD8+ TIL包括RA+效應記憶/效應(TEMRA/TEFF；CD45RA+CD62L+)TIL。在一些實施例中，與CD4+群體相比，CD8+的百分比更高。在一些實施例中，TIL表現一種或多種選自由以下組成之群組之標誌：顆粒酶B、穿孔蛋白及顆粒溶解素。在一些實施例中，TIL表現顆粒酶B。在一些實施例中，TIL表現穿孔蛋白。在一些實施例中，TIL表現顆粒溶解素。

【1283】在一些實施例中，亦可使用細胞介素釋放分析，評估再刺激的TIL之細胞介素釋放。在一些實施例中，可評估TIL之干擾素-γ(IFN-γ)分泌。在一些實施例中，IFN-γ分泌係藉由ELISA分析量測。在一些實施例中，IFN-γ分泌係藉由ELISA分析在快速第二擴增步驟之後、在如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)所提供之步驟D之後量測。在一些實施例中，TIL健康係藉由IFN-γ(IFN-γ)分泌量測。在一些實施例中，IFN-γ分泌指示活性TIL。在一些實施例中，採用針對IFN-γ產生之效力分析。IFN-γ產生為細胞毒性潛力的另一種量度。IFN-γ產生可藉由測定經抗CD3、CD28及CD137/4-1BB之抗體刺激之TIL培養基中之細胞介素IFN-γ

之含量量測。來自此等受刺激TIL之培養基中之IFN-γ含量可藉由量測IFN-γ釋放測定。在一些實施例中，例如如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中提供之Gen 3過程中步驟D TIL相較於例如如圖1(特別是例如圖1A)中提供之2A過程中步驟D之IFN-γ產生增加，指示步驟D TIL之細胞毒性潛力增加。在一些實施例中，IFN-γ分泌增加一倍、兩倍、三倍、四倍或五倍或更多。在一些實施例中，IFN-γ分泌增加一倍。在一些實施例中，IFN-γ分泌增加兩倍。在一些實施例中，IFN-γ之分泌增加三倍。在一些實施例中，IFN-γ分泌增加四倍。在一些實施例中，IFN-γ分泌增加五倍。在一些實施例中，使用Quantikine ELISA套組量測IFN-γ。在一些實施例中，量測離體TIL中之IFN-γ。在一些實施例中，量測離體TIL中之IFN-γ，包含藉由本發明之方法(包含例如圖1B方法)產生之TIL。

【1284】在一些實施例中，能夠分泌至少一倍、兩倍、三倍、四倍或五倍或更多IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少多於一倍之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少多於兩倍之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在

一些實施例中，能夠分泌至少多於三倍之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少多於四倍之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少多於五倍之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。

【1285】在一些實施例中，能夠分泌至少100 pg/ml至約1000 pg/mL或更多之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，在能夠分泌至少200 pg/ml、至少250 pg/ml、至少300 pg/ml、至少350 pg/ml、至少400 pg/ml、至少450 pg/ml、至少500 pg/ml、至少550 pg/ml、至少600 pg/ml、至少650 pg/ml、至少700 pg/ml、至少750 pg/ml、至少800 pg/ml、至少850 pg/ml、至少900 pg/ml、至少950 pg/ml或至少1000 pg/mL或更多IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增

方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少300 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少400 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少500 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少600 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少700 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少800 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少900 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少1000 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少2000 pg/ml IFN-γ之

TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少3000 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少4000 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少5000 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少6000 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少7000 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少8000 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少9000 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少10,000 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分

泌至少15,000 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少20,000 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少25,000 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少30,000 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少35,000 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少40,000 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少45,000 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少50,000 pg/ml IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。

【1286】在一些實施例中，能夠分泌至少100 pg/ml/5e5個細胞至約1000 pg/ml/5e5個細胞或更多IFN-γ之

TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/ml/5e5個細胞、至少250 pg/ml/5e5個細胞、至少300 pg/ml/5e5個細胞、至少350 pg/ml/5e5個細胞、至少400 pg/ml/5e5個細胞、至少450 pg/ml/5e5個細胞、至少500 pg/ml/5e5個細胞、至少550 pg/ml/5e5個細胞、至少600 pg/ml/5e5個細胞、至少650 pg/ml/5e5個細胞、至少700 pg/ml/5e5個細胞、至少750 pg/ml/5e5個細胞、至少800 pg/ml/5e5個細胞、至少850 pg/ml/5e5個細胞、至少900 pg/ml/5e5個細胞、至少950 pg/ml/5e5個細胞或至少1000 pg/ml/5e5個細胞或更多IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少300 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少400 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖

1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少500 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少600 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少700 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少800 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少900 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少1000 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少2000 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少3000 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施

例中，能夠分泌至少4000 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少5000 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少6000 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少7000 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少8000 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少9000 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少10,000 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少15,000 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少

20,000 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少25,000 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少30,000 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少35,000 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少40,000 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少45,000 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少50,000 pg/ml/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。

【1287】在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL至300000 pg/10^6個TIL或更多顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/

或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL、高於5000 pg/10^6個TIL、高於7000 pg/10^6個TIL、高於9000 pg/10^6個TIL、高於11000 pg/10^6個TIL、高於13000 pg/10^6個TIL、高於15000 pg/10^6個TIL、高於17000 pg/10^6個TIL、高於19000 pg/10^6個TIL、高於20000 pg/10^6個TIL、高於40000 pg/10^6個TIL、高於60000 pg/10^6個TIL、高於80000 pg/10^6個TIL、高於100000 pg/10^6個TIL、高於120000 pg/10^6個TIL、高於140000 pg/10^6個TIL、高於160000 pg/10^6個TIL、高於180000 pg/10^6個TIL、高於200000 pg/10^6個TIL、高於220000 pg/10^6個TIL、高於240000 pg/10^6個TIL、高於260000 pg/10^6個TIL、高於280000 pg/10^6個TIL、高於300000 pg/10^6個TIL或更多顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於5000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於7000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於9000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由

本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於11000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於13000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於15000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於17000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於19000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於20000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於40000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於60000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。

在一些實施例中，展現分泌高於80000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於100000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於120000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於140000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於160000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於180000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於200000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於220000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於240000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本

發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於260000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於280000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於300000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL至300000 pg/10^6個TIL或更多顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL、高於5000 pg/10^6個TIL、高於7000 pg/10^6個TIL、高於9000 pg/10^6個TIL、高於11000 pg/10^6個TIL、高於13000 pg/10^6個TIL、高於15000 pg/10^6個TIL、高於17000 pg/10^6個TIL、高於19000 pg/10^6個TIL、高於20000 pg/10^6個TIL、高於40000 pg/10^6個TIL、高於60000 pg/10^6個TIL、高於80000 pg/10^6個TIL、高於100000 pg/10^6個TIL、高於120000 pg/10^6個TIL、高於140000 pg/10^6個TIL、高於160000 pg/10^6個TIL、高於180000 pg/10^6個TIL、高於200000 pg/10^6個TIL、高於220000 pg/10^6個TIL、高於240000 pg/10^6個TIL、高於260000 pg/10^6個

TIL、高於280000 pg/10^6個TIL、高於300000 pg/10^6個TIL或更多顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於5000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於7000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於9000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於11000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於13000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於15000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於17000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由

本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於19000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於20000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於40000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於60000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於80000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於100000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於120000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於140000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生

之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於160000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於180000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於200000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於220000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於240000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於260000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於280000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於300000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。

【1288】在一些實施例中，展現分泌高於1000 pg/ml至

300000 pg/ml或更多之顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於1000 pg/ml、高於2000 pg/ml、高於3000 pg/ml、高於4000 pg/ml、高於5000 pg/ml、高於6000 pg/ml，更大之TIL。大於7000 pg/ml、高於8000 pg/ml、高於9000 pg/ml、高於10000 pg/ml、高於20000 pg/ml、高於30000 pg/ml、高於40000 pg/ml、高於50000 pg/ml、高於60000 pg/ml、高於70000 pg/ml、高於80000 pg/ml、高於90000 pg/ml、高於100000 pg/ml或更多顆粒酶B之TIL為藉由擴增產生之TIL本發明之方法，包括例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於1000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於2000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於3000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於4000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於5000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或

圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於6000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於7000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於8000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於9000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於10000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於20000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於30000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於40000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於50000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些

實施例中，展現高於60000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於70000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於80000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於90000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於100000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於120000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於140000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於160000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於180000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實

施例中，展現分泌高於200000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於220000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於240000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於260000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於280000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於300000 pg/ml顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。

【1289】在一些實施例中，本發明之擴增方法產生展現相較於非擴增TIL群體增加的活體外顆粒酶B分泌的擴增TIL群體，包括例如如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G中提供的TIL。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少一倍至五十倍或更多。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，IFN-γ分泌增加至少一倍、至少兩倍、至少三

倍、至少四倍、至少五倍、至少六倍、至少七倍、至少八倍、至少九倍、至少十倍、至少二十倍、至少三十倍、至少四十倍、至少五十倍或更多。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少一倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少兩倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少三倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少四倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少五倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少六倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少七倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少八倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少九倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少十倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少二十倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少三十倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體

之顆粒酶B分泌增加至少四十倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少五十倍。

【1290】在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌分泌低至少一倍、兩倍、三倍、四倍或五倍或更多含量之TNF-α(亦即，TNF-alpha)之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌分泌低至少一倍含量之TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌分泌低至少兩倍含量之TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌分泌低至少三倍含量之TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌分泌低至少四倍含量之TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌分泌低至少五倍含量之TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。

【1291】在一些實施例中，能夠分泌至少200

pg/ml/5e5個細胞至約10,000 pg/ml/5e5個細胞或更多TNF-α(亦即，TNF-alpha)之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少500 pg/ml/5e5個細胞至約10,000 pg/ml/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少1000 pg/ml/5e5個細胞至約10,000 pg/ml/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少2000 pg/ml/5e5個細胞至約10,000 pg/ml/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少3000 pg/ml/5e5個細胞至約10,000 pg/ml/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少4000 pg/ml/5e5個細胞至約10,000 pg/ml/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少5000 pg/ml/5e5個細胞至約10,000 pg/ml/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖

1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少6000 pg/ml/5e5個細胞至約10,000 pg/ml/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少7000 pg/ml/5e5個細胞至約10,000 pg/ml/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少8000 pg/ml/5e5個細胞至約10,000 pg/ml/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少9000 pg/ml/5e5個細胞至約10,000 pg/ml/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL。

【1292】在一些實施例中，量測IFN-γ及顆粒酶B含量以判定藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL的表型特徵。在一些實施例中，量測IFN-γ及TNF-α含量以判定藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL的表型特徵。在一些實施例中，量測顆粒酶B及TNF-α含量以判定藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL的表型特徵。在一些實施例中，量測

IFN-γ、顆粒酶B及TNF-α含量以判定藉由本發明之擴增方法(包含例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G方法)產生之TIL的表型特徵。

【1293】T及B淋巴球之多樣抗原受體係藉由有限但大量的基因區段之體細胞重組產生。此等基因區段：V(可變區)、D(多樣區)、J(聯結區)及C(恆定區)決定免疫球蛋白及T細胞受體(TCR)之結合特異性及下游應用。本發明提供一種用於產生展現且增加T細胞貯庫多樣性之TIL的方法。在一些實施例中，藉由本發明方法獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，相較於新鮮收集的TIL及/或使用除本文中提供之方法以外之其他方法製備的TIL，藉由本發明方法獲得的TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性，該等其他方法包含例如除圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中實施之方法以外的方法。在一些實施例中，相較於新鮮收集的TIL及/或使用如圖1(特別是例如圖1A)中例示之稱為過程2A之方法製備的TIL，藉由本發明方法獲得的TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，在第一擴增中獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，增加多樣性係增加免疫球蛋白多樣性及/或T細胞受體多樣性。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白重鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白輕鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於T細胞受體中。在一些實施例中，多樣性存在於選

自由α、β、γ及δ受體組成之群組的T細胞受體中之一者中。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α及/或β之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)β之表現增加。在一些實施例中，TCRαβ(亦即TCRα/β)之表現增加。

【1294】在一些實施例中，TIL之活化及耗竭可藉由檢查一種或多種標誌判定。在一些實施例中，活化及耗竭可使用多色流動式細胞測量術判定。在一些實施例中，標誌之活化及耗竭包含但不限於一種或多種選自由以下組成之群組之標誌：CD3、PD-1、2B4/CD244、CD8、CD25、BTLA、KLRG、TIM-3、CD194/CCR4、CD4、TIGIT、CD183、CD69、CD95、CD127、CD103及/或LAG-3)。在一些實施例中，標誌之活化及耗竭包含但不限於一種或多種選自由以下組成之群組之標誌：BTLA、CTLA-4、ICOS、Ki67、LAG-3、PD-1、TIGIT及/或TIM-3。在一些實施例中，標誌之活化及耗竭包含但不限於一種或多種選自由以下組成之群組之標誌：BTLA、CTLA-4、ICOS、Ki67、LAG-3、CD103+/ CD69+、CD103+/CD69-、PD-1、TIGIT及/或TIM-3。在一些實施例中，可判定及/或分析T細胞標誌(包含活化及耗竭標誌)以檢查T細胞活化、抑制或功能。在一些實施例中，T細胞標誌可包含但不限於一種或多種選自由以下組成之群組之標誌：TIGIT、CD3、FoxP3、Tim-3、PD-1、CD103、CTLA-4、LAG-3、BTLA-4、ICOS、Ki67、CD8、CD25、CD45、CD4及/或CD59。

【1295】在一些實施例中，表型特徵係在冷凍保存之後檢查。

N. 另外過程實施例

【1296】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包括：(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；(b)藉由在包括IL-2及OKT-3之第一細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約1天至8天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與包括IL-2、OKT-3及外源性抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增進行約1天至10天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體。

【1297】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包括：(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；(b)藉由在第一細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，以產生第二TIL群體，該第一細胞培養基包括IL-2以及自培養於補充有IL-2及OKT-3之培養基中的抗原呈現細

胞(APC)培養物獲得的培養物上清液，其中該第一細胞培養基未補充有APC，其中該初始第一擴增進行約1天至8天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與包括IL-2、OKT-3及外源性抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增進行約1天至10天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體。

【1298】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包括：(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；(b)藉由在包括IL-2、OKT-3及外源性抗原呈現細胞(APC)之第一細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約1天至8天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與第二細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，該第二細胞培養基包括IL-2以及自培養於補充有IL-2及OKT-3之細胞培養基中的APC培養物獲得的培養物上清液，其中該第二細胞培養基未補充有APC，其中該快速第二擴增進行約1天至10天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體。

【1299】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包括：(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；(b)藉由在第一細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，以產生第二TIL群體，該第一細胞培養基包括IL-2以及自培養於補充有IL-2及OKT-3之培養基中的第一抗原呈現細胞(APC)培養物獲得的第一培養物上清液，其中該第一細胞培養基未補充有APC，其中該初始第一擴增進行約1天至8天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與第二細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，該第二細胞培養基包括IL-2以及自培養於補充有IL-2及OKT-3之細胞培養基中的第二APC培養物獲得的第二培養物上清液，其中該第二細胞培養基未補充有APC，其中該快速第二擴增進行約1天至10天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體。

【1300】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包括：(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；(b)藉由在包括IL-2及OKT-3之第一細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該初始第

一擴增進行約1天至8天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與包括IL-2、OKT-3及外源性抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增進行約1天至8天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體。

【1301】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包括：(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；(b)藉由在第一細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，以產生第二TIL群體，該第一細胞培養基包含IL-2以及自培養於補充有IL-2及OKT-3之細胞培養基中的抗原呈現細胞(APC)培養物獲得的培養物上清液，其中該第一細胞培養基未補充有APC，其中該初始第一擴增進行約1天至8天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與包括IL-2、OKT-3及外源性抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增進行約1天至8天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體。

【1302】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫

瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包括：(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；(b)藉由在包括外源性抗原呈現細胞(APC)、IL-2及OKT-3之第一細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約1天至8天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與第二細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，該第二細胞培養基包括IL-2以及自培養於補充有IL-2及OKT-3之培養基中的APC培養物獲得的培養物上清液，其中該第二細胞培養基未補充有APC，其中該快速第二擴增進行約1天至8天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體。

【1303】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包括：(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；(b)藉由在第一細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，以產生第二TIL群體，該第一細胞培養基包括IL-2以及自培養於補充有IL-2及OKT-3之細胞培養基中的第一抗原呈現細胞(APC)培養物獲得的第一培養物上清液，其中該第一細胞培養基未補充有APC，其中該初始第一擴增進行約1天至8天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數

目上大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與第二細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，該第二細胞培養基包括IL-2以及自培養於補充有IL-2及OKT-3之細胞培養基中的第二APC培養物獲得的第二培養物上清液，其中該第二細胞培養基未補充有APC，其中該快速第二擴增進行約1天至8天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體。

【1304】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包括：(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；(b)藉由在包括IL-2及OKT-3之第一細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約1天至7天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與包括IL-2、OKT-3及外源性抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增進行約1天至11天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體。

【1305】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包括：(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而

獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；(b)藉由在包括IL-2及OKT-3之第一細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約7天或8天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與包括IL-2、OKT-3及外源性抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增進行約8天至10天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體。

【1306】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包括：(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；(b)藉由在第一細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，以產生第二TIL群體，該第一細胞培養基包含IL-2以及自培養於補充有IL-2及OKT-3之細胞培養基中的抗原呈現細胞(APC)培養物獲得的細胞培養物上清液，其中該第一細胞培養基未補充有APC，其中該初始第一擴增進行約7天或8天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與包括IL-2、OKT-3及外源性抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增進行約8天至10天以獲得第三TIL群體，其中第

三TIL群體為治療性TIL群體；及(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體。

【1307】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包括：(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；(b)藉由在補充有抗原呈現細胞(APC)、IL-2及OKT-3之第一細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約7天或8天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與第二細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，該第二細胞培養基包括IL-2以及自培養於補充有IL-2及OKT-3之培養基中的APC培養物獲得的培養物上清液，其中該第二細胞培養基未補充有APC，其中該快速第二擴增進行約8天至10天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體。

【1308】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包括：(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；(b)藉由在第一細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，以產生第二TIL群體，該第一細胞培養基補充有IL-2以及自培養於補充有IL-2及OKT-3之細胞培養基中的第一

抗原呈現細胞(APC)培養物獲得的第一培養物上清液，其中該第一細胞培養基未補充有APC，其中該初始第一擴增進行約7天或8天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與第二細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，該第二細胞培養基包括IL-2以及自培養於補充有IL-2及OKT-3之培養基中的第二APC培養物獲得的第二培養物上清液，其中該第二細胞培養基未補充有APC，其中該快速第二擴增進行約8天至10天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體。

【1309】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約2天至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自小規模培養之第二TIL群體轉移至比第一容器大之第二容器(例如G-REX 500MCS容器)之中，其中在第二容器中，來自小規模培養的第二TIL群體係在較大規模培養中培養約4天至8天之時段。在一些實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX 100MCS容器或G-REX 10M容器)中之第一小規模培養中培養第二TIL群體約3天至4天之時段進行快速第二擴增片；

且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個與第一容器大小相等之第二容器之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自第一小規模培養之第二TIL群體部分係在第二小規模培養中培養約4天至8天之時段。在一些實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX 10M容器或G-REX 100M容器)中之第一小規模培養中培養第二TIL群體約3天至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至5個與第一容器大小相等之第二容器之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自第一小規模培養之第二TIL群體部分係在第二小規模培養中培養約6天至7天之時段。在一些實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，自小規模培養轉移至此類第二容器之第二TIL群體部分係在較大規模培養中培養約4天至8天之時

段。在一些實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，自小規模培養轉移至此類第二容器之第二TIL群體部分係在較大規模培養中培養約5天至7天之時段。

【1310】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由使第一TIL群體與進一步包括外源性抗原呈現細胞(APC)之第一培養基接觸來進行，其中步驟(c)中第二培養基中之APC數目大於步驟(b)中第一培養基中之APC數目。

【1311】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，第二培養基補充有另外的外源性APC。

【1312】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約1.1:1至剛好或大約20:1的範圍內。

【1313】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中

添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約1.1:1至剛好或大約10:1的範圍內。

【1314】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約1.1:1至剛好或大約9:1的範圍內。

【1315】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約1.1:1至剛好或大約8:1的範圍內。

【1316】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約1.1:1至剛好或大約7:1的範圍內。

【1317】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約1.1:1至剛好或大約6:1的範圍內。

【1318】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約1.1:1至剛好或大約5:1的範圍內。

【1319】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中

添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約1.1:1至剛好或大約4:1的範圍內。

【1320】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約1.1:1至剛好或大約3:1的範圍內。

【1321】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.9:1的範圍內。

【1322】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.8:1的範圍內。

【1323】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.7:1的範圍內。

【1324】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.6:1的範圍內。

【1325】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中

添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.5:1的範圍內。

【1326】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.4:1的範圍內。

【1327】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.3:1的範圍內。

【1328】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.2:1的範圍內。

【1329】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.1:1的範圍內。

【1330】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約1.1:1至剛好或大約2:1的範圍內。

【1331】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中

添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約2:1至剛好或大約10:1的範圍內。

【1332】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約2:1至剛好或大約5:1的範圍內。

【1333】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約2:1至剛好或大約4:1的範圍內。

【1334】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約2:1至剛好或大約3:1的範圍內。

【1335】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約2:1至剛好或大約2.9:1的範圍內。

【1336】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約2:1至剛好或大約2.8:1的範圍內。

【1337】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中

添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約2:1至剛好或大約2.7:1的範圍內。

【1338】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約2:1至剛好或大約2.6:1的範圍內。

【1339】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約2:1至剛好或大約2.5:1的範圍內。

【1340】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約2:1至剛好或大約2.4:1的範圍內。

【1341】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約2:1至剛好或大約2.3:1的範圍內。

【1342】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約2:1至剛好或大約2.2:1的範圍內。

【1343】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中

添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率在剛好或大約2:1至剛好或大約2.1:1的範圍內。

【1344】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率為剛好或大約2:1。

【1345】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率為剛好或大約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或5:1。

【1346】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中初始第一擴增中添加之APC數目為剛好或大約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或3.5×10^8個APC，且其中快速第二擴增中添加之APC數目為剛好或大約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或1×10^9個APC。

【1347】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中初始第一擴增中添加之APC數目在剛好或大約1×10^8個APC至剛好或大約3.5×10^8個APC的範圍內，且其中快速第二擴增中添加之APC數目在剛好或大約3.5×10^8個APC至剛好或大約1×10^9個APC的範圍內。

【1348】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中初始第一擴增中添加之APC數目在剛好或大約1.5×10^8個APC至剛好或大約3×10^8個APC的範圍內，且其中快速第二擴增中添加之APC數目在剛好或大約4×10^8個APC至剛好或大約7.5×10^8個APC的範圍內。

【1349】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中初始第一擴增中

添加之APC數目在剛好或大約2×10^8個APC至剛好或大約2.5×10^8個APC的範圍內，且其中快速第二擴增中添加之APC數目在剛好或大約4.5×10^8個APC至剛好或大約5.5×10^8個APC的範圍內。

【1350】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中剛好或大約2.5×10^8個APC係添加至初始第一擴增，且剛好或大約5×10^8個APC係添加至快速第二擴增。

【1351】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中初級第一擴增中添加之抗原呈現細胞為周邊血液單核細胞(PBMC)。

【1352】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之抗原呈現細胞為周邊血液單核細胞(PBMC)。

【1353】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在初始第一擴增中，第一細胞培養基包括自周邊血液單核細胞(PBMC)培養物獲得的培養物上清液。

【1354】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中，第二細胞培養基包括自周邊血液單核細胞(PBMC)培養物獲得的培養物上清液。

【1355】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在初始第一擴增

中，第一細胞培養基包括自第一周邊血液單核細胞(PBMC)培養物獲得的第一培養物上清液，且在快速第二擴增中，第二細胞培養基包括自第二PBMC培養物獲得的第二培養物上清液。

【1356】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在初始第一擴增中，第一細胞培養基包括自周邊血液單核細胞(PBMC)培養物獲得的培養物上清液，其中該培養物上清液係在培養物中之細胞生長速率開始下降之後獲得。在一些實施例中，該培養物上清液係在起始PBMC培養後3天或4天獲得。在一些實施例中，該培養物上清液係在培養物中之細胞生長速率與培養物中之細胞峰值生長速率相比下降至少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多之後獲得。在一些實施例中，該培養物上清液係在培養PMBC之細胞培養基用過或耗盡之後獲得。

【1357】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中，第二細胞培養基包括自周邊血液單核細胞(PBMC)培養物獲得的培養物上清液。在一些實施例中，該培養物上清液係在起始PBMC培養後3天或4天獲得。在一些實施例中，該培養物上清液係在培養物中之細胞生長速率與培養物中之細胞峰值生長速率相比下降至少約5%、10%、

15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多之後獲得。在一些實施例中，該培養物上清液係在培養PMBC之細胞培養基用過或耗盡之後獲得。

【1358】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在初始第一擴增中，第一細胞培養基包括自第一周邊血液單核細胞(PBMC)培養物獲得的第一培養物上清液，且在快速第二擴增中，第二細胞培養基包括自第二PBMC培養物獲得的第二培養物上清液。在一些實施例中，該第一培養物上清液係在起始第一PBMC培養後3天或4天獲得。在一些實施例中，該第二培養物上清液係在起始第二PBMC培養後3天或4天獲得。在一些實施例中，該第一培養物上清液係在起始第一PBMC培養後3天或4天獲得，且該第二培養物上清液係在起始第二PBMC培養後3天或4天獲得。在一些實施例中，該第一培養物上清液係在第一PBMC培養物中之細胞生長速率與第一PBMC培養物中之細胞峰值生長速率相比下降至少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多之後獲得。在一些實施例中，該第二培養物上清液係在第二PBMC培養物中之細胞生長速率與第二PBMC培養物中之細胞峰值生長速率相比下降至少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、

85%、90%、95%或更多之後獲得。在一些實施例中，該第一培養物上清液係在第一PBMC培養物中之細胞生長速率與第一PBMC培養物中之細胞峰值生長速率相比下降至少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多之後獲得，且該第二培養物上清液係在第二PBMC培養物中之細胞生長速率與第二PBMC培養物中之細胞峰值生長速率相比下降至少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多之後獲得。在一些實施例中，該第一培養物上清液係在培養第一PMBC培養物之細胞培養基用過或耗盡之後獲得。在一些實施例中，該第二培養物上清液係在培養第二PMBC培養物之細胞培養基用過或耗盡之後獲得。在一些實施例中，該第一培養物上清液係在培養第一PMBC培養物之細胞培養基用過或耗盡之後獲得，且該第二培養物上清液係在培養第二PMBC培養物之細胞培養基用過或耗盡之後獲得。

【1359】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在初始第一擴增中，第一細胞培養基包括自以約1×10^7至約1×10^9個PBMC起始的周邊血液單核細胞(PBMC)培養物獲得的培養物上清液。在其他實施例中，第一細胞培養基包括自以約5×10^7至約5×10^8個PBMC起始的周邊血液單核細胞(PBMC)培養物獲得的培養物上清液。

【1360】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中，第二細胞培養基包括自以約1×10^7至約1×10^9個PBMC起始的周邊血液單核細胞(PBMC)培養物獲得的培養物上清液。在其他實施例中，第二細胞培養基包括自以約5×10^7至約5×10^8個PBMC起始的周邊血液單核細胞(PBMC)培養物獲得的培養物上清液。

【1361】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在初始第一擴增中，第一細胞培養基包括自以約1×10^7至約1×10^9個PBMC起始的第一周邊血液單核細胞(PBMC)培養物獲得的第一培養物上清液，且在快速第二擴增中，第二細胞培養基包括自以約1×10^7至約1×10^9個PBMC起始的第二PBMC培養物獲得的第二培養物上清液。在其他實施例中，第一細胞培養基包括自以約5×10^7至約5×10^8個PBMC起始的第一周邊血液單核細胞(PBMC)培養物獲得的第一培養物上清液，且第二細胞培養基包括自以約5×10^7至約5×10^8個PBMC起始的第二PBMC培養物獲得的第二培養物上清液。

【1362】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個腫瘤碎片係分佈至複數個分開的容器中，在各分開的容器中，第一TIL群體係在步驟(a)中獲得，第二TIL群體係在步驟(b)中獲得，且第三TIL群體係在步驟(c)中獲得，且將來自步驟(c)中複數個容器之治療性TIL群體合併以產生來自步驟(d)

之經收集的TIL群體。

【1363】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個腫瘤均勻分佈至複數個分開的容器中。

【1364】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包括至少兩個分開的容器。

【1365】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包括兩個至二十個分開的容器。

【1366】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包括兩個至十五個分開的容器。

【1367】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包括兩個至十個分開的容器。

【1368】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包括兩個至五個分開的容器。

【1369】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包括2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個分開的容器。

【1370】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中在各容器中對步驟(b)中之第一TIL群體進行初始第一擴增，在同一容器中對由此類第一TIL群體產生之第二TIL群體進行步驟(c)中的快速第二擴增。

【1371】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中分開的容器中之各者包括第一透氣表面區域。

【1372】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個腫瘤碎片分佈於單一容器中。

【1373】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中單一容器包括第一透氣表面區域。

【1374】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約一個細胞層至剛好或大約三個細胞層的平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1375】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約1.5個細胞層至剛好或大約2.5個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1376】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約2個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1377】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上：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或3個細胞層。

【1378】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3個細胞層至剛好或大約10個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1379】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約4個細胞層至剛好或大約8個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1380】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3、4、5、6、7、8、9或10個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1381】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，

APC以剛好或大約以下之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上：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或8個細胞層。

【1382】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係在包括第一透氣表面區域的第一容器中進行，且在步驟(c)中，快速第二擴增係在包括第二透氣表面區域的第二容器中進行。

【1383】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二容器比第一容器大。

【1384】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約一個細胞層至剛好或大約三個細胞層的平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1385】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約1.5個細胞層至剛好或大約2.5個細胞層

之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1386】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約2個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1387】在其他實施例中，本發明提供經修改之如適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上：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或3個細胞層。

【1388】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3個細胞層至剛好或大約10個細胞層之平均厚度層疊至第二透氣表面區域上。

【1389】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約4個細胞層至剛好或大約8個細胞層之平均厚度層疊至第二透氣表面區域上。

【1390】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3、4、5、6、7、8、9或10個細胞層之平均厚度層疊至第二透氣表面區域上。

【1391】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層疊至第二透氣表面區域上：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或8個細胞層。

【1392】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係在包括第一透氣表面區域的第一容器中進行，且在步驟(c)中，快速第二擴增係在第一容器中進行。

【1393】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約一個細胞層至剛好或大約三個細胞層的平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1394】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約1.5個細胞層至剛好或大約2.5個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1395】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，

APC以剛好或大約2個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1396】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上：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或3個細胞層。

【1397】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3個細胞層至剛好或大約10個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1398】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約4個細胞層至剛好或大約8個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1399】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3、4、5、6、7、8、9或10個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1400】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上：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或8個細胞層。

【1401】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率在剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:10的範圍內。

【1402】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率在剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:9的範圍內。

【1403】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數

的比率在剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:8的範圍內。

【1404】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率在剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:7的範圍內。

【1405】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率在剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:6的範圍內。

【1406】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率在剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:5的範圍內。

【1407】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，

初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率在剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:4的範圍內。

【1408】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率在剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:3的範圍內。

【1409】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率在剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:2的範圍內。

【1410】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中

層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率在剛好或大約1:1.2至剛好或大約1:8的範圍內。

【1411】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率在剛好或大約1:1.3至剛好或大約1:7的範圍內。

【1412】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率在剛好或大約1:1.4至剛好或大約1:6的範圍內。

【1413】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率在剛好或大約1:1.5至剛好或大約1:5的範圍內。

【1414】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率在剛好或大約1:1.6至剛好或大約1:4的範圍內。

【1415】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率在剛好或大約1:1.7至剛好或大約1:3.5的範圍內。

【1416】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率在剛好或大約1:1.8至剛好或大約1:3的範圍內。

【1417】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之

APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率在剛好或大約1:1.9至剛好或大約1:2.5的範圍內。

【1418】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率在剛好或大約1:2的範圍內。

【1419】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之第一細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約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或1:10。

【1420】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體中之TIL數目與第一TIL群體中之TIL數目的比率為剛好或大約1.5:1至剛好或大約100:1。

【1421】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體中之TIL數目與第一TIL群體中之TIL數目的比率為剛好或大約50:1。

【1422】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體中之TIL數目與第一TIL群體中之TIL數目的比率為剛好或大約25:1。

【1423】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體中之TIL數目與第一TIL群體中之TIL數目的比率為剛好或大約20:1。

【1424】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體中之TIL數目與第一TIL群體中之TIL數目的比率為剛好或大約10:1。

【1425】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體在數目上比第一TIL群體高至少剛好或大約50倍。

【1426】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體在數目上比第一TIL群體高至少剛好或大約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或50倍。

【1427】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中之第二時段開始後剛好或大約2天或剛好或大約3天，對細胞培養基補充另外的IL-2。

【1428】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，進一步包括使用冷凍保存過程冷凍保存步驟(d)中之經收集的TIL群體的步驟。

【1429】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，包括在步驟(d)後進行將來自步驟(d)之經收集的TIL群體轉移至視情況含有HypoThermosol之輸注袋的另外步驟(e)。

【1430】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，包括使用冷凍保存過程冷凍保存包括步驟(e)中之經收集之TIL群體的輸注袋的步驟。

【1431】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中使用1:1比率之經收集之TIL群體與冷凍保存培養基來進行冷凍保存過程。

【1432】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中抗原呈現細胞為周邊血液單核細胞(PBMC)。

【1433】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中PBMC為經照射且同種異體的。

【1434】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中添加至第一細胞培養基之APC總數為2.5×10^8個。

【1435】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中添加至第二細胞培養基之APC總數為5×10^8個。

【1436】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中APC為PBMC。

【1437】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中PBMC為經照射且同種異體的。

【1438】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中抗原呈現細胞為人工抗原呈現細胞。

【1439】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中使用基於膜之細胞處理系統來進行步驟(d)中之收集。

【1440】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中使用LOVO細胞處理系統來進行步驟(d)中之收集。

【1441】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約5至剛好或大約60個碎片。

【1442】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約10至剛好或大約60個碎片。

【1443】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約15至剛好或大約60個碎片。

【1444】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約20至剛好或大約60個碎片。

【1445】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約25至剛好或大約60個碎片。

【1446】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約30至剛好或大約60個碎片。

【1447】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約35至剛好或大約60個碎片。

【1448】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約40至剛好或大約60個碎片。

【1449】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約45至剛好或大約60個碎片。

【1450】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約50至剛好或大約60個碎片。

【1451】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約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或60個碎片。

【1452】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約27 mm^3之體積。

【1453】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約20 mm^3至剛好或大約50 mm^3之體積。

【1454】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約21 mm^3至剛好或大約30 mm^3之體積。

【1455】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約22 mm^3至剛好或大約29.5 mm^3之體積。

【1456】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約23 mm^3至剛好或大約29 mm^3之體積。

【1457】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約24 mm^3至剛好或大約28.5 mm^3之體積。

【1458】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約25 mm^3至剛好或大約28 mm^3之體積。

【1459】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約26.5 mm^3至剛好或大約27.5 mm^3之體積。

【1460】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約以下之體積：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或50 mm^3。

【1461】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括剛好或大約30至剛好或大約60個碎片，其中總體積為剛好或大約1300 mm^3至剛好或大約1500 mm^3。

【1462】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括剛好或大約50個碎片，其中總體積為剛好或大約1350 mm^3。

【1463】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括剛好或大約50個碎片，其中總質量為剛好或大約1公克至剛好或大約1.5公克。

【1464】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一細胞培養基係提供於呈G容器或Xuri細胞袋之容器中。

【1465】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二細胞培養基係提供於呈G容器或Xuri細胞袋之容器中。

【1466】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一細胞培養基及第二細胞培養基中之每一者係提供於呈G容器或Xuri細胞袋之容器中。

【1467】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一細胞培養基

中之IL-2濃度為約10,000 IU/mL至約5,000 IU/mL。

【1468】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二細胞培養基中之IL-2濃度為約10,000 IU/mL至約5,000 IU/mL。

【1469】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一細胞培養基及第二細胞培養基中之每一者中之IL-2濃度為約10,000 IU/mL至約5,000 IU/mL。

【1470】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一細胞培養基中之IL-2濃度為約6,000 IU/mL。

【1471】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二細胞培養基中之IL-2濃度為約6,000 IU/mL。

【1472】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一細胞培養基及第二細胞培養基中之每一者中之IL-2濃度為約6,000 IU/mL。

【1473】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中冷凍保存培養基包括二甲基亞碸(DMSO)。

【1474】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中冷凍保存培養基包括7%至10% DMSO。

【1475】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(b)中之第一時段係於剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天之時段內進行。

【1476】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(c)中之第二時段係於剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天之時段內進行。

【1477】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(b)中之第一時段及步驟(c)中之第二時段各自分別係於剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天之時段內進行。

【1478】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(b)中之第一時段及步驟(c)中之第二時段各自分別係於剛好或大約5天、6天或7天之時段內進行。

【1479】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(b)中之第一時段及步驟(c)中之第二時段各自分別係於剛好或大約7天之時段內進行。

【1480】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約14天至剛好或大約18天中進行。

【1481】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約15天至剛好或大約18天中進行。

【1482】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約16天至剛好或大約18天中進行。

【1483】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約17天至剛好或大約18天中進行。

【1484】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約14天至剛好或大約17天中進行。

【1485】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約15天至剛好或大約17天中進行。

【1486】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約16天至剛好或大約17天中進行。

【1487】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約14天至剛好或大約16天中進行。

【1488】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約15天至剛好或大約16天中進行。

【1489】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約14天中進行。

【1490】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約15天中進行。

【1491】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約16天中進行。

【1492】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約17天中進行。

【1493】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約18天中進行。

【1494】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約14天或更短中進行。

【1495】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約15天或更短中進行。

【1496】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約16天或更短中進行。

【1497】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約17天或更短中進行。

【1498】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約18天或更短中進行。

【1499】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(d)中收集之治療性TIL群體包括足以用於TIL之治療有效劑量的TIL。

【1500】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中足以用於治療有效劑量之TIL數為剛好或大約2.3×10^{10}個至剛好或大約13.7×10^{10}個。

【1501】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(c)中之第三TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1502】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中相較於藉由長於16天之過程來製備的TIL，步驟(c)中之第三TIL群體提供至少一倍至五倍或更多的干擾素-γ產生。

【1503】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中相較於藉由長於17天之過程來製備的TIL，步驟(c)中之第三TIL群體提供

至少一倍至五倍或更多的干擾素-γ產生。

【1504】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中相較於藉由長於18天之過程來製備的TIL，步驟(c)中之第三TIL群體提供至少一倍至五倍或更多的干擾素-γ產生。

【1505】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中相對於獲自步驟(b)第二細胞群體之效應T細胞及/或中樞記憶T細胞，獲自步驟(c)第三TIL群體之效應T細胞及/或中樞記憶T細胞展現增加的CD8及CD28表現。

【1506】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中引述之各容器為密閉容器。

【1507】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中引述之各容器為G容器。

【1508】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中引述之各容器為GREX-10。

【1509】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中引述之各容器為GREX-100。

【1510】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中引述之各

容器為GREX-500。

【1511】在其他實施例中，本發明提供藉由如上適用之任何前述段落中描述之方法製備的治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體。

【1512】在其他實施例中，本發明提供一種自患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的抗原呈現細胞(APC)或OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，治療性TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1513】在其他實施例中，本發明提供一種自患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的抗原呈現細胞(APC)之情況下進行之過程製備的TIL，治療性TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1514】在其他實施例中，本發明提供一種自患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，治療性TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1515】在其他實施例中，本發明提供一種自患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無添加的抗原呈現

細胞(APC)及無添加的OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，治療性TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1516】在其他實施例中，本發明提供一種自患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由過程長於16天之過程製備的TIL，治療性TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1517】在其他實施例中，本發明提供一種自患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由過程長於17天之過程製備的TIL，治療性TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1518】在其他實施例中，本發明提供一種自患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由過程長於18天之過程製備的TIL，治療性TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1519】在其他實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，該治療性TIL群體提供增加的干擾素-γ產生。

【1520】在其他實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，該治療性TIL群體提供增加的多株性。

【1521】在其他實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，該治療性TIL群體提供增加的功效。

【1522】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於16天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於17天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於18天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【1523】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於16天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於17天之過程製備的TIL，該

治療性TIL群體能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於18天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。

【1524】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於16天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於17天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於18天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。

【1525】在其他實施例中，本發明提供一種治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的抗原呈現細胞(APC)之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性腫瘤浸潤性淋巴球群體能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【1526】在其他實施例中，本發明提供一種治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性腫瘤浸潤性淋巴球群體產生至少多於一倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【1527】在其他實施例中，本發明提供一種治療性TIL群體，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的APC之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體產生至少多於兩倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C

及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。

【1528】在其他實施例中，本發明提供一種治療性TIL群體，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體產生至少多於兩倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。

【1529】在其他實施例中，本發明提供一種治療性TIL群體，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的APC之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體產生至少多於三倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【1530】在其他實施例中，本發明提供一種治療性TIL群體，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體產生至少多於三倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖

1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。

【1531】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中腫瘤碎片為小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物。

【1532】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中腫瘤碎片為粗針活體組織切片。

【1533】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中腫瘤碎片為細針抽吸物。

【1534】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中腫瘤碎片為小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)。

【1535】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中腫瘤碎片為芯針活體組織切片。

【1536】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括自一個或多個來自個體之腫瘤組織小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物獲得第一TIL群體；(ii)該方法包括在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在包括IL-2之

細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包括進行初始第一擴增約8天之時段；且(iv)該方法包括進行快速第二擴增約11天之時段。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1537】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括自一個或多個來自個體之腫瘤組織小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物獲得第一TIL群體；(ii)該方法包括在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在包括IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包括進行初始第一擴增約8天之時段；且(iv)該方法包括藉由以下方式進行快速第二擴增：培養第二TIL群體之培養物約5天，將培養物分成至多5個繼代培養物，且培養該等繼代培養物約6天。在一些前述實施例中，在與在快速第二擴增中開始培養第二TIL群體的容器相同大小或更大的容器中，分別培養至多5個繼代培養物。在一些前述實施例中，第二TIL群體之培養物平均分在至多5個繼代培養物中。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1538】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1至約20個來自個體之腫瘤組織小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體

組織切片或細針抽吸物。

【1539】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1至約10個來自個體之腫瘤組織小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物。

【1540】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自個體之腫瘤組織小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物。

【1541】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自個體之腫瘤組織小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物。

【1542】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1至約20個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片。

【1543】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1至約10個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片。

【1544】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片。

【1545】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片。

【1546】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1至約20個來自個體之腫瘤組織細針抽吸物。

【1547】經修改之如上適用之段落，其中第一TIL群體係獲自1至約10個來自個體之腫瘤組織細針抽吸物。

【1548】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自個體之腫瘤組織細針抽吸物。

【1549】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自個體之腫瘤組織細針抽吸物。

【1550】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係

獲自1至約20個來自個體之腫瘤組織芯針活體組織切片。

【1551】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1至約10個來自個體之腫瘤組織芯針活體組織切片。

【1552】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自個體之腫瘤組織芯針活體組織切片。

【1553】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自個體之腫瘤組織芯針活體組織切片。

【1554】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1至約20個來自個體之腫瘤組織小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)。

【1555】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1至約10個來自個體之腫瘤組織小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)。

【1556】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、

14、15、16、17、18、19或20個來自個體之腫瘤組織小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)。

【1557】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自個體之腫瘤組織小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)。

【1558】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括自1至約10個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片獲得第一TIL群體；(ii)該方法包括在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在包括IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包括藉由在包括IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基中培養第一TIL群體約8天之時段來進行初始第一擴增步驟，以獲得第二TIL群體；且(iv)該方法包括藉由在包括IL-2、OKT-3及APC之第三細胞培養基中培養第二TIL群體約11天之時段來進行快速第二擴增步驟。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1559】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括自1至約10個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片獲得第一TIL群體；(ii)該方法包括在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在包括IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包括藉由在第二細胞培

養基中培養第一TIL群體約8天之時段來進行初始第一擴增步驟，以獲得第二TIL群體，該第二細胞培養基包括IL-2以及自培養於補充有IL-2及OKT-3之細胞培養基中的抗原呈現細胞(APC)培養物獲得的培養物上清液；且(iv)該方法包括藉由在包括IL-2、OKT-3及APC之第三細胞培養基中培養第二TIL群體約11天之時段來進行快速第二擴增步驟。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1560】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括自1至約10個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片獲得第一TIL群體；(ii)該方法包括在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在包括IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包括藉由在包括IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基中培養第一TIL群體約8天之時段來進行初始第一擴增步驟，以獲得第二TIL群體；且(iv)該方法包括藉由在第三培養基中培養第二TIL群體約11天之時段來進行快速第二擴增步驟，該第三培養基包括IL-2以及自培養於補充有IL-2及OKT-3之細胞培養基中的APC培養物獲得的培養物上清液。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1561】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括自1至約10個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片獲得第

一TIL群體；(ii)該方法包括在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在包括IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包括藉由在第二細胞培養基中培養第一TIL群體約8天之時段來進行初始第一擴增步驟，以獲得第二TIL群體，該第二細胞培養基包括IL-2以及自培養於補充有IL-2及OKT-3之細胞培養基中的第一抗原呈現細胞(APC)培養物獲得的第一培養物上清液；且(iv)該方法包括藉由在第三培養基中培養第二TIL群體約11天之時段來進行快速第二擴增步驟，該第三培養基包括IL-2以及自培養於補充有IL-2及OKT-3之細胞培養基中的第二APC培養物獲得的第二培養物上清液。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1562】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括自1至約10個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片獲得第一TIL群體；(ii)該方法包括在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在包括IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包括藉由在包括IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基中培養第一TIL群體約8天之時段來進行初始第一擴增步驟，以獲得第二TIL群體；且(iv)該方法包括藉由以下方式進行快速第二擴增：在包括IL-2、OKT-3及APC之第三細胞培養基中培養第二TIL群體之培養物約5天，將培養物分成至多5個繼代培養物，以及在包括IL-2之第四細胞培養基中培養該

等繼代培養物中之每一者約6天。在一些前述實施例中，在與在快速第二擴增中開始培養第二TIL群體的容器相同大小或更大的容器中，分別培養至多5個繼代培養物。在一些前述實施例中，第二TIL群體之培養物平均分在至多5個繼代培養物中。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1563】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括自1至約10個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片獲得第一TIL群體；(ii)該方法包括在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在包括IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包括藉由在第二細胞培養基中培養第一TIL群體約8天之時段來進行初始第一擴增步驟，以獲得第二TIL群體，該第二細胞培養基包括自培養於補充有IL-2及OKT-3之細胞培養基中的抗原呈現細胞(APC)培養物獲得的培養物上清液；且(iv)該方法包括藉由以下方式進行快速第二擴增：在包括IL-2、OKT-3及APC之第三細胞培養基中培養第二TIL群體之培養物約5天，將培養物分成至多5個繼代培養物，以及在包括IL-2之第四細胞培養基中培養該等繼代培養物中之每一者約6天。在一些前述實施例中，在與在快速第二擴增中開始培養第二TIL群體的容器相同大小或更大的容器中，分別培養至多5個繼代培養物。在一些前述實施例中，第二TIL群體之培養物平均分在至多5個繼代培養物中。在一些前述實施例

中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1564】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括自1至約10個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片獲得第一TIL群體；(ii)該方法包括在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在包括IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包括藉由在包括IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基中培養第一TIL群體約8天之時段來進行初始第一擴增步驟，以獲得第二TIL群體；且(iv)該方法包括藉由以下方式進行快速第二擴增：在第三細胞培養基中培養第二TIL群體之培養物約5天，該第三細胞培養基包括IL-2以及自培養於補充有IL-2及OKT-3之細胞培養基中的APC培養物獲得的培養物上清液；且接著將第二TIL群體之培養物分成至多5個繼代培養物；以及在包括IL-2之第四細胞培養基中培養該等繼代培養物中之每一者約6天。在一些前述實施例中，在與在快速第二擴增中開始培養第二TIL群體的容器相同大小或更大的容器中，分別培養至多5個繼代培養物。在一些前述實施例中，第二TIL群體之培養物平均分在至多5個繼代培養物中。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1565】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括自1至約10個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片獲得第

一TIL群體；(ii)該方法包括在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在包括IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包括藉由在第二細胞培養基中培養第一TIL群體約8天之時段來進行初始第一擴增步驟，以獲得第二TIL群體，該第二細胞培養基包括自培養於補充有IL-2及OKT-3之細胞培養基中的第一抗原呈現細胞(APC)培養物獲得的第一培養物上清液；且(iv)該方法包括藉由以下方式進行快速第二擴增：在第三細胞培養基中培養第二TIL群體之培養物約5天，該第三細胞培養基包括IL-2以及自培養於補充有IL-2及OKT-3之細胞培養基中的第二APC培養物獲得的第二培養物上清液；且接著將第二TIL群體之培養物分成至多5個繼代培養物；以及在包括IL-2之第四細胞培養基中培養該等繼代培養物中之每一者約6天。在一些前述實施例中，在與在快速第二擴增中開始培養第二TIL群體的容器相同大小或更大的容器中，分別培養至多5個繼代培養物。在一些前述實施例中，第二TIL群體之培養物平均分在至多5個繼代培養物中。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1566】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括自1至約10個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片獲得第一TIL群體；(ii)該方法包括在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在G-Rex 100M培養瓶中在包括含6000 IU IL-2/ml之0.5 L CM1培養基的細胞培養基中培養第一TIL群

體約3天之時段；(iii)該方法包括藉由以下方式進行初始第一擴增：添加含有6000 IU/ml IL-2、30 ng/ml OKT-3及約10^8個飼養細胞之0.5 L CM1培養基，且培養約8天之時段；且(iv)該方法包括藉由以下方式進行快速第二擴增：(a)將第二TIL群體轉移至含有具有3000 IU/ml IL-2、30 ng/ml OKT-3及5×10^9個飼養細胞之5 L CM2培養基的G-Rex 500MCS培養瓶中，且培養約5天；(b)藉由將10^9個TIL轉移至含有具有3000 IU/ml IL-2之5 L AIM-V培養基的至多5個G-Rex 500MCS培養瓶中之每一者中而將培養物分成至多5個繼代培養物，且培養該等繼代培養物約6天。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1567】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括自1至約10個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片獲得第一TIL群體；(ii)該方法包括在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在第一G-Rex 100M培養瓶中在包括含6000 IU IL-2/ml之0.25 L DM1培養基的細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包括藉由以下方式進行初始第一擴增：添加含有6000 IU/ml IL-2、30 ng/ml OKT-3及約2.5×10^8個PBMC飼養細胞之0.25 L DM1培養基，且培養約8天之時段；且(iv)該方法包括藉由以下方式進行快速第二擴增：(a)添加補充有6000 IU/ml IL-2、30 ng/ml OKT-3及5×10^8個PBMC飼養細胞之0.5 L DM1培養基，且培養約5天；(b)藉由將五分之一培養物轉移至含有具有3000

IU/ml IL-2之5 L DM2的至多5個G-Rex 500MCS培養瓶中之每一者中而將培養物分成至多5個繼代培養物，且培養該等繼代培養物約6天。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1568】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括自1至約10個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片獲得第一TIL群體；(ii)該方法包括在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在第一G-Rex 100M培養瓶中在包括含6000 IU IL-2/ml之0.15 L DM1培養基的第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包括藉由以下方式進行初始第一擴增：將含有6000 IU/ml IL-2之0.15 L DM1培養基及自5×10^8個PBMC之培養物獲得的0.15 L培養物上清液添加至第一TIL群體之培養物中，且培養約8天之時段，該PBMC培養物已在第二G-Rex 100M培養瓶中在補充有6000 IU IL-2/ml及30 ng OKT-3/ml之1 L DM1中培養約3天之時段；且(iv)該方法包括藉由以下方式進行快速第二擴增：(a)添加補充有6000 IU/ml IL-2、30 ng/ml OKT-3及5×10^8個PBMC飼養細胞之0.5 L DM1培養基，且培養約5天；(b)藉由將五分之一培養物轉移至含有具有3000 IU/ml IL-2之5 L DM2的至多5個G-Rex 500MCS培養瓶中之每一者中而將培養物分成至多5個繼代培養物，且培養該等繼代培養物約6天。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1569】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括自1至約10個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片獲得第一TIL群體；(ii)該方法包括在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在第一G-Rex 100M培養瓶中在包括含6000 IU IL-2/ml之0.25 L DM1培養基的細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包括藉由以下方式進行初始第一擴增：添加含有6000 IU/ml IL-2、30 ng/ml OKT-3及約2.5×10^8個PBMC飼養細胞之0.25 L DM1培養基，且培養約8天之時段；且(iv)該方法包括藉由以下方式進行快速第二擴增：(a)將含有6000 IU/ml IL-2之0.25 L DM1培養基及自5×10^8個PBMC之培養物獲得的0.25 L培養物上清液添加至第二TIL群體之培養物中，且培養約5天，該PBMC培養物係在第二G-Rex 100M培養瓶中在補充有6000 IU IL-2/ml及30 ng OKT-3/ml之1L DM1培養基中培養約3天之時段；(b)藉由將五分之一培養物轉移至含有具有3000 IU/ml IL-2之5 L DM2的至多5個G-Rex 500MCS培養瓶中之每一者中而將第二TIL群體之培養物分成至多5個繼代培養物，且培養該等繼代培養物約6天。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1570】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括自1至約10個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片獲得第一TIL群體；(ii)該方法包括在進行初始第一擴增步驟之前

進行以下步驟：在第一G-Rex 100M培養瓶中在包括含6000 IU IL-2/ml之0.15 L DM1培養基的第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包括藉由以下方式進行初始第一擴增：將含有6000 IU/ml IL-2之0.15 L DM1培養基及自5×10^{8}個PBMC之第一培養物獲得的0.15 L第一培養物上清液添加至第一TIL群體之培養物中，且培養約8天之時段，該第一PBMC培養物已在第二G-Rex 100M培養瓶中在補充有6000 IU IL-2/ml及30 ng OKT-3/ml之1 L DM1中培養約3天之時段；且(iv)該方法包括藉由以下方式進行快速第二擴增：(a)將含有6000 IU/ml IL-2之0.25 L DM1培養基及自5×10^{8}個PBMC之第二培養物獲得的0.25 L第二培養物上清液添加至第二TIL群體之培養物中，且培養約5天，該第二PBMC培養物係在第二G-Rex 100M培養瓶中在補充有6000 IU IL-2/ml及30 ng OKT-3/ml之1L DM1培養基中培養約3天之時段；(b)藉由將五分之一培養物轉移至含有具有3000 IU/ml IL-2之5 L DM2的至多5個G-Rex 500MCS培養瓶中之每一者中而將第二TIL群體之培養物分成至多5個繼代培養物，且培養該等繼代培養物約6天。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1571】在其他實施例中，本發明提供一種擴增T細胞之方法，其包括：(a)藉由培養獲自供體之第一T細胞群體來進行該第一T細胞群體的初始第一擴增，以實現生長及啟動第一T細胞群體的活化；(b)在步驟(a)中啟動之第一T細胞群體之活化開始衰退後，藉由培養第一T細胞群體進

行第一T細胞群體的快速第二擴增以實現生長及增強第一T細胞群體的活化，以獲得第二T細胞群體；及(c)收集第二T細胞群體。在其他實施例中，快速第二擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移至比第一容器大的第二容器(例如G-REX 500MCS容器)，及在第二容器中之較大規模培養中培養來自小規模培養的第一T細胞群體約4至7天的時段。在其他實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中之第一小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自第一小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個與第一容器大小相等之第二容器之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自第一小規模培養的第一T細胞群體部分係在第二小規模培養中培養約4至7天的時段。在其他實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉

移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約4至7天的時段。在其他實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約5天的時段。

【1572】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移至比第一容器大之第二容器(例如G-REX 500MCS容器)之中，及在第二容器中之較大規模培養中培養來自小規模培養的第一T細胞群體約5至7天的時段。

【1573】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中之第一小規模培養中培養第一T細胞群體約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自第一小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個與第一容器大小相等之第二容器之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自第一小規模培養的第一T細胞群體部分係在第二小規模培養中培養約5至7天的時段。

【1574】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約5至7天的時段。

【1575】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速擴增步驟分

為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約5至6天的時段。

【1576】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約5天的時段。

【1577】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段

進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，轉移至此等第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約6天的時段。

【1578】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，轉移至此等第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約7天的時段。

【1579】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中步驟(a)之初始第一擴增係在至多7天之時段內進行。

【1580】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中步驟(b)之快速第二擴增係在至多8天之時段內進行。

【1581】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中步驟(b)之快速第二擴增係在至多9天之時段內進行。

【1582】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中步驟(b)之快速第二擴增係在至多10天之時段內進行。

【1583】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中步驟(b)之快速第二擴增係在至多11天之時段內進行。

【1584】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之初始第一擴增係在7天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多9天之時段內進行。

【1585】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之初始第一擴增係在7天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多10天之時段內進行。

【1586】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之初始第一擴增係在7天或8天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多9天之時段內進行。

【1587】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之初始第一擴增係在7天或8天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多10天之時段內進行。

【1588】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之初始

第一擴增係在8天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多9天之時段內進行。

【1589】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之初始第一擴增係在8天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多8天之時段內進行。

【1590】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(a)中，第一T細胞群體係在包括OKT-3及IL-2之第一培養基中培養。

【1591】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一培養基包括4-1BB促效劑、OKT-3及IL-2。

【1592】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一培養基包括OKT-3、IL-2及抗原呈現細胞(APC)。

【1593】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一培養基包括4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及抗原呈現細胞(APC)。

【1594】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，第一T細胞群體係在包括OKT-3、IL-2及抗原呈現細胞(APC)之第二培養基中培養。

【1595】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第二培養基包括

4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及抗原呈現細胞(APC)。

【1596】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一T細胞群體係在包括第一透氣表面之容器中於第一培養基中培養，其中第一培養基包括OKT-3、IL-2及第一抗原呈現細胞(APC)群體，其中第一APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第一APC群體層疊至第一透氣表面上，其中在步驟(b)中，第一T細胞群體係在容器中於第二培養基中培養，其中第二培養基包括OKT-3、IL-2及第二APC群體，其中第二APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第二APC群體層疊至第一透氣表面上，且其中第二APC群體比第一APC群體大。

【1597】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一T細胞群體係在包括第一透氣表面之容器中於第一培養基中培養，其中第一培養基包括4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及第一抗原呈現細胞(APC)群體，其中第一APC群體對於第一T細胞群體供體為外源性的，且第一APC群體層疊至第一透氣表面上，其中在步驟(b)中，第一T細胞群體係在容器中於第二培養基中培養，其中第二培養基包括OKT-3、IL-2及第二APC群體，其中第二APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第二APC群體層疊至第一透氣表面上，且其中第二APC群體比第一APC群體大。

【1598】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一T細胞群體係在包括第一透氣表面之容器中於第一培養基中培養，其中第一培養基包括OKT-3、IL-2及第一抗原呈現細胞(APC)群體，其中第一APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第一APC群體層疊至第一透氣表面上，其中在步驟(b)中，第一T細胞群體係在容器中於第二培養基中培養，其中第二培養基包括4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及第二APC群體，其中第二APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第二APC群體層疊至第一透氣表面上，且其中第二APC群體比第一APC群體大。

【1599】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一T細胞群體係在包括第一透氣表面之容器中於第一培養基中培養，其中第一培養基包括4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及第一抗原呈現細胞(APC)群體，其中第一APC群體對於第一T細胞群體供體為外源性的，且第一APC群體層疊至第一透氣表面上，其中在步驟(b)中，第一T細胞群體係在容器中於第二培養基中培養，其中第二培養基包括4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及第二APC群體，其中第二APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第二APC群體層疊至第一透氣表面上，且其中第二APC群體比第一APC群體大。

【1600】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第二APC群體中之APC之數目與第一APC群體中之APC之數目的比率為約2:1。

【1601】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一APC群體中之APC之數目為約2.5×10^8，且第二APC群體中之APC之數目為約5×10^8。

【1602】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以2個APC層之平均厚度層疊至第一透氣表面上。

【1603】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中，第二APC群體以在4至8個APC層之範圍內的平均厚度層疊至第一透氣表面上。

【1604】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中層疊至第一透氣表面上之APC層的平均數目與在步驟(a)中層疊至第一透氣表面上之APC層的平均數目的比率為2:1。

【1605】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以在剛好或大約1.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約4.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面

上。

【1606】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以在剛好或大約1.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1607】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以在剛好或大約2.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3.0×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1608】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以剛好或大約2.0×10^6個APC/cm^2之密度接種在第一透氣表面上。

【1609】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中，第二APC群體以在剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約7.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1610】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中，第二APC群體以在剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約6.0×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表

面上。

【1611】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中，第二APC群體以在剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約5.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1612】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中，第二APC群體以剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2之密度接種在第一透氣表面上。

【1613】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以在剛好或大約1.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約4.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上，且在步驟(b)中，第二APC群體以在剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約7.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1614】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以在剛好或大約1.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上，且在步驟(b)中，第二APC群體以在剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約6.0×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1615】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以在剛好或大約2.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3.0×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上，且在步驟(b)中，第二APC群體以在剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約5.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1616】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以剛好或大約2.0×10^6個APC/cm^2之密度接種在第一透氣表面上，且在步驟(b)中，第二APC群體以剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2之密度接種在第一透氣表面上。

【1617】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中APC為周邊血液單核細胞(PBMC)。

【1618】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中PBMC經照射且對於第一T細胞群體之供體為外源性的。

【1619】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中T細胞為腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)。

【1620】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中T細胞為骨髓浸潤性淋巴球(MIL)。

【1621】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中T細胞為周邊血液淋巴球(PBL)。

【1622】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一T細胞群體係藉由自供體之全血分離而獲得。

【1623】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一T細胞群體係藉由自供體之血球分離術產物分離而獲得。

【1624】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一T細胞群體係藉由T細胞表型之正向或負向選擇自供體之全血或血球分離術產物分離。

【1625】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中T細胞表型為CD3+及CD45+。

【1626】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在進行第一T細胞群體之初始第一擴增之前，自NK細胞分離T細胞。在其他實施例中，藉由自第一T細胞群體移除CD3- CD56+細胞來將第一T細胞群體中之T細胞與NK細胞分離。在其他實施例中，藉由使用移除CD3- CD56+細胞級份且回收陰性級份之圈選策略對第一T細胞群體進行細胞分選，自第一T細胞群體移除CD3- CD56+細胞。在其他實施例中，前述

方法係用於以高百分比之NK細胞為特徵的第一T細胞群體中之T細胞擴增。在其他實施例中，前述方法係用於以高百分比之CD3- CD56+細胞為特徵的第一T細胞群體中之T細胞擴增。在其他實施例中，前述方法係用於以存在大量NK細胞為特徵的腫瘤組織中之T細胞擴增。在其他實施例中，前述方法係用於以大量CD3- CD56+細胞為特徵的腫瘤組織中之T細胞擴增。在其他實施例中，前述方法係用於自患有以存在大量NK細胞為特徵之腫瘤的患者獲得的腫瘤組織中之T細胞擴增。在其他實施例中，前述方法係用於自患有以存在大量CD3- CD56+細胞為特徵之腫瘤的患者獲得的腫瘤組織中之T細胞擴增。在其他實施例中，前述方法係用於自患有卵巢癌之患者獲得的腫瘤組織中之T細胞擴增。

【1627】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中將剛好或大約1×10^7個來自第一T細胞群體之T細胞接種於容器中，以起始此類容器中之初始第一擴增培養。

【1628】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中將第一T細胞群體分佈至複數個容器中，且在各容器中接種剛好或大約1×10^7個來自第一T細胞群體之T細胞，以起始此類容器中之初始第一擴增培養。

【1629】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(c)中收集

之第二T細胞群體為治療性TIL群體。

【1630】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自一個或多個來自供體之腫瘤組織小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物。

【1631】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至20個來自供體之腫瘤組織小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物。

【1632】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至10個來自供體之腫瘤組織小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物。

【1633】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自供體之腫瘤組織小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物。

【1634】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體

係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自供體之腫瘤組織小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物。

【1635】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自一個或多個來自供體之腫瘤組織粗針活體組織切片。

【1636】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至20個來自供體之腫瘤組織粗針活體組織切片。

【1637】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至10個來自供體之腫瘤組織粗針活體組織切片。

【1638】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自供體之腫瘤組織粗針活體組織切片。

【1639】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自供體之腫瘤組織粗針活體組織切片。

【1640】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體

係獲自一個或多個來自供體之腫瘤組織細針抽吸物。

【1641】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至20個來自供體之腫瘤組織細針抽吸物。

【1642】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至10個來自供體之腫瘤組織細針抽吸物。

【1643】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自供體之腫瘤組織細針抽吸物。

【1644】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自供體之腫瘤組織細針抽吸物。

【1645】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自一個或多個來自供體之腫瘤組織小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)。

【1646】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至20個來自供體之腫瘤組織小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)。

【1647】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至10個來自供體之腫瘤組織小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)。

【1648】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自供體之腫瘤組織小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)。

【1649】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自供體之腫瘤組織小活體組織切片(包含例如穿孔活體組織切片)。

【1650】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自一個或多個來自供體之腫瘤組織芯針活體組織切片。

【1651】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至20個來自供體之腫瘤組織芯針活體組織切片。

【1652】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至10個來自供體之腫瘤組織芯針活體組織切片。

【1653】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自供體之腫瘤組織芯針活體組織切片。

【1654】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自供體之腫瘤組織芯針活體組織切片。

【1655】在其他實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包括：i)藉由在包括IL-2之第一細胞培養基中培養自個體腫瘤之一個或多個小活體組織切片、粗針活體組織切片或穿刺活體組織切片獲得的腫瘤樣本約3天而自該腫瘤樣本獲得及/或接受第一TIL群體；(ii)藉由在包括IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增以產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增係在包括第一透氣表面區域之容器中進行，其中該初始第一擴增進行約7天或8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(iii)藉由用另外的IL-2、OKT-3及APC補充第二TIL群體之第二細胞培養基來進行快速第二擴增以產生第三TIL群體，其中在快速第二擴增中添加之APC數目為在步驟(ii)中添加之APC數目的至少兩倍，其中該快速第二擴增進行約11天之第二時段以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療

性TIL群體，其中該快速第二擴增係在包括第二透氣表面區域之容器中進行；(iv)收集獲自步驟(iii)之治療性TIL群體；及(v)將來自步驟(iv)之經收集的TIL群體轉移至輸注袋。

【1656】在其他實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包括：(i)藉由在包括IL-2之第一細胞培養基中培養自個體腫瘤之一個或多個小活體組織切片、粗針活體組織切片或穿刺活體組織切片獲得的腫瘤樣本約3天而自該腫瘤樣本獲得及/或接受第一TIL群體；(ii)藉由在包括IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增以產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約7天或8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(iii)藉由使第二TIL群體與包括IL-2、OKT-3及APC之第三細胞培養基接觸來進行快速第二擴增以產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增進行約11天之第二時段以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及(iv)收集獲自步驟(iii)之治療性TIL群體。

【1657】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括藉由在第二細胞培養基中培養第一TIL群體約8天之時段來進行初始第一擴增步驟以獲得第二TIL群體，該第二細胞培養基包括自培養於補充有IL-2及OKT-3之細胞培養基中的

抗原呈現細胞(APC)培養物獲得的培養物上清液，其中第一TIL群體之培養物未補充有APC；且(ii)該方法包括藉由以下方式進行快速第二擴增：在包括IL-2、OKT-3及APC之第三細胞培養基中培養第二TIL群體約5天，將培養物分成至多5個繼代培養物，且在包括IL-2之第四細胞培養基中培養該等繼代培養物中之每一者約6天。在一些前述實施例中，在與在快速第二擴增中開始培養第二TIL群體的容器相同大小或更大的容器中，分別培養至多5個繼代培養物。在一些前述實施例中，第二TIL群體之培養物平均分在至多5個繼代培養物中。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1658】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括藉由在包括IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基中培養第一TIL群體約8天之時段來進行初始第一擴增步驟以獲得第二TIL群體；且(ii)該方法包括藉由以下方式進行快速第二擴增：在第三細胞培養基中培養第二TIL群體約5天，該第三細胞培養基包括IL-2以及自培養於補充有IL-2及OKT-3之細胞培養基中的APC培養物獲得的培養物上清液，其中第二TIL群體之培養物未補充有APC；且接著將第二TIL群體之培養物分成至多5個繼代培養物；且在包括IL-2之第四細胞培養基中培養該等繼代培養物中之每一者約6天。在一些前述實施例中，在與在快速第二擴增中開始培養第二TIL群體的容器相同大小或更大的容器

中，分別培養至多5個繼代培養物。在一些前述實施例中，第二TIL群體之培養物平均分在至多5個繼代培養物中。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1659】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括藉由在第二細胞培養基中培養第一TIL群體約8天之時段來進行初始第一擴增步驟以獲得第二TIL群體，該第二細胞培養基包括自培養於補充有IL-2及OKT-3之細胞培養基中的第一抗原呈現細胞(APC)培養物獲得的第一培養物上清液，其中第一TIL群體之培養物未補充有APC；且(iii)該方法包括藉由以下方式進行快速第二擴增：在第三細胞培養基中培養第二TIL群體約5天，該第三細胞培養基包括IL-2以及自培養於補充有IL-2及OKT-3之細胞培養基中的第二APC培養物獲得的第二培養物上清液，其中第二TIL群體之培養物未補充有APC；且接著將第二TIL群體之培養物分成至多5個繼代培養物；且在包括IL-2之第四細胞培養基中培養該等繼代培養物中之每一者約6天。在一些前述實施例中，在與在快速第二擴增中開始培養第二TIL群體的容器相同大小或更大的容器中，分別培養至多5個繼代培養物。在一些前述實施例中，第二TIL群體之培養物平均分在至多5個繼代培養物中。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1660】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中在第二時段之第5天後，將培養物分成2個或更多個繼代培養物，且向各繼代培養物補充另外數量的第三培養基並且培養約6天。

【1661】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在第二時段之第5天後，將培養物分成2個或更多個繼代培養物，且向各繼代培養物補充包括IL-2之第四培養基並且培養約6天。

【1662】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在第二時段之第5天後，將培養物分成至多5個繼代培養物。

【1663】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中之所有步驟係在約22天內完成。

【1664】在其他實施例中，本發明提供一種擴增T細胞之方法，其包括：(i)藉由培養來自腫瘤樣本之第一T細胞群體來進行該第一T細胞群體的初始第一擴增，以實現生長及啟動第一T細胞群體的活化，該腫瘤樣本係自供體腫瘤之一個或多個小活體組織切片、粗針活體組織切片或穿刺活體組織切片獲得；(ii)在步驟(a)中啟動之第一T細胞群體之活化開始衰退後，藉由培養第一T細胞群體進行第一T細胞群體的快速第二擴增以實現生長及增強第一T細胞群體的活化，以獲得第二T細胞群體；及(iv)收集第二T細胞群體。在一些實施例中，腫瘤樣本係自複數個粗針活體組織切片獲得。在一些實施例中，複數個粗針活體組織切

片係選自由以下組成之群組：2、3、4、5、6、7、8、9及10個粗針活體組織切片。

【1665】在一些實施例中，快速第二擴增以兩個時段之形式發生，包括快速第二擴增內的活化II時段，接著為分瓶或分裂及進一步生長時段。在一些實施例中，快速第二擴增發生1至11天之時段。在一些實施例中，快速第二擴增發生1至10天之時段，產生主體TIL群體。在一些實施例中，快速第二擴增發生1至9天之時段。在一些實施例中，快速第二擴增發生1至8天之時段。在一些實施例中，快速第二擴增包括1至4天之活化II時段，接著為1至7天之分瓶或分裂及進一步生長時段。在一些實施例中，快速第二擴增包括1至3天之活化II時段，接著為1至6天之分瓶或分裂及進一步生長時段。在一些實施例中，快速第二擴增包括1至4天之活化II時段，接著為1至6天之分瓶或分裂及進一步生長時段。在一些實施例中，快速第二擴增包括1至7天之活化II時段，接著為1至7天之分瓶或分裂及進一步生長時段。在一些實施例中，快速第二擴增包括1至3天之活化II時段，接著為1至7天之分瓶或分裂及進一步生長時段。在一些實施例中，快速第二擴增包括1天、2天、3天或4天之活化II時段，接著為1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天之分瓶或分裂及進一步生長時段。在一些實施例中，分瓶或分裂亦可包含規模縱向擴大至增加數目之容器(包含例如袋子及/或GREX容器)。在一些實施例中，分瓶或分裂亦可包含規模縱向擴大至增加數目之容器(包

含例如袋子及/或GREX容器)，自活化II步驟期間之數目之容器規模縱向擴大至進一步生長時段期間之增加數目之容器。

【1666】在一些實施例中，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法包括：

(a)藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，或

藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)視情況將該等腫瘤碎片或碎解物添加至密閉系統中；

(c)藉由在包括IL-2、視情況選用之OKT-3及抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約5天至9天以獲得該第二TIL群體，其中該第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充該第二TIL群體的該細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約1天至5天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在

密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)藉由將該第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將該第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基且進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中該第三擴增進行約4天至8天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f)收集獲自步驟(e)之該第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(e)至步驟(f)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(g)將來自步驟(g)之該經收集TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(f)至(g)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【1667】在一些實施例中，本發明提供一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其包括治療性浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中TIL組成物係藉由包括以下之方法產生：

(a)藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，或

藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)視情況將該等腫瘤碎片或碎解物添加至密閉系統

中；

(c)藉由在包括IL-2、視情況選用之OKT-3及抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約5天至9天以獲得該第二TIL群體，其中該第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充該第二TIL群體的該細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約1天至5天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)藉由將該第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將該第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基且進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中該第三擴增進行約4天至8天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f)收集獲自步驟(e)之該第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(e)至步驟(f)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(g)將來自步驟(g)之該經收集TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(f)至(g)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【1668】在一些實施例中，TIL組成物為冷凍保存組成物，且其中方法進一步包括(h)使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(g)之包括經收集TIL群體的輸注袋。

【1669】在一些實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體的方法，該方法包括投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，其包括：

(a)藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，或

藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)視情況將該等腫瘤碎片或碎解物添加至密閉系統中；

(c)藉由在包括IL-2、視情況選用之OKT-3及抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約5天至9天以獲得該第二TIL群體，其中該第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中當視情況在密閉系統中進行

時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充該第二TIL群體的該細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約1天至5天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)藉由將該第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將該第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基且進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中該第三擴增進行約4天至8天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f)收集獲自步驟(e)之該第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(e)至步驟(f)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(g)將來自步驟(g)之該經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(f)至(g)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(h)向該個體投予治療有效劑量之來自步驟(g)中之該

輸注袋的該第三TIL群體。

【1670】在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增、快速第二擴增、第三擴增及第三擴增各自進行約5天至7天、約5天至6天或約6天至7天。在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增、快速第二擴增、第三擴增及第三擴增各自進行約5天、6天或7天。在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增、快速第二擴增、第三擴增及第三擴增各自進行約5天。在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增、快速第二擴增、第三擴增及第三擴增各自進行約6天。在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增、快速第二擴增、第三擴增及第三擴增各自進行約7天。在一些實施例中，第一複數個亞群包括約2至10個亞群、約2至9個亞群、約2至8個亞群、約2至7個亞群、約2至6個亞群、約2至5個亞群、約2至4個亞群或約2至3個亞群。

III. 醫藥組成物、劑量及給藥方案

【1671】在一些實施例中，使用本揭示案之方法擴增之TIL係以醫藥組成物之形式向患者投予。在一些實施例中，醫藥組成物為TIL於無菌緩衝液中之懸浮液。使用本揭示案之PBMC擴增的TIL可藉由此項技術中已知的任何適合途徑投予。在一些實施例中，T細胞係以單一動脈內或靜脈內輸注之形式投予，其較佳持續大約30至60分鐘。其他適合之投予途徑包含腹膜內、鞘內及淋巴管內投予。

【1672】可投予任何適合劑量之TIL。在一些實施例

中，投予約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}個TIL，平均約7.8×10^{10}個TIL，特別是在癌症為黑色素瘤之情況下。在一些實施例中，投予約1.2×10^{10}至約4.3×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投予約3×10^{10}至約12×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投予約4×10^{10}至約10×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投予約5×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投予約6×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投予約7×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}個。在一些實施例中，治療有效劑量為約7.8×10^{10}個TIL，特別是在癌症為黑色素瘤之情況下。在一些實施例中，治療有效劑量為約1.2×10^{10}至約4.3×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約3×10^{10}至約12×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約4×10^{10}至約10×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約5×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約6×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約7×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。

【1673】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組成物中的TIL之數目為約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9×10^{13}。在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組成物中的TIL之數目在1×10^{6}至5×10^{6}、5×10^{6}至1×10^{7}、1×10^{7}至5×10^{7}、5×10^{7}至1×10^{8}、1×10^{8}至5×10^{8}、5×10^{8}至1×10^{9}、1×10^{9}至5×10^{9}、5×10^{9}至1×10^{10}、1×10^{10}至5×10^{10}、5×10^{10}至1×10^{11}、5×10^{11}至1×10^{12}、1×10^{12}至5×10^{12}及5×10^{12}至1×10^{13}之範圍內。

【1674】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組成物中的TIL之濃度小於例如醫藥組成物之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%或0.0001% w/w、w/v或v/v。

【1675】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組成物中的TIL之濃度大於醫藥組成物之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%或0.0001% w/w、w/v或v/v。

【1676】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組成物中的TIL之濃度在醫藥組成物的約0.0001%至約50%、約0.001%至約40%、約0.01%至約30%、約0.02%至約29%、約0.03%至約28%、約0.04%至約27%、約0.05%至約26%、約0.06%至約25%、約0.07%至約24%、約0.08%至約23%、約0.09%至約22%、約0.1%至約21%、約0.2%至約20%、約0.3%至約19%、約0.4%至約18%、約0.5%至約17%、約0.6%至約16%、約0.7%至約15%、約0.8%至約14%、約

0.9%至約12%或約1%至約10% w/w、w/v或v/v之範圍內。

【1677】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組成物中的TIL之濃度在醫藥組成物之約0.001%至約10%、約0.01%至約5%、約0.02%至約4.5%、約0.03%至約4%、約0.04%至約3.5%、約0.05%至約3%、約0.06%至約2.5%、約0.07%至約2%、約0.08%至約1.5%、約0.09%至約1%、約0.1%至約0.9% w/w、w/v或v/v之範圍內。

【1678】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組成物中的TIL之量等於或小於10 g、9.5 g、9.0 g、8.5 g、8.0 g、7.5 g、7.0 g、6.5 g、6.0 g、5.5 g、5.0 g、4.5 g、4.0 g、3.5 g、3.0 g、2.5 g、2.0 g、1.5 g、1.0 g、0.95 g、0.9 g、0.85 g、0.8 g、0.75 g、0.7 g、0.65 g、0.6 g、0.55 g、0.5 g、0.45 g、0.4 g、0.35 g、0.3 g、0.25 g、0.2 g、0.15 g、0.1 g、0.09 g、0.08 g、0.07 g、0.06 g、0.05 g、0.04 g、0.03 g、0.02 g、0.01 g、0.009 g、0.008 g、0.007 g、0.006 g、0.005 g、0.004 g、0.003 g、0.002 g、0.001 g、0.0009 g、0.0008 g、0.0007 g、0.0006 g、0.0005 g、0.0004 g、0.0003 g、0.0002 g或0.0001 g。

【1679】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組成物中的TIL之量大於0.0001 g、0.0002 g、0.0003 g、0.0004 g、0.0005 g、0.0006 g、0.0007 g、0.0008 g、0.0009 g、0.001 g、0.0015 g、0.002 g、0.0025 g、0.003 g、0.0035 g、0.004 g、0.0045 g、0.005 g、0.0055 g、0.006 g、0.0065 g、0.007 g、0.0075 g、0.008 g、0.0085 g、0.009

g、0.0095 g、0.01 g、0.015 g、0.02 g、0.025 g、0.03 g、0.035 g、0.04 g、0.045 g、0.05 g、0.055 g、0.06 g、0.065 g、0.07 g、0.075 g、0.08 g、0.085 g、0.09 g、0.095 g、0.1 g、0.15 g、0.2 g、0.25 g、0.3 g、0.35 g、0.4 g、0.45 g、0.5 g、0.55 g、0.6 g、0.65 g、0.7 g、0.75 g、0.8 g、0.85 g、0.9 g、0.95 g、1 g、1.5 g、2 g、2.5、3 g、3.5、4 g、4.5 g、5 g、5.5 g、6 g、6.5 g、7 g、7.5 g、8 g、8.5 g、9 g、9.5 g或10 g。

【1680】提供於本發明之醫藥組成物中的TIL在廣泛劑量範圍內有效。準確劑量將視投予途徑、化合物投予形式、待治療個體之性別及年齡、待治療個體之體重及主治醫師之偏好及經驗而定。適當時亦可使用TIL之臨床確定劑量。使用本文之方法投予之醫藥組成物的量，諸如TIL之劑量將視所治療之人類或哺乳動物、病症或病狀之嚴重程度、投予速率、活性醫藥成分之配置及開處方醫師之判斷而定。

【1681】在一些實施例中，TIL可以單次劑量投予。此類投予可藉由例如靜脈內注射之注射進行。在一些實施例中，TIL可以多次劑量投予。給藥可為每年一次、兩次、三次、四次、五次、六次或超過六次。給藥可為每月一次、每兩週一次、一週一次或每隔一天一次。TIL之投予可視需要而繼續。

【1682】在一些實施例中，TIL之有效劑量為約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9×10^{13}。在一些實施例中，TIL之有效劑量在1×10^6至5×10^6、5×10^6至1×10^7、1×10^7至5×10^7、5×10^7至1×10^8、1×10^8至5×10^8、5×10^8至1×10^9、1×10^9至5×10^9、5×10^9至1×10^{10}、1×10^{10}至5×10^{10}、5×10^{10}至1×10^{11}、5×10^{11}至1×10^{12}、1×10^{12}至5×10^{12}及5×10^{12}至1×10^{13}之範圍內。

【1683】在一些實施例中，TIL之有效劑量在約0.01 mg/kg至約4.3 mg/kg、約0.15 mg/kg至約3.6 mg/kg、約0.3 mg/kg至約3.2 mg/kg、約0.35 mg/kg至約2.85 mg/kg、約0.15 mg/kg至約2.85 mg/kg、約0.3 mg至約2.15 mg/kg、約0.45 mg/kg至約1.7 mg/kg、約0.15 mg/kg至約1.3 mg/kg、約0.3 mg/kg至約1.15 mg/kg、約0.45 mg/kg至約1 mg/kg、約0.55 mg/kg至約0.85 mg/kg、約0.65 mg/kg至約0.8 mg/kg、約0.7 mg/kg至約0.75 mg/kg、約0.7 mg/kg至約2.15 mg/kg、約0.85 mg/kg至約2 mg/kg、約1 mg/kg至約1.85 mg/kg、約1.15 mg/kg至約1.7 mg/kg、約1.3 mg/kg mg

至約1.6 mg/kg、約1.35 mg/kg至約1.5 mg/kg、約2.15 mg/kg至約3.6 mg/kg、約2.3 mg/kg至約3.4 mg/kg、約2.4 mg/kg至約3.3 mg/kg、約2.6 mg/kg至約3.15 mg/kg、約2.7 mg/kg至約3 mg/kg、約2.8 mg/kg至約3 mg/kg或約2.85 mg/kg至約2.95 mg/kg之範圍內。

【1684】在一些實施例中，TIL之有效劑量在約1 mg至約500 mg、約10 mg至約300 mg、約20 mg至約250 mg、約25 mg至約200 mg、約1 mg至約50 mg、約5 mg至約45 mg、約10 mg至約40 mg、約15 mg至約35 mg、約20 mg至約30 mg、約23 mg至約28 mg、約50 mg至約150 mg、約60 mg至約140 mg、約70 mg至約130 mg、約80 mg至約120 mg、約90 mg至約110 mg、或約95 mg至約105 mg、約98 mg至約102 mg、約150 mg至約250 mg、約160 mg至約240 mg、約170 mg至約230 mg、約180 mg至約220 mg、約190 mg至約210 mg、約195 mg至約205 mg或約198至約207 mg之範圍內。

【1685】有效量之TIL可藉由投予具有類似效用之試劑的任一種公認模式，包含鼻內及經皮途徑、藉由動脈內注射、靜脈內、腹膜內、非經腸、肌肉內、皮下、局部、藉由移植或藉由吸入，以單次或多次劑量投予。

【1686】在其他實施例中，本發明提供一種輸注袋，其包括如上適用的在任何前述段落中描述的治療性TIL群體。

【1687】在其他實施例中，本發明提供一種腫瘤浸潤

性淋巴球(TIL)組成物，其包括如上適用的在任何前述段落中描述的治療性TIL群體及醫藥學上可接受之載劑。

【1688】在其他實施例中，本發明提供一種輸注袋，其包括如上適用的在任何前述段落中描述的TIL組成物。

【1689】在其他實施例中，本發明提供一種如上適用的在任何前述段落中描述的治療性TIL群體的冷凍保存製劑。

【1690】在其他實施例中，本發明提供一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其包括如上適用的在任何前述段落中描述的治療性TIL群體及冷凍保存培養基。

【1691】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的TIL組成物，其中冷凍保存培養基含有DMSO。

【1692】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的TIL組成物，其中冷凍保存培養基包含7%至10% DMSO。

【1693】在一些實施例中，本發明提供在無血清培養基或確定培養基中包括TIL的TIL組成物。在一些實施例中，無血清或確定培養基包括基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，無血清或確定培養基用於防止及/或減少部分因含血清培養基之批次間變化所致之實驗變化。

【1694】在一些實施例中，無血清或確定培養基包括基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些

實施例中，基礎細胞培養基包含但不限於CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CTS™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【1695】在一些實施例中，血清補充劑或血清替代物包含但不限於以下中之一者或多者：CTS™ OpTmizer T細胞擴增血清補充劑、CTS™免疫細胞血清替代物、一種或多種白蛋白或白蛋白取代物、一種或多種胺基酸、一種或多種維生素、一種或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一種或多種抗氧化劑、一種或多種胰島素或胰島素取代物、一種或多種膠原蛋白前驅物、一種或多種抗生素及一種或多種微量元素。在一些實施例中，確定培養基包括白蛋白及一種或多種選自由以下組成之群組的成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分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

Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，確定培養基進一步包括L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或2-巰基乙醇。

【1696】在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞免疫細胞血清替代物與習知生長培養基一起使用，該習知生長培養基包含但不限於CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CST™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【1697】在一些實施例中，以無血清或確定培養基之總體積計，無血清或確定培養基中之總血清替代物濃度(vol%)為約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約3%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約5%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約10%。

【1698】在一些實施例中，無血清或確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™

OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1 L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基及26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑在使用前混合在一起之組合。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。

【1699】在一些實施例中，確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1 L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基及26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑在使用前混合在一起之組合。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM的2-巰基乙醇及2 mM的L-麩醯胺酸。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包括約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包括約3000 IU/mL IL-

2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包括約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包括約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包括約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包括約1000 IU/mL至約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包括約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包括約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包括約6000 IU/mL IL-2。

【1700】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養

基補充有濃度約0.1 mM至約10 mM、0.5 mM至約9 mM、1 mM至約8 mM、2 mM至約7 mM、3 mM至約6 mM或4 mM至約5 mM的麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約2 mM之麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。

【1701】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約5 mM至約150 mM、10 mM至約140 mM、15 mM至約130 mM、20 mM至約120 mM、25 mM至約110 mM、30 mM至約100 mM、35 mM至約95 mM、40 mM至約90 mM、45 mM至約85 mM、50 mM至約80 mM、55 mM至約75 mM、60 mM至約70 mM或約65 mM之2-巯基乙醇。在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約55 mM之2-巯基乙醇。

【1702】在一些實施例中，以引用之方式併入本文中的國際PCT公開案第WO/1998/030679號中所描述之確定培養基可用於本發明。在該公開案中，描述無血清真核細胞培養基。無血清真核細胞培養基包含補充有能夠支持細胞在無血清培養中生長之無血清補充劑的基礎細胞培養基。無血清真核細胞培養基補充劑包括一種或多種選自由以下組成之群組的成分，或藉由組合一種或多種選自由以下組成之群組的成分而獲得：一種或多種白蛋白或白蛋白取代物、一種或多種胺基酸、一種或多種維生素、一種或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一種或多種抗氧化劑、一種或多種胰島素或胰島素取代物、一種或多種膠原蛋白前驅

物、一種或多種微量元素及一種或多種抗生素。在一些實施例中，確定培養基進一步包括L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或β-巰基乙醇。在一些實施例中，確定培養基包括白蛋白或白蛋白取代物及一種或多種選自由以下組成之群組的成分：一種或多種胺基酸、一種或多種維生素、一種或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一種或多種抗氧化劑、一種或多種胰島素或胰島素取代物、一種或多種膠原蛋白前驅物及一種或多種微量元素。在一些實施例中，確定培養基包括白蛋白及一種或多種選自由以下組成之群組的成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分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Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，基礎細胞培養基係選自由以下組成之群組：達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【1703】在一些實施例中，確定培養基中甘胺酸之濃度在約5至200 mg/L之範圍內，L-組胺酸之濃度為約5至250 mg/L，L-異白胺酸之濃度為約5至300 mg/L，L-甲硫

胺酸之濃度為約5至200 mg/L，L-苯丙胺酸之濃度為約5至400 mg/L，L-脯胺酸之濃度為約1至1000 mg/L，L-羥基脯胺酸之濃度為約1至45 mg/L，L-絲胺酸之濃度為約1至250 mg/L，L-蘇胺酸之濃度為約10至500 mg/L，L-色胺酸之濃度為約2至110 mg/L，L-酪胺酸之濃度為約3至175 mg/L，L-纈胺酸之濃度為約5至500 mg/L，硫胺素之濃度為約1至20 mg/L，還原麩胱甘肽之濃度為約1至20 mg/L，L-抗壞血酸-2-磷酸鹽之濃度為約1至200 mg/L，鐵飽和運鐵蛋白之濃度為約1至50 mg/L，胰島素之濃度為約1至100 mg/L，亞硒酸鈉之濃度為約0.000001至0.0001 mg/L，且白蛋白(例如AlbuMAX® I)之濃度為約5000至50,000 mg/L。

【1704】在一些實施例中，確定培養基中之非微量元素部分成分係以表4中標題「1X培養基中之濃度範圍」欄中列出之濃度範圍存在。在其他實施例中，確定培養基中之非微量元素部分成分係以表4中標題「1X培養基之較佳實施例」欄中列出之最終濃度存在。在其他實施例中，確定培養基為包括無血清補充劑之基礎細胞培養基。在一些此等實施例中，無血清補充劑包括表4中的類型及標題「補充劑之較佳實施例」欄中列出之濃度的非微量部分成分。

【1705】在一些實施例中，確定培養基之滲透壓介於約260與350 mOsmol之間。在一些實施例中，滲透壓介於約280與310 mOsmol之間。在一些實施例中，確定培養基補充有至多約3.7 g/L或約2.2 g/L碳酸氫鈉。確定培養基可

進一步補充有L-麩醯胺酸(最終濃度為約2 mM)、一種或多種抗生素、非必需胺基酸(NEAA；最終濃度為約100 μM)、2-巰基乙醇(最終濃度為約100 μM)。

【1706】在一些實施例中，Smith等人，《使用新穎無Xeno CTS免疫細胞血清替代物離體擴增人類T細胞以用於過繼免疫療法》，《臨床轉化免疫學》，4(1) 2015(數位物件識別碼：10.1038/cti.2014.31)中所描述之確定培養基可用於本發明。簡言之，RPMI或CTS™ OpTmizer™用作基礎細胞培養基且補充有0、2%、5%或10% CTS™免疫細胞血清替代物。

【1707】在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基為未經過濾的。使用未經過濾之細胞培養基可簡化擴增細胞數目所需之程序。在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基缺乏β-巰基乙醇(BME或βME；亦稱為2-巰基乙醇，CAS 60-24-2)。

【1708】在其他實施例中，本發明提供一種如上適用之任何前述段落中描述的TIL組成物的冷凍保存製劑。

IV. 治療患者之方法

【1709】治療方法始於原始TIL收集及TIL培養。此類方法均已描述於例如以全文引用之方式併入本文中的Jin等人，《免疫療法雜誌》，**2012**, 35(3):283-292之領域中。下文貫穿各個部分，包含實例，描述了治療方法之實施例。

【1710】發現根據本文所描述之方法，包含例如如上文步驟A至F中所描述或根據上文步驟A至F(亦如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所示)而產生的擴增TIL在治療癌症患者方面的特殊用途(例如，如以全文引用之方式併入本文中的Goff等人，《臨床腫瘤學雜誌》，**2016**, 34(20):2389-239以及補充內容中所描述)。在一些實施例中，如先前描述自經切除轉移性黑色素瘤寄存物生長TIL(參見以全文引用之方式併入本文中的Dudley等人，《免疫療法雜誌》，**2003**, 26:332-342)。可在無菌條件下分割新鮮腫瘤。可收集代表樣本以用於正式病理分析。可使用2 mm^3至3 mm^3之單個碎片。在一些實施例中，自每位患者獲得5、10、15、20、25或30個樣本。在一些實施例中，自每位患者獲得20、25或30個樣本。在一些實施例中，自每位患者獲得20、22、24、26或28個樣本。在一些實施例中，自每位患者獲得24個樣本。可將樣本置於24孔盤之個別孔中，維持於含高劑量IL-2(6,000 IU/mL)之生長培養基中，並監測腫瘤破壞及/或TIL增殖。如本文所描述，可將在處理後剩餘活細胞之任何腫瘤酶碎解成單細胞懸浮液並冷凍保存。

【1711】在一些實施例中，可對成功生長之TIL進行取樣以用於表型分析(CD3、CD4、CD8及CD56)，並在可用時針對自體腫瘤進行測試。若隔夜共培養產生之干擾素-γ(IFN-γ)含量> 200 pg/mL且為背景之兩倍，則可認為TIL具反應性。(Goff等人，《免疫療法雜誌》，**2010**, 33:840-

847；以全文引用之方式併入本文中)。在一些實施例中，可選擇已證明具自體反應性或充足生長模式的培養物用於第二擴增(例如根據圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)之步驟D中所提供之第二擴增，包含有時稱作快速擴增(REP)的第二擴增)。在一些實施例中，選擇具有高自體反應性(例如在第二擴增期間高度增殖)的經擴增TIL用於另外的第二擴增。在一些實施例中，選擇具高自體反應性(例如在如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)之步驟D中所提供之第二擴增期間高度增殖)的TIL用於根據圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)之步驟D的另外之第二擴增。

【1712】在一些實施例中，患者不直接進行ACT(過繼細胞轉移)，例如，在一些實施例中，在腫瘤收集及/或第一擴增之後，不立即利用細胞。在一些實施例中，可冷凍保存且在向患者投予之前2天解凍TIL。在一些實施例中，可冷凍保存且在向患者投予之前1天解凍TIL。在一些實施例中，可冷凍保存且在即將向患者投予之前解凍TIL。

【1713】可藉由針對表面標誌CD3、CD4、CD8、CCR7及CD45RA之流動式細胞測量術(例如FlowJo)(碧迪生物科學)以及藉由本文所描述之任一種方法分析輸注袋TIL之冷凍保存樣本之細胞表型。可藉由使用標準酶聯免疫吸附分析技術量測血清細胞介素。血清IFN-g之升高可定義為>100 pg/mL且超過基線血清IFN-g水準至少4倍或至少3

倍或至少2倍或至少1倍。在一些實施例中，血清IFN-g之升高定義為>1000 pg/mL。在一些實施例中，血清IFN-g之升高定義為>200 pg/mL。在一些實施例中，血清IFN-g之升高定義為>250 pg/mL。在一些實施例中，血清IFN-g之升高定義為>300 pg/mL。在一些實施例中，血清IFN-g之升高定義為>350 pg/mL。在一些實施例中，血清IFN-g之升高定義為>400 pg/mL。在一些實施例中，血清IFN-g之升高定義為>450 pg/mL。在一些實施例中，血清IFN-g之升高定義為>500 pg/mL。在一些實施例中，血清IFN-g之升高定義為>550 pg/mL。在一些實施例中，血清IFN-g之升高定義為>600 pg/mL。在一些實施例中，血清IFN-g之升高定義為>650 pg/mL。在一些實施例中，血清IFN-g之升高定義為>700 pg/mL。在一些實施例中，血清IFN-g之升高定義為>750 pg/mL。在一些實施例中，血清IFN-g之升高定義為>800 pg/mL。在一些實施例中，血清IFN-g之升高定義為>850 pg/mL。在一些實施例中，血清IFN-g之升高定義為>900 pg/mL。在一些實施例中，血清IFN-g之升高定義為>950 pg/mL。在一些實施例中，血清IFN-g之升高定義為>1000 pg/mL。

【1714】在一些實施例中，藉由本文所提供之方法，例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中例示之方法產生的TIL獲得對TIL之臨床功效的驚人改善。在一些實施例中，相較於藉由除本文所描述方法外之方法(包含例如除圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C

及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中例示之方法外的方法)產生的TIL，藉由本文所提供之方法，例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中例示之方法產生的TIL展現增加之臨床功效。在一些實施例中，除本文所描述之方法外的方法包含稱作過程1C及/或第1代(Gen 1)之方法。在一些實施例中，藉由DCR、ORR及/或其他臨床反應量測增加之功效。在一些實施例中，相較於藉由除本文所描述方法外之方法(包含例如除圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中例示之方法外的方法，例如Gen 1過程)產生的TIL，藉由本文所提供之方法，例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中例示之方法產生的TIL展現類似反應時間及安全性概況。

【1715】在一些實施例中，IFN-γ指示治療功效及/或增加之臨床功效。在一些實施例中，用TIL治療的個體之血液中之IFN-γ指示活性TIL。在一些實施例中，採用針對IFN-γ產生之效力分析。IFN-γ產生為細胞毒性潛力的另一種量度。藉由測定由本發明方法製備之TIL治療的個體之血液、血清或離體TIL中之細胞介素IFN-γ含量，可量測IFN-γ產生，該等方法包含如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所描述之方法。在一些實施例中，IFN-γ增加指示對用藉由本發明方法產生之TIL治療的患者之治療功效。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法

的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ增加一倍、兩倍、三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍、十倍或更多倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加一倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加兩倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加三倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加四倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治

療的患者，IFN-γ分泌增加五倍。在一些實施例中，使用Quantikine ELISA套組量測IFN-γ。在一些實施例中，量測用藉由本發明方法，包含如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所描述之方法製備的TIL治療的個體之離體TIL中之IFN-γ。在一些實施例中，量測用藉由本發明方法，包含如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所描述之方法製備的TIL治療的個體之血液中之IFN-γ。在一些實施例中，量測用藉由本發明方法，包含如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所描述之方法製備的TIL治療的個體之TIL血清中之IFN-γ。

【1716】在一些實施例中，相較於藉由其他方法(包含例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中未例示之方法，諸如稱作過程1C方法之方法)產生的TIL，藉由本發明方法，包含如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所描述之方法製備的TIL展現增加之多株性。在一些實施例中，顯著提高之多株性及/或增加之多株性指示治療功效及/或增加之臨床功效。在一些實施例中，多株性係指T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，多株性增加可指示關於投予藉由本發明方法產生之TIL的治療功效。在一些實施例中，相較於使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備的TIL，多株性

增加一倍、兩倍、十倍、100倍、500倍或1000倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加一倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加兩倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加十倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加100倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加500倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/

或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加1000倍。

【1717】功效之量度可包含疾病控制率(DCR)以及總反應率(ORR)，如本領域已知以及本文所描述。

1. 治療癌症及其他疾病之方法

【1718】本文所描述之組成物及方法可用於一種治療疾病之方法中。在一些實施例中，其用於治療過度增生病症。其亦可用於治療如本文及以下段落中所描述之其他病症。

【1719】在一些實施例中，過度增生病症為癌症。在一些實施例中，過度增生病症為實體腫瘤癌症。在一些實施例中，實體腫瘤癌症係選自由以下組成之群組：神經膠母細胞瘤(GBM)、胃腸癌、黑色素瘤、卵巢癌、子宮內膜癌、甲狀腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、腎癌及腎細胞癌。在一些實施例中，過度增生病症為血液惡性病。在一些實施例中，實體腫瘤癌症係選自由以下組成之群組：慢性淋巴球性白血病、急性淋巴母細胞白血病、彌漫性大B細胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤及套細胞淋巴瘤。

【1720】在一些實施例中，癌症為高突變癌症表型。高突變癌症廣泛描述於Campbell等人(《細胞》，171:

1042-1056 (2017)；出於所有目的以全文引用之方式併入本文中)中。在一些實施例中，高突變腫瘤包括每兆鹼基(Mb)9至10個突變。在一些實施例中，小兒高突變腫瘤包括每兆鹼基(Mb)9.91個突變。在一些實施例中，成人高突變腫瘤包括每兆鹼基(Mb)9個突變。在一些實施例中，增強高突變腫瘤包括每兆鹼基(Mb)10至100個突變。在一些實施例中，增強小兒高突變腫瘤包括每兆鹼基(Mb)10至100個突變。在一些實施例中，增強成人高突變腫瘤包括每兆鹼基(Mb)10至100個突變。在一些實施例中，超高突變腫瘤包括每兆鹼基(Mb)大於100個突變。在一些實施例中，小兒超高突變腫瘤包括每兆鹼基(Mb)大於100個突變。在一些實施例中，成人超高突變腫瘤包括每兆鹼基(Mb)大於100個突變。

【1721】在一些實施例中，高突變腫瘤具有複製修復路徑之突變。在一些實施例中，高突變腫瘤具有複製修復相關DNA聚合酶之突變。在一些實施例中，高突變腫瘤具有微衛星不穩定性。在一些實施例中，超高突變腫瘤具有複製修復相關DNA聚合酶之突變且具有微衛星不穩定性。在一些實施例中，腫瘤之高突變與對免疫檢查點抑制劑之反應相關。在一些實施例中，高突變腫瘤對免疫檢查點抑制劑治療具有抗性。在一些實施例中，高突變腫瘤可使用本發明之TIL治療。在一些實施例中，腫瘤之高突變係由環境因素(外在暴露)引起。舉例而言，UV光可為惡性黑色素瘤中大量突變之主要原因(參見例如Pfeifer, G.P.、You,

Y.H.及Besaratinia, A. (2005).《突變研究(Mutat. Res.)》571, 19-31.；Sage, E.(1993).《光化學與光生物學(Photochem. Photobiol.)》57, 163-174.)。在一些實施例中，腫瘤之高突變可歸因於直接突變原暴露而由菸草煙霧中大於60種之肺及喉腫瘤以及其他腫瘤致癌物引起(參見例如Pleasance, E.D.、Stephens, P.J.、O'Meara, S.、McBride, D.J.、Meynert, A.、Jones, D.、Lin, M.L.、Beare, D.、Lau, K.W.、Greenman, C等人(2010).《自然》 463, 184-190)。在一些實施例中，腫瘤之高突變係由已顯示在廣泛範圍之癌症中引起C至T轉換量增加的催化性多肽樣脂蛋白元BmRNA編輯酶(APOBEC)家族成員的失調引起(參見例如Roberts, S.A.、Lawrence, M.S.、Klimczak, L.J.、Grimm, S.A.、Fargo, D.、Stojanov, P.、Kiezun, A.、Kryukov, G.V.、Carter, S.L.、Saksena, G等人(2013).《自然-遺傳學(Nat. Genet.)》45, 970-976)。在一些實施例中，腫瘤之高突變係由缺陷性DNA複製修復引起，該缺陷性DNA複製修復係由損害主要複製酶Pol3及Pold1所進行之校讀的突變造成。在一些實施例中，腫瘤之高突變係由與結腸直腸癌、子宮內膜癌及其他癌症之高突變相關的DNA錯配修復缺陷引起(參見例如Kandoth, C.、Schultz, N.、Cherniack, A.D.、Akbani, R.、Liu, Y.、Shen, H.、Robertson, A.G.、Pashtan, I.、Shen, R.、Benz, C.C等人(2013).《自然》497, 67-73.；Muzny, D.M.、Bainbridge, M.N.、Chang, K.、Dinh, H.H.、Drummond, J.A.、Fowler, G.、Kovar,

C.L.、Lewis, L.R.、Morgan, M.B.、Newsham, I.F.等人(2012).《自然》 487, 330-337)。在一些實施例中，DNA複製修復突變亦發現於癌症易感症候群，諸如組成性或雙對偶錯配修復缺陷(constitutional or biallelic mismatch repair deficiency；CMMRD)、林奇症候群(Lynch syndrome)及聚合酶校讀相關息肉病(PPAP)中。

【1722】在一些實施例中，本發明包含一種用TIL群體治療癌症之方法，其中癌症為高突變癌症。在一些實施例中，本發明包含一種用TIL群體治療癌症之方法，其中癌症為增強高突變癌症。在一些實施例中，本發明包含一種用TIL群體治療癌症之方法，其中癌症為超高突變癌症。

【1723】在一些實施例中，本發明包含一種用TIL群體治療癌症之方法，其中患者在輸注根據本揭示案之TIL之前經非骨髓清除式化療預治療。在一些實施例中，非骨髓清除式化療為環磷醯胺60 mg/kg/d持續2天(在TIL輸注前第27及26天)及氟達拉賓25毫克/平方公尺/天持續5天(在TIL輸注前第27至23天)。在一些實施例中，在根據本揭示案之非骨髓清除式化療及TIL輸注之後(第0天)，患者每8小時以720,000 IU/kg靜脈內接受IL-2的靜脈內輸注以達到生理耐受。

【1724】可使用本領域已知的為人類疾病治療提供指南之各種模型來測試本文所描述之化合物及化合物組合在治療、預防及/或控制所指示疾病或病症中的功效。舉例

而言，用於測定卵巢癌治療功效之模型描述於例如Mullany等人，《內分泌學(*Endocrinology*)》 **2012,** *153*, 1585-92；及Fong等人，《卵巢研究雜誌(*J. Ovarian Res.*)》 **2009**, 2, 12中。用於測定胰臟癌治療功效之模型描述於Herreros-Villanueva等人，《世界胃腸病學雜誌(*World J. Gastroenterol.*)》**2012,** *18*, 1286-1294中。用於測定乳癌治療功效之模型描述於例如Fantozzi,《乳癌研究(*Breast Cancer Res.*)》**2006,** *8*, 212中。用於測定黑色素瘤治療功效之模型描述於例如Damsky等人，《色素細胞及黑色素瘤研究(*Pigment Cell & Melanoma Res.*)》**2010,** *23*,853-859中。用於測定肺癌治療功效之模型描述於例如Meuwissen等人，《基因與發育(*Genes & Development*)》, **2005,** *19*, 643-664中。用於測定肺癌治療功效之模型描述於例如Kim,《臨床與實驗耳鼻喉科學(*Clin. Exp. Otorhinolaryngol.*)》**2009,** *2*, 55-60；及Sano,《頭頸癌腫瘤學(*Head Neck Oncol.*)》**2009,** *1*, 32中。

【1725】在一些實施例中，IFN-γ指示過度增生病症治療之治療功效。在一些實施例中，用TIL治療的個體之血液中之IFN-γ指示活性TIL。在一些實施例中，採用針對IFN-γ產生之效力分析。IFN-γ產生為細胞毒性潛力的另一種量度。藉由測定由本發明方法製備之TIL治療的個體之血液中之細胞介素IFN-γ含量，可量測IFN-γ產生，該等方法包含如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所描述之方法。在一些實施例中，相較於用使用如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)及整個本申請案所例示之稱作Gen 3

過程之方法製備的TIL治療之個體，藉由本發明方法獲得之TIL在用本發明方法之TIL治療的個體之血液中提供增加之IFN-γ。在一些實施例中，IFN-γ增加指示對用藉由本發明方法產生之TIL治療的患者之治療功效。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ增加一倍、兩倍、三倍、四倍或五倍或更多倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加一倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加兩倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加三倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方

法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加四倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加五倍。在一些實施例中，使用Quantikine ELISA套組量測IFN-γ。在一些實施例中，使用Quantikine ELISA套組量測IFN-γ。在一些實施例中，量測來自用藉由本發明方法產生之TIL治療的患者的離體TIL中之IFN-γ。在一些實施例中，量測用藉由本發明方法產生之TIL治療的患者的血液中之IFN-γ。在一些實施例中，量測用藉由本發明方法產生之TIL治療的患者的血清中之IFN-γ。

【1726】在一些實施例中，相較於藉由其他方法(包含例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中未例示之方法，諸如稱作過程1C方法之方法)產生的TIL，藉由本發明方法，包含如例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所描述之方法製備的TIL展現增加之多株性。在一些實施例中，顯著提高之多株性及/或增加之多株性指示對癌症治療之治療功效及/或增加之臨床功效。在一些實施例中，多株性係指T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，多株性增加可指示關於投予藉由本發明方法產生之TIL的治療功效。在一些實施例中，相較於使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C

及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備的TIL，多株性增加一倍、兩倍、十倍、100倍、500倍或1000倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加一倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加兩倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加十倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加100倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加500倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法

(包含例如除體現於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加1000倍。

2. 共同投予方法

【1727】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL，包含例如來源於圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)之步驟A至F中所描述之方法的TIL，可與一種或多種免疫檢查點調節因子(諸如下文所描述之抗體)組合投予。舉例而言，靶向PD-1且可與本發明之TIL共同投予的抗體包含例如但不限於納武單抗(BMS-936558，百時美施貴寶；Opdivo®)、帕博利珠單抗(蘭立珠單抗、MK03475或MK-3475，默克公司；Keytruda®)、人源化抗PD-1抗體JS001(上海君實)、單株抗PD-1抗體TSR-042(Tesaro, Inc.)、皮立珠單抗(抗PD-1 mAb CT-011，Medivation)、抗PD-1單株抗體BGB-A317(百濟神州)，及/或抗PD-1抗體SHR-1210(上海恆瑞)、人類單株抗體REGN2810(再生元)、人類單株抗體MDX-1106(百時美施貴寶)及/或人源化抗PD-1 IgG4抗體PDR001(諾華公司)。在一些實施例中，PD-1抗體係來自選殖株：RMP1-14(大鼠IgG)-BioXcell目錄號BP0146。適合與如本文所描述根據步驟A至F產生的TIL一起用於共同投予方法中的其他適合抗體為揭示於以引用之方式併入本文中的美國專利第8,008,449號中之抗PD-1抗體。在一些實施例中，抗體或

其抗原結合部分特異性結合至PD-L1且抑制其與PD-1之相互作用，從而增加免疫活性。本領域已知的結合至PD-L1且破壞PD-1與PD-L1之相互作用並刺激抗腫瘤免疫反應的任何抗體均適合與如本文所描述根據步驟A至F產生的TIL一起用於共同投予方法中。舉例而言，靶向PD-L1且處於臨床試驗中之抗體包含BMS-936559(百時美施貴寶)及MPDL3280A(基因泰克)。靶向PD-L1之其他適合之抗體揭示於以引用之方式併入本文中的美國專利第7,943,743號中。一般技術者應理解，結合至PD-1或PD-L1、破壞PD-1/PD-L1相互作用且刺激抗腫瘤免疫反應之任何抗體均適合與如本文所描述根據步驟A至F產生的TIL一起用於共同投予方法中。在一些實施例中，當患者患有單獨投予抗PD-1抗體難以治療之癌症類型時，向投予根據步驟A至F產生之TIL之組合的個體共同投予抗PD-1抗體。在一些實施例中，當患者患有難治性黑色素瘤時，向患者投予TIL與抗PD-1之組合。在一些實施例中，當患者患有非小細胞肺癌(NSCLC)時，向患者投予TIL與抗PD-1之組合。

3. PD-1及PD-L1抑制劑

【1728】在一些實施例中，提供給癌症患者之TIL療法可包含單獨用治療性TIL群體治療，或可包含組合治療，包含TIL及一種或多種PD-1及/或PD-L1抑制劑。

【1729】計劃性死亡1(PD-1)為由T細胞、B細胞、自然殺手(NK)T細胞、活化單核球及樹突狀細胞表現之288胺

基酸跨膜免疫檢查點受體蛋白。PD-1，亦稱為CD279，屬於CD28家族，且在人類中係由2號染色體上之Pdcd1基因編碼。PD-1由一個免疫球蛋白(Ig)超家族域、跨膜區及細胞內域組成，該細胞內域含有免疫受體酪胺酸抑制模體(ITIM)及免疫受體酪胺酸切換模體(ITSM)。已知PD-1及其配體(PD-L1及PD-L2)在免疫耐受性中起重要作用，如Keir等人，《免疫學年度評論》2008, 26, 677-704中所描述。PD-1提供負向調節T細胞免疫反應的抑制信號。PD-L1(亦稱為B7-H1或CD274)及PD-L2(亦稱為B7-DC或CD273)表現於腫瘤細胞及基質細胞上，其可能遇到表現PD-1之活化T細胞，導致對T細胞之免疫抑制。PD-L1為由人類9號染色體上之Cd274基因編碼的290胺基酸跨膜蛋白。使用PD-1抑制劑、PD-L1抑制劑及/或PD-L2抑制劑阻斷PD-1與其配體PD-L1及PD-L2之間的相互作用，可克服免疫抗性，如近期臨床研究，諸如Topalian等人，《新英格蘭醫學雜誌(N. Eng. J. Med.)》 2012, 366, 2443-54中所描述之研究所顯示。PD-L1表現於許多腫瘤細胞株上，而PD-L2表現於主要地表現於樹突狀細胞及一些腫瘤株上。除T細胞(其在活化後誘導性表現PD-1)以外，PD-1亦表現於B細胞、自然殺手細胞、巨噬細胞、活化單核球及樹突狀細胞上。

【1730】在一些實施例中，PD-1抑制劑可為本領域已知的任何PD-1抑制劑或PD-1阻斷劑。詳言之，其為在以下段落中更詳細描述的PD-1抑制劑或阻斷劑之一。關於PD-1抑制劑，術語「抑制劑」、「拮抗劑」及「阻斷劑」在本

文中可互換使用。為了避免疑問，本文中提及作為抗體之PD-1抑制劑時可指代化合物或其抗原結合片段、變體、結合物或生物類似物。為了避免疑問，本文中提及PD-1抑制劑時亦可指代小分子化合物或其醫藥學上可接受之鹽、酯、溶劑合物、水合物、共晶體或前藥。

【1731】在一些實施例中，PD-1抑制劑為抗體(亦即抗PD-1抗體)、其片段，包含其Fab片段或單鏈可變片段(scFv)。在一些實施例中，PD-1抑制劑為多株抗體。在一些實施例中，PD-1抑制劑為單株抗體。在一些實施例中，PD-1抑制劑競爭結合PD-1，及/或結合至PD-1上之抗原決定基。在一些實施例中，抗體競爭結合PD-1，及/或結合至PD-1上之抗原決定基。

【1732】在一些實施例中，PD-1抑制劑為如下PD-1抑制劑，該PD-1抑制劑以約100 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約90 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約80 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約70 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約60 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約50 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約40 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約30 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約20 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約10 pM或更低之KD結合人類PD-1，或以約1 pM或更低之KD結合人類PD-1。

【1733】在一些實施例中，PD-1抑制劑為如下PD-1抑制劑，該PD-1抑制劑以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-1、以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類

PD-1、以約8×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-1、以約8.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-1、以約9×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-1、以約9.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-1，或以約1×10^6 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-1。

【1734】在一些實施例中，PD-1抑制劑為如下PD-1抑制劑，該PD-1抑制劑以約2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.1×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.4×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.5×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.6×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1，或以約2.7×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.8×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.9×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1，或以約3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1。

【1735】在一些實施例中，PD-1抑制劑為如下PD-1抑制劑，該PD-1抑制劑以約10 nM或更低之IC_{50}阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約9 nM或更低之IC_{50}阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約8 nM或更低之IC_{50}阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約7 nM或更低之IC_{50}阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約6 nM或更低之IC_{50}阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與

人類PD-1之結合、以約5 nM或更低之IC_{50}阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約4 nM或更低之IC_{50}阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約3 nM或更低之IC_{50}阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約2 nM或更低之IC_{50}阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合，或以約1 nM或更低之IC_{50}阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合。

【1736】在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗(可自百時美施貴寶公司以OPDIVO商購)或其生物類似物、抗原結合片段、結合物或變體。納武單抗為阻斷PD-1受體之完全人類IgG4抗體。在一些實施例中，抗PD-1抗體為免疫球蛋白G4κ抗(人類CD274)抗體。納武單抗經指派化學文摘社(CAS)登記號946414-94-4且亦稱為5C4、BMS-936558、MDX-1106及ONO-4538。納武單抗之製備及特性描述於美國專利第8,008,449號及國際專利公開案第WO 2006/121168號中，該等專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。納武單抗在各種形式之癌症中的臨床安全性及功效已描述於Wang等人，《癌症免疫學研究(Cancer Immunol Res.)》2014, 2, 846-56；Page等人,《年度醫學評論(Ann. Rev. Med.)》, 2014, 65, 185-202；及Weber等人,《臨床腫瘤學雜誌》, 2013, 31, 4311-4318中，該等文獻之揭示內容以引用之方式併入本文中。納武單抗之胺基酸序列闡述於表19中。納武單抗在22-96、140-196、254-314、

360-418、22''-96''、140''-196''、254''-314''及360''-418''處具有重鏈內雙硫鍵；在23'-88'、134'-194'、23'''-88'''及134'''-194'''處具有輕鏈內雙硫鍵；在127-214'、127''-214'''處具有重鏈-輕鏈間雙硫鍵；在219-219''及222-222''處具有重鏈-重鏈間雙硫鍵；且在290、290''處具有N-糖基化位點(H CH2 84.4)。

【1737】在一些實施例中，PD-1抑制劑包括SEQ ID NO:463所載之重鏈及SEQ ID NO:464所載之輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:463及SEQ ID NO:464中所示之序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:463及SEQ ID NO:464中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:463及SEQ ID NO:464中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:463及SEQ ID NO:464中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:463及SEQ ID NO:464中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:463及SEQ ID NO:464中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1738】在一些實施例中，PD-1抑制劑包括納武單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，PD-1

抑制劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:465中所示之序列，且PD-1抑制劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:466中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:465及SEQ ID NO:466中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:465及SEQ ID NO:466中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:465及SEQ ID NO:466中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:465及SEQ ID NO:466中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:465及SEQ ID NO:466中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【1739】在一些實施例中，PD-1抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:467、SEQ ID NO:468及SEQ ID NO:469中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:470、SEQ ID NO:471及SEQ ID NO:472中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：PD-1上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【1740】在一些實施例中，PD-1抑制劑為藥物管理機構參考納武單抗核准之抗PD-1生物類似物單株抗體。在一

些實施例中，生物類似物包括抗PD-1抗體，該抗PD-1抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為納武單抗。在一些實施例中，該一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化，氧化、脫醯胺及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗PD-1抗體，其中該抗PD-1抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為納武單抗。抗PD-1抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為納武單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為納武單抗。

表 19.參考納武單抗之 PD-1 抑制劑的胺基酸序列。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:463 納武單抗重鏈	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSSASTKGPS 120 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS 180 VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP 240 KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT 300 VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC 360 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV 420 MHEALHNHYT QKSLSLSLGK 440
SEQ ID NO:464 納武單抗輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:465 納武單抗可變重鏈	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSS 113
SEQ ID NO:466 納武單抗可變輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIK 107

識別號	序列（單字母胺基酸符號）	
SEQ ID NO:467 納武單抗重鏈 CDR1	NSGMH	5
SEQ ID NO:468 納武單抗重鏈 CDR2	VIWYDGSKRY YADSVKG	17
SEQ ID NO:469 納武單抗重鏈 CDR3	NDDY	4
SEQ ID NO:470 納武單抗輕鏈 CDR1	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID NO:471 納武單抗輕鏈 CDR2	DASNRAT	7
SEQ ID NO:472 納武單抗輕鏈 CDR3	QQSSNWPRT	9

【1741】在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，且納武單抗係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投予。在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，且納武單抗係以如下劑量投予：約0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約1.5 mg/kg、約2 mg/kg、約2.5 mg/kg、約3 mg/kg、約3.5 mg/kg、約4 mg/kg、約4.5 mg/kg、約5 mg/kg、約5.5 mg/kg、約6 mg/kg、約6.5 mg/kg、約7 mg/kg、約7.5 mg/kg、約8 mg/kg、約8.5 mg/kg、約9 mg/kg、約9.5 mg/kg或約10 mg/kg。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投

予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1742】在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，且納武單抗係以約200 mg至約500 mg之劑量投予。在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，且納武單抗係以如下劑量投予：約200 mg、約220 mg、約240 mg、約260 mg、約280 mg、約300 mg、約320 mg、約340 mg、約360 mg、約380 mg、約400 mg、約420 mg、約440 mg、約460 mg、約480 mg或約500 mg。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1743】在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，且每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投予納武單抗。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，

亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1744】在一些實施例中，投予納武單抗以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤。在一些實施例中，投予納武單抗以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤，且每2週以約240 mg進行投予。在一些實施例中，投予納武單抗以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤，且每4週以約480 mg進行投予。在一些實施例中，投予納武單抗以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤，且每3週於同一天投予約1 mg/kg納武單抗，然後投予3 mg/kg伊匹木單抗，持續4次劑量，隨後每2週投予240 mg或每4週投予480 mg納武單抗。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1745】在一些實施例中，投予納武單抗以輔助治療黑色素瘤。在一些實施例中，每2週以約240 mg投予納武單抗以輔助治療黑色素瘤。在一些實施例中，每4週以約480 mg投予納武單抗以輔助治療黑色素瘤。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。

在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1746】在一些實施例中，投予納武單抗以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，每2週以約3 mg/kg投予納武單抗且每6週以約1 mg/kg投予伊匹木單抗，以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，每3週以約360 mg投予納武單抗，加上每6週1 mg/kg伊匹木單抗與2個週期之含鉑雙重化療，以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg或每4週以480 mg投予納武單抗以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1747】在一些實施例中，投予納武單抗以治療小細胞肺癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投予納武單抗以治療小細胞肺癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施

例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1748】在一些實施例中，每3週以約360 mg投予納武單抗且每6週投予1 mg/kg伊匹木單抗，以治療惡性胸膜間皮瘤。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1749】在一些實施例中，投予納武單抗以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投予納武單抗以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投予納武單抗以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，以約3 mg/kg投予納武單抗，然後每3週在同一天以約1 mg/kg投予伊匹木單抗達4次劑量，隨後每2週投予240 mg納武單抗，以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，以約3 mg/kg投予納武單抗，然後每3週在同一天以約1 mg/kg投予伊匹木單抗達4次劑量，隨後每2週投予240 mg、每4週投予480 mg納武單抗，以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納

武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1750】在一些實施例中，投予納武單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤。在一些實施例中，每2週以約240 mg投予納武單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤。在一些實施例中，每4週以約480 mg投予納武單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1751】在一些實施例中，投予納武單抗以治療復發性或轉移性頭頸鱗狀細胞癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投予納武單抗以治療復發性或轉移性頭頸鱗狀細胞癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投予納武單抗以治療復發性或轉移性頭頸鱗狀細胞癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗

投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1752】在一些實施例中，每2週以約240 mg投予納武單抗以治療局部晚期或轉移性尿道上皮癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投予納武單抗以治療局部晚期或轉移性尿道上皮癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1753】在一些實施例中，投予納武單抗以治療高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性結腸直腸癌。在一些實施例中，投予納武單抗以治療成人及小兒患者之高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性結腸直腸癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投予納武單抗以治療≥40 kg之成人及小兒患者之高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性結腸直腸癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投予納武單抗以治療≥40 kg之成人及小兒患者之高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性結腸直腸癌。在一

些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1754】在一些實施例中，每2週以約3 mg/kg投予納武單抗以治療<40 kg之小兒患者之高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性結腸直腸癌。在一些實施例中，以約3 mg/kg投予納武單抗，然後每3週在同一天投予1 mg/kg伊匹木單抗達4次劑量，隨後每2週投予240 mg納武單抗，以治療≥40 kg之成人及小兒患者之高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性結腸直腸癌。在一些實施例中，以約3 mg/kg投予納武單抗，然後每3週在同一天投予1 mg/kg伊匹木單抗達4次劑量，隨後每4週投予480 mg納武單抗，以治療≥40 kg之成人及小兒患者之高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性結腸直腸癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1755】在一些實施例中，投予納武單抗以治療肝細胞癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投予納武單抗以治療肝細胞癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投予納武單抗以治療肝細胞癌。在一些實施例中，以約1 mg/kg投予納武單抗，然後每3週在同一天投予3 mg/kg伊匹木單抗達4次劑量，隨後每2週投予納武單抗240 mg，以治療肝細胞癌。在一些實施例中，以約1 mg/kg投予納武單抗，然後每3週在同一天投予3 mg/kg伊匹木單抗達4次劑量，隨後每4週投予480 mg納武單抗，以治療肝細胞癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1756】在一些實施例中，投予納武單抗以治療食道鱗狀細胞癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投予納武單抗以治療食道鱗狀細胞癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投予納武單抗以治療食道鱗狀細胞癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納

武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1757】在一些實施例中，PD-1抑制劑包括帕博利珠單抗(可自美國新澤西州凱尼爾沃思之默克公司以KEYTRUDA商購)或抗原結合片段、結合物或變體。帕博利珠單抗經指派CAS登記號1374853-91-4且亦稱為蘭立珠單抗、MK-3475及SCH-900475。帕博利珠單抗具有免疫球蛋白G4抗(人類蛋白PDCD1(計劃性細胞死亡1))抗體，含(人類家鼷鼠單株重鏈)雙硫鍵與人類家鼷鼠單株輕鏈二聚體結構。帕博利珠單抗之結構亦可描述為免疫球蛋白G4抗(人類計劃性細胞死亡1)抗體；含人源化小鼠單株[228-L-脯胺酸(H10-S>P)]γ4重鏈(134-218')雙硫鍵與人源化小鼠單株κ輕鏈二聚體(226-226'':229-229'')雙二硫鍵。帕博利珠單抗之特性、用途及製備描述於國際專利公開案第WO 2008/156712 A1號、美國專利第8,354,509號以及美國專利申請公開案第US 2010/0266617 A1號、第US 2013/0108651 A1號及第US 2013/0109843 A2號中，該等專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。帕博利珠單抗在各種形式之癌症中的臨床安全性及功效描述於Fuerst, 《腫瘤學時報(Oncology Times)》, 2014, 36, 35-36；Robert等人, 《柳葉刀(Lancet)》, 2014, 384, 1109-17；及Thomas等人, 《生物治療專家意見(Exp. Opin. Biol. Ther.)》, 2014, 14, 1061-1064中。帕博利珠單抗之胺基酸序列闡述於表20中。帕博利珠單抗包含以下雙硫鍵：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367''-425''；以及以下糖基化位點(N)：Asn-297及Asn-297''。帕博利珠單抗為在Fc區中含穩定化S228P突變的IgG4/κ同型；IgG4鉸鏈區中此突變之插入防止形成IgG4抗體通常觀測到之半分子。帕博利珠單抗在各重鏈之Fc域內於Asn297處異質糖基化，使得完整抗體之分子量為大約149 kDa。帕博利珠單抗之主要糖型為岩藻糖基化去半乳糖基雙線聚糖形式(G0F)。

【1758】在一些實施例中，PD-1抑制劑包括SEQ ID NO:473所載之重鏈及SEQ ID NO:474所載之輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:473及SEQ ID NO:474中所示之序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:473及SEQ ID NO:474中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:473及SEQ ID NO:474中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:473及SEQ ID NO:474中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:473及SEQ ID NO:474中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:473及SEQ ID NO:474中所

示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1759】在一些實施例中，PD-1抑制劑包括帕博利珠單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，PD-1抑制劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:475中所示之序列，且PD-1抑制劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:476中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:475及SEQ ID NO:476中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:475及SEQ ID NO:476中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:475及SEQ ID NO:476中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:475及SEQ ID NO:476中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:475及SEQ ID NO:476中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【1760】在一些實施例中，PD-1抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:477、SEQ ID NO:478及SEQ ID NO:479中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:480、SEQ ID NO:481及SEQ ID NO:482中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：PD-1上與任何前述抗體

相同之抗原決定基。

【1761】在一些實施例中，PD-1抑制劑為藥物管理機構參考帕博利珠單抗核准之抗PD-1生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物包括抗PD-1抗體，該抗PD-1抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為帕博利珠單抗。在一些實施例中，該一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化，氧化、脫醯胺及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗PD-1抗體，其中該抗PD-1抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為帕博利珠單抗。抗PD-1抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為帕博利珠單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為帕博利珠單抗。

表 20.參考帕博利珠單抗之 PD-1 抑制劑的胺基酸序列。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:473 帕博利珠單抗 重鏈	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
SEQ ID NO:474 帕博利珠單抗 輕鏈	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
SEQ ID NO:475 帕博利珠單抗 可變重鏈	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF 60 NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS 120
SEQ ID NO:476 帕博利珠單抗 可變輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI K 111

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:477 帕博利珠單抗重鏈 CDR1	NYYMY 5
SEQ ID NO:478 帕博利珠單抗重鏈 CDR2	GINPSNGGTN FNEKFK 16
SEQ ID NO:479 帕博利珠單抗重鏈 CDR3	RDYRFDMGFD Y 11
SEQ ID NO:480 帕博利珠單抗輕鏈 CDR1	RASKGVSTSG YSYLH 15
SEQ ID NO:481 帕博利珠單抗輕鏈 CDR2	LASYLES 7
SEQ ID NO:482 帕博利珠單抗輕鏈 CDR3	QHSRDLPLT 9

【1762】在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，且帕博利珠單抗係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投予。在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，且帕博利珠單抗係以如下劑量投予：約0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約1.5 mg/kg、約2 mg/kg、約2.5 mg/kg、約3 mg/kg、約3.5 mg/kg、約4 mg/kg、約4.5 mg/kg、約5 mg/kg、約5.5 mg/kg、約6 mg/kg、約6.5 mg/kg、約7 mg/kg、約7.5 mg/kg、約8 mg/kg、約8.5 mg/kg、約9 mg/kg、約9.5 mg/kg或約10 mg/kg。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天

開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1763】在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，其中帕博利珠單抗係以約200 mg至約500 mg之劑量投予。在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，且納武單抗係以如下劑量投予：約200 mg、約220 mg、約240 mg、約260 mg、約280 mg、約300 mg、約320 mg、約340 mg、約360 mg、約380 mg、約400 mg、約420 mg、約440 mg、約460 mg、約480 mg或約500 mg。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1764】在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，其中每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施

例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1765】在一些實施例中，投予帕博利珠單抗以治療黑色素瘤。在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療黑色素瘤。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療黑色素瘤。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1766】在一些實施例中，投予帕博利珠單抗以治療NSCLC。在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療NSCLC。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療NSCLC。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博

利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1767】在一些實施例中，投予帕博利珠單抗以治療小細胞肺癌(SCLC)。在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療SCLC。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療SCLC。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1768】在一些實施例中，投予帕博利珠單抗以治療頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC)。在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療HNSCC。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療HNSCC。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或

3週投予帕博利珠單抗。

【1769】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤(cHL)或原發性縱隔大B細胞淋巴瘤(PMBCL)。在一些實施例中，成人每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤(cHL)或原發性縱隔大B細胞淋巴瘤(PMBCL)。在一些實施例中，小兒每3週以約約2 mg/kg(至多200 mg)投予帕博利珠單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤(cHL)或原發性縱隔大B細胞淋巴瘤(PMBCL)。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1770】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療尿道上皮癌。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療尿道上皮癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕

博利珠單抗。

【1771】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)癌。在一些實施例中，成人每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療MSI-H或dMMR癌。在一些實施例中，小兒每3週以約2 mg/kg(至多200 mg)投予帕博利珠單抗以治療MSI-H或dMMR癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1772】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷結腸直腸癌(dMMR CRC。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療MSI-H或dMMR CRC。在

一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1773】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療胃癌。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療胃癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1774】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療食道癌。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療食道癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博

利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1775】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療子宮頸癌。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療子宮頸癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1776】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療肝細胞癌(HCC)。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療HCC。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1777】在一些實施例中，成人每3週以約200 mg投予

帕博利珠單抗以治療默克氏細胞癌(Merkel cell carcinoma；MCC)。在一些實施例中，成人每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療MCC。在一些實施例中，小兒每3週以約2 mg/kg(至多200 mg)投予帕博利珠單抗以治療MCC。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1778】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療腎細胞癌(RCC)。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗且每天兩次經口投予阿西替尼5 mg以治療RCC。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些

實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1779】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療子宮內膜癌。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗且每天一次經口投予用於非MSI-H或dMMR腫瘤之樂伐替尼20 mg以治療子宮內膜癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1780】在一些實施例中，成人每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療高腫瘤突變負荷(TMB-H)癌症。在一些實施例中，成人每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療TMB-H癌症。在一些實施例中，小兒每3週以約2 mg/kg(至多200 mg)投予帕博利珠單抗以治療TMB-H癌症。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之

前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1781】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療皮膚鱗狀細胞癌(cSCC)。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療cSCC。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1782】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療三陰性乳癌(TNBC)。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療TNBC。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1783】在一些實施例中，若患者或個體為成人，亦

即治療成人適應症，則可採用另外的每6週400 mg之給藥方案。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1784】在一些實施例中，PD-1抑制劑為可商購抗PD-1單株抗體，諸如抗m-PD-1選殖株J43(目錄號BE0033-2)及RMP1-14(目錄號BE0146)(美國新罕布夏州西黎巴嫩的Bio X Cell, Inc.)。多種可商購抗PD-1抗體為本領域一般熟習此項技術者所知。

【1785】在一些實施例中，PD-1抑制劑為揭示於美國專利第8,354,509號或美國專利申請公開案第2010/0266617 A1號、第2013/0108651 A1號、第2013/0109843 A2號中之抗體，該等專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，PD-1抑制劑為描述於美國專利第8,287,856號、第8,580,247號及第8,168,757號以及美國專利申請公開案第2009/0028857 A1號、第2010/0285013 A1號、第2013/0022600 A1號及第2011/0008369 A1號中之抗PD-1抗體，該等專利之教示內容以引用之方式併入本文中。在其他實施例中，PD-1抑制劑為揭示於美國專利第8,735,553 B1號中之抗PD-1抗體，該專利之揭示內容以引

用之方式併入本文中。在一些實施例中，PD-1抑制劑為皮立珠單抗，亦稱為CT-011，其描述於美國專利第8,686,119號中，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1786】在一些實施例中，PD-1抑制劑可為小分子或肽或肽衍生物，諸如美國專利第8,907,053號、第9,096,642號及第9,044,442號以及美國專利申請公開案第US 2015/0087581號中所描述之小分子或肽或肽衍生物；1,2,4-噁二唑化合物及衍生物，諸如美國專利申請公開案第2015/0073024號中所描述之1,2,4-噁二唑化合物及衍生物；環狀肽模擬化合物及衍生物，諸如美國專利申請公開案第US 2015/0073042號中所描述之環狀肽模擬化合物及衍生物；環狀化合物及衍生物，諸如美國專利申請公開案第US 2015/0125491中所描述之環狀化合物及衍生物；1,3,4-噁二唑及1,3,4-噻二唑化合物及衍生物，諸如國際專利申請公開案第WO 2015/033301號中所描述之1,3,4-噁二唑及1,3,4-噻二唑化合物及衍生物；基於肽之化合物及衍生物，諸如國際專利申請公開案第WO 2015/036927號及第WO 2015/04490號中所描述之基於肽之化合物及衍生物；或基於肽之巨環化合物及衍生物，諸如美國專利申請公開案第US 2014/0294898號中所描述之基於肽之巨環化合物及衍生物；該等專利中之每一者之揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

【1787】在一些實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑可為本領域已知的任何PD-L1或PD-L2抑制劑、拮抗劑或阻斷

劑。詳言之，其為在以下段落中更詳細描述的PD-L1或PD-L2抑制劑、拮抗劑或阻斷劑之一。關於PD-L1及PD-L2抑制劑，術語「抑制劑」、「拮抗劑」及「阻斷劑」在本文中可互換使用。為了避免疑問，本文中提及作為抗體之PD-L1或PD-L2抑制劑時可指代化合物或其抗原結合片段、變體、結合物或生物類似物。為了避免疑問，本文中提及PD-L1或PD-L2抑制劑時亦可指代化合物或其醫藥學上可接受之鹽、酯、溶劑合物、水合物、共晶體或前藥。

【1788】在一些實施例中，本文所描述之組成物、過程及方法包含PD-L1或PD-L2抑制劑。在一些實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑為小分子。在一些實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑為抗體(亦即抗PD-1抗體)、其片段，包含其Fab片段或單鏈可變片段(scFv)。在一些實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑為多株抗體。在一些實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑為單株抗體。在一些實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑競爭結合PD-L1或PD-L2及/或結合至PD-L1或PD-L2上之抗原決定基。在一些實施例中，抗體競爭結合PD-L1或PD-L2，及/或結合至PD-L1或PD-L2上之抗原決定基。

【1789】在一些實施例中，本文提供之PD-L1抑制劑對PD-L1具選擇性，因為化合物與PD-L1結合或相互作用之濃度相比其與包含PD-L2受體之其他受體結合或相互作用之濃度低得多。在某些實施例中，化合物以如下結合常數結合至PD-L1受體，該結合常數為相比結合至PD-L2受

體之濃度高至少約2倍之濃度、高約3倍之濃度、高約5倍之濃度、高約10倍之濃度、高約20倍之濃度、高約30倍之濃度、高約50倍之濃度、高約100倍之濃度、高約200倍之濃度、高約300倍之濃度或高約500倍之濃度。

【1790】在一些實施例中，本文提供之PD-L2抑制劑對PD-L2具選擇性，因為化合物與PD-L2結合或相互作用之濃度相比其與包含PD-L1受體之其他受體結合或相互作用之濃度低得多。在某些實施例中，化合物以如下結合常數結合至PD-L2受體，該結合常數為相比結合至PD-L1受體之濃度高至少約2倍之濃度、高約3倍之濃度、高約5倍之濃度、高約10倍之濃度、高約20倍之濃度、高約30倍之濃度、高約50倍之濃度、高約100倍之濃度、高約200倍之濃度、高約300倍之濃度或高約500倍之濃度。

【1791】不受任何理論束縛，咸信腫瘤細胞表現PD-L1，且T細胞表現PD-1。然而，腫瘤細胞對PD-L1之表現不為PD-1或PD-L1抑制劑或阻斷劑之功效所需。在一些實施例中，腫瘤細胞表現PD-L1。在其他實施例中，腫瘤細胞並不表現PD-L1。在一些實施例中，方法可包含PD-1及PD-L1抗體(諸如本文所描述之PD-1及PD-L1抗體)與TIL之組合。可同時或依序投予PD-1及PD-L1抗體與TIL之組合。

【1792】在一些實施例中，PD-L1及/或PD-L2抑制劑為如下PD-L1及/或PD-L2抑制劑，該PD-L1及/或PD-L2抑制劑以約100 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、

以約90 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約80 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約70 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約60 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約50 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約40 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2，或以約30 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2。

【1793】在一些實施例中，PD-L1及/或PD-L2抑制劑為如下PD-L1及/或PD-L2抑制劑，該PD-L1及/或PD-L2抑制劑以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-L1及/或PD-L2、以約8×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-L1及/或PD-L2、以約8.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-L1及/或PD-L2、以約9×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-L1及/或PD-L2、以約9.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-L1及/或PD-L2，或以約1×10^6 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-L1及/或PD-L2。

【1794】在一些實施例中，PD-L1及/或PD-L2抑制劑為如下PD-L1及/或PD-L2抑制劑，該PD-L1及/或PD-L2抑制劑以約2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-L1或PD-L2、以約2.1×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.4×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.5×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.6×10^{-5} 1/s或更慢之

k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.7×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-L1或PD-L2，或以約3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-L1或PD-L2。

【1795】在一些實施例中，PD-L1及/或PD-L2抑制劑為如下PD-L1及/或PD-L2抑制劑，該PD-L1及/或PD-L2抑制劑以約10 nM或更低之IC_{50}阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約9 nM或更低之IC_{50}阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約8 nM或更低之IC_{50}阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約7 nM或更低之IC_{50}阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約6 nM或更低之IC_{50}阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約5 nM或更低之IC_{50}阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約4 nM或更低之IC_{50}阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約3 nM或更低之IC_{50}阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約2 nM或更低之IC_{50}阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合，或以約1 nM或更低之IC_{50}阻斷人類PD-1或阻斷人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合。

【1796】在一些實施例中，PD-L1抑制劑為德瓦魯單抗，亦稱為MEDI4736(其可=自馬里蘭州蓋瑟斯堡阿斯特捷利康製藥公司子公司Medimmune, LLC商購)或其抗原結合片段、結合物或變體。在一些實施例中，PD-L1抑制劑

為揭示於美國專利第8,779,108號或美國專利申請公開案第2013/0034559號中之抗體，該等專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。德瓦魯單抗之臨床功效已描述於Page等人，《年度醫學評論》，2014, 65, 185-202；Brahmer等人，《臨床腫瘤學雜誌》2014, 32, 5s(增刊，摘要8021)；及McDermott等人，《癌症治療評論(Cancer Treatment Rev.)》，2014, 40, 1056-64中。德瓦魯單抗之製備及特性描述於美國專利第8,779,108號中，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。德瓦魯單抗之胺基酸序列闡述於表21中。德瓦魯單抗單株抗體包含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371''-429'處之雙硫鍵；及Asn-301及Asn-301''處之N-糖基化位點。

【1797】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括SEQ ID NO:483所載之重鏈及SEQ ID NO:484所載之輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:483及SEQ ID NO:484中所示之序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:483及SEQ ID NO:484中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:483及SEQ ID NO:484中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括

各自分別與SEQ ID NO:483及SEQ ID NO:484中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:483及SEQ ID NO:484中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:483及SEQ ID NO:484中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1798】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括德瓦魯單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，PD-L1抑制劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:485中所示之序列，且PD-L1抑制劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:486中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:485及SEQ ID NO:486中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:485及SEQ ID NO:486中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:485及SEQ ID NO:486中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:485及SEQ ID NO:486中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:485及SEQ ID NO:486中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【1799】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:487、SEQ ID NO:488及SEQ ID NO:489中所

闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:490、SEQ ID NO:491及SEQ ID NO:492中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：PD-L1上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【1800】在一些實施例中，PD-L1抑制劑為藥物管理機構參考德瓦魯單抗核准之抗PD-L1生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物包括抗PD-L1抗體，該抗PD-L1抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為德瓦魯單抗。在一些實施例中，該一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化，氧化、脫醯胺及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗PD-L1抗體，其中該抗PD-L1抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為德瓦魯單抗。抗PD-L1抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為德瓦魯單抗。在

一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為德瓦魯單抗。

表 21.參考德瓦魯單抗之 PD-L1 抑制劑的胺基酸序列。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:483 德瓦魯單抗重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY 60 VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEFEG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPASIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
SEQ ID NO:484 德瓦魯單抗輕鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN EIVLTQSPGT 60 LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT 120 DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT 180 ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL TLSKADYEKH 240 KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC 265

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:485 德瓦魯單抗可變重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS S 121
SEQ ID NO:486 德瓦魯單抗可變輕鏈	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIK 108
SEQ ID NO:487 德瓦魯單抗重鏈 CDR1	RYWMS 5
SEQ ID NO:488 德瓦魯單抗重鏈 CDR2	NIKQDGSEKY YVDSVKG 17
SEQ ID NO:489 德瓦魯單抗重鏈 CDR3	EGGWFGELAF DY 12
SEQ ID NO:490 德瓦魯單抗輕鏈 CDR1	RASQRVSSSY LA 12
SEQ ID NO:491 德瓦魯單抗輕鏈 CDR2	DASSRAT 7
SEQ ID NO:492 德瓦魯單抗輕鏈 CDR3	QQYGSLPWT 9

【1801】在一些實施例中，PD-L1抑制劑為阿維魯單抗，亦稱為MSB0010718C(可自默克集團/雪蘭諾商購)或其抗原結合片段、結合物或變體。阿維魯單抗之製備及特性描述於美國專利申請公開案第US 2014/0341917 A1號中，該專利之揭示內容特別以引用之方式併入本文中。阿維魯單抗之胺基酸序列闡述於表22中。阿維魯單抗具有22-96、147-203、264-324、370-428、22''-96''、147''-203''、264''-324''及370''-428''處之重鏈內雙硫鍵(C23-C104)；22'-90'、138'-197'、22'''-90'''及138'''-197'''處之輕鏈內雙硫鍵(C23-C104)；223-215' 及223''-215'''處之重鏈-輕鏈內雙硫鍵(h 5-CL 126)；229-229''及232-232''處之重鏈-重鏈內雙硫鍵(h 11，h 14)；300、300''處之N-糖基化位點(H CH2 N84.4)；岩藻糖基化複合物雙線CHO類聚糖；及450及450'處之H CHS K2 C端離胺酸裁剪。

【1802】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括SEQ ID NO:493所載之重鏈及SEQ ID NO:494所載之輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:493及SEQ ID NO:494中所示之序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:493及SEQ ID NO:494中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:493及SEQ ID NO:494中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括

各自分別與SEQ ID NO:493及SEQ ID NO:494中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:493及SEQ ID NO:494中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:493及SEQ ID NO:494中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1803】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括阿維魯單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，PD-L1抑制劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:495中所示之序列，且PD-L1抑制劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:496中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:495及SEQ ID NO:496中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:496及SEQ ID NO:496中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:495及SEQ ID NO:496中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:495及SEQ ID NO:496中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:495及SEQ ID NO:496中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【1804】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:497、SEQ ID NO:498及SEQ ID NO:499中所

闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:500、SEQ ID NO:501及SEQ ID NO:502中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：PD-L1上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【1805】在一些實施例中，PD-L1抑制劑為藥物管理機構參考阿維魯單抗核准之抗PD-L1生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物包括抗PD-L1抗體，該抗PD-L1抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為阿維魯單抗。在一些實施例中，該一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化，氧化、脫醯胺及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗PD-L1抗體，其中該抗PD-L1抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為阿維魯單抗。抗PD-L1抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為阿維魯單抗。在

一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為阿維魯單抗。

表 22.參考阿維魯單抗之 PD-L1 抑制劑的胺基酸序列。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:493 阿維魯單抗重鏈	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY 60 ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS 120 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 180 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO:494 阿維魯單抗輕鏈	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV 60 SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL GQPKANPTVT 120 LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNNKYAASS 180 YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS 216
SEQ ID NO:495 阿維魯單抗可變重鏈	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY 60 ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS 120
SEQ ID NO:496 阿維魯單抗可變輕鏈	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV 60 SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL 110

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:497 阿維魯單抗 重鏈 CDR1	SYIMM 5
SEQ ID NO:498 阿維魯單抗 重鏈 CDR2	SIYPSGGITF YADTVKG 17
SEQ ID NO:499 阿維魯單抗 重鏈 CDR3	IKLGTVTTVD Y 11
SEQ ID NO:500 阿維魯單抗 輕鏈 CDR1	TGTSSDVGGY NYVS 14
SEQ ID NO:501 阿維魯單抗 輕鏈 CDR2	DVSNRPS 7
SEQ ID NO:502 阿維魯單抗 輕鏈 CDR3	SSYTSSSTRV 10

【1806】在一些實施例中，PD-L1抑制劑為阿特珠單抗，亦稱為MPDL3280A或RG7446(其可自瑞士巴塞爾羅氏之子公司基因泰克公司以TECENTRIQ商購)或其抗原結合片段、結合物或變體。在一些實施例中，PD-L1抑制劑為揭示於美國專利第8,217,149號中之抗體，該專利之揭示內容特別以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，PD-

L1抑制劑為揭示於美國專利申請公開案第2010/0203056 A1號、第2013/0045200 A1號、第2013/0045201 A1號、第2013/0045202 A1號或第2014/0065135 A1號中之抗體，該等專利之揭示內容特別以引用之方式併入本文中。阿替利珠單抗之製備及特性描述於美國專利第8,217,149號中，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。阿替利珠單抗之胺基酸序列闡述於表23中。阿替利珠單抗具有22-96、145-201、262-322、368-426、22''-96''、145''-201''、262''-322''及368''-426''處之重鏈內雙硫鍵(C23-C104)；23'-88'、134'-194'、23'''-88'''及134'''-194'''處之輕鏈內雙硫鍵(C23-C104)；221-214'及221''-214'''處之重鏈-輕鏈內雙硫鍵(h 5-CL 126)；227-227''及230-230''處之重鏈-重鏈內雙硫鍵(h 11，h 14)；及298及298'處之N-糖基化位點(H CH2 N84.4>A)。

【1807】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括SEQ ID NO:503所載之重鏈及SEQ ID NO:504所載之輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:503及SEQ ID NO:504中所示之序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:503及SEQ ID NO:504中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:503及SEQ ID NO:504中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括

各自分別與SEQ ID NO:503及SEQ ID NO:504中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:503及SEQ ID NO:504中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:503及SEQ ID NO:504中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1808】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括阿替利珠單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，PD-L1抑制劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:505中所示之序列，且PD-L1抑制劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:506中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:505及SEQ ID NO:506中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:505及SEQ ID NO:506中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:505及SEQ ID NO:506中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:505及SEQ ID NO:506中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:505及SEQ ID NO:506中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【1809】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:507、SEQ ID NO:508及SEQ ID NO:509中所

闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:510、SEQ ID NO:511及SEQ ID NO:512中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：PD-L1上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【1810】在一些實施例中，抗PD-L1抗體為藥物管理機構參考阿替利珠單抗核准之抗PD-L1生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物包括抗PD-L1抗體，該抗PD-L1抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為阿替利珠單抗。在一些實施例中，該一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化，氧化、脫醯胺及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗PD-L1抗體，其中該抗PD-L1抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為阿替利珠單抗。抗PD-L1抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為阿替利

珠單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為阿替利珠單抗。

表 23.參考阿替利珠單抗之 PD-L1 抑制劑的胺基酸序列。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:503 阿替利珠單抗重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYAST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
SEQ ID NO:504 阿替利珠單抗輕鏈	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:505 阿替利珠單抗可變重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSA 118
SEQ ID NO:506 阿替利珠單抗可變輕鏈	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKR 108

識別號	序列（單字母胺基酸符號）	
SEQ ID NO:507 阿替利珠單抗重鏈 CDR1	GFTFSDSWIH	10
SEQ ID NO:508 阿替利珠單抗重鏈 CDR2	AWISPYGGST YYADSVKG	18
SEQ ID NO:509 阿替利珠單抗重鏈 CDR3	RHWPGGFDY	9
SEQ ID NO:510 阿替利珠單抗輕鏈 CDR1	RASQDVSTAV A	11
SEQ ID NO:511 阿替利珠單抗輕鏈 CDR2	SASFLYS	7
SEQ ID NO:512 阿替利珠單抗輕鏈 CDR3	QQYLYHPAT	9

【1811】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含美國專利申請公開案第US 2014/0341917 A1號中所描述之彼等抗體，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。在其他實施例中，亦包含與此等抗體中之任一種競爭結合至PD-L1的抗體。在一些實施例中，抗PD-L1抗體為MDX-1105，亦稱為BMS-935559，其揭示於美國專利第US

7,943,743號中，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，抗PD-L1抗體係選自揭示於美國專利第US 7,943,743號中之抗PD-L1抗體，該專利以引用之方式併入本文中。

【1812】在一些實施例中，PD-L1抑制劑為可商購單株抗體，諸如INVIVOMAB抗m-PD-L1選殖株10F.9G2(目錄號BE0101，美國新罕布夏州西黎巴嫩的Bio X Cell, Inc.)。在一些實施例中，抗PD-L1抗體為可商購單株抗體，諸如AFFYMETRIX EBIOSCIENCE(MIH1)。多種可商購抗PD-L1抗體為本領域一般熟習此項技術者所知。

【1813】在一些實施例中，PD-L2抑制劑為可商購單株抗體，諸如BIOLEGEND 24F.10C12小鼠IgG2aκ同型(目錄號329602，加利福尼亞聖地亞哥Biolegend, Inc.)、SIGMA抗PD-L2抗體(目錄號SAB3500395，密蘇里州聖路易斯西格瑪奧瑞奇公司)或本領域一般熟習此項技術者已知的其他可商購抗PD-L2抗體。

4. CTLA-4抑制劑

【1814】在一些實施例中，提供給癌症患者之TIL療法可包含單獨用治療性TIL群體治療，或可包含組合治療，包含TIL及一種或多種CTLA-4抑制劑。

【1815】細胞毒性T淋巴球抗原4(CTLA-4)為免疫球蛋白超家族成員且表現於輔助T細胞表面上。CTLA-4為CD28依賴性T細胞活化之負向調節因子且充當適應性免疫

反應之檢查點。類似於T細胞共刺激蛋白CD28，CTLA-4結合抗原在細胞上呈現CD80及CD86。CTLA-4將抑制因子信號遞送至T細胞，而CD28遞送刺激信號。針對人類CTLA-4之人類抗體已描述為許多疾病病狀之免疫刺激調節劑，諸如治療或預防病毒及細菌感染且治療癌症(WO 01/14424及WO 00/37504)。各種臨床前研究已顯示諸如單株抗體之CTLA-4抑制劑對CTLA-4之阻斷增強針對免疫原性腫瘤的宿主免疫反應且甚至可以消除已形成腫瘤。已在臨床試驗中針對治療各種類型的實體腫瘤研究了多種完全人類抗人類CTLA-4單株抗體(mAb)，該等抗體包含但不限於伊匹木單抗(MDX-010)及曲美單抗(CP-675,206)。

【1816】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑可為本領域已知的任何CTLA-4抑制劑或CTLA-4阻斷劑。詳言之，其為在以下段落中更詳細描述的CTLA-4抑制劑或阻斷劑之一。關於CTLA-4抑制劑，術語「抑制劑」、「拮抗劑」及「阻斷劑」在本文中可互換使用。為了避免疑問，本文中提及作為抗體之CTLA-4抑制劑時可指代化合物或其抗原結合片段、變體、結合物或生物類似物。為了避免疑問，本文中提及CTLA-4抑制劑時亦可指代小分子化合物或其醫藥學上可接受之鹽、酯、溶劑合物、水合物、共晶體或前藥。

【1817】適用於本發明之方法的CTLA-4抑制劑包含但不限於抗CTLA-4抗體、人類抗CTLA-4抗體、小鼠抗CTLA-4抗體、哺乳動物抗CTLA-4抗體、人源化抗CTLA-4

抗體、單株抗CTLA-4抗體、多株抗CTLA-4抗體、嵌合抗CTLA-4抗體、MDX-010(伊匹木單抗)、曲美單抗、抗CD28抗體、抗CTLA-4阿德奈汀、抗CTLA-4域抗體、單鏈抗CTLA-4片段、重鏈抗CTLA-4片段、輕鏈抗CTLA-4片段、促效共刺激路徑之CTLA-4抑制劑、揭示於PCT公開案第WO 2001/014424號中之抗體、揭示於PCT公開案第WO 2004/035607號中之抗體、揭示於美國公開案第2005/0201994號中之抗體及揭示於授與歐洲專利第EP 1212422 B1號中之抗體，該等專利中之每一者的揭示內容以引用之方式併入本文中。另外的CTLA-4抗體描述於美國專利第5,811,097號、第5,855,887號、第6,051,227號及第6,984,720號中；PCT公開案第WO 01/14424號及第WO 00/37504號中；及美國公開案第2002/0039581號及第2002/086014號中，該等專利中之每一者的揭示內容以引用之方式併入本文中。可用於本發明方法中之其他抗CTLA-4抗體包含例如揭示於以下中之抗體：WO 98/42752；美國專利第6,682,736號及第6,207,156號；Hurwitz等人，《美國國家科學院院刊》，95(17):10067-10071(1998)；Camacho等人，《臨床腫瘤學雜誌》，22(145): 摘要號2505(2004)(抗體CP-675206)；Mokyr等人，《癌症研究》，58:5301-5304(1998)；及美國專利第5,977,318號、第6,682,736號、第7,109,003號及第7,132,281號，該等專利中之每一者的揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1818】另外的CTLA-4抑制劑包含但不限於以下：通常由於經活化而能夠破壞CD28抗原結合至其同源配體之能力、抑制CTLA-4結合至其同源配體之能力、增強經由共刺激路徑之T細胞反應、破壞B7結合至CD28及/或CTLA-4之能力、破壞B7活化共刺激路徑之能力、破壞CD80結合至CD28及/或CTLA-4之能力、破壞CD80活化共刺激路徑之能力、破壞CD86結合至CD28及/或CTLA-4之能力、破壞CD86活化共刺激路徑之能力及破壞共刺激路徑的任何抑制劑。此必定包含：CD28、CD80、CD86、CTLA-4以及共刺激路徑之其他成員之小分子抑制劑；針對CD28、CD80、CD86、CTLA-4以及共刺激路徑之其他成員的抗體；針對CD28、CD80、CD86、CTLA-4以及共刺激路徑之其他成員的反義分子；針對CD28、CD80、CD86、CTLA-4以及共刺激路徑之其他成員的阿德奈汀；CD28、CD80、CD86、CTLA-4以及共刺激路徑之其他成員的RNAi抑制劑(單股及雙股)；以及其他CTLA-4抑制劑。

【1819】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑以如下Kd結合至CTLA-4，該Kd為約10^{-6} M或更小、10^{-7} M或更小、10^{-8} M或更小、10^{-9} M或更小、10^{-10} M或更小、10^{-11} M或更小、10^{-12} M或更小，例如10^{-13} M與10^{-16} M之間，或在任兩個前述值作為端點的任何範圍內。在一些實施例中，當使用相同分析比較時，CTLA-4抑制劑結合至CTLA-4的Kd不超過伊匹木單抗之Kd之10倍。在一些實施例中，當使用相同分析比較時，CTLA-4抑制劑結合至CTLA-4的Kd

與伊匹木單抗之Kd大致相同或更小(例如低至多10倍或低至多100倍)。在一些實施例中，當使用相同分析比較時，與CTLA-4分別與CD80或CD86結合的伊匹木單抗介導之抑制的IC_{50}值相比，CTLA-4抑制劑抑制CTLA-4與CD80或CD86之結合的IC_{50}值高不超過10倍。在一些實施例中，當使用相同分析比較時，與CTLA-4分別與CD80或CD86結合的伊匹木單抗介導之抑制的IC_{50}值相比，CTLA-4抑制劑抑制CTLA-4與CD80或CD86之結合的IC_{50}值大致相同或更小(例如，低至多10倍或低至多100倍)。

【1820】在一些實施例中，以如下量使用CTLA-4抑制劑，該量足以相對於適合之對照將CTLA-4之表現抑制及/或使CTLA-4之生物活性降低至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%，例如50%與75%、75%與90%或90%與100%之間。在一些實施例中，以如下量使用CTLA-4路徑抑制劑，該量足以藉由使CTLA-4與CD80、CD86或兩者之結合相對於適合之對照減少至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%，例如相對於適合之對照減少50%與75%、75%與90%或90%與100%之間來降低CTLA-4之生物活性。在評定或量化所關注之藥劑之效應的上下文中之適合對照通常為尚未暴露於所關注之藥劑(例如CTLA-4路徑抑制劑)或用該藥劑處理的相當之生物系統(例如細胞或個體)(或已暴露於可忽略量或用可忽略量進行處理)。在一些實施例中，生物系統可充當其自身之對照，例如可在暴露於藥劑或用藥

劑處理之前評定生物系統並與開始或結束暴露或處理之後的狀態進行比較。在一些實施例中，可使用歷史對照。

【1821】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗(可自百時美施貴寶公司以Yervoy商購)或其生物類似物、抗原結合片段、結合物或變體。如本領域中已知，伊匹木單抗係指抗CTLA-4抗體，一種來源於具有編碼重鏈及輕鏈之人類基因以產生功能性人類譜系之轉殖基因小鼠的完全人類IgG1κ抗體。伊匹木單抗亦可藉由其CAS登記號477202-00-9及在PCT公開案第WO 01/14424中提及，該公開案出於所有目的以全文引用之方式併入。其以抗體10DI之形式揭示。特定言之，伊匹木單抗含有輕鏈可變區及重鏈可變區(具有包括SEQ ID NO:516之輕鏈可變區且具有包括SEQ ID NO:515之重鏈可變區)。表示特異性結合於CTLA-4之人類單株抗體或其抗原結合位點。伊匹木單抗之醫藥組成物包含含有伊匹木單抗及一種或多種稀釋劑、媒劑及/或賦形劑的所有醫藥學上可接受之組成物。含有伊匹木單抗之醫藥組成物之實例描述於PCT公開案第WO 2007/67959號中。伊匹木單抗可靜脈內(IV)投予。

【1822】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括SEQ ID NO:513所載之重鏈及SEQ ID NO:514所載之輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:513及SEQ ID NO:514中所示之序列的重鏈及輕鏈或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID

NO:513及SEQ ID NO:514中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:513及SEQ ID NO:514中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:513及SEQ ID NO:514中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:513及SEQ ID NO:514中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:513及SEQ ID NO:514中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1823】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括伊匹木單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:515中所示之序列，且CTLA-4抑制劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:516中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:515及SEQ ID NO:516中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:515及SEQ ID NO:516中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:515及SEQ ID NO:516中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:515及SEQ ID NO:516中所示

之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:515及SEQ ID NO:516中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【1824】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:517、SEQ ID NO:518及SEQ ID NO:519中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:520、SEQ ID NO:521及SEQ ID NO:522中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：CTLA-4上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【1825】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為藥物管理機構參考伊匹木單抗核准之CTLA-4生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物包括抗CTLA-4抗體，該抗CTLA-4抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為伊匹木單抗。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗CTLA-4抗體，其中該抗CTLA-4抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為

伊匹木單抗。抗CTLA-4抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為伊匹木單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為伊匹木單抗。

表 24.伊匹木單抗之胺基酸序列。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:513 伊匹木單抗重鏈	1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNNKYY 61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSSAS 121 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 181 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTH
SEQ ID NO:514 伊匹木單抗輕鏈	1 EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 61 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP 121 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL 181 TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC
SEQ ID NO:515 伊匹木單抗可變重鏈	1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNNKYY 61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSS
SEQ ID NO:516 伊匹木單抗可變輕鏈	1 EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 61 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIK
SEQ ID NO:517 伊匹木單抗重鏈 CDR1	GFTFSSYT 8
SEQ ID NO:518 伊匹木單抗重鏈 CDR2	TFISYDGNNK 10

識別號	序列（單字母胺基酸符號）	
SEQ ID NO:519 伊匹木單抗重鏈 CDR3	ARTGWLGPFD Y	11
SEQ ID NO:520 伊匹木單抗輕鏈 CDR1	QSVGSSY	7
SEQ ID NO:521 伊匹木單抗輕鏈 CDR2	GAF	3
SEQ ID NO:522 伊匹木單抗輕鏈 CDR3	QQYGSSPWT	9

【1826】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且伊匹木單抗係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投予。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且伊匹木單抗係以如下劑量投予：約 0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約1.5 mg/kg、約2 mg/kg、約2.5 mg/kg、約3 mg/kg、約3.5 mg/kg、約4 mg/kg、約4.5 mg/kg、約5 mg/kg、約5.5 mg/kg、約6 mg/kg、約6.5 mg/kg、約7 mg/kg、約7.5 mg/kg、約8 mg/kg、約8.5 mg/kg、約9 mg/kg、約9.5 mg/kg或約10 mg/kg。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投予。

【1827】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，其中伊匹木單抗係以約200 mg至約500 mg之劑量投予。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且伊匹木單抗係以如下劑量投予：約200 mg、約220 mg、約240 mg、約260 mg、約280 mg、約300 mg、約320 mg、約340 mg、約360 mg、約380 mg、約400 mg、約420 mg、約440 mg、約460 mg、約480 mg或約 500 mg。在一些實施例中，在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投予。

【1828】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投予伊匹木單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投予。

【1829】在一些實施例中，投予伊匹木單抗以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤。在一些實施例中，每3週以約mg/kg投予伊匹木單抗，持續最多4次劑量以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或

5週開始伊匹木單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投予。

【1830】在一些實施例中，投予伊匹木單抗以輔助治療黑色素瘤。在一些實施例中，每3週以約10 mg/kg投予伊匹木單抗，持續4次劑量，然後每12週投予10 mg/kg，持續至多3年，以輔助治療黑色素瘤。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投予。

【1831】在一些實施例中，投予伊匹木單抗以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，每3週以約1 mg/kg投予伊匹木單抗，緊接著在同一天投予3 mg/kg納武單抗，持續4次劑量，以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，在完成組合之4次劑量之後，可根據標準給藥方案針對晚期腎細胞癌及/或腎細胞癌以單一試劑形式投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投予。

【1832】在一些實施例中，投予伊匹木單抗以治療高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性結腸直腸癌。在一些實施例中，每3週經30分鐘以約1 mg/kg

靜脈內投予伊匹木單抗，緊接著在同一天經30分鐘靜脈內投予3 mg/kg納武單抗，持續4次劑量，以治療高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性結腸直腸癌。在一些實施例中，在完成組成物之4次劑量之後，如根據標準給藥方案所推薦針對高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性結腸直腸癌以單一試劑形式投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投予。

【1833】在一些實施例中，投予伊匹木單抗以治療肝細胞癌。在一些實施例中，每3週經30分鐘以約3 mg/kg靜脈內投予伊匹木單抗，緊接著在同一天經30分鐘靜脈內投予1 mg/kg納武單抗，持續4次劑量，以治療肝細胞癌。在一些實施例中，在完成組合之4次劑量之後，根據標準給藥方案針對肝細胞癌以單一試劑形式投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投予。

【1834】在一些實施例中，投予伊匹木單抗以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，每6週以約1 mg/kg投予伊匹木單抗且每2週投予3 mg/kg納武單抗，以治療轉

移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，每6週以約1 mg/kg投予伊匹木單抗，加上每3週360 mg納武單抗與2個週期之含鉑雙重化療，以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投予。

【1835】在一些實施例中，投予伊匹木單抗以治療惡性胸膜間皮瘤。在一些實施例中，每6週以約1 mg/kg投予伊匹木單抗且每3週投予360 mg納武單抗，以治療惡性胸膜間皮瘤。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投予。

【1836】曲美單抗(亦稱為CP-675,206)為完全人類IgG2單株抗體且CAS編號為745013-59-6。曲美單抗以抗體11.2.1形式揭示於美國專利第6,682,736號(以引用之方式併入本文中)中。曲美單抗之重鏈及輕鏈之胺基酸序列分別闡述於SEQ IND NO:xx及xx中。已在臨床試驗中針對治療包含黑色素瘤及乳癌之各種腫瘤研究了曲美單抗；其中每4或12週以0.01與15 mg/kg之間的劑量範圍呈單次劑量或多次劑量靜脈內投予曲美單抗。在本發明提供之方案中，局部投予，尤其是皮內或皮下投予曲美單抗。皮內或皮下投

予之曲美單抗的有效量通常在每人5-200毫克/劑的範圍內。在一些實施例中，曲美單抗之有效量在每人每劑10-150毫克/劑的範圍內。在一些特定實施例中，曲美單抗之有效量為每人約10、25、37.5、40、50、75、100、125、150、175或200毫克/劑。

【1837】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括SEQ ID NO:523所載之重鏈及SEQ ID NO:524所載之輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:523及SEQ ID NO:524中所示之序列的重鏈及輕鏈或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:523及SEQ ID NO:524中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:523及SEQ ID NO:524中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:523及SEQ ID NO:524中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:523及SEQ ID NO:524中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:523及SEQ ID NO:524中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1838】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括曲美單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，

CTLA-4抑制劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:525中所示之序列，且CTLA-4抑制劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:526中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:525及SEQ ID NO:526中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:525及SEQ ID NO:526中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:525及SEQ ID NO:526中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:525及SEQ ID NO:526中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:525及SEQ ID NO:526中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【1839】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:527、SEQ ID NO:528及SEQ ID NO:529中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:530、SEQ ID NO:531及SEQ ID NO:532中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：CTLA-4上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【1840】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為藥物管理機構參考曲美單抗核准之抗CTLA-4生物類似物單株抗

體。在一些實施例中，生物類似物包括抗CTLA-4抗體，該抗CTLA-4抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為曲美單抗。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗CTLA-4抗體，其中該抗CTLA-4抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為曲美單抗。抗CTLA-4抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為曲美單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為曲美單抗。

表 25.曲美單抗之胺基酸序列。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:523 曲美單抗重鏈	1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY 61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP RGATLYYYYY GMDVWGQGTT 121 VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA 181 VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVERKCCVE CPPCPAPPVA 241 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF 301 NSTFRVVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE 361 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 421 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K
SEQ ID NO:524 曲美單抗輕鏈	1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIN SYLDWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS 61 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYSTPFTFGP GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 121 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 181 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
SEQ ID NO:525 曲美單抗可變重鏈	1 GVVQPGRSLR LSCAASGFTF SSYGMHWVRQ APGKGLEWVA VIWYDGSNKY YADSVKGRFT 61 ISRDNSKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCARD PRGATLYYYY YGMDVWGQGT TVTVSSASTK 121 GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVH
SEQ ID NO:526 曲美單抗可變輕鏈	1 PSSLSASVGD RVTITCRASQ SINSYLDWYQ QKPGKAPKLL IYAASSLQSG VPSRFSGSGS 61 GTDFTLTISS LQPEDFATYY CQQYYSTPFT FGPGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS 121 GTASVVCLLN NFYPREAKV

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:527 曲美單抗重鏈 CDR1	GFTFSSYGMH 10
SEQ ID NO:528 曲美單抗重鏈 CDR2	VIWYDGSNKY YADSV 15
SEQ ID NO:529 曲美單抗重鏈 CDR3	DPRGATLYYY YYGMDV 16
SEQ ID NO:530 曲美單抗輕鏈 CDR1	RASQSINSYL D 11
SEQ ID NO:531 曲美單抗輕鏈 CDR2	AASSLQS 7
SEQ ID NO:532 曲美單抗輕鏈 CDR3	QQYYSTPFT 9

【1841】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，且曲美單抗係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投予。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，且曲美單抗係以如下劑量投予：約0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約1.5 mg/kg、約2 mg/kg、約2.5 mg/kg、約3 mg/kg、約3.5 mg/kg、約4 mg/kg、約4.5

mg/kg、約5 mg/kg、約5.5 mg/kg、約6 mg/kg、約6.5 mg/kg、約7 mg/kg、約7.5 mg/kg、約8 mg/kg、約8.5 mg/kg、約9 mg/kg、約9.5 mg/kg或約10 mg/kg。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始曲美單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始曲美單抗投予。

【1842】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，其中曲美單抗係以約200 mg至約500 mg之劑量投予。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，且曲美單抗係以如下劑量投予：約200 mg、約220 mg、約240 mg、約260 mg、約280 mg、約300 mg、約320 mg、約340 mg、約360 mg、約380 mg、約400 mg、約420 mg、約440 mg、約460 mg、約480 mg或約500 mg。在一些實施例中，在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始曲美單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始曲美單抗投予。

【1843】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，且每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投予曲美單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始曲美單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始曲

美單抗投予。

【1844】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為來自Adgenus之澤弗利單抗或其生物類似物、抗原結合片段、結合物或變體。澤弗利單抗為完全人類單株抗體。澤弗利單抗經指派化學文摘社(CAS)登記號2148321-69-9且亦稱為亦稱為AGEN1884。澤弗利單抗之製備及特性描述於美國專利第10,144,779號及美國專利申請公開案第US2020/0024350 A1號中，該等專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1845】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括SEQ ID NO:533所載之重鏈及SEQ ID NO:534所載之輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:533及SEQ ID NO:534中所示之序列的重鏈及輕鏈或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:533及SEQ ID NO:534中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:533及SEQ ID NO:534中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:533及SEQ ID NO:534中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:533及SEQ ID NO:534中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:533

及SEQ ID NO:534中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1846】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括澤弗利單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:535中所示之序列，且CTLA-4抑制劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:536中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:535及SEQ ID NO:536中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:535及SEQ ID NO:536中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:535及SEQ ID NO:536中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:535及SEQ ID NO:536中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:535及SEQ ID NO:536中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【1847】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:536、SEQ ID NO:538及SEQ ID NO:539中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:540、SEQ ID NO:541及SEQ ID NO:542中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭

以與以下結合及/或結合至以下：CTLA-4上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【1848】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為藥物管理機構參考澤弗利單抗核准之CTLA-4生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物包括抗CTLA-4抗體，該抗CTLA-4抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為澤弗利單抗。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗CTLA-4抗體，其中該抗CTLA-4抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為澤弗利單抗。抗CTLA-4抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為澤弗利單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組成物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為澤弗利單抗。

表 26.澤弗利單抗之胺基酸序列。

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:533 澤弗利單抗重鏈	1 EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 61 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSSAS 121 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 181 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS 241 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 301 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT 361 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 421 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO:534 澤弗利單抗輕鏈	1 EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKP GQAPRLLIYG ASTRATGIPD 61 RFSGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 121 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 181 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
SEQ ID NO:535 澤弗利單抗可變重鏈	1 EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 61 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSS
SEQ ID NO:536 澤弗利單抗可變輕鏈	1 EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKP GQAPRLLIYG ASTRATGIPD 61 RFSGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQ GTKVEIK
SEQ ID NO:537 澤弗利單抗重鏈 CDR1	GFTFSSYS 8

識別號	序列（單字母胺基酸符號）
SEQ ID NO:538 澤弗利單抗重鏈 CDR2	ISSSSSYI 8
SEQ ID NO:539 澤弗利單抗重鏈 CDR3	ARVGLMGPFD I 11
SEQ ID NO:540 澤弗利單抗輕鏈 CDR1	QSVSRY 6
SEQ ID NO:541 澤弗利單抗輕鏈 CDR2	GAS 3
SEQ ID NO:542 澤弗利單抗輕鏈 CDR3	QOYGSSPWT 9

【1849】另外的抗CTLA-4抗體之實例包含但不限於：AGEN1181、BMS-986218、BCD-145、ONC-392、CS1002、REGN4659及ADG116，其為本領域一般熟習此項技術者已知。

【1850】在一些實施例中，抗CTLA-4抗體為揭示於任一以下專利公開案(以引用之方式併入本文中)中之抗CTLA-4抗體：US2019/0048096A1；US2020/0223907；US2019/0201334；US2019/0201334；US2005/0201994；EP 1212422 B1；WO2018204760；WO2018204760；WO2001014424；WO2004035607；WO2003086459；WO2012120125；WO2000037504；WO2009100140；WO200609649；WO2005092380；WO2007123737；WO2006029219；WO20100979597；WO200612168；及

WO1997020574。另外的CTLA-4抗體描述於以下中：美國專利第5,811,097號、第5,855,887號、第6,051,227號及第6,984,720號；PCT公開案第WO 01/14424號及第WO 00/37504號；以及美國公開案第2002/0039581號及第2002/086014號；及/或美國專利第5,977,318號、第6,682,736號、第7,109,003號及第7,132,281號(以引用之方式併入本文中)。在一些實施例中，抗CTLA-4抗體為例如揭示於以下中之抗體：WO 98/42752；美國專利第6,682,736號及第6,207,156號；Hurwitz等人，《美國國家科學院院刊》，95(17):10067-10071(1998)；Camacho等人，《臨床腫瘤學雜誌》，22(145): 摘要號2505(2004)(抗體CP-675206)；Mokyr等人，《癌症研究》，58:5301-5304(1998)(以引用之方式併入本文中)。

【1851】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為如WO1996040915(以引用之方式併入本文中)中所揭示之CTLA-4配體。

【1852】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為CTLA-4表現之核酸抑制劑。舉例而言，抗CTLA-4 RNAi分子可呈Mello及Fire在以下中描述之分子的形式：PCT公開案第WO 1999/032619號及第WO 2001/029058號；美國公開案第2003/0051263號、第2003/0055020號、第2003/0056235號、第2004/265839號、第2005/0100913號、第2006/0024798號、第2008/0050342號、第2008/0081373號、第2008/0248576號及第2008/055443號；及/或美國專

利第6,506,559號、第7,282,564號、第7,538,095號及第7,560,438號(以引用之方式併入本文中)。在一些情況下，抗CTLA-4 RNAi分子呈由Tuschl在歐洲專利第EP 1309726號(以引用之方式併入本文中)中描述之雙股RNAi分子形式。在一些情況下，抗CTLA-4 RNAi分子呈由Tuschl在美國專利第7,056,704號及第7,078,196號(以引用之方式併入本文中)中描述之雙鏈RNAi分子形式。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為PCT公開案第WO2004081021號(以引用之方式併入本文中)中所描述之適體。

【1853】在其他實施例中，本發明之抗CTLA-4 RNAi分子為Crooke在美國專利第5,898,031號、第6,107,094號、第7,432,249號及第7,432,250號以及歐洲申請案第EP 0928290號(以引用之方式併入本文中)中描述之RNA分子。

5. 患者之淋巴球耗盡預調節

【1854】在一些實施例中，本發明包含一種用TIL群體治療癌症之方法，其中患者在輸注根據本揭示案之TIL之前經非骨髓清除式化療預治療。在一些實施例中，本發明包含用於治療已用非骨髓清除式化療預治療之患者之癌症的TIL群體。在一些實施例中，TIL群體係藉由輸注投予。在一些實施例中，非骨髓清除式化療為環磷醯胺60 mg/kg/d持續2天(在TIL輸注前第27及26天)及氟達拉賓25毫克/平方公尺/天持續5天(在TIL輸注前第27至23天)。在一

些實施例中，在根據本揭示案之非骨髓清除式化療及TIL輸注(第0天)之後，患者每8小時以720,000 IU/kg靜脈內接受IL-2(阿地介白素，可以PROLEUKIN商購)之靜脈內輸注以達到生理耐受。在某些實施例中，TIL群體用於與IL-2組合治療癌症，其中IL-2係在TIL群體之後投予。

【1855】實驗發現表明，在過繼性轉移腫瘤特異性T淋巴球之前，淋巴球耗盡藉由消除調節性T細胞且競爭免疫系統之元件(『細胞介素庫』)在增強治療功效方面發揮關鍵作用。因此，本發明之一些實施例在引入本發明之TIL之前在患者身上採用淋巴球耗盡步驟(有時亦稱為「免疫抑制性調節」)。

【1856】一般而言，使用氟達拉濱或環磷醯胺(活性形式稱作馬磷醯胺)及其組合之投予實現淋巴球耗盡。此類方法描述於Gassner等人，《癌症免疫學及免疫治療》**2011**, *60*, 75-85、Muranski等人，《自然臨床實踐腫瘤學》,**2006,** *3*, 668-681、Dudley等人，《臨床腫瘤學雜誌》**2008**, *26*, 5233-5239及Dudley等人，《臨床腫瘤學雜誌》**2005**, *23*, 2346-2357中，所有該等文獻以全文引用之方式併入本文中。

【1857】在一些實施例中，氟達拉濱係以0.5 μg/mL至10 μg/mL氟達拉濱之濃度投予。在一些實施例中，氟達拉濱係以1 μg/mL氟達拉濱之濃度投予。在一些實施例中，投予氟達拉濱治療1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天或更多天。在一些實施例中，氟達拉濱係以10毫克/公斤/

天、15毫克/公斤/天、20毫克/公斤/天、25毫克/公斤/天、30毫克/公斤/天、35毫克/公斤/天、40毫克/公斤/天或45毫克/公斤/天之劑量投予。在一些實施例中，氟達拉濱治療係以35毫克/公斤/天投予2至7天。在一些實施例中，氟達拉濱治療係以35毫克/公斤/天投予4至5天。在一些實施例中，氟達拉濱治療係以25毫克/公斤/天投予4至5天。

【1858】在一些實施例中，藉由投予環磷醯胺獲得濃度為0.5 μg/mL至10 μg/mL的環磷醯胺之活性形式馬磷醯胺。在一些實施例中，藉由投予環磷醯胺獲得濃度為1 μg/mL的環磷醯胺之活性形式馬磷醯胺。在一些實施例中，投予環磷醯胺治療1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天或更多天。在一些實施例中，環磷醯胺係以100毫克/平方公尺/天、150毫克/平方公尺/天、175毫克/平方公尺/天、200毫克/平方公尺/天、225毫克/平方公尺/天、250毫克/平方公尺/天、275毫克/平方公尺/天或300毫克/平方公尺/天之劑量投予。在一些實施例中，環磷醯胺係靜脈內(亦即i.v.)投予。在一些實施例中，環磷醯胺治療係以35毫克/公斤/天投予2至7天。在一些實施例中，環磷醯胺治療係以250毫克/平方公尺/天靜脈內投予4至5天。在一些實施例中，環磷醯胺治療係以250毫克/平方公尺/天靜脈內投予4天。

【1859】在一些實施例中，藉由將氟達拉濱及環磷醯胺一起投予給患者進行淋巴球耗盡。在一些實施例中，經4天以25毫克/平方公尺/天靜脈內投予氟達拉濱且以250毫

克/平方公尺/天靜脈內投予環磷醯胺。

【1860】在一些實施例中，藉由以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱五天來進行淋巴球耗盡。

【1861】在一些實施例中，藉由以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天及以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱五天來進行淋巴球耗盡，其中在前兩天投予環磷醯胺及氟達拉濱兩者，且其中在總計五天中進行淋巴球耗盡。

【1862】在一些實施例中，藉由以約50毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天及以約25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱五天來進行淋巴球耗盡，其中在前兩天投予環磷醯胺及氟達拉濱兩者，且其中在總計五天中進行淋巴球耗盡。

【1863】在一些實施例中，藉由以約50毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天及以約20毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱五天來進行淋巴球耗盡，其中在前兩天投予環磷醯胺及氟達拉濱兩者，且其中在總計五天中進行淋巴球耗盡。

【1864】在一些實施例中，藉由以約40毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天及以約20毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱五天來進行淋巴球耗盡，其中在前兩天投予環磷醯胺及氟達拉濱兩者，且其中在總計五天中進行淋巴球耗盡。

【1865】在一些實施例中，藉由以約40毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天及以約15毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱五天來進行淋巴球耗盡，其中在前兩天投予環磷醯胺及氟達拉濱兩者，且其中在總計五天中進行淋巴球耗盡。

【1866】在一些實施例中，藉由持續兩天以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺及以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱三天來進行淋巴球耗盡。

【1867】在一些實施例中，環磷醯胺係與美司鈉(mesna)一起投予。在一些實施例中，美司鈉係以15 mg/kg投予。在一些實施例中，輸注美司鈉，且若連續輸注，則歷經24小時，伴隨各自環磷醯胺劑量開始，美司鈉可經大約2小時與環磷醯胺一起輸注(第-5天及/或第-4天)，隨後在剩餘22小時以3毫克/千克/小時之速率輸注。

【1868】在一些實施例中，淋巴球耗盡包括以下步驟：始於在向患者投予第三TIL群體之後當天，用IL-2方案治療患者。

【1869】在一些實施例中，淋巴球耗盡包括以下步驟：始於向患者投予第三TIL群體當天，用IL-2方案治療患者。

【1870】在一些實施例中，淋巴球耗盡包括5天之預調節治療。在一些實施例中，天數指示為第-5天至第-1天，或第0天至第4天。在一些實施例中，該方案包括第-5

天及第-4天(亦即第0天及第1天)的環磷醯胺。在一些實施例中，該方案包括第-5天及第-4天(亦即第0天及第1天)的靜脈內環磷醯胺。在一些實施例中，該方案包括第-5天及第-4天(亦即第0天及第1天)的60 mg/kg靜脈內環磷醯胺。在一些實施例中，環磷醯胺係與美司鈉一起投予。在一些實施例中，該方案進一步包括氟達拉濱。在一些實施例中，該方案進一步包括靜脈內氟達拉濱。在一些實施例中，該方案進一步包括25 mg/m^{2}靜脈內氟達拉濱。在一些實施例中，該方案進一步包括第-5天及第-1天(亦即第0天至第4天)的25 mg/m^{2}靜脈內氟達拉濱。在一些實施例中，該方案進一步包括第-5天及第-1天(亦即第0天至第4天)的25 mg/m^{2}靜脈內氟達拉濱。

【1871】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：持續兩天以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺及以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱五天。

【1872】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱(fludarabine)五天。

【1873】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：持續兩天以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺及以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達

拉濱，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱三天。

【1874】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱三天。

【1875】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：持續兩天以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺及以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱一天。

【1876】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表27投予。

表27.例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 60 mg/kg	X	X								
美司鈉（按需要）	X	X								
氟達拉濱 25 毫克/平方公尺/天	X	X	X	X	X					
TIL 輸注						X				

【1877】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表28投予。

表 28.例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 60 mg/kg	X	X							
美司鈉（按需要）	X	X							
氟達拉濱 25 毫克/平方公尺/天	X	X	X	X					
TIL 輸注					X				

【1878】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表29投予。

表 29.例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 60 mg/kg	X	X						
美司鈉（按需要）	X	X						
氟達拉濱 25 毫克/平方公尺/天	X	X	X					
TIL 輸注				X				

【1879】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表30投予。

表 30.例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 60 mg/kg	X	X								
美司鈉（按需要）	X	X								
氟達拉濱 25 毫克/平方公尺/天			X	X	X					
TIL 輸注						X				

【1880】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表31投予。

表31.例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 300 mg/kg	X	X								
美司鈉（按需要）	X	X								
氟達拉濱 30 毫克/平方公尺/天	X	X	X	X	X					
TIL 輸注						X				

【1881】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表32投予。

表32.例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 300 mg/kg	X	X							
美司鈉（按需要）	X	X							
氟達拉濱 30 毫克/平方公尺/天	X	X	X	X					
TIL 輸注					X				

【1882】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表33投予。

表33.例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 300 mg/kg	X	X						
美司鈉（按需要）	X	X						
氟達拉濱 30 毫克/平方公尺/天	X	X	X					
TIL 輸注				X				

【1883】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表34投予。

表34.例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 300 mg/kg	X	X								
美司鈉（按需要）	X	X								
氟達拉濱 30 毫克/平方公尺/天			X	X	X					
TIL 輸注						X				

6 IL-2方案

【1884】在一些實施例中，IL-2方案包括高劑量IL-2方案，其中高劑量IL-2方案包括阿地介白素或其生物類似物或變體，其在投予治療性TIL群體之治療有效部分之後當天開始靜脈內投予，其中阿地介白素或其生物類似物或變體係每八小時使用15分鐘推注靜脈內輸注以0.037 mg/kg或0.044 mg/kg IU/kg(患者體重)之劑量投予直至耐受，最多為14個劑量。在休止9天後，可重複此時程再投予14次劑量，最多總計28次劑量。在一些實施例中，IL-2係以1、2、3、4、5或6次劑量投予。

【1885】在一些實施例中，IL-2係以至多6次劑量之最大劑量投予。在一些實施例中，高劑量IL-2方案適用於小兒用途。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為600,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為500,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為400,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為500,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達

最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為300,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為200,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為100,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。

【1886】在一些實施例中，IL-2方案包括遞減IL-2方案。遞減IL-2方案已描述於O'Day等人，《臨床腫瘤學雜誌》**1999**, *17*, 2752-61及Eton等人，《癌症》**2000,** *88*, 1703-9，該等文獻之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，遞減IL-2方案包括經6小時靜脈內投予18×10^6 IU/m^2，然後經12小時靜脈內投予18×10^6 IU/m^2，然後經24小時靜脈內投予18×10^6 IU/m^2，然後經72小時靜脈內投予4.5×10^6 IU/m^2。此治療週期可每28天重複，達最多四個週期。在一些實施例中，遞減IL-2方案包括第1天18,000,000 IU/m^2，第2天9,000,000 IU/m^2 以及第3天及第4天4,500,000 IU/m^2 。

【1887】在一實施例中，IL-2方案包括低劑量IL-2方案。可使用本領域中已知之任何低劑量IL-2方案，包含Dominguez-Villar及Hafler，《自然免疫學(*Nat. Immunology*)》**2000,** *19*, 665-673；Hartemann等人，《柳葉刀糖尿病與內分泌學(*Lancet Diabetes Endocrinol.*)》**2013**, *1*, 295-305；及Rosenzwaig等人，《風濕病年鑒(*Ann. Rheum. Dis.*)》**2019,** *78*, 209-217中所描述之低劑量IL-2方

案，該等文獻之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，低劑量IL-2方案包括每24小時18×10^6 IU/m^2之阿地介白素或其生物類似物或變體，以連續輸注形式投予5天；之後2至6天不投予IL-2療法；視情況之後再靜脈內投予阿地介白素或其生物類似物或變體5天，以每24小時連續輸注18×10^6 IU/m^2之形式；視情況在之後3週不投予IL-2療法，其後可進行另外週期之投予。

【1888】在一些實施例中，IL-2係以至多6次劑量之最大劑量投予。在一些實施例中，高劑量IL-2方案適用於小兒用途。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為600,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為500,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為400,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為500,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為300,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為200,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為100,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。

【1889】在一些實施例中，IL-2方案包括每1、2、4、6、7、14或21天以0.10毫克/天至50毫克/天之劑量投予聚

乙二醇化IL-2。在一些實施例中，IL-2方案包括每1、2、4、6、7、14或21天以0.10毫克/天至50毫克/天之劑量投予貝培阿地介白素或其片段、變體或生物類似物。

【1890】在一些實施例中，IL-2方案包括每1、2、4、6、7、14或21天以0.10毫克/天至50毫克/天之劑量投予THOR-707或其片段、變體或生物類似物。

【1891】在一些實施例中，IL-2方案包括每1、2、4、6、7、14或21天以0.10毫克/天至50毫克/天之劑量投予內維介白素α或其片段、變體或生物類似物。

【1892】在一些實施例中，IL-2方案包括投予移植至抗體主鏈上之IL-2片段。在一些實施例中，IL-2方案包括投予結合IL-2低親和力受體之抗體細胞介素移植蛋白。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括重鏈可變區(V_H)，其包括互補決定區HCDR1、HCDR2、HCDR3；輕鏈可變區(V_L)，其包括LCDR1、LCDR2、LCDR3；及IL-2分子或其片段，其移植至V_H或V_L之CDR中，其中該抗體細胞介素移植蛋白優先於調節性T細胞擴增T效應細胞。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括重鏈可變區(V_H)，其包括互補決定區HCDR1、HCDR2、HCDR3；輕鏈可變區(V_L)，其包括LCDR1、LCDR2、LCDR3；及IL-2分子或其片段，其移植至V_H或V_L之CDR中，其中該IL-2分子為突變蛋白，並且其中該抗體細胞介素移植蛋白優先於調節性T細胞擴增T效應細胞。在一些實施例中，IL-2方案包括每1、2、4、6、7、14或21天以0.10毫克/天至50毫克/

天之劑量投予抗體或其片段、變體或生物類似物，該抗體包括選自由SEQ ID NO:559及SEQ ID NO:568組成之群組的重鏈及選自由SEQ ID NO:567及SEQ ID NO:569組成之群組的輕鏈。

【1893】在一些實施例中，本文所描述之抗體細胞介素移植蛋白的血清半衰期比野生型IL-2分子(諸如但不限於阿地介白素(Proleukin®)或可比分子)長。

【1894】在一些實施例中，與骨髓清除式淋巴球耗盡方案之前述實施例一起使用之TIL輸注可為本文所描述之任何TIL組成物且亦可包含代替TIL輸注之MIL及PBL輸注，以及添加IL-2方案及投予如本文所描述之共同療法(諸如PD-1及/或PD-L1抑制劑及/或CTLA-4抑制劑)。

7. 另外之治療方法

【1895】在其他實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體的方法，其包括向該個體投予治療有效劑量之如上適用的在任何前述段落中描述之治療性TIL群體。

【1896】在其他實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體的方法，其包括向該個體投予治療有效劑量之如上適用的在任何前述段落中描述之TIL組成物。

【1897】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中在投予治療有效劑量的如上適用的在任何前述

段落中描述的治療性TIL群體或治療有效劑量的如上適用的在任何前述段落中描述的TIL組成物之前，已向個體投予非骨髓清除式淋巴球耗盡方案。

【1898】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱五天。

【1899】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其進一步包括以下步驟：始於在向個體投予TIL細胞之後當天，用高劑量IL-2方案治療個體。

【1900】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中高劑量IL-2方案包括每八小時以15分鐘推注靜脈內輸注形式投予600,000或720,000 IU/kg直至耐受。

【1901】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為實體腫瘤。

【1902】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之在任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為黑色素瘤、卵巢癌、子宮內膜癌、甲狀腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引

起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌或腎細胞癌。

【1903】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【1904】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為黑色素瘤。在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為難治性或不可切除性黑色素瘤。

【1905】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為HNSCC。

【1906】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為子宮頸癌。

【1907】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為NSCLC。

【1908】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為神經膠母細胞瘤(包含GBM)。

【1909】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為胃腸癌。

【1910】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為高突變癌症。

【1911】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為小兒高突變癌症。

【1912】在其他實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體，其用於治療患有癌症之個體的方法中，該方法包括向該個體投予治療有效劑量之治療性TIL群體。

【1913】在其他實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述的TIL組成物，其用於治療患有癌症之個體的方法中，該方法包括向個體投予治療有效劑量之TIL組成物。

【1914】在其他實施例中，本發明提供經修改的如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上適用之任何前述段落中描述的TIL組成物，其中在向個體投予治療有效劑量之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上適用之任何前述段落中描述的TIL組成物之前，已向個體投予非骨髓清除式淋巴球耗盡方案。

【1915】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組成物，其中非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱五天。

【1916】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上適用之任何前述段落中描述的TIL組成物，其進一步包括以下步驟：始於在向患者投予TIL細胞之後當天，用高劑量IL-2方案治療患者。

【1917】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組成物，其中高劑量IL-2方案包括每八小時以15分鐘推注靜脈內輸注形式投予600,000或720,000 IU/kg直至耐受。

【1918】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上適用之任何前述段落中描述的TIL組成物，其中癌症為實體腫瘤。

【1919】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上適用之任何前述段落中描述的TIL組成物，其中癌症為黑色素瘤、卵巢癌、子宮內膜癌、甲狀腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含

GBM)、胃腸癌、腎癌或腎細胞癌。

【1920】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上適用之任何前述段落中描述的TIL組成物，其中癌症為黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【1921】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上適用之任何前述段落中描述的TIL組成物，其中癌症為黑色素瘤。

【1922】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組成物，其中癌症為HNSCC。

【1923】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組成物，其中癌症為子宮頸癌。

【1924】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組成物，其中癌症為NSCLC。

【1925】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組成物，其中癌症為神經膠母細胞瘤(包含GBM)。

【1926】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組成

物，其中癌症為胃腸癌。

【1927】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組成物，其中癌症為高突變癌症。

【1928】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組成物，其中癌症為小兒高突變癌症。

【1929】在其他實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體在治療個體之癌症之方法中的用途，該方法包括向該個體投予治療有效劑量之治療性TIL群體。

【1930】在其他實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述的TIL組成物在治療個體之癌症之方法中的用途，該方法包括向個體投予治療有效劑量之TIL組成物。

【1931】在其他實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上適用之任何前述段落中描述的TIL組成物在治療個體之癌症之方法中的用途，該方法包括向該個體投予非骨髓清除式淋巴球耗盡方案且隨後向該個體投予治療有效劑量之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或治療有效劑量之如上適用之任何前述段落中描述的TIL組成物。

【1932】在其他實施例中，本發明提供經修改的如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上適用

之任何前述段落中描述的TIL組成物，其中在向個體投予治療有效劑量之治療性TIL群體或治療有效劑量之TIL組成物之前，已向個體投予非骨髓清除式淋巴球耗盡方案。

【1933】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組成物的用途，其中非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱五天。

【1934】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體的用途或如上適用之任何前述段落中描述的TIL組成物的用途，其進一步包括以下步驟：始於在向患者投予TIL細胞之後當天，用高劑量IL-2方案治療患者。

【1935】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組成物的用途，其中高劑量IL-2方案包括每八小時以15分鐘推注靜脈內輸注形式投予600,000或720,000 IU/kg直至耐受。

【1936】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組成物的用途，其中癌症為實體腫瘤。

【1937】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上適用之任何前述段落中描述的TIL組成物的用途，其中癌症為黑色素瘤、卵巢癌、子宮內膜癌、甲狀腺癌、結腸直腸

癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌或腎細胞癌。

【1938】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組成物的用途，其中癌症為黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【1939】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組成物的用途，其中癌症為黑色素瘤。

【1940】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組成物的用途，其中癌症為HNSCC。

【1941】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組成物的用途，其中癌症為子宮頸癌。

【1942】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組成物的用途，其中癌症為NSCLC。

【1943】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組成物的用途，其中癌症為神經膠母細胞瘤(包含GBM)。

【1944】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組成物的用途，其中癌症為胃腸癌。

【1945】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組成物的用途，其中癌症為高突變癌症。

【1946】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組成物的用途，其中癌症為小兒高突變癌症。

【1947】一種治療有需要之患者/個體之不可切除及/或雙重難治性黑色素瘤(包含轉移性黑色素瘤)的方法，該方法包括：

(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得及/或接受來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)藉由在包括IL-2、視情況選用之OKT-3及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)及/或來自包括OKT-3的APC之第一培養物的培養物上清液的細胞培養基中培養第一TIL群體以進行初始第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增係在包括第一透氣表面區域之容器中進行，其中該初始第一擴增進行約1至7天或1至8天以獲得第二TIL群體；

(c)藉由用另外的IL-2、OKT-3及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)及/或來自包括OKT-3的APC之第二培養物的培養物上清液補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中添加至速第二擴

增中之APC的數目為步驟(b)中添加之APC的數目的至少兩倍，其中快速第二擴增進行約1至11天以獲得第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體，其中該快速第二擴增係在包括第二透氣表面區域之容器中進行；

(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體；

(e)將來自步驟(d)之經收集之TIL群體轉移至輸液袋；及

(f)向該患者/個體投予治療有效劑量之來自步驟(e)之TIL。

【1948】一種治療有需要之患者/個體之不可切除及/或雙重難治性黑色素瘤(包含轉移性黑色素瘤)的方法，該方法包括：

(a)藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，或

藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)視情況添加該等腫瘤碎片或碎解物至密閉系統中；

(c)藉由在包括IL-2及視情況選用之OKT-3以及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養第一TIL群體來進行第一擴增或初始第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約5天至9天以獲得第二TIL群體，其中該第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該

系統的情況下發生；

(d)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約1天至5天以獲得第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)藉由將第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至單獨的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基且進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中該第三擴增進行約4至8天，其中視情況地，每個單獨的容器係提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f)收集獲自步驟(e)之第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(e)至步驟(f)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(g)將來自步驟(g)之經收集的TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(f)至(g)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(h)向該患者/個體投予治療有效劑量之來自步驟(g)中的輸注袋之第三TIL群體。

【1949】一種治療有需要之患者/個體之不可切除及/或雙重難治性黑色素瘤(包含轉移性黑色素瘤)的方法，該方法包括：

(a)藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，或藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)視情況添加該等腫瘤碎片或碎解物至密閉系統中；

(c)藉由在包括IL-2及視情況選用之OKT-3以及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養第一TIL群體來進行第一擴增或初始第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增或初始第一擴增進行約5天至9天以獲得第二TIL群體，其中該第一擴增或該初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

(d)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約5至9天以獲得第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)藉由將第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將第

一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至單獨的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基且進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中該第三擴增進行約5至9天，其中視情況地，每個單獨的容器係提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開系統的情況下發生；

(f)收集獲自步驟(f)之第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(e)至步驟(f)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(g)將來自步驟(f)之經收集TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(f)至(g)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(h)向該患者/個體投予治療有效劑量的來自步驟(g)中的輸注袋之第三TIL群體。

【1950】一種治療有需要之患者/個體之不可切除及/或雙重難治性黑色素瘤(包含轉移性黑色素瘤)的方法，該方法包括：

(a)藉由以下進行第一擴增或初始第一擴增從而產生第二TIL群體：(i)解凍包括來自個體所切除、在切除之後碎解且在碎解之後冷凍保存的腫瘤的第一TIL群體的經冷凍保存之腫瘤碎解物；(ii)在包括IL-2及視情況選用之OKT-3以及抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養第一TIL群體，其中該第一擴增或初始第一擴增進行約5至9天以獲得

第二TIL群體，其中該第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域的密閉容器中進行；

(b)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約5至9天以獲得第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(a)至步驟(b)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(c)藉由將第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至單獨的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基且進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中該第三擴增進行約5至9天，其中視情況地，每個單獨的容器係提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開系統的情況下發生；

(d)收集獲自步驟(c)之第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)將來自步驟(d)之經收集TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(d)至(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f)向該個體投予治療有效劑量的來自步驟(e)中的輸注

袋之經收集之TIL群體。

【1951】在一些實施例中，步驟(a)中的(i)包括解凍包括來自個體所切除且在切除之後冷凍保存的腫瘤的第一TIL群體的經冷凍保存之腫瘤以產生經解凍腫瘤，及將經解凍之腫瘤碎斷成多個腫瘤碎片，且其中步驟(a)中的(ii)包括培養包括第一TIL群體之多個腫瘤碎片。

【1952】一種治療有需要之患者/個體之不可切除及/或雙重難治性黑色素瘤(包含轉移性黑色素瘤)的方法，該方法包括：

(a)藉由在包括IL-2及視情況選用之OKT-3以及抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養包括來自患者所切除之腫瘤的第一TIL群體的腫瘤樣本來進行第一擴增或初始第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約5至9天以獲得第二TIL群體，其中該第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行；

(b)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約1至5天以獲得第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(a)至步驟(b)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(c)藉由將第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將第

一複數個TIL亞群的每個亞群接種至單獨容器中，添加補充有IL-2及視情況選用的OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中第三擴增進行約4至8天，其中視情況地，每個單獨的容器係提供第三透氣表面區域的密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開系統的情況下發生；

(d)收集獲自步驟(c)之第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)將來自步驟(d)之經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(d)至(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(f)向該個體投予治療有效劑量的來自步驟(e)中之輸注袋的第三TIL群體。如請求項376至379之方法，其中在步驟(a)中培養之前，該腫瘤樣本經碎斷成包括該第一TIL群體之多個腫瘤碎片。

【1953】一種治療有需要之患者/個體之不可切除及/或雙重難治性黑色素瘤(包含轉移性黑色素瘤)的方法，該方法包括：

(a)藉由在包括IL-2及視情況選用之OKT-3以及抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養包括來自患者所切除之腫瘤的第一TIL群體的腫瘤樣本來進行第一擴增或初始第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行

約5至9天以獲得第二TIL群體，其中該第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行；

(b)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充第二TIL群體的細胞培養基來進行快速第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約5至9天以獲得第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(a)至步驟(b)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(c)藉由將第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至單獨的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基且進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中該第三擴增進行約5至9天，其中視情況地，每個單獨的容器係提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開系統的情況下發生；

(d)收集獲自步驟(f)之第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)將來自步驟(d)之經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(d)至(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(f)向該患者/個體投予治療有效劑量的來自步驟(e)中之輸注袋之第三TIL群體。

【1954】在一些實施例中，患者/個體先前已用PD-1抑制劑或其生物類似物治療。在一些實施例中，PD-1抑制劑係選自由以下組成之群組：納武單抗、帕博利珠單抗及其生物類似物。

【1955】在一些實施例中，患者/個體先前已用PD-L1抑制劑或其生物類似物治療。在一些實施例中，PD-L1抑制劑係選自由以下組成之群組：阿維魯單抗、阿替利珠單抗、德瓦魯單抗及其生物類似物。

【1956】在一些實施例中，PD-1抑制劑或其生物類似物係與CTLA-4抑制劑或其生物類似物共同投予。在一些實施例中，PD-L1抑制劑或其生物類似物係與CTLA-4抑制劑或其生物類似物共同投予。

【1957】在一些實施例中，患者先前已用一種另外的前線全身性療法治療。在一些實施例中，一種另外的前線全身性療法為BRAF抑制劑或其醫藥學上可接受之鹽。在一些實施例中，BRAF抑制劑係選自由以下組成之群組：維羅非尼(vemurafenib)、達拉非尼(dabrafenib)及其醫藥學上可接受之鹽。在一些實施例中，一種另外的前線全身性療法為MEK抑制劑或其醫藥學上可接受之其鹽或溶劑合物。在一些實施例中，MEK抑制劑係選自由以下組成之群組：曲美替尼(trametinib)、考比替尼(cobimetinib)及其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物。在一些實施例中，一種另

外的前線全身性療法為BRAF抑制劑或其醫藥學上可接受之鹽與MEK抑制劑或其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物的組合。在一些實施例中，BRAF抑制劑係選自由以下組成之群組：維羅非尼、達拉非尼及其醫藥學上可接受之鹽，且MEK抑制劑係選自由以下組成之群組：曲美替尼、考比替尼及其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物。在一些實施例中，一種另外的前線全身性療法為CTLA-4抑制劑或其生物類似物。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑係選自由以下組成之群組：易普單抗(ipilumumab)、曲美單抗及其生物類似物。在一些實施例中，一種另外的前線全身性療法為化療方案。在一些實施例中，化療方案包括達卡巴嗪(dacarbazine)或替莫唑胺(temozolimide)。

【1958】在一些實施例中，IL-2在第一擴增或初始第一擴增步驟中以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在於細胞培養基中。

【1959】在一些實施例中，在第二擴增步驟(d)中，IL-2以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在且OKT-3抗體以約30 ng/mL之初始濃度存在。

【1960】在一些實施例中，第一擴增或初始第一擴增步驟中之細胞培養基進一步包括選自由以下組成之群組的細胞介素：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其組合。

【1961】在一些實施例中，快速第二擴增或第三擴增中之細胞培養基進一步包括選自由以下組成之群組的細胞介素：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其組合。

【1962】在一些實施例中，該等方法進一步包括以下步驟：在向患者投予TIL之前，用非骨髓清除式淋巴球耗盡方案治療患者。在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱(fludarabine)五天。

【1963】在一些實施例中，該等方法進一步包括以下步驟：始於向患者投予TIL之後當天，用IL-2方案治療患者。在一些實施例中，IL-2方案為包括600,000或720,000 IU/kg阿地介白素或其生物類似物或變體之低劑量IL-2方案，其以每八小時15分鐘的推注靜脈內輸注形式投予直至耐受為止。

【1964】在一些實施例中，治療有效的TIL群體包括約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}個TIL。

【1965】過繼細胞轉移：過繼細胞轉移(ACT)為免疫療法之有效形式且涉及將具有抗腫瘤活性之免疫細胞轉移至癌症患者中。ACT為涉及活體外鑑別具有抗腫瘤活性之淋巴球、此等細胞大量活體外擴增及其輸注至攜帶癌症之宿主中的治療方法。用於過繼性轉移之淋巴球可衍生自經切除腫瘤之基質(腫瘤浸潤性淋巴球或TIL)。ACT的TIL可以如本文所述製備。在一些實施例中，例如根據如圖1(特別是例如圖1B及/或圖1C及/或圖1E及/或圖1F及/或圖1G)中所描述之方法製備TIL。若其經基因工程改造以表現抗腫瘤T細胞受體(TCR)或嵌合抗原受體(CAR)，其富含混合

淋巴球腫瘤細胞培養物(MLTC)，或使用自體抗原呈現細胞及腫瘤衍生肽選殖，則其亦可衍生自血液或來自血液。其中淋巴球來自攜帶癌症宿主的待輸注的ACT 被稱為自體 ACT。美國公開案第2011/0052530號係關於一種用於進行過繼細胞療法以促進癌症消退之方法，該方法主要用於治療罹患轉移性黑色素瘤之患者，該公開案以全文引用之方式併入以獲得此等方法。在一些實施例中，可如本文所述投予TIL。在一些實施例中，TIL可以單次劑量投予。此類投予可藉由例如靜脈內注射之注射進行。在一些實施例中，TIL及/或細胞毒性淋巴球可以多次劑量投予。給藥可為每年一次、兩次、三次、四次、五次、六次或超過六次。給藥可為每月一次、每兩週一次、一週一次或每隔一天一次。TIL及/或細胞毒性淋巴球之投予可視需要而繼續。

實例

【1966】現參考以下實例描述本文中涵蓋之實施例。此等實例僅出於說明之目的提供且本揭示案決不應理解為限於此等實例，而應理解為涵蓋由於本文提供之教示而變得顯而易見的任何及所有變化形式。

實例1：製備用於預REP及REP過程之培養基

【1967】實例描述製備用於涉及培養來源於各種腫瘤類型之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)的方案中之組織培養基的程序，該等腫瘤類型包含但不限於轉移性黑色素瘤、頭頸

鱗狀細胞癌(HNSCC)、卵巢癌、三陰性乳癌及肺腺癌。此培養基可用於製備本申請案及實例中所描述之任一TIL。

製備CM1

【1968】自冷藏庫取出以下試劑並使其在37℃水浴中升溫：(RPMI1640、人AB血清、200 mM L-麩醯胺酸)。根據下表35，藉由將每一成分添加至適於待過濾體積之0.2 μm過濾器單元的頂部來製備CM1培養基。儲存於4℃下。

表35：製備CM1

成分	最終濃度	最終體積 500 ml	最終體積 IL
RPMI1640	NA	450 ml	900 ml
人AB血清，加熱不活化 10%	50 ml	100 ml	
200 mM L-麩醯胺酸	2 mM	5 ml	10 ml
55 mM BME	55 μM	0.5 ml	1 ml
50 mg/ml 硫酸建它黴素	50 μg/ml	0.5 ml	1 ml

【1969】使用當天，將所需量之CM1在37℃水浴中預熱並添加6000 IU/ml IL-2。

【1970】根據表36的按需另外補充。

表36：按需要對CM1之另外補充。

補充	儲備液濃度	稀釋	最終濃度
GlutaMAX™	200 mM	1:100	2 mM
青黴素/鏈黴素	10,000 U/ml 青黴素 10,000 μg/ml 鏈黴素	1:100	100 U/ml 青黴素 100 μg/ml 鏈黴素
雙性黴素B	250 μg/ml	1:100	2.5 μg/ml

製備CM2

【1971】自冰箱取出已製備之CM1或根據上表35製備

新鮮CM1。自冰箱取出AIM-V®，且藉由在無菌培養基瓶中混合已製備之CM1與等體積AIM-V®來製備所需量之CM2。在使用當天向CM2培養基中添加3000 IU/ml IL-2。在使用當天用3000 IU/ml IL-2製成足夠量之CM2。將CM2培養基瓶標記上名稱、製備者名字縮寫、過濾/製備日期、兩週之過期日期，且在需要用於組織培養之前儲存於4℃下。

製備CM3

【1972】在需要使用的當天，製備CM3。CM3與AIM-V®培養基相同，但在使用當天補充3000 IU/ml IL-2。藉由向AIM-V瓶或袋中直接添加IL-2儲備液，製備滿足實驗需求之量的CM3。藉由輕微振盪進行充分混合。添加AIM-V之後，立即將瓶子標記上「3000 IU/ml IL-2」。若存在過量CM3，則將其儲存於處於4℃下之瓶子中，標記上培養基名稱、製備者名字縮寫、製備培養基之日期及其過期日期(製備後7天)。儲存於4℃下7天後，捨棄補充有IL-2之培養基。

製備CM4

【1973】CM4與CM3相同，但另外補充2 mM GlutaMAX™ (最終濃度)。每1L CM3添加10 ml之200 mM GlutaMAX™。藉由向AIM-V瓶或袋直接添加IL-2儲備液及GlutaMAX™儲備液，製備滿足實驗需求之量的CM4。藉

由輕微振盪進行充分混合。添加AIM-V之後，立即將瓶子標記上「3000 IL/ml IL-2及GlutaMAX」。若存在過量CM4，則將其儲存於處於4℃下之瓶子中，標記上培養基名稱、「GlutaMAX」及其過期日期(製備後7天)。儲存於4℃下7天後，捨棄補充有IL-2之培養基。

實例2：製備IL-2儲備液(CELLGENIX)

【1974】此實例描述將經純化之凍乾重組人類介白素-2溶解於適合用於其他組織培養方案(包含本申請案及實例中所描述之所有彼等方案)之儲備樣本中的過程，包含涉及使用rhIL-2之彼等過程。

程序

【1975】製備0.2%乙酸溶液(HAc)。將29 mL無菌水轉移至50 mL錐形管中。向50 mL錐形管中添加1 mL 1N乙酸。藉由倒轉管2至3次進行充分混合。藉由使用Steriflip過濾器對HAc溶液進行滅菌。

【1976】製備含1% HSA之PBS。在150 mL無菌過濾器單元中，向96 mL PBS中添加4 mL 25% HSA儲備液。過濾溶液。儲存於4℃下。針對製備的每一小瓶rhIL-2，填寫表格。

【1977】製備rhIL-2儲備液(6×10^6 IU/mL最終濃度)。每一批次之rhIL-2不同，且所需資訊見於製造商之分析證書(COA)，諸如：1)每小瓶rhIL-2之質量(mg)、2)rhIL-2之

比活性(IU/mg)及3)推薦0.2% HAc復原體積(mL)。

【1978】使用以下公式計算rhIL-2批次所需的1% HSA之體積：

$$\left(\frac{小瓶質量(mg)\ x\ 生物活性\left(\frac{IU}{mg}\right)}{6x10^6\ \frac{IU}{mL}}\right) - HAc體積(mL) = 1\%\ HSA體積(mL)$$

【1979】舉例而言，根據CellGenix之rhIL-2批次10200121 COA，1 mg小瓶之比活性為25×10^6 IU/mg。推薦於2 mL 0.2% HAc中復原rhIL-2。

$$\left(\frac{1mg\ x\ 25x10^6\ \frac{IU}{mg}}{6x10^6\ \frac{IU}{mL}}\right) - 2mL = 2.167mL\ HSA$$

【1980】用酒精擦拭物擦拭IL-2小瓶之橡膠塞。使用連接於3 mL注射器之16G針頭，將推薦體積之0.2% HAc注入小瓶中。請小心不要在拔出針頭時取開塞子。將小瓶倒轉3次並旋動直至所有粉末溶解為止。小心地取下塞子並擱置於酒精擦拭物上。向小瓶中添加所計算體積之1% HSA。

【1981】儲存rhIL-2溶液。對於短期儲存(< 72小時)，將小瓶儲存於4℃下。對於長期儲存(> 72小時)，將小瓶等分成較小體積，且在準備使用之前儲存於-20℃下之冷凍小瓶中。避免冷凍/解凍循環。記錄製備日期後6個月之過期日期。Rh-IL-2標籤包含供應商及目錄號、批號、過期日期、操作員名字縮寫、濃度及等分體積。

實例3：冷凍保存過程

【1982】此實例描述使用CryoMed受控速率冷凍機型號7454(Thermo Scientific)對利用實例12中所描述之簡短閉合程序製備的TIL進行冷凍保存過程的方法。

【1983】所用設備如下：鋁製卡盒支架(與CS750冷凍袋相容)、用於750 mL袋的冷凍盒、低壓(22 psi)液氮罐、冰箱、熱電偶感測器(帶式袋)及CryoStore CS750冷凍袋(OriGen Scientific)。

【1984】冷凍過程在自成核至-20℃之間提供0.5℃速率且在至-80℃終點溫度之間提供1℃/分鐘之冷卻速率。程式參數如下：步驟1 - 在4℃下等待；步驟2：1.0℃/min(樣本溫度)達到-4℃；步驟3：20.0℃/min(箱室溫度)達到-45℃；步驟4：10.0℃/min(箱室溫度)達到-10.0℃；步驟5：0.5℃/min(箱室溫度)達到-20℃；且步驟6：1.0℃/min(樣本溫度)達到-80℃。

實例4：自CLL患者的PBMCS中選擇及擴增PBLS的例示性實施例。

【1985】自患者收集PBMC且冷凍以供後續使用或新鮮使用。在本發明方法中，收集足夠量之周邊血液以針對起始物質產生至少約400,000,000(400×10^6)個PBMC。在該方法之第0天，6×10^6 IU/mL的IL-2係經新鮮製備或解凍，且儲存在 4℃或冰上直至準備使用為止。200 mL CM2培養基藉由以下製備：合併100 mL CM1培養基(含有

GlutaMAX®)，接著以100 mL(1:1)用AIM-V將其稀釋以製造CM2。CM2避光，且在不使用時密封。

【1986】以下所有步驟均在無菌細胞培養條件下進行。將CM2的等分試樣在 50 mL 錐形管中在 37℃水浴中加熱，用於解凍及/或洗滌冷凍的PBMC樣本。若使用經冷凍之PBMC樣本，則自冷凍庫中取出樣本且使其保持在乾冰上直至準備解凍為止。當準備解凍PBMC冷凍小瓶時，將5 mL CM2培養基置於無菌50 mL錐形管中。將PBMC樣本冷凍小瓶置於37℃水浴中，直至只剩下少量冰晶。以1:1之樣本:培養基(約1 mL)體積比逐滴添加經升溫之CM2培養基至樣本小瓶中。自冷凍小瓶中移除整個內容物且轉移至50 mL錐形管中之剩餘CM2培養基中。使用另外的1至2 mL之CM2培養基沖洗冷凍小瓶，且取出冷凍小瓶之整個內容物且轉移至50 mL錐形管中。隨後用另外的CM2培養基將錐形管之體積調節至15 mL，且溫和地渦旋以沖洗細胞。隨後在室溫下以400 g使錐形管離心5分鐘，以便收集細胞沈澱物。

【1987】自沈澱物中取出上清液，將錐形管加蓋，且接著藉由例如沿粗糙表面刮擦管來破壞細胞沈澱物。將約1 mL CM2培養基添加至細胞沈澱物中，且用吸液管向上及向下抽吸沈澱物及培養基5至10次以分解細胞沈澱物。將另外的3至5 mL CM2 培養基添加至管中，並經由吸液器混合以懸浮細胞。此時，記錄細胞懸浮液的體積。自管中取出100 µL細胞懸浮液，利用自動細胞計數器(例

Nexcelom Cellometer K2)進行細胞計數。確定樣本中的活細胞數並記錄。

【1988】保留最少5×10^{6}個細胞用於表型分析及其他表徵實驗。在室溫下以400g旋轉保留的細胞5分鐘以收集細胞沈澱物。在冷凍培養基(無菌、熱滅活的FBS，含有20% DMSO)中重懸浮細胞沈澱物。在冷凍培養基中冷凍經保留細胞之一或兩份等分試樣，然後在-80℃冷凍機中的細胞冷凍機(Mr. Frosty™)中緩慢冷凍該等等分試樣。在-80℃下最少24小時後轉移至液氮儲存器中。

【1989】對於以下步驟，使用預冷卻的溶液，快速工作，並保持細胞低溫。下一步驟為純化PBMC樣本之T細胞級份。其係使用泛T細胞分離套組(美天旎，目錄號130-096-535)完成的。藉由用含有PBS、0.5% BSA及2 mM EDTA的pH 7.2的無菌過濾洗滌緩衝液洗滌細胞來製備用於純化之細胞。以400g使PBMC樣本離心5分鐘以收集細胞沈澱物。吸出上清液且每10^{7}個細胞將細胞沈澱物再懸浮於40 μL洗滌緩衝液中。每10^{7}個細胞添加10 μL泛T細胞生物素抗體混合物。混合均勻並在冰箱或冰上培育5分鐘。每10^{7}個細胞添加30 μL洗滌緩衝液。每10^{7}個細胞添加20 μL泛T細胞微珠混合物。混合均勻並在冰箱或冰上培育10分鐘。準備 LS管柱並將細胞與微珠磁性分離。將LS管柱置於QuadroMACS磁場中。用3 mL冷洗滌緩衝液洗滌LS管柱，且收集並丟棄洗滌液。將細胞懸浮液施用於管柱上且收集流經物(未標記之細胞)。此流經物為富集的T細胞級

份(PBL)。用3 mL洗滌緩衝液洗滌管柱且將流經物收集在與初始流經物相同之管中。為該管加蓋且置於冰上。此為T細胞級份或PBL。自磁場中取出LS管柱，用5 mL洗滌緩衝液洗滌管柱，且收集非T細胞級份(經磁性標記之細胞)至另一管中。以400 g使兩種級份離心5分鐘以收集細胞沈澱物。自兩個樣本中抽吸上清液，破壞沈澱物，且對於各沈澱物將細胞再懸浮於1 mL補充有3000 IU/mL IL-2之CM2培養基中，且上下吸液5至10次以使沈澱物破碎。添加1至2 mL CM2至各樣本中，且混合各樣本孔，並且儲存於組織培養恆溫箱中以用於下一步驟。自各樣本中取出50 μL等分試樣，計算細胞的數目，且記錄計數及存活率。

【1990】隨後將T細胞(PBL)與Dunabeads™人類T擴增因子CD3/CD28一起培養。將Dynabeads之儲備小瓶以中等速度渦旋30秒。將所需等分試樣之珠粒自儲備小瓶移出至無菌1.5 mL微管中。藉由添加1 mL珠粒洗滌液至含有珠粒之1.5 mL微管中來用珠粒洗滌溶液洗滌珠粒。輕輕混合。將管子置於DynaMag™-2磁體上並靜置30分鐘，同時將珠粒吸向磁體。將洗滌溶液自珠粒吸出且自磁體移除試管。將補充有3000 IU/mL IL-2的1 mL CM2培養基添加至珠粒中。將微管之全部內容物轉移至15或50 mL錐形管。使用含 IL-2的CM2 培養基使珠粒之最終濃度達到約500,000/mL。

【1991】將T細胞(PBL)及珠粒如下一起培養。在第0天：在G-Rex 24孔盤中，每孔總共7 mL，添加500,000 個

T細胞、500,000 個CD3/CD28 Dynabeads及CM2，並補充有IL-2。將G-Rex培養盤置於加濕的37℃、5% CO_2培育箱中，直到該過程之下一步(第4 天)。使用Mr. Frosty™細胞冷凍機將剩餘的細胞冷凍在CS10冷凍保存培養基中。使用Mr. Frosty細胞冷凍機將細胞的非T細胞級份冷凍在CS10冷凍保存培養基中。在第4天，更換培養基。自G-rex培養盤的每個孔中取出一半的培養基(約3.5 mL)。添加足夠體積(約3.5 mL)的CM4培養基以替換自每個樣本孔中取出的培養基，該CM4培養基補充有3000 IU/mL IL-2且經加熱至37℃。將G-rex培養盤返回至培育箱。

【1992】在第7天，準備細胞以便藉由REP擴增。將G-rex培養盤自培育箱中取出且自各孔中取出一半培養基並丟棄。將細胞再懸浮在剩餘的培養基中並轉移至15 mL錐形管中。各個孔用1 mL CM4洗滌，該CM4補充有 3000 IU/mL IL-2且經加熱至37℃，並將洗滌培養基轉移至與細胞相同的15 mL 管中。取出細胞之代表性本且使用自動化細胞計數器計數。若活細胞少於1×10^6個，則重複第0天的Dynabead擴增過程。剩餘的細胞被冷凍用於備用擴增或表型分析及其他表徵研究。若有1×10^6個活細胞或更多，則根據第0天的方案重複設定REP擴增。或者，在細胞足夠之情況下，在G-rex 10M培養瓶中中，可以使用每培養瓶10-15$\times10^6$個PBL及在補充有3000 IU/mL IL-2之最終體積為100 mL/孔之CM4培養基中1:1之Dynabeads:PBL比率來設定擴增。使培養盤及/或培養瓶返回至培育箱。可以將多餘的PBL等分

且-80℃冷凍機中的Mr. Frosty™ 細胞冷凍機中緩慢冷凍，並在-80℃下最少24小時後將其轉移至液氮儲存器中。此等PBL可用作擴增或表型分析或其他表徵研究的備用樣本。

【1993】在第11天，更換培養基。自 G-rex培養盤的每個孔或培養瓶中取出一半培養基，並在37℃下用相同量的補充有3000 IU/mL IL-2的新鮮 CM4 培養基替換。

【1994】在第14天，收集PBL。若使用G-rex培養盤，則自培養盤之各孔中取出約一半培養基且丟棄。使PBL及珠粒懸浮於剩餘培養基中且轉移至無菌15 mL錐形管(管1)中。用1-2 mL加熱至 37℃的新鮮 AIM-V培養基洗滌孔，並將洗滌液轉移至管1。將管1加蓋且置於DynaMag™-15磁體中1分鐘，以使珠粒被吸至磁體。將細胞懸液轉移至新的15 mL 管(管2)中，並在 37℃下用2 mL新鮮的AIM-V洗滌珠粒。將管1放回磁體中再1分鐘，且隨後將洗滌培養基轉移至管2。在最終洗滌步驟之後，可視需要合併孔。移除代表性細胞樣本且計數，記錄計數及存活率。計數時可將管置於培育箱中。若細胞顯得非常密集，則可添加另外的AIMV培養基至管2中。若使用培養瓶，則培養瓶的體積應減少至約10 mL。將培養瓶之內容物混合且轉移至15 mL錐形管(管A)中。如上所述用2 mL AIM-V培養基洗滌培養瓶，並亦將洗滌培養基轉移至管A。將管A加蓋並置於DynaMag™-15 磁體中1 分鐘以使珠粒被吸至磁體。將細胞懸液轉移至新的15 mL 管(管B)中，並在37℃下用 2 mL

新鮮AIM-V洗滌珠粒。將管A放回磁體中再1 分鐘，且隨後將洗滌培養基轉移至管B。在最後洗滌步驟後，可視需要合併孔。移除代表性細胞樣本且計數，記錄計數及存活率。計數時可將管置於培育箱中。若細胞顯得非常密集，則可添加另外的AIM-V培養基至管B中。細胞可以所需濃度新鮮使用或冷凍於CS10保存培養基中。

實例5：使用GEN 3擴增平台擴增來自血液惡性病的T細胞的例示性實施例。

【1995】在第0天，使用正向或負向選擇方法(亦即使用T細胞標誌(CD2、CD3等)來移除T細胞，或移除其他細胞從而留下T細胞)或梯度離心將T細胞級份(CD3+、CD45+)與富集淋巴球之血球分離產物、全血或(新鮮或經解凍)腫瘤碎解物分離。

【1996】根據本文所描述之Gen3過程，Gen 3.1過程係以每個培養瓶接種約1×10^7個細胞開始。

【1997】在第7天，根據Gen 3.1過程再活化細胞。

【1998】在第9至11天，根據Gen 3.1過程將細胞進行規模縱向擴大。

【1999】在第14至16天，根據Gen 3.1過程收集細胞。

【2000】圖21提供用於使用Gen 3過程擴增來血液惡性病之TIL之例示性實施例的示意圖。

實例6：利用確定培養基之腫瘤擴增過程。

【2001】用根據本發明之確定培養基(例如CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM，賽默飛世爾，包含例如DM1及DM2)替代CM1及CM2培養基來進行揭示於實例5至實例12中所揭示之過程。

實例7：來自患有胰臟癌之個體的組織核心活體組織切片的腫瘤浸潤性淋巴球的擴增

【2002】此實例描述一項研究，其目的係對來自獲自患者之胰臟癌腫瘤核心活體組織切片之TIL進行擴增。該實例提供一種用於對來自組織核心活體組織切片之樣本的TIL進行擴增之方法的例示性實施例。

【2003】獲得包含3個腫瘤碎片之胰臟腫瘤核心活體組織切片，且根據下文所概述之類Gen 2腫瘤處理方法來處理。圖1A描繪例示性類Gen 2方案之過程步驟。

第0天腫瘤處理

【2004】在該方法之第0天，接收腫瘤核心活體組織切片且如本文所描述洗滌。使用直尺量測組織核心之長度及理論質量並記錄。

第0天- 類Gen 2(預REP)

【2005】G-Rex 100M標有「腫瘤 ID、Gen 2、首字母縮寫、培養基配方及日期」。將升溫至37℃(至少24至30小時)的0.5 L CM1 + 6000 IU/mL IL-2添加至G-Rex 100M。

使用6孔盤，且將5 mL腫瘤洗滌緩衝液添加至標記為「#1」、「#2」及「#3」之三個孔中。簡言之，將核心活體組織切片容器溶液的所有內容物轉移至皮氏培養皿(例如100 mm或150 mm)中。

【2006】藉由使用巴斯德吸液管將核心活體組織切片樣品轉移至孔1來洗滌樣本三次。將樣本培育3分鐘。隨後，將樣品轉移至孔#2中持續3分鐘，並接著將樣品轉移至孔#3中持續3分鐘。

【2007】使用移液管或鉗子，自孔#3中直接添加活體組織切片樣品至經標記之G-Rex 100M，其含有在上述步驟中製備的0.5 L CM1 + 6000 IU/mL IL-2。將G-Rex 100M置於37℃/5% CO_2培育箱中直至第11天。

第3天 - 類Gen 2(REP前收集/活化)

【2008】如下進行 類Gen 2過程的第3天。飼養細胞(同種異體PBMC飼養細胞)由來自 2 個或更多不同供體的混合PBMC群體製備。飼養細胞極少被操縱及冷凍直至需要。將2×1 mL小瓶之飼養細胞(同種異體PBMC飼養細胞)解凍且吸液至升溫至37℃之48 mL CM-1 + 6000 IU/mL IL-2中。

【2009】使用血清學吸液管充分混合PBMC飼養細胞且取出4×1 mL等分試樣。根據本領域中熟習此項技術者已知之標準程序，在沒有稀釋的情況下對解凍之飼養細胞進行計數。接下來，根據等式計算100e6個PBMC飼養細胞所

需的體積：100e6/平均活細胞濃度 = 100e6個PBMC所需的體積。

【2010】自培育箱取出含有預REP培養物之G-Rex 100M培養瓶且將其置於生物安全櫃(BSC)中。

【2011】將自上文計算出的體積及30 µL儲備OKT3(30 ng/mL)添加至每個含有500 mL CM1 + 6000 IU/mL IL-2的G-Rex 100M培養瓶中。將總體積補足(QS)至 1 L：向培養瓶添加500 mL – 添加至每個培養瓶中的PPBMC的經計算體積 = CM1 + 6000 IU/mL IL-2的總體積。

第11天 – 類Gen 2(REP)

【2012】如下進行類Gen 2過程的第11天。對於預REP TIL收集，使用開放系統培育瓶。自培育箱中取出含有培養物之G-Rex 100M培養瓶，且取出上清液之2×1 mL等分試樣以用於代謝物分析且儲存於-80℃。稱量無菌的150 mL瓶子並記錄重量。自G-Rex 100M培養瓶中抽吸約900 mL上清液。使用血清學吸液管將預REP TIL培養物轉移至稱量的150 mL無菌培養瓶中。

【2013】用血清學吸液管充分混合預REP TIL培養物且收集4×1 mL等分試樣以用於細胞計數。根據本領域中熟習此項技術者已知之標準程序，在沒有稀釋的情況下進行四次細胞計數。在進行計數時，將預REP TIL培養物置於培養箱中。

【2014】使用具有Ashton吸液器之100 mL注射器，自

預REP TIL培養物中取出超出待接種至REP培養物中之最大量(200e6個TIL)的細胞。經由藍色NIS端口將200e6個TIL轉移至EV-1000N袋中。

【2015】將含有預REP TIL之EV-1000N袋無菌熔接至G-Rex 500MCS之紅色管線上，且將TILS經重力排出至培養瓶中。在排出之後，熱封紅色管線。

【2016】如上文所描述解凍5e9個PBMC飼養細胞。在進行4次細胞計數之後，基於細胞計數調整飼養細胞培養物之體積以添加5e9個飼養細胞至EV1000N飼養袋中。添加飼養細胞後，將150 uL OKT3添加至飼養袋中。將飼養袋無菌熔接至G-Rex 500MCS之紅色管線上，且將5e9個飼養細胞經重力排出至G-Rex中。將4.5 L CM2及3,000 IU/mL IL-2添加至G-Rex 500MCS。

第16天– 類Gen 2(分瓶)

【2017】根據Gen 2第16天方法進行類Gen 2過程之第16天。

【2018】首先，吸取2×1 mL上清液等分試樣以用於代謝物分析且儲存在-80℃。簡言之，體積減少且將REP細胞培養物分瓶至5個GREX 500MCS中。在每個GREX 500MCS中，培養物體積為4.5 L CM4培養基+IL-2(3000 IU/mL)且≥1×10^9個TVC/培養瓶。

第22天– 類Gen 2(收集)

【2019】根據Gen 2第22天方法進行類Gen 2過程之第22天。

【2020】收集第22天的細胞，經由LOVO(TIL收集2cy)進行處理，並使用CRF程式#1冷凍在30×1 mL冷凍小瓶中(在 1:1 CS10/PLLA 1% HSA中)。在一些情況下，僅存在1個培養瓶且外推任何另外的子培養瓶之假設產率。

【2021】冷凍前保存10e6個LOVO後的細胞用於身分染色。在丟棄上清液廢料之前，取出2×1 mL上清液等分試樣用於代謝物分析且儲存於-80℃。

結果

【2022】第11天(活化)之TVC計數產生47.3e6個細胞。在LOVO後第22天(REP)的TVC計數產生10.4e9個細胞，存活率為93%。因此，自類Gen-2過程的第11天至第22天，有8.4次細胞倍增。

實例8：用於擴增來自組織核心活體組織切片之腫瘤浸潤性淋巴球的類GEN-2過程及GEN 3過程

【2023】此實例描述一項研究，該研究使用類Gen 2過程及Gen 3過程比較來自胰臟癌腫瘤核心活體組織切片的TIL擴增。該研究利用胰臟癌患者之腫瘤核心活體組織切片(P7057)。此腫瘤樣本包含3個核心且TIL產物係根據本文中所描述之類Gen 2過程產生。該研究亦利用胰臟癌患者的腫瘤核心活體組織切片(P7058)。此腫瘤樣本包含8個

核心且TIL產物係根據類Gen 2過程由4個核心產生且根據本文中所描述之Gen 3過程由4個核心產生。

介紹

【2024】芯針活體組織切片係用於診斷癌症時取樣異常組織生長的標準初步診斷程序。該程序利用大規格(18、16、14等)針頭經皮取樣可疑區域，接著對可疑區域進行進一步分析及測試以確定組織是否為癌性。因為芯針活體組織切片不需要切開或手術，所以其是獲得腫瘤樣本的侵入性小得多的方式。因此，需要觀察核心活體組織切片是否可以用作切除腫瘤以得到所概述的TIL製造過程中之起始物質的替代方案。

背景

【2025】已開發兩個製造過程(Gen 2及Gen 3)，並用於臨床製造中，用於對衍生自新切除腫瘤之自體腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之離體擴增。Gen 2過程及Gen 3過程利用相同生物反應器(G-Rex100 MCS及G-Rex500 MCS)。Gen 2過程包含預快速擴增方案(預REP)步驟，且此步驟已由Gen 3過程中之活化步驟替換。Gen 2及Gen 3細胞培養物擴增過程中之TIL培養物的快速擴增(REP)及規模縱向擴大係在皆促進TIL擴增之介白素-2(IL-2)、單株抗體OKT3及經照射周邊血液單核細胞(「飼養細胞」)之存在下進行。Gen 3過程的持續時間比Gen 2過程短。Gen 2過程及Gen 3過程用作芯針活體組織切片過程的設計基礎。

目的

【2026】此研究之此目的係開發使用芯針活體組織切片樣品作為起始物質之TIL製造過程。此製造過程之設計係基於本文所概述之類Gen 2及Gen 3臨床製造過程之設計。

範疇

【2027】使用類Gen 2過程及Gen 3過程進行完整規模研究(參見例如以上實例)。與Gen 2過程相比，類Gen-2過程有兩個變化，包含3天的預REP(相對11天Gen 2)及藉由在第3天添加飼養細胞及OKT-3的第3天活化步驟。

【2028】類Gen 2與Gen 3之間的主要過程設計差異如下。在類Gen 2過程中存在預快速擴增方案(預REP)，其中細胞在IL-2存在但OKT-3及飼養細胞不存在的情況下在3天培育期內自核心組織或活體組織切片中滲出。Gen 3過程中的相應步驟將TIL自腫瘤之外滲與其藉由在第0天添加OKT-3及飼養細胞進行的活化相結合。

【2029】Gen 2過程中的快速擴增方案包含經11天之時段使用添加OKT3、飼養細胞至預REP TIL的單次活化，其中在第16天分瓶。Gen 3過程中之對應REP亦使用在第7/8天添加之OKT3及飼養細胞，其中在第11天規模縱向擴大。

【2030】Gen 2過程使用G-Rex 100 MCS進行預REP且

使用G-Rex 500 MCS進行REP。Gen 3過程使用G-Rex 100 MCS進行活化及再活化且使用G-Rex 500 MCS進行規模縱向擴大。

【2031】Gen 3過程的持續時間為16天至17天，而Gen 2過程為22天(例如，Gen 3比Gen 2短5天至6天)。

【2032】Gen 3過程使用確定培養基(亦即，無人類AB血清)，而Gen 2過程使用含有人類AB血清之完全培養基。

【2033】圖1A提供本文所描述之類Gen 2過程及Gen 3過程的比較。

程序

【2034】實例之此部分概述待用以由胰臟腫瘤核心活體組織切片樣本P7057之核心產生TIL產物的類Gen 2程序。下文描述之類Gen 2過程及Gen 3過程用於自來自胰臟腫瘤核心活體組織切片樣本P7058的核心產生TIL樣本。

【2035】此研究利用源自商業供應商、合作者或合作夥伴之組織核心/活體組織切片腫瘤樣本。同種異體PBMC飼養細胞係合併自2種或更多種不同供體。飼養細胞的操作最少，並直接添加至冷凍保存基質中的TIL培養物中，該基質由懸浮在CS10中的單核細胞組成。

類Gen 2過程之概述

第0天 –類Gen 2(腫瘤處理)

【2036】類Gen 2方法的腫瘤處理如下進行。接收腫瘤

核心活體組織切片且將其洗滌3次。使用直尺量測每個組織核心之長度及理論質量並進行記錄。

第0天 - 類Gen 2(預REP)

【2037】在類Gen 2過程之第0天，預REP階段如下起始。為G-Rex 100M標上「腫瘤ID、Gen 2、首字母縮寫、培養基配方及日期」。將升溫至37℃(至少24至30小時)的0.5 L CM1 + 6000 IU/mL IL-2添加至G-Rex 100M。使用6孔盤且添加5 mL腫瘤洗滌緩衝液至3個標記為1、2及3之孔中。簡言之，將核心活體組織切片容器溶液之全部內容物轉移至皮氏培養皿(100 mm或150 mm)中。藉由使用巴斯德吸液管將核心活體組織切片樣品轉移至孔1來洗滌樣本3次。培育3分鐘。隨後將樣品轉移至孔2持續3分鐘，且接著將樣品轉移至孔3持續3分鐘。使用移液管或鉗子將活體組織切片樣品自孔3中直接添加至經標記之含有以上步驟中製備之0.5 L CM1 + 6000 IU/mL IL-2的G-Rex 100M中。將G-Rex 100M置於37℃/5% CO_2培育箱中直至第11天。

第3天 - 類Gen 2(REP前收集/活化)

【2038】在類Gen 2過程之第3天，REP**前**收集/活化如下進行。解凍2×1 mL小瓶的PBMC且將其移取至升溫至37℃之48 mL CM-1 + 6000 IU/mL IL-2中。藉由血清學吸液管充分混合且取出4×1 mL等分試樣，並且在沒有稀釋的情況下按照標準方法對經解凍之飼養細胞進行計數。計算

100e6個PBMC所需的體積：(100e6/平均活細胞濃度=100e6個PBMC所需的體積)。自培育箱中取出含有培養物的G-Rex 100M培養瓶且置於BSC中。將自上文計算出的體積及30 µL儲備OKT3(30 ng/mL)添加至每個含有500 mL CM1 + 6000 IU/mL IL-2的培養瓶中，將總體積補足至1 L：500 mL - 在10.5.6中添加之體積= 添加至培養瓶中之CM1 + 6000 IU/mL IL-2之總體積。

第11天 – 類Gen 2(REP)

【2039】在類Gen 2過程之第11天，REP階段按照Gen 2第11天過程起始，但預REP TIL收集且接種至G-Rex 500MCS除外。對於預REP TIL收集，使用開放系統培養瓶。自培育箱中取出培養瓶且取出2×1 mL上清液等分試樣以用於代謝物分析且儲存於-80℃。稱量150 mL無菌瓶並記錄重量。抽吸約900 mL上清液。使用血清學吸液管將預REP TIL轉移至所稱量的150 mL無菌培養瓶中。用血清學吸液管充分混合且獲得4×1 mL等分試樣用於細胞計數。作為標準方法，在沒有稀釋的情況下在NC-200上進行4次細胞計數。在進行細胞計數時將預REP TIL保持在培育箱中。

【2040】必要時，自培養瓶取出適當體積，留下200e6個TIL(待接種至REP中的最大量)且使用具有Ashton吸液管之100 mL注射器，經由藍色NIS端口將剩餘TIL(200e6個TIL)轉移至EV-1000N袋中。將含有預REP TIL之EV-1000N

袋無菌熔接至G-Rex 500MCS之紅色管線上，且將TILS經重力排出至培養瓶中。在排出之後，熱封紅色管線。

【2041】根據上文所描述之方法解凍5e9個飼養細胞。在進行4次細胞計數之後，必要時調整體積以使EV1000N飼養袋中的細胞達到5e9個。添加150 µL OKT3至飼養袋中。將飼養袋無菌熔接至G-Rex 500MCS之紅色管線上，且將5e9個飼養細胞經重力排出至G-Rex中。添加4.5 L CM2 + 3000 IU/mL IL-2至G-Rex 500MCS中。

第16天 – 類Gen 2(分瓶)

【2042】在類Gen 2過程之第16天，按照Gen 2第16天步驟進行分瓶步驟。吸取2×1 mL上清液等分試樣以用於代謝物分析且儲存在-80℃。按照Gen 2第16天過程進行類Gen 2過程之第16天，但以下情況除外。若僅將1個培養瓶向前移動用於規模縱向擴大/分瓶，則在收集時添加子培養瓶之數目以外推完全規模。舉例而言，若需要5個培養瓶，則僅向前移動1個，且將最終產物TVC乘以5以外推預期完全規模產率。

第22天 – 類Gen 2(收集)

【2043】在類Gen-2過程之第22天，按照Gen 2第22天過程進行收集步驟。收集類Gen 2之第22天的細胞，經由LOVO細胞處理系統處理，且冷凍於30×1 mL冷凍小瓶中(1:1 CS10/PLLA 1% HSA中)。在一些情況下，僅存在1個培養瓶且外推任何另外的子培養瓶之假設產率。冷凍前保

存10e6個LOVO後細胞用於身分染色。在丟棄上清液廢料之前，取出2×1 mL上清液等分試樣用於代謝物分析且儲存於-80℃。

Gen 3過程之概述

第0天 - Gen 3(腫瘤處理)

【2044】如本文中所概述進行Gen 3方法之腫瘤處理。接收腫瘤核心活體組織切片且將其洗滌3次。使用直尺量測每個組織核心之長度及理論質量並進行記錄。

第0天 – Gen 3(活化)

【2045】根據所概述之過程進行Gen 3之第0天(參見例如實例5至實例8)。將如上所述之剩餘活體組織切片等分至G-Rex 100M培養瓶中，該培養瓶含有500 mL DM + 6000 IU/mL IL-2，經升溫至37℃。對於所用各培養瓶，在37℃水浴中解凍4×1 mL小瓶中的經照射PBMC。使用移液管將PBMC轉移至具有46 mL溫熱DM + 6000 IU/mL IL-2之50 mL錐形管中。藉由血清學吸液管充分混合且取出4×1 mL等分試樣，並且按照本文所描述之方案在NC-200上以1:10稀釋度計數。計算250e6個PBMC所需的體積：(250e6/平均濃度=250e6個PBMC所需的體積)。將上一步的經計算體積添加至每個含有 500 mL DM+6000 IU/mL IL-2及腫瘤碎片的培養瓶中。將15 µL儲備OKT-3(1 mg/mL)添加至每個含有500 mL DM+6000 IU/mL IL-2、腫瘤碎片及PBMC飼養細胞

的培養瓶。為每個培養瓶標上「腫瘤ID、Gen 3、培養瓶編號、首字母縮寫、日期」。置於37℃/5% CO_2培育箱中直至第8天。

第7/8天 – Gen 3(再活化)

【2046】Gen 3過程之第7/8天係如例如實例5至實例9中所描述來進行。自培育箱中取出含有培養物的G-Rex 100M培養瓶且置於BSC中。取出2×1 mL上清液等分試樣以用於代謝物分析且儲存在-80℃。將經升溫至37℃之500 mL DM + 6000 IU/mL IL-2添加至G-Rex 100M培養瓶中。將經升溫至37℃之25 mL DM + 6000 IU/mL IL-2添加至50 mL錐形管中。在37℃水浴中解凍1×25 mL袋的PBMC，為袋子釘上血漿擴展裝置，用注射器吸取25 mL，並分配至所準備的50 mL錐形管中。以1:10(100 µL PBMC於900 µL AIM-V中)或1:100(如所描述製得1:10，且接著將100 µL轉移至另一個900 µL的AIM-V)進行4次細胞計數，按照標準方法計算經解凍飼養細胞的數目。計算500e6個PBMC所需的體積：(500e6/平均濃度=500e6個PBMC所需的體積)。將上述步驟計算出的PBMC體積添加至含有1L DM + 6000 IU/mL IL-2及核心活體組織切片的G-Rex 100M中。將30 µL的儲備OKT3(30 ng/mL)添加至培養瓶中。將培養瓶置於37℃/5% CO_2培育箱中。

第10/11天 – Gen 3(規模縱向擴大)

【2047】Gen 3過程之第10/11天規模縱向擴大係如例如實例5實例10中所描述來進行。取出培育箱中之培育瓶且取出2×1 mL上清液等分試樣以用於代謝物分析且儲存於-80℃。將流體轉移裝置無菌熔接至G-Rex 500MCS之紅色管線上，使流體轉移裝置穿過Baxter泵，並將Ashton吸液器無菌連接至BSC內部的另一端。將約700 mL培養基自G-Rex 100MCS轉移至G-Rex 500MCS，使泵停止，渦旋以干擾細胞層，且將剩餘細胞培養物轉移至G-Rex 500MCS。在轉移所有TIL之後，將G-Rex之紅色管線無菌熔接至升溫至37℃的DM + 3K IU/mL IL-2的5 L或10 L袋上。經重力排出培養基，直至G-Rex 500MCS之5 L標記。在完成排出之後，將培養瓶返回至培育箱。

第16/17天 – Gen 3(收集)

【2048】Gen 3過程之第16/17天係如例如實例5-1中所描述來進行。收集Gen 3之第17天的細胞，經由LOVO(TIL收集5cy)處理，且使用CRF程式#1冷凍於30×1 mL冷凍小瓶中(1:1比率之CS10:含1% HSA之Plasmalyte中)。在一些情況下，視在第0天接種之碎片的數目而定，僅存在1或2個培養瓶用於收集。在冷凍前保存10e6個LOVO後細胞用於純度染色。

最終產物及起始物質表徵：

【2049】可評估根據類Gen 2過程及Gen 3過程製造之

起始物質及最終TIL產物。使用標準方案量測冷凍之前的新鮮TIL產物之鑑別性(CD45+/CD3+%)。舉例而言，量測關於干擾素-γ產生及顆粒酶B釋放之TIL功能。根據IFN-γ釋放量測TIL之刺激。經由ELISA，根據顆粒酶B釋放量測TIL之刺激。可評估使用分化組及/或活化/耗竭組之CD107a表型、擴展表型、TIL表面抗原染色。可以進行TCRvβ定序。可以執行端粒酶活性及端粒長度。可以藉由CEDEX生物分析儀量測培養物上清液中的代謝物。

預期結果或接受準則

【2050】表37及表38中提供來自類Gen 2過程之預REP細胞及最終產物以及Gen 3過程之最終產物的預期結果。

【2051】

表37.類Gen 2過程之預REP測試及預期結果

測試類型	方法	接受準則
細胞計數/存活率	螢光	> 5×10e6個活細胞

【2052】

表 38.最終產物測試及接受準則（類 Gen 2 過程及 Gen 3 過程）

測試類型	方法	接受準則
釋放測試		
細胞存活率	螢光	≥ 70%
總活細胞計數	螢光	1e9 至 150e9
鑑別性（CD45+/CD3+%）	流動式細胞測量術	類 Gen 2： 對於所有適應症，≥ 90% CD45+CD3+ TIL Gen 3： 對於非卵巢，≥ 90% CD45+CD3+ TIL 對於卵巢，≥ 85% CD45+CD3+ TIL
干擾素-γ 產生（受刺激 - 未受刺激）	刺激及 ELISA	≥ 500 pg/mL

【2053】在一些實施例中，對以本文所描述之方法(諸如類Gen 2方法及Gen 3方法)產生的產物進行經冷凍最終產物測試。在一些實施例中，該測試包括評定以下中之一者或多者：分化、活化及耗竭標誌、顆粒酶B、CD107A、TCR vβ定序、端粒長度、端粒酶活性及代謝物。在一些情況下，藉由流動式細胞測量術，例如藉由TIL 1組之流動式細胞測量術評估分化。在一些情況下，藉由流動式細胞測量術，例如藉由TIL 2組之流動式細胞測量術評估活化及耗竭標誌。在一些情況下，藉由珠粒刺激及ELISA評估顆粒酶B。在一些情況下，藉由促分裂原刺激及細胞內流動式細胞測量術評估CD107A。在一些情況下，藉由深度定序進行TCR vβ定序。在一些情況下，使用TAT分析量測端粒長度。在一些情況下，藉由Q-TRAP測定端粒酶活

性。在一些情況下，使用TAT分析量測端粒長度。在一些情況下，使用CEDEX代謝物分析儀測定代謝物。

實例9：例示性GEN 3過程實例

準備第0天、第7/8天及第10/11天之確定培養基。

製備的IL-2

【2054】確定培養基批次體積：

- 第1批 = 3L DM1 @ 6000 IU/mL IL-2(為D0及D7/8提前14天準備)；
- 第2批 = 4L DM2 @ 3000 IU/mL IL-2(為D10/11提前14天準備)
- DM1=確定培養基1；DM2=確定培養基2
- 第1批DM1 = 6000 IU/mL×3000 mL = $18x10^6$ IU
- 第2批DM2 = 3000 IU/mL×4000 mL = $12x10^6$ IU

【2055】製備的IL-2：Akron預填充注射器1 mg於1 mL中。

表39.第1批：IL-2計算以製備3L 6000 IU的DM1。

A 準備裝入每個袋子的體積	**B** 每袋IL-2之最終濃度	**C** 要準備的袋數	**D** 所需的總IL-2 mg=mL **B(A*C)**	**E** 比活性 IU/mL（CoA）	**F** 每袋轉移之IL-2 **(B*A)/E**（1位小數）	**G** IL-2所需的總體積 **F*C**	**H** 需要的注射器數目	**I** **H**在0位小數下捨入
1000 mL	6000 IU/mL	3	$18x10^6$					

【2056】

表 40.第 2 批：IL-2 計算以製備 4L 的 3000 IU/mL 確定培養基。

A 準備裝入每個袋子的體積	**B** 每袋 IL-2 之最終濃度	**C** 要準備的袋數	**D** 所需的總 IL-2 mg=mL **B(A*C)**	**E** 比活性 IU/mL（CoA）	**F** 每袋轉移的 IL-2 **(B*A)/E**（1 位小數）	**G** IL-2 所需的總體積 **F*C**
1000 mL	3000 IU/mL	4	$12x10^6$			

表 41.根據要準備的 G-Rex 培養瓶的#的第 2 批選項：使用選中的選項。

選項	**H** 要處理的 GREX 培養瓶#	**I** 需要的確定培養基	**J** 要準備的 1L 袋#	**K** 批次所需的 IL-2 體積 **（G*H）**	**L** 需要的 IL-2 注射器#（**K** 取整為整數）
A	1	4L	4		
B	2	8L	8		
C	3	12L	12		
D	4	16L	16		

【2057】製備的 IL-2：Akron 凍乾 1mg。

表 42.第 1 批：IL-2 計算以製備 3L 6000 IU 的 DM 1

A 準備裝入每個袋子的體積	**B** 每袋 IL-2 的最終濃度	**C** 要準備的袋數	**D** 所需的總 IL-2 mg=mL **B(A*C)**	**E** 比活性 IU/mL（CoA）	**F** 每袋轉移的 IL-2 **(B*A)/E**（1 位小數）	**G** IL-2 所需的總體積 **F*C**	H 需要的注射器數目	**I** **H** 在 0 位小數下捨入
1000 mL	6000 IU/mL	3	$18x10^6$					

【2058】

表 43.第 2 批：IL-2 計算以製備 4L 的 3000 IU/mL 確定培養基

A 準備裝入每個袋子的體積	**B** 每袋 IL-2 之最終濃度	**C** 要準備的袋數	**D** 所需的總 IL-2 mg=mL **B(A*C)**	**E** 比活性 IU/mL（CoA）	**F** 每袋轉移之 IL-2 **(B*A)/E**（1 位小數）	**G** IL-2 所需的總體積 **F*C**
1000 mL	3000 IU/mL	4	$12x10^6$			

表 44.根據要準備的 G-Re 培養瓶#的第 2 批選項：使用選中的選項；

選項	**H** 要處理的 GREX 培養瓶#	**I** 需要的確定培養基	**J** 要準備的 1L 袋#	**K** 批次所需的 IL-2 體積 **(G*H)**	**L** 需要的 IL-2 注射器#（**K** 取整為整數）
A	1	4L	4		
B	2	8L	8		
C	3	12L	12		
D	4	16L	16		

【2059】製備的 IL-2：Cellgenix凍乾 1mg。

表 45.第 1 批：IL-2 計算以製備 3L 6000 IU 的 DM 1。

A 準備裝入每個袋子的體積	**B** 每袋 IL-2 的最終濃度	**C** 要準備的袋數	**D** 所需的總 IL-2 mg=mL **B(A*C)**	**E** 比活性 IU/mL（CoA）	**F** 每袋轉移的 IL-2 (B*A)/E（1 位小數）	**G** IL-2 所需的總體積 **F*C**	**H** 需要的注射器數目	**I** **H** 在 0 位小數下捨入
1000 mL	6000 IU/mL	3	$18x10^6$					

表 46.第 2 批：IL-2 計算以製備 4L 的 3000 IU/mL 確定培養基。

A 準備裝入每個袋子的體積	**B** 每袋 IL-2 的最終濃度	**C** 要準備的袋數	**D** 所需的總 IL-2 mg=mL **B(A*C)**	**E** 比活性 IU/mL（CoA）	**F** 每袋轉移的 IL-2 (B*A)/E（1 位小數）	**G** IL-2 所需的總體積 **F*C**
1000 mL	3000 IU/mL	4	$12x10^6$			

表 47.根據要準備的 G-Rex 培養瓶的#的第 2 批選項：使用選中的選項。

選項	**H** **要處理的 GREX 培養瓶#**	**I** **需要的確定培養基**	**J** **要準備的 1L 袋#**	**K** **批次所需的 IL-2 體積（G*H）**	**L** **需要的 IL-2 注射器#（K 取整為整數）**
A	1	4L	4		
B	2	8L	8		
C	3	12L	12		
D	4	16L	16		

初步製備

【2060】預製IL-2：對於預裝注射器中的Akron IL-2，無需重新配製，進行步驟 2.8；對於 Akron IL-2 凍乾並進行復原；且對於凍乾的Cellgenix IL-2，轉至步驟2.5並進行復原。

【2061】將以下物品轉移至生物安全櫃(BSC)中：Akron IL-2粉瓶、迷你尖釘(1)、注射用水瓶(1)、10 mL注射器(根據需要)及18G安全針頭(根據需要)。使用10 mL注射器刺入注射用水(WFI)瓶中，吸取1 mL WFI。將18G針頭連接至注射器並將1 mL WFI轉移至IL-2小瓶。將小瓶倒轉2至3次並旋動直至所有粉末溶解為止。避免泡沫形成，且不要劇烈混合。重複此步驟來復原所需數目之小瓶(若需

要，使用新注射器)。

【2062】記錄待復原之小瓶數目。將以下物質轉移至BSC 中：Cellgenix IL-2凍乾小瓶、迷你尖釘(1)、500 mL 0.25%乙酸(Hac)(1)、10 mL注射器(根據需要)、pumpmatic吸液管(1)及安全針頭18G(根據需要)。

【2063】使用10 mL 注射器及pumpmatic吸液管，吸取 2 mL HAc。將18G針頭連接至注射器並經由其隔膜將2 mL HAc轉移至小瓶中。將小瓶倒轉2至3次並旋動直至所有粉末溶解為止。避免泡沫形成，且不要劇烈混合。重複此步驟來復原第2.5部分中所需數目之小瓶。

【2064】將所需數目的預裝注射器轉移至BSC。根據需要使用流體分配器。根據需要使用注射器。每1L袋製備確定培養基。檢查CTS免疫細胞SR的解凍情況。

【2065】每1L要製備的培養基將以下物質轉移至BSC中：

- 50 mL CTS免疫細胞SR(1)
- 10 mL瓶裝硫酸建它黴素，50 mg/ml
- 1L CTS OpTmizer T細胞擴增SFM基礎培養基1L袋(1)
- CTS OpTmizer T 細胞擴增補充劑26 ML瓶(1)
- 100 mL Glutamax瓶(1)
- 10 mL血清學吸液管(2)
- 容器或50 mL錐形管「CTS 免疫細胞SR」(1)
- 容器或50 mL錐形管「Glutamax」
- 2L labtainer袋(如果需要)，用於製備

- 瓶子
- 60 mL注射器(根據需要)

【2066】

表48.根據下表製備確定培養基1L袋。標記要準備的合適的量：

選項	處理日	需要的確定培養基(L)	共準備1L袋	所需IL-2的最終濃度(IU/mL)
A	第1批 (第0天或第7/8天)	3 L	3	6000 IU/mL
B	第2批 (第10/11天)	4 L = 1 GREX培養瓶 8 L = 2 GREX培養瓶 12 L = 3 GREX培養瓶 16 L = 4 GREX培養瓶	4 8 12 16	3000 IU/mL

【2067】

表49.按照以下體積表說明製備每個1L確定培養基。

試劑	所需體積(m)
CTS OpTmizer T細胞擴增SFM基礎培養基	1000
CTS免疫細胞SR	30
CIS OpTmizer T細胞擴增補充劑	26
Glutamax	20
建它黴素	1

【2068】將所需的容器標記為Glutamax及CTS免疫細胞SR。使用適當大小的移液管，自瓶中取出20 mL的Glutamax，並轉移至標有Glutamax的50 mL容器中。重複所製備培養基袋之數目。將30 mL CTS SR轉移至標有CTS免疫細胞SR的50 mL錐形管中。重複所製備培養基袋之數目。在每個CTS免疫細胞SR容器中加入1 mL建它黴素並勻漿。

【2069】對於Cellgenix或Akro復原小瓶，使用足夠體積的注射器及18G 針頭，抽取所需體積的IL-2 用於1L確定培養基袋並轉移至每個CTS免疫細胞SR容器中並均質化。對於Akron IL-2預裝注射器，將IL-2之第1部分中計算之體積轉移至每個CTS免疫SR容器中並均質化。將流體分配器連接器連接至1 mL注射器，然後藉由魯爾鎖連接連接至預裝的Akron IL-2，取下注射器並將所需體積分配至每個CTS免疫細胞SR容器中並均質化。

【2070】將確定培養基袋上的擴展裝置連接至流體傳輸裝置，並將流體轉移裝置的另一側連接至Pumpmatic 移液管。將吸液器吸頭放入CTS OpTmizer T細胞擴增SFM基礎培養基的第一個1L 瓶中。將流體轉轉移置置於Acacia泵上。如下所示設定泵上的參數。程式：體積；速度：250 RPM；體積：1000 mL。

【2071】將第一瓶1L CTS OpTimizer T細胞擴增SFM基礎培養基的全部體積泵入確定培養基袋(2L Labtainer)中。將pumpmatic吸液管轉移至一個標有Glutamax的管中，並將整個體積抽入袋中。對一個標有免疫細胞SR的管及一瓶26 mL的補充劑重複進行。記錄轉移之總體積。將袋子裝滿後倒置混合並確保線條清晰。關閉導管上的夾子並熱封延長線三次。

【2072】為確定培藉由養基袋貼上標籤後：為袋子上釘上4"血漿轉移裝置。使用連接至pumpmatic吸液器的100 mL注射器，將來自CTS免疫細胞SR容器的全部體積吸取

至注射器中，其中添加了建它黴素及IL-2。

【2073】將帶有pumpmatic吸液管的注射器轉移至Glutamax 容器中，並將Glutamax的整個體積吸取至注射器中。將帶有pumpmatic吸液器的注射器轉移至CTS OpTmizer T 細胞中。擴增補充劑瓶(26 mL)並將整個體積吸取至注射器中。取出確定培養基袋的魯爾鎖蓋，並將注射器中的全部溶液注入培養基袋中，用培養基沖洗注射器三次，以確保全部溶液含有CTS SR、補充劑、glutamax、建它黴素及IL-2被添加至袋中。

【2074】取出注射器並藉由魯爾鎖連接連接擴展裝置，將其夾住並熱封三次。混合且重複。將袋在 =2℃至8℃下避光儲存直至使用。

GEN 3過程 – 第0天

初步操作

【2075】確定培養基(CTS OpTmizer)DM1。記錄確定培養基及保溫包培育的開始日期及時間。將培養基及保溫包加熱過夜(約18小時)。使用建它黴素(50 mg/mL)(1)、500 mL瓶的HBSS(1)及5 mL血清學吸液器(1)製備腫瘤洗滌培養基。

【2076】將5 mL 建它黴素(50 mg/mL)添加至500 mL HBSS瓶中。使用標籤或手動識別500 mL瓶的腫瘤洗滌培養基。將5 mL 腫瘤洗滌培養基添加至15 mL錐形瓶中，用於OKT3稀釋。保留腫瘤洗滌培養基直至使用。

【2077】使用以下製備飼養細胞袋：

- 10 mL注射器(4)
- 確定培養基袋(1 L)
- 預熱包(2)
- EV1000N袋(1)
- EV3000N袋(1)

【2078】閉合所有夾子，並使用無菌焊機將所製備的培養基袋無菌熔接至飼養細胞袋#1。藉由重力將500 mL±10 mL培養基轉移至飼養細胞袋中，且記錄加入之體積。假定1 g = 1 mL。熱封並移除飼養細胞袋#1，留下相同的原始導管長度。將飼養細胞袋#1轉移至SSC。

【2079】準備飼養細胞。

【2080】在37℃水浴中解凍飼養袋 3-5分鐘。記錄解凍開始及結束時間。使用一個魯爾接頭將飼養細胞袋#1連接至CC3。使用另一個魯爾接頭將飼養細胞袋#2 連接至CC3。用100 mL 注射器替換CC3歧管上的注射器。用CC3之尖釘刺穿飼養細胞袋，進入飼養袋之單個端口。旋轉活栓閥，使飼養細胞袋#1及飼養細胞袋#2處於關閉位置。閥門指示什麼是關閉的。

【2081】飼養細胞計數及濃度調整。如有必要，用AIM-V 製備每個細胞級份樣本的稀釋液(推薦 1:10 稀釋液)。NC200之最佳範圍在5×10^4與5×10^6個細胞/毫升之間。準備四個具有 4.5 mL AIM-V的錐形管。為每個細胞計數添加0.5 mL CF。

【2082】對樣本1進行細胞數目計算。表示NC-200 中使用的稀釋係數。下面記錄存活(活)細胞濃度及存活率。對所有樣本重複。

【2083】飼養細胞計數及濃度並測定存活率。使用記錄的數據計算四個計數的平均值：(飼養細胞1 + 飼養細胞2 + 飼養細胞3 + 飼養細胞4) / 4。計算活飼養細胞總數。飼養細胞懸浮液的體積×平均濃度。當總存活飼養細胞數至少為 $1x10^9$個細胞時，進行下一步調整飼養細胞濃度。當活飼養細胞總數<$1x10^9$個細胞時，聯繫管理。

【2084】使用p1000微量吸液器，將900µl的腫瘤洗滌培養基轉移至OKT3 等分試樣(100µL)中。藉由上下移液3次混合。

【2085】計算自飼養細胞袋#1中取出的飼養細胞的體積，以便將$1×10^9$個細胞添加至飼養細胞袋#2。$1×10^9$/平均活細胞濃度。

【2086】確定自飼養細胞袋#1轉移至飼養細胞袋#2的體積，同時將飼養袋保持在保溫包上。將50 mL空氣吸取至一個新的100 ml注射器並用其替換當前的注射器。將空氣排入飼養細胞袋#2。確保飼養細胞袋#1充分混合。用注射器自飼養細胞袋#1中取出計算的體積(步驟5.9)。對於大容量，使用另外的注射器。打開通向飼養細胞袋#2的夾子，並將注射器中的體積轉移至飼養細胞袋#2中。倒置注射器並排出空氣以清除管線。

【2087】擦拭飼養細胞袋 #2上的NIS。使用帶有18G

針頭的1 ml注射器，抽取0.6 ml在步驟5.8中製備的OKT3。取下針頭並經由NIS將OKT3分配至飼養細胞袋#2中。

【2088】使飼養細胞袋#2與歧管斷開熱封會留下足夠的導管以備將來熔接使用。將飼養細胞袋#2無菌熔接至確定培養基袋。將飼養細胞袋#2 置於天平上並稱量天平的皮重。

【2089】計算補足至2L總體積所需的體積為2000 mL——轉移的飼養細胞懸浮液的體積。打開所有夾子並轉移計算出的體積，假定1 g = 1 mL。在轉移所需的體積時夾緊。在空時藉由無菌熔接新的培養基袋來更換培養基袋。

【2090】將所需體積轉移至飼養細胞袋#2中後，將飼養袋翻過來並用空氣清除管線。熱封三次並破壞中間密封，留下大約12英吋的導管。該導管連接至G-Rex100 MCS培養瓶上的紅色管線。如有必要，附上擴展裝置。

【2091】將飼養細胞袋#2 轉移至培育箱。記錄放置在培育箱中的時間及培育箱#。記錄腫瘤處理的開始日期及時間。確定腫瘤的總保持時間為運送介質。

組織分割

【2092】將6孔板標記為「多餘腫瘤塊」。將四個100 mm皮氏培養皿中的每一個標記為「Wash_01」、「Wash_02」、「Wash_03」、「Wash_04」及「保持」。將5 ml腫瘤洗滌培養基添加至標記為多餘腫瘤塊的6孔盤的所有孔中。將50 ml 腫瘤洗滌培養基添加至每個100 mm的標有Wash_01、Wash_02、Wash_03及保持的皮氏培養皿

中。

【2093】標記一種50 ml的錐形管鑷子洗滌培養基、一種解剖刀洗滌培養基及一種蓋滴洗滌培養基。標記四個50 ml錐形管：碎片管1至碎片管4。將25 ml腫瘤洗滌培養基轉移至每個50 ml的錐形管中，分別標記為碎片管1至碎片管4。將20 mL腫瘤洗滌培養基添加至標記有鑷子洗滌培養基、解剖刀洗滌培養基及蓋滴洗滌培養基的每個50 mL錐形管中。將腫瘤洗滌培養基保存在BSC中，以進一步用於在分割過程中保持腫瘤水分。

【2094】僅對於分割而言，將解剖刀及短鑷子置於標記有鑷子洗滌培養基及解剖刀洗滌培養基的適當管中。將腫瘤容器轉移至BSC中。使用長鑷子將腫瘤自樣品瓶轉移至標記有Wash_01之100 mm皮氏培養皿中。

【2095】在環境溫度下於Wash_01中培育腫瘤3分鐘。記錄自運送介質中取出腫瘤並置於Wash_01中的時間。

【2096】重新蓋好樣品瓶且轉移至天平。記錄樣品瓶之重量且計算腫瘤組織之重量差。

【2097】將10 mL腫瘤運送介質轉移至標記有腫瘤運送介質的管中。記錄轉移至腫瘤運送介質管中的體積。

【2098】用18G針頭將10 mL腫瘤運送介質吸取至注射器中。對每個厭氧無菌瓶及好氧無菌瓶接種5 mL腫瘤運送介質。

【2099】將每個皮氏培養皿標記為分割1至分割4。記錄腫瘤培育1的停止時間。(培育至少3分鐘後)。使用鑷子

將腫瘤轉移至標記為Wash_02的100 mm皮氏培養皿中，並在環境溫度下培育腫瘤至少3 分鐘。記錄腫瘤培育開始時間。記錄腫瘤培育停止時間。

【2100】使用鑷子，將腫瘤轉移至標記為Wash_03的100 mm皮氏培養皿中，並在環境下培育腫瘤3分鐘。記錄腫瘤培育開始時間。記錄腫瘤培育停止時間。洗滌完成後，應將腫瘤移至『保持』盤中，以確保組織保持水分。

【2101】在整個分割過程中將直尺放在皮氏培養皿的蓋下方。使用長鑷子將腫瘤轉移至標記為分割1的皮氏培養皿中。量測且記錄腫瘤長度及接受之碎片數目。腫瘤之長度經量測為原始腫瘤直徑之總和。

【2102】將分割盤中的腫瘤初步分割為四個中間塊，或分成四組等體積。切割時要注意保留每個中間塊之腫瘤結構。若腫瘤非常小，則可以一次分割整個腫瘤。將沒有被主動分割的任何中間腫瘤塊轉移至保持盤以保持組織水分。在標記為分割1至分割4的皮氏培養皿的每個蓋子中，添加10至20滴(約 1 mL)以在靠近培養盤邊緣的位置形成一個洗滌緩衝液池，以容納所分割碎片。對每個要分割的中間碎片或組重複。可以根據操作者的判斷使用新鮮的解剖刀及鑷子。記錄腫瘤分割開始時間。

【2103】使用分割盤蓋下的直尺作為參考，輕輕地將腫瘤分割成27mm''的碎片(3x3x3mm)。快速加工且將整個組織分割成碎片。一次使用一個分割盤蓋工作，將分割的碎片轉移至每個盤內的緩衝液池中，以防止脫水。

【2104】使用移液管、解剖刀或鑷子計算獲得的總碎片數。記錄每個盤的值。當一個中間碎片沒有產生 60個碎片時，可以在同一個皮氏培養皿中分割下一個中間碎片，直到達到60個碎片。

【2105】更換蓋子並根據需要繼續分割第二、第三及第四個中間碎片。

【2106】在操作過程中注意避免蓋子的任何交叉。

【2107】注意在整個分割程序中始終保留組織水分。若需要向碎片添加緩衝液以保持其水分，則使用移液管。

【2108】計算最終碎片的總數。注意：根據產生的最終碎片數目，最多準備4個G-Rex 100MCS培養瓶。最多接種240個碎片。

表50：最終碎片總數

選項	碎片總數	待接種之培養瓶	每培養瓶碎片
A	少於30個碎片	1	碎片總數/1
B	31至60個碎片	2	碎片總數/2
C	61至90個碎片	3	碎片總數/3
D	91至240個碎片	4	碎片總數/4

【2109】使用上表，確定要接種的培養瓶數目及每個培養瓶要接種的碎片數目。根據表使用鑷子、移液管或解剖刀將確定數目的碎片轉移至標記為碎片管1至碎片管4的50 mL錐形管中，並在以下步驟中記錄轉移至每個50 mL管中的碎片。

【2110】將要添加至每個碎片管中的碎片數目(亦即，

產生的碎片總數/要接種的培養瓶數目，見上文第7.24節中的表)添加至每個適用的碎片管中。下面記錄每各管漂浮碎片的數目。若可以自「多餘腫瘤塊」盤中獲得，則添加與漂浮碎片數目相等的另外碎片。記錄腫瘤處理的分割停止時間。

【2111】自BSC中取出所有不必要的物品，將有利的組織碎片保留在錐形管碎片管1至碎片管4 中。丟棄任何未使用的腫瘤。

【2112】用飼養細胞懸浮液製備G-REX100MCS培養瓶。根據碎片管的數目計算要接種飼養細胞懸浮液之G-Rex 100MCS培養瓶的數目。自培育箱中取出飼養細胞袋#2。為G-Rex 100MCS #1接種：打開外包裝並將G-Rex 100MCS置於BSC中；閉合G-Rex100MCS中除了過濾器管線的夾子的所有夾子；確保所有魯爾鎖是安全的。當時與一個GREX 100MCS一起工作。

【2113】將飼養細胞袋#2無菌熔接至G-Rex 100MCS培養瓶上的紅色管線，並確保袋子的定期混合。將G-Rex培養瓶置於分析型去皮重天平上。標記G-Rex100MCS培養瓶#1 腫瘤碎片培養(第0天)並將培養瓶轉移至BSC。

【2114】為G-Rex 100MCS #2 -#4接種：對於另外的G-Rex 100MCS培養瓶，閉合除大過濾器管線以外的所有夾子。將飼養袋熔接至培養瓶的紅色管線上。根據需要重複相同的操作以便接種每個培養瓶。記錄細胞懸浮液添加體積。標記G-Rex100MCS培養瓶#2 腫瘤碎片培養(第0天)並

將培養瓶轉移至BSC。標記G-Rex100MCS培養瓶#1-#4腫瘤碎片培養(第0天)。

G-Rex100MCS腫瘤碎片培養D0(至多4個)GREX100MCS培養瓶的鑑定。

【2115】將腫瘤碎片添加至G-REX100MCS。每次一個G-Rex 100 MCS工作。將帶有飼養細胞懸浮液的G-Rex 100 MCS轉移至BSC。在 BSC內，擰下標有腫瘤碎片培養(D0)1的G-Rex 100MCS及標有碎片管的50 mL錐形管的蓋子。旋轉打開的碎片管1，同時輕輕抬起 G-Rex100MCS的蓋子。在旋轉的同時將帶有碎片的培養基添加至G-Rex100MCS。小心使G-Rex及蓋子對準並緊緊關閉蓋子。記錄轉移至GRex100MCS的碎片數目。記錄在GRex100MCS中觀察到的漂浮碎片的數量。

【2116】一旦碎片位於GREX培養瓶底部，將一個10 mL注射器連接至藍色加蓋NIS並吸取7 mL培養基。產生七個1 mL等分試樣，約5 mL用於擴展表徵且2 mL用於無菌樣本。將5份等分試樣(最終碎片培養物上清液)儲存在5至20℃下進行擴展表徵，直至主管提出要求。分別對一個厭氧BacT/Alert瓶及一個好氧BacT/Alert瓶中接種1 mL最終碎片培養物上清液。對採樣的每個培養瓶進行重複。

【2117】對每個G-Rex 100MCS進行重複。

【2118】下面記錄將GREX 100MCS培養瓶置於培育箱的時間。記錄培育向的溫度及CO_2讀數。記錄第0天處理的結束時間。

GEN 3過程 – 第7天

【2119】記錄確定培養基1及保溫包培育的開始日期及時間。將培養基及保溫包加熱過夜(約18小時)。記錄培養基及保溫包培育的結束時間及日期。培養基及保溫包是否在一夜之間加熱？如果沒有，請聯繫管理。

【2120】準備好飼養細胞袋並記錄處理的開始。將EV1000N 袋標記為飼養細胞袋#1及袋#2。閉合飼養細胞袋#1及#2的所有夾子。使用無菌焊機將準備好的培養基袋無菌熔接至飼養細胞袋#1。在此過程中將飼養細胞袋#1及#2上未使用的導管夾緊。將飼養細胞袋#1置於分析型去皮重天平上。夾住管線並將培養基袋掛在IV桿上。藉由重力將500 mL±10 m培養基轉移至飼養細胞袋#1中，且記錄增加之體積。假定1 g = 1 mL。

【2121】熱封並移除飼養細胞袋#1，留下相同的原始導管長度。將飼養細胞袋#1 轉移至 BSC。

【2122】準備飼養細胞。記錄要解凍的冷凍飼養細胞袋的批號。確保使用了兩個不同的批次。在37℃水浴中解凍飼養細胞袋3至5分鐘。記錄解凍開始時間。記錄解凍結束時間。自水浴中取出飼養細胞袋並確認袋子是乾燥的。

【2123】使用歧管上的一個魯爾接頭將飼養細胞袋#1連接至CC1。使用歧管的另一個魯爾接頭側將飼養細胞袋#2袋連接至CC1。將20 mL空氣吸取至100 mL注射器中。移動活栓使注射器處於關閉位置。用100 mL注射器更換

CC1歧管上的注射器。用來自CC3的尖釘將每個飼養細胞袋刺入飼養袋的單個端口。

【2124】旋轉活栓閥，使飼養細胞袋#1及2 處於關閉位置。閥門指示已關閉。

【2125】打開進料袋管線的夾子。藉由一次吸取將兩個飼養細胞袋的內容物吸取至注射器中。記錄回收的總體積。將飼養細胞袋#1及飼養細胞袋#2放在預熱包上。

【2126】旋轉活栓閥，使得飼養細胞袋處於『關閉』位置，且沿飼養細胞袋#1的方向打開所有夾子。

【2127】將注射器之內容物分配至飼養細胞袋#1中，同時輕緩混合。旋轉活栓閥，使飼養細胞袋#1處於關閉位置。將飼養細胞袋#1中的細胞充分混合。將10 mL注射器連接至飼養細胞袋#1的NIS，混合袋子並用至少6 mL細胞沖洗注射器 三次，然後取出1 mL樣本。將樣本轉移至冷凍小瓶1。對每個樣本使用新的10 mL注射器，以針對樣本2、3及4進重複。

【2128】計算飼養細胞懸浮液之體積。

【2129】飼養細胞計數及濃度調整。必要時，用AIM-V製備每個細胞級份樣本的稀釋液(推薦1:10 稀釋液)。NC200的最佳濃度範圍介於5×10^4與5×10^6個細胞/毫升之間。準備四個具有4.5 mL AIM-V的錐形管。為每個細胞計數添加0.5 mL細胞級份。混合樣本並自每個稀釋管中轉移500pL至一個新的冷凍管中。將樣本充分混合並進行細胞計數。記錄存活(活)細胞濃度及存活率。針對樣本2、3及

4進行重複。

【2130】使用步驟4.3中記錄之資料計算四個計數的平均值：(飼養細胞1 + 飼養細胞2 +飼養細胞3 + 飼養細胞4)/4。計算活飼養細胞總數。飼養細胞懸浮液的體積(步驟3.15)x 平均濃度。當存活飼養細胞總數為至少2×10^9個細胞時，進行下一步以調整飼養細胞濃度。

【2131】計算要自飼養細胞袋#1中取出的飼養細胞的體積，以便將2×10^9個細胞添加至飼養細胞袋#2。2×10^9/平均活細胞濃度。

【2132】使用p1000 微量吸液管，將900uL HBSS轉移至100uL OKT3等分試樣中。藉由上下移液3次混合。準備兩個小瓶。確定自飼養細胞袋#1轉移至飼養細胞袋#2的體積，同時將飼養袋保持在保溫包上。將50 mL空氣吸取至一個新的100 ml 注射器並用其替換當前的注射器。將空氣排入飼養細胞袋#2中。確保飼養細胞袋#1充分混合。用注射器自飼養細胞袋#1中取出計算出的體積。打開通向飼養細胞袋#2的夾子，並將注射器中的體積轉移至飼養細胞袋#2中。倒置注射器並分配空氣以清除管路。必要時，取出注射器並將空氣吸取至注射器並分配至飼養細胞袋#2中。確保有足夠的空氣以促進培養瓶的重力填充。

【2133】使用帶有所附18G針頭的1 mL注射器擦拭飼養細胞袋#2上的NIS，自步驟14.9中製備的一個等分試樣吸取0.6 mL OKT3。取下針頭並經由NIS將OKT3分配至飼養細胞袋#2中。倒置飼養細胞袋#2，確保培養基靠近端

口，並用0.5 mL飼養細胞沖洗注射器，以確保將所有OKT3添加至袋中。用第二個等分試樣重複，將總共1.2 ml OKT3分配至飼養細胞袋#2中。用0.5 mL飼養細胞產物沖洗注射器以確保將所有OKT3添加至袋中。

【2134】熱封來自歧管的飼養細胞袋#2，留下足夠的導管供將來熔接使用。將飼養細胞袋#2無菌熔接至培養基袋。將飼養細胞袋#2置於去皮重天平上。如果有的話，可以同時熔接兩個培養基袋。計算補足至總體積2L所需的體積。2000 mL -- 轉移的飼養細胞懸浮液體積。

【2135】打開所有夾子並轉移計算出的體積(假定1 g = 1 mL)。在轉移所需的體積時夾緊。當培養基袋為空時，如有必要，藉由無菌熔接一個新的培養基袋來更換。

【2136】將所需體積轉移至飼養細胞袋#2中後，將飼養袋翻過來並用空氣清除管線。閉合夾子並熱封三遍並破壞中間密封，留下大約12英吋的導管。將該導管連接至G-Rex 100 MCS培養瓶上的紅色管線。

【2137】將飼養細胞袋#2轉移至培育箱。記錄置於培育箱中的時間。用飼養細胞懸浮液製備G-REX100MCS培養瓶。根據第0天生成的G-Rex培養瓶的數目記錄要處理的G-Rex 100MCS培養瓶的數目。自培育箱中取出G-Rex培養瓶並記錄每次取出培養瓶時取出培養瓶的日期及時間。自培育箱中取出飼養細胞袋#2。

【2138】在添加飼養細胞懸浮液之前移除上清液。將G-Rex100 MCS轉移至BSC，並將一個10 mL注射器連接至

藍色封蓋NIS。吸取5 mL培養基。產生五個1 mL等分試樣。將5個等分試樣(預處理培養物上清液)儲存在-20℃下進行擴展表徵，直至主管提出要求。為小瓶標上適當培養瓶編號。繼續將飼養細胞接種至G-Rex100 MCS中。對每個G-Rex100 MCS培養瓶重複步驟。

【2139】接種G-Rex 1：確認G-Rex100MCS上的所有夾子均已閉合，但過濾器管路的夾子除外。當時與一個GREX 100MCS一起工作。將飼養細胞袋 #2無菌熔接至G-Rex 100MCS培養瓶上的紅色管線。在IV桿上懸掛飼養細胞袋#2，並確保定期混合袋子。將G-Rex培養瓶置於分析型去皮重天平上。鬆開所有管線並經重力將500 mL飼養細胞袋#2按重量轉移至G-Rex 100MCS培養瓶1中。假定1 g = 1 mL。記錄添加至每個培養瓶中的飼養細胞級份的數目。一旦將所需體積轉移至G-Rex培養瓶中即閉合較靠近G-Rex之導管附近的夾子，以停止將飼養細胞添加至培養瓶中。倒轉飼養袋且使導管中的飼養細胞懸浮液流回飼養袋。

【2140】標記G-Rex100MCS(#1)第7天-TIL培養物 + 飼養細胞。將G-Rex100 MCS轉移至培育箱並記錄日期及時間。接種G-Rex 2-4：對於另外的G-Rex 100MCS培養瓶，確證除大過濾器管線外的所有夾子均已閉合。將飼養細胞袋#2熔接至紅色管線上。根據需要重複接種每個培養瓶。記錄加入的細胞懸浮液體積。將G-Rex100MCS 標記為第7天-TIL培養物 + 飼養細胞及最多4個GREX100MCS

培養瓶。記錄時間。

GEN 3過程 - 第11天

準備TIL處理

【2141】記錄確定培養基(DM2)培育的開始日期時間。將培養基加熱過夜(約18小時)。記錄培養基培育的結束時間及日期。將TIL懸浮液自G-REX 100MCS轉移至 G-REX 500 MCS。記錄處理起始時間。自培育箱中取出第一個G-Rex 100MCS培養瓶並轉移至BSC。檢查除大過濾器管線以外的所有夾子均閉合。確保所有魯爾鎖均係安全的。將一個10 mL注射器連接至藍色加蓋NIS並吸取7 mL預處理培養物上清液

【2142】

預處理培養物上清液

【2143】產生七個1 mL等分試樣：5 mL用於擴展表徵，2 mL用於無菌樣本。該樣本必須在混合培養瓶之前自每個培養瓶中取出。對每個培養瓶重複。

支原體上清液收集：

【2144】使用新注射器，使用藍色加蓋NIS自每個培養瓶中取出適當體積的上清液。請參閱下文，瞭解根據培養瓶數目移除的體積。將上清液轉移至標記為D10/11支原體上清液的15 mL錐形管中。總共移出10 mL。該樣本必須在混合培養瓶之前自每個培養瓶中取出。在BSC中保留15

mL錐形管，直到第4節需要。

- 1個培養瓶 = 10 mL
- 2個培養瓶 = 5 mL/培養瓶
- 3個培養瓶 = 3.3 mL/培養瓶
- 4個培養瓶 = 2.5 mL/培養瓶

QC樣本收集：

【2145】藉由輕輕旋轉使細胞懸浮來小心地混合培養瓶。使用新注射器，根據要處理的培養瓶數目取出以下體積並加入 50 mL錐形管中。自每個培養瓶中吸取的樣本保持分開且不合併。

- 1個培養瓶 = 40 mL
- 2個培養瓶 = 20 mL/培養瓶
- 3個培養瓶 = 13.3 mL/培養瓶
- 4個培養瓶 = 10 mL/培養瓶

【2146】標記每個錐形管第10/11天QC樣本培養瓶#。儲存在培育箱中，直至第4節中需要。對每個培養瓶重複。

【2147】將每個培養瓶中的5個等分試樣(預處理培養物上清液)儲存在 20℃以下以進行擴展表徵，直至主管提出要求。

【2148】分別對一個厭氧BacT/Alert瓶及一個好氧BacT/ Alert瓶中接種1 mL預處理培養物上清液，先前收集了該預處理培養物上清液用於對每個採樣之培養瓶進行無

菌測試。繼續將細胞懸浮液轉移至G-Rex 500MCS中。

【2149】注意：對於BSC外的多個G-Rex 100MCS培養瓶，可以並行執行後續步驟。每個G-Rex 100MCS均被轉移至其自己的具有相應編號的G-Rex500MCS(例如，G-Rex 100MCS#1 被轉移至G-Rex 500MCS #1)。

【2150】將含有IIL懸浮液之G-Rex100MCS上的透明細胞收集物無菌熔接至Y型血液過濾器的一個輸入管線。打開BSC中的G-Rex 500MCS。確保除大過濾器管線外的所有夾子均閉合，然後自BSC中取出GREX 500MCS，並將過濾器之末端熔接至G-Rex 500MCS上的紅色管線。熱封未使用的血液過濾器之輸入線以防止洩漏。將G-Rex 100MCS的透明管線插入GatheRex上的藍色收集夾。將細胞懸浮液轉移至G-Rex 500MCS：鬆開通向G-Rex 500MCS的所有夾子。將細胞懸浮液轉移至G-Rex500 MCS培養瓶中。當液體轉移開始時，抬高血液過濾器的末端(將血液過濾器垂直倒置)，直到腔室完全充滿液體。過濾器完全灌注後，可將其水平放置在工作台上。*避免了腫瘤碎片被轉移出G-Rex100MCS，因為該等碎片有可能堵塞管線。當藉由按下藍色X使G-Rex 100MCS的體積減少至500 ml時，使用培養瓶上的刻度，停止收集。輕輕旋轉培養瓶以重新懸浮培養基中的細胞。若觀察到任何組織碎片，將培養瓶傾斜45°角且使該等組織碎片在收集吸管對面沈降。繼續將細胞懸浮液轉移至GRex 500MCS培養瓶中。當G-Rex100MCS的體積減少至300 ml至200 ml之間時，使用培養瓶上的刻

度，停止收集。旋轉培養瓶以重新懸浮培養基中的細胞。若觀察到任何組織碎片，將培養瓶傾斜45°角且使該等組織碎片在收集吸管對面沈降。將細胞懸浮液重新轉移至G-Rex500 MCS培養瓶中。當藉由按下藍色X將100MCS的體積減少至-100 ml時，使用培養瓶上的刻度，停止收集。旋轉培養瓶以重新懸浮培養基中的細胞。若觀察到任何組織碎片，將培養瓶傾斜45°角且使該等組織碎片在收集吸管對面沈降。一旦沈降，將培養瓶慢慢地向收集吸管傾斜，留下碎片相對且使介質在吸管周圍聚集。保持傾斜並繼續將細胞懸浮液轉移至G-Rex500 MCS培養瓶中。當空氣進入管線時，GatheRex停止。倒置血液過濾器(Y部分向上)。重複直到所有流體均自過濾器及管道轉移至500MCS培養瓶中。完成後，閉合所有夾子且熱封並移除G-Rex100MCS。G-Rex100MCS及過濾器組件可能會被丟棄。

【2151】標記培養瓶G-Rex500MCS #1至#4：對每個G-Rex 500 MCS重複標記步驟。將G-Rex500MCS #1轉移至培育箱直至使用，並繼續下一個G-Rex100MCS系列。G-Rex 2-4：對於另外的G-Rex 100MCS培養瓶，重複相同的操作，將TIL懸浮液自G-Rex100MCS轉移至G-Rex500MCS培養瓶。記錄培育箱ID及將G-Rex 500MCS置於培養箱中的時間。

培養基添加

【2152】注意：對於每個G-Rex 500MCS培養瓶，可以

並行執行以下步驟。對於每個待處理的G-Rex 500MCS，自培育箱中取出4L培養基。將每個培養基袋熔接至4S4M60歧管的支腿上。確保端子上的夾子閉合。自培養箱中取出500MCS培養瓶並在5L刻度處進行標記。將歧管的末端熔接至500MCS培養瓶的紅色管線上。懸掛4個培養基袋並允許培養基藉由重力轉移。不允許填充體積超過5L。

【2153】將GREX 500MCS轉移至培養箱。下面記錄在適當步驟中將培養瓶置於培育箱中的時間。每個G-Rex500MCS培養瓶重複步驟。將G-Rex 1 – 4(及任何額外的)放入37℃及5% CO2的培養箱中。記錄培育箱ID及時間。在置放所有培養瓶之後記錄培育箱的溫度及CO2讀數。

製備QC樣本

【2154】自培育箱中取出標有D10/11 QC樣本培養瓶#的錐形管。記錄取出的時間。使用5 mL吸液管將樣本充分混合並將四份0.5 mL等分試樣轉移至標記為1-4的冷凍小瓶中進行計數。對每個錐形管重複。在自每個培養瓶的錐形管中等分所有用於計數的樣本後，將體積合併至一個標有「D10/11 QC合併樣本」的新的50 mL錐形管中。使用吸液管將合併樣本充分混合並將四份0.5 mL的合併樣本轉移至標記為1-4的冷凍小瓶中進行計數。在NC-200上使用Viability and Cell Count_Iovance方案。使用NC-200，對樣本1進行細胞數目計算。請務必指明NC-200中使用的稀釋

係數。下面記錄存活(活)細胞濃度及存活率。針對樣本2、3及4進行重複。

【2155】培養瓶1(若只有1個培養瓶，則不會計算合併之樣本)使用記錄的資料計算四個計數的平均值：(培養瓶1 TIL 1 +培養瓶1 TIL 2 +培養瓶1 TIL 3 +培養瓶1 TIL 4)/4。培養瓶2使用步驟 4.7 中記錄之資料計算四個計數的平均值：(培養瓶2 TIL i + 培養瓶2 TIL 2 + 培養瓶2 TIL 3 + 培養瓶2 TIL 4)/4。培養瓶3使用步驟 4.9中記錄之資料計算四個計數的平均值：(培養瓶3 TO_1 +培養瓶3 TIL 2 +培養瓶3 TIL 3 +培養瓶3 TIL 4)/4。培養瓶4使用步驟 4.11 中記錄之資料計算四個計數的平均值：(培養瓶3 TIL 1 + 培養瓶3 TIL 2 + 培養瓶3 TIL 3 + 培養瓶3 TIL 4)/4。

【2156】合併係使用在步驟4.13中記錄的資料計算四個計數的平均值：(合併之TIL 1 + 合併之TIL 2 + 合併之3 +合併之TIL 4)/4。根據合併之樣本計數計算活細胞總數目。若只有一個培養瓶，則使用培養瓶1計數。細胞懸浮液體積(40 mL - 為計數而移除的總體積)x 平均活濃度。計算為支原體測試取出1×10^6個細胞所需的體積。1×10^6個細胞/平均存活濃度(步驟4.14 或4.6)。取出計算的體積並放入標有 D10/11 支原體上清液的管中。已添加標記管以指示1×10^6個細胞。計算D10/11 QC樣本管中剩餘的總活細胞。TVC：1×10^6個細胞。計算濃度為$10x10^6$個細胞/毫升的細胞級份(CF)用於冷凍保存所需的體積。計算要製備的小瓶數目。CS10的體積等於要配製的小瓶數。每個小瓶中

的最終體積為 1 mL CS10。將標有D10/11 QC樣本合併管的錐形管在20℃下350 G離心5分鐘。

【2157】捨棄上清液。根據計算添加適量的CS10。每管最終濃度為10×10^6個細胞/mL。將體積等分至1.8 ml冷凍小瓶中；每個冷凍小瓶1 mL。將小瓶標記為D10/11保留。分裝後，放入Mr. Frosty-80℃冷凍機或同等產品中。記錄處理結束時間。

IL-2 Proleukin等分試樣製備

【2158】製備含1% HAS之PlasmaLyte A。在無菌過濾器單元中，向384 mL PlasmaLyte A中添加16 mL 25% HSA儲備液。下面記錄體積。

表51：體積

試劑	**所需體積**
25% HAS	**16 mL**
PlasmaLyte A	**384 mL**
總體積	**400 mL**

【2159】注意：以上體積足以準備最終濃度為6×10^4 IU/mL之一個IL-2小瓶。經由0.22 μm過濾器單元過濾培養基。標記為含1% FBA之PlasmaLyte A。

製備rhIL-2儲備液。

【2160】在含1% HAS之PlasmaLyte A中製備rhIL-2儲備液(6×10^2 IU/mL最終濃度)。將18G針頭連接至3 mL 注

射器並吸取1.2 mL注射用水。注入IL-2小瓶中。不自小瓶取出注射器。

【2161】將小瓶倒轉2至3次並旋轉直至所有粉末溶解為止。不要搖晃或渦旋以防止起泡。在不自小瓶中取出注射器的情況下，自小瓶中吸取溶液並進行量測，且將該溶液置於500 mL無菌瓶中。

【2162】計算所需1% HSA稀釋劑之體積。注意：根據製造商的說明，在用1.2 mL WFI復原後，每個小瓶含有18×10^4 IU/mL。

【2163】將500 mL無菌瓶標上IL-2工作儲備液6×10^4 IU/mL。將計算量之1% HSA轉移至已添加經復原IL-2之500 mL無菌瓶中。充分混合。必要時將適當量轉移至無菌樣品杯，以便於等分。標記為IL-2工作儲備液6×10^4 IU/mL。

【2164】將IL-2工作儲備液中的經復原6×10^4 IU/mL 1L-2以1mL等分試樣等分至標記管中。將試管標記為Proleukin IL-2，6×10^4 IU/mL 並儲存在 -80℃。完成等分後，記錄所製備之1 mL等分試樣之數目。

GEN 3過程 - 第16/17天

【2165】確證第10/11天初步無菌結果。洗滌緩衝液製備(1% HAS/PlasmaLyte A)。記錄處理開始時間。鑑別5L labtainer：「Plasmalyte 1% HSA 洗滌緩衝液」。

【2166】將HSA及Plasmalyte轉移至5L袋中以製作

LOVO洗滌緩衝液：使用魯爾接頭，將擴展裝置無菌連接至5L labtainer。用迷你尖釘為每個HSA瓶加釘。使用合適尺寸的注射器經由擴展管線將總體積為125 mL的25% HSA轉移至5L袋中。閉合4S-4M60接頭裝置上的所有夾子。為每個PlasmaLyte袋加釘。將4S-4M60的一個陽端熔接至Acacia泵罩的入口管線上。將泵罩的一側熔接至5L Labtainer。閉合5L袋子上的所有夾子，除了泵管線以外。懸掛PlasmaLyte 袋並將整個體積泵入5L Labtainer中。

【2167】熱封連接至袋子的4S4M60歧管管線，保留與5L Labtainer袋子的魯爾連接。混合袋子並將LOVO洗滌緩衝袋保持在室溫下。標記為帶有日期的LOVO 洗滌緩衝液。在環境溫度下24小時內失效。

【2168】準備用於冷凍保存的空白袋：將注射器連接至LOVO洗滌緩衝液並取出50 mL的LOVO洗滌緩衝液。轉移至CS750 袋中並使用注射器去除袋中的任何空氣。將紅色蓋子連接至管線。為CS750袋標上「含有LOVO洗滌緩衝液的空白」、批次記錄批號及首字母/日期。

IL-2製備(Proleukin)

【2169】當預先製備IL-2 時：混合LOVO洗滌緩衝液袋並使用大小合適的注射器，取出並轉移40 mL洗滌緩衝液至「IL-2 6×10^4 IU/mL」管中。計算添加至Plasmalyte + 1% HSA 中的經復原IL-2 體積：經復原IL-2的體積 =(IL-2的最終濃度×最終體積)/比活性。記錄比活性。1L-2的最

終濃度：6)(10^4 IU/mL。最終體積：40 mL。去除記錄為「 推薦的復原體積」的WFI 量，並將18G針頭固定在注射器上，並將IL-2重新懸浮在小瓶中。使用連接至18G針頭的1 mL 注射器子經復原IL-2中去除計算出的IL-2初始體積，並轉移至「IL-2 6x10^4 IU/mL」管中。

樣本收集

【2170】記錄將要處理的G-Rex 500培養瓶的數目。記錄收集了多少培養瓶。每個要收集的培養瓶需要一個5L Labtainer。當要收集兩個以上的培養瓶時，使用兩個EV3000N袋來收集細胞。表示用於收集細胞的初級EV3000N袋的數目。根據需要準備一定數目之EV3000N袋並標記為細胞收集池#。閉合5L袋子的所有夾子，並對每個labtainer袋子上附加擴展裝置。最後熱封擴展裝置。將袋子標記為培養瓶上清液袋#。針對要收集的每個培養瓶進行重複。

【2171】自培育箱取出G-Rex 500MCS培養瓶並置放於緊鄰GatheRex的工作台上。檢查除大過濾器管線以外，所有夾子閉合。確保所有魯爾鎖均係安全的。若要使用2個或更多個5L廢Labtainers 袋，可以同時使用第二個GatheRex泵。當第一個G-Rex 500M-CS代之體積減小時，可準備下一個培養瓶以減少體積。將紅色培養基管線自G-Rex 500M-CS培養瓶無菌熔接至預先準備好的合適的上清液袋上。將紅色管線置於GatheRex泵的紅色狹槽中，並

將GatheRex管線連接至G-Rex上的過濾器管線。將第一個G-Rex 500M-CS培養瓶的透明收集管線無菌熔接至細胞收集池EV3000袋上，然後將透明管線置於GatheRex上的藍色狹槽中。自第一個G-Rex 500M-CS中取出4500 mL上清液。在去除上清液時，將「細胞收集池」袋置於上清液袋的頂部。旋轉G-Rex培養瓶以將細胞自膜上分離。在下一步驟期間維持邊緣傾斜。

【2172】鬆開通向細胞收集池袋的夾子。啟動GatheRex以收集細胞級份。按下GatheRex上的藍色按鈕，輕輕攪動G-Rex，同時收集細胞懸浮液以保持細胞懸浮。當細胞收集停止時，閉合夾子。鬆開所有夾子並熱封：G-Rex培養瓶的清空管線；G-Rex培養瓶的紅色管線。根據需要重複直到所有G-Rex 500MCS培養瓶體積減小並進行收集。

【2173】QC取樣(包含用於支原體檢測)：將一個適當大小的容器標記為支原體池樣本。在每個「上清液」袋上無菌熔接擴展裝置。使用60 mL注射器，自下表中的全部「上清液袋」中取出最多60 mL的上清液，以獲得最具代表性的樣本。若收集多於一個培養瓶，則收集支原體池容器中的所有上清液。自每個上清液15 mL管中的上清液池中分配10 mL。保持在2-8℃(支原體及原體參考)。將「上清液-支原體」及「上清液-支原體參考」管轉移至QC。

【2174】用於表徵的上清液收集。自每個上清液袋中取出 5 mL並以1 mL等分試樣以進行擴展表徵。將5份等分

試樣儲存在 5-20℃以進行擴展表徵，直到贊助商提出要求。在收集的上清液培養瓶之間混合表徵樣本。收集所有樣本後，丟棄上清液袋。

【2175】將EV3000N袋標記為「LOVO 來源袋」並密封關閉LOVO來源袋(新EV3000 袋)並移除連接。打開BSC中的y 型血液過濾器並閉合所有夾子。將過濾器的出口管道無菌熔接至LOVO來源袋上。將過濾器的每個入口管道無菌熔接至每個細胞級份(CF)池袋上。懸掛 CF池袋進行過濾。打開所有夾子且使細胞藉由重力經由血液過濾器排至LOVO來源袋。藉由垂直握住過濾器來灌注過濾器。防止細胞在袋子底部凝結。

【2176】將所有細胞轉移至LOVO來源袋後，閉合所有夾子。熱封以保持與以前相同的管道長度(使用標記作為指南)。稱量含有細胞懸浮液之完整LOVO來源袋。計算細胞級份體積(CF)：(認為1g 等於1 Ml)LOVO 來源袋的重量 – 乾重。充分混合LOVO來源袋。使用10 mL注射器，經由NIS均質化細胞級份並去除1 mL細胞級份，然後轉移至第一個冷凍小瓶中。使用新的10 mL 注射器對剩餘的三個冷凍小瓶重複此步驟三次。將LOVO來源袋置於培育箱中。計算LOVO來源袋中的細胞級份之剩餘體積。

【2177】使用自動化細胞計數器進行細胞計數。用4.5 mL AIM-V製備四個15 mL 錐形管。其可以提前準備。NC200之最佳範圍在5×10^4與5×10^6個細胞/毫升之間。(建議1:10稀釋)。對於1:10 稀釋，向先前製備的4500pL AIM

V中添加500pL CF。若需要不同的稀釋度以達到最佳範圍，請注意使用的稀釋度。使用的稀釋係數 = 10。使用NC-200，對樣本1進行細胞數目計算。請務必指明NC-200中使用的稀釋係數。下面記錄存活(活)細胞濃度及存活率。針對樣本2、3及4進行重複。

【2178】計算四次計數的平均值：(TIL01+TIL02+TIL03 +TIL04)/4；平均總活細胞濃度(活細胞)；平均總細胞濃度(活細胞 + 死細胞)；平均存活率百分比。計算LOVO前的TC(總細胞)(活細胞 + 死細胞)= 平均總細胞濃度(LOVO前的TC濃度)(活細胞 + 死細胞)(步驟 4.44)x LOVO來源袋的體積。計算LOVO前的TVC(總活細胞)(活細胞)= 平均總活細胞濃度(LOVO前)(活細胞)(步驟4.44)x LOVO來源袋的體積。

【2179】在一些實施例中，若總細TC> 5×10^9，則取出5×10^8個細胞以作為MDA保留樣本冷凍保存。5×10^8 / 平均TC濃度(步驟4.44)= 要取出的體積。若TC 低於5×10^9，則取出4 $x10^6$個細胞以作為MDA 保留樣本進行冷凍保存。4×10^6 / 平均TC濃度 = 要取出的體積。在冷凍保存步驟之前保存於培育箱中。

【2180】在加載LOVO之前確定是否需要取出細胞。TVC是否超過$150x10^9$個細胞？(是/否)。若是，繼續。若否，則不需要取出細胞。計算要取出以保留$150x10^9$個活細胞的細胞數目：LOVO前TVC(參見步驟4.45)-5×10^8或4×10^6或N/A(參見步驟4.46)-$150x10^9$個細胞。計算要取出

的細胞體積：要取出的細胞數目(參見步驟4.48)÷ 平均活細胞濃度。取出計算出的細胞懸浮液體積並丟棄廢液容器中的細胞。計算LOVO來源袋中所含細胞級份之剩餘體積。計算袋中剩餘的剩餘細胞總數。計算LOVO前的TC(總細胞數)-。平均總細胞濃度(參見步驟14.44)X 剩餘體積(參見步驟4.52)= LOVO前剩餘的TC。若有需要，則將LOVO來源袋置於培育箱中。記錄培育箱編號及置於培育箱中之時間。如有必要，請按照LOVO 手冊中的說明進行LOVO收集及LOVO校準。LOVO運行結束。按照說明操作直至 LOVO運行結束。根據所選配置文件確定所需的CS10袋子數量。注意：準備空白袋需要額外的50 mL CS10。

【2181】確定所需的CS750冷凍袋數量。閉合連接處附近CS750袋的所有夾子。識別每個CS750冷凍袋：按照以下步驟的說明標記最終產品袋。將每個DP袋的袋標籤插入袋頂部的「小袋」中。在小袋的開口部分密封三遍以保持標籤就位。對於每個DP袋，密封魯爾接頭下方的一根導管並取下夾子。將CC3的「尖釘」末端熔接至CS10袋子上(保留CC3歧管的要求)。保留CC3的未使用的「尖釘」v。將CC3的「魯爾」末端無菌熔接至CS750袋上(保留CC3歧管的要求)。

【2182】完成所有組裝後，將未使用的導管密封在每CS750冷凍袋上，靠近連接處。如有必要，可以將組件放入自封袋中，然後放入冰箱，直至LOVO後FCF袋與LOVO

套件斷開連接。所有帶有先前標記的CS10及CS750袋的歧管組裝都可以提前完成並儲存在冰箱中直至使用。使用適當尺寸的注射器吸取50 mL的CS10。將注射器連接至含有LOVO 洗滌緩衝液(之前在第8節中製備)的CS750袋空白，並注入50 mL的CS10。三重熱封低於尖釘端口水平的導管。在第二個密封點上切割。用「含有LOVO洗滌緩衝液及CS10批號、首字母/日期的空白」重新標記CS750袋子。將空白袋放在冷袋上，直至放入CRF中。

IL-2添加

【2183】選擇與所用過程相對應的IL-2 添加量。體積計算為：滯留體積×2×300 IU/mL = 所需1L-2的IU。需要1L-2的IU/6x10^4 IU/mL = 添加至LOVO後FCF袋中的1L-2體積。若使用在步驟3.2至3.6中準備的IL-2 管：LOVO 3 mL注射器上的18G 針頭。自所準備的IL-2 6x10^4 IU/mL錐形管中吸取一定體積之IL-2。若使用先前製備的IL-2等分試樣：使用合適的注射器及針頭自標記為IL-2 6x10^4 IU/mL的等分試樣管中吸取計算體積。取下針頭，經由LOVO後袋上的NIS 將IL-2 轉移至LOVO後FCF袋中。

【2184】利用空氣清空管線。確保添加了所有IL-2，並且沒有任何殘留在管線上。將1L-2添加至LOVO 後袋中後，藉由熔接至圖中剩餘的一個尖釘導管街頭，將LOVO後FCF袋連接至CC3。保留CC3歧管的夾子。

最終調配

【2185】將50 mL錐形管標記上「FCF保留物」。準備內毒素參考、D16或17 IFN-y保留物、D16或17 QC測試及MDA保留(若適用)的標籤。將DP 袋、Lovo後袋 + IL-2及CS10袋放在冰袋上。

【2186】將100 mL注射器連接至CC3歧管。打開通向CS10袋子的夾子。吸取確定的CS10的體積。仔細檢查要添加的體積。將CS10的體積分至LOVO後FCF袋中。記錄添加之體積。清空管線。輕輕混合。記錄CS10添加時間。

【2187】根據所使用的配置文件，如所描述選擇每個DP袋將添加的FCF 體積。如上所述，標記了與使用的配置文件相對應的每個DP袋要移除的保留體積。

【2188】DP袋#1：一次操控一個袋子。小心地藉由將注射器與活栓朝下朝向工作台來正確量測所有體積。

【2189】FCF體積：取下注射器並更換為新注射器。將細胞產物充分混合。根據所使用的過程吸取適當體積的FCF產物。將其注入DP袋 #1。記錄添加的FCF體積。

【2190】保留體積：將細胞產物充分混合。自DP袋#1中吸取存在於 DP袋#1 中的空氣。根據使用過程吸取適當體積的保留物。倒置注射器並用空氣清空管路。閉合DP袋夾。將保留體積注入保留物的50 mL管中，記錄添加的保留體積。如有必要，使用另外的注射器取出清空管線的空氣。

【2191】DP袋 #2 - #4：對 DP袋 #2重複。FCF體

積：記錄添加的FCF體積。保留體積：記錄取出的保留體積。用10 mL注射器吸取LOVO後FCF袋之所有剩餘體積並轉移至標記有LOVO後FCF袋之管中。

【2192】使用止血鉗夾住所有DP袋的管線。自BSC中取出所有組件。將冷凍袋置於水平面。三重熱封低於尖釘端口水平的導管。在第二個密封點上切割。使導管與冷凍袋斷開連接。對每個冷凍袋重複此等步驟以進行密封。

【2193】繼續目視檢查每個DP袋。檢查標籤上的批號是否與 ID批次匹配；袋子是否有可見的洩漏；袋子是否有異常的大細胞團；袋子是否有異常觀察結果。檢查後，將每個DP 袋放入盒子及冰袋中或放在 2-8℃下。在關閉盒子之前，確保已置放紗布覆蓋端口。

準備MDA保留瓶。

【2194】將標有「MDA保留」的管在 20℃下以400 xg的速度離心5分鐘，同時完全制動並完全加速。在BSC中，吸出上清液。輕敲管底以使細胞再懸浮於剩餘流體中。將管子放在一邊，以便以後加入CS10培養基。

冷凍保存細胞

【2195】用70% IPA對受控速率冷凍機(CRF)室進行消毒。根據下表52製備及填充冷凍小瓶：

樣本 ID	#及體積
參考小瓶*	8×0.5 mL
內毒素保留*	2×0.12 mL
IFN 分析保留物*	7×0.5 mL
衛星小瓶**	≤20×0.5 mL

*樣本取自標有FCF保留物的試管。**衛星小瓶由標有LOVO後的FCF 袋的管中的產物製備。

【2196】在如前一步驟中所說明對樣本進行等分後，保存標有FCF保留物的管以供進一步取樣。沒有丟棄FCF保留物。

【2197】等分的MDA保留小瓶：若適用，則將適當體積的0810培養基添加至MDA保留管中，然後等分至5個標記的MDA保留冷凍小瓶中。記錄時間。記錄室溫且記錄樣本溫度。等待樣本溫度達到 8±1℃並等待腔室溫度達到4±1℃，再次按下 Run(RUN旁邊的燈亮起，WAIT旁邊的燈熄滅)。記錄開始時間。運行開始後，操作員必須檢查配置文件是否繼續至步驟2(20℃/min C至-45℃)。CS10添加時間。計算的經過時間。當冷凍配置文件完成後(冷凍運行需要大約1小時30分)，立即將DP及冷凍小瓶轉移至LN2罐中。記錄 CRF運行的結束時間。

【2198】將18G針頭固定在10 mL注射器上並吸取5.4 mL保留物。先將2.5 mL注入厭氧BacTAlert瓶，並接著注入2.5 mL好氧BacTAlert瓶。轉移至QC 進行微生物學排序。接種一個厭氧BacTAlert瓶及一個好氧BacTAlert瓶。

記錄BacTAlert瓶的接種時間。

【2199】等分以下樣本用於QC測試並將其轉移至QC：細胞計數(4x 0.5 mL小瓶)； FCF保留管(保存剩餘部分用於適用的QC測試)。使用5 mL吸液管，吸取2 mL保留物並將0.5 mL分配至4個冷凍小瓶中，用於細胞計數及存活率測試。注意：保留樣品保持在 2-8℃。製備待計算數目之FCF樣本的稀釋液。(推薦1:100稀釋)NC200之最佳範圍在5×10^4與5×10^6個細胞/毫升之間。表示NC-200中使用的稀釋係數。下面記錄存活(活)細胞濃度及存活率。對所有樣本重複。計算四次計數的平均值：(TIL01+TIL02+TIL03+TIL04) ÷ 4。平均總活細胞濃度(活細胞)。平均總細胞濃度(活細胞 + 死細胞)。平均存活%計算 TVC(總活細胞)FCF(活細胞)= 平均總活細胞濃度(FCF)(活細胞)x FCF體積(袋數×袋體積)。

在當前GEN 3過程期間量測TIL群體之IFN-γ分泌

【2200】在第11天及第17天，在當前Gen 3過程期間TIL的IFN-γ分泌。下表顯示在當前Gen 3過程期間的各天TIL群體之IFN-γ分泌的量測結果。

表53：量測

批號	處理日	結果
W329020208240	D17	18051.61 pg/mL
	D11	20377.25 pg/mL

實例10：實例9 更新的GEN 3過程

【2201】此處的此示例描述了更新的Gen 3過程(更新的Gen 3過程)，其包含與實例9 中相同的步驟，但有以下例外/更改：

【2202】實例9：(確定培養基類型1(DM1)的培養基配方不含額外的抗氧化劑或還原劑。

• 更新的Gen 3過程：將B-巰基乙醇添加至確定培養基類型1(DM1)中達到最終濃度為55uM，例如，藉由將1 mL B-ME(55mM儲備液)添加至1 L DM1培養基中。

【2203】實例9：對於Gen 3過程的單個循環，僅製造3個用於DM1的袋子及至多16個用於DM2的袋子。

• 更新的過程：可以為DM1及/或 DM2製造任意數目的袋子，以用於更新的Gen 3過程的一個循環。

【2204】實例9：在15 mL錐形管中產生等分試樣。

• 更新的Gen 3過程：在50 mL錐形管中產生等分試樣。

【2205】實例9：僅使用EV3000袋。

• 更新的Gen 3過程：Charter醫療袋亦可用於飼養細胞製備。

【2206】實例9：將CC3用於飼養細胞集束。

• 更新的Gen 3過程：替代供應(CC1、CC2、charter合併集束組等)亦可用於飼養細胞集束。

【2207】實例9：的總活飼養細胞需為$1x10^9$。

• 更新的Gen 3過程：總活飼養細胞需為$1.25x10^9$。

【2208】實例9：所需的OKT-3最終體積為0.6 mL。

• 更新的Gen 3過程：所需的OKT3最終體積為0.75 mL。

【2209】實例9：飼養細胞袋#2的最終體積為2000 mL。

• 更新的Gen 3過程：飼養細胞袋#2的最終體積為2500 mL ± 25 mL。

【2210】實例9：將進入的腫瘤洗滌三次以去除潛在污染物。在一系列三個100 mm皮氏培養皿中進行洗滌，每個皮氏培養皿含有50 mL洗滌緩衝液。用4.5''鑷子將腫瘤自一個洗滌盤轉移至下一個洗滌盤。每次洗滌≥3分鐘。

• 更新的Gen 3過程：在三個單獨的100-150 mL瓶中進行腫瘤洗滌，每個瓶子含有50至100 mL洗滌緩衝液。使用無菌8''鑷子將腫瘤自腫瘤運送容器中取出並轉移至第一個洗滌瓶中。瓶子將被關閉並輕輕旋轉以攪動腫瘤。腫瘤將在洗滌瓶中停留3至5分鐘。第一次洗滌後，用新的8''無菌鑷子將腫瘤移至第二個洗滌瓶中，並重複洗滌步驟。以與上述相同的方式完成第三次洗滌。

【2211】實例9：將20 mL添加至蓋滴洗滌培養基管中。

• 更新的Gen 3過程：向蓋滴洗滌培養基管添加30 mL。

【2212】實例9：允許的最終碎片的最大數目為240。

• 更新的Gen 3過程：將最終碎片的最大總數減少至200。

【2213】實例9：在第0天允許的最大培養瓶數目為4，且總數為240個最終碎片被分至4個培養瓶中。

• 更新的Gen 3過程：在第0天最多5個培養瓶，且總數為200個最終碎片將被分至5個培養瓶中。

【2214】實例9：每個培養瓶的最大碎片數目為 60：選項 A =碎片≤30 =要接種的培養瓶1；選項 B = 31≤碎片≥60 =要接種的培養瓶2；選項 C = 61≤碎片≥90 =要接種的培養瓶3；選項 D = 91≤碎片≥240 =要接種的培養瓶4。

• 更新的Gen 3過程：每個培養瓶的最大碎片數目為40：選項A = 碎片 ≤30 =要接種的培養瓶 1；選項B = 31≤碎片≥50 =要接種的培養瓶2；選項 C = 51≤碎片≥75 = 要接種的培養瓶 3；選項D = 76≤碎片≥100 = 要接種的培養瓶4；選項 E = 101≤碎片≥200 =要接種的培養瓶5。

【2215】實例9：將四個50 mL錐形管標記為碎片管。

• 更新的Gen 3過程：為碎片管標記五個50 mL錐形管。

【2216】實例9：將4個皮氏培養皿標記為分割1至分割4。

• 更新的Gen 3過程：將5個皮氏培養皿標記為分割1至分割5。

【2217】實例9：在標記為分割1至分割4的皮氏培養皿的每個蓋子中，加入 10至20 滴(約1 mL)以靠近培養盤邊緣形成一池洗滌緩衝液，以容納所分割的的碎片。對要分割的每個中間碎片或組重複該過程。

• 更新的Gen 3過程：在標記為分割1至分割5的皮氏培養皿的每個蓋子中，添加約20至30滴以在培養盤邊緣周圍形成4個大小相等的池，以便操作員可以對每組10 個碎片，至多 40個小塊進行計數。

【2218】實例9：分割1至分割4中每個碎片總數至多4個複選框。

• 更新的Gen 3過程：在分割1至分割5 中，每個碎片總數至多5個複選框。

【2219】實例9：在每管添加額外碎片後，沒有最終碎片計數的記錄。

• 更新的Gen 3過程：在第二個表中添加一列以捕獲每管的碎片總數而不計算漂浮物，然後計算所有培養瓶的碎片總數，不包含漂浮物。

【2220】實例9：向每個培養瓶中添加500 ± 2 mL。

• 更新的Gen 3過程：向每個培養瓶中添加500 ± 10 mL。

【2221】實例9：記錄培養基及保溫包培育的結束時間及日期。

• 更新的Gen 3過程：記錄確定培養基 1及保溫包培育的開始日期及時間。

【2222】實例9：可以使用至多4 個GREX 100培養瓶。

• 更新的Gen 3過程：可以使用至多5 個GREX 100培養瓶。

【2223】實例9：每個培養瓶需要5 mL 用於擴展表徵，並在5個單獨的管中等分。

• 更新的Gen 3過程：每個培養瓶需要3 mL用於擴展表徵，並在3 個單獨的管中等分。

【2224】實例9：至多4 個培養瓶無菌樣本複選框。

• 更新的Gen 3過程：至多5 個培養瓶無菌樣本複選框。

【2225】實例9：將細胞懸浮液自GREX100轉移至GREX500(至多4個培養瓶)。

• 更新的Gen 3過程：將細胞懸浮液自GREX100 轉移至GREX500(至多5 個培養瓶)。

【2226】實例9：在過程開始時使用GREX100上的NIS自每個培養瓶中單獨採集細胞計數樣本。採集細胞計數樣本後，使用Gatherex將整個細胞懸浮液自GREX100轉移至GREX 500培養瓶中。

• 更新的Gen 3過程：1)使用c 將100MCS的體積減少至約500 mL，而不會破壞細胞，將上清液轉移至合適的Labtainer 袋中。2)使得培養瓶與Gatherex斷開連接並轉移 BSC。3)在 BSC 內，藉由旋轉殘留物以確保均勻懸浮來小心混合培養瓶，並使用NIP(4x1 mL)獲取細胞計數樣本。4)使用天平稱重G-Rex並記錄。5)使用GatheRex 將細胞懸浮液轉移至最終的GREX500培養瓶中。6)用收集的用過的培養基反沖洗GREX100培養瓶，然後將用過的培養基轉移至GREX500培養瓶中。7)將DM2培養基添加至

GREX500 中，至多5L。8)稱量空的G-Rex，並按重量差計算所轉移懸浮液的體積。

【2227】實例9：將樣本取至4 個培養瓶：

1 個培養瓶 = 10 mL

o 2個培養瓶 = 5 mL/培養瓶

o 3個培養瓶 = 3.3 mL/培養瓶

o 4個培養瓶 = 2.5 mL/培養瓶

• 更新的Gen 3過程："將樣本取至至多5個培養瓶：1個培養瓶 = 12 mL

o 2個培養瓶 = 6 mL/培養瓶

o 3個培養瓶 = 4 mL/培養瓶

o 4個培養瓶 = 3 mL/培養瓶

5個培養瓶= 2.4 mL/培養瓶

【2228】實例9：每個培養瓶需要5 mL用於擴展表徵，並在5個單獨的管中等分。

• 更新的Gen 3過程：每個培養瓶需要3 mL用於擴展表徵，並在3個單獨的管中等分。

【2229】實例 9：至多4 個培養瓶的BacT測試。

• 更新的Gen 3過程：至多5 個培養瓶的BacT測試。

【2230】實例 9：至多4個培養瓶的培養基添加。

• 更新的Gen 3過程：至多5 個培養瓶的培養基添加。

【2231】實例 9：將每個培養基袋熔接至4S4M60 歧管的支腿上。

• 更新的Gen 3過程：亦可以使用4S4M60的替代供應。

【2232】實例9：N/A。

• 更新的Gen 3過程：自將培養瓶置於培育箱時的取出日期，因為處理日期記錄在首頁上，所以沒有必要。SM 090919。

【2233】實例9：未提供多餘細胞的說明。

• 更新的Gen 3過程：1)將所需樣本更改為1×10^6個細胞用於支原體，5×10^6個細胞用於流動，且1×10^6個細胞用於再刺激。2)若TVC 小於必要的16×10^6個細胞，則聯繫管理。3)添加凍結多餘細胞的說明，允許以大約10^6個細胞/毫升的濃度產生過量細胞的等分試樣。將TVC除以10^6得到待使用的CS10的體積。向下捨入至最接近的毫升數，因此每個小瓶的細胞將始終超過10^6個細胞。

【2234】實例9：僅使用EV3000袋進行飼養細胞製備。

• 更新的Gen 3過程：Charter醫療袋亦可用於飼養細胞製備。

【2235】實例9：沒有報告最終TVC 值的說明。

• 更新的Gen 3過程：在第10/11天，COA上報告的最終TVC 值將為經合併之細胞計數樣本。

【2236】實例9：所需的總活飼養細胞2×10^9。

• 更新的Gen 3過程：所需的總活飼養細胞為2.5×10^9。

【2237】實例9：要自飼養細胞袋#1移至飼養細胞袋#2的飼養細胞的數目為2×10^9個細胞。

• 更新的Gen 3過程：要自飼養細胞袋#1移至飼養細胞#2的飼養細胞的數目為2.5×10^9。

【2238】實例9：所需的OKT-3體積為1.2 mL，總計30 ng/mL。

• 更新的Gen 3過程：所需的OKT-3 體積為1.5 mL，總計30 ng/mL。

【2239】實例9：QS的總體積為2.0L

• 更新的Gen 3過程：QS的總體積為2.5L。

【2240】實例9：允許最多有4個GREX 100培養瓶。

• 更新的Gen 3過程：允許最多有5個GREX 100培養瓶。

【2241】實例9：每個培養瓶需要5 mL用於擴展表徵，並在 5個單獨的管中等分。

• 更新的Gen 3過程：每個培養瓶需要3 mL用於擴展表徵，並在3個單獨的管中等分。

【2242】實例9：沒有使用4S4M69 及CC3的替代供應。

• 更新的Gen 3過程：可以使用4S4M69及CC3的替代供應。

【2243】實例9：EV3000用作來源袋。

• 更新的Gen 3過程：若收集了大量細胞懸浮液，則添加視情況選用的Charter 醫療EXpak5L袋作

【2244】實例9：使用5L Labtainer收集用過的培養基。

• 更新的Gen 3過程：若收集4 個或更多個培養瓶，則添加視情況選用的10L labtainer袋用於收集用過的培養基。

【2245】實例9：收集至多4個培養瓶。

• 更新的Gen 3過程：收集至多5個培養瓶。

【2246】實例9：收集至多4個培養瓶用於支原體樣本。

• 更新的Gen 3過程：收集至多5個培養瓶用於支原體樣本。

【2247】實例9：每個培養瓶需要5 mL用於擴展表徵，並在5個單獨的管中等分。

• 更新的Gen 3過程：每個培養瓶需要3 mL 用於擴展表徵，並在3個單獨的管中等分。

【2248】實例9：沒有記錄置放預LOVO 袋並將其自培育箱中取出的時間的說明。

• 更新的Gen 3過程：記錄置放預LOVO袋並將其自培育箱中取出的時間。

【2249】實例9：沒有記錄LOVO處理之時間的說明。

• 更新的Gen 3過程：記錄LOVO起始及完成的時間。

【2250】實例9：當最終調配不能立即開始時，沒有關於置放LOVO後袋的溫度的說明。

• 更新的Gen 3過程：若無法在LOVO 完成後立即起

始最終調配，則LOVO後袋應保持在2至8度，且若時間超過15 分鐘，請立即聯繫Iovance團隊。

【2251】實例9：記錄沖洗百分比(1位小數)。

• 更新的Gen 3過程：記錄沖洗百分比(4位小數)。

【2252】實例9：自最終DP袋中單獨取出保留的QC樣本，然後合併至50 mL錐形管中。

• 更新的Gen 3過程：在每 DP袋裝滿所需體積後，將直接自配方袋(LOVO後袋)中取出保 QC樣本。保留體積可以用合適尺寸的注射器取出，然後轉移至50 mL錐形管中。

【2253】實例9：使用500uL樣本及4500uL AIM-V 製備1:10稀釋液。

• 更新的Gen 3過程：刪除了500uL樣本及4500uL AIM-V的規範。

實例11：第二代GEN 3過程

一項所提出的使用飼養細胞混成物來活化TIL的研究-GEN 3 – 第一階段及第二階段。

【2254】該實例提供了測試採用在單獨容器中培養飼養細胞培養物，然後使用飼養細胞培養物的培養基(細胞培養物上清液)來活化TIL的過程的實施例。

【2255】此方法將允許在規模縱向擴大日及在收集時對TIL生產進行更明確的量測，而無需細胞收集時的飼養細胞背景。此類方法係描述於本文中並顯示在例如圖1E至

1G中。

【2256】此方法亦可以提前估計該批次是否會在收集時成功。最終的細胞計數將僅來自沒有飼養細胞背景的TIL。

【2257】此方法亦將允許在規模縱向放大日的存活率的潛在增加，並可能降低安排淋巴球耗竭的風險。

【2258】總之，該過程的該實施例可以允許減少及/或沒有飼養細胞背景。

GEN 3代表圖

【2259】圖21圖示第二代Gen 3過程的實施例。

【2260】圖 1E至1G 提供第二代Gen 3過程的流程圖概覽。

實例12：經冷凍保存之TIL細胞療法之例示性生產

【2261】此實例描述一種根據當前組織優良操作規範(current Good Tissue Practices)及當前優良製造規範(current Good Manufacturing Practices)在G-Rex培養瓶中進行TIL細胞療法過程的例示性cGMP製造。

表 54.過程擴增例示性計劃

估計天數（接種後）	活性	目標準則	預期容器	估計總體積（mL）
0	腫瘤分割	每 G-Rex100MCS ≤50 個期望腫瘤碎片	G-Rex100MCS 1 培養瓶	≤1000
11	REP 接種	每 G-Rex500MCS 5 至 200×10^6 個活細胞	G-Rex500MCS 1 培養瓶	≤5000
16	REP 分瓶	每 G-Rex500MCS 1×10^9 個活細胞	G-Rex500MCS≤5 培養瓶	≤25000
22	收集	可獲得細胞總數	3 至 4 個 CS-750 袋	≤530

表 55.培養瓶體積

培養瓶類型	工作容積/培養瓶（mL）
G-Rex100MCS	1000
G-Rex500MCS	5000

初始過程資訊

第0天CM1培養基製備

【2262】在BSC中，向RPMI 1640培養基瓶添加試劑。添加以下試劑t，每瓶添加：加熱不活化人AB血清(100.0 mL)；GlutaMax(10.0 mL)；硫酸建它黴素，50 mg/mL(1.0 mL)；2-巯基乙醇(1.0 mL)自BSC取出不必要之材料。自BSC分發培養基試劑，將硫酸建它黴素及HBSS保留在BSC以用於調配洗滌培養基製備。解凍IL-2等分試樣。解凍一個1.1 mL IL-2等分試樣(6×10^6 IU/mL)(BR71424)，直至所有冰融化為止。

【2263】將IL-2儲備液轉移至培養基中。在BSC中，

將1.0 mL IL-2儲備液轉移至準備之CM1第0天培養基瓶中。添加CM1第0天培養基1瓶及IL-2(6×10^6 IU/mL)1.0 mL。將G-Rex100MCS傳遞至BSC中。將G-Rex100MCS(W3013130)無菌傳遞至BSC中。將所有完全CM1第0天培養基泵吸至G-Rex100MCS培養瓶中。組織碎片錐形管或GRex100MCS。

第0天腫瘤洗滌培養基製備

【2264】在BSC中，將5.0 mL建它黴素(W3009832或W3012735)添加至1×500 mL HBSS培養基(W3013128)瓶中。每瓶添加：HBSS(500.0 mL)；硫酸建它黴素，50 mg/ml(5.0 mL)。經由1L 0.22微米過濾器單元(W1218810)製備含有建它黴素之經過濾HBSS。

第0天腫瘤處理

【2265】獲得腫瘤。自QAR獲得腫瘤樣品並立即轉移至2至8℃下之套件中進行處理。等分腫瘤洗滌培養基。腫瘤洗滌1 使用8''鑷子(W3009771)，自樣品瓶取出腫瘤並轉移至準備之「洗滌1」皮氏培養皿中。隨後為腫瘤洗滌2及腫瘤洗滌3。

【2266】量測腫瘤。評定腫瘤。評定是否觀測到整個腫瘤面積之> 30%壞死及/或為脂肪組織。若適用：清除分割。若腫瘤較大且觀測到>30%組織外表壞死/為脂肪，則藉由使用解剖刀及/或鑷子之組合移除壞死/脂肪組織並同

時保留腫瘤內部結構來進行「清除分割」。

【2267】分割腫瘤使用解剖刀及/或鑷子之組合，將腫瘤樣品切割成偶數個適當大小之碎片(至多6個中間碎片)。轉移中間腫瘤碎片。將腫瘤塊分割成大小為3×3×3 mm之小塊。儲存中間碎片以防脫水。

【2268】重複中間碎片分割。測定收集之小塊數目。若僅保留所需組織，則自「有利中間塊」6孔盤選擇另外的有利腫瘤碎片來填充丟棄碎片，使得最多達50個小塊。

【2269】準備錐形管。將腫瘤塊轉移至50 mL錐形管中。準備用於G-REX100MCS之BSC。自培育箱取出G-REX100MCS。將G-Rex100MCS培養瓶無菌傳遞至BSC中。將腫瘤碎片添加至G-Rex100MCS培養瓶中。使小塊均勻分佈。

【2270】按以下參數使G-Rex100MCS保溫：使G-Rex培養瓶保溫：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO2百分比：5.0±1.5% CO2。計算：保溫時間；下限=保溫時間+252小時；上限=保溫時間+276小時。

第11天 - 培養基製備

【2271】監測培育箱。監測培育箱。培育箱參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO2百分比：5.0±1.5% CO2。在培育箱中使3×1000 mL RPMI 1640培養基(W3013112)瓶及3×1000 mL AIM-V(W3009501)瓶升溫≥30分鐘。自培育箱取出RPMI 1640培養基瓶。準備RPMI 1640

培養基瓶。過濾培養基。解凍3×1.1 mL IL-2等分試樣(6×10^6 IU/mL)(BR71424)。自培育箱中取出AIM-V培養基。將IL-2添加至AIM-V中。將10L Labtainer袋及中繼泵轉移裝置無菌轉移至BSC中。準備10L Labtainer培養基袋。準備Baxa泵。準備10L Labtainer培養基袋。將培養基泵吸至10L Labtainer中。自Labtainer袋取下自動泵吸管。

【2272】混合培養基。輕緩地揉按袋子以進行混合。依據取樣計劃對培養基進行取樣。取出20.0 mL培養基並置於50 mL錐形管中。在BSC中準備細胞計數稀釋管，將4.5 mL已標記有「用於細胞計數稀釋」及批號之AIM-V培養基添加至四個15 mL錐形管中。將試劑自BSC轉移至2至8℃下。準備1L轉移包。在BSC外部，將1L轉移包熔接至附接於所準備的「完全CM2第11天培養基」袋的轉移裝置上。準備飼養細胞轉移包。培育完全CM2第11天培養基。

第11天 - TIL收集

【2273】預處理表格。培育箱參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO2百分比：5.0±1.5% CO2。自培育箱取出G-Rex100MCS。準備300 mL轉移包。將轉移包熔接至G-Rex100MCS。準備用於TIL收集之培養瓶並起始TIL收集。收集TIL。使用GatheRex，透過血液過濾器將細胞懸浮液轉移至300 mL轉移包中。檢查膜上之黏附細胞。沖洗培養瓶膜。閉合G-Rex100MCS上之夾子。確保所有夾子閉合。熱封

TIL及「上清液」轉移包。計算TIL懸浮液之體積。準備用於取樣之上清液轉移包。抽取Bac-T樣本。在BSC中，自1L「上清液」轉移包中吸取約20.0 mL上清液，並分配至無菌的50 mL錐形管中。依據取樣計劃接種BacT。使用適當大小之注射器自準備的標記有BacT之50 mL錐形管取出1.0 mL樣本並接種於厭氧瓶。

【2274】培育TIL。在需要之前將TIL轉移包置於培育箱中。進行細胞數目計算及演算。測定進行細胞數目計算之細胞的活細胞濃度平均值及存活率平均值。存活率÷2。活細胞濃度÷2。測定計數之上限及下限。下限：活細胞濃度平均值×0.9。上限：活細胞濃度平均×1.1。確認兩個計數在可接受界限內。根據進行的所有四次數目計算測定平均活細胞濃度。

【2275】調整TIL懸浮液之體積，計算取出細胞計數樣本後TIL懸浮液之經調整體積。總TIL細胞體積(A)。取出的細胞數目計算樣本之體積(4.0 ml)(B)經調整TIL細胞總體積C = A - B。

【2276】計算活TIL細胞總數。平均活細胞濃度*：總體積；總活細胞：C = A×B。流動式細胞測量術之計算：若活TIL細胞總計數為≥4.0×10^7，則計算獲得用於流動式細胞測量術樣本的1.0×10^7個細胞的體積。流動式細胞測量術所需之活細胞總數：1.0×10^7個細胞。流動式細胞測量術所需之細胞體積：活細胞濃度除以1.0×10^7個細胞A。計算TIL懸浮液之體積等於2.0×10^8個活細胞。按需要，計

算待取出的過量TIL細胞體積，且取出過量TIL並按需要將TIL置於培育箱中。計算按需要取出之過量TIL總量。將以供冷凍之目標細胞濃度添加至過量TIL細胞的CS-10培養基之計算量為1.0×10^8個細胞/毫升。按需要使過量TIL離心。觀測錐形管並添加CS-10。填充小瓶。將1.0 mL細胞懸浮液等分至適當大小之冷凍小瓶中。每SOP-00242將剩餘體積等分至適當大小之冷凍小瓶中。若體積≤0.5 mL，則將CS10添加至小瓶，直至體積為0.5 mL為止。

樣本之TIL冷凍保存

【2277】計算獲得用於冷凍保存之1×10^7個細胞所需之細胞體積。取出樣本以進行冷凍保存。將TIL置於培育箱中。

樣本之冷凍保存。

【2278】觀測錐形管，且緩慢添加CS-10並記錄添加0.5 mL CS10後的體積。

第11天 - 飼養細胞

【2279】獲得飼養細胞。自LN2冷凍機獲得至少兩個不同批號的3袋飼養細胞。在準備解凍之前將細胞保存於乾冰上。準備水浴或Cryotherm。在37.0±2.0℃水浴或cytotherm處解凍飼養細胞約3至5分鐘或直至冰剛好消失為止。自培育箱取出培養基。合併解凍之飼養細胞。將飼養細胞添加至轉移包。將飼養細胞自注射器分配至轉移包

中。對合併飼養細胞進行混合，且標記轉移包。計算轉移包中之飼養細胞懸浮液之總體積。

【2280】取出細胞數目計算樣本。針對每個樣本使用單獨的3 mL注射器，使用非必要注入口自飼養細胞懸浮液轉移包抽取4×1.0 mL細胞數目計算樣本。將每個樣本等分至經標記之冷凍小瓶中。進行細胞數目計算，且判定乘數選定方案並輸入乘數。測定進行細胞數目計算之細胞的活細胞濃度平均值及存活率平均值。測定計數之上部及下限，並確認其在界限內。

【2281】調整飼養細胞懸浮液之體積。計算取出細胞數目計算樣本後飼養細胞懸浮液之經調整體積。計算活飼養細胞總數。按需要獲得另外的飼養細胞。按需要解凍另外的飼養細胞。將第4飼養細胞袋置於拉鏈袋中，且在37.0±2.0℃水浴或cytotherm中解凍約3至5分鐘並合併另外的飼養細胞。量測體積。量測注射器中飼養細胞之體積並記錄在下面(B)。計算飼養細胞之新的總體積。將飼養細胞添加至轉移包。

【2282】按需要製備稀釋液，將4.5 mL AIM-V培養基添加至四個15 mL錐形管中。準備計算細胞數目。針對每個樣本使用單獨的3 mL注射器，使用非必要注入口自飼養細胞懸浮液轉移包取出4×1.0 mL細胞數目計算樣本。進行細胞數目計算及演算。根據進行的所有四次數目計算測定平均活細胞濃度。調整飼養細胞懸浮液之體積，且計算取出細胞數目計算樣本後飼養細胞懸浮液之經調整體積。飼

養細胞總體積減去取出之4.0 mL。計算獲得5×10^9個活飼養細胞所需的飼養細胞懸浮液之體積。計算過量飼養細胞體積。計算待取出之過量飼養細胞之體積。取出過量飼養細胞。使用1.0 mL注射器及16G針頭，吸取0.15 mL OKT3並添加OKT3。熱封飼養細胞懸浮液轉移包。

第11天G-Rex填充及接種

【2283】設定G-Rex500MCS。自培育箱取出「完全CM2第11天培養基」並將培養基泵吸至G-Rex500MCS中。將4.5 L培養基泵吸至G-Rex500MCS中，填充至培養瓶上標示之線處。按需要熱封並使培養瓶保溫。將飼養細胞懸浮液轉移包熔接至G-Rex500MCS。將飼養細胞添加至G-Rex500MCS。熱封。將TIL懸浮液轉移包熔接至培養瓶。將TIL添加至G-Rex500MCS。將G-Rex500MCS熱封且在37.0±2.0℃下保溫，CO2百分比：5.0±1.5% CO2。

【2284】計算保溫範圍。進行計算以確定在第16天自培育箱取出G-Rex500MCS的適當時間。下限：保溫時間+108小時。上限：保溫時間+132小時。

第11天過量TIL冷凍保存

【2285】適用：冷凍過量TIL小瓶。確證在冷凍前已設定CRF。進行冷凍保存。將小瓶自速率受控冷凍機轉移至適當儲存件中。完成冷凍後，將小瓶自CRF轉移至適當儲存容器。將小瓶轉移至適當儲存件中。記錄在LN2中的

儲存位置。

第16天培養基製備

【2286】預熱AIM-V培養基。針對培養基袋1、2及3計算使培養基升溫的時間。確保所有袋子已升溫12至24小時之持續時間。設定用於上清液之10L Labtainer。使用魯爾接頭將流體泵轉移裝置之較大直徑端附接至10L Labtainer袋之一個凹形端口。設定用於上清液之10L Labtainer並進行標記。設定用於上清液之10L Labtainer。確保在自BSC之前取出前閉合所有夾子。注意：在TIL收集期間使用上清液袋，該TIL收集可與培養基製備並行地進行。

【2287】解凍IL-2。每袋CTS AIM V培養基解凍5×1.1 mL IL-2等分試樣(6×10^6 IU/mL)(BR71424)，直至所有冰融化為止。等分100.0 mL GlutaMax。將IL-2添加至GlutaMax。準備用於調配之CTS AIM V培養基袋。準備用於調配之CTS AIM V培養基袋。多級Baxa泵。準備調配培養基。將GlutaMax + IL-2泵吸至袋子中。監測之參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO2百分比：5.0±1.5% CO2。使完全CM4第16天培養基升溫。製備稀釋液。

第16天REP分瓶

【2288】監測培育箱參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO2百分比：5.0±1.5% CO2。自培育箱取出G-Rex500MCS。準備1L轉移包且標記為TIL懸浮液並加權為

1L。G-Rex500MCS之體積減少。將約4.5L培養物上清液自G-Rex500MCS轉移至10L中。準備用於TIL收集之培養瓶。取出上清液後，閉合通向紅色管線之所有夾子。起始TIL收集。劇烈敲擊培養瓶並旋動培養基以使細胞剝離，以確保所有細胞剝落。

【2289】TIL收集。鬆開通向TIL懸浮液轉移包之所有夾子。使用GatheRex，將細胞懸浮液轉移至TIL懸浮液轉移包中。注意：確保維持邊緣傾斜，直至收集到所有細胞及培養基為止。檢查膜上之黏附細胞。沖洗培養瓶膜。閉合G-Rex500MCS上之夾子。熱封含有TIL之轉移包。熱封含有上清液之10L Labtainer。記錄含細胞懸浮液之轉移包的重量並計算懸浮液體積。準備用於樣本取出之轉移包。自細胞上清液取出測試樣本。

【2290】無菌性及BacT測試取樣：自準備的標記有BacT之15 mL錐形管取出1.0 mL樣本。取出細胞數目計算樣本。在BSC中，針對每個樣本使用單獨的3 mL注射器，自「TIL懸浮液」轉移包取出4×1.0 mL細胞數目計算樣本。取出黴漿菌樣本。使用3 mL注射器，自TIL懸浮液轉移包取出1.0 mL並置於準備的標記有「黴漿菌稀釋劑」之15 mL錐形管中。

【2291】準備用於接種之轉移包。將TIL置於培育箱中。自BSC取出細胞懸浮液，且在需要之前置於培育箱中。進行細胞數目計算及演算。首先藉由將0.5 mL細胞懸浮液添加至準備的4.5 mL AIM-V培養基中來對細胞數目計

算樣本進行稀釋，稀釋度為1:10。測定進行細胞數目計算之細胞的活細胞濃度平均值及存活率平均值。測定計數之上限及下限。注意：可根據預期細胞濃度調整稀釋度。根據進行的所有四次數目計算測定平均活細胞濃度。調整TIL懸浮液之體積。計算取出細胞數目計算樣本後TIL懸浮液之經調整體積。總TIL細胞體積減去取出以用於測試之5.0 mL。

【2292】計算活TIL細胞總數。計算待接種之培養瓶之總數目。注意：待接種的G-Rex500MCS培養瓶之最大數目為五。若計算的待接種培養瓶之數目超過五，則使用可用的所有體積之細胞懸浮液接種僅五個培養瓶。

【2293】計算用於繼代培養之培養瓶數目。計算除所準備之袋子以外還需要之培養基袋的數目。按計算需要每兩個G-Rex-500M培養瓶準備一個10L「CM4第16天培養基」袋。繼續接種第一GREX-500M培養瓶，同時準備另外的培養基並使其升溫。準備確定的所計算數目之其他培養基袋並使其升溫。填充G-Rex500MCS。準備泵吸培養基並將4.5 L培養基泵吸至G-Rex500MCS中。熱封。重複填充。使培養瓶保溫。計算待添加至新G-Rex500MCS培養瓶中的TIL懸浮液之目標體積。若計算之培養瓶數目超過五，則使用所有體積之細胞懸浮液接種僅五個培養瓶。準備用於接種之培養瓶。自培育箱取出G-Rex500MCS。準備用於泵吸之G-Rex500MCS。除較大過濾器管線外，閉合所有夾子。自培育箱取出TIL。製備用於接種之細胞懸浮

液。將「TIL懸浮液」轉移包無菌熔接至泵入口管線。將TIL懸浮液袋置於稱上。

【2294】用TIL懸浮液接種培養瓶。泵吸所計算體積之TIL懸浮液至培養瓶中。熱封。填充剩餘培養瓶。監測培育箱。培育箱參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO2百分比：5.0±1.5% CO2。使培養瓶保溫。測定在第22天自培育箱取出G-Rex500MCS的時間範圍。

第22天洗滌緩衝液製備

【2295】準備10L Labtainer袋。在BSC中，經由魯爾接頭將4''血漿轉移裝置附接至10L Labtainer袋。準備10L Labtainer袋。在轉移出BSC之前，閉合所有夾子。注意：為待進行收集之每兩個G-Rex500MCS培養瓶準備一個10L Labtainer袋。將Plasmalyte泵吸至3000 mL袋中，且藉由翻轉泵及操控袋子之位置來自3000 mL Origen袋移除空氣。將人類白蛋白25%添加至3000 mL袋中。獲得最終體積為120.0 mL的人類白蛋白25%。

【2296】製備IL-2稀釋劑。使用10 mL注射器，使用LOVO洗滌緩衝液袋上之無針注入口取出5.0 mL LOVO洗滌緩衝液。將LOVO洗滌緩衝液分配至50 mL錐形管中。等分CRF空白袋LOVO洗滌緩衝液。使用100 mL注射器，自無針注入口吸取70.0 mL LOVO洗滌緩衝液。解凍一份1.1 mL IL-2(6×10^6 IU/mL)，直至所有冰融化為止。IL-2製備。將50 μL IL-2儲備液(6×10^6 IU/mL)添加至標記有「IL-

2稀釋劑」之50 mL錐形管中。冷凍保存製備。將5個冷凍盒置於2至8℃下，以對其進行預處理，以便用於最終產物冷凍保存。

【2297】製備細胞數目計算稀釋液。在BSC中，向4個單獨的15 mL錐形管中添加4.5 mL已標記有批號及「用於細胞數目計算稀釋」的AIM-V培養基。準備計算細胞數目。將4個冷凍小瓶標記上小瓶編號(1至4)。將小瓶保存在BSC以供使用。

第22天TIL收集

【2298】監測培育箱。培育箱參數：溫度LED顯示器：37±2.0℃，CO2百分比：5%±1.5%。自培育箱取出G-Rex500MCS培養瓶。準備TIL收集袋並進行標記。封閉額外之接頭。體積減少：將約4.5 L上清液自G-Rex500MCS轉移至上清液袋。

【2299】準備用於TIL收集之培養瓶。起始TIL收集。劇烈敲擊培養瓶並旋動培養基以剝離細胞。確保所有細胞剝落。起始TIL收集。鬆開通向TIL懸浮液收集袋之所有夾子。TIL收集。使用GatheRex，將TIL懸浮液轉移至3000 mL收集袋中。檢查膜上之黏附細胞。沖洗培養瓶膜。閉合G-Rex500MCS上之夾子，並確保閉合所有夾子。將細胞懸浮液轉移至LOVO來源袋中。閉合所有夾子。熱封。取出4×1.0 mL細胞數目計算樣本。

【2300】進行細胞數目計算。利用NC-200及過程註釋

5.14進行細胞數目計算及演算。首先藉由將0.5 mL細胞懸浮液添加至準備的4.5 mL AIM-V培養基中來對細胞數目計算樣本進行稀釋。得到1:10稀釋度。測定進行細胞數目計算之細胞的平均存活率、活細胞濃度及總成核細胞濃度。測定計數之上限及下限。測定進行細胞數目計算之細胞的平均存活率、活細胞濃度及總成核細胞濃度。稱量LOVO來源袋。計算活TIL細胞總數。計算成核細胞總數。

【2301】製備黴漿菌稀釋劑。經由魯爾樣本口自一個上清液袋取出10.0 mL並置於15 mL錐形管中。

LOVO

【2302】進行「TIL G-Rex收集」方案並測定最終產物目標體積。裝載一次性套組。取出濾液袋。輸入濾液容量。將濾液容器置於實驗台上。附接PlasmaLyte。確證已附接PlasmaLyte，且觀測到PlasmaLyte正在移動。將來源容器附接至導管，且確證已附接來源容器。確認PlasmaLyte正在移動。

最終調配及填充

【2303】目標體積/袋子計算。計算待調配於空白袋中之CS-10及LOVO洗滌緩衝液的體積。準備CRF空白袋。

【2304】計算待添加至最終產物的IL-2之體積。所需最終IL-2濃度(IU/mL)-300IU/mL。IL-2工作儲備液：6×10^4 IU/mL。組裝連接設備。將4S-4M60無菌熔接至CC2單元接

頭。將CS750冷凍袋無菌熔接(依據過程註釋5.11)至準備之集束上。將CS-10袋熔接至4S-4M60之尖端上。用IL-2製備TIL。使用適當大小之注射器，自「IL-2 6×10^4」等分試樣取出所測定量之IL-2。標記經調配TIL袋。將經調配TIL袋添加至設備。添加CS10。切換注射器。將約10 mL空氣吸取至100 mL注射器中並替換設備上之60 mL注射器。添加CS10。準備CS-750袋。分配細胞。

【2305】自最終產物袋移除空氣並獲得保留物。一旦已填充最後一個最終產物袋，即閉合所有夾子。將10 mL空氣吸取至新的100mL注射器中並替換設備上之注射器。將保留物分配至50 mL錐形管中並將管標記為「保留物」及批號。針對每個袋子重複空氣移除步驟。

【2306】準備用於冷凍保存之最終產物，包括目視檢查。在冷凍保存之前將冷凍袋保存於降溫包上或2至8℃下。

【2307】取出細胞數目計算樣本。使用適當大小之吸液管，取出2.0 mL保留物並置於15 mL錐形管中以用於細胞數目計算。進行細胞數目計算及演算。注意：僅將一個樣本稀釋至確證稀釋度足夠的適當稀釋度。將另外的樣本稀釋至適當稀釋因數並繼續進行數目計算。測定進行細胞數目計算之細胞的活細胞濃度平均值及存活率平均值。測定計數之上限及下限。注意：可根據預期細胞濃度調整稀釋度。測定活細胞濃度平均值及存活率平均值。測定計數之上限及下限。計算IFN-γ。熱封最終產物袋。

【2308】依據以下例示性取樣計劃標記並收集樣本。

表 56：取樣計劃

樣本	容器數目	每次添加之樣本體積	容器類型
*黴漿菌	1	1.0 mL	15 mL 錐形管
內毒素	2	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
革蘭氏染色	1	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
IFN-g	1	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
流動式細胞測量術	1	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
**Bac-T 無菌性	2	1.0 mL	Bac-T 瓶
QC 保留物	4	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
衛星小瓶	10	0.5 mL	2 mL 冷凍小瓶

【2309】無菌性及BacT。測試取樣。在BSC中，自使用適當大小之注射器收集的保留細胞懸浮液中取出1.0 mL樣本，並接種厭氧瓶。對好氧瓶重複以上操作。

最終產物冷凍保存

【2310】準備速率受控冷凍機。確證已設定CRF。設定CRF探針。將最終產物及樣本置於CRF中。測定要達到4℃ ±1.5℃所需的時間並繼續進行CRF運行。完成CRF並儲存。完成運行後停止CRF。自CRF取出盒子及小瓶。將盒子及小瓶轉移至氣相LN2進行儲存。

後處理概述

後處理：最終藥品

【2311】(第22天)在第22天REP中藉由流動式細胞測量術測定CD3+細胞

【2312】(第22天)革蘭氏染色法(GMP)

【2313】(第22天)藉由凝膠凝塊LAL分析(Gel Clot LAL Assay)進行細菌內毒素測試(GMP)

【2314】(第16天)BacT無菌性分析(GMP)

【2315】(第16天)藉由TD-PCR進行黴漿菌DNA偵測(GMP)

【2316】可接受的外觀屬性

【2317】(第22天)BacT無菌性分析(GMP)(第22天)。

【2318】(第22天)IFN-γ分析

【2319】提供上述實例以為本領域中熟習此項技術者提供如何製得並使用本發明之組成物、系統及方法之實施例的完整揭示內容及描述，且並不意欲限制本發明人定義其發明之範疇。本領域中熟習此項技術者顯而易見的進行本發明之上文所描述模式的修改意欲在以下申請專利範圍之範疇內。本說明書中提及之所有專利及公開案指示本領域中熟習本發明所屬領域者之技能水準。

【2320】所有標題及章節名稱僅用於清晰及參考目的，且不應視為以任何方式具限制性。舉例而言，本領域中熟習此項技術者應瞭解根據本文所描述之本發明之精神及範疇按需要組合來自不同標題及章節之各種態樣的有用性。

【2321】本文中引用之所有參考文獻以全文引用之方

式且出於所有目的併入本文中，其引用程度如同各個別公開案或專利或專利申請案經特定且個別地指示出於所有目的以全文引用的方式併入本文中一般。

【2322】如本領域中熟習此項技術者將顯而易見，可在不脫離本申請案之精神及範疇的情況下對其進行多種修改及改變。本文所描述之特定實施例及實例僅作為實例提供，且本申請案僅受隨附申請專利範圍之各項以及申請專利範圍授權之等效物的全部範疇限制。

【序列表】

<110> 美商艾歐凡斯生物治療公司（Iovance Biotherapeutics, Inc.）

<120> 用於產生腫瘤浸潤性淋巴球的過程及其在免疫療法中的用途

<130> 116983-5077-WO

<140> TW 110116078
<141> 2021-05-04

<150> US 63/162,441
<151> 2021-03-17

<150> US 63/146,405
<151> 2021-02-05

<150> US 63/023,666
<151> 2020-05-12

<150> US 63/019,917
<151> 2020-05-04

<160> 573

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成莫羅單抗重鏈

<400> 1

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1               5                  10                  15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
            20                  25                  30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
```

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Gly Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser
180 185 190

Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
195 200 205

Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 2
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成莫羅單抗輕鏈

<400> 2

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Ala Asp Thr Ala Pro
100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 3
<211> 134
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成重組人類 IL-2（rhIL-2）

<400> 3

Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1 5 10 15

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
35 40 45

Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
50 55 60

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
65 70 75 80

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
85 90 95

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
100 105 110

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser
115 120 125

Ile Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 4
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類阿地介白素

<400> 4

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1 5 10 15

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
20 25 30

Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
35 40 45

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
50 55 60

Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65 70 75 80

Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
85 90 95

Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
100 105 110

Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
115 120 125

Ser Thr Leu Thr
130

<210> 5
<211> 130
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成重組人類 IL-4（rhIL-4）

<400> 5

Met His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn
1 5 10 15

Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp
20 25 30

Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg
35 40 45

Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr
50 55 60

Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu
65 70 75 80

Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly
85 90 95

Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn
100 105 110

Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys
115 120 125

Ser Ser
130

<210> 6
<211> 153
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成重組人類 IL-7（rhIL-7）

<400> 6

Met Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val
1 5 10 15

Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly
20 25 30

Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys
35 40 45

Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu
50 55 60

Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu
65 70 75 80

Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln
85 90 95

Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys
100 105 110

Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp
115 120 125

Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn
130 135 140

Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 7
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成重組人類 IL-15（rhIL-15）

<400> 7

Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
1 5 10 15

Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
20 25 30

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
35 40 45

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
50 55 60

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
65 70 75 80

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
85 90 95

Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
100 105 110

Asn Thr Ser
115

<210> 8
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成重組人類 IL-21（rhIL-21）

<400> 8

Met Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val
1 5 10 15

Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro
20 25 30

Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys
35 40 45

Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg
50 55 60

Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr
65 70 75 80

Asn Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp
85 90 95

Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser
100 105 110

Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly
115 120 125

Ser Glu Asp Ser
130

<210> 9
<211> 255
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成人類 4-1BB，腫瘤壞死因子受體超家族成員 9（智人）

<400> 9

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
35 40 45

Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
50 55 60

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
85 90 95

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
130 135 140

Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu
180 185 190

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
195 200 205

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
210 215 220

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
245 250 255

<210> 10
<211> 256
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成鼠類 4-1BB，腫瘤壞死因子受體超家族成員 9（小鼠）

<400> 10

Met Gly Asn Asn Cys Tyr Asn Val Val Val Ile Val Leu Leu Leu Val
1 5 10 15

Gly Cys Glu Lys Val Gly Ala Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln
20 25 30

Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro
35 40 45

Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys
50 55 60

Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr
65 70 75 80

His Asn Ala Glu Cys Glu Cys Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro
85 90 95

Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr
100 105 110

Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn
115 120 125

Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg
130 135 140

Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

Pro Val Val Ser Phe Ser Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu
165 170 175

Gly Gly Pro Gly Gly His Ser Leu Gln Val Leu Thr Leu Phe Leu Ala
180 185 190

Leu Thr Ser Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ile Phe Ile Thr Leu Leu Phe
195 200 205

Ser Val Leu Lys Trp Ile Arg Lys Lys Phe Pro His Ile Phe Lys Gln
210 215 220

Pro Phe Lys Lys Thr Thr Gly Ala Ala Gln Glu Glu Asp Ala Cys Ser
225 230 235 240

Cys Arg Cys Pro Gln Glu Glu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Glu Leu
245 250 255

<210> 11
<211> 441
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗之合成重鏈

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 12
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗之合成輕鏈

<400> 12

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
85 90 95

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 13
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗之合成重鏈可變區

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 14
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗之合成輕鏈可變區

<400> 14

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
85 90 95

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗之合成重鏈 CDR1

<400> 15

Ser Thr Tyr Trp Ile Ser
1 5

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗之合成重鏈 CDR2

<400> 16

Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗之合成重鏈 CDR3

<400> 17

Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr
1 5

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗之合成輕鏈 CDR1

<400> 18

Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala His
1 5 10

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗之合成輕鏈 CDR2

<400> 19

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 20
<211> 11

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗之合成輕鏈 CDR3

<400> 20

Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu Ala Val
1 5 10

<210> 21
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗之合成重鏈

<400> 21

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 22
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗之合成輕鏈

<400> 22

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Ala Leu Thr Phe Cys Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 23
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗之合成可變重鏈

<400> 23

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
35 40 45

Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Pro
115 120

<210> 24
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗之合成可變輕鏈

<400> 24

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗之合成重鏈 CDR1

<400> 25

Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 26
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗之合成重鏈 CDR2

<400> 26

Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser
1 5 10 15

<210> 27
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗之合成重鏈 CDR3

<400> 27

Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗之合成輕鏈 CDR1

<400> 28

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗之合成輕鏈 CDR2

<400> 29

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗之合成輕鏈 CDR3

<400> 30

Gln Gln Arg Ser Asp Trp Pro Pro Ala Leu Thr
1 5 10

<210> 31
<211> 230
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 Fc 域

<400> 31

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
1 5 10 15

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
20 25 30

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
35 40 45

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
50 55 60

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
85 90 95

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
100 105 110

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
115 120 125

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
130 135 140

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
145 150 155 160

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
165 170 175

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
180 185 190

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
195 200 205

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
210 215 220

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 32
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 32

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
1 5 10 15

Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20

<210> 33
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 33

Gly Gly Ser Gly Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
1 5 10 15

Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20

<210> 34
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 34

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys
1 5 10 15

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25

<210> 35
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 35

Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys
1 5 10 15

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25

<210> 36
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 36

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys
1 5 10 15

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25

<210> 37
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 37

Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys
1 5 10 15

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25

<210> 38
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 38

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ser Asp Lys Thr His Thr
1 5 10 15

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20

<210> 39
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 39

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
1 5 10 15

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20

<210> 40
<211> 21

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 40

Gly Gly Pro Ser Ser Ser Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
1 5 10 15

Cys Pro Ala Pro Glu
20

<210> 41
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 41

Gly Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Asp Lys Thr His
1 5 10 15

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25

<210> 42
<211> 246
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TNFRSF 促效劑融合蛋白之合成 Fc 域

<400> 42

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Ala Gly Asn Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
20 25 30

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
35 40 45

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
50 55 60

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
65 70 75 80

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
85 90 95

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
100 105 110

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
115 120 125

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
130 135 140

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
145 150 155 160

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
165 170 175

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
180 185 190

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
195 200 205

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
210 215 220

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
225 230 235 240

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
245

<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TNFRSF 促效劑融合蛋白之合成連接子

<400> 43

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TNFRSF 促效劑融合蛋白之合成連接子

<400> 44

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 45
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TNFRSF 促效劑融合蛋白之合成連接子

<400> 45

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10 15

<210> 46
<211> 254
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 4-1BBL

<400> 46

Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro
1 5 10 15

Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val
20 25 30

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe
35 40 45

Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser
50 55 60

Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp
65 70 75 80

Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val
85 90 95

Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp
100 105 110

Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu
115 120 125

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
130 135 140

Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
145 150 155 160

Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
165 170 175

Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
180 185 190

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
195 200 205

Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
210 215 220

Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
225 230 235 240

Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
245 250

<210> 47
<211> 168
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 4-1BBL 可溶域

<400> 47

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
1 5 10 15

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
20 25 30

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
35 40 45

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
50 55 60

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
65 70 75 80

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
85 90 95

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
100 105 110

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
115 120 125

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
130 135 140

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
145 150 155 160

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
165

<210> 48
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B4-1-1 型式 1 之合成可變重鏈

<400> 48

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Val Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 49
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B4-1-1 型式 1 之合成可變輕鏈

<400> 49

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Gln Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 50
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B4-1-1 型式 2 之合成可變重鏈

<400> 50

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Val Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 51
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 4B4-1-1 型式 2 之合成可變輕鏈

<400> 51

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Gln Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 52
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> H39E3-2 之合成可變重鏈

<400> 52

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asp Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Asp Ile Lys Asn Asp Gly Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala
65 70 75 80

Pro Ser Leu Thr Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Leu Thr
115 120

<210> 53
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> H39E3-2 之合成可變輕鏈

<400> 53

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Ser Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Arg Gln
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
100 105

<210> 54
<211> 277
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成人類 OX40（智人）

<400> 54

```
Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1               5                  10                  15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
            20                  25                  30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
        35                  40                  45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
    50                  55                  60

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
65                  70                  75                  80

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
                85                  90                  95

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
            100                 105                 110

Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
        115                 120                 125

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
    130                 135                 140

Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
145                 150                 155                 160

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
                165                 170                 175

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
            180                 185                 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
        195                 200                 205
```

Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
210 215 220

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
225 230 235 240

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
260 265 270

Thr Leu Ala Lys Ile
275

<210> 55
<211> 272
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成鼠類 OX40（小鼠）

<400> 55

Met Tyr Val Trp Val Gln Gln Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu
1 5 10 15

Thr Leu Gly Val Thr Ala Arg Arg Leu Asn Cys Val Lys His Thr Tyr
20 25 30

Pro Ser Gly His Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met
35 40 45

Val Ser Arg Cys Asp His Thr Arg Asp Thr Leu Cys His Pro Cys Glu
50 55 60

Thr Gly Phe Tyr Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys
65 70 75 80

Thr Gln Cys Asn His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr
85 90 95

Pro Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg
100 105 110

Gln Asp Ser Gly Tyr Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro
115 120 125

Gly His Phe Ser Pro Gly Asn Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn
130 135 140

Cys Thr Leu Ser Gly Lys Gln Thr Arg His Pro Ala Ser Asp Ser Leu
145 150 155 160

Asp Ala Val Cys Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu
165 170 175

Thr Gln Arg Pro Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Gln Ser Thr Thr Val
180 185 190

Trp Pro Arg Thr Ser Glu Leu Pro Ser Pro Pro Thr Leu Val Thr Pro
195 200 205

Glu Gly Pro Ala Phe Ala Val Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Leu
210 215 220

Ala Pro Leu Thr Val Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Lys Ala Trp
225 230 235 240

Arg Leu Pro Asn Thr Pro Lys Pro Cys Trp Gly Asn Ser Phe Arg Thr
245 250 255

Pro Ile Gln Glu Glu His Thr Asp Ala His Phe Thr Leu Ala Lys Ile
260 265 270

<210> 56
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔沃西單抗之合成重鏈

<400> 56

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 57
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔沃西單抗之合成輕鏈

<400> 57

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
            20                  25                  30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 58
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔沃西單抗之合成重鏈可變區

<400> 58

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr
115

<210> 59
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔沃西單抗之合成輕鏈可變區

<400> 59

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔沃西單抗之合成重鏈 CDR1

<400> 60

Gly Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Trp Asn
1 5

<210> 61
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔沃西單抗之合成重鏈 CDR2

<400> 61

Tyr Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His
1 5 10

<210> 62
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔沃西單抗之合成重鏈 CDR3

<400> 62

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 63
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔沃西單抗之合成輕鏈 CDR1

<400> 63

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5

<210> 64
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔沃西單抗之合成輕鏈 CDR2

<400> 64

Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser
1 5 10

<210> 65
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔沃西單抗之合成輕鏈 CDR3

<400> 65

Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
1 5

<210> 66
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4 之合成重鏈

<400> 66

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 67
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4 之合成輕鏈

<400> 67

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205
```

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 68
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4 之合成重鏈可變區

<400> 68

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 69
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4 之合成輕鏈可變區

<400> 69

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 70
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4 之合成重鏈 CDR1

<400> 70

Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 71
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4 之合成重鏈 CDR2

<400> 71

Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4 之合成重鏈 CDR3

<400> 72

Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr
1 5

<210> 73
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4 之合成輕鏈 CDR1

<400> 73

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4 之合成輕鏈 CDR2

<400> 74

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4 之合成輕鏈 CDR3

<400> 75

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 76
<211> 450

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 18D8 之合成重鏈

<400> 76

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
130 135 140

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
195 200 205

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
210 215 220

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 77
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 18D8 之合成輕鏈

<400> 77

Glu Ile Val Val Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 78
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 18D8 之合成重鏈可變區

<400> 78

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 79
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 18D8 之合成輕鏈可變區

<400> 79

Glu Ile Val Val Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 80
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 18D8 之合成重鏈 CDR1

<400> 80

Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 81
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 18D8 之合成重鏈 CDR2

<400> 81

Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 82
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 18D8 之合成重鏈 CDR3

<400> 82

Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 83
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 18D8 之合成輕鏈 CDR1

<400> 83

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 84
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 18D8 之合成輕鏈 CDR2

<400> 84

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 85
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 18D8 之合成輕鏈 CDR3

<400> 85

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
1 5

<210> 86
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu119-122 之合成重鏈可變區

<400> 86

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
50 55 60

Glu Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 87
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> Hu119-122之合成輕鏈可變區

<400> 87

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 88
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu119-122之合成重鏈CDR1

<400> 88

Ser His Asp Met Ser
1 5

<210> 89
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu119-122之重鏈CDR2

<400> 89

Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Glu
1 5 10 15

Arg

<210> 90
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu119-122 之合成重鏈 CDR3

<400> 90

His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 91
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu119-122 之合成輕鏈 CDR1

<400> 91

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10 15

<210> 92
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu119-122 之合成輕鏈 CDR2

<400> 92

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu119-122 之合成輕鏈 CDR3

<400> 93

Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 94
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu106-222 之合成重鏈可變區

<400> 94

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 95
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu106-222 之合成輕鏈可變區

<400> 95

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 96
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu106-222 之合成重鏈 CDR1

<400> 96

Asp Tyr Ser Met His
1 5

<210> 97
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu106-222 之合成重鏈 CDR2

<400> 97

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 98
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu106-222 之合成重鏈 CDR3

<400> 98

Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 99
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu106-222 之合成輕鏈 CDR1

<400> 99

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 100
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu106-222 之合成輕鏈 CDR2

<400> 100

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr
1 5

<210> 101
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu106-222 之合成輕鏈 CDR3

<400> 101

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
1 5

<210> 102
<211> 183

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 OX40L

<400> 102

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg
1 5 10 15

Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln
20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser
35 40 45

Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val
50 55 60

Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln
65 70 75 80

Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn
85 90 95

Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu
100 105 110

Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln
115 120 125

Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr
130 135 140

Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu
145 150 155 160

Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
165 170 175

Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
180

<210> 103
<211> 131

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 OX40L 可溶域

<400> 103

Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu
1 5 10 15

Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu
20 25 30

Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe
35 40 45

Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser
50 55 60

Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val
65 70 75 80

Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys
85 90 95

Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His
100 105 110

Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe
115 120 125

Cys Val Leu
130

<210> 104
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 OX40L 可溶域（替代的）

<400> 104

Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys
1 5 10 15

Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys
20 25 30

Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile
35 40 45

Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr
50 55 60

Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg Ser Val
65 70 75 80

Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu
85 90 95

Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly
100 105 110

Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
115 120 125

<210> 105
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 008 之合成可變重鏈

<400> 105

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Arg Tyr Ser Gln Val His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 106
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 008 之合成可變輕鏈

<400> 106

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Ala Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
85 90 95

Tyr Asn His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 107
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 011 之合成可變重鏈

<400> 107

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Arg Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80

Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95

Asp Arg Tyr Phe Arg Gln Gln Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 108
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 011 之合成可變輕鏈

<400> 108

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Ala Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
85 90 95

Tyr Asn His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 109
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 021 之合成可變重鏈

<400> 109

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Arg Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Arg Tyr Ile Thr Leu Pro Asn Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 110
<211> 108

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 021 之合成可變輕鏈

<400> 110

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Val Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
85 90 95

Lys Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 111
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 023 之合成可變重鏈

<400> 111

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Gly Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Met
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Asp Asn Val Met Gly Leu Tyr Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 112
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 023 之合成可變輕鏈

<400> 112

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 113
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成重鏈可變區

<400> 113

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 114
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成輕鏈可變區

<400> 114

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 115
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成重鏈可變區

<400> 115

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Phe Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Gly Tyr His Gly Pro His Leu Asp Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Pro
115 120

<210> 116
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成輕鏈可變區

<400> 116

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ala Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Thr Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ile Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 117
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體之合成重鏈可變區

<400> 117

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly His Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 118
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體之合成重鏈可變區

<400> 118

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 119
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體之合成輕鏈可變區

<400> 119

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 120
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體之合成輕鏈可變區

<400> 120

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 121
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體之合成重鏈可變區

<400> 121

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ser Asn Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Lys Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
50 55 60

Glu Arg Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Lys Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 122
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體之合成重鏈可變區

<400> 122

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
50 55 60

Glu Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 123
<211> 111

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體之合成輕鏈可變區

<400> 123

```
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
            20                  25                  30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
    50                  55                  60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65                  70                  75                  80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
                85                  90                  95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
            100                 105                 110
```

<210> 124
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體之合成輕鏈可變區

<400> 124

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
            20                  25                  30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
        35                  40                  45
```

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 125
<211> 138
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成重鏈可變區

<400> 125

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly
1 5 10 15

Val Gln Ser Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr
65 70 75 80

Tyr Ala Glu Ser Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
85 90 95

Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Trp Gly Glu Val Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 126
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成輕鏈可變區

<400> 126

Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His
1 5 10 15

Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Asp
35 40 45

Ile Asn Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser
85 90 95

Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp
100 105 110

Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

<210> 127

<400> 127
000

<210> 128

<400> 128
000

<210> 129

<400> 129
000

<210> 130

<400> 130
000

<210> 131

<400> 131
000

<210> 132

<400> 132
000

<210> 133

<400> 133
000

<210> 134

<400> 134
000

<210> 135

<400> 135
000

<210> 136

<400> 136
000

<210> 137

<400> 137
000

<210> 138

<400> 138
000

<210> 139

<400> 139
000

<210> 140

<400> 140
000

<210> 141

<400> 141
000

<210> 142

<400> 142
000

<210> 143

<400> 143
000

<210> 144

<400> 144
000

<210> 145

<400> 145
000

<210> 146

<400> 146
000

<210> 147

<400> 147
000

<210> 148

<400> 148
000

<210> 149

<400> 149
000

<210> 150

<400> 150
000

<210> 151

<400> 151
000

<210> 152

<400> 152

000

<210> 153

<400> 153
000

<210> 154

<400> 154
000

<210> 155

<400> 155
000

<210> 156

<400> 156
000

<210> 157

<400> 157
000

<210> 158

<400> 158
000

<210> 159

<400> 159
000

<210> 160

<400> 160
000

<210> 161

<400> 161
000

<210> 162

<400> 162
000

<210> 163

<400> 163
000

<210> 164

<400> 164
000

<210> 165

<400> 165
000

<210> 166

<400> 166
000

<210> 167

<400> 167
000

<210> 168

<400> 168
000

<210> 169

<400> 169
000

<210> 170

<400> 170
000

<210> 171

<400> 171
000

<210> 172

<400> 172
000

<210> 173

<400> 173
000

<210> 174

<400> 174
000

<210> 175

<400> 175
000

<210> 176

<400> 176
000

<210> 177

<400> 177
000

<210> 178

<400> 178
000

<210> 179

<400> 179
000

<210> 180

<400> 180
000

<210> 181

<400> 181
000

<210> 182

<400> 182
000

<210> 183

<400> 183
000

<210> 184

<400> 184
000

<210> 185

<400> 185
000

<210> 186

<400> 186
000

<210> 187

<400> 187
000

<210> 188

<400> 188
000

<210> 189

<400> 189
000

<210> 190

<400> 190
000

<210> 191

<400> 191
000

<210> 192

<400> 192
000

<210> 193

<400> 193
000

<210> 194

<400> 194
000

<210> 195

<400> 195
000

<210> 196

<400> 196
000

<210> 197

<400> 197
000

<210> 198

<400> 198
000

<210> 199

<400> 199
000

<210> 200

<400> 200
000

<210> 201

<400> 201
000

<210> 202

<400> 202
000

<210> 203

<400> 203
000

<210> 204

<400> 204
000

<210> 205

<400> 205
000

<210> 206

<400> 206
000

<210> 207

<400> 207
000

<210> 208

<400> 208
000

<210> 209

<400> 209
000

<210> 210

<400> 210

000

<210> 211

<400> 211
000

<210> 212

<400> 212
000

<210> 213

<400> 213
000

<210> 214

<400> 214
000

<210> 215

<400> 215
000

<210> 216

<400> 216
000

<210> 217

<400> 217
000

<210> 218

<400> 218
000

<210> 219

<400> 219
000

<210> 220

<400> 220
000

<210> 221

<400> 221
000

<210> 222

<400> 222
000

<210> 223

<400> 223
000

<210> 224

<400> 224
000

<210> 225

<400> 225
000

<210> 226

<400> 226
000

<210> 227

<400> 227
000

<210> 228

<400> 228
000

<210> 229

<400> 229
000

<210> 230

<400> 230
000

<210> 231

<400> 231
000

<210> 232

<400> 232
000

<210> 233

<400> 233
000

<210> 234

<400> 234
000

<210> 235

<400> 235
000

<210> 236

<400> 236
000

<210> 237

<400> 237
000

<210> 238

<400> 238
000

<210> 239

<400> 239
000

<210> 240

<400> 240
000

<210> 241

<400> 241
000

<210> 242

<400> 242
000

<210> 243

<400> 243
000

<210> 244

<400> 244
000

<210> 245

<400> 245
000

<210> 246

<400> 246
000

<210> 247

<400> 247
000

<210> 248

<400> 248
000

<210> 249

<400> 249
000

<210> 250

<400> 250
000

<210> 251

<400> 251
000

<210> 252

<400> 252
000

<210> 253

<400> 253
000

<210> 254

<400> 254
000

<210> 255

<400> 255
000

<210> 256

<400> 256
000

<210> 257

<400> 257
000

<210> 258

<400> 258
000

<210> 259

<400> 259
000

<210> 260

<400> 260
000

<210> 261

<400> 261
000

<210> 262

<400> 262
000

<210> 263

<400> 263
000

<210> 264

<400> 264
000

<210> 265

<400> 265
000

<210> 266

<400> 266
000

<210> 267

<400> 267
000

<210> 268

<400> 268

000

<210> 269

<400> 269
000

<210> 270

<400> 270
000

<210> 271

<400> 271
000

<210> 272

<400> 272
000

<210> 273

<400> 273
000

<210> 274

<400> 274
000

<210> 275

<400> 275
000

<210> 276

<400> 276
000

<210> 277

<400> 277
000

<210> 278

<400> 278
000

<210> 279

<400> 279
000

<210> 280

<400> 280
000

<210> 281

<400> 281
000

<210> 282

<400> 282
000

<210> 283

<400> 283
000

<210> 284

<400> 284
000

<210> 285

<400> 285
000

<210> 286

<400> 286
000

<210> 287

<400> 287
000

<210> 288

<400> 288
000

<210> 289

<400> 289
000

<210> 290

<400> 290
000

<210> 291

<400> 291
000

<210> 292

<400> 292
000

<210> 293

<400> 293
000

<210> 294

<400> 294
000

<210> 295

<400> 295
000

<210> 296

<400> 296
000

<210> 297

<400> 297
000

<210> 298

<400> 298
000

<210> 299

<400> 299
000

<210> 300

<400> 300
000

<210> 301

<400> 301
000

<210> 302

<400> 302
000

<210> 303

<400> 303
000

<210> 304

<400> 304
000

<210> 305

<400> 305
000

<210> 306

<400> 306
000

<210> 307

<400> 307
000

<210> 308

<400> 308
000

<210> 309

<400> 309
000

<210> 310

<400> 310
000

<210> 311

<400> 311
000

<210> 312

<400> 312
000

<210> 313

<400> 313
000

<210> 314

<400> 314
000

<210> 315

<400> 315
000

<210> 316

<400> 316
000

<210> 317

<400> 317
000

<210> 318

<400> 318
000

<210> 319

<400> 319
000

<210> 320

<400> 320
000

<210> 321

<400> 321
000

<210> 322

<400> 322
000

<210> 323

<400> 323
000

<210> 324

<400> 324
000

<210> 325

<400> 325
000

<210> 326

<400> 326

000

<210> 327

<400> 327
000

<210> 328

<400> 328
000

<210> 329

<400> 329
000

<210> 330

<400> 330
000

<210> 331

<400> 331
000

<210> 332

<400> 332
000

<210> 333

<400> 333
000

<210> 334

<400> 334
000

<210> 335

<400> 335
000

<210> 336

<400> 336
000

<210> 337

<400> 337
000

<210> 338

<400> 338
000

<210> 339

<400> 339
000

<210> 340

<400> 340
000

<210> 341

<400> 341
000

<210> 342

<400> 342
000

<210> 343

<400> 343
000

<210> 344

<400> 344
000

<210> 345

<400> 345
000

<210> 346

<400> 346
000

<210> 347

<400> 347
000

<210> 348

<400> 348
000

<210> 349

<400> 349
000

<210> 350

<400> 350
000

<210> 351

<400> 351
000

<210> 352

<400> 352
000

<210> 353

<400> 353
000

<210> 354

<400> 354
000

<210> 355

<400> 355
000

<210> 356

<400> 356
000

<210> 357

<400> 357
000

<210> 358

<400> 358
000

<210> 359

<400> 359
000

<210> 360

<400> 360
000

<210> 361

<400> 361
000

<210> 362

<400> 362
000

<210> 363

<400> 363
000

<210> 364

<400> 364
000

<210> 365

<400> 365
000

<210> 366

<400> 366
000

<210> 367

<400> 367
000

<210> 368

<400> 368
000

<210> 369

<400> 369
000

<210> 370

<400> 370
000

<210> 371

<400> 371
000

<210> 372

<400> 372
000

<210> 373

<400> 373
000

<210> 374

<400> 374
000

<210> 375

<400> 375
000

<210> 376

<400> 376
000

<210> 377

<400> 377
000

<210> 378

<400> 378
000

<210> 379

<400> 379
000

<210> 380

<400> 380
000

<210> 381

<400> 381
000

<210> 382

<400> 382
000

<210> 383

<400> 383
000

<210> 384

<400> 384

000

<210> 385

<400> 385
000

<210> 386

<400> 386
000

<210> 387

<400> 387
000

<210> 388

<400> 388
000

<210> 389

<400> 389
000

<210> 390

<400> 390
000

<210> 391

<400> 391
000

<210> 392

<400> 392
000

<210> 393

<400> 393
000

<210> 394

<400> 394
000

<210> 395

<400> 395
000

<210> 396

<400> 396
000

<210> 397

<400> 397
000

<210> 398

<400> 398
000

<210> 399

<400> 399
000

<210> 400

<400> 400
000

<210> 401

<400> 401
000

<210> 402

<400> 402
000

<210> 403

<400> 403
000

<210> 404

<400> 404
000

<210> 405

<400> 405
000

<210> 406

<400> 406
000

<210> 407

<400> 407
000

<210> 408

<400> 408
000

<210> 409

<400> 409
000

<210> 410

<400> 410
000

<210> 411

<400> 411
000

<210> 412

<400> 412
000

<210> 413

<400> 413
000

<210> 414

<400> 414
000

<210> 415

<400> 415
000

<210> 416

<400> 416
000

<210> 417

<400> 417
000

<210> 418

<400> 418
000

<210> 419

<400> 419
000

<210> 420

<400> 420
000

<210> 421

<400> 421
000

<210> 422

<400> 422
000

<210> 423

<400> 423
000

<210> 424

<400> 424
000

<210> 425

<400> 425
000

<210> 426

<400> 426
000

<210> 427

<400> 427
000

<210> 428

<400> 428
000

<210> 429

<400> 429
000

<210> 430

<400> 430
000

<210> 431

<400> 431
000

<210> 432

<400> 432
000

<210> 433

<400> 433
000

<210> 434

<400> 434
000

<210> 435

<400> 435
000

<210> 436

<400> 436
000

<210> 437

<400> 437
000

<210> 438

<400> 438
000

<210> 439

<400> 439
000

<210> 440

<400> 440
000

<210> 441

<400> 441
000

<210> 442

<400> 442

000

<210> 443

<400> 443
000

<210> 444

<400> 444
000

<210> 445

<400> 445
000

<210> 446

<400> 446
000

<210> 447

<400> 447
000

<210> 448

<400> 448
000

<210> 449

<400> 449
000

<210> 450

<400> 450
000

<210> 451

<400> 451
000

<210> 452

<400> 452
000

<210> 453

<400> 453
000

<210> 454

<400> 454
000

<210> 455

<400> 455
000

<210> 456

<400> 456
000

<210> 457

<400> 457
000

<210> 458

<400> 458
000

<210> 459

<400> 459
000

<210> 460

<400> 460
000

<210> 461

<400> 461
000

<210> 462

<400> 462
000

<210> 463
<211> 440
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成納武單抗重鏈

<400> 463

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 464
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成納武單抗輕鏈

<400> 464

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 465
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成納武單抗可變重鏈

<400> 465

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 466
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成納武單抗可變輕鏈

<400> 466

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 467
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成納武單抗重鏈 CDR1

<400> 467

Asn Ser Gly Met His
1 5

<210> 468
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成納武單抗重鏈 CDR2

<400> 468

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 469
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成納武單抗重鏈 CDR3

<400> 469

Asn Asp Asp Tyr
1

<210> 470
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成納武單抗輕鏈 CDR1

<400> 470

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 471
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成納武單抗輕鏈 CDR2

<400> 471

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 472
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成納武單抗輕鏈 CDR3

<400> 472

Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 473
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成帕博利珠單抗重鏈

<400> 473

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                  10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
    130                 135                 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
            180                 185                 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
        195                 200                 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
    210                 215                 220
```

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 474
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成帕博利珠單抗輕鏈

<400> 474

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 475
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成帕博利珠單抗可變重鏈

<400> 475

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 476
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成帕博利珠單抗可變輕鏈

<400> 476

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 477
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成帕博利珠單抗重鏈 CDR1

<400> 477

Asn Tyr Tyr Met Tyr
1 5

<210> 478
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成帕博利珠單抗重鏈 CDR2

<400> 478

Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

<210> 479
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成帕博利珠單抗重鏈 CDR3

<400> 479

Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 480
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成帕博利珠單抗輕鏈 CDR1

<400> 480

Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 481
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成帕博利珠單抗輕鏈 CDR2

<400> 481

Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
1 5

<210> 482
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成帕博利珠單抗輕鏈 CDR3

<400> 482

Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 483
<211> 451

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成德瓦魯單抗重鏈

<400> 483

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 484
<211> 265
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成德瓦魯單抗輕鏈

<400> 484

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser
50 55 60

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser
65 70 75 80

Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
85 90 95

Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
100 105 110

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
115 120 125

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser
130 135 140

Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
145 150 155 160

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
165 170 175

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
180 185 190

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
195 200 205

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
210 215 220

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
225 230 235 240

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
245 250 255

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
260 265

<210> 485
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成德瓦魯單抗可變重鏈

<400> 485

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 486
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成德瓦魯單抗可變輕鏈

<400> 486

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 487
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成德瓦魯單抗重鏈 CDR1

<400> 487

Arg Tyr Trp Met Ser
1 5

<210> 488
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成德瓦魯單抗重鏈 CDR2

<400> 488

Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 489
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成德瓦魯單抗重鏈 CDR3

<400> 489

Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 490
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成德瓦魯單抗輕鏈 CDR1

<400> 490

Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 491
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成德瓦魯單抗輕鏈 CDR2

<400> 491

Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 492
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成德瓦魯單抗輕鏈 CDR3

<400> 492

Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 493
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿維魯單抗重鏈

<400> 493

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 494
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿維魯單抗輕鏈

<400> 494

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 495
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿維魯單抗可變重鏈

<400> 495

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 496
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿維魯單抗可變輕鏈

<400> 496

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 497
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿維魯單抗重鏈 CDR1

<400> 497

Ser Tyr Ile Met Met
1 5

<210> 498
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿維魯單抗重鏈 CDR2

<400> 498

Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 499
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿維魯單抗重鏈 CDR3

<400> 499

Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr
1 5 10

<210> 500
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿維魯單抗輕鏈 CDR1

<400> 500

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 501
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿維魯單抗輕鏈 CDR2

<400> 501

Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 502
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿維魯單抗輕鏈 CDR3

<400> 502

Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Arg Val
1 5 10

<210> 503
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿替利珠單抗重鏈

<400> 503

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 504
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿替利珠單抗輕鏈

<400> 504

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 505
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿替利珠單抗可變重鏈

<400> 505

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 506
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿替利珠單抗可變輕鏈

<400> 506

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 507
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿替利珠單抗重鏈 CDR1

<400> 507

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 508
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿替利珠單抗重鏈 CDR2

<400> 508

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 509
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿替利珠單抗重鏈 CDR3

<400> 509

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 510
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿替利珠單抗輕鏈 CDR1

<400> 510

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 511
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿替利珠單抗輕鏈 CDR2

<400> 511

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 512
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿替利珠單抗輕鏈 CDR3

<400> 512

Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr
1 5

<210> 513
<211> 225
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成伊匹木單抗重鏈

<400> 513

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His
225

<210> 514
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成伊匹木單抗輕鏈

<400> 514

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 515
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成伊匹木單抗可變重鏈

<400> 515

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 516
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成伊匹木單抗可變輕鏈

<400> 516

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 517
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成伊匹木單抗重鏈

<400> 517

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr
1 5

<210> 518
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成伊匹木單抗重鏈 CDR2

<400> 518

Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys
1 5 10

<210> 519
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成伊匹木單抗重鏈 CDR3

<400> 519

Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 520
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成伊匹木單抗輕鏈 CDR1

<400> 520

Gln Ser Val Gly Ser Ser Tyr
1 5

<210> 521
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成伊匹木單抗輕鏈 CDR2

<400> 521

Gly Ala Phe
1

<210> 522
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成伊匹木單抗輕鏈 CDR3

<400> 522

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 523
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成曲美單抗重鏈

<400> 523

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
130 135 140

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys
195 200 205

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu
210 215 220

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 524
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成曲美單抗輕鏈

<400> 524

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 525
<211> 167
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成曲美單抗可變重鏈

<400> 525

Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
1 5 10 15

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
20 25 30

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn
35 40 45

Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
50 55 60

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
65 70 75 80

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu
85 90 95

Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165

<210> 526
<211> 139
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成曲美單抗可變輕鏈

<400> 526

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
1 5 10 15

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys
20 25 30

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
50 55 60

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
85 90 95

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
100 105 110

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
115 120 125

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
130 135

<210> 527
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成曲美單抗重鏈 CDR1

<400> 527

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
1 5 10

<210> 528
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成曲美單抗重鏈 CDR2

<400> 528

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

<210> 529
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成曲美單抗重鏈 CDR3

<400> 529

Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 530
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成曲美單抗輕 CDR1

<400> 530

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp
1 5 10

<210> 531
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成曲美單抗輕 CDR2

<400> 531

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 532
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成曲美單抗輕 CDR3

<400> 532

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 533
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成澤氟利單抗重鏈

<400> 533

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 534
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成澤氟利單抗輕鏈

<400> 534

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 535
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成澤氟利單抗可變重鏈

<400> 535

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 536
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成澤氟利單抗可變輕鏈

<400> 536

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 537
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成澤氟利單抗重鏈 CDR1

<400> 537

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser
1 5

<210> 538
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成澤氟利單抗重鏈 CDR2

<400> 538

Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile
1 5

<210> 539
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成澤氟利單抗重鏈 CDR3

<400> 539

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 540
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成澤氟利單抗輕鏈 CDR1

<400> 540

Gln Ser Val Ser Arg Tyr
1 5

<210> 541
<211> 3

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成澤氟利單抗輕鏈 CDR2

<400> 541

Gly Ala Ser
1

<210> 542
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成澤氟利單抗輕鏈 CDR3

<400> 542

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 543
<211> 153
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 IL-2

<400> 543

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145 150

<210> 544
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 IL-2 突變蛋白

<400> 544

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 545
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 IL-2 突變蛋白

<400> 545

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 546
<211> 145
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成 HCDR1_IL-2

<400> 546

Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
1 5 10 15

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
20 25 30

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe
35 40 45

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
50 55 60

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
65 70 75 80

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
85 90 95

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
100 105 110

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
115 120 125

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser Val
130 135 140

Gly
145

<210> 547
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 HCDR2

<400> 547

Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 548
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 HCDR3

<400> 548

Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 549
<211> 91
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 HCDR1_IL-2 kabat

<400> 549

Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu
1 5 10 15

Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro
20 25 30

Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly
35 40 45

Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile
50 55 60

Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser
65 70 75 80

Thr Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly
85 90

<210> 550
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 HCDR2 kabat

<400> 550

Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 551
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 HCDR3 kabat

<400> 551

Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 552
<211> 142
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 HCDR1_IL-2 clothia

<400> 552

Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
1 5 10 15

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
20 25 30

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe
35 40 45

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
50 55 60

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
65 70 75 80

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
85 90 95

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
100 105 110

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
115 120 125

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met
130 135 140

<210> 553
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 HCDR2 clothia

<400> 553

Trp Trp Asp Asp Lys
1 5

<210> 554
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 HCDR3 clothia

<400> 554

Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 555
<211> 143
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 HCDR1_IL-2 IMGT

<400> 555

Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
1 5 10 15

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
20 25 30

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe
35 40 45

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
50 55 60

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
65 70 75 80

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
85 90 95

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
100 105 110

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
115 120 125

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser
130 135 140

<210> 556
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 HCDR2 IMGT

<400> 556

Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys
1 5

<210> 557
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 HCDR3 IMGT

<400> 557

Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 558
<211> 253
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 VH

<400> 558

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr
20 25 30

Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
35 40 45

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys
50 55 60

Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr
65 70 75 80

Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu
85 90 95

Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg
100 105 110

Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser
115 120 125

Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val
130 135 140

Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr
145 150 155 160

Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro
165 170 175

Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys
180 185 190

Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr
195 200 205

Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp
210 215 220

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe
225 230 235 240

Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 559
<211> 533
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成重鏈

<400> 559

Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
1 5 10 15

Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
20 25 30

Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
35 40 45

Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
50 55 60

Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
65 70 75 80

Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
85 90 95

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
100 105 110

Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
115 120 125

Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr
130 135 140

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
145 150 155 160

Asn Gln Val Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala
165 170 175

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
180 185 190

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
195 200 205

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
210 215 220

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
225 230 235 240

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
245 250 255

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
260 265 270

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
275 280 285

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
290 295 300

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
305 310 315 320

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
325 330 335

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val
340 345 350

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
355 360 365

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
370 375 380

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
385 390 395 400

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Ala Ala
405 410 415

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
420 425 430

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
435 440 445

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
450 455 460

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
465 470 475 480

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
485 490 495

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
500 505 510

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
515 520 525

Leu Ser Pro Gly Lys
530

<210> 560
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 LCDR1 kabat

<400> 560

Lys Ala Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met His
1 5 10

<210> 561
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成 LCDR2 kabat

<400> 561

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 562
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 LCDR3 kabat

<400> 562

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 563
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 LCDR1 chothia

<400> 563

Gln Leu Ser Val Gly Tyr
1 5

<210> 564
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 LCDR2 chothia

<400> 564

Asp Thr Ser
1

<210> 565
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 LCDR3 chothia

<400> 565

Gly Ser Gly Tyr Pro Phe
1 5

<210> 566
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 VL

<400> 566

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 567
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成輕鏈

<400> 567

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 568
<211> 583
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成輕鏈

<400> 568

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr
20 25 30

Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
35 40 45

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys
50 55 60

Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr
65 70 75 80

Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu
85 90 95

Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg
100 105 110

Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser
115 120 125

Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val
130 135 140

Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr
145 150 155 160

Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro
165 170 175

Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys
180 185 190

Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr
195 200 205

Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp
210 215 220

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe
225 230 235 240

Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
245 250 255

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
260 265 270

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
275 280 285

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
290 295 300

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
305 310 315 320

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
325 330 335

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
340 345 350

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
355 360 365

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
370 375 380

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
385 390 395 400

Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
405 410 415

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
420 425 430

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
435 440 445

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
450 455 460

Ala Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
465 470 475 480

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
485 490 495

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
500 505 510

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
515 520 525

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
530 535 540

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
545 550 555 560

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
565 570 575

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
580

<210> 569
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成輕鏈

<400> 569

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 570
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 IL-2 形式

<400> 570

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 571
<211> 303
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 IL-2 形式

<400> 571

Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn
1 5 10 15

Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu
20 25 30

Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile
35 40 45

Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Ser Ser Ser
50 55 60

Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln
65 70 75 80

Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg
85 90 95

Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys
100 105 110

His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu
115 120 125

Asn Leu Ala Gln Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Leu Cys Asp Asp Asp
130 135 140

Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu
145 150 155 160

Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys
165 170 175

Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser
180 185 190

Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr
195 200 205

Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr
210 215 220

Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly
225 230 235 240

His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile
245 250 255

Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly
260 265 270

Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr
275 280 285

His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly
290 295 300

<210> 572
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 IL-2 形式

<400> 572

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Ala Arg Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys
20 25 30

Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu
35 40 45

Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn
50 55 60

Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly
85 90 95

Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser
100 105 110

Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser
115 120 125

Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu
130 135 140

Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro
145 150 155 160

Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Gly Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro
180 185 190

His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser
195 200 205

Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 573
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成黏蛋白域多肽

<400> 573

Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Pro
1 5 10 15

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其包括：

(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得及/或接受來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)藉由在包括第一細胞培養基、IL-2及以下中任一者之第一TIL細胞培養物中培養該第一TIL群體來進行初始第一擴增：

i)獲自抗原呈現飼養細胞(APC)之第一培養物之第一培養物上清液，其中該第一培養物上清液包括OKT-3，或

ii)APC及OKT-3，

其中藉由在包括第一透氣表面區域之第一容器中培養該第一TIL細胞培養物持續約1天至7天或1天至8天之第一時段來進行該初始第一擴增，以獲得第二TIL群體，且其中該第二TIL群體於數目上大於該第一TIL群體；

(c)藉由用另外的第一細胞培養基、IL-2及以下中任一者補充該第一TIL細胞培養物來進行快速第二擴增：

i)獲自APC之第二培養物之第二培養物上清液，其中該第二培養物上清液包括OKT-3，或

ii)APC及OKT-3；

以形成第二TIL細胞培養物，其中藉由培養該第二TIL細胞培養物持續約1天至11天之第二時段來進行該快速第二擴增，以獲得第三TIL群體，且其中該第三TIL群體為治療性TIL群體；其中該第一TIL細胞培養物不包括該第一培

養物上清液及APC兩者；其中該第二TIL細胞培養物不包括該第二培養物上清液及補充APC兩者；且其中該第一TIL細胞培養物不包括APC及/或該第二TIL細胞培養物不包括補充APC；

(d)收集獲自步驟(c)之該治療性TIL群體；及

(e)將來自步驟(d)之該經收集之TIL群體轉移至輸注袋。

【請求項2】如請求項1之用於擴增TIL之方法，其中在步驟(b)之該初始第一擴增中，該第一TIL細胞培養物包括該第一培養物上清液，且其中在步驟(c)之該快速第二擴增中，用OKT-3及APC補充該第一TIL細胞培養物以形成該第二TIL細胞培養物。

【請求項3】如請求項1之用於擴增TIL之方法，其中在步驟(b)之該初始第一擴增中，該第一TIL細胞培養物包括OKT-3及APC，且其中在步驟(c)之該快速第二擴增中，用該第二培養物上清液補充該第一TIL細胞培養物以形成該第二TIL細胞培養物。

【請求項4】如請求項1之用於擴增TIL之方法，其中在步驟(b)之該初始第一擴增中，該第一TIL細胞培養物包括該第一培養物上清液，且其中在步驟(c)之該快速第二擴增中，用該第二培養物上清液補充該第一TIL細胞培養物以形成該第二TIL細胞培養物。

【請求項5】如請求項1之用於擴增TIL之方法，其中獲得用於步驟(b)中之該第一培養物上清液包括：

1)提供包括IL-2及OKT-3之APC細胞培養基；

2)在來自1)之該APC細胞培養基中培養至少約5×10^8個APC持續約3天至4天，以產生該第一培養物上清液；及

3)自2)中的該細胞培養物收集該第一培養物上清液。

【請求項6】如請求項1之用於擴增TIL之方法，其中獲得用於步驟(c)中之該第二培養物上清液包括：

1)提供包括IL-2及OKT-3之APC細胞培養基；

2)在來自1)之該APC細胞培養基中培養至少約1×10^7個APC持續約3天至4天，以產生該第二培養物上清液；及

3)自2)中的該細胞培養物收集該第二培養物上清液。

【請求項7】如請求項1之方法，其中步驟(c)之該快速第二擴增進一步包括以下步驟：

i)在步驟(c)中該第二時段開始之後約3天或4天，用另外的IL-2補充該第二TIL細胞培養物。

【請求項8】如請求項1之方法，其中該等APC對於該個體為外源性的。

【請求項9】如請求項1之方法，其中該等APC為周邊血液單核細胞(PBMC)。

【請求項10】如請求項1之方法，其中步驟(c)之該快速第二擴增進一步包括以下步驟：

i)在該第二時段開始之後剛好或大約3天或4天，將該第二TIL細胞培養物自該第一容器轉移至複數個第二容器中，以在該複數個第二容器中之每一者中形成該第二TIL細胞培養物的繼代培養物；及

ii)在該第二時段之剩餘時間中，在該複數個第二容器中之每一者中培養該第二TIL細胞培養物之繼代培養物。

【請求項11】如請求項10之方法，其中在步驟i)中，將等體積之該第二TIL細胞培養物轉移至該複數個第二容器中。

【請求項12】如請求項10之方法，其中該等第二容器中之每一者的大小與該第一容器相等。

【請求項13】如請求項10之方法，其中該等第二容器中之每一者比該第一容器大。

【請求項14】如請求項10之方法，其中該等第二容器之大小相等。

【請求項15】如請求項14之方法，其中該等第二容器比該第一容器大。

【請求項16】如請求項14之方法，其中該等第二容器比該第一容器小。

【請求項17】如請求項1之方法，其中該第一容器為G-Rex 100培養瓶。

【請求項18】如請求項10之方法，其中該第一容器為G-Rex 100培養瓶，且該複數個第二容器中之每一者為G-Rex 100培養瓶。

【請求項19】如請求項10之方法，其中該複數個第二容器係選自由以下組成之群組：2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19及20個第二容器。

【請求項20】如請求項10之方法，其中該複數個第二容器為5個第二容器。

【請求項21】如請求項10之方法，其中在步驟ii)之前，該方法進一步包括用另外的IL-2補充該第二TIL細胞培養物之各繼代培養物。

【請求項22】如請求項10之方法，其中在步驟ii)之前，該方法進一步包括用第二細胞培養基及IL-2補充該第二TIL細胞培養物之各繼代培養物。

【請求項23】如請求項22之方法，其中該第一細胞培養基與該第二細胞培養基相同。

【請求項24】如請求項22之方法，其中該第一細胞培養基與該第二細胞培養基不同。

【請求項25】如請求項22之方法，其中該第一細胞培養基為DM1，且該第二細胞培養基為DM2。

【請求項26】一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包括：

(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得及/或接受來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)藉由在包括IL-2、視情況選用之OKT-3及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)及/或包括OKT-3的來自APC之第一培養物之培養物上清液的細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中在包括第一透氣表面區域之容器中進行該初始第一擴增，其中該初始第一擴增進行約1天至7天至1天至8天之第一時

段以獲得該第二TIL群體，其中該第二TIL群體於數目上大於該第一TIL群體；

(c)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC及/或包括OKT-3的來自APC之第二培養物的培養物上清液補充該第二TIL群體的該細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中在該快速第二擴增中添加之APC的數目為步驟(b)中添加之APC的數目的至少兩倍，其中該快速第二擴增進行約1天至11天之第二時段以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體，其中在包括第二透氣表面區域之容器中進行該快速第二擴增；

(d)收集獲自步驟(c)之該治療性TIL群體；及

(e)將來自步驟(d)之該經收集之TIL群體轉移至輸注袋。

【請求項27】一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包括：

(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得及/或接受來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)藉由在包括IL-2、視情況選用之OKT-3且視情況包括抗原呈現細胞(APC)及/或包括OKT-3的來自APC之第一培養物之培養物上清液的細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約1天至7天或1天至8天之第一時段以獲得該第二TIL群體，其中該第二TIL群體於數目上大於該第

一TIL群體；

(c)藉由使該第二TIL群體與包括IL-2、視情況選用之OKT-3及APC及/或包括OKT-3的來自APC之第二培養物之培養物上清液的細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增進行約1天至11天之第二時段以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體；及

(d)收集獲自步驟(c)之該治療性TIL群體。

【請求項28】如請求項27之方法，其中在步驟(b)中，該細胞培養基進一步包括抗原呈現細胞(APC)，且其中步驟(c)中的該培養基中之APC之數目大於步驟(b)中的該培養基中之APC之數目。

【請求項29】一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包括：

(a)藉由在包括IL-2、視情況選用之OKT-3及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)及/或包括OKT-3的來自APC之第一培養物之培養物上清液的細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，該第一TIL群體可藉由將來自個體所切除之腫瘤的腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得，其中在包括第一透氣表面區域之容器中進行該初始第一擴增，其中該初始第一擴增進行約1天至7天/8天之第一時段以獲得該第二TIL群體，其中該第二TIL群體於數目上大於該第一TIL群體；

(b)藉由使該第二TIL群體與含另外的IL-2、視情況選

用之OKT-3及APC及/或包括OKT-3的來自APC之第二培養物之培養物上清液的該第二TIL群體之細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中在該快速第二擴增中APC的數目為步驟(a)中APC的數目的至少兩倍，其中該快速第二擴增進行約1天至11天之第二時段以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體，其中在包括第二透氣表面區域之容器中進行該快速第二擴增；及

(c)收集獲自步驟(b)之該治療性TIL群體。

【請求項30】一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包括：

(a)藉由在包括IL-2、視情況選用之OKT-3且視情況包括抗原呈現細胞(APC)及/或包括OKT-3的來自APC之第一培養物之培養物上清液的細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約1天至7天或1天至8天之第一時段以獲得該第二TIL群體，其中該第二TIL群體於數目上大於該第一TIL群體；

(b)藉由使該第二TIL群體與包括IL-2、視情況選用之OKT-3及APC及/或包括OKT-3的來自APC之第二培養物之培養物上清液的細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增進行約1天至11天之第二時段以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體；及

(c)收集獲自步驟(b)之該治療性TIL群體。

【請求項31】如請求項30之方法，其中在步驟(a)中，該細胞培養基進一步包括抗原呈現細胞(APC)，且其中步驟(c)中的該培養基中之APC之數目大於步驟(b)中的該培養基中之APC之數目。

【請求項32】如請求項26或28或31之方法，其中該快速第二擴增中APC之數目與該初始第一擴增中APC之數目的比率在約1.5:1至約20:1之範圍內。

【請求項33】如請求項32之方法，其中該快速第二擴增中APC之數目與該初始第一擴增中APC之數目的比率在約1.5:1至約10:1之範圍內。

【請求項34】如請求項26或28或31之方法，其中該快速第二擴增中APC之數目與該初始第一擴增中APC之數目的比率在約2:1至約5:1之範圍內。

【請求項35】如請求項26或28或31之方法，其中該快速第二擴增中APC之數目與該初始第一擴增中APC之數目的比率在約2:1至約3:1之範圍內。

【請求項36】如請求項26或28或31之方法，其中該快速第二擴增中APC之數目與該初始第一擴增中APC之數目的比率為約2:1。

【請求項37】如請求項26或28或31之方法，其中該初始第一擴增中APC之數目在約1.0×10^6個APC/cm^2至約4.5×10^6個APC/cm^2的範圍內，且其中該快速第二擴增中APC之數目在約2.5×10^6個APC/cm^2至約7.5×10^6個APC/cm^2

的範圍內。

【請求項38】如請求項26或28或31之方法，其中該初始第一擴增中APC之數目在約1.5×10^6個APC/cm^2至約3.5×10^6個APC/cm^2的範圍內，且其中該快速第二擴增中APC之數目在約3.5×10^6個APC/cm^2至約6.0×10^6個APC/cm^2的範圍內。

【請求項39】如請求項26或28或31之方法，其中該初始第一擴增中APC之數目在約2.0×10^6個APC/cm^2至約3.0×10^6個APC/cm^2的範圍內，且其中該快速第二擴增中APC之數目在約4.0×10^6個APC/cm^2至約5.5×10^6個APC/cm^2的範圍內。

【請求項40】如請求項26或28或31之方法，其中該初始第一擴增中APC之數目在約1×10^8個APC至約3.5×10^8個APC的範圍內，且其中該快速第二擴增中APC之數目在約3.5×10^8個APC至約1×10^9個APC的範圍內。

【請求項41】如請求項26或28或31之方法，其中該初始第一擴增中APC之數目在約1.5×10^8個APC至約3×10^8個APC的範圍內，且其中該快速第二擴增中APC之數目在約4×10^8個APC至約7.5×10^8個APC的範圍內。

【請求項42】如請求項26或28或31之方法，其中該初始第一擴增中APC之數目在約2×10^8個APC至約2.5×10^8個APC的範圍內，且其中該快速第二擴增中APC之數目在約4.5×10^8個APC至約5.5×10^8個APC的範圍內。

【請求項43】如請求項26或28或31之方法，其中將約

2.5×10^8個APC添加至該初始第一擴增且將5×10^8個APC添加至該快速第二擴增。

【請求項44】如請求項26至43中任一項之方法，其中該第二TIL群體中TIL之數目與該第一TIL群體中TIL之數目的比率為約1.5:1至約100:1。

【請求項45】如請求項26至43中任一項之方法，其中該第二TIL群體中TIL之數目與該第一TIL群體中TIL之數目的比率為約50:1。

【請求項46】如請求項26至43中任一項之方法，其中該第二TIL群體中TIL之數目與該第一TIL群體中TIL之數目的比率為約25:1。

【請求項47】如請求項26至40中任一項之方法，其中該第二TIL群體中TIL之數目與該第一TIL群體中TIL之數目的比率為約20:1。

【請求項48】如請求項26至40中任一項之方法，其中該第二TIL群體中TIL之數目與該第一TIL群體中TIL之數目的比率為約10:1。

【請求項49】如請求項26至43中任一項之方法，其中該第二TIL群體在數目上比該第一TIL群體大至少50倍。

【請求項50】如請求項27至31中任一項之方法，其中該方法包括在收集該治療性TIL群體的該步驟之後進行以下另一步驟：

將該經收集之治療性TIL群體轉移至輸注袋。

【請求項51】如請求項27至50中任一項之方法，其中

該多個腫瘤碎片分佈至複數個分開的容器中，在每個分開的容器中，該第二TIL群體係獲自該初始第一擴增步驟中的該第一TIL群體，且該第三TIL群體係獲自該快速第二擴增步驟中的該第二TIL群體，且其中獲自該第三TIL群體之該治療性TIL群體係自該複數個容器中之每一者中收集且經合併以產生該經收集之TIL群體。

【請求項52】如請求項51之方法，其中該複數個分開的容器包括至少兩個分開的容器。

【請求項53】如請求項51之方法，其中該複數個分開的容器包括兩個至二十個分開的容器。

【請求項54】如請求項51之方法，其中該複數個分開的容器包括兩個至十個分開的容器。

【請求項55】如請求項51之方法，其中該複數個分開的容器包括兩個至五個分開的容器。

【請求項56】如請求項51至55中任一項之方法，其中該等分開的容器中之每一者包括第一透氣表面區域。

【請求項57】如請求項27至50中任一項之方法，其中該多個腫瘤碎片分佈於單一容器中。

【請求項58】如請求項57之方法，其中該單一容器包括第一透氣表面區域。

【請求項59】如請求項56或58之方法，其中在該初始第一擴增步驟中，該細胞培養基包括抗原呈現細胞(APC)，且該等APC係以約一個細胞層至約三個細胞層之平均厚度層疊至該第一透氣表面區域上。

【請求項60】如請求項58之方法，其中在該初始第一擴增步驟中，該等APC係以約1.5個細胞層至約2.5個細胞層之平均厚度層疊至該第一透氣表面區域上。

【請求項61】如請求項58之方法，其中在該初始第一擴增步驟中，該等APC係以約2個細胞層之平均厚度層疊至該第一透氣表面區域上。

【請求項62】如請求項59至61中任一項之方法，其中在該快速第二擴增步驟中，該等APC係以約3個細胞層至約5個細胞層之厚度層疊至該第一透氣表面區域上。

【請求項63】如請求項62之方法，其中在該快速第二擴增步驟中，該等APC係以約3.5個細胞層至約4.5個細胞層之厚度層疊至該第一透氣表面區域上。

【請求項64】如請求項63之方法，其中在該快速第二擴增步驟中，該等APC係以約4個細胞層之厚度層疊至該第一透氣表面區域上。

【請求項65】如請求項27至50中任一項之方法，其中在該初始第一擴增步驟中，該初始第一擴增係在包括第一透氣表面區域之第一容器中進行，且在該快速第二擴增步驟中，該快速第二擴增係在包括第二透氣表面區域之第二容器中進行。

【請求項66】如請求項65之方法，其中該第二容器比該第一容器大。

【請求項67】如請求項65或66之方法，其中在該初始第一擴增步驟中，該細胞培養基包括抗原呈現細胞

(APC)，且該等APC係以約一個細胞層至約三個細胞層之平均厚度層疊至該第一透氣表面區域上。

【請求項68】如請求項66之方法，其中在該初始第一擴增步驟中，該等APC係以約1.5個細胞層至約2.5個細胞層之平均厚度層疊至該第一透氣表面區域上。

【請求項69】如請求項68之方法，其中在該初始第一擴增步驟中，該等APC係以約2個細胞層之平均厚度層疊至該第一透氣表面區域上。

【請求項70】如請求項65至69中任一項之方法，其中在該快速第二擴增步驟中，該等APC係以約3個細胞層至約5個細胞層之平均厚度層疊至該第二透氣表面區域上。

【請求項71】如請求項70之方法，其中在該快速第二擴增步驟中，該等APC係以約3.5個細胞層至約4.5個細胞層之平均厚度層疊至該第二透氣表面區域上。

【請求項72】如請求項70之方法，其中在該快速第二擴增步驟中，該等APC係以約4個細胞層之平均厚度層疊至該第二透氣表面區域上。

【請求項73】如請求項27至64中任一項之方法，其中在各容器中對第一TIL群體進行該初始第一擴增，在同一容器中對自該第一TIL群體產生之該第二TIL群體進行該快速第二擴增。

【請求項74】如請求項73之方法，其中各容器包括第一透氣表面區域。

【請求項75】如請求項74之方法，其中在該初始第一

擴增步驟中，該細胞培養基包括抗原呈現細胞(APC)，且該等APC係以約一個細胞層至約三個細胞層之平均厚度層疊至該第一透氣表面區域上。

【請求項76】如請求項75之方法，其中在該初始第一擴增步驟中，該等APC係以約1.5個細胞層至約2.5個細胞層之平均厚度層疊至該第一透氣表面區域上。

【請求項77】如請求項76之方法，其中在該初始第一擴增步驟中，該等APC係以約2個細胞層之平均厚度層疊至該第一透氣表面區域上。

【請求項78】如請求項74至77中任一項之方法，其中在該快速第二擴增步驟中，該等APC係以約3個細胞層至約5個細胞層之平均厚度層疊至該第一透氣表面區域上。

【請求項79】如請求項78之方法，其中在該快速第二擴增步驟中，該等APC係以約3.5個細胞層至約4.5個細胞層之平均厚度層疊至該第一透氣表面區域上。

【請求項80】如請求項79之方法，其中在該快速第二擴增步驟中，該等APC係以約4個細胞層之平均厚度層疊至該第一透氣表面區域上。

【請求項81】如請求項27至57、65、66及73中任一項之方法，其中在該初始第一擴增步驟中，在各容器中對第一TIL群體進行該初始第一擴增，該第一容器包括第一表面區域，該細胞培養基包括抗原呈現細胞(APC)，且該等APC層疊至該第一透氣表面區域上，且其中在該初始第一擴增步驟中層疊之APC的平均層數與在該快速第二擴增步

驟中層疊之APC的平均層數的比率在約1:1.1至約1:10之範圍內。

【請求項82】如請求項81之方法，其中在該初始第一擴增步驟中層疊之APC的平均層數與在該快速第二擴增步驟中層疊之APC的平均層數的比率在約1:1.2至約1:8之範圍內。

【請求項83】如請求項81之方法，其中在該初始第一擴增步驟中層疊之APC的平均層數與在該快速第二擴增步驟中層疊之APC的平均層數的比率在約1:1.3至約1:7之範圍內。

【請求項84】如請求項81之方法，其中在該初始第一擴增步驟中層疊之APC的平均層數與在該快速第二擴增步驟中層疊之APC的平均層數的比率在約1:1.4至約1:6之範圍內。

【請求項85】如請求項81之方法，其中在該初始第一擴增步驟中層疊之APC的平均層數與在該快速第二擴增步驟中層疊之APC的平均層數的比率在約1:1.5至約1:5之範圍內。

【請求項86】如請求項81之方法，其中在該初始第一擴增步驟中層疊之APC的平均層數與在該快速第二擴增步驟中層疊之APC的平均層數的比率在約1:1.6至約1:4之範圍內。

【請求項87】如請求項81之方法，其中在該初始第一擴增步驟中層疊之APC的平均層數與在該快速第二擴增步

驟中層疊之APC的平均層數的比率在約1:1.7至約1:3.5之範圍內。

【請求項88】如請求項81之方法，其中在該初始第一擴增步驟中層疊之APC的平均層數與在該快速第二擴增步驟中層疊之APC的平均層數的比率在約1:1.8至約1:3之範圍內。

【請求項89】如請求項81之方法，其中在該初始第一擴增步驟中層疊之APC的平均層數與在該快速第二擴增步驟中層疊之APC的平均層數的比率在約1:1.9至約1:2.5之範圍內。

【請求項90】如請求項81之方法，其中在該初始第一擴增步驟中層疊之APC的平均層數與在該快速第二擴增步驟中層疊之APC的平均層數的比率為約1:2。

【請求項91】如前述請求項中任一項之方法，其中在該快速第二擴增步驟中2天至3天之後，向該細胞培養基補充另外的IL-2。

【請求項92】如前述請求項中任一項之方法，其進一步包括使用冷凍保存過程冷凍保存在收集該治療性TIL群體之該步驟中收集之該TIL群體。

【請求項93】如請求項26或50之方法，其進一步包括冷凍保存該輸注袋之步驟。

【請求項94】如請求項92或93之方法，其中使用1:1比率之經收集之TIL群體與冷凍保存培養基來進行該冷凍保存過程。

【請求項95】如前述請求項中任一項之方法，其中該等抗原呈現細胞為周邊血液單核細胞(PBMC)。

【請求項96】如請求項95之方法，其中該等PBMC經照射且為同種異體的。

【請求項97】如前述請求項中任一項之方法，其中在該初始第一擴增步驟中，該細胞培養基包括周邊血液單核細胞(PBMC)，且其中在該初始第一擴增步驟中添加至該細胞培養基中之PBMC的總數為約2.5×10^8。

【請求項98】如前述請求項中任一項之方法，其中在該快速第二擴增步驟中，該細胞培養基中之該等抗原呈現細胞(APC)為周邊血液單核細胞(PBMC)，且其中在該快速第二擴增步驟中添加至該細胞培養基中之PBMC的總數為約5×10^8。

【請求項99】如請求項26至91中任一項之方法，其中該等抗原呈現細胞為人工抗原呈現細胞。

【請求項100】如前述請求項中任一項之方法，其中在收集該治療性TIL群體之該步驟中，該收集係使用基於膜之細胞處理系統進行。

【請求項101】如前述請求項中任一項之方法，其中在收集該治療性TIL群體之該步驟中，該收集係使用基於LOVO之細胞處理系統進行。

【請求項102】如前述請求項中任一項之方法，其中在該初始第一擴增步驟中，該多個碎片包括每容器約60個碎片，其中各碎片之體積為約27 mm^3。

【請求項103】如前述請求項中任一項之方法，其中該等多個碎片包括約30至約60個碎片，其總體積為約1300 mm^3至約1500 mm^3。

【請求項104】如請求項103之方法，其中該多個碎片包括約50個碎片，其總體積為約1350 mm^3。

【請求項105】如前述請求項中任一項之方法，其中該多個碎片包括約50個碎片，其總質量為約1公克至約1.5公克。

【請求項106】如前述請求項中任一項之方法，其中該細胞培養基提供於選自由以下組成之群組的容器中：G容器及Xuri細胞袋。

【請求項107】如前述請求項中任一項之方法，其中該IL-2濃度為約10,000 IU/mL至約5,000 IU/mL。

【請求項108】如前述請求項中任一項之方法，其中該IL-2濃度為約6,000 IU/mL。

【請求項109】如請求項26或50之方法，其中在將該經收集之治療性TIL群體轉移至輸注袋之該步驟中，該輸注袋為含有HypoThermosol之輸注袋。

【請求項110】如請求項92至94中任一項之方法，其中該冷凍保存培養基包括二甲亞碸(DMSO)。

【請求項111】如請求項110之方法，其中該冷凍保存培養基包括7%至10% DMSO。

【請求項112】如前述請求項中任一項之方法，其中該初始第一擴增步驟中之該第一時段及該快速第二擴增步

驟中之該第二時段各自個別地在5天、6天或7天之時段內進行。

【請求項113】如請求項26至111中任一項之方法，其中該初始第一擴增步驟中之該第一時段係在5天、6天或7天之時段內進行。

【請求項114】如請求項26至111中任一項之方法，其中該快速第二擴增步驟中之該第二時段係在7天、8天或9天之時段內進行。

【請求項115】如請求項26至111中任一項之方法，其中該初始第一擴增步驟中之該第一時段及該快速第二擴增步驟中之該第二時段各自個別地在7天之時段內進行。

【請求項116】如請求項26至111中任一項之方法，其中該初始第一擴增步驟至收集該治療性TIL群體之該步驟係在約14天至約16天之時段內進行。

【請求項117】如請求項26至111中任一項之方法，其中該初始第一擴增步驟至收集該治療性TIL群體之該步驟係在約15天至約16天之時段內進行。

【請求項118】如請求項26至111中任一項之方法，其中該初始第一擴增步驟至收集該治療性TIL群體之該步驟係在約14天之時段內進行。

【請求項119】如請求項26至111中任一項之方法，其中該初始第一擴增步驟至收集該治療性TIL群體之該步驟係在約15天之時段內進行。

【請求項120】如請求項26至111中任一項之方法，其

中該初始第一擴增步驟至收集該治療性TIL群體之該步驟係在約16天之時段內進行。

【請求項121】如請求項26至111中任一項之方法，其進一步包括使用冷凍保存過程冷凍保存該經收集之治療性TIL群體的步驟，其中該初始第一擴增步驟至收集該治療性TIL群體之該步驟及該冷凍保存步驟係在16天內或少於16天內進行。

【請求項122】如請求項26至118中任一項之方法，其中在收集該治療性TIL群體之該步驟中收集的該治療性TIL群體包括足以用於該等TIL之治療有效劑量的TIL。

【請求項123】如請求項122之方法，其中足以用於治療有效劑量的TIL之數目為約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}。

【請求項124】如請求項26至123中任一項之方法，其中該快速第二擴增步驟中的該第三TIL群體提供增加之功效、增加之干擾素-γ產生及/或增加之多株性。

【請求項125】如請求項26至123中任一項之方法，其中該快速第二擴增步驟中的該第三TIL群體相較於藉由長於18天之過程製備的TIL提供至少一倍至五倍或更多倍的干擾素-γ產生。

【請求項126】如請求項26至123中任一項之方法，其中獲自該快速第二擴增步驟中的該第三TIL群體之效應T細胞及/或中央記憶T細胞相對於獲自在該初始第一擴增步驟中的該第二TIL群體之效應T細胞及/或中央記憶T細胞展現增加的CD8及CD28表現。

【請求項127】如請求項26至126中任一項之方法，其中將來自收集該治療性TIL群體之該步驟的該治療性TIL群體輸注至患者中。

【請求項128】一種用於治療患有癌症之個體之方法，該方法包括投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，其包括：

(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得及/或接受來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)藉由在包括IL-2、視情況選用之OKT-3及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)及/或包括OKT-3的來自APC之第一培養物之培養物上清液的細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增係在包括第一透氣表面區域之容器中進行，其中該初始第一擴增進行約1天至7天或1天至8天以獲得該第二TIL群體；

(c)藉由用另外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)及/或包括OKT-3的來自APC之第二培養物的培養物上清液補充該第二TIL群體的該細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中添加至該快速第二擴增之APC的數目為步驟(b)中添加之APC的數目的至少兩倍，其中該快速第二擴增進行約1天至11天以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體，其中在包括第二透氣表面區域之容器中進行該快速第二擴增；

(d)收集獲自步驟(c)之該治療性TIL群體；

(e)將來自步驟(d)之該經收集之TIL群體轉移至輸注袋；及

(f)向該個體投予治療有效劑量之來自步驟(e)之TIL。

【請求項129】如請求項128之方法，其中在步驟(f)中足以用於投予治療有效劑量的TIL之數目為約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}。

【請求項130】如請求項128之方法，其中該等抗原呈現細胞(APC)為PBMC。

【請求項131】如請求項128至130中任一項之方法，其中在步驟(f)中投予治療有效劑量之TIL細胞之前，已向該患者投予非骨髓清除式淋巴球耗盡方案。

【請求項132】如請求項131之方法，其中該非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱五天。

【請求項133】如請求項128至132中任一項之方法，其進一步包括以下步驟：始於步驟(f)中向該患者投予該等TIL細胞之後當天，用高劑量IL-2方案治療該患者。

【請求項134】如請求項133之方法，其中該高劑量IL-2方案包括每八小時以15分鐘推注靜脈內輸注投予600,000或720,000 IU/kg直至耐受為止。

【請求項135】如請求項128至134中任一項之方法，其中步驟(b)中之該第三TIL群體提供增加之功效、增加之干擾素-γ產生及/或增加之多株性。

【請求項136】如請求項128至134中任一項之方法，其中步驟(c)中之該第三TIL群體相較於藉由長於16天之過程製備的TIL提供至少一倍至五倍或更多倍的干擾素-γ產生。

【請求項137】如請求項128至134中任一項之方法，其中獲自步驟(c)中之該第三TIL群體之效應T細胞及/或中央記憶T細胞相對於獲自步驟(b)中之該第二細胞群體之效應T細胞及/或中央記憶T細胞展現增加之CD8及CD28表現。

【請求項138】如請求項128至137中任一項之方法，其中該癌症為實體腫瘤。

【請求項139】如請求項128至137中任一項之方法，其中該癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。

【請求項140】如請求項139之方法，其中該癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【請求項141】如請求項139之方法，其中該癌症為黑色素瘤。

【請求項142】如請求項139之方法，其中該癌症為HNSCC。

【請求項143】如請求項139之方法，其中該癌症為子宮頸癌。

【請求項144】如請求項139之方法，其中該癌症為NSCLC。

【請求項145】如請求項139之方法，其中該癌症為神經膠母細胞瘤(包含GBM)。

【請求項146】如請求項139之方法，其中該癌症為胃腸癌。

【請求項147】如請求項128至146中任一項之方法，其中該癌症為高突變癌症。

【請求項148】如請求項128至146中任一項之方法，其中該癌症為小兒高突變癌症。

【請求項149】如請求項128至148中任一項之方法，其中該容器為密閉容器。

【請求項150】如請求項128至149中任一項之方法，其中該容器為G容器。

【請求項151】如請求項128至150中任一項之方法，其中該容器為GREX-10。

【請求項152】如請求項128至150中任一項之方法，其中該密閉容器包括GREX-100。

【請求項153】如請求項128至150中任一項之方法，其中該密閉容器包括GREX-500。

【請求項154】一種藉由如前述請求項中任一項之方法製得的治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體。

【請求項155】一種治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其由患者之腫瘤組織製備，其中該治療性TIL群體提供增加之功效、增加之干擾素-γ產生及/或增加之多株性。

【請求項156】如請求項154或請求項155之治療性TIL群體，其提供增加之干擾素-γ產生。

【請求項157】如請求項154或請求項155之治療性TIL群體，其提供增加之多株性。

【請求項158】如請求項154或請求項155之治療性TIL群體，其提供增加之功效。

【請求項159】如請求項154至158中任一項之治療性TIL群體，其中該治療性TIL群體相較於藉由長於16天之過程製備之TIL能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【請求項160】如請求項154至158中任一項之治療性TIL群體，其中該治療性TIL群體相較於藉由長於16天之過程製備之TIL能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。

【請求項161】如請求項154至158中任一項之治療性TIL群體，其中該治療性TIL群體相較於藉由長於16天之過程製備之TIL能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。

【請求項162】一種治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的抗原呈現細胞(APC)之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【請求項163】如請求項162之治療性TIL群體，其中相較於藉由其中TIL之該第一擴增係在無任何添加的APC

之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。

【請求項164】如請求項163之治療性TIL群體，其中相較於藉由其中TIL之該第一擴增係在無任何添加的APC之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。

【請求項165】一種治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【請求項166】如請求項165之治療性TIL群體，其中相較於藉由其中TIL之該第一擴增係在無任何添加的OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。

【請求項167】如請求項165之治療性TIL群體，其中相較於藉由其中TIL之該第一擴增係在無任何添加的OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。

【請求項168】一種治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由其中TIL之第一擴增係在不添加抗原呈現細胞(APC)且不添加OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【請求項169】如請求項168之治療性TIL群體，其中

相較於藉由其中TIL之該第一擴增係在不添加抗原呈現細胞(APC)且不添加OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。

【請求項170】如請求項168之治療性TIL群體，其中相較於藉由其中TIL之該第一擴增係在不添加抗原呈現細胞(APC)且不添加OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。

【請求項171】一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其包括如請求項154至170中任一項之治療性TIL群體及醫藥學上可接受之載劑。

【請求項172】一種無菌輸注袋，其包括如請求項168之TIL組成物。

【請求項173】一種如請求項154至167中任一項之治療性TIL群體之冷凍保存製劑。

【請求項174】一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其包括如請求項154至170中任一項之治療性TIL群體及冷凍保存培養基。

【請求項175】如請求項174之TIL組成物，其中該冷凍保存培養基含有DMSO。

【請求項176】如請求項175之TIL組成物，其中該冷凍保存培養基含有7-10% DMSO。

【請求項177】一種如請求項171或174至176中任一項之TIL組成物之冷凍保存製劑。

【請求項178】如請求項171或174至177中任一項之腫

瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其用作藥物。

【請求項179】如請求項171或174至177中任一項之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其用於治療癌症。

【請求項180】如請求項171或174至177中任一項之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其用於治療實體腫瘤癌症。

【請求項181】如請求項171或174至177中任一項之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其用於治療選自由以下組成之群組的癌症：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。

【請求項182】如請求項171或174至177中任一項之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其用於治療選自由以下組成之群組的癌症：黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【請求項183】如請求項171或174至177中任一項之TIL組成物，其用於治療癌症，其中癌症為黑色素瘤。

【請求項184】如請求項171或174至177中任一項之TIL組成物，其用於治療癌症，其中癌症為HNSCC。

【請求項185】如請求項171或174至177中任一項之TIL組成物，其用於治療癌症，其中癌症為子宮頸癌。

【請求項186】如請求項171或174至177中任一項之

TIL組成物，其用於治療癌症，其中癌症為NSCLC。

【請求項187】如請求項171或174至177中任一項之TIL組成物，其用於治療癌症，其中該癌症為神經膠母細胞瘤(包含GBM)。

【請求項188】如請求項171或174至177中任一項之TIL組成物，其用於治療癌症，其中該癌症為胃腸癌。

【請求項189】如請求項171或174至177中任一項之TIL組成物，其用於治療癌症，其中該癌症為高突變癌症。

【請求項190】如請求項171或174至177中任一項之TIL組成物，其用於治療癌症，其中該癌症為小兒高突變癌症。

【請求項191】一種如請求項171或174至177中任一項之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物之用途，其用於治療個體之癌症之方法中，該方法包括向該個體投予治療有效劑量之該TIL組成物。

【請求項192】如請求項191之TIL組成物之用途，其中該癌症為實體腫瘤。

【請求項193】如請求項191之TIL組成物之用途，其中該癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。

【請求項194】如請求項191之TIL組成物之用途，其中該癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【請求項195】如請求項191之TIL組成物之用途，其中該癌症為黑色素瘤。

【請求項196】如請求項191之TIL組成物之用途，其中該癌症為HNSCC。

【請求項197】如請求項191之TIL組成物之用途，其中該癌症為子宮頸癌。

【請求項198】如請求項191之TIL組成物之用途，其中該癌症為NSCLC。

【請求項199】如請求項191之TIL組成物之用途，其中該癌症為神經膠母細胞瘤(包含GBM)。

【請求項200】如請求項191之TIL組成物之用途，其中該癌症為胃腸癌。

【請求項201】如請求項191之TIL組成物之用途，其中該癌症為高突變癌症。

【請求項202】如請求項191之TIL組成物之用途，其中該癌症為小兒高突變癌症。

【請求項203】如請求項171或174至177中任一項之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其用於治療個體之癌症之方法中，該方法包括向該個體投予治療有效劑量之該TIL組成物。

【請求項204】如請求項203之TIL組成物，其中該癌症為實體腫瘤。

【請求項205】如請求項203之TIL組成物，其中該癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。

【請求項206】如請求項203之TIL組成物，其中該癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【請求項207】一種治療個體之癌症之方法，其包括向該個體投予治療有效劑量的如請求項171或174至177中任一項之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物。

【請求項208】如請求項207之方法，其中該癌症為實體腫瘤。

【請求項209】如請求項207之方法，其中該癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。

【請求項210】如請求項207之方法，其中該癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、

NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【請求項211】如請求項207之方法，其中該癌症為黑色素瘤。

【請求項212】如請求項207之方法，其中該癌症為HNSCC。

【請求項213】如請求項207之方法，其中該癌症為子宮頸癌。

【請求項214】如請求項207之方法，其中該癌症為NSCLC。

【請求項215】如請求項207之方法，其中該癌症為神經膠母細胞瘤(包含GBM)。

【請求項216】如請求項207之方法，其中該癌症為胃腸癌。

【請求項217】如請求項207之方法，其中該癌症為高突變癌症。

【請求項218】如請求項207之方法，其中該癌症為小兒高突變癌症。

【請求項219】一種擴增T細胞之方法，其包括：

(a)藉由培養獲自供體之第一T細胞群體以實現生長及起動該第一T細胞群體之活化來對該第一T細胞群體進行初始第一擴增；

(b)在步驟(a)中起動活化的該第一T細胞群體開始衰變之後，藉由培養該第一T細胞群體以實現生長及加強該第一T細胞群體之該活化來進行該第一T細胞群體之快速第二

擴增以獲得第二T細胞群體；及

(c)收集該第二T細胞群體。

【請求項220】如請求項219之方法，其中步驟(a)之該初始第一擴增係在至多7天之時段內進行。

【請求項221】如請求項219或220之方法，其中步驟(b)之該快速第二擴增係在至多11天之時段內進行。

【請求項222】如請求項221之方法，其中步驟(b)之該快速第二擴增係在至多9天之時段內進行。

【請求項223】如請求項219至222中任一項之方法，其中步驟(a)之該初始第一擴增係在7天之時段內進行且步驟(b)之該快速第二擴增係在9天之時段內進行。

【請求項224】如請求項219之方法，其中步驟(a)之該初始第一擴增係在至多8天之時段內進行。

【請求項225】如請求項219或220之方法，其中步驟(b)之該快速第二擴增係在至多8天之時段內進行。

【請求項226】如請求項219至222中任一項之方法，其中步驟(a)之該初始第一擴增係在8天之時段內進行且步驟(b)之該快速第二擴增係在8天之時段內進行。

【請求項227】如請求項219至226中任一項之方法，其中在步驟(a)中，該第一T細胞群體係在包括OKT-3及IL-2的第一培養基中培養。

【請求項228】如請求項227之方法，其中該第一培養基包括OKT-3、IL-2及抗原呈現細胞(APC)。

【請求項229】如請求項219至226中任一項之方法，

其中在步驟(b)中，該第一T細胞群體係在包括OKT-3、IL-2及抗原呈現細胞(APC)及/或包括OKT-3的來自APC之培養物之培養物上清液的第二培養基中培養。

【請求項230】如請求項219至226中任一項之方法，其中在步驟(a)中，該第一T細胞群體係在包括第一透氣表面之容器中於第一培養基中培養，其中該第一培養基包括視情況選用之OKT-3、IL-2及視情況選用之第一抗原呈現細胞(APC)群體或包括OKT-3的來自APC之第一培養物之培養物上清液，其中該第一APC群體對於該第一T細胞群體之該供體為外源性的，且該第一APC群體層疊至該第一透氣表面上，其中在步驟(b)中，該第一T細胞群體係在該容器中於第二培養基中培養，其中該第二培養基包括OKT-3、IL-2及第二APC群體或包括OKT-3的來自APC之第二培養物之培養物上清液，其中該第二APC群體對於該第一T細胞群體之該供體為外源性的，且該第二APC群體層疊至該第一透氣表面上，且其中該第二APC群體比該第一APC群體大。

【請求項231】如請求項230之方法，其中該第二APC群體中APC之數目與該第一APC群體中APC之數目的比率為約2:1。

【請求項232】如請求項230或231之方法，其中該第一APC群體中APC之數目為約2.5×10^8且該第二APC群體中APC之數目為約5×10^8。

【請求項233】如請求項230至232中任一項之方法，

其中在步驟(a)中，該第一APC群體係以2個APC層之平均厚度層疊至該第一透氣表面上。

【請求項234】如請求項230至233中任一項之方法，其中在步驟(b)中，該第二APC群體係以在4個至8個APC層之範圍內的平均厚度層疊至該第一透氣表面上。

【請求項235】如請求項230至234中任一項之方法，其中在步驟(b)中層疊至該第一透氣表面上之APC層的平均數目與在步驟(a)中層疊至該第一透氣表面上之APC層的平均數目的比率為2:1。

【請求項236】如請求項230至235中任一項之方法，其中該等APC為周邊血液單核細胞(PBMC)。

【請求項237】如請求項230至236中任一項之方法，其中APC包括經照射且對於該第一T細胞群體之該供體為外源性的PBMC。

【請求項238】如請求項227至234中任一項之方法，其中該等T細胞為腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)。

【請求項239】如請求項227至234中任一項之方法，其中該等T細胞為骨髓浸潤性淋巴球(MIL)。

【請求項240】如請求項227至234中任一項之方法，其中該等T細胞為周邊血液淋巴球(PBL)。

【請求項241】如前述請求項中任一項之方法，其中該細胞培養基為確定培養基及/或無血清培養基。

【請求項242】如請求項241之方法，其中該確定培養基包括(視情況重組之)運鐵蛋白、(視情況重組之)胰島素

及(視情況重組之)白蛋白。

【請求項243】如請求項241至242中任一項之方法，其中該無血清或確定培養基包括基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。

【請求項244】如請求項243之方法，其中該基礎細胞培養基係選自由以下組成之群組：CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CTS™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【請求項245】如請求項243至244中任一項之方法，其中該血清補充劑或血清替代物係選自由以下組成之群組：CTS™ OpTmizer T細胞擴增血清補充劑及CTS™免疫細胞血清替代物。

【請求項246】如請求項241至245中任一項之方法，其中該細胞培養基包括一種或多種白蛋白或白蛋白取代物。

【請求項247】如請求項241至246中任一項之方法，其中該細胞培養基包括一種或多種胺基酸。

【請求項248】如請求項241至247中任一項之方法，其中該細胞培養基包括一種或多種維生素、一種或多種運

鐵蛋白或運鐵蛋白取代物。

【請求項249】如請求項241至248中任一項之方法，其中該細胞培養基包括一種或多種抗氧化劑、一種或多種胰島素或胰島素取代物。

【請求項250】如請求項241至249中任一項之方法，其中該細胞培養基包括一種或多種膠原蛋白前驅物、一種或多種抗生素及一種或多種微量元素。

【請求項251】如請求項241至250中任一項之方法，其中該細胞培養基包括白蛋白。

【請求項252】如請求項241至251中任一項之方法，其中該細胞培養基包括白蛋白及一種或多種選自由以下組成之群組的成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分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Zr^{4+}之化合物。

【請求項253】如請求項241至252中任一項之方法，其中該細胞培養基進一步包括L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或2-巰基乙醇。

【請求項254】如請求項241至253中任一項之方法，其中該細胞培養基包括以該細胞培養基之體積計總濃度(vol%)為約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、

10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%之血清替代物。

【請求項255】如請求項241至254中任一項之方法，其中該細胞培養基包括總濃度為該細胞培養基之總體積之約3%、約5%或約10%的血清替代物。

【請求項256】如請求項241至255中任一項之方法，其中該細胞培養基進一步包括濃度為約0.1 mM至約10 mM、0.5 mM至約9 mM、1 mM至約8 mM、2 mM至約7 mM、3 mM至約6 mM或4 mM至約5 mM的麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。

【請求項257】如請求項241至256中任一項之方法，其中該細胞培養基進一步包括濃度為約2 mM之麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。

【請求項258】如請求項241至257中任一項之方法，其中該細胞培養基進一步包括濃度為約5 mM至約150 mM、10 mM至約140 mM、15 mM至約130 mM、20 mM至約120 mM、25 mM至約110 mM、30 mM至約100 mM、35 mM至約95 mM、40 mM至約90 mM、45 mM至約85 mM、50 mM至約80 mM、55 mM至約75 mM、60 mM至約70 mM或約65 mM的2-巰基乙醇。

【請求項259】如請求項241至258中任一項之方法，其中該細胞培養基進一步包括濃度為約55 mM之2-巰基乙醇。

【請求項260】如請求項241至259中任一項之方法，

其中該細胞培養基包括國際PCT公開案第WO/1998/030679號中所描述之確定培養基。

【請求項261】如請求項241至260中任一項之方法，其中該細胞培養基包括約5至200 mg/L範圍內之甘胺酸、約5至250 mg/L範圍內之L-組胺酸、約5至300 mg/L範圍內之L-異白胺酸、約5至200 mg/L範圍內之L-甲硫胺酸、約5至400 mg/L範圍內之L-苯丙胺酸、約1至1000 mg/L範圍內之L-脯胺酸、約1至45 mg/L範圍內之L-羥基脯胺酸、約1至250 mg/L範圍內之L-絲胺酸、約10至500 mg/L範圍內之L-蘇胺酸、約2至110mg/L範圍內之L-色胺酸、約3至175 mg/L範圍內之L-酪胺酸、約5至500 mg/L範圍內之L-纈胺酸、約1至20 mg/L範圍內之硫胺素、約1至20 mg/L範圍內之還原麩胱甘肽、約1至200 mg/L範圍內之L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、約1至50 mg/L範圍內之鐵飽和運鐵蛋白、約1至100 mg/L範圍內之胰島素、約0.000001至0.0001 mg/L範圍內之亞硒酸鈉及/或約5000至50,000 mg/L範圍內之白蛋白(例如AlbuMAX® I)。

【請求項262】如請求項241至261中任一項之方法，其中該細胞培養基包括非微量元素部分成分中之一或多者，其以本文提供之表4中標題「1X培養基中之濃度範圍」欄中列出之濃度範圍存在。

【請求項263】如請求項241至262中任一項之方法，其中該細胞培養基之滲透壓介於約260與350 mOsmol之間。

【請求項264】如請求項241至263中任一項之方法，其中該細胞培養基進一步包括約3.7 g/L或約2.2 g/L碳酸氫鈉。

【請求項265】如請求項241至264中任一項之方法，其中該細胞培養基進一步包括L-麩醯胺酸(最終濃度為約2 mM)、一種或多種抗生素、非必需胺基酸(NEAA；最終濃度為約100 μM)及/或2-巰基乙醇(最終濃度為約100 μM)。

【請求項266】如請求項241至265中任一項之方法，其中該第一及/或第二透氣容器中之該細胞培養基缺乏β-巰基乙醇(BME或βME；亦稱為2-巰基乙醇，CAS 60-24-2)。

【請求項267】如請求項241至265中任一項之方法，其中該細胞培養基包括CTS OpTmizer T細胞擴增SFM、3% CTS免疫細胞血清替代物、55 mM BME及視情況選用之麩醯胺酸。

【請求項268】如請求項241至265中任一項之方法，其中該細胞培養基包括補充有CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑(26 mL/L)及3% CTS™免疫細胞SR的CTS™OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基以及2 mM Glutamax，其視情況進一步包括6,000 IU/mL IL-2。

【請求項269】如請求項241至265中任一項之方法，其中該細胞培養基包括補充有CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑(26mL/L)及3% CTS™免疫細胞SR的CTS™OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、2 mM Glutamax且視情況進一步包

括3,000 IU/mL IL-2。

【請求項270】如前述請求項中任一項之方法，其中該腫瘤樣本為該個體之該腫瘤的一個或多個小活體組織切片、粗針活體組織切片或針吸活體組織切片。

【請求項271】一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其包括：

(i)藉由在包括IL-2之第一細胞培養基中培養獲自個體之腫瘤的一個或多個小活體組織切片、粗針活體組織切片或針吸活體組織切片的腫瘤樣本約3天而自該腫瘤樣本獲得及/或接受第一TIL群體；

(ii)藉由在包括IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)及/或包括OKT-3的來自APC之第一培養物之培養物上清液的第二細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中在包括第一透氣表面區域之容器中進行該初始第一擴增，其中該初始第一擴增進行約7天或8天之第一時段以獲得該第二TIL群體，其中該第二TIL群體於數目上大於該第一TIL群體；

(iii)藉由用另外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)及/或包括OKT-3的來自APC之第二培養物的培養物上清液補充該第二TIL群體的該第二細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中在該快速第二擴增中添加之APC的數目為步驟(ii)中添加之APC的數目的至少兩倍，其中該快速第二擴增進行約11天之第二時段以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體，其

中在包括第二透氣表面區域之容器中進行該快速第二擴增；

(iv)收集獲自步驟(iii)之該治療性TIL群體；及

(v)將來自步驟(iv)之該經收集之TIL群體轉移至輸注袋。

【請求項272】一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其包括：

(i)藉由在包括IL-2之第一細胞培養基中培養獲自個體之腫瘤的一個或多個小活體組織切片、粗針活體組織切片或針吸活體組織切片的腫瘤樣本約3天而自該腫瘤樣本獲得及/或接受第一TIL群體；

(ii)藉由在包括IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)及/或包括OKT-3的來自APC之第一培養物之培養物上清液的第二細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約7天或8天之第一時段以獲得該第二TIL群體，其中該第二TIL群體於數目上大於該第一TIL群體；

(iii)藉由使該第二TIL群體與包括IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)及/或包括OKT-3的來自APC之第二培養物之培養物上清液的第三細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增執行約11天之第二時段以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體；及

(iv)收集獲自步驟(iii)之該治療性TIL群體。

【請求項273】如271或272之方法，其中在該第二時段之第5天後，將該培養物分成2個或更多個繼代培養物，且各繼代培養物補充有另外量之該第三培養基且培養約6天。

【請求項274】如請求項273之方法，其中在該第二時段之第5天後，將該培養物分成至多5個繼代培養物。

【請求項275】如請求項271至274中任一項之方法，其中該方法之所有步驟在約22天內完成。

【請求項276】一種擴增T細胞之方法，其包括：

(i)藉由培養來自獲自供體之腫瘤之一個或多個小活體組織切片、粗針活體組織切片或針吸活體組織切片之腫瘤樣本的第一T細胞群體以實現生長及起始該第一T細胞群體之活化，進行該第一T細胞群體之初始第一擴增；

(ii)在步驟(a)中起動活化的該第一T細胞群體開始衰變之後，藉由培養該第一T細胞群體以實現生長及加強該第一T細胞群體之活化來進行該第一T細胞群體之快速第二擴增以獲得第二T細胞群體；及

(iv)收集該第二T細胞群體。

【請求項277】如請求項270至276中任一項之方法，其中該腫瘤樣本係自複數個粗針活體組織切片獲得。

【請求項278】如請求項277之方法，其中該複數個粗針活體組織切片係選自由以下組成之群組：2、3、4、5、6、7、8、9及10個粗針活體組織切片。

【請求項279】一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)或經擴增

之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其包括：

i)腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其視情況如請求項1至278中任一項而獲得，及

ii)確定培養基或無血清培養基，其視情況包括(視情況重組之)運鐵蛋白、(視情況重組之)胰島素及(視情況重組之)白蛋白。

【請求項280】如請求項270之TIL或經擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基包括(視情況重組之)運鐵蛋白、(視情況重組之)胰島素及(視情況重組之)白蛋白。

【請求項281】如請求項270至271中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基包括基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。

【請求項282】如請求項272之TIL或經擴增TIL組成物，其中該基礎細胞培養基包含但不限於CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CTS™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【請求項283】如請求項281至282中任一項之TIL或經

擴增TIL組成物，其中該血清補充劑或血清替代物係選自由以下組成之群組：CTS™ OpTmizer T細胞擴增血清補充劑及CTS™免疫細胞血清替代物。

【請求項284】如請求項279至283中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基包括一種或多種白蛋白或白蛋白取代物。

【請求項285】如請求項279至284中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基包括一種或多種胺基酸。

【請求項286】如請求項289至285中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基包括一種或多種維生素、一種或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物。

【請求項287】如請求項279至286中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基包括一種或多種抗氧化劑、一種或多種胰島素或胰島素取代物。

【請求項288】如請求項279至287中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基包括一種或多種膠原蛋白前驅物、一種或多種抗生素及一種或多種微量元素。

【請求項289】如請求項279至288中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基包括白蛋白。

【請求項290】如請求項279至289中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基包括白蛋白及一種或多種選自由以下組成之群組的成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分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Zr^{4+}之化合物。

【請求項291】如請求項279至290中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基進一步包括L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或2-巰基乙醇。

【請求項292】如請求項279至291中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基包括以該細胞培養基之體積計總濃度(vol%)為約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%之血清替代物。

【請求項293】如請求項279至292中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基包括總濃度為該細胞培養基之總體積之約3%、約5%或約10%的血清替代物。

【請求項294】如請求項279至293中任一項之TIL或經

擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基進一步包括濃度為約0.1 mM至約10 mM、0.5 mM至約9 mM、1 mM至約8 mM、2 mM至約7 mM、3 mM至約6 mM或4 mM至約5 mM的麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。

【請求項295】如請求項279至294中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基進一步包括濃度為約2 mM之麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。

【請求項296】如請求項279至295中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基進一步包括濃度為約5 mM至約150 mM、10 mM至約140 mM、15 mM至約130 mM、20 mM至約120 mM、25 mM至約110 mM、30 mM至約100 mM、35 mM至約95 mM、40 mM至約90 mM、45 mM至約85 mM、50 mM至約80 mM、55 mM至約75 mM、60 mM至約70 mM或約65 mM的2-巰基乙醇。

【請求項297】如請求項279至296中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基進一步包括濃度為約55 mM之2-巰基乙醇。

【請求項298】如請求項279至297中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基進一步包括國際PCT公開案第WO/1998/030679號中所描述之確定培養基。

【請求項299】如請求項279至298中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基包括約5至200 mg/L範圍內之甘胺酸、約5至250 mg/L範圍內之

L-組胺酸、約5至300 mg/L範圍內之L-異白胺酸、約5至200 mg/L範圍內之L-甲硫胺酸、約5至400 mg/L範圍內之L-苯丙胺酸、約1至1000 mg/L範圍內之L-脯胺酸、約1至45 mg/L範圍內之L-羥基脯胺酸、約1至250 mg/L範圍內之L-絲胺酸、約10至500 mg/L範圍內之L-蘇胺酸、約2至110mg/L範圍內之L-色胺酸、約3至175 mg/L範圍內之L-酪胺酸、約5至500 mg/L範圍內之L-纈胺酸、約1至20 mg/L範圍內之硫胺素、約1至20 mg/L範圍內之還原麩胱甘肽、約1至200 mg/L範圍內之L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、約1至50 mg/L範圍內之鐵飽和運鐵蛋白、約1至100 mg/L範圍內之胰島素、約0.000001至0.0001 mg/L範圍內之亞硒酸鈉及/或約5000至50,000 mg/L範圍內之白蛋白(例如AlbuMAX® I)。

【請求項300】如請求項279至299中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基包括非微量元素部分成分中之一或多者，其以本文提供之表4中標題「1X培養基中之濃度範圍」欄中列出之濃度範圍存在。

【請求項301】如請求項279至300中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基之滲透壓介於約260與350 mOsmol之間。

【請求項302】如請求項279至301中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基進一步包括約3.7 g/L或約2.2 g/L碳酸氫鈉。

【請求項303】如請求項279至302中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該確定培養基或無血清培養基進一步包括L-麩醯胺酸(最終濃度為約2 mM)、一種或多種抗生素、非必需胺基酸(NEAA；最終濃度為約100 μM)及/或2-巰基乙醇(最終濃度為約100 μM)。

【請求項304】如請求項279至303中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該第一及/或第二透氣容器中之該確定培養基或無血清培養基缺乏β-巰基乙醇(BME或βME；亦稱為2-巰基乙醇，CAS 60-24-2)。

【請求項305】如請求項279至304中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該細胞培養基包括CTS OpTmizer T細胞擴增SFM、3% CTS免疫細胞血清替代物、55 mM BME及視情況選用之麩醯胺酸。

【請求項306】如請求項279至305中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該細胞培養基包括補充有CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑(26 mL/L)及3% CTS™免疫細胞SR的CTS™OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基以及2 mM Glutamax，其視情況進一步包括6,000 IU/mL IL-2。

【請求項307】如請求項279至305中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該細胞培養基包括補充有CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑(26 mL/L)及3% CTS™免疫細胞SR的CTS™OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、2 mM Glutamax且視情況進一步包括3,000 IU/mL IL-2。

【請求項308】如請求項279至207中任一項之TIL或經

擴增TIL組成物，其中該TIL群體為治療性TIL群體。

【請求項309】如請求項279至308中任一項之TIL或經擴增TIL組成物，其中該治療性TIL群體展現血清IFN-γ之升高，其中IFN-γ之該升高大於200 pg/ml、大於250 pg/ml、大於300 pg/ml、大於350 pg/ml、大於400 pg/ml、大於450 pg/ml、大於500 pg/ml、大於550 pg/ml、大於600 pg/ml、大於650 pg/ml、大於700 pg/ml、大於750 pg/ml、大於800 pg/ml、大於850 pg/ml、大於900 pg/ml、大於950 pg/ml或大於1000 pg/ml。

【請求項310】一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包括：

(a)藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，或

藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)視情況將該等腫瘤碎片或碎解物添加至密閉系統中；

(c)藉由在包括IL-2、視情況選用之OKT-3及抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約5天至9天以獲得該第二TIL群體，其中該第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況

下發生；

(d)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充該第二TIL群體的該細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約1天至5天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)藉由將該第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將該第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中該第三擴增進行約4天至8天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f)收集獲自步驟(e)之該第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(e)至步驟(f)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(g)將來自步驟(g)之該經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(f)至(g)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【請求項311】一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其包括治療性浸潤淋巴球(TIL)群體，其中該TIL組成物係

藉由包括以下之方法產生：

(a)藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，或

藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)視情況將該等腫瘤碎片或該等腫瘤碎解物添加至密閉系統中；

(c)藉由在包括IL-2及抗原呈現細胞(APC)以及視情況選用之OKT-3的細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約5天至9天以獲得該第二TIL群體，其中該第一擴增或該初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充該第二TIL群體的該細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約1天至5天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)藉由將該第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將該第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器

中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中該第三擴增進行約4天至8天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f)收集獲自步驟(e)之該第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(e)至步驟(f)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(g)將來自步驟(g)之該經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(f)至(g)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【請求項312】如請求項311之TIL組成物，其中該TIL組成物為冷凍保存組成物，且其中該方法進一步包括(h)使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(g)之包括該經收集之TIL群體的該輸注袋。

【請求項313】一種用於治療患有癌症之個體之方法，該方法包括投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，其包括：

(a)藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，或

藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)視情況將該等腫瘤碎片或該等腫瘤碎解物添加至密

閉系統中；

(c)藉由在包括IL-2、視情況選用之OKT-3及抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約5天至9天以獲得該第二TIL群體，其中該第一擴增或該初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充該第二TIL群體的該細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約1天至5天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)藉由將該第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將該第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中該第三擴增進行約4天至8天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f)收集獲自步驟(e)之該第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(e)至步驟(f)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(g)將來自步驟(g)之該經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(f)至(g)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(h)向該個體投予治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體。

【請求項314】如請求項310至313之方法，其中該第一擴增或該初始第一擴增進行約6天至8天。

【請求項315】如請求項310至313之方法，其中該快速第二擴增進行約2天至4天。

【請求項316】如請求項310至313之方法，其中該第三擴增各進行約5天至7天。

【請求項317】如請求項310至313之方法，其中該第一擴增或初始第一擴增進行約7天，該快速第二擴增進行約3天，且該第三擴增進行約6天。

【請求項318】如請求項310至313之方法，其中步驟(c)至(e)係在約14天至18天內進行。

【請求項319】如請求項310至313之方法，其中步驟(c)至(e)係在約16天內進行。

【請求項320】如請求項310至313之方法，其中步驟(c)至(e)係在約18天或少於18天內進行。

【請求項321】如請求項310至313之方法，其中步驟

(c)至(e)係在約16天或少於16天內進行。

【請求項322】如請求項310至321中任一項之方法，其中步驟(e)包括將該第一複數個TIL亞群中之每個亞群以約2×10^6個細胞/平方公分之接種密度接種至提供第三透氣表面區域之分開的容器中。

【請求項323】如請求項313至322之方法，其中該癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。

【請求項324】如請求項323之方法，其中該癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【請求項325】如請求項323之方法，其中該癌症為黑色素瘤。

【請求項326】如請求項323之方法，其中該癌症為HNSCC。

【請求項327】如請求項323之方法，其中該癌症為子宮頸癌。

【請求項328】如請求項323之方法，其中該癌症為NSCLC。

【請求項329】如請求項323之方法，其中該癌症為神經膠母細胞瘤(包含GBM)。

【請求項330】如請求項323之方法，其中該癌症為胃腸癌。

【請求項331】如請求項323之方法，其中該癌症為高突變癌症。

【請求項332】如請求項323之方法，其中該癌症為小兒高突變癌症。

【請求項333】一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其包括：

(a)藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，或藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)視情況將該等腫瘤碎片或該等腫瘤碎解物添加至密閉系統中；

(c)藉由在包括IL-2及視情況選用之OKT-3以及抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增或該初始第一擴增進行約5天至9天以獲得該第二TIL群體，其中該第一擴增或該初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充該第二TIL群體的該細胞培養基來進行快速第二擴增，

從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約5天至9天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)藉由將該第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將該第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中該第三擴增進行約5天至9天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f)收集獲自步驟(f)之該第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(e)至步驟(f)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(g)將來自步驟(f)之該經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(f)至(g)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【請求項334】一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其包括治療性浸潤淋巴球(TIL)群體，其中該TIL組成物係藉由包括以下之方法產生：

(a)藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，或藉由將

獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)視情況將該等腫瘤碎片或該等腫瘤碎解物添加至密閉系統中；

(c)藉由在包括IL-2及視情況選用之OKT-3以及抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增或該初始第一擴增進行約5天至9天以獲得該第二TIL群體，其中該第一擴增或該初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充該第二TIL群體的該細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約5天至9天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)藉由將該第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將該第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中該第三擴增進行約5天至9天，其中視情況地，

每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f)收集獲自步驟(f)之該第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(e)至步驟(f)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(g)將來自步驟(f)之該經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(f)至(g)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【請求項335】如請求項334之TIL組成物，其中該TIL組成物為冷凍保存組成物，且其中該方法進一步包括(h)使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(g)之包括該經收集之TIL群體的該輸注袋。

【請求項336】一種用於治療患有癌症之個體之方法，該方法包括投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，其包括：

(a)藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，或藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物而獲得來自該患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b)視情況將該等腫瘤碎片或該等腫瘤碎解物添加至密閉系統中；

(c)藉由在包括IL-2及視情況選用之OKT-3以及抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第

一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增或該初始第一擴增進行約5天至9天以獲得該第二TIL群體，其中該第一擴增或該初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充該第二TIL群體的該細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約5天至9天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)藉由將該第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將該第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中該第三擴增進行約5天至9天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f)收集獲自步驟(f)之該第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(e)至步驟(f)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(g)將來自步驟(f)之該經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(f)至(g)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(h)向該個體投予治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體。

【請求項337】如請求項333至336之方法，其中在步驟(a)中，藉由以下將獲自該患者之該腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片：(i)冷凍保存該腫瘤樣本以產生冷凍保存之腫瘤樣本；(ii)解凍該冷凍保存之腫瘤樣本以產生解凍之腫瘤樣本；及(iii)將該解凍之腫瘤樣本碎斷成多個腫瘤碎片。

【請求項338】如請求項333至336之方法，其中在步驟(a)中，藉由以下將獲自該患者之該腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物：(i)冷凍保存該腫瘤樣本以產生冷凍保存之腫瘤樣本；(ii)解凍該冷凍保存之腫瘤樣本以產生解凍之腫瘤樣本；及(iii)碎解該解凍之腫瘤樣本以產生腫瘤碎解物。

【請求項339】如請求項333至336之方法，其中在步驟(a)中，藉由以下將獲自該患者之該腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物：(i)冷凍保存該腫瘤樣本以產生冷凍保存之腫瘤樣本；(ii)解凍該冷凍保存之腫瘤樣本以產生解凍之腫瘤樣本；(iii)將該解凍之腫瘤樣本碎斷成多個腫瘤碎片；及(iv)碎解該多個腫瘤碎片以產生腫瘤碎解物。

【請求項340】如請求項333至336中任一項之方法，其中步驟(e)包括將該第一複數個TIL亞群中之每個亞群以約2×10^6個細胞/平方公分之接種密度接種至提供第三透氣

表面區域之分開的容器中。

【請求項341】如請求項336至340之方法，其中該癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。

【請求項342】如請求項341之方法，其中該癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【請求項343】如請求項341之方法，其中該癌症為黑色素瘤。

【請求項344】如請求項341之方法，其中該癌症為HNSCC。

【請求項345】如請求項341之方法，其中該癌症為子宮頸癌。

【請求項346】如請求項341之方法，其中該癌症為NSCLC。

【請求項347】如請求項341之方法，其中該癌症為神經膠母細胞瘤(包含GBM)。

【請求項348】如請求項341之方法，其中該癌症為胃腸癌。

【請求項349】如請求項341之方法，其中該癌症為高突變癌症。

【請求項350】如請求項341之方法，其中該癌症為小兒高突變癌症。

【請求項351】一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其包括：

(a)藉由以下進行第一擴增或初始第一擴增從而產生第二TIL群體：(i)解凍包括來自個體所切除、在切除之後碎解以及在碎解之後冷凍保存的腫瘤的第一TIL群體的冷凍保存之腫瘤碎解物；及(ii)在包括IL-2及視情況選用之OKT-3以及抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養該第一TIL群體，其中該第一擴增或該初始第一擴增進行約5天至9天以獲得該第二TIL群體，其中該第一擴增或該初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域的密閉容器中進行；

(b)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充該第二TIL群體的該細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約5天至9天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(a)至步驟(b)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(c)藉由將該第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將該第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL

亞群，其中該第三擴增進行約5天至9天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)收集獲自步驟(c)之該第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(e)將來自步驟(d)之該經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(d)至(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【請求項352】一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其包括治療性浸潤淋巴球(TIL)群體，其中該TIL組成物係藉由包括以下之方法產生：

(a)藉由以下進行第一擴增或初始第一擴增從而產生第二TIL群體：(i)解凍包括來自個體所切除及在切除之後冷凍保存的腫瘤的第一TIL群體的冷凍保存之腫瘤碎解物；(ii)在包括IL-2及視情況選用之OKT-3以及抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養該第一TIL群體，其中該第一擴增或該初始第一擴增進行約5天至9天以獲得該第二TIL群體，其中該第一擴增或該初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域的密閉容器中進行；

(b)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充該第二TIL群體的該細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約5天至9天

以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(a)至步驟(b)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(c)藉由將該第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將該第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中該第三擴增進行約5天至9天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)收集獲自步驟(c)之該第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(e)將來自步驟(d)之該經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(d)至(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【請求項353】如請求項352之TIL組成物，其中該TIL組成物為冷凍保存組成物，且其中該方法進一步包括(f)使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(e)之包括該經收集之TIL群體的該輸注袋。

【請求項354】一種用於治療患有癌症之個體之方法，該方法包括投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，

其包括：

(a)藉由以下進行第一擴增或初始第一擴增從而產生第二TIL群體：(i)解凍包括來自個體所切除、在切除之後碎解以及在碎解之後冷凍保存的腫瘤的第一TIL群體的冷凍保存之腫瘤碎解物；及(ii)在包括IL-2及視情況選用之OKT-3以及抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養該第一TIL群體，其中該第一擴增或該初始第一擴增進行約5天至9天以獲得該第二TIL群體，其中該第一擴增或該初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域的密閉容器中進行；

(b)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充該第二TIL群體的該細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約5天至9天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(a)至步驟(b)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(c)藉由將該第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將該第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中該第三擴增進行約5天至9天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)

的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)收集獲自步驟(c)之該第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至步驟(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)將來自步驟(d)的該經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(d)至(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；(f)向該個體投予治療有效劑量的來自步驟(e)中之該輸注袋的該經收集之TIL群體。

【請求項355】如請求項351至354之方法，其中步驟(a)(i)包括解凍包括來自個體所切除且在切除之後冷凍保存的腫瘤的第一TIL群體的冷凍保存之腫瘤以產生解凍之腫瘤，及將解凍之腫瘤碎斷成多個腫瘤碎片，且其中步驟(a)(ii)包括培養包括該第一TIL群體之該多個腫瘤碎片。

【請求項356】如請求項351至355中任一項之方法，其中步驟(c)包括將該第一複數個TIL亞群中之每個亞群以約2×10^6個細胞/平方公分之接種密度接種至提供第三透氣表面區域之分開的容器中。

【請求項357】如請求項351至356中任一項之方法，其中該第一擴增或初始第一擴增進行約6天至8天。

【請求項358】如請求項351至356中任一項之方法，其中該快速第二擴增進行約6天至8天。

【請求項359】如請求項351至356中任一項之方法，其中該第三擴增進行約6天至8天。

【請求項360】如請求項351至356中任一項之方法，其中該第一擴增或初始第一擴增、該快速第二擴增及該第三擴增係在約18天至24天內進行。

【請求項361】如請求項351至356中任一項之方法，其中該第一擴增或初始第一擴增、該快速第二擴增及該第三擴增係在約20天至22天內進行。

【請求項362】如請求項351至356中任一項之方法，其中該第一擴增或初始第一擴增、該快速第二擴增及該第三擴增係在約21天內進行。

【請求項363】如請求項351至356中任一項之方法，其中該第一擴增或初始第一擴增、該快速第二擴增及該第三擴增係在約24天或少於24天內進行。

【請求項364】如請求項351至356中任一項之方法，其中該第一擴增或初始第一擴增、該快速第二擴增及該第三擴增係在約22天或少於22天內進行。

【請求項365】如請求項351至356中任一項之方法，其中該第一擴增或初始第一擴增、該快速第二擴增及該第三擴增係在約21天或少於21天內進行。

【請求項366】如請求項354至365之方法，其中該癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。

【請求項367】如請求項366之方法，其中該癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【請求項368】如請求項366之方法，其中該癌症為黑色素瘤。

【請求項369】如請求項366之方法，其中該癌症為HNSCC。

【請求項370】如請求項366之方法，其中該癌症為子宮頸癌。

【請求項371】如請求項366之方法，其中該癌症為NSCLC。

【請求項372】如請求項366之方法，其中該癌症為神經膠母細胞瘤(包含GBM)。

【請求項373】如請求項366之方法，其中該癌症為胃腸癌。

【請求項374】如請求項366之方法，其中該癌症為高突變癌症。

【請求項375】如請求項366之方法，其中該癌症為小兒高突變癌症。

【請求項376】一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其包括：

(a)藉由在包括IL-2及視情況選用之OKT-3以及抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養包括來自患者所切除之腫瘤的第一TIL群體的腫瘤樣本來進行第一擴增或初始第

一擴增，從而產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約5天至9天以獲得該第二TIL群體，其中該第一擴增或初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行；

(b)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充該第二TIL群體的該細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約1天至5天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(a)至步驟(b)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(c)藉由將該第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將該第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中該第三擴增進行約4天至8天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)收集獲自步驟(c)之該第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(e)將來自步驟(d)之該經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟

(d)至(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【請求項377】一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其包括治療性浸潤淋巴球(TIL)群體，其中該TIL組成物係藉由包括以下之方法產生：

(a)藉由在包括IL-2及視情況選用之OKT-3以及抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養包括來自患者所切除之腫瘤的第一TIL群體的腫瘤樣本來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約5天至9天以獲得該第二TIL群體，其中該第一擴增或該初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行；

(b)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充該第二TIL群體的該細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約1天至5天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(a)至步驟(b)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(c)藉由將該第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將該第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中該第三擴增進行約4天至8天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且

其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)收集獲自步驟(c)之該第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(e)將來自步驟(d)之該經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(d)至(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【請求項378】如請求項377之TIL組成物，其中該TIL組成物為冷凍保存組成物，且其中該方法進一步包括(f)使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(e)之包括該經收集之TIL群體的該輸注袋。

【請求項379】一種用於治療患有癌症之個體之方法，該方法包括投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，其包括：

(a)藉由在包括IL-2及視情況選用之OKT-3以及抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養包括來自患者所切除之腫瘤的第一TIL群體的腫瘤樣本來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約5天至9天以獲得該第二TIL群體，其中該第一擴增或該初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行；

(b)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充該第二TIL群體的該細胞培養基來進行快速第二擴增，

從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約1天至5天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(a)至步驟(b)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(c)藉由將該第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將該第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中該第三擴增進行約4天至8天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)收集獲自步驟(c)之該第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)將來自步驟(d)之該經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(d)至(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(f)向該個體投予治療有效劑量之來自步驟(e)中之該輸注袋的該第三TIL群體。

【請求項380】如請求項376至379之方法，其中在步驟(a)中之培養之前，將該腫瘤樣本碎斷成包括該第一TIL群體的多個腫瘤碎片。

【請求項381】如請求項376至379之方法，其中在步驟(a)中之培養之前，碎解該腫瘤樣本以產生包括該第一TIL群體的腫瘤碎解物。

【請求項382】如請求項376至381中任一項之方法，其中該第一擴增或初始第一擴增進行約6天至8天。

【請求項383】如請求項376至381中任一項之方法，其中該快速第二擴增進行約2天至4天。

【請求項384】如請求項376至381中任一項之方法，其中該第三擴增各進行約5天至7天。

【請求項385】如請求項376至381中任一項之方法，其中該第一擴增或初始第一擴增進行約7天，該快速第二擴增進行約3天，且該第三擴增進行約6天。

【請求項386】如請求項376至381中任一項之方法，其中步驟(a)至(c)係在約14天至18天內進行。

【請求項387】如請求項376至381中任一項之方法，其中步驟(a)至(c)係在約16天內進行。

【請求項388】如請求項376至381中任一項之方法，其中步驟(a)至(c)係在約18天或少於18天內進行。

【請求項389】如請求項376至381中任一項之方法，其中步驟(a)至(c)係在約16天或少於16天內進行。

【請求項390】如請求項376至381中任一項之方法，其中步驟(c)包括將該第一複數個TIL亞群中之每個亞群以約2×10^6個細胞/平方公分之接種密度接種至提供第三透氣表面區域之分開的容器中。

【請求項391】如請求項379至390之方法，其中該癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。

【請求項392】如請求項391之方法，其中該癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【請求項393】如請求項391之方法，其中該癌症為黑色素瘤。

【請求項394】如請求項391之方法，其中該癌症為HNSCC。

【請求項395】如請求項391之方法，其中該癌症為子宮頸癌。

【請求項396】如請求項391之方法，其中該癌症為NSCLC。

【請求項397】如請求項391之方法，其中該癌症為神經膠母細胞瘤(包含GBM)。

【請求項398】如請求項391之方法，其中該癌症為胃腸癌。

【請求項399】如請求項391之方法，其中該癌症為高突變癌症。

【請求項400】如請求項391之方法，其中該癌症為小

兒高突變癌症。

【請求項401】一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其包括：

(a)藉由在包括IL-2及視情況選用之OKT-3以及抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養包括來自患者所切除之腫瘤的第一TIL群體的腫瘤樣本來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約5天至9天以獲得該第二TIL群體，其中該第一擴增或該初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行；

(b)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充該第二TIL群體的該細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約5天至9天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(a)至步驟(b)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(c)藉由將該第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將該第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中該第三擴增進行約5天至9天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)

的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)收集獲自步驟(f)之該第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(e)將來自步驟(d)之該經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(d)至(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【請求項402】一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組成物，其包括治療性浸潤淋巴球(TIL)群體，其中該TIL組成物係藉由包括以下之方法產生：

(a)藉由在包括IL-2及視情況選用之OKT-3以及抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養包括來自患者所切除之腫瘤的第一TIL群體的腫瘤樣本來進行第一擴增或初始第一擴增，從而產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約5天至9天以獲得該第二TIL群體，其中該第一擴增或該初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行；

(b)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充該第二TIL群體的該細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約5天至9天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(a)至步驟(b)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(c)藉由將該第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將該第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中該第三擴增進行約5天至9天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)收集獲自步驟(f)之該第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(e)將來自步驟(d)之該經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟(d)至(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生。

【請求項403】如請求項402之方法，其中該TIL組成物為冷凍保存組成物，且其中該方法進一步包括(f)使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(e)之包括該經收集之TIL群體的該輸注袋。

【請求項404】一種用於治療患有癌症之個體之方法，該方法包括投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，其包括：

(a)藉由在包括IL-2及視情況選用之OKT-3以及抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養包括來自患者所切除之腫瘤的第一TIL群體的腫瘤樣本來進行第一擴增或初始第

一擴增，從而產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約5天至9天以獲得該第二TIL群體，其中該第一擴增或該初始第一擴增係視情況在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行；

(b)藉由用另外的IL-2、視情況選用之OKT-3及APC補充該第二TIL群體的該細胞培養基來進行快速第二擴增，從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約5天至9天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係視情況在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(a)至步驟(b)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(c)藉由將該第三TIL群體分成第一複數個TIL亞群，將該第一複數個TIL亞群中的每個亞群接種至分開的容器中，添加補充有IL-2及視情況選用之OKT-3的細胞培養基以及進行培養來進行第三擴增，從而產生第二複數個TIL亞群，其中該第三擴增進行約5天至9天，其中視情況地，每個分開的容器為提供第三透氣表面區域之密閉容器，且其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d)收集獲自步驟(f)之該第二複數個TIL亞群，其中當視情況在密閉系統中進行時，自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e)將來自步驟(d)之該經收集之TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋，其中當視情況在密閉系統中進行時，步驟

(d)至(e)的轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(f)向該個體投予治療有效劑量之來自步驟(e)中之該輸注袋的該第三TIL群體。

【請求項405】如請求項401至404之方法，其中在步驟(a)中之培養之前，將該腫瘤樣本碎斷成包括該第一TIL群體的多個腫瘤碎片。

【請求項406】如請求項401至404之方法，其中在步驟(a)中之培養之前，碎解該腫瘤樣本以產生包括該第一TIL群體的腫瘤碎解物。

【請求項407】如請求項401至406中任一項之方法，其中該第一擴增或初始第一擴增進行約6天至8天。

【請求項408】如請求項401至406中任一項之方法，其中該快速第二擴增進行約6天至8天。

【請求項409】如請求項401至406中任一項之方法，其中該第三擴增進行約6天至8天。

【請求項410】如請求項401至406中任一項之方法，其中該第一擴增或初始第一擴增、該快速第二擴增及該第三擴增係在約18天至24天內進行。

【請求項411】如請求項401至406中任一項之方法，其中該第一擴增或初始第一擴增、該快速第二擴增及該第三擴增係在約20天至22天內進行。

【請求項412】如請求項401至406中任一項之方法，其中該第一擴增或初始第一擴增、該快速第二擴增及該第三擴增係在約21天內進行。

【請求項413】如請求項401至406中任一項之方法，其中該第一擴增或初始第一擴增、該快速第二擴增及該第三擴增係在約24天或少於24天內進行。

【請求項414】如請求項401至406中任一項之方法，其中該第一擴增或初始第一擴增、該快速第二擴增及該第三擴增係在約22天或少於22天內進行。

【請求項415】如請求項401至406中任一項之方法，其中該第一擴增或初始第一擴增、該快速第二擴增及該第三擴增係在約21天或少於21天內進行。

【請求項416】如請求項401至406中任一項之方法，其中步驟(c)包括將該第一複數個TIL亞群中之每個亞群以約2×10^6個細胞/平方公分之接種密度接種至提供第三透氣表面區域之分開的容器中。

【請求項417】如請求項404至416之方法，其中該癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。

【請求項418】如請求項417之方法，其中該癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【請求項419】如請求項417之方法，其中該癌症為黑色素瘤。

【請求項420】如請求項417之方法，其中該癌症為HNSCC。

【請求項421】如請求項417之方法，其中該癌症為子宮頸癌。

【請求項422】如請求項417之方法，其中該癌症為NSCLC。

【請求項423】如請求項417之方法，其中該癌症為神經膠母細胞瘤(包含GBM)。

【請求項424】如請求項417之方法，其中該癌症為胃腸癌。

【請求項425】如請求項417之方法，其中該癌症為高突變癌症。

【請求項426】如請求項417之方法，其中該癌症為小兒高突變癌症。

[發明圖式]

滿程式2A：『自步驟A至E約22天

步驟A

獲得患者腫瘤樣本

（視情況可在步驟B之前冷凍；

腫瘤樣本視情況可為細針小活體組織切片）

步驟B

第一擴增

（物理碎斷成至少40個碎片/容器，

生長約3天至14天，培養基包括IL-2）

步驟C

第一擴增至第二擴增之轉變

（步驟B TIL視情況在步驟B的

第11天直接移至步驟D）

步驟D

第二擴增

（TIL於密閉容器中生長於包括IL-2、

OKT-3及抗原呈現飼養細胞之生長培養基中）

步驟E

收集來自步驟D之TIL

（經由密閉系統收集TIL）

步驟F

最終調配及分成轉移至輸注袋

（視情況冷凍保存）

滿程式GEN 3：『自步驟A至E約14天至18天

步驟A

獲得患者腫瘤樣本

（視情況可在步驟B之前冷凍）

步驟B

初始第一擴增

（物理碎斷成至多60個碎片/容器，

生長約11天至18天，培養基包括IL-2、OKT-3及視情況

選用之抗原呈現飼養細胞）

步驟C

初始第一擴增至快速第二擴增之轉變

（步驟B TIL在第18天直接移至步驟D）

步驟D

快速第二擴增

（TIL生長於包括IL-2、OKT-3及2X抗原

呈現飼養細胞之生長培養基中，第10天至

第11天規模縮小擴大且添加另外的IL-2）

步驟E

收集來自步驟D之TIL

步驟F

最終調配及分成轉移至輸注袋

（視情況冷凍保存）

[圖 1A]

實施例GEN 3：『1步驟A至1約14天至18天

步驟A

獲得健者細胞樣本

（視情況可在步驟B之前冷凍）

步驟B

初始第一擴增

（物理碎斷成至多60個碎片/容器，

生長約1天至7/8天，培養基包括IL-2、OKT-3及

視情況選用之抗原呈現飼養細胞）

步驟C

初始第一擴增至快速第二擴增之轉變

（步驟B TIL在第7/8天直接移至步驟D）

步驟D

快速第二擴增

（TIL在生長於包括IL-2、OKT-3及2X抗原呈現飼養細胞

之生長培養基中，第10天至第11天規模縮小擴大

且添加另外的IL-2）

步驟E

收集來自步驟D之TIL

步驟F

最終調配及入或轉移至輸注袋

（視情況冷凍保存）

|(圖 1B)|

實施例GEN 3.0： 『自步驟A至E約14天至18天	實施例GEN 3.1對照： 『自步驟A至E約14天至18天	實施例GEN 3.1測試/F： 『自步驟A至E約14天至18天
步驟A 獲得患者腫瘤樣本 （視情況可在步驟B之前冷凍）	步驟A 獲得患者腫瘤樣本 （視情況可在步驟B之前冷凍）	步驟A 獲得患者腫瘤樣本 （視情況可在步驟B之前冷凍）
步驟B 初始第一擴增 （物理碎斷成至多60個碎片/容器，生長約11天至18天，培養基包含IL-2）	步驟B 初始第一擴增 （物理碎斷成至多60個碎片/容器，生長約11天至18天，培養基包含IL-2及OKT-3）	步驟B 初始第一擴增 （物理碎斷成至多60個碎片/容器，生長約11天至18天，培養基包含IL-2、OKT-3及抗原呈現擴養細胞）
步驟C 初始第一擴增至快速第二擴增之轉變 （步驟B TIL在第11至18天直接移至步驟D）	步驟C 初始第一擴增至快速第二擴增之轉變 （步驟B TIL在第11至18天直接移至步驟D）	步驟C 初始第一擴增至快速第二擴增之轉變 （步驟B TIL在第11至18天直接移至步驟D）
步驟D 快速第二擴增 （TIL在生長於包含IL-2、OKT-3及抗原呈現擴養細胞之生長培養基中，第10天至第11天規模縮向擴大且添加另外的IL-2）	步驟D 快速第二擴增 （TIL在生長於包含IL-2、OKT-3及2X抗原呈現擴養細胞之生長培養基中，第10天至第11天規模縮向擴大且添加另外的IL-2）	步驟D 快速第二擴增 （TIL在生長於包含IL-2、OKT-3及2X抗原呈現擴養細胞之生長培養基中，第10天至第11天規模縮向擴大且添加另外的IL-2）
步驟E 收集來自步驟D之TIL	步驟E 收集來自步驟D之TIL	步驟E 收集來自步驟D之TIL
步驟F 最終調配及/或轉移至輸注袋 （視情況冷凍保存）	步驟F 最終調配及/或轉移至輸注袋 （視情況冷凍保存）	步驟F 最終調配及/或轉移至輸注袋 （視情況冷凍保存）

圖 1C

經修改的Gen 2製程：自步驟A至D約22天

步驟A

獲得患者腫瘤樣本

（視情況可在步驟B之前冷凍；腫瘤樣本

視情況可為粗針小活體組織切片）

步驟B1

初始培養物

物理碎斷成每容器至多60個腫瘤碎片或至多10個粗針小活體

組織切片，TIL在IL-2之生長培養基中生長3天

步驟B2

初始第一擴增

TIL在IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞

之生長培養基中生長8天

步驟C

初始第一擴增至快速第二擴增之轉變

（步驟B TIL在第11天自接移至步驟D）

步驟D

快速第二擴增

（體積減少；TIL在生長於IL-2、OKT-3及50X抗原呈現飼養細胞之

生長培養基中，第16天規模縮小擴大且添加另外的IL-2）

步驟E

收集來自步驟D之TIL

步驟F

最終調配及灌裝移至輸注袋

（視情況冷凍保存）

|（圖 1D）|

第二代Gen 3流程（A）：自步驟A至少約14天至18天

步驟A

獲得患者腫瘤樣本

（視情況可在步驟B之前冷凍）

步驟B

初始第一擴增

（物理碎斷成至多60個碎片/容器，

生長約1天至7/8天，培養基IL-2及獨自抗原

呈現細胞（APC）之培養物的培養物上清液）

步驟C

初始第一擴增至快速第二擴增之轉變

（步驟B TIL在第7/8天直接移至步驟D）

步驟D

快速第二擴增

（TIL生長於IL-2、OKT-3及APC之生長培養基中，

第10天至第11天規模縱向擴大且添加另外的IL-2）

步驟E

收集來自步驟D之TIL

步驟F

最終調配及灌裝轉移至輸注袋

（視情況冷凍保存）

|（圖 1E）|

第二代GEN 3製程（B）：自步驟A至D約14天至18天

步驟A

獲得患者腫瘤樣本

（視情況可在步驟B之前冷凍）

步驟B

初始第一擴增

（物理性斷成至多60個碎片/容器，生長約1天至7/8天，

培養基包括IL-2、OKT-3及APC）

步驟C

初始第一擴增至快速第二擴增之轉變

（步驟B TIL在第7/8天直接移至步驟D）

步驟D

快速第二擴增

（TIL生長於包括IL-2及獲自APC之培養物的培養物上

清液的生長培養基中，第10天至第11天規模能夠擴大且添加另外的IL-2）

步驟E

收集來自步驟D之TIL

步驟F

最終製劑及/或轉移至輸注袋

（視情況冷凍保存）

圖 1E

第二代GEN 3擴增（C）：自步驟A約14天至18天

步驟A

獲得患者腫瘤樣本

（視情況可在步驟B之前冷凍）

步驟B

初始第一擴增

（物理碎斷成至多60個碎片/容器，

生長約1天至7/8天，培養具白血球IL-2及獲自APC之

培養物的培養物上清液）

步驟C

初始第一擴增至快速第二擴增之轉變

（步驟B TIL在第7/8天自接移至步驟D）

步驟D

快速第二擴增

（TIL生長於白血球IL-2及獲自APC之培養物的培養物上清液的

生長培養基中，第10天至第11天規模縮向擴大且添加另外的IL-2）

步驟E

收集來自步驟D之TIL

步驟F

最終調配及分裝轉移至輸注袋

（視情況冷凍保存）

圖 1G

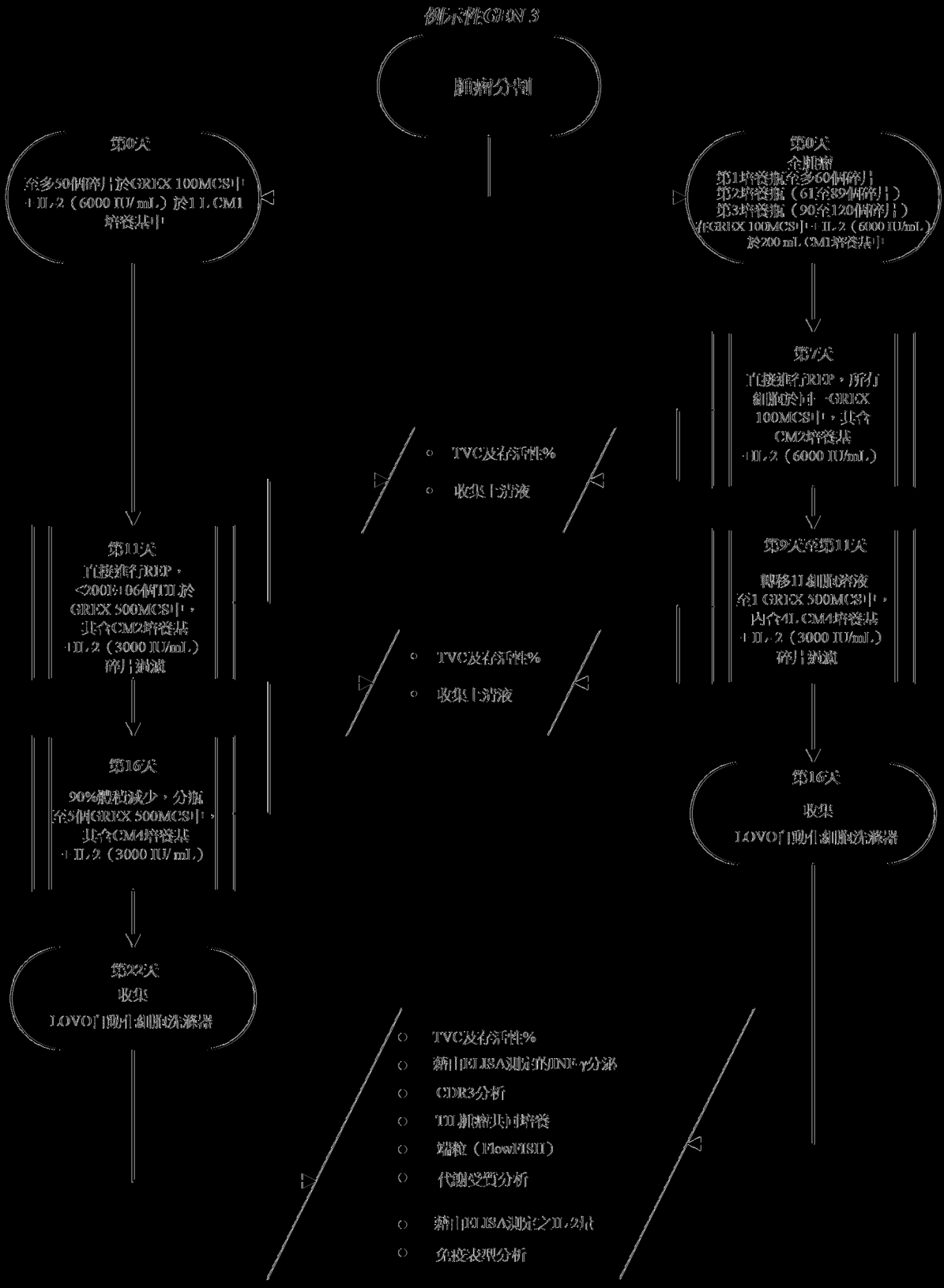

健康者CD8+ T
離心分割
第0天
全多50個冷凍管於GRCX 100MCS中，+IL-2（6000 IU/mL）於1 L CM1培養基中
第0天
全排崩
第1培養瓶(全多60個冷凍管)
第2培養瓶（61全89個冷凍管）
第3培養瓶（90全120個冷凍管）
於GRCX 100MCS中+IL-2（6000 IU/mL）於200 mL CM1培養基中
第7天
直接離心RDP，所有細胞於中，GRCX 100MCS中，其含CM2培養基+IL-2（6000 IU/mL）
TVC及存活性%
收集上清液
第9天至第11天
轉移1L細胞培養液至1 GRCX 500MCS中，內含4L CM4培養基+IL-2（3000 IU/mL）
第11天
直接離心RDP，<200×10^6個TIL於GRCX 500MCS中，其含CM2培養基+IL-2（3000 IU/mL）
第16天
收集
LOVO自動化細胞洗滌器
第16天
90%體積減少，分瓶至5個GRCX 500MCS中，其含CM4培養基+IL-2（3000 IU/mL）
第22天
收集
LOVO自動化細胞洗滌器
TVC及存活性%
藉由ELISA測定的IFN-γ分泌
CDR3分析
TIL擴增共同培養
端粒（Flow FISH）
代謝受質分析
藉由ELISA測定之IL-2分泌
免疫表型分析

圖 2)

圖 3

圖 3

圖 5

圖(6)

第0天
◦使用正向或負向選擇方法（亦即使用T細胞標誌（CD2、CD3等）來移除T細胞，或移除其他細胞從而留下T細胞）或梯度離心自富集淋巴球之血球分離產物、全血或（新鮮或經解凍）腫瘤碎解物分離T細胞級份（CD3+、CD45+）
◦
◦藉由根據Gen 3過程接種約1×10^6個細胞/培養瓶來進入Gen 3.1過程
第7天
◦根據Gen 3擴增
第9天至第11天
◦根據Gen 3擴增並收集
第12天至第16天
◦根據Gen 3收集

（圖 7）

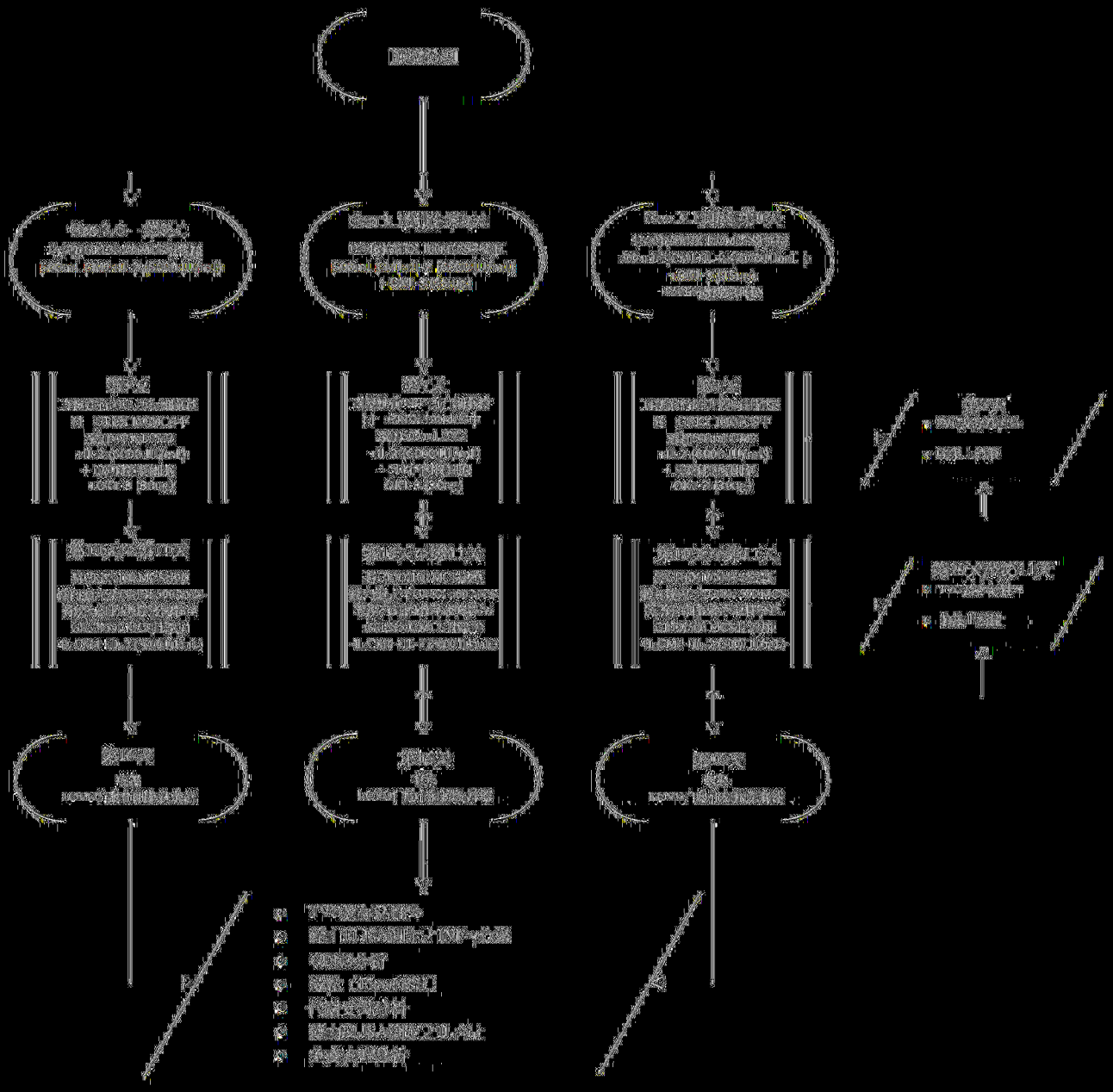


圖 8

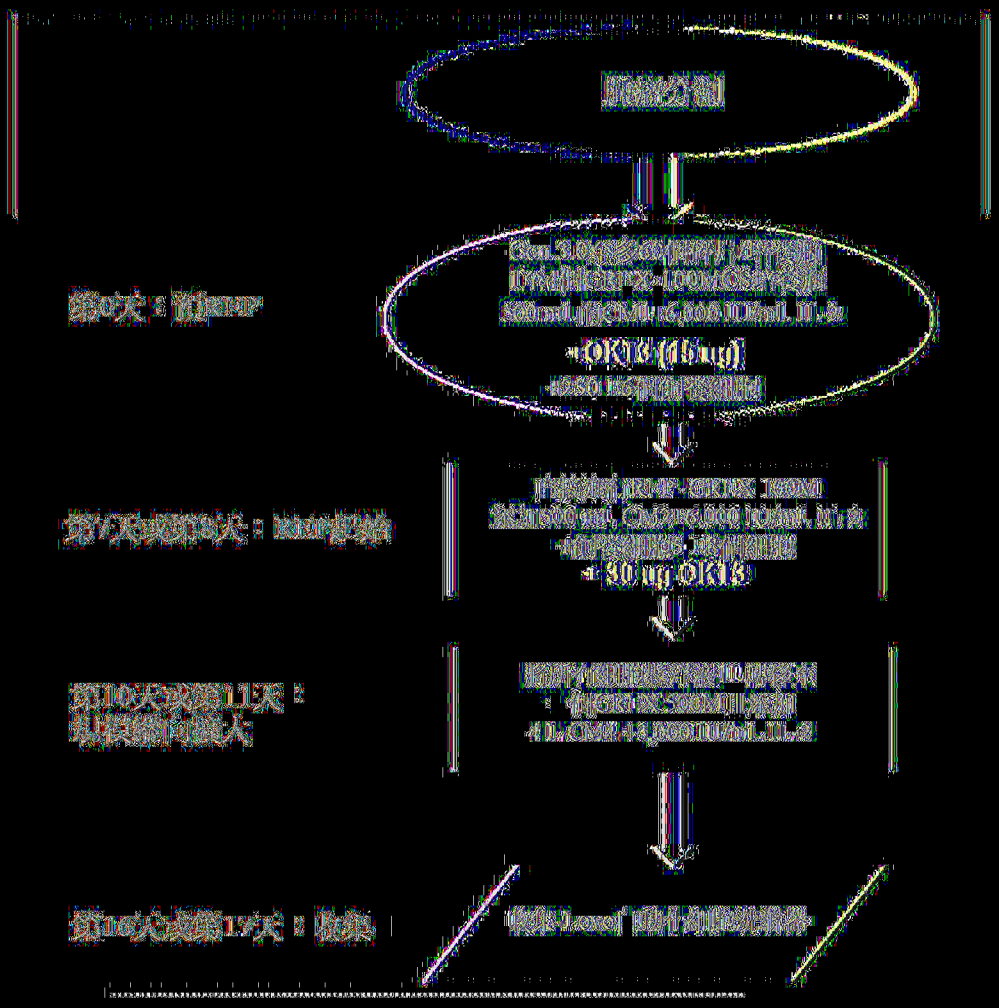
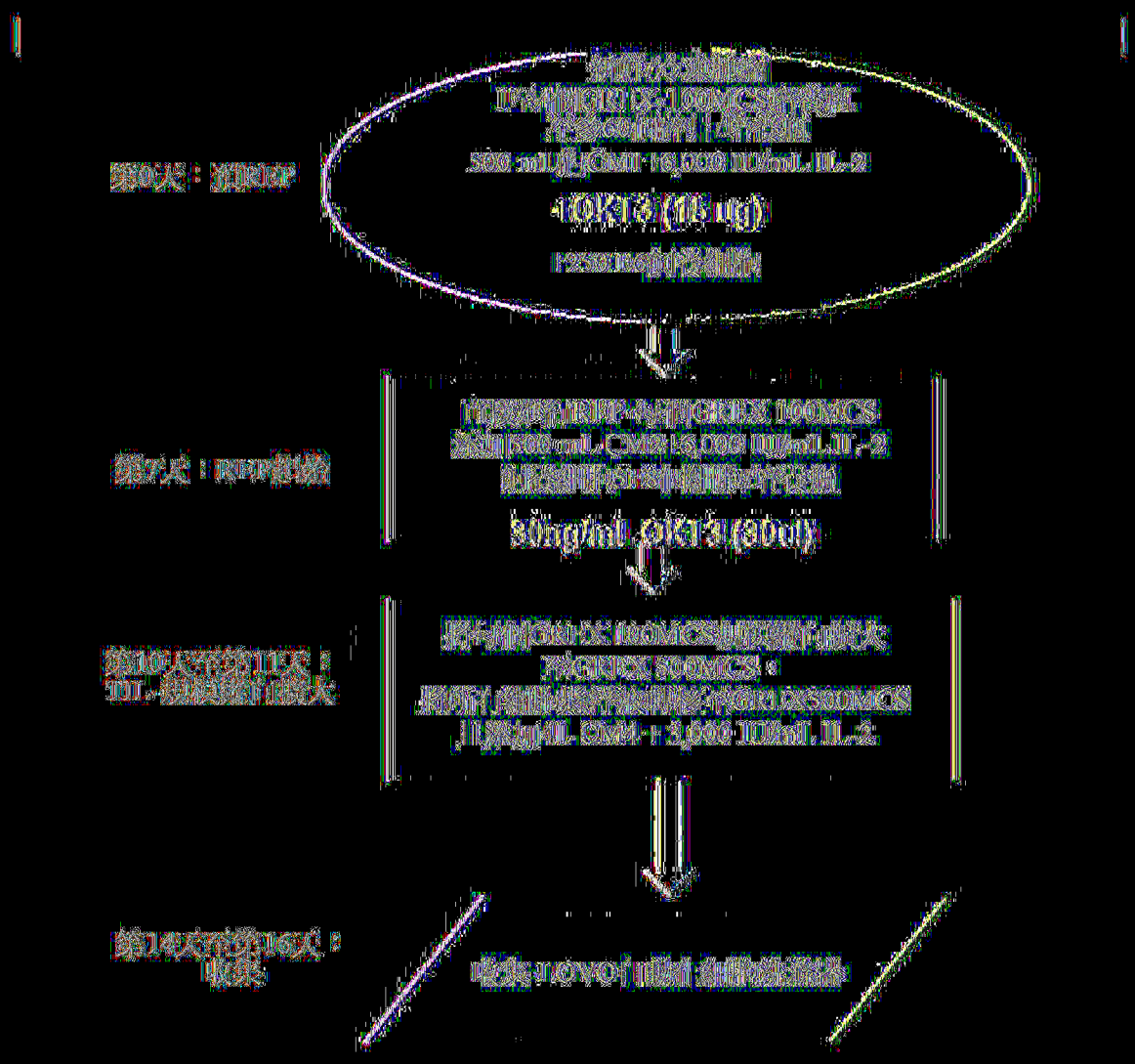


圖 9

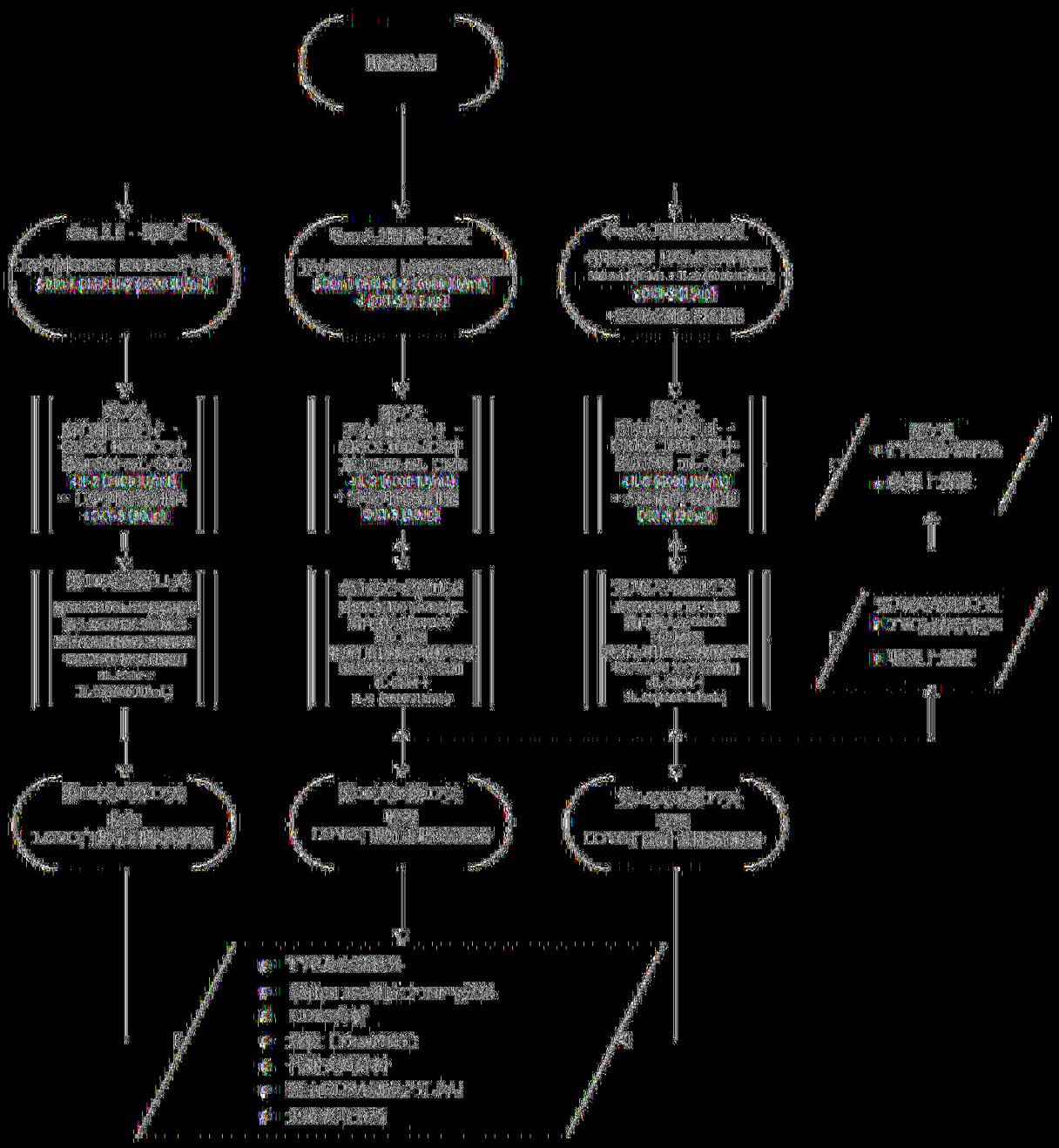
圖3


第0天：第1代T
10K T3 (0.5 ug)
第7天：RPF培養
80ng/ml 0K T3 (80ul)
第10天~第13天：
第14天~第16天：
收集

(圖 12)

(圖3A)

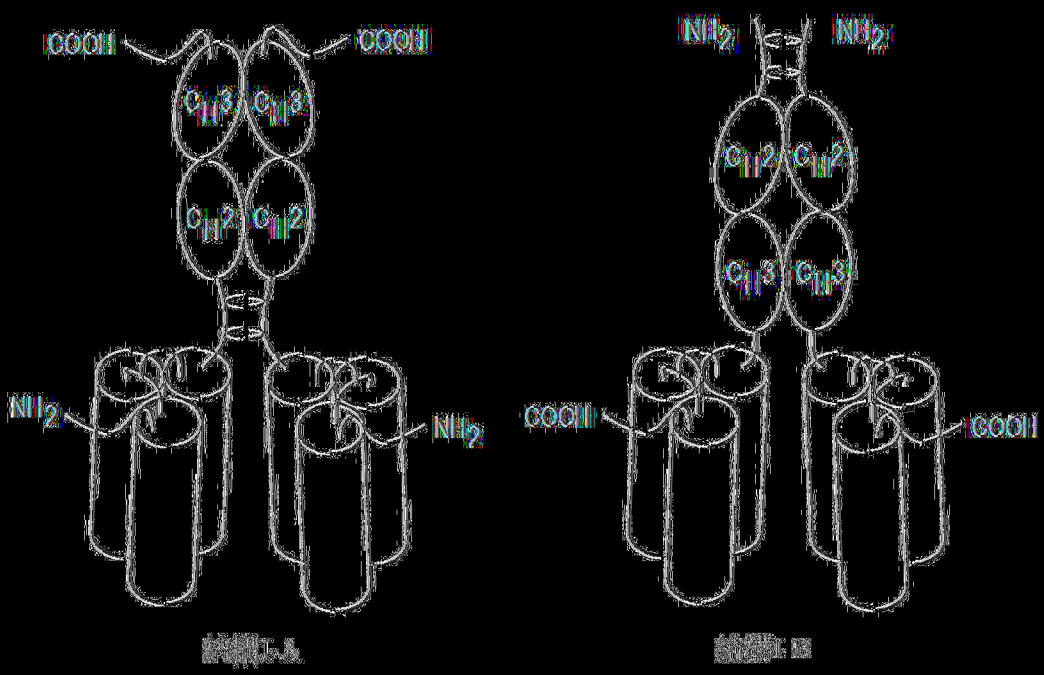
圖 3B



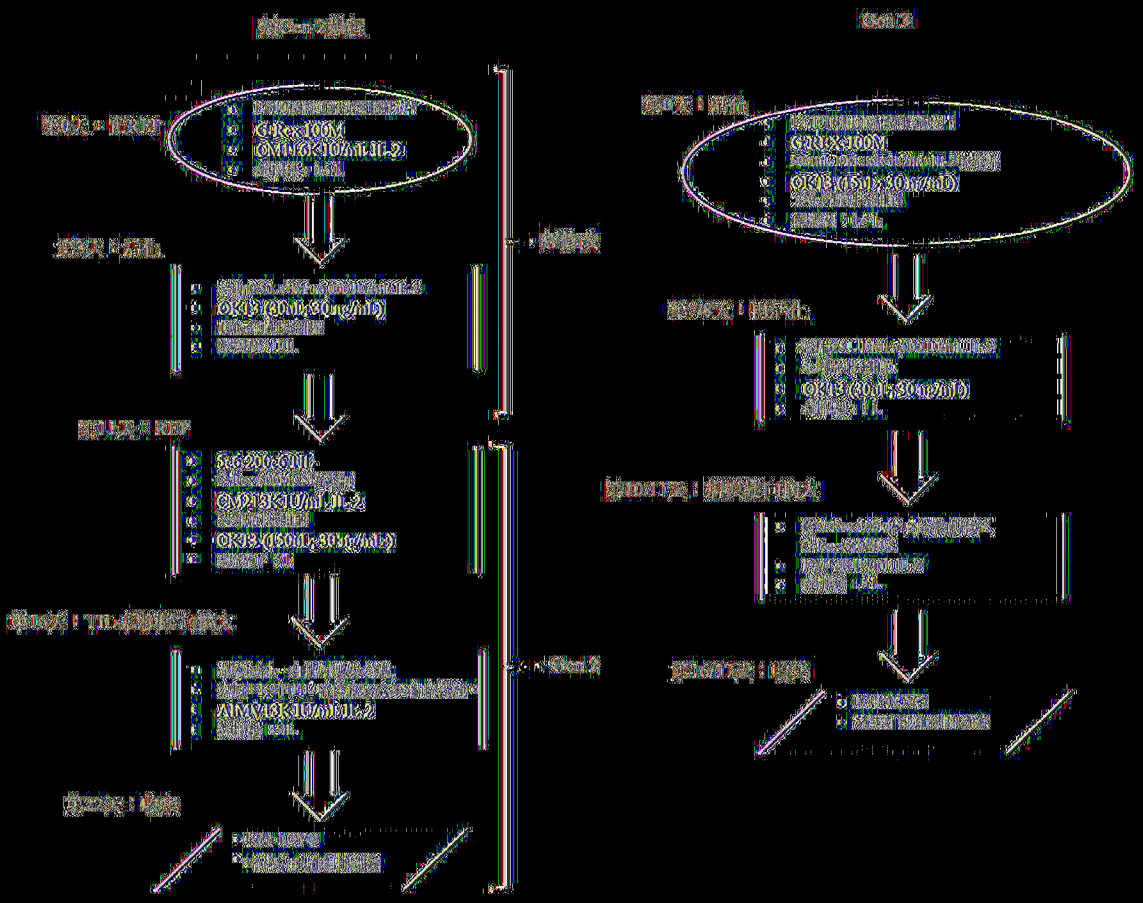
[圖 15]

步驟	培養第0至2天之細胞。
第0天 腫瘤浸潤淋巴球的	培養基 細胞數目 細胞存活率 IL-2 (6000IU/ml) 2.5x10^8 腫瘤浸潤淋巴球的培養瓶 15mg OK-432培養瓶
第3至第5天 不添加	細胞數目、細胞存活率 培養基體積計算 3x10^8 腫瘤浸潤淋巴球 20 mg OK-432培養瓶 G-Rex 100MCS 添加500mL培養基+IL-2 (6000IU/mL)
第6天至第11天 規模縱向擴大或 TIL繼代培養	培養基 RPMI 1640 腫瘤浸潤淋巴球的培養瓶 + 含IL-2 (6000 IU/mL) G-Rex 100MCS 轉移至GREX 300MCS 且添加IL-2培養基+IL-2（3000 IU/mL）/培養瓶
第16天至第17天 收集	收集 LOVO-自動化細胞洗滌器 基於Plasmalyte 1% HSA: CS10冷凍保存

(時 16)



(圖 17)



(圖 18)

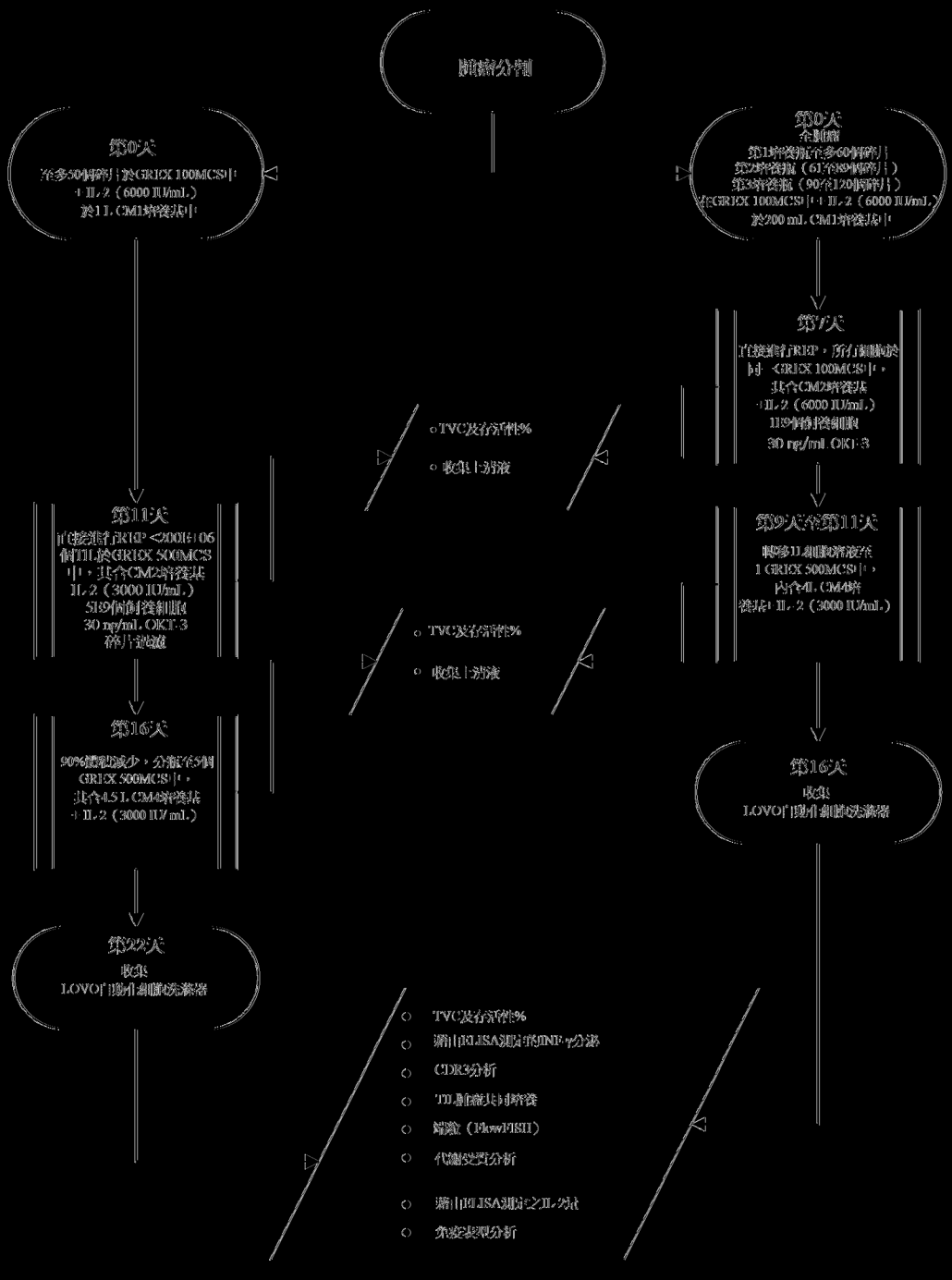

腫瘤分割
第0天
至多50個粉碎於GREX 100MCS中
+ IL-2（6000 IU/mL）
於1 L CM1培養基中
第0天
全腫瘤
第1培養瓶至多60個粉碎
第2培養瓶（61至90個粉碎）
第3培養瓶（90至120個粉碎）
於GREX 100MCS中+ IL-2（6000 IU/mL）
於200 mL CM1培養基中
第7天
自接種於REP，所有細胞於
時 GREX 100MCS中，
其含CM2培養基
+IL-2（6000 IU/mL）
以9個抗體細胞
30 ng/mL OKT-3
第9天至第11天
將多IL細胞培養至
1 GREX 500MCS中，
內含4L CM4培
養基+ IL-2（3000 IU/mL）
第11天
自接種於REP <200億個
倒IL於GREX 500MCS
中，其含CM2培養基
IL-2（3000 IU/mL）
5E9個細胞細胞
30 ng/mL OKT-3
粹片培養
第16天
90%體積減少，分瓶至4個
GREX 500MCS中，
其含4.5 L CM4培養基
+ IL-2（3000 IU/mL）
第16天
收集
LOVO門閉仁細胞洗滌器
第22天
收集
LOVO門閉仁細胞洗滌器
TVC及存活性%
收集上清液
TVC及存活性%
收集上清液
TVC及存活性%
藉由ELISA測定IFNγ分泌
CDR3分析
TIL細胞共同培養
殺滅（HowFISH）
代謝型態分析
藉由ELISA測定之IL-2分泌
表型表現分析

圖 19

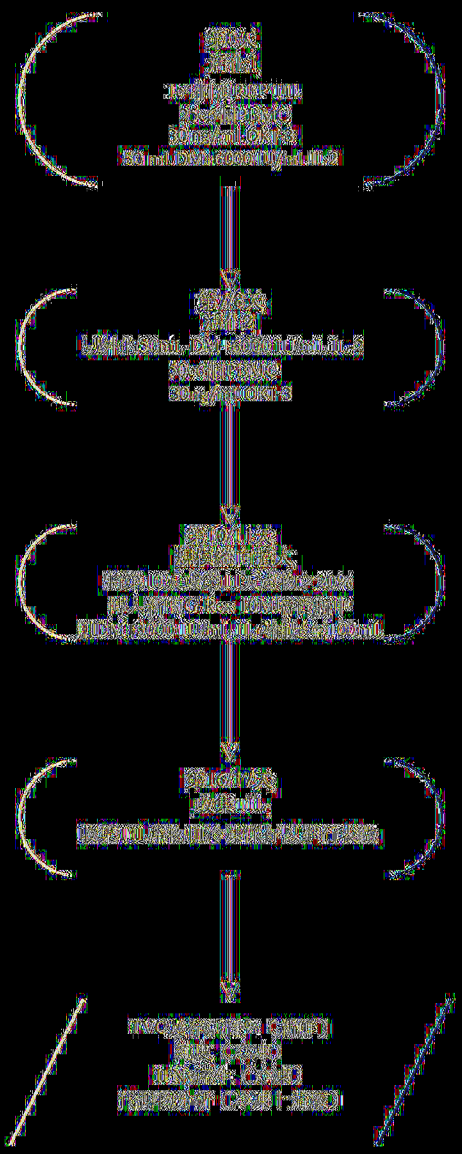


圖 20

選擇天數	Gen 3.0當前選擇	在第 0 天 Gen 3.0 +飼養細胞溫成物	在第 7/8 天 Gen 3.0 +飼養細胞溫成物	在第 0 天及第 7/8 天 Gen 3.0 +飼養細胞溫成物	飼養細胞培養瓶#1	飼養細胞培養瓶#2
第 3 天	NA	NA	NA	NA	在 GREX 100 培養瓶中於含 DM1 培養基+IL-2 (6000IU/mL)+OKT3 30ng/mL 的總體積 1L 之培養基中培養 500e6 個飼養細胞	NA
第 0 天	4 個碎片 IL-2 (6e3IU/mL) 50 mL DM1 培養基 Grex10M 25e6 個飼養細胞 OKT-3 (30ng/mL)	4 個碎片 IL-2 (6e3IU/mL) 25 mL DM1 培養基 Grex10M +來自僅飼養細胞培養瓶#1（第 -3 天）之 25 mL 飼養細胞溫成物	4 個碎片 IL-2 (6e3IU/mL) 50 mL DM1 培養基 Grex10M 25e6 個飼養細胞 OKT-3 (30ng/mL)	4 個碎片 IL-2 (6e3IU/mL) 25 mL DM1 培養基 Grex10M +來自僅飼養細胞培養瓶#1（第 -3 天）之 25 mL 飼養細胞溫成物	收集溫成物且將特定體積添加至 A 條件及 C 條件。 收集溫成物以用於另外的測試（下一部分）	NA
第 4 天	NA	NA	NA	NA	收集溫成物以用於另外的測試（下一部分）	在 GREX 100 培養瓶中於含 DM1 培養基+IL-2 (6000IU/mL)+OKT3 30ng/mL 的總體積 1L 之培養基中培養 1e7 個飼養細胞
第 7/8 天	添加 50 mL DM1 培養基+IL-2（6e3 IU/mL）+50e6 個飼養細胞 OKT-3 (30ng/mL)	添加 50 mL DM1 培養基+IL-2（6e3 IU/mL）+50e6 個飼養細胞 OKT-3 (30ng/mL)	添加 25 mL DM1 培養基 +IL-2 (6e3 IU/mL) +來自僅飼養細胞培養瓶#2（第 4 天）之 25 mL 飼養細胞溫成物	添加 25 mL DM1 培養基 +IL-2 (6e3 IU/mL) +來自僅飼養細胞培養瓶#2（第 4 天）之 25 mL 飼養細胞溫成物	收集溫成物以用於另外的測試（下一部分）	收集溫成物且將特定體積添加至 B 條件及 C 條件。 收集溫成物以用於另外的測試)
第 10/11 天	將 20%細胞培養物轉移至新的 Grex10M，且用 DM2+IL-2（3e3IU/mL）補足至 100mL	將 20%細胞培養物轉移至新的 Grex10M，且用 DM2+IL-2（3e3IU/mL）補足至 100mL	將 20%細胞培養物轉移至新的 Grex10M，且用 DM2+IL-2（3e3IU/mL）補足至 100mL	將 20%細胞培養物轉移至新的 Grex10M，且用 DM2+IL-2（3e3IU/mL）補足至 100mL	收集溫成物以用於另外的測試（下一部分）	收集溫成物以用於另外的測試
第 16/17 天	收集（TVC 及存活性%）	收集（TVC 及存活性%）	收集（TVC 及存活性%）	收集（TVC 及存活性%）	NA	收集溫成物以用於另外的測試

|（圖 21）|

圖 23

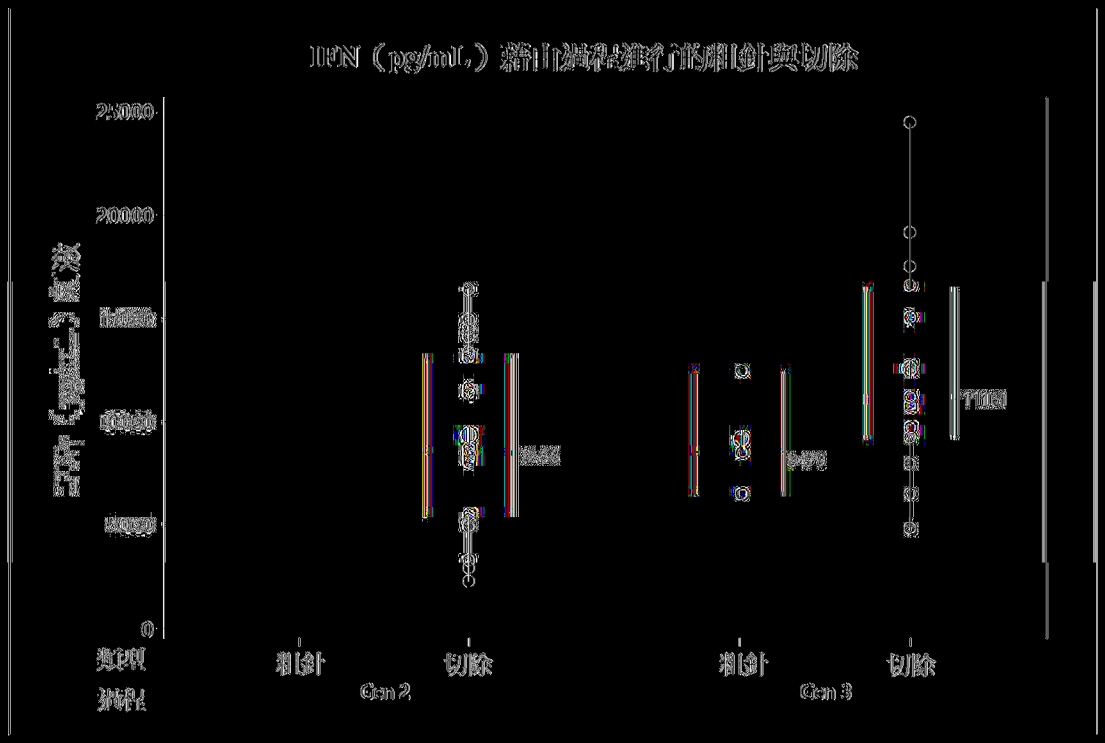


圖 24

表(25)

圖 29

(27)

（圖 28A）