(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112969469 A
(43)申请公布日 2021.06.15

(21)申请号 201980072808.1

(22)申请日 2019.11.04

(30)优先权数据
62/756,025 2018.11.05 US
62/903,627 2019.09.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.04.30

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/059720 2019.11.04

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/096989 EN 2020.05.14

(71)申请人 艾欧凡斯生物治疗公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 M·法尔迪 A·纳塔拉扬

(74)专利代理机构 上海华诚知识产权代理有限公司 31300
代理人 李晓

(51)Int.Cl.
A61K 35/17(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C12N 5/0783(2006.01)

权利要求书9页 说明书267页
序列表92页 附图128页

(54)发明名称

抗PD-1抗体难治性NSCLC患者的治疗

(57)摘要

本发明提供用于制备TIL以便制备对于治疗非小细胞肺癌(non-small cell lung carcinoma;NSCLC)具有增加治疗效果的治疗性TIL群体的经改进且/或缩短的工艺和方法,其中所述NSCLC难以用抗PD-1抗体治疗。

CN 112969469 A

1.一种用肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte;TIL)群体治疗非小细胞肺癌(non-small cell lung carcinoma;NSCLC)的方法,其包含以下步骤:

(a)从手术切除、穿刺活检、核心活检、小型活检或用于从患者的NSCLC肿瘤中获得含有肿瘤和TIL细胞的混合物的样品的其它手段获得和/或接收第一TIL群体;

(c)使所述肿瘤碎片与第一细胞培养基接触;

(d)在所述第一细胞培养基中进行所述第一TIL群体的起始扩增以获得第二TIL群体,其中所述第二TIL群体的数量比所述第一TIL群体的数量大至少5倍,其中所述第一细胞培养基包含IL-2;

(e)在第二细胞培养基中进行所述第二TIL群体的快速扩增以获得第三TIL群体,其中在开始所述快速扩增7天之后,所述第三TIL群体的数量比所述第二TIL群体的数量大至少50倍;其中所述第二细胞培养基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗体)和任选地经辐照的同种异体外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell;PBMC);且其中在14天或更短的时段内进行所述快速扩增;

(f)采集所述第三TIL群体;以及

(g)向患有所述NSCLC的患者给予治疗有效部分的所述第三TIL群体;

其中所述NSCLC难以用抗PD-1抗体治疗。

2.根据权利要求1所述的方法,其中获得所述第一TIL群体包含多病灶采样方法。

3.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC先前已经用抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗PD-L2抗体治疗。

4.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗。

5.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗。

6.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC先前已经用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗,并且先前已经用化学治疗剂治疗。

7.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗,并且先前已经用化学治疗剂治疗。

8.根据权利要求5至7所述的方法,其中所述难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗,但当前尚未用化学治疗剂治疗。

9.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC具有低PD-L1表达。

10.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC先前已经用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且具有低PD-L1表达。

11.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且具有低PD-L1表达。

12.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗并且具有低PD-L1表达。

13.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗,但当前尚未用化学治疗剂治疗并且具有低PD-L1表达。

14.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗,并且在基线时具有巨块病变(bulky disease)。

15.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC先前已经用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且在基线时具有巨块病变。

16.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗并且在基线时具有巨块病变。

17.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗,但当前尚未用化学治疗剂治疗并且在基线时具有巨块病变。

18.根据权利要求14至17所述的方法,其中巨块病变表示在横断面或冠状面中测量的最大肿瘤直径大于7cm,或短轴直径为20mm或更大的肿胀淋巴结。

19.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC难以用至少两个先前全身性治疗疗程治疗,不包括新辅助疗法或辅助疗法。

20.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC难以用选自以下组成的组的抗PD-1或抗PD-L1抗体治疗:纳武单抗(nivolumab)、派立珠单抗(pembrolizumab)、JS001、TSR-042、匹立珠单抗(pidilizumab)、BGB-A317、SHR-1210、REGN2810、MDX-1106、PDR001、来自克隆株RMP1-14的抗PD-1、美国专利第8,008,449号中公开的抗PD-1抗体、度伐单抗(durvalumab)、阿特珠单抗(atezolizumab)、阿维鲁单抗(avelumab)及其片段、衍生物、变体以及生物类似物。

21.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC难以用派立珠单抗或其生物类似物治疗。

22.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC难以用纳武单抗或其生物类似物治疗。

23.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC难以用抗CLTA-4抗体,例如伊匹单抗(ipilimumab)或其生物类似物治疗。

24.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC难以用抗CLTA-4抗体,例如伊匹单抗或其生物类似物及派立珠单抗或其生物类似物治疗。

25.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC难以用抗CLTA-4抗体,例如伊匹单抗或其生物类似物及纳武单抗或其生物类似物治疗。

26.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC难以用度伐单抗或其生物类似物治疗。

27.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC难以用阿特珠单抗或其生物类似物治疗。

28.根据权利要求1所述的方法,其中所述难治性NSCLC难以用阿维鲁单抗或其生物类似物治疗。

29.根据权利要求1至28中任一项所述的方法,其中在21天或更短的时段内进行所述起始扩增。

30.根据权利要求1至29中任一项所述的方法,其中在14天或更短的时段内进行所述起始扩增。

31.根据权利要求1至30中任一项所述的方法,其中所述IL-2是以1000IU/mL与6000IU/mL之间的起始浓度存在于所述第一细胞培养基中。

32.根据权利要求1至31中任一项所述的方法,其中所述IL-2是以1000IU/mL与6000IU/

mL之间的起始浓度存在于所述第二细胞培养基中且所述OKT-3抗体是以约30ng/mL的起始浓度存在于所述第二细胞培养基中。

33.根据权利要求1至32中任一项所述的方法,其中使用气体可渗透容器进行所述起始扩增。

34.根据权利要求1至33中任一项所述的方法,其中使用气体可渗透容器进行所述快速扩增。

35.根据权利要求1至34中任一项所述的方法,其中所述第一细胞培养基进一步包含选自以下组成的组的细胞因子:IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其组合。

36.根据权利要求1至35中任一项所述的方法,其中所述第二细胞培养基进一步包含选自以下组成的组的细胞因子:IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其组合。

37.根据权利要求1至36中任一项所述的方法,其进一步包含在向所述患者给予所述第三TIL群体之前,用非清髓性淋巴细胞耗减方案治疗所述患者的步骤。

38.根据权利要求37所述的方法,其中所述非清髓性淋巴细胞耗减方案包含以每天60mg/m^2的剂量给予环磷酰胺两天,接着以每天25mg/m^2的剂量给予氟达拉宾五天的步骤。

39.根据权利要求1至38中任一项所述的方法,其进一步包含在向所述患者给予所述第三TIL群体后的当天开始用IL-2方案治疗所述患者的步骤。

40.根据权利要求39所述的方法,其中所述IL-2方案为包含每八小时以15分钟大剂量静脉内输注的形式给予600,000或720,000IU/kg的阿地白介素或其生物类似物或变体直到耐受的高剂量IL-2方案。

41.一种用肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体治疗非小细胞肺癌(NSCLC)的方法,其包含以下步骤:

(a)从患者切除肿瘤,所述肿瘤包含第一TIL群体;

(b)将所述肿瘤碎裂成肿瘤碎片;

(c)使所述肿瘤碎片与第一细胞培养基接触;

(d)在所述第一细胞培养基中进行所述第一TIL群体的起始扩增以获得第二TIL群体,其中所述第二TIL群体的数量比所述第一TIL群体的数量大至少5倍,其中所述第一细胞培养基包含IL-2;

(e)在第二细胞培养基中进行所述第二TIL群体的快速扩增以获得第三TIL群体,其中在开始所述快速扩增7天之后,所述第三TIL群体的数量比所述第二TIL群体的数量大至少50倍;其中所述第二细胞培养基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗体)和任选地经辐照的同种异体外周血单核细胞(PBMC);且其中在14天或更短的时段内进行所述快速扩增;

(f)采集所述第三TIL群体;以及

(g)向患有所述NSCLC的患者给予治疗有效部分的所述第三TIL群体;

其中所述NSCLC难以用抗PD-1抗体治疗。

42.根据权利要求41所述的方法,其中从一个或多个肿瘤部位切除所述肿瘤。

43.根据权利要求41所述的方法,其中所述难治性NSCLC先前已经用抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗PD-L2抗体治疗。

44.根据权利要求41所述的方法,其中所述难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗。

45.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗。

46.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC先前已用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗，并且先前已经用化学治疗剂治疗。

47.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗，并且先前已经用化学治疗剂治疗。

48.根据权利要求45至47所述的方法，其中所述难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗，但当前尚未用化学治疗剂治疗。

49.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC具有低PD-L1表达。

50.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC先前已经用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且具有低PD-L1表达。

51.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且具有低PD-L1表达。

52.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗并且具有低PD-L1表达。

53.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗，但当前尚未用化学治疗剂治疗并且具有低PD-L1表达。

54.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且在基线时具有巨块病变。

55.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC先前已经用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗，并且在基线时具有巨块病变。

56.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗并且在基线时具有巨块病变。

57.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗，但当前尚未用化学治疗剂治疗并且在基线时具有巨块病变。

58.根据权利要求54至57所述的方法，其中所述巨块病变表示在横断面或冠状面中测量的最大肿瘤直径大于7cm，或短轴直径为20mm或更大的肿胀淋巴结。

59.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC难以用至少两个先前全身性治疗疗程治疗，不包括新辅助疗法或辅助疗法。

60.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC难以用选自以下组成的组的抗PD-1或抗PD-L1抗体治疗：纳武单抗、派立珠单抗、JS001、TSR-042、匹立珠单抗、BGB-A317、SHR-1210、REGN2810、MDX-1106、PDR001、来自克隆株RMP1-14的抗PD-1、美国专利第8,008,449号中公开的抗PD-1抗体、度伐单抗、阿特珠单抗、阿维鲁单抗及其片段、衍生物、变体以及生物类似物。

61.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC难以用派立珠单抗或其生物类似物治疗。

62.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC难以用纳武单抗或其生物类似物治疗。

63.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC难以用抗CLTA-4抗体，例如伊匹单抗或其生物类似物治疗。

64.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC难以用抗CLTA-4抗体，例如伊匹单抗或其生物类似物及派立珠单抗或其生物类似物治疗。

65.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC难以用抗CLTA-4抗体，例如伊匹单抗或其生物类似物及纳武单抗或其生物类似物治疗。

66.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC难以用度伐单抗或其生物类似物治疗。

67.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC难以用阿特珠单抗或其生物类似物治疗。

68.根据权利要求41所述的方法，其中所述难治性NSCLC难以用阿维鲁单抗或其生物类似物治疗。

69.根据权利要求41至68中任一项所述的方法，其中在21天或更短的时段内进行所述起始扩增。

70.根据权利要求41至69中任一项所述的方法，其中在14天或更短的时段内进行所述起始扩增。

71.根据权利要求41至70中任一项所述的方法，其中所述IL-2是以1000IU/mL与6000IU/mL之间的起始浓度存在于所述第一细胞培养基中。

72.根据权利要求41至71中任一项所述的方法，其中所述IL-2是以1000IU/mL与6000IU/mL之间的起始浓度存在于所述第二细胞培养基中且所述OKT-3抗体是以约30ng/mL的起始浓度存在于所述第二细胞培养基中。

73.根据权利要求41至72中任一项所述的方法，其中使用气体可渗透容器进行所述起始扩增。

74.根据权利要求41至73中任一项所述的方法，其中使用气体可渗透容器进行所述快速扩增。

75.根据权利要求41至74中任一项所述的方法，其中所述第一细胞培养基进一步包含选自以下组成的组的细胞因子：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其组合。

76.根据权利要求41至75中任一项所述的方法，其中所述第二细胞培养基进一步包含选自以下组成的组的细胞因子：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其组合。

77.根据权利要求41至76中任一项所述的方法，其进一步包含在向所述患者给予所述第三TIL群体之前，用非清髓性淋巴细胞耗减方案治疗所述患者的步骤。

78.根据权利要求77所述的方法，其中所述非清髓性淋巴细胞耗减方案包含以每天60mg/m^2的剂量给予环磷酰胺两天，接着以每天25mg/m^2的剂量给予氟达拉滨五天的步骤。

79.根据权利要求41至78中任一项所述的方法，其进一步包含在向所述患者给予所述第三TIL群体后的当天开始用IL-2方案治疗所述患者的步骤。

80.根据权利要求79所述的方法，其中所述IL-2方案为包含每八小时以15分钟大剂量静脉内输注的形式给予600,000或720,000IU/kg的阿地白介素或其生物类似物或变体直到耐受的高剂量IL-2方案。

81.一种用于治疗患有非小细胞肺癌(NSCLC)的个体的方法，其中所述癌症难以用抗PD-1抗体治疗，所述方法包含给予已扩增的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)，包含：

(a)通过将获自个体的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片而从所述个体切除的肿瘤获得

和/或接收第一TIL群体；

(b)将所述肿瘤碎片添加到封闭系统中；

(c)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养所述第一TIL群体进行第一次扩增以产生第二TIL群体，其中所述第一次扩增是在提供第一气体可渗透表面区域的闭合容器中进行，其中所述第一次扩增进行约3-14天以获得所述第二TIL群体，其中所述第二TIL群体的数量比所述第一TIL群体的数量大至少50倍，并且其中在不打开所述系统的情况下发生从步骤(b)过渡到步骤(c)；

(d)通过用额外IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)补充所述第二TIL群体的所述细胞培养基进行第二次扩增，以产生第三TIL群体，其中所述第二次扩增进行约7-14天以获得所述第三TIL群体，其中所述第三TIL群体为相对于所述第二TIL群体包含增加的效应T细胞和/或中央记忆T细胞亚群的治疗性TIL群体，其中所述第二次扩增是在提供第二气体可渗透表面区域的闭合容器中进行，并且其中在不打开所述系统的情况下发生从步骤(c)过渡到步骤(d)；

(e)采集获自步骤(d)的治疗性TIL群体，其中在不打开所述系统的情况下发生从步骤(d)过渡到步骤(e)；以及

(f)将从步骤(e)采集的TIL群体转移到输注袋中，其中在不打开所述系统的情况下发生从步骤(e)转移到(f)；

(g)使用冷冻保存工艺冷冻保存包含从步骤(f)采集的TIL群体的所述输注袋；以及

(h)向所述个体给予治疗有效剂量的来自步骤(g)中的所述输注袋的所述第三TIL群体。

82.根据权利要求81所述的方法，其中所述肿瘤样品来源于多病灶采样方法。

83.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC先前已经用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗。

84.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗。

85.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗。

86.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC先前已用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗，并且先前已经用化学治疗剂治疗。

87.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗，并且先前已经用化学治疗剂治疗。

88.根据权利要求85至87所述的方法，其中所述难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗，但当前尚未用化学治疗剂治疗。

89.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC具有低PD-L1表达。

90.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC先前已经用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且具有低PD-L1表达。

91.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且具有低PD-L1表达。

92.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗并且具有低PD-L1表达。

93.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗，但当前尚未用化学治疗剂治疗并且具有低PD-L1表达。

94.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且在基线时具有巨块病变。

95.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC先前已经用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗，并且在基线时具有巨块病变。

96.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗并且在基线时具有巨块病变。

97.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗，但当前尚未用化学治疗剂治疗并且在基线时具有巨块病变。

98.根据权利要求94至97所述的方法，其中巨块病变表示在横断面或冠状面中测量的最大肿瘤直径大于7cm，或短轴直径为20mm或更大的肿胀淋巴结。

99.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC难以用至少两个先前全身性治疗疗程治疗，不包括新辅助疗法或辅助疗法。

100.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC难以用选自以下组成的组的抗PD-1或抗PD-L1抗体治疗：纳武单抗、派立珠单抗、JS001、TSR-042、匹立珠单抗、BGB-A317、SHR-1210、REGN2810、MDX-1106、PDR001、来自克隆株RMP1-14的抗PD-1、美国专利第8,008,449号中公开的抗PD-1抗体、度伐单抗、阿特珠单抗、阿维鲁单抗及其片段、衍生物、变体以及生物类似物。

101.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC难以用派立珠单抗或其生物类似物治疗。

102.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC难以用纳武单抗或其生物类似物治疗。

103.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC难以用抗CLTA-4抗体，例如伊匹单抗或其生物类似物治疗。

104.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC难以用抗CLTA-4抗体，例如伊匹单抗或其生物类似物及派立珠单抗或其生物类似物治疗。

105.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC难以用抗CLTA-4抗体，例如伊匹单抗或其生物类似物及纳武单抗或其生物类似物治疗。

106.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC难以用度伐单抗或其生物类似物治疗。

107.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC难以用阿特珠单抗或其生物类似物治疗。

108.根据权利要求81所述的方法，其中所述难治性NSCLC难以用阿维鲁单抗或其生物类似物治疗。

109.根据权利要求81至108中任一项所述的方法，其中在21天或更短的时段内进行所述起始扩增。

110.根据权利要求81至109中任一项所述的方法，其中在14天或更短的时段内进行所述起始扩增。

111.根据权利要求81至110中任一项所述的方法，其中所述IL-2是以1000IU/mL与6000IU/mL之间的起始浓度存在于所述第一细胞培养基中。

112.根据权利要求81至111中任一项所述的方法，其中所述IL-2是以1000IU/mL与6000IU/mL之间的起始浓度存在于所述第二细胞培养基中且所述OKT-3抗体是以约30ng/mL的起始浓度存在于所述第二细胞培养基中。

113.根据权利要求81至112中任一项所述的方法，其中使用气体可渗透容器进行所述起始扩增。

114.根据权利要求81至113中任一项所述的方法，其中使用气体可渗透容器进行所述快速扩增。

115.根据权利要求81至114中任一项所述的方法，其中所述第一细胞培养基进一步包含选自以下组成的组的细胞因子：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其组合。

116.根据权利要求81至115中任一项所述的方法，其中所述第二细胞培养基进一步包含选自以下组成的组的细胞因子：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其组合。

117.根据权利要求81至116中任一项所述的方法，其进一步包含在向所述患者给予所述第三TIL群体之前，用非清髓性淋巴细胞耗减方案治疗所述患者的步骤。

118.根据权利要求117所述的方法，其中所述非清髓性淋巴细胞耗减方案包含以每天60mg/m^2的剂量给予环磷酰胺两天，接着以每天25mg/m^2的剂量给予氟达拉宾五天的步骤。

119.根据权利要求81至118中任一项所述的方法，其进一步包含在向所述患者给予所述第三TIL群体后的当天开始用IL-2方案治疗所述患者的步骤。

120.根据权利要求119所述的方法，其中所述IL-2方案为包含每八小时以15分钟大剂量静脉内输注的形式给予600,000或720,000IU/kg的阿地白介素或其生物类似物或变体直到耐受的高剂量IL-2方案。

121.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述NSCLC难以用包含抗PD-1和化学治疗剂的组合治疗或疗法治疗。

122.根据权利要求121所述的方法，其中所述抗PD-1抗体或所述抗PD-L1抗体是选自以下组成的组：纳武单抗、派立珠单抗、JS001、TSR-042、匹立珠单抗、BGB-A317、SHR-1210、REGN2810、MDX-1106、PDR001、来自克隆株RMP1-14的抗PD-1、美国专利第8,008,449号中公开的抗PD-1抗体、度伐单抗、阿特珠单抗、阿维鲁单抗及其片段、衍生物、变体以及生物类似物。

123.根据权利要求121所述的方法，其中所述抗PD-1是派立珠单抗。

124.根据权利要求121至123中任一项所述的方法，其中所述化学治疗剂为含铂双药化学治疗剂(platinum doublet chemotherapeutic agent)。

125.根据权利要求121至123中任一项所述的方法，其中所述含铂双药疗法包含：

i)第一化学治疗剂，其选自顺铂和卡铂组成的组，

ii)和第二化学治疗剂，其选自以下组成的组：长春瑞滨(vinorelbine)、吉西他滨(gemcitabine)和紫杉烷(taxane)(包括例如紫杉醇(paclitaxel)、多西他赛(docetaxel)或白蛋白结合型紫杉醇(nab-paclitaxel))。

126.根据权利要求121至125中任一项所述的方法，其中所述化学治疗剂与培美曲塞(pemetrexed)组合。

127.根据权利要求121至126中任一项所述的方法，其中所述NSCLC难以用包含卡铂、紫杉醇、培美曲塞和顺铂的组合疗法治疗。

128.根据权利要求121至127中任一项所述的方法，其中所述NSCLC难以用包含卡铂、紫杉醇、培美曲塞、顺铂、纳武单抗和伊匹单抗的组合疗法治疗。

抗PD-1抗体难治性NSCLC患者的治疗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年11月5日提交的美国临时专利申请第62/756,025号和2019年9月 20日提交的美国临时专利申请第62/903,627号的优先权,其全部内容以引用的方式并入本文中。

背景技术

[0003] 使用肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocytes;TIL)的过继转移治疗巨块难治性癌症代表具有较差预后的患者的有效治疗途径。Gattinoni等人,《自然免疫学综述(Nat.Rev. Immunol.)》2006,6,383-393。成功的免疫治疗需要大量TIL,并且商业化需要稳固且可靠的工艺。由于细胞扩增的技术、逻辑和调控问题,这一直是一项挑战。基于IL-2的TIL扩增接着“快速扩增工艺”(rapid expansion process;REP)因其速度和效能而成为用于TIL扩增的优选方法。Dudley等人,《科学(Science)》2002,298,850-54;Dudley等人,《临床肿瘤学杂志(J.Clin.Oncol.)》2005,23,2346-57;Dudley等人,《临床肿瘤学杂志》2008,26,5233-39; Riddell等人,《科学》1992,257,238-41;Dudley等人,《免疫治疗学杂志(J.Immunother.)》 2003,26,332-42。REP可在14天时段内产生TIL的1,000倍扩增,但其需要大大过量(例如, 200倍)的通常来自多个供体的呈饲养细胞形式的经辐照的同种异体外周血单核细胞(PBMC,又称为单核细胞(MNC)),以及抗CD3抗体(OKT3)和高剂量的IL-2。Dudley等人,《免疫治疗学杂志》2003,26,332-42。经历REP程序的TIL在患有黑素瘤的患者中进行宿主免疫抑止后产生成功的过继性细胞疗法。当前的输注接受参数依赖于TIL组成的读数(例如, CD28、CD8或CD4阳性)且依赖于REP产物的倍数扩增及存活率。

[0004] 当前的TIL制造和治疗工艺受到时长、成本、无菌问题以及本文中所描述的其它因素限制,如治疗难以用抗PD1治疗的患者的潜能,且因此受到严重限制。迫切需要提供TIL制造工艺和基于这类工艺的疗法,所述疗法适用于治疗对其具有极少或仍无可行治疗选项的患者。本发明因提供用于产生TIL的缩短制造工艺而符合此需求,所述TIL可用于治疗难以用抗 PD-1治疗的非小细胞肺癌(NSCLC)患者。

发明内容

[0005] 本发明提供用于扩增TIL且制造治疗性TIL群体的经改进且/或缩短的方法,所述治疗性 TIL群体用于治疗难以用抗PD-1治疗的非小细胞肺癌(NSCLC)患者。

[0006] 本发明提供一种用肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体治疗非小细胞肺癌(NSCLC)的方法,所述方法包含以下步骤:

[0007] (a)从手术切除、穿刺活检、核心活检、小型活检或用于从患者的NSCLC肿瘤中获得含有肿瘤和TIL细胞的混合物的样品的其它手段获得和/或接收第一TIL群体;

[0008] (c)使所述肿瘤碎片与第一细胞培养基接触;

[0009] (d)在所述第一细胞培养基中进行所述第一TIL群体的起始扩增以获得第二TIL群体,其中所述第二TIL群体的数量比所述第一TIL群体的数量大至少5倍,其中所述第一细胞

培养基包含IL-2；

[0010] (e)在第二细胞培养基中进行所述第二TIL群体的快速扩增以获得第三TIL群体，其中在开始所述快速扩增7天之后，所述第三TIL群体的数量比所述第二TIL群体的数量大至少 50倍；其中所述第二细胞培养基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗体)和任选地经辐照的同种异体外周血单核细胞(PBMC)；且其中在14天或更短的时段内进行所述快速扩增；

[0011] (f)采集所述第三TIL群体；以及

[0012] (g)向患有所述NSCLC的患者给予治疗有效部分的所述第三TIL群体；

[0013] 其中所述NSCLC难以用抗PD-1抗体治疗。

[0014] 在一些实施例中，“获得”表示所述方法和/或工艺中采用的TIL可直接从作为方法和/或工艺步骤的部分的样品(包括从手术切除、穿刺活检、核心活检、小型活检或其它样品)中得到。在一些实施例中，“接收”表示所述方法和/或工艺中采用的TIL可间接地从样品(包括来源于手术切除、穿刺活检、核心活检、小型活检或其它样品)中得到且随后用于所述方法和/或工艺中，(例如，步骤(a)开始时，已通过不包括在部分(a)中的单独工艺从样品中得到TIL，这类TIL可称为“已接收的”)。

[0015] 在一些实施例中，第一TIL群体包含多病灶采样方法。

[0016] 在一些实施例中，难治性NSCLC先前已用抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗PD-L2抗体治疗。

[0017] 在一些实施例中，难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗。

[0018] 在一些实施例中，难治性NSCLC已用化学治疗剂治疗。

[0019] 在一些实施例中，难治性NSCLC先前已用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且先前已用化学治疗剂治疗。

[0020] 在一些实施例中，难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且先前已用化学治疗剂治疗。

[0021] 在一些实施例中，难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗，但当前尚未用化学治疗剂治疗。

[0022] 在一些实施例中，难治性NSCLC具有低PD-L1表达。

[0023] 在一些实施例中，难治性NSCLC先前已经用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且具有低PD-L1表达。

[0024] 在一些实施例中，难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且具有低 PD-L1表达。

[0025] 在一些实施例中，难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗并且具有低PD-L1表达。

[0026] 在一些实施例中，难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗，但当前尚未用化学治疗剂治疗并且具有低PD-L1表达。

[0027] 在一些实施例中，难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且在基线时具有巨块病变。

[0028] 在一些实施例中，难治性NSCLC先前已经用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且在基线时具有巨块病变。

[0029] 在一些实施例中，难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗并且在基线时具有巨块病变。

[0030] 在一些实施例中，难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗，但当前尚未用化学治疗剂治疗并且在基线时具有巨块病变。

[0031] 在一些实施例中，巨块病变表示在横断面或冠状面中测量的最大肿瘤直径大于7cm，或短轴直径为20mm或更大的肿胀淋巴结。

[0032] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用至少两个先前全身性治疗疗程治疗，不包括新辅助疗法或辅助疗法。

[0033] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用选自以下组成的组的抗PD-1抗体或抗PD-L1治疗：纳武单抗(nivolumab)、派立珠单抗(pembrolizumab)、伊匹单抗(ipilimumab)、JS001、TSR-042、匹立珠单抗(pidilizumab)、BGB-A317、SHR-1210、REGN2810、MDX-1106、PDR001、来自克隆株RMP1-14的抗PD-1、美国专利第8,008,449号中公开的抗PD-1抗体、度伐单抗 (durvalumab)、阿特珠单抗(atezolizumab)、阿维鲁单抗(avelumab)及其片段、衍生物、变体以及生物类似物。

[0034] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用派立珠单抗或其生物类似物治疗。

[0035] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用纳武单抗或其生物类似物治疗。

[0036] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用伊匹单抗或其生物类似物治疗。

[0037] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用伊匹单抗或其生物类似物及派立珠单抗或其生物类似物治疗。

[0038] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用伊匹单抗或其生物类似物及纳武单抗或其生物类似物治疗。

[0039] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用度伐单抗或其生物类似物治疗。

[0040] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用阿特珠单抗或其生物类似物治疗。

[0041] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用阿维鲁单抗或其生物类似物治疗。

[0042] 在一些实施例中，在21天或更短的时段内进行起始扩增。

[0043] 在一些实施例中，在14天或更短的时段内进行起始扩增。

[0044] 在一些实施例中，IL-2是以1000IU/mL与6000IU/mL之间的起始浓度存在于第一细胞培养基中。

[0045] 在一些实施例中，IL-2是以1000IU/mL与6000IU/mL之间的起始浓度存在于第二细胞培养基中并且OKT-3抗体是以约30ng/mL的起始浓度存在于第二细胞培养基中。

[0046] 在一些实施例中，使用气体可渗透容器进行起始扩增。

[0047] 在一些实施例中，使用气体可渗透容器进行快速扩增。

[0048] 在一些实施例中，第一细胞培养基进一步包含选自以下组成的组的细胞因子：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其组合。

[0049] 在一些实施例中，第二细胞培养基进一步包含选自以下组成的组的细胞因子：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其组合。

[0050] 在一些实施例中，所述方法进一步包含在向患者给予第三TIL群体之前，用非清髓性淋巴细胞耗减方案治疗患者的步骤。

[0051] 在一些实施例中，非清髓性淋巴细胞耗减方案包含以每天60mg/m^2的剂量给予环磷酰胺两天，接着以每天25mg/m^2的剂量给予氟达拉宾五天的步骤。

[0052] 在一些实施例中，所述方法进一步包含在向患者给予第三TIL群体后的当天开始

用IL-2 方案治疗患者的步骤。

[0053] 在一些实施例中,IL-2方案为包含以每八小时15分钟大剂量静脉内输注的形式给予 600,000或720,000IU/kg的阿地白介素(aldesleukin)或其生物类似物或变体直到耐受的高剂量IL-2方案。

[0054] 在一些实施例中,本发明提供一种用肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体治疗非小细胞肺癌 (NSCLC)的方法,所述方法包含以下步骤:

[0055] (a)从患者切除肿瘤,所述肿瘤包含第一TIL群体;

[0056] (b)将所述肿瘤碎裂成肿瘤碎片;

[0057] (c)使所述肿瘤碎片与第一细胞培养基接触;

[0058] (d)在所述第一细胞培养基中进行所述第一TIL群体的起始扩增以获得第二TIL群体,其中所述第二TIL群体的数量比所述第一TIL群体的数量大至少5倍,其中所述第一细胞培养基包含IL-2;

[0059] (e)在第二细胞培养基中进行所述第二TIL群体的快速扩增以获得第三TIL群体,其中在开始所述快速扩增7天之后,所述第三TIL群体的数量比所述第二TIL群体的数量大至少 50倍;其中所述第二细胞培养基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗体)和任选地经辐照的同种异体外周血单核细胞(PBMC);且其中在14天或更短的时段内进行所述快速扩增;

[0060] (f)采集所述第三TIL群体;以及

[0061] (g)向患有癌症的患者给予治疗有效部分的所述第三TIL群体;

[0062] 其中癌症难以用抗PD-1抗体治疗。

[0063] 在一些实施例中,难治性NSCLC先前已用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗。

[0064] 在一些实施例中,难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗。

[0065] 在一些实施例中,难治性NSCLC已用化学治疗剂治疗。

[0066] 在一些实施例中,难治性NSCLC先前已用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且先前已用化学治疗剂治疗。

[0067] 在一些实施例中,难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且先前已用化学治疗剂治疗。

[0068] 在一些实施例中,难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗,但当前尚未用化学治疗剂治疗。

[0069] 在一些实施例中,难治性NSCLC具有低PD-L1表达。

[0070] 在一些实施例中,难治性NSCLC先前已经用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且具有低PD-L1表达。

[0071] 在一些实施例中,难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且具有低 PD-L1表达。

[0072] 在一些实施例中,难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗并且具有低PD-L1表达。

[0073] 在一些实施例中,难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗,但当前尚未用化学治疗剂治疗并且具有低PD-L1表达。

[0074] 在一些实施例中,难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且在基线时具有巨块病变。

[0075] 在一些实施例中,难治性NSCLC先前已经用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且在

基线时具有巨块病变。

[0076] 在一些实施例中，难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗并且在基线时具有巨块病变。

[0077] 在一些实施例中，难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗，但当前尚未用化学治疗剂治疗并且在基线时具有巨块病变。

[0078] 在一些实施例中，巨块病变表示在横断面或冠状面中测量的最大肿瘤直径大于7cm，或短轴直径为20mm或更大的肿胀淋巴结。

[0079] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用至少两个先前全身性治疗疗程治疗，不包括新辅助疗法或辅助疗法。

[0080] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用选自以下组成的组的抗PD-1或抗PD-L1抗体治疗：纳武单抗、派立珠单抗、JS001、TSR-042、匹立珠单抗、BGB-A317、SHR-1210、REGN2810、MDX-1106、PDR001、来自克隆株RMP1-14的抗PD-1、美国专利第8,008,449号中公开的抗PD-1抗体、度伐单抗、阿特珠单抗、阿维鲁单抗及其片段、衍生物、变体以及生物类似物。

[0081] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用派立珠单抗或其生物类似物治疗。

[0082] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用纳武单抗或其生物类似物治疗。

[0083] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用抗CLTA-4抗体，例如伊匹单抗或其生物类似物治疗。

[0084] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用抗CLTA-4抗体，例如伊匹单抗或其生物类似物及派立珠单抗或其生物类似物治疗。

[0085] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用抗CLTA-4抗体，例如伊匹单抗或其生物类似物及纳武单抗或其生物类似物治疗。

[0086] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用度伐单抗或其生物类似物治疗。

[0087] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用阿特珠单抗或其生物类似物治疗。

[0088] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用阿维鲁单抗或其生物类似物治疗。

[0089] 在一些实施例中，在21天或更短的时段内进行起始扩增。

[0090] 在一些实施例中，在14天或更短的时段内进行起始扩增。

[0091] 在一些实施例中，IL-2是以1000IU/mL与6000IU/mL之间的起始浓度存在于第一细胞培养基中。

[0092] 在一些实施例中，IL-2是以1000IU/mL与6000IU/mL之间的起始浓度存在于第二细胞培养基中并且OKT-3抗体是以约30ng/mL的起始浓度存在于第二细胞培养基中。

[0093] 在一些实施例中，使用气体可渗透容器进行起始扩增。

[0094] 在一些实施例中，使用气体可渗透容器进行快速扩增。

[0095] 在一些实施例中，第一细胞培养基进一步包含选自以下组成的组的细胞因子：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其组合。

[0096] 在一些实施例中，第二细胞培养基进一步包含选自以下组成的组的细胞因子：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其组合。

[0097] 在一些实施例中，所述方法进一步包含在向患者给予第三TIL群体之前，用非清髓性淋巴细胞耗减方案治疗患者的步骤。

[0098] 在一些实施例中，非清髓性淋巴细胞耗减方案包含以每天60mg/m^2的剂量给予环

磷酰胺两天，接着以每天25mg/m^2的剂量给予氟达拉宾五天的步骤。

[0099] 在一些实施例中，所述方法进一步包含在向患者给予第三TIL群体后的当天开始用IL-2 方案治疗患者的步骤。

[0100] 在一些实施例中，IL-2方案为包含以每八小时15分钟大剂量静脉内输注的形式给予 600,000或720,000IU/kg的阿地白介素或其生物类似物或变体直到耐受的高剂量IL-2方案。

[0101] 在一些实施例中，本发明提供一种用于治疗患有非小细胞肺癌(NSCLC)的个体的方法，其中所述癌症难以用抗PD-1抗体治疗，所述方法包含给予已扩增的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)，包含：

[0102] (a)通过将获自个体的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片而从所述个体切除的肿瘤获得和/或接收第一TIL群体；

[0103] (b)将所述肿瘤碎片添加到封闭系统中；

[0104] (c)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养所述第一TIL群体进行第一次扩增以产生第二 TIL群体，其中所述第一次扩增是在提供第一气体可渗透表面区域的闭合容器中进行，其中所述第一次扩增进行约3-11~~3-14~~天以获得所述第二TIL群体，其中所述第二TIL群体的数量比所述第一TIL群体的数量大至少50倍，并且其中在不打开所述系统的情况下发生从步骤(b) 过渡到步骤(c)；

[0105] (d)通过用额外IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)补充所述第二TIL群体的所述细胞培养基进行第二次扩增，以产生第三TIL群体，其中所述第二次扩增进行约7-11~~7-14~~天以获得所述第三TIL群体，其中所述第三TIL群体为相对于所述第二TIL群体包含增加的效应T细胞和/或中央记忆T细胞亚群的治疗性TIL群体，其中所述第二次扩增是在提供第二气体可渗透表面区域的闭合容器中进行，并且其中在不打开所述系统的情况下发生从步骤(c)过渡到步骤(d)；

[0106] (e)采集获自步骤(d)的治疗性TIL群体，其中在不打开所述系统的情况下发生从步骤 (d)过渡到步骤(e)；以及

[0107] (f)将从步骤(e)采集的TIL群体转移到输注袋中，其中在不打开所述系统的情况下发生从步骤(e)转移到(f)；

[0108] (g)使用冷冻保存工艺冷冻保存包含从步骤(f)采集的TIL群体的所述输注袋；以及

[0109] (h)向所述个体给予治疗有效剂量的来自步骤(g)中的所述输注袋的所述第三TIL群体。

[0110] 在一些实施例中，难治性NSCLC先前已用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗。

[0111] 在一些实施例中，难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗。

[0112] 在一些实施例中，难治性NSCLC已用化学治疗剂治疗。

[0113] 在一些实施例中，难治性NSCLC先前已用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且先前已用化学治疗剂治疗。

[0114] 在一些实施例中，难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且先前已用化学治疗剂治疗。

[0115] 在一些实施例中，难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗，但当前尚未用化学治疗剂

治疗。

[0116] 在一些实施例中，难治性NSCLC具有低PD-L1表达。

[0117] 在一些实施例中，难治性NSCLC先前已经用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且具有低PD-L1表达。

[0118] 在一些实施例中，难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且具有低 PD-L1表达。

[0119] 在一些实施例中，难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗并且具有低PD-L1表达。

[0120] 在一些实施例中，难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗，但当前尚未用化学治疗剂治疗并且具有低PD-L1表达。

[0121] 在一些实施例中，难治性NSCLC先前未用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且在基线时具有巨块病变。

[0122] 在一些实施例中，难治性NSCLC先前已经用抗PD-1和/或抗PD-L1抗体治疗并且在基线时具有巨块病变。

[0123] 在一些实施例中，难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗并且在基线时具有巨块病变。

[0124] 在一些实施例中，难治性NSCLC已经用化学治疗剂治疗，但当前尚未用化学治疗剂治疗并且在基线时具有巨块病变。

[0125] 在一些实施例中，巨块病变表示在横断面或冠状面中测量的最大肿瘤直径大于7cm，或短轴直径为20mm或更大的肿胀淋巴结。

[0126] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用至少两个先前全身性治疗疗程治疗，不包括新辅助疗法或辅助疗法。

[0127] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用选自以下组成的组的抗PD-1或抗PD-L1抗体治疗：纳武单抗、派立珠单抗、JS001、TSR-042、匹立珠单抗、BGB-A317、SHR-1210、REGN2810、MDX-1106、PDR001、来自克隆株RMP1-14的抗PD-1、美国专利第8,008,449号中公开的抗 PD-1抗体、度伐单抗、阿特珠单抗、阿维鲁单抗及其片段、衍生物、变体以及生物类似物。

[0128] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用派立珠单抗或其生物类似物治疗。

[0129] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用纳武单抗或其生物类似物治疗。

[0130] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用抗CLTA-4抗体，例如伊匹单抗或其生物类似物治疗。

[0131] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用抗CLTA-4抗体，例如伊匹单抗或其生物类似物及派立珠单抗或其生物类似物治疗。

[0132] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用抗CLTA-4抗体，例如伊匹单抗或其生物类似物及纳武单抗或其生物类似物治疗。

[0133] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用度伐单抗或其生物类似物治疗。

[0134] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用阿特珠单抗或其生物类似物治疗。

[0135] 在一些实施例中，难治性NSCLC难以用阿维鲁单抗或其生物类似物治疗。

[0136] 在一些实施例中，在21天或更短的时段内进行起始扩增。

[0137] 在一些实施例中，在14天或更短的时段内进行起始扩增。

[0138] 在一些实施例中，IL-2是以1000IU/mL与6000IU/mL之间的起始浓度存在于第一细

胞培养基中。

[0139] 在一些实施例中,IL-2是以1000IU/mL与6000IU/mL之间的起始浓度存在于第二细胞培养基中并且OKT-3抗体是以约30ng/mL的起始浓度存在于第二细胞培养基中。

[0140] 在一些实施例中,使用气体可渗透容器进行起始扩增。

[0141] 在一些实施例中,使用气体可渗透容器进行快速扩增。

[0142] 在一些实施例中,第一细胞培养基进一步包含选自以下组成的组的细胞因子:IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其组合。

[0143] 在一些实施例中,第二细胞培养基进一步包含选自以下组成的组的细胞因子:IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其组合。

[0144] 在一些实施例中,所述方法进一步包含在向患者给予第三TIL群体之前,用非清髓性淋巴细胞耗减方案治疗患者的步骤。

[0145] 在一些实施例中,非清髓性淋巴细胞耗减方案包含以每天60mg/m^2的剂量给予环磷酰胺两天,接着以每天25mg/m^2的剂量给予氟达拉宾五天的步骤。

[0146] 在一些实施例中,所述方法进一步包含在向患者给予第三TIL群体后的当天开始用IL-2 方案治疗患者的步骤。

[0147] 在一些实施例中,IL-2方案为包含以每八小时15分钟大剂量静脉内输注的形式给予 600,000或720,000IU/kg的阿地白介素或其生物类似物或变体直到耐受的高剂量IL-2方案。

[0148] 在一些实施例中,NSCLC难以用包含抗PD-1和化学治疗剂的组合治疗治疗。

[0149] 在一些实施例中,抗PD-1或抗PD-L1抗体是选自以下组成的组:纳武单抗、派立珠单抗、JS001、TSR-042、匹立珠单抗、BGB-A317、SHR-1210、REGN2810、MDX-1106、PDR001、来自克隆株RMP1-14的抗PD-1、美国专利第8,008,449号中公开的抗PD-1抗体、度伐单抗、阿特珠单抗、阿维鲁单抗及其片段、衍生物、变体以及生物类似物。

[0150] 在一些实施例中,抗PD-1是派立珠单抗。

[0151] 在一些实施例中,化学治疗剂为含铂双药化学治疗剂(platinum doublet chemotherapeutic agent)。

[0152] 在一些实施例中,含铂双药疗法包含:

[0153] i)第一化学治疗剂,其选自顺铂和卡铂组成的组,

[0154] ii)和第二化学治疗剂,其选自以下组成的组:长春瑞滨(vinorelbine)、吉西他滨(gemcitabine)和紫杉烷(taxane)(包括例如紫杉醇(paclitaxel)、多西他赛(docetaxel)或白蛋白结合型紫杉醇(nab-paclitaxel))。

[0155] 在一些实施例中,化学治疗剂与培美曲塞(pemetrexed)组合。

[0156] 在一些实施例中,NSCLC难以用包含卡铂、紫杉醇、培美曲塞和顺铂的组合疗法治疗。

[0157] 在一些实施例中,NSCLC难以用包含卡铂、紫杉醇、培美曲塞、顺铂、纳武单抗和伊匹单抗的组合疗法治疗。

附图说明

[0158] 图1:提供步骤A至F的概述的示范性工艺2A的图。

[0159] 图2:工艺2A的工艺流程图。

[0160] 图3:示出了冷冻保存的TIL示范性制造工艺(约22天)的一实施例的图式。

[0161] 图4:示出了工艺2A(一种用于TIL制造的22天工艺)的一实施例的图式。

[0162] 图5:工艺1C与工艺2A的示范性实施例的步骤A至F的比较表。

[0163] 图6:工艺1C的一实施例与工艺2A的一实施例的详细比较。

[0164] 图7:用于NSCLC肿瘤的示范性GEN 3型工艺。

[0165] 图8A-8C:A)示出了用于TIL制造的2A工艺(约22天的工艺)与Gen 3工艺实施例(约14天到16天的工艺)之间的比较。B)提供步骤A至F的概述的示范性工艺Gen3的图 (约14天到16天的工艺)。C)提供三个示范性Gen 3工艺及三个工艺变型中的每一个的步骤 A至F(约14天到16天的工艺)的概述的图。

[0166] 图9:提供GEN 2(工艺2A)与GEN 3之间的可比性实验流程图。

[0167] 图10A-10C:A)Gen 2和Gen 3工艺中的TIL产物的L4054表型表征。B)Gen 2和Gen 3工艺中的TIL产物的L4055表型表征。C)Gen 2和Gen 3工艺中的TIL产物的M1085T表型表征。

[0168] 图11A-11C:A)对来自Gen 2和Gen 3工艺的TIL产物的L4054-记忆标记分析。B)对来自Gen 2和Gen 3工艺的TIL产物的L4055-记忆标记分析。C)对来自Gen 2和Gen 3工艺的TIL产物的M1085T-记忆标记分析。

[0169] 图12:(A)门控于CD4+上的L4054活化和耗尽标记,(B)门控于CD8+上的L4054活化和耗尽标记。

[0170] 图13:(A)门控于CD4+上的L4055活化和耗尽标记,(B)门控于CD8+上的L4055活化和耗尽标记。

[0171] 图14:IFNγ产生(pg/mL):Gen 2和Gen 3工艺的(A)L4054、(B)L4055和(C)M1085T:此处展现的每个条形图为受刺激、未受刺激和培养基对照的IFNγ含量的平均值 +SEM。在450nm下测量光密度。

[0172] 图15:细胞培养上清液中的IL-2浓度的ELISA分析:(A)L4054和(B)L4055。此处展现的每个条形图为废培养基上的IL-2含量的平均值+SEM。在450nm下测量光密度。

[0173] 图16:废培养基中的葡萄糖和乳酸的量化(g/L):(A)葡萄糖和(B)乳酸:在两个肿瘤株中,并且在两个工艺中,在整个REP扩增过程中观测到葡萄糖减少。相反地,正如预期,观测到乳酸增加。Gen 2与Gen 3工艺之间的葡萄糖减少和乳酸增加均相当。

[0174] 图17:A)对L4054和L4055的废培养基中的L-谷氨酰胺的量化对。B)对L4054和L4055 的废培养基中的Glutamax的量化。C)对L4054和L4055的废培养基中的氨的量化。

[0175] 图18:端粒长度分析。相对端粒长度(RTL)值表示Gen 2和Gen 3工艺中的每个染色体/基因组的平均端粒荧光相对于使用DAKO试剂盒的对照细胞系(1301白血病细胞系)中每个染色体/基因组的端粒荧光的平均值。

[0176] 图19:在Gen 2和Gen 3工艺下,L4054和L4055上的TIL最终产物的独特CDR3序列分析。纵列显示从Gen 2工艺采集日(例如,第22天)和Gen 3工艺采集日(例如,第14-16 天)收集的1×10^6个细胞中鉴别出的独特TCR B克隆型的数量。基于样品内独特肽CDR的数量,Gen 3示出比Gen 2更高的克隆多样性。

[0177] 图20:L4054IL采集的最终细胞产物(Gen 2工艺(例如,第22天)和Gen 3工艺(例如,第14-16天))上的独特CDR3序列的频率。

[0178] 图21:L4055TIL采集的最终细胞产物(Gen 2(例如,第22天)和Gen 3工艺(例如,第14-16天))上的独特CDR3序列的频率。

[0179] 图22:在Gen 2和Gen 3工艺下,L4054和L4055上的TIL最终产物的多样性指数。香农熵多样性指数(Shanon entropy diversity index)为用于比较的更可靠且常用的度量。Gen 3 L4054和L4055显示比Gen 2略微更高的多样性。

[0180] 图23:表45(参见以下实例8)中呈现的第7天-Gen 3REP起始时的细胞计数的原始数据。

[0181] 图24:表45(参见以下实例8)中呈现的第11天-Gen 2REP起始和Gen 3规模扩大时的细胞计数的原始数据。

[0182] 图25:表46(参见以下实例8)中呈现的第16天-Gen 2规模扩大和Gen 3采集(例如,第16天)时的细胞计数的原始数据。

[0183] 图26:表46(参见以下实例8)中呈现的第22天-Gen 2采集(例如,第22天)时的细胞计数的原始数据。对于L4054Gen 2,因为研究的总数,将LOVO后计数外推至4个烧瓶。1个烧瓶被污染,并且进行外推,得到总数=6.67E+10

[0184] 图27:图10A、10A和10B中描绘的流式细胞测量结果的原始数据。

[0185] 图28:图10C和10C中描绘的流式细胞测量结果的原始数据。

[0186] 图29:图12和13中描绘的流式细胞测量结果的原始数据。

[0187] 图30:图14中描绘的L4054样品的IFNγ产生分析结果的原始数据。

[0188] 图31:图14中描绘的L4055样品的IFNγ产生分析结果的原始数据。

[0189] 图32:图14中描绘的M1085T样品的IFNγ产生分析结果的原始数据。

[0190] 图33:图15中描绘的IL-2ELISA分析结果的原始数据。

[0191] 图34:图16和17中呈现的代谢底物和代谢分析结果的原始数据。

[0192] 图35:图18中呈现的相对端粒长度分析结果的原始数据。

[0193] 图36:图19和22中呈现的独特CD3序列和克隆多样性分析结果的原始数据。

[0194] 图37:示出了不同Gen 2(2A工艺)与Gen 3.1工艺实施例之间的比较。

[0195] 图38:描述Gen 2、Gen 2.1和Gen 3.0工艺实施例的各种特征的图表。

[0196] 图39:Gen 3工艺的一实施例(称为Gen 3.1)的培养基条件的概述。

[0197] 图40:描述Gen 2、Gen 2.1和Gen 3.0工艺实施例的各种特征的图表。

[0198] 图41:比较Gen 2和Gen 3.0工艺实施例的各种特征的图表。

[0199] 图42:提供所描述的扩增工艺的各种实施例中的培养基使用的图表。

[0200] 图43:表型比较:所述工艺的Gen 3.0和Gen 3.1实施例显示出相当的CD28、CD27和CD57表达。

[0201] 图44:Gen 3最终产物上的更高IFNγ产生。在培养冷冻上清液中评估IFNγ分析(通过 ELISA)以比较两个工艺。对于每个肿瘤,在每个Gen 2(例如,第22天)和Gen 3工艺(例如,第16天)中使用新鲜TIL产物刺激抗CD3涂布的培养板整夜。此处展现的每个条形图为受刺激、未受刺激和培养基对照的IFNγ含量。

[0202] 图45:上图:TIL最终产物的独特CDR3序列分析:纵列显示从Gen 2(例如,第22天)和Gen 3工艺(例如,第14-16天)收集的1×10^{6}个细胞中鉴别出的独特TCR B克隆型的数量。基于样品内独特肽CDR的数量,Gen 3示出比Gen 2更高的克隆多样性。下图:TIL最终产物的

多样性指数:香农熵多样性指数为用于比较的更可靠的常用度量。Gen 3示出比Gen 2略微更高的多样性。

[0203] 图46:Gen 3与Gen 2最终产物之间共享199个序列,对应于Gen 2与Gen 3最终产物共享的前80%独特CDR3序列的97.07%。

[0204] 图47:Gen 3与Gen 2最终产物之间共享1833个序列,对应于Gen 2与Gen 3最终产物共享的前80%独特CDR3序列的99.45%。

[0205] 图48:Gen 3工艺的一示范性实施例(16天的工艺)的示意图。

[0206] 图49:使用Gen 3扩增平台扩增来自造血性恶性肿瘤之T细胞的方法的一示范性实施例的示意图。

[0207] 图50:提供结构I-A和I-B,圆柱体指代单独的多肽结合域。结构I-A及I-B包含来源于例如4-1BBL或结合4-1BB的抗体的三个线性连接的TNFRSF结合域,所述结合域折叠以形成三价蛋白质,接着经由IgG1-Fc(包括CH3和CH2域)连接至第二个三价蛋白质,接着用以经由二硫键(小细长卵形)将两个三价蛋白质连接在一起,使所述结构稳定并且提供能够将六个受体的胞内信号传导域和信号传导蛋白质聚集在一起以形成信号传导复合物的诱导剂。以圆柱体形式表示的TNFRSF结合域可为scFv域,包含例如,由可包含亲水性残基和具有灵活性的Gly及Ser序列以及具有溶解性的Glu及Lys的连接子连接的V_H和V_L链。

[0208] 图51:Gen 3工艺的一示范性实施例(16天的工艺)的示意图。

[0209] 图52:提供Gen 3.1工艺的一示范性实施例(Gen 3.1测试)(16天的工艺)的过程概述。

[0210] 图53:提供Gen 3工艺的示范性实施例(Gen 3.0、Gen 3.1对照、Gen 3.1测试)的TIL 增殖、每个肿瘤碎片的平均总活细胞计数、采集日的存活率百分比和采集日的总活细胞计数 (TVC)的数据。Gen 3.1测试(其包括在第0天添加OKT-3和饲养细胞)在采集时达到烧瓶的最大容量。如果在第0天开始最多4个烧瓶,那么每次TVC采集应乘以4。

[0211] 图54:描绘Gen 3工艺的示范性实施例(Gen 3.0、Gen 3.1对照、Gen 3.1测试)(16天的工艺)的总活细胞计数(TVC)和存活率百分比的条形图。

[0212] 图55:提供的数据表明Gen 3工艺的示范性实施例(Gen3.0、Gen 3.1对照和Gen 3.1测试)产生显示出相当的CD28、CD27和CD57表达的细胞。

[0213] 图56:提供的数据表明由Gen 3工艺的示范性实施例(Gen 3.0、Gen 3.1对照和Gen 3.1 测试)产生的细胞中的TIL记忆状态相当。REP TIL的记忆状态描绘如下:CD4+或CD8+ TIL 记忆亚群划分成不同的记忆亚群。幼稚(CD45RA+CD62L+)、CM:中央记忆 (CD45RA-CD62L+)、EM:效应子记忆(CD45RA-CD62L-)、TEMRA/TEFF:RA+效应子记忆/效应子(CD45RA+CD62L+)。呈现的条形图为在CD4+或CD8+上进行门控时的阳性 CD45+/-CD62L+/-百分比。

[0214] 图57:提供的数据表明在CD4+上进行门控时,由Gen 3工艺的示范性实施例(Gen 3.0、 Gen 3.1对照和Gen 3.1测试)产生的细胞中的TIL活化/耗尽标记是相当的。通过多色流式细胞测量术测定REP TIL的活化和耗尽。用流式细胞测量术抗体(CD3-BUV395、PD-1-BV421、 2B4/CD244-PB、CD8-BB515、CD25-BUV563、BTLA-PE、KLRG1-PE-Dazzle 594、 TIM-3-BV650、CD194/CCR4-APC、CD4-VioGreen、TIGIT-PerCP-eFluor 710、CD183-BV711、 CD69-APC-R700、CD95-BUV737、CD127-PE-Cy7、CD103-BV786、LAG-3-APC-eFluor 780) 对采集的TIL样品进行染色。呈现的条形图为REP TIL的CD4+或CD8+TIL的百分比。

[0215] 图58:提供的数据表明在CD8+上进行门控时,由Gen 3工艺的示范性实施例(Gen 3.0、Gen 3.0、Gen 3.1对照和Gen 3.1)产生的细胞中的TIL活化/耗尽标记是相当的。通过多色流式细胞测量术测定REP TIL的活化和耗尽。用流式细胞测量术抗体(CD3-BUV395、PD-1-BV421、2B4/CD244-PB、CD8-BB515、CD25-BUV563、BTLA-PE、KLRG1-PE-Dazzle 594、TIM-3-BV650、CD194/CCR4-APC、CD4-VioGreen、TIGIT-PerCP-eFluor 710、CD183-BV711、CD69-APC-R700、CD95-BUV737、CD127-PE-Cy7、CD103-BV786、LAG-3-APC-eFluor 780) 对TIL采集样品进行染色。呈现的条形图为REP TIL的CD4+或CD8+TIL的百分比。

[0216] 图59:提供的数据表明Gen 3.1最终产物展现出更高的IFN-γ产生。在培养冷冻上清液中评估IFNγ分析ELISA以比较两个工艺。对于每个肿瘤,在每个采集日使用新鲜的TIL产物刺激抗CD3涂布的培养板整夜。此处呈现的每个条形图为受刺激、未受刺激和培养基对照的IFNγ含量。

[0217] 图60:提供的数据表明在使用标准培养基的Gen 3工艺的示范性实施例(Gen 3.0、Gen 3.1 对照、Gen 3.1测试)中,上清液中的IL-2浓度是相当的。左图:L4063-Gen 2标准培养基。右图:L4064-CTS Optimizer培养基。*用AIM V稀释剂进行ELISA

[0218] 图61:提供的数据表明在Gen 3工艺的示范性实施例(Gen 3.0、Gen 3.1对照、Gen 3.1 测试)中,上清液中的代谢物浓度是相当的。L4063TIL是在标准培养基中扩增。L4064 TIL 是在CTS Optimizer培养基中扩增。

[0219] 图62:对Gen 3工艺的示范性实施例(Gen 3.0、Gen 3.1对照、Gen 3.1测试)的端粒长度分析。由肿瘤识别编号L4063和L4064产生的细胞的端粒长度分析:相对端粒长度(RTL)值表示由Gen 3.0、Gen 3.1对照和Gen 3.1测试工艺产生的细胞中每个染色体/基因组的端粒荧光相对于使用DAKO试剂盒的对照细胞系(1301白血病细胞系)中每个染色体/基因组的端粒荧光的平均值。

[0220] 图63:Gen 3.1测试(Gen 3.1优化)工艺的一示范性实施例(16-17天工艺)的示意图。

[0221] 图64:Gen 3工艺的一示范性实施例(16天的工艺)的示意图。

[0222] 图65A-65B:示范性Gen 2和示范性Gen 3工艺的比较表,其中高亮显示示范性差异。

[0223] 图66:Gen 3工艺(16/17天的工艺)制备时间线的一示范性实施例的示意图。

[0224] 图67:Gen 3工艺(14-16天的工艺)的一示范性实施例的示意图。

[0225] 图68:示范性Gen 3工艺实施例的三个工程改造轮次的第16/17天的数据的汇总。

[0226] 图69:关于TIL的扩展表型的数据:示出通过示范性Gen 3工艺实施例的两个工程改造轮次而产生的细胞的针对TIL身份(ID)特化的分化特征。

[0227] 图70:关于从肺肿瘤中扩增的TIL的扩展表型的数据:示出通过使用肺肿瘤组织的示范性Gen 3工艺实施例的两个工艺开发(PD)轮次而产生的细胞的针对TIL身份(ID)特化的分化特征。

[0228] 图71:关于从卵巢肿瘤中扩增的TIL的扩展表型(纯度、身份和记忆)的数据:示出使用示范性Gen 2、Gen 3.1和FR ER(冷冻肿瘤,早期REP)工艺实施例从卵巢肿瘤中扩增的细胞的纯度、一致性和记忆表型特征;*表示未测试的情况;Y表示采样问题、低TVC计数或解冻时的非活细胞。

[0229] 图72:示出表征TIL的门口策略(示出门控层次结构)和关于通过示范性Gen 3工艺实施例的两个工程改造轮次而产生的细胞的扩展表型特征的数据。

[0230] 图73:示出表征TIL的门控策略(示出门控层次结构)和关于通过示范性Gen 3工艺实施例的两个工程改造轮次而产生的细胞的CD4+亚群和CD8+亚群的扩展表型特征的数据。

[0231] 图74:示出关于通过示范性Gen 3工艺实施例的两个工程改造轮次而产生的细胞的颗粒酶B ELISA分析的数据。

[0232] 图75A-75B:Gen 3工艺(的一示范性实施例16天的工艺)的示意图。

[0233] 图76:Gen 3工艺的一示范性实施例(16天的工艺)的示意图。

[0234] 图77:Gen 2、Gen 2.1和Gen 3工艺的一实施例(16天的工艺)的比较。

[0235] 图78:Gen 2、Gen 2.1和Gen 3工艺的一实施例(16天的工艺)的比较。

[0236] 图79:Gen 3实施例的组成部分。

[0237] 图80:Gen 3实施例的流程图比较(Gen 3.0、Gen 3.1对照、Gen 3.1测试)。

[0238] 图81:展现使用标准细胞培养基和无血清细胞培养基的示范性Gen 3实施例(Gen 3.0、Gen 3.1对照和Gen 3.1测试)的总活细胞计数和倍数扩增。

[0239] 图82:展现使用标准细胞培养基和无血清细胞培养基的示范性Gen 3实施例(Gen 3.0、Gen 3.1对照和Gen 3.1测试)在再活化、规模扩大培养和TIL采集后的存活%分值。

[0240] 图83:展现通过在使用标准细胞培养基和CTS无血清细胞培养基的示范性Gen 3工艺 (Gen 3.0、Gen 3.1对照和Gen 3.1测试)中处理L4063和L4064肿瘤样品而产生的最终TIL 产物的表型表征。

[0241] 图84:展现通过在使用标准细胞培养基和CTS无血清细胞培养基的示范性Gen 3工艺 (Gen 3.0、Gen 3.1对照和Gen 3.1测试)中处理L4063和L4064肿瘤样品而产生的TIL产物的记忆标记分析。

[0242] 图85:展现通过在使用标准细胞培养基和CTS无血清细胞培养基的示范性Gen 3工艺 (Gen 3.0、Gen 3.1对照和Gen 3.1测试)中处理L4063和L4064肿瘤样品接着进行CD4+门控细胞分选而产生的TIL的活化和耗尽标记。

[0243] 图86:展现通过在使用标准细胞培养基和CTS无血清细胞培养基的示范性Gen 3工艺 (Gen 3.0、Gen 3.1对照和Gen 3.1测试)中处理L4063和L4064肿瘤样品接着进行CD8+门控细胞分选而产生的TIL的活化和耗尽标记。

[0244] 图87:展现通过在使用标准细胞培养基和CTS无血清细胞培养基的示范性Gen 3工艺(Gen 3.0、Gen 3.1对照和Gen 3.1测试)中处理L4063和L4064肿瘤样品而产生的最终TIL产物的IFN-γ产生(pg/mL)分值。

[0245] 图88:展现在使用标准细胞培养基和CTS无血清细胞培养基的示范性Gen 3工艺(Gen 3.0、Gen 3.1对照和Gen 3.1测试)中处理L4063和L4064肿瘤样品的(在再活化、规模扩大培养和TIL采集时收集的)废培养基的IL-2浓度(pg/mL)分析。

[0246] 图89:展现在使用标准细胞培养基和CTS无血清细胞培养基的示范性Gen 3工艺(Gen 3.0、Gen 3.1对照和Gen 3.1测试)中处理L4063和L4064肿瘤样品的(在再活化、规模扩大培养和TIL采集时收集的)废培养基中的葡萄糖浓度(g/L)。

[0247] 图90:展现在使用标准细胞培养基和CTS无血清细胞培养基的示范性Gen 3工艺(Gen 3.0、Gen 3.1对照和Gen 3.1测试)中处理L4063和L4064肿瘤样品的(在再活化、规模

扩大培养和TIL采集时收集的)废培养基中的乳酸浓度(g/L)。

[0248] 图91:展现在使用标准细胞培养基和CTS无血清细胞培养基的示范性Gen 3工艺(Gen 3.0、Gen 3.1对照和Gen 3.1测试)中处理L4063和L4064肿瘤样品的(在再活化、规模扩大培养和TIL采集时收集的)废培养基中的谷氨酰胺浓度(mmol/L)。

[0249] 图92:展现在使用标准细胞培养基和CTS无血清细胞培养基的示范性Gen 3工艺(Gen 3.0、Gen 3.1对照和Gen 3.1测试)中处理L4063和L4064肿瘤样品的(在再活化、规模扩大培养和TIL采集时收集的)废培养基中的glutamax浓度(mmol/L)。

[0250] 图93:展现在使用标准细胞培养基和CTS无血清细胞培养基的示范性Gen 3工艺(Gen 3.0、Gen 3.1对照和Gen 3.1测试)中处理L4063和L4064肿瘤样品的(在再活化、规模扩大培养和TIL采集时收集的)废培养基中的氨浓度(mmol/L)。对Gen 3工艺的示范性实施例 (Gen 3.0、Gen 3.1对照、Gen 3.1测试)的端粒长度分析。由肿瘤识别编号L4063和L4064产生的细胞的端粒长度分析:相对端粒长度(RTL)值表示由Gen 3.0、Gen 3.1对照和Gen 3.1 测试工艺产生的细胞中每个染色体/基因组的端粒荧光相对于使用DAKO试剂盒的对照细胞系(1301白血病细胞系)中每个染色体/基因组的端粒荧光的平均值。

[0251] 图94:对通过使用标准细胞培养基和CTS无血清细胞培养基的Gen 3工艺的示范性实施例(Gen 3.0、Gen 3.1对照、Gen 3.1测试)产生的TIL的端粒长度分析。由肿瘤识别编号L4063 和L4064产生的细胞的端粒长度分析:相对端粒长度(RTL)值表示由Gen 3.0、Gen 3.1对照和Gen 3.1测试工艺产生的细胞中每个染色体/基因组的端粒荧光相对于使用DAKO试剂盒的对照细胞系(1301白血病细胞系)中每个染色体/基因组的端粒荧光的平均值。

[0252] 图95:通过使用标准细胞培养基和CTS无血清细胞培养基的Gen 3工艺的示范性实施例 (Gen 3.0、Gen 3.1对照、Gen 3.1测试)产生的TIL的TCR Vβ库汇总。描述了由肿瘤识别编号L4063和L4064产生并通过Gen 3.0、Gen 3.1对照和Gen 3.1测试工艺产生的最终TIL产物的TIL克隆性,如通过独特CDR3序列的TCR Vβ库所测量。

[0253] 图96:关于处理L4063肿瘤样品采集的TIL产物中的独特CDR3序列的频率,比较通过 Gen 3工艺的示范性实施例(Gen 3.0、Gen 3.1对照、Gen 3.1测试)产生的TIL。

[0254] 图97:关于处理L4063肿瘤样品采集的TIL细胞产物中的共享独特CDR3序列百分比,比较通过Gen 3工艺的示范性实施例(Gen 3.0、Gen 3.1对照、Gen 3.1测试)产生的TIL:Gen测试3.0与Gen 3.1测试最终产物之间共享975个序列,等效于Gen 3.0与Gen 3.1测试最终产物共享的前80%独特CDR3序列的88%。

[0255] 图98:关于处理L4064肿瘤样品采集的TIL细胞产物中的共享独特CDR3序列百分比,比较通过Gen 3工艺(的示范性实施例Gen 3.0、Gen 3.1对照、Gen 3.1测试)产生的TIL:Gen 3.0与Gen 3.1测试最终产物之间共享2163个序列,等效于Gen 3.0与Gen 3.1测试最终产物共享的前80%独特CDR3序列的87%。

[0256] 图99:关于处理L4064肿瘤样品采集的TIL产物中的独特CDR3序列的频率,比较通过 Gen 3工艺的示范性实施例(Gen 3.0、Gen 3.1对照、Gen 3.1测试)产生的TIL。

[0257] 图100:示出Gen 3工艺的示范性实施例的组成部分(Gen 3-优化,16-17天的工艺)。

[0258] 图101:验收标准表。

[0259] 图102:再活化日的细胞计数。

[0260] 图103:规模扩大日的细胞计数。

[0261] 图104:采集L4063的细胞计数。

[0262] 图105:采集L4064的细胞计数。

[0263] 图106:流式细胞测量数据。

[0264] 图107:流式细胞测量数据。

[0265] 图108:流式细胞测量数据。

[0266] 图109:流式细胞测量数据。

[0267] 图110:图7-L4063的IFN-γ产生数据。

[0268] 图111:图7-L4064的IFN-γ产生数据。

[0269] 图112:IL-2浓度数据的ELISA分析。

[0270] 图113:代谢数据汇总表。

[0271] 图114:汇总数据。

[0272] 图115:汇总数据。

[0273] 图116:香农多样性指数。

[0274] 序列表的简要说明

[0275] SEQ ID NO:1为莫罗单抗(muromonab)的重链的氨基酸序列。

[0276] SEQ ID NO:2为莫罗单抗的轻链的氨基酸序列。

[0277] SEQ ID NO:3为重组人类IL-2蛋白的氨基酸序列。

[0278] SEQ ID NO:4为阿地白介素的氨基酸序列。

[0279] SEQ ID NO:5为重组人类IL-4蛋白的氨基酸序列。

[0280] SEQ ID NO:6为重组人类IL-7蛋白的氨基酸序列。

[0281] SEQ ID NO:7为重组人类IL-15蛋白的氨基酸序列。

[0282] SEQ ID NO:8为重组人类IL-21蛋白的氨基酸序列。

[0283] SEQ ID NO:9为人类4-1BB蛋白的氨基酸序列。

[0284] SEQ ID NO:10为鼠类4-1BB的氨基酸序列

[0285] SEQ ID NO:11为4-1BB激动剂单克隆抗体乌托米单抗(utomilumab)(PF-05082566)的重链。

[0286] SEQ ID NO:12为4-1BB激动剂单克隆抗体乌托米单抗(PF-05082566)的轻链。

[0287] SEQ ID NO:13为4-1BB激动剂单克隆抗体乌托米单抗(PF-05082566)的重链可变区 (VH)。

[0288] SEQ ID NO:14为4-1BB激动剂单克隆抗体乌托米单抗(PF-05082566)的轻链可变区 (VL)。

[0289] SEQ ID NO:15为4-1BB激动剂单克隆抗体乌托米单抗(PF-05082566)的重链CDR1。

[0290] SEQ ID NO:16为4-1BB激动剂单克隆抗体乌托米单抗(PF-05082566)的重链CDR2。

[0291] SEQ ID NO:17为4-1BB激动剂单克隆抗体乌托米单抗(PF-05082566)的重链CDR3。

[0292] SEQ ID NO:18为4-1BB激动剂单克隆抗体乌托米单抗(PF-05082566)的轻链CDR1。

[0293] SEQ ID NO:19为4-1BB激动剂单克隆抗体乌托米单抗(PF-05082566)的轻链CDR2。

[0294] SEQ ID NO:20为4-1BB激动剂单克隆抗体乌托米单抗(PF-05082566)的轻链CDR3。

[0295] SEQ ID NO:21为4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(urelumab)(BMS-663513)的

重链。

[0296] SEQ ID NO:22为4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的轻链。

[0297] SEQ ID NO:23为4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的重链可变区(VH)。

[0298] SEQ ID NO:24为4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的轻链可变区(VL)。

[0299] SEQ ID NO:25为4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的重链CDR1。

[0300] SEQ ID NO:26为4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的重链CDR2。

[0301] SEQ ID NO:27为4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的重链CDR3。

[0302] SEQ ID NO:28为4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的轻链CDR1。

[0303] SEQ ID NO:29为4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的轻链CDR2。

[0304] SEQ ID NO:30为4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的轻链CDR3。

[0305] SEQ ID NO:31为TNFRSF激动剂融合蛋白的Fc域。

[0306] SEQ ID NO:32为TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0307] SEQ ID NO:33为TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0308] SEQ ID NO:34为TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0309] SEQ ID NO:35为TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0310] SEQ ID NO:36为TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0311] SEQ ID NO:37为TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0312] SEQ ID NO:38为TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0313] SEQ ID NO:39为TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0314] SEQ ID NO:40为TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0315] SEQ ID NO:41为TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0316] SEQ ID NO:42为TNFRSF激动剂融合蛋白的Fc域。

[0317] SEQ ID NO:43为TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0318] SEQ ID NO:44为TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0319] SEQ ID NO:45为TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0320] SEQ ID NO:46为4-1BB配体(4-1BBL)氨基酸序列。

[0321] SEQ ID NO:47为4-1BBL多肽的可溶性部分。

[0322] SEQ ID NO:48为4-1BB激动剂抗体4B4-1-1版本1的重链可变区(VH)。

[0323] SEQ ID NO:49为4-1BB激动剂抗体4B4-1-1版本1的轻链可变区(VL)。

[0324] SEQ ID NO:50为4-1BB激动剂抗体4B4-1-1版本2的重链可变区(VH)。

[0325] SEQ ID NO:51为4-1BB激动剂抗体4B4-1-1版本2的轻链可变区(VL)。

[0326] SEQ ID NO:52为4-1BB激动剂抗体H39E3-2的重链可变区(VH)。

[0327] SEQ ID NO:53为4-1BB激动剂抗体H39E3-2的轻链可变区(VL)。

[0328] SEQ ID NO:54为人类OX40的氨基酸序列。

[0329] SEQ ID NO:55为鼠类OX40的氨基酸序列。

[0330] SEQ ID NO:56为OX40激动剂单克隆抗体他沃立珠单抗(tavolixizumab)(MEDI-0562)的重链。

[0331] SEQ ID NO:57为OX40激动剂单克隆抗体他沃立珠单抗(MEDI-0562)的轻链。

[0332] SEQ ID NO:58为OX40激动剂单克隆抗体他沃立珠单抗(MEDI-0562)的重链可变区(VH)。

[0333] SEQ ID NO:59为OX40激动剂单克隆抗体他沃立珠单抗(MEDI-0562)的轻链可变区(VL)。

[0334] SEQ ID NO:60为OX40激动剂单克隆抗体他沃立珠单抗(MEDI-0562)的重链CDR1。

[0335] SEQ ID NO:61为OX40激动剂单克隆抗体他沃立珠单抗(MEDI-0562)的重链CDR2。

[0336] SEQ ID NO:62为OX40激动剂单克隆抗体他沃立珠单抗(MEDI-0562)的重链CDR3。

[0337] SEQ ID NO:63为OX40激动剂单克隆抗体他沃立珠单抗(MEDI-0562)的轻链CDR1。

[0338] SEQ ID NO:64为OX40激动剂单克隆抗体他沃立珠单抗(MEDI-0562)的轻链CDR2。

[0339] SEQ ID NO:65为OX40激动剂单克隆抗体他沃立珠单抗(MEDI-0562)的轻链CDR3。

[0340] SEQ ID NO:66为OX40激动剂单克隆抗体11D4的重链。

[0341] SEQ ID NO:67为OX40激动剂单克隆抗体11D4的轻链。

[0342] SEQ ID NO:68为OX40激动剂单克隆抗体11D4的重链可变区(VH)。

[0343] SEQ ID NO:69为OX40激动剂单克隆抗体11D4的轻链可变区(VL)。

[0344] SEQ ID NO:70为OX40激动剂单克隆抗体11D4的重链CDR1。

[0345] SEQ ID NO:71为OX40激动剂单克隆抗体11D4的重链CDR2。

[0346] SEQ ID NO:72为OX40激动剂单克隆抗体11D4的重链CDR3。

[0347] SEQ ID NO:73为OX40激动剂单克隆抗体11D4的轻链CDR1。

[0348] SEQ ID NO:74为OX40激动剂单克隆抗体11D4的轻链CDR2。

[0349] SEQ ID NO:75为OX40激动剂单克隆抗体11D4的轻链CDR3。

[0350] SEQ ID NO:76为OX40激动剂单克隆抗体18D8的重链。

[0351] SEQ ID NO:77为OX40激动剂单克隆抗体18D8的轻链。

[0352] SEQ ID NO:78为OX40激动剂单克隆抗体18D8的重链可变区(VH)。

[0353] SEQ ID NO:79为OX40激动剂单克隆抗体18D8的轻链可变区(VL)。

[0354] SEQ ID NO:80为OX40激动剂单克隆抗体18D8的重链CDR1。

[0355] SEQ ID NO:81为OX40激动剂单克隆抗体18D8的重链CDR2。

[0356] SEQ ID NO:82为OX40激动剂单克隆抗体18D8的重链CDR3。

[0357] SEQ ID NO:83为OX40激动剂单克隆抗体18D8的轻链CDR1。

[0358] SEQ ID NO:84为OX40激动剂单克隆抗体18D8的轻链CDR2。

[0359] SEQ ID NO:85为OX40激动剂单克隆抗体18D8的轻链CDR3。

[0360] SEQ ID NO:86为OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的重链可变区(VH)。

[0361] SEQ ID NO:87为OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的轻链可变区(VL)。

[0362] SEQ ID NO:88为OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的重链CDR1。

[0363] SEQ ID NO:89为OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的重链CDR2。

[0364] SEQ ID NO:90为OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的重链CDR3。

[0365] SEQ ID NO:91为OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的轻链CDR1。

[0366] SEQ ID NO:92为OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的轻链CDR2。

[0367] SEQ ID NO:93为OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的轻链CDR3。

[0368] SEQ ID NO:94为OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的重链可变区(VH)。

[0369] SEQ ID NO:95为OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的轻链可变区(VL)。

[0370] SEQ ID NO:96为OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的重链CDR1。

[0371] SEQ ID NO:97为OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的重链CDR2。

[0372] SEQ ID NO:98为OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的重链CDR3。

[0373] SEQ ID NO:99为OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的轻链CDR1。

[0374] SEQ ID NO:100为OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的轻链CDR2。

[0375] SEQ ID NO:101为OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的轻链CDR3。

[0376] SEQ ID NO:102为OX40配体(OX40L)氨基酸序列。

[0377] SEQ ID NO:103为OX40L多肽的可溶性部分。

[0378] SEQ ID NO:104为OX40L多肽的替代可溶性部分。

[0379] SEQ ID NO:105为OX40激动剂单克隆抗体008的重链可变区(VH)。

[0380] SEQ ID NO:106为OX40激动剂单克隆抗体008的轻链可变区(VL)。

[0381] SEQ ID NO:107为OX40激动剂单克隆抗体011的重链可变区(VH)。

[0382] SEQ ID NO:108为OX40激动剂单克隆抗体011的轻链可变区(VL)。

[0383] SEQ ID NO:109为OX40激动剂单克隆抗体021的重链可变区(VH)。

[0384] SEQ ID NO:110为OX40激动剂单克隆抗体021的轻链可变区(VL)。

[0385] SEQ ID NO:111为OX40激动剂单克隆抗体023的重链可变区(VH)。

[0386] SEQ ID NO:112为OX40激动剂单克隆抗体023的轻链可变区(VL)。

[0387] SEQ ID NO:113为OX40激动剂单克隆抗体的重链可变区(VH)。

[0388] SEQ ID NO:114为OX40激动剂单克隆抗体的轻链可变区(VL)。

[0389] SEQ ID NO:115为OX40激动剂单克隆抗体的重链可变区(VH)。

[0390] SEQ ID NO:116为OX40激动剂单克隆抗体的轻链可变区(VL)。

[0391] SEQ ID NO:117为人类化OX40激动剂单克隆抗体的重链可变区(VH)。

[0392] SEQ ID NO:118为人类化OX40激动剂单克隆抗体的重链可变区(VH)。

[0393] SEQ ID NO:119为人类化OX40激动剂单克隆抗体的轻链可变区(VL)。

[0394] SEQ ID NO:120为人类化OX40激动剂单克隆抗体的轻链可变区(VL)。

[0395] SEQ ID NO:121为人类化OX40激动剂单克隆抗体的重链可变区(VH)。

[0396] SEQ ID NO:122为人类化OX40激动剂单克隆抗体的重链可变区(VH)。

[0397] SEQ ID NO:123为人类化OX40激动剂单克隆抗体的轻链可变区(VL)。

[0398] SEQ ID NO:124为人类化OX40激动剂单克隆抗体的轻链可变区(VL)。

[0399] SEQ ID NO:125为OX40激动剂单克隆抗体的重链可变区(VH)。

[0400] SEQ ID NO:126为OX40激动剂单克隆抗体的轻链可变区(VL)。

[0401] SEQ ID NO:127-462当前未分配。

[0402] SEQ ID NO:463为PD-1抑制剂纳武单抗的重链氨基酸序列。

[0403] SEQ ID NO:464为PD-1抑制剂纳武单抗的轻链氨基酸序列。

[0404] SEQ ID NO:465为PD-1抑制剂纳武单抗的重链可变区(V_H)氨基酸序列。

[0405] SEQ ID NO:466为PD-1抑制剂纳武单抗的轻链可变区(V_L)氨基酸序列。

[0406] SEQ ID NO:467为PD-1抑制剂纳武单抗的重链CDR1氨基酸序列。

[0407] SEQ ID NO:468为PD-1抑制剂纳武单抗的重链CDR2氨基酸序列。

[0408] SEQ ID NO:469为PD-1抑制剂纳武单抗的重链CDR3氨基酸序列。

[0409] SEQ ID NO:470为PD-1抑制剂纳武单抗的轻链CDR1氨基酸序列。

[0410] SEQ ID NO:471为PD-1抑制剂纳武单抗的轻链CDR2氨基酸序列。

[0411] SEQ ID NO:472为PD-1抑制剂纳武单抗的轻链CDR3氨基酸序列。

[0412] SEQ ID NO:473为PD-1抑制剂派立珠单抗的重链氨基酸序列。

[0413] SEQ ID NO:474为PD-1抑制剂派立珠单抗的轻链氨基酸序列。

[0414] SEQ ID NO:475为PD-1抑制剂派立珠单抗的重链可变区(V_H)氨基酸序列。

[0415] SEQ ID NO:476为PD-1抑制剂派立珠单抗的轻链可变区(V_L)氨基酸序列。

[0416] SEQ ID NO:477为PD-1抑制剂派立珠单抗的重链CDR1氨基酸序列。

[0417] SEQ ID NO:478为PD-1抑制剂派立珠单抗的重链CDR2氨基酸序列。

[0418] SEQ ID NO:479为PD-1抑制剂派立珠单抗的重链CDR3氨基酸序列。

[0419] SEQ ID NO:480为PD-1抑制剂派立珠单抗的轻链CDR1氨基酸序列。

[0420] SEQ ID NO:481为PD-1抑制剂派立珠单抗的轻链CDR2氨基酸序列。

[0421] SEQ ID NO:482为PD-1抑制剂派立珠单抗的轻链CDR3氨基酸序列。

[0422] SEQ ID NO:483为PD-L1抑制剂度伐单抗的重链氨基酸序列。

[0423] SEQ ID NO:484为PD-L1抑制剂度伐单抗的轻链氨基酸序列。

[0424] SEQ ID NO:485为PD-L1抑制剂度伐单抗的重链可变区(V_H)氨基酸序列。

[0425] SEQ ID NO:486为PD-L1抑制剂度伐单抗的轻链可变区(V_L)氨基酸序列。

[0426] SEQ ID NO:487为PD-L1抑制剂度伐单抗的重链CDR1氨基酸序列。

[0427] SEQ ID NO:488为PD-L1抑制剂度伐单抗的重链CDR2氨基酸序列。

[0428] SEQ ID NO:489为PD-L1抑制剂度伐单抗的重链CDR3氨基酸序列。

[0429] SEQ ID NO:490为PD-L1抑制剂度伐单抗的轻链CDR1氨基酸序列。

[0430] SEQ ID NO:491为PD-L1抑制剂度伐单抗的轻链CDR2氨基酸序列。

[0431] SEQ ID NO:492为PD-L1抑制剂度伐单抗的轻链CDR3氨基酸序列。

[0432] SEQ ID NO:493为PD-L1抑制剂阿维鲁单抗的重链氨基酸序列。

[0433] SEQ ID NO:494为PD-L1抑制剂阿维鲁单抗的轻链氨基酸序列。

[0434] SEQ ID NO:495为PD-L1抑制剂阿维鲁单抗的重链可变区(V_H)氨基酸序列。

[0435] SEQ ID NO:496为PD-L1抑制剂阿维鲁单抗的轻链可变区(V_L)氨基酸序列。

[0436] SEQ ID NO:497为PD-L1抑制剂阿维鲁单抗的重链CDR1氨基酸序列。

[0437] SEQ ID NO:498为PD-L1抑制剂阿维鲁单抗的重链CDR2氨基酸序列。

[0438] SEQ ID NO:499为PD-L1抑制剂阿维鲁单抗的重链CDR3氨基酸序列。

[0439] SEQ ID NO:500为PD-L1抑制剂阿维鲁单抗的轻链CDR1氨基酸序列。

[0440] SEQ ID NO:501为PD-L1抑制剂阿维鲁单抗的轻链CDR2氨基酸序列。

[0441] SEQ ID NO:502为PD-L1抑制剂阿维鲁单抗的轻链CDR3氨基酸序列。

[0442] SEQ ID NO:503为PD-L1抑制剂阿特珠单抗的重链氨基酸序列。

[0443] SEQ ID NO:504为PD-L1抑制剂阿特珠单抗的轻链氨基酸序列。

[0444] SEQ ID NO:505为PD-L1抑制剂阿特珠单抗的重链可变区(V_H)氨基酸序列。

[0445] SEQ ID NO:506为PD-L1抑制剂阿特珠单抗的轻链可变区(V_L)氨基酸序列。

[0446] SEQ ID NO:507为PD-L1抑制剂阿特珠单抗的重链CDR1氨基酸序列。

[0447] SEQ ID NO:508为PD-L1抑制剂阿特珠单抗的重链CDR2氨基酸序列。

[0448] SEQ ID NO:509为PD-L1抑制剂阿特珠单抗的重链CDR3氨基酸序列。

[0449] SEQ ID NO:510为PD-L1抑制剂阿特珠单抗的轻链CDR1氨基酸序列。

[0450] SEQ ID NO:511为PD-L1抑制剂阿特珠单抗的轻链CDR2氨基酸序列。

[0451] SEQ ID NO:512为PD-L1抑制剂阿特珠单抗的轻链CDR3氨基酸序列。

具体实施方式

[0452] I.简介

[0453] 利用通过快速扩增方案(REP)离体培养的TIL的过继性细胞疗法在患有例如黑素瘤的癌症的患者中进行宿主免疫抑止之后已产生成功的过继性细胞疗法。当前的输注接受参数依赖于TIL组成的读数(例如,CD28、CD8或CD4阳性)且依赖于REP产物的倍数扩增和存活率。

[0454] 当前的REP方案几乎不了解将输注到患者体内的TIL的健康状况。T细胞在从天然T细胞到效应T细胞的成熟过程期间经历了深入的代谢转变(参见Chang等人,《自然免疫学(Nat. Immunol.)》2016,17,364,以全文引用的方式明确地并入本文中,且确切地说用于无氧及有氧代谢的论述和标记)。举例来说,天然T细胞依赖于线粒体呼吸以产生ATP,而成熟健康的效应T细胞(例如TIL)依赖于有氧糖酵解进行高度糖酵解以提供其增殖、迁移、活化和抗肿瘤疗效所需的生物能量学底物。

[0455] 当前的TIL制造和治疗工艺受到时长、成本、无菌问题以及本文中所描述的其它因素限制,如治疗难以用抗PD1治疗的患者的潜能,且因此受到严重限制。迫切需要提供TIL制造工艺和基于这类工艺的疗法,所述疗法适用于治疗对其具有极少或仍无可行治疗选项的患者。本发明因提供用于产生TIL的缩短制造工艺而符合此需求,所述TIL可用于治疗难以用抗 PD-1治疗的非小细胞肺癌(NSCLC)患者。

[0456] II.定义

[0457] 除非另外规定,否则本文中所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员通常所理解相同的含义。本文提及的所有专利和公开均以其全文引用的方式并入本文中。

[0458] 如本文中所使用的术语“共同给药(co-administration)”、“共同给予(co-administering)”、“与组合给予(administered in combination with/administering in combination with)”、“同时”和“并行”涵盖向个体给予两种或更多种活性医药成分(在本发明的一优选实施例中,例如,多种TIL),以使得活性医药成分和/或其代谢物同时存在于所述个体中。共同给药包括以独立组合物形式同时给药、以独立组合物形式在不同时间给药或以存在两种或更多种活性医药成分的组合物形式给药。以独立组合物形式同时给药和以存在两种药剂的组合物形式给药为优选的。

[0459] 术语“活体内”是指在个体体内发生的事件。

[0460] 术语“活体外”是指在个体体外发生的事件。活体外检定涵盖基于细胞的检定,其中采用存活或死亡的细胞;并且还可以涵盖无细胞检定,其中不采用完整的细胞。

[0461] 术语“离体”是指涉及在已从个体体内去除的细胞、组织和/或器官上治疗或执行

程序的事件。适当地，可以手术或治疗方法将细胞、组织和/或器官返回到个体体内。

[0462] 术语“快速扩增”意指抗原特异性TIL的数量在一周的时段内增加至少约3倍(或4倍、5倍、6倍、7倍、8倍或9倍)，更优选地在一周的时段内增加至少约10倍(或20倍、30 倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍或90倍)，或优选在一周的时段内增加至少约100倍。本文中描述多个快速扩增方案。

[0463] 本文中的“肿瘤浸润淋巴细胞”或“TIL”意指最初以白细胞形式获得的细胞群体，所述细胞已离开个体的血流且迁移到肿瘤中。TIL包括(但不限于)$CD8^+$细胞毒性T细胞(淋巴细胞)、Th1及Th17$CD4^+$T细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞和M1巨噬细胞。TIL包括初始和次级TIL两种。“初始TIL”为如本文中所概述获自患者组织样品的那些TIL(有时称为“新采集的”)，且“次级TIL”为如本文所论述已扩增或增殖的任何TIL细胞群体，包括(但不限于)块状TIL和扩增TIL(“REP TIL”或“post-REP TIL”)。TIL细胞群体可包括经基因修饰的TIL。

[0464] 本文中的“细胞群体”(包括TIL)意指许多具有共同特点的细胞。一般来说，群体的数量通常介于1×10^6到1×10^{10}范围内，其中不同TIL群体包含不同的数量。举例来说，初始TIL 在存在IL-2情况下的初始生长会产生具有大致1×10^8个细胞的块状TIL群体。通常完成REP 扩增以提供具有1.5×10^9至1.5×10^{10}个细胞的群体供输注。

[0465] 本文中的“冷冻保存的TIL”意指在约-150℃至-60℃范围内处理或存储的TIL(初始、块状或扩增(REP TIL))。用于冷冻保存的通用方法亦在本文中的其它地方(包括实例中)描述。为了清楚起见，“冷冻保存的TIL”可区别于可用作初始TIL的来源的冷冻组织样品。

[0466] 本文中的“解冻的冷冻保存TIL”意指先前被冷冻保存并且随后进行处理以恢复至室温或更高温度(包括(但不限于)细胞培养温度或可向患者给予TIL的温度)的TIL群体。

[0467] TIL通常可以使用细胞表面标记物进行生物化学定义，或通过其浸渗肿瘤且实现治疗的能力进行功能定义。TIL通常可以通过表达以下生物标记物中的一个或多个来进行分类：CD4、CD8、TCRαβ、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1和CD25。另外地且替代地，TIL可以通过将其再引入到患者体内后浸润实体肿瘤的能力进行功能定义。

[0468] 术语“冷冻保存介质(cryopreservation media/cryopreservation medium)”是指可用于冷冻保存细胞的任何介质。这类介质可包括包含7％至10％DMSO的介质。示范性介质包含 CryoStor CS10、Hyperthermasol以及其组合。术语“CS10”是指获自Stemcell Technologies 或Biolife Solutions的冷冻保存介质。CS10介质可以由商标名“CryoStor® CS10”指代。CS10 介质为包含DMSO的无血清无动物组分介质。

[0469] 术语“中央记忆T细胞”是指人类中为CD45RO+且组成性表达CCR7(CCR7^{hi})和CD62L(CD62^{hi})的T细胞子集。中央记忆T细胞的表面表型还包括TCR、CD3、CD127(IL-7R) 和IL-15R。中央记忆T细胞的转录因子包括BCL-6、BCL-6B、MBD2和BMI1。TCR触发之后，中央记忆T细胞主要分泌IL-2和CD40L作为效应分子。中央记忆T细胞主要存在于血液中的CD4区室中，并且在人体中按比例地富集于淋巴结和扁桃体中。

[0470] 术语“效应记忆T细胞”是指如中央记忆T细胞为CD45RO+，但已失去CCR7的组成性表达(CCR7^{lo})并且对于CD62L表达而言为异质或较低(CD62L^{lo})的人类或哺乳动物T细胞的子集。中央记忆T细胞的表面表型还包括TCR、CD3、CD127(IL-7R)和IL-15R。中央记忆T细胞的转录因子包括BLIMP1。效应记忆T细胞在抗原刺激之后迅速地分泌高水平的发炎性细胞

因子,包括干扰素-γ、IL-4和IL-5。中央记忆T细胞主要存在于血液中的CD8 区室中,且在人体中按比例地富集于肺、肝脏和肠道中。CD8+效应记忆T细胞携带大量穿孔素。

[0471] 术语“封闭系统”是指对外部环境封闭的系统。本发明方法可采用适合于细胞培养方法的任何封闭系统。封闭系统包括(例如)但不限于封闭的G容器。一旦将肿瘤节段添加到封闭系统中,所述系统就不会对外部环境开放直到准备将TIL给予患者。

[0472] 如本文中用于描述破坏肿瘤的工艺的术语“碎裂”、“碎片”和“碎裂的”包括机械碎裂方法,例如压碎、切割、分裂和切碎肿瘤组织以及破坏肿瘤组织的物理结构的任何其它方法。

[0473] 术语“外周血单核细胞”和“PBMC”是指具有圆形细胞核的外周血细胞,包括淋巴细胞(T细胞、B细胞、NK细胞)和单核细胞。当用作抗原呈递细胞(PBMC是一种类型的抗原呈递细胞)时,外周血单核细胞优选地照射同种异体外周血单核细胞。

[0474] 术语“外周血淋巴细胞”和“PBL”是指自外周血扩增的T细胞。在一些实施例中,从来自供体的全血或单采术(apheresis)产物中分离PBL。在一些实施例中,通过T细胞表型(例如CD3+CD45+的T细胞表型)的正向或负向选择,从来自供体的全血或单采术产物中分离PBL。

[0475] 术语“抗CD3抗体”是指针对成熟T细胞的T细胞抗原受体中的CD3受体的抗体或其变体,例如单克隆抗体,并且包括人类、人类化、嵌合或鼠类抗体。抗CD3抗体包括OKT-3,又称为莫罗单抗。抗CD3抗体还包括UHCT1克隆株,又称为T3和CD3ε。其它抗CD3抗体包括(例如)奥昔珠单抗(otelixizumab)、替利珠单抗(teplizumab)和维西珠单抗 (visilizumab)。

[0476] 术语“OKT-3”(本文中也称为“OKT3”)是指针对成熟T细胞的T细胞抗原受体中的CD3受体的单克隆抗体或其生物类似物或变体,包括人类、人类化、嵌合或鼠类抗体,且包括可商购的形式,例如OKT-3(30ng/mL,MACS GMP CD3纯,美天旎生物技术有限公司(Miltenyi Biotech,Inc.),美国加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego,CA,USA))和莫罗单抗或其变体、保守氨基酸取代、糖型或生物类似物。表1中给出莫罗单抗的重链和轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2)。能够产生OKT-3的杂交瘤是由美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection)保藏并且分配ATCC寄存编号CRL 8001。能够产生OKT-3的杂交瘤也由欧洲认证的细胞培养物集存库(European Collection of Authenticated Cell Cultures;ECACC)保藏并且分配目录号86022706。

[0477] 表1.莫罗单抗的氨基酸序列。

[0478]

标识符	序列(单字母氨基酸符号)	
SEQ ID NO:1 莫罗单抗重链	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID NO:2 莫罗单抗轻链	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC	60 120 180 213

[0479] 术语“IL-2”(本文中也称为“IL2”)是指称为白细胞介素-2的T细胞生长因子,并且包括所有形式的IL-2,包括其人类及哺乳动物形式、保守氨基酸取代、糖型、生物类似物和

变体。IL-2描述于例如Nelson,《免疫学杂志(J.Immunol.)》2004,172,3983-88和Malek,《免疫学年鉴(Annu.Rev.Immunol.)》2008,26,453-79中,其公开内容以引用的方式并入本文中。表2中给出适用于本发明的重组人类IL-2的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)。举例来说,术语IL-2 涵盖人类重组形式的IL-2,例如阿地白介素(PROLEUKIN,可从多个供应商购得,每个一次性使用小瓶有2200万IU),以及由美国新罕布夏州朴茨茅斯小镇(Portsmouth,NH,USA)的CellGenix公司(CELLGRO GMP)或美国新泽西州东布朗斯维克(East Brunswick,NJ,USA)的ProSpec-Tany TechnoGene有限公司(目录号CYT-209-b)市售的重组IL-2形式和来自其它供应商的其它商业等效物。阿地白介素(去-丙氨酰基-1、丝氨酸-125人类IL-2)为具有大致 15kDa的分子量的非糖基化人类重组形式的IL-2。表2中给出适用于本发明的阿地白介素的氨基酸序列(SEQ ID NO:4)。术语IL-2还涵盖如本文所描述的聚乙二醇化形式的IL-2,包括聚乙二醇化IL2前药NKTR-214,购自美国加利福尼亚州南旧金山(South San Francisco,CA, USA)的内克塔治疗公司(Nektar Therapeutics)。适用于本发明的NKTR-214和聚乙二醇化 IL-2描述于美国专利申请公开第US 2014/0328791 A1号和国际专利申请公开第WO 2012/065086A1号中,其公开内容以引用的方式并入本文中。适用于本发明的替代形式的共轭IL-2描述于美国专利第4,766,106号、第5,206,344号、第5,089,261号和第4902,502号中,其公开内容以引用的方式并入本文中。适用于本发明的IL-2调配物描述于美国专利第 6,706,289号中,其公开内容以引用的方式并入本文中。

[0480] 表2.白细胞介素的氨基酸序列。

[0481]

标识符	序列(单字母氨基酸符号)	
SEQ ID NO:3 重组人类IL-2 (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN RWITFCQSII STLT	60 120 134
SEQ ID NO:4 阿地白介素	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFSQSIIST LT	60 120 132
SEQ ID NO:5 重组人类IL-4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI MREKYSKCSS	60 120 130
SEQ ID NO:6 重组人类IL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH	60 120 153
SEQ ID NO:7 重组人类IL-15 (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS	60 115
SEQ ID NO:8 重组人类IL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ HLSSRTHGSE DS	60 120 132

[0482] 术语“IL-4”(本文中也称为“IL4”)是指称为白细胞介素4的细胞因子,其由Th2T细胞且由嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和肥大细胞产生。IL-4调节天然辅助T细胞(Th0细胞)分化成Th2T细胞。Steinke和Borish,《呼吸研究(Respir.Res.)》2001,2,66-70。通过IL-4激活后,Th2T细胞随后在正反馈回路中产生额外IL-4。IL-4还刺激B细胞增殖和II类MHC 表达,且诱导类转换成B细胞的IgE和IgG_1表达。适用于本发明的重组人类IL-4可商购自多个供应商,包括美国新泽西州东布朗斯维克的ProSpec-Tany TechnoGene有限公司(目录号CYT-211)和美国马萨诸塞州沃尔瑟姆(Waltham,MA,USA)的赛默飞世尔科学有限公司(ThermoFisher Scientific,Inc.)(人类IL-15重组蛋白,目录号Gibco CTP0043)。表2中给出适用于本发明的重组人类IL-4的氨基酸序列(SEQ ID NO:5)。

[0483] 术语“IL-7”(本文中也称为“IL7”)是指称为白细胞介素7的糖基化组织衍生的细

胞因子,其可获自基质和上皮细胞,以及树突状细胞。Fry和Mackall,《血液(Blood)》2002,99, 3892-904。IL-7可以刺激T细胞的发育。IL-7结合至IL-7受体(一种由IL-7受体α和共同γ链受体组成的杂二聚体,其在一系列对于T细胞在胸腺内的发育和在外周内的存活而言至关重要的信号中)。适用于本发明的重组人类IL-7可商购自多个供应商,包括美国新泽西州东布朗斯维克的ProSpec-Tany TechnoGene有限公司(目录号CYT-254)和美国马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科学有限公司(人类IL-15重组蛋白,目录号Gibco PHC0071)。表2中给出适用于本发明的重组人类IL-7的氨基酸序列(SEQ ID NO:6)。

[0484] 术语“IL-15”(本文中也称为“IL15”)是指称为白细胞介素-15的T细胞生长因子,并且包括所有形式的IL-2,包括其人类及哺乳动物形式、保守氨基酸取代、糖型、生物类似物和变体。IL-15描述于例如Fehniger和Caligiuri,《血液》2001,97,14-32中,其公开内容以引用的方式并入本文中。IL-15与IL-2共用β及γ信号传导受体亚基。重组人类IL-15为分子量为12.8kDa的含有114个氨基酸(和N端甲硫氨酸)的非糖基化多肽单链。适用于本发明的重组人类IL-15可商购自多个供应商,包括美国新泽西州东布朗斯维克的ProSpec-Tany TechnoGene有限公司(目录号CYT-230-b)和美国马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科学有限公司(人类IL-15重组蛋白,目录号34-8159-82)。表2中给出适用于本发明的重组人类IL-15 的氨基酸序列(SEQ ID NO:7)。

[0485] 术语“IL-21”(本文中也称为“IL21”)是指称为白细胞介素-21的多效性细胞因子蛋白质,并且包括所有形式的IL-21,包括其人类及哺乳动物形式、保守氨基酸取代、糖型、生物类似物和变体。IL-21描述于例如Spolski和Leonard,《自然评论-药物研发(Nat.Rev.Drug. Disc.)》,2014,13,379-95中,其公开内容以引用的方式并入本文中。IL-21主要由自然杀伤T 细胞和活化的人类$CD4^+$T细胞产生。重组人类IL-21为分子量为15.4kDa的含有132个氨基酸的非糖基化多肽单链。适用于本发明的重组人类IL-21可商购自多个供应商,包括美国新泽西州东布朗斯维克的ProSpec-Tany TechnoGene有限公司(目录号CYT-408-b)和美国马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科学有限公司(人类IL-21重组蛋白,目录号14-8219-80)。表 2中给出适用于本发明的重组人类IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:8)。

[0486] 当指示“抗肿瘤有效量”、“肿瘤抑制有效量”或“治疗量”时,待给予的本发明组合物的精确量可由医师考虑年龄、体重、肿瘤尺寸、感染或转移程度方面的个体差异以及患者(个体)的病状来确定。通常可规定,本文中所描述的包含肿瘤浸润淋巴细胞(例如,次级TIL或经基因修饰的细胞毒性淋巴细胞)的医药组合物可以10^4至10^{11}个细胞/千克体重的剂量(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}个细胞/千克体重)(包括那些范围内的所有整数值)给予。肿瘤浸润淋巴细胞(在一些情况下,包括经基因修饰的细胞毒性淋巴细胞)组合物还可以这些剂量多次给予。肿瘤浸润淋巴细胞(在一些情况下,包括基因上的)可以通过使用免疫治疗中通常已知的输注技术给予(参见例如Rosenberg等人,《新英格兰医学期刊 (New Eng.J.of Med)》,319:1676,1988)。针对特定患者的最佳剂量和治疗方案可由医药领域的技术人员通过监测患者的疾病病征且相应地调整治疗来容易确定。

[0487] 术语“恶性血液病(hematological malignancy/hematologic malignancy)”或相关含义的术语是指造血和淋巴组织的哺乳动物癌症和肿瘤,包括(但不限于)血液、骨髓、淋

巴结和淋巴系统的组织。恶性血液病也称为“液体肿瘤”。恶性血液病包括(但不限于)急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性淋巴瘤(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性单核细胞性白血病(AMoL)、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin’s lymphoma)和非霍奇金氏淋巴瘤。术语“B细胞恶性血液病”是指影响 B细胞的恶性血液病。

[0488] 术语“液体肿瘤”是指本质上为流体的异常细胞块。液体肿瘤癌症包括(但不限于)白血病、骨髓瘤和淋巴瘤,以及其它恶性血液病。获自液体肿瘤的TIL在本文中还可称为骨髓浸润淋巴细胞(marrow infiltrating lymphocyte;MIL)。获自液体肿瘤(包括在外周血中循环的液体肿瘤)的TIL在本文中还可称为PBL。术语MIL、TIL和PBL在本文中可互换地使用,且仅基于细胞所衍生的组织类型而不同。

[0489] 如本文中所使用的术语“微环境”可指代整体上的实体或血液肿瘤微环境或指代所述微环境内的个别细胞子集。如本文中所使用的肿瘤微环境是指“促进赘生性转变、支持肿瘤生长和侵袭、避免肿瘤宿主免疫、促进治疗抗性并且提供显性癌转移至成长的生态位的细胞、可溶性因子、信号传导分子、胞外基质和机械诱因”的复杂混合物,如Swartz等人,《癌症研究(Cancer Res.)》2012,72,2473中所描述。尽管肿瘤表达应由T细胞识别的抗原,但由于微环境的免疫抑制作用,通过免疫系统清除肿瘤很罕见。

[0490] 在一实施例中,本发明包括用TIL群体治疗癌症的方法,其中在输注根据本发明的TIL 之前,用非清髓性化学疗法对患者进行预治疗。在一些实施例中,可提供TIL群体,其中在输注根据本发明的TIL之前,用非清髓性化学疗法对患者进行预治疗。在一实施例中,非清髓性化学疗法为环磷酰胺60mg/kg/d持续2天(在TIL输注之前的第27天和第26天)和氟达拉滨25mg/m^2/d持续5天(TIL输注之前的第27天至第23天)。在一实施例中,在非清髓性化学疗法和根据本发明的TIL输注(第0天)之后,患者每8小时经静脉内接受720,000IU/kg IL-2的静脉内输注达至生理耐受。

[0491] 实验结果表明,在过继转移肿瘤特异性T淋巴细胞之前,淋巴细胞耗减通过消除调节T 细胞和免疫系统的竞争要素(“细胞因子库(cytokine sink)”)在增强治疗效果中发挥关键作用。因此,在引入本发明的rTIL之前,本发明的一些实施例对患者使用了淋巴细胞耗减步骤 (有时也称为“免疫抑制调节”)。

[0492] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指如本文所描述的足以实现预期应用(包括(但不限于)疾病治疗)的化合物或化合物组合的量。治疗有效量可以根据预期应用(活体外或活体内),或待治疗的个体状况及疾病病状(例如,个体的体重、年龄和性别)、疾病病状的严重程度或给药方式而变化。所述术语也适用于将在靶细胞中诱导特定反应(例如,减少血小板粘附和/或细胞迁移)的剂量。具体剂量将根据选定的特定化合物、所遵循的给药方案、所述化合物是否与其它化合物组合给予、给药时机、给予化合物的组织和运载化合物的物理递送系统而变化。

[0493] 术语“治疗(treatment/treating/treat)”和类似术语是指获得期望药理学和/或生理学效果。所述效果就完全或部分地预防疾病或其症状而言可为预防性的,且/或就部分或完全治愈疾病和/或由疾病引起的不良影响而言可为治疗性的。如本文中所使用的“治疗”涵盖哺乳动物的 (尤其人类的)疾病的任何治疗,且包括:(a)预防在可能易患疾病但尚未被诊断为患有疾病的个体中发生疾病;(b)抑制疾病,即,遏止其发展或进展;和(c)减轻

疾病，即，引起疾病消退和/或减轻一或多个疾病症状。“治疗”还意图涵盖递送甚至在不存在疾病或病状的情况下以实现药理学效果的药剂。举例来说，“治疗”涵盖递送在不存在疾病病状的情况下(例如在疫苗的情况下)可诱发免疫反应或赋予免疫性的组合物。

[0494] 术语“异源的”在涉及核酸或蛋白质的部分使用时，指示所述核酸或蛋白质包含两个或更多个在自然界中彼此之间没有相同关系的子序列。举例来说，核酸通常以重组方式产生，具有两个或更多个来自不相关基因的序列，所述序列被排列以制备新的功能核酸，例如来自一个来源的启动子和来自另一来源的编码区，或来自不同来源的编码区。类似地，异源蛋白质指示蛋白质包含两个或更多个在自然界中彼此之间没有相同关系的子序列(例如，融合蛋白)。

[0495] 在两种或更多种核酸或多肽的内容背景中，术语“序列一致性”、“一致性百分比”和“序列一致性百分比”(或其同义词，例如“99％一致”)是指两个或更多个序列或子序列为相同的或具有特定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基，当比较且比对(在必要时引入间隙)最大对应性时，不将任何保守氨基酸取代考虑为序列一致性的部分。一致性百分比可以使用序列比较软件或算法或通过目视检查测量。所属领域中已知可以用于获得氨基酸或核苷酸序列的比对的各种算法和软件。确定序列一致性百分比的合适程序包括例如可从美国政府的国家生物技术信息中心BLAST网站获得的BLAST程序套件。两个序列之间的比较可以使用 BLASTN或BLASTP算法来进行。BLASTN用于比较核酸序列，而BLASTP用于比较氨基酸序列。ALIGN、ALIGN-2(基因泰克公司(Genentech)，加利福尼亚州南旧金山(South San Francisco,California))或可从DNASTAR获得的MegAlign是可用于比对序列的其它可公开获得的软件程序。所属领域的技术人员可以通过特定比对软件来确定最大比对的适当参数。在某些实施例中，使用比对软件的默认参数。

[0496] 如本文中所使用，术语“变体”涵盖(但不限于)包含借助于在参考抗体的氨基酸序列内或邻近的某些位置的一个或多个取代、缺失和/或添加而与参考抗体的氨基酸序列不同的氨基酸序列的抗体或融合蛋白。与参考抗体的氨基酸序列相比，变体在其氨基酸序列中可以包含一个或多个保守性取代。保守性取代可涉及例如类似带电或不带电氨基酸的取代。变体保留了特异性结合于参考抗体的抗原的能力。术语变体还包括聚乙二醇化抗体或蛋白质。

[0497] 本文中的“肿瘤浸润淋巴细胞”或“TIL”意指最初以白细胞形式获得的细胞群体，所述细胞已离开个体的血流且迁移到肿瘤中。TIL包括(但不限于)$CD8^+$细胞毒性T细胞(淋巴细胞)、Th1及Th17$CD4^+$T细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞和M1巨噬细胞。TIL包括初始和次级TIL两种。“初始TIL”为如本文中所概述获自患者组织样品的那些TIL(有时称为“新采集的”)，且“次级TIL”为如本文所论述已扩增或增殖的任何TIL细胞群体，包括(但不限于)块状TIL、扩增TIL(“REP TIL”)以及如本文所论述的“reREP TIL”。reREP TIL 可包括例如第二次扩增TIL或第二次再扩增TIL(例如图8的步骤D中描述的那些，包括称为reREP TIL的TIL)。

[0498] TIL通常可以使用细胞表面标记物进行生物化学定义，或通过其浸渗肿瘤且实现治疗的能力进行功能定义。TIL通常可以通过表达以下生物标记物中的一个或多个来进行分类：CD4、 CD8、TCRαβ、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1和CD25。另外地且替代地，TIL可以通过将其再引入到患者体内后浸润实体肿瘤的能力进行功能定义。TIL可以进

一步通过效力表征，举例来说，如果例如干扰素(IFN)释放大于约50pg/mL、大于约100 pg/mL、大于约150pg/mL或大于约200pg/mL，那么TIL可以视为强效的。

[0499] 术语“脱氧核糖核苷酸”涵盖天然和合成的、未经修饰的和经修饰的脱氧核糖核苷酸。修饰包括寡核苷酸中糖部分、碱基部分和/或脱氧核糖核苷酸之间的键的变化。

[0500] 术语“RNA”定义包含至少一个核糖核苷酸残基的分子。术语“核糖核苷酸”定义在b-D- 呋喃核糖部分的2’位置具有羟基的核苷酸。术语RNA包括双链RNA、单链RNA、经分离RNA(例如部分纯化的RNA)、基本上纯的RNA、合成的RNA、以重组方式产生的RNA，以及通过一个或多个核苷酸的添加、缺失、取代和/或变异而不同于天然存在的RNA的变异 RNA。本文描述的RNA分子的核苷酸也可包含非标准核苷酸，例如非天然存在的核苷酸或化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。这些变异RNA可被称作类似物或天然产生的RNA的类似物。

[0501] 术语“药学上可接受的载剂”或“药学上可接受的赋形剂”旨在包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂，以及惰性成分。这类药学上可接受的载剂或药学上可接受的赋形剂针对活性医药成分的用途是所属领域中众所周知的。除非任何常规的药学上可接受的载剂或药学上可接受的赋形剂与活性医药成分不相容，否则考虑将其用于本发明的治疗性组合物中。另外的活性医药成分(例如其它药物)也可并入到所描述的组合物和方法中。

[0502] 术语“约”和“大致”意指在值的统计学上有意义的范围内。这类范围可在一定数量级内，优选在给定值或范围的50％内，更优选在20％内，更优选在10％内，且甚至更优选在5％内。术语“约”或“大致”涵盖的可允许的变化取决于研究的特定系统，并且所属领域的普通技术人员可容易地理解。此外，如本文中所使用，术语“约”和“大致”意指尺寸、大小、配方、参数、形状和其它量和特征不是且不必需是精确的，但可为近似的和/或更大或更小，视需要反映容差、转换因子、四舍五入、测量误差和类似物，以及所属领域的技术人员已知的其它因子。一般来说，尺寸、大小、配方、参数、形状或其它数量或特征为“约”或“近似”的，无论是否明确陈述如此。应注意，非常不同的大小、形状和尺寸的实施例可采用所描述的布置。

[0503] 过渡术语“包含”、“基本上由……组成”和“由...组成”以原始及修改的形式用于所附权利要求书时，定义了相对于哪些未列出的附加权利要求要素或步骤(如果存在)排除在权利要求的范围之外的权利要求范围。术语“包含”旨在包括端点或为开放式的并且不排除任何附加未列出的要素、方法、步骤或材料。术语“由...组成”排除权利要求书中指定的那些以外的任何要素、步骤或材料，并且在后一种情况下，排除与特定材料普通相关的杂质。术语“基本上由…组成”将权利要求书的范围限制于特定要素、步骤或材料和不实质上影响所要求的发明的基本和新颖特征的要素、步骤或材料。在替代实施例中，本文中所描述的实施本发明的所有组合物、方法和试剂盒可由任一过渡术语“包含”、“基本上由……组成”和“由... 组成”更具体地定义。

[0504] 术语“抗体(antibody)”和其复数形式“抗体(antibodies)”是指完整免疫球蛋白和其任何抗原结合片段(“抗原结合部分”)或单链。“抗体”进一步是指包含由二硫键互连的至少两个重(H)链及两个轻(L)链的糖蛋白，或其抗原结合部分。每条重链是由重链可变区(本文中缩写为V_H)和重链恒定区构成。重链恒定区由三个域CH1、CH2和CH3构成。每条轻链是由轻链可变区(在本文中缩写为V_L)和轻链恒定区构成。轻链恒定区是由一个域C_L构成。抗

体的V_H和V_L区可进一步细分为高变区，其称为互补决定区(CDR)或高变区(HVR)，且其可穿插有更保守性的区域(称为构架区(FR))。每个V_H和V_L是由从氨基端到羧基端按以下顺序排列的三个CDR和四个FR构成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与一个或多个抗原表位相互作用的结合域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白结合到宿主组织或因子，包括免疫系统的多种细胞(例如，效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0505] 术语“抗原”是指诱导免疫反应的物质。在一些实施例中，抗原为如果由主要组织相容性复合物(MHC)分子呈递则能够与抗体或TCR结合的分子。如本文中所使用，术语“抗原”还涵盖T细胞表位。另外，抗原能够被免疫系统识别。在一些实施例中，抗原能够诱导体液免疫反应或细胞免疫反应，从而导致B淋巴细胞和/或T淋巴细胞活化。在一些情况下，这可能需要抗原含有Th细胞表位或连接到Th细胞表位。抗原还可具有一个或多个表位(例如，B表位和T表位)。在一些实施例中，抗原将通常以高度特异性及选择性方式优选地与其对应的抗体或TCR反应，并且不与可能由其它抗原诱导的多种其它抗体或TCR反应。

[0506] 术语“单克隆抗体”、“mAb”、“单克隆抗体组合物”或其复数形式是指具有单一分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物显示针对特定表位的单一结合特异性和亲和力。可使用所属领域中的以下知识和技能制备针对某些受体具有特异性的单克隆抗体：向测试个体注射合适的抗原，且接着分离表达具有所需序列或功能特征的抗体的融合瘤。编码单克隆抗体的DNA可以使用常规程序(例如，通过使用能够特异性结合到编码单克隆抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)容易地分离和测序。杂交瘤细胞充当这种DNA的优选来源。一旦分离，就可以将DNA放入表达载体中，然后将其转染到不会另外产生免疫球蛋白的宿主细胞，例如大肠杆菌细胞、猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞中，以在重组宿主细胞中实现单克隆抗体的合成。下文将更详细地描述抗体的重组产生。

[0507] 如本文中所使用，术语抗体(或简称“抗体部分”或“片段”)的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”是指抗体的保留特异性结合于抗原的能力的一或多个片段。已表明抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段进行。涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括(i)Fab片段，由V_L、V_H、C_L和CH1域组成的单价片段；(ii)$F(ab')_2$片段，包含两个在铰链区由二硫桥键连接的Fab片段的二价片段；(iii)由V_H和CH1域组成的Fd片段；(iv)由抗体单臂的V_L和V_H域组成的Fv片段，(v)域抗体(dAb)片段(Ward等人，《自然(Nature)》，1989,341,544-546)，其可由V_H域或V_L域组成；和(vi)分离的互补决定区 (CDR)。此外，尽管Fv片段的两个域(V_L和V_H)由单独的基因编码，但其可以使用重组方法通过合成连接子接合，所述合成连接子使其能够被制成单个蛋白链，其中V_L和V_H区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv))；参见例如，Bird等人，《科学(Science)》，1988,242, 423-426；以及Huston等人，《美国国家科学协会公报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》，1988, 85,5879-5883)。这类scFv抗体还旨在涵盖于术语抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”内。这些抗体片段是使用所属领域的技术人员已知的常规技术获得，且以与完整抗体相同的方式针对效用对片段进行筛选。

[0508] 如本文中所使用，术语“人类抗体”旨在包括具有可变区的抗体，其中构架区和CDR区均来源于人类种系免疫球蛋白序列。此外，如果抗体含有恒定区，那么所述恒定区也来源于人类种系免疫球蛋白序列。本发明的人类抗体可以包括不由人类种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如，通过活体外随机或位点特异性诱变或通过活体内体细胞突变引入

的突变)。如本文中所使用,术语“人类抗体”旨在不包括其中来源于另一哺乳动物物种(如小鼠)的种系的CDR序列已移植到人类构架序列上的抗体。

[0509] 术语“人类单克隆抗体”是指显示出单一结合特异性的抗体,其具有可变区,其中构架区和CDR区均来源于人类种系免疫球蛋白序列。在一实施例中,人类单克隆抗体是由杂交瘤产生,所述杂交瘤包括获自转基因非人类动物(例如,转基因小鼠)的B细胞,所述B细胞具有包含与永生化细胞融合的人类重链转基因和轻链转基因的基因组。

[0510] 如本文中所使用,术语“重组人类抗体”包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人类抗体,例如(a)从人类免疫球蛋白基因的转基因或转染色体动物(例如,小鼠)或由其制备的杂交瘤中分离的抗体(下文进一步描述),(b)从被转化以表达人类抗体的宿主细胞分离的抗体,例如从转染瘤分离的抗体,(c)从重组的组合人类抗体库分离的抗体,以及 (d)通过将人免疫球蛋白基因序列剪接至其它DNA序列的通过任何其它方式制备、表达、产生或分离的抗体。这类重组人类抗体具有可变区,其中构架区和CDR区来源于人类种系免疫球蛋白序列。然而,在某些实施例中,可以对这类重组人类抗体进行活体外诱变(或者,当使用人类Ig序列的转基因动物时,进行活体内体细胞诱变),且因此重组抗体的V_L和V_H区的氨基酸序列是尽管来源于人类种系V_L和V_H序列并与之相关,但可能并不天然存在于活体内人类抗体种系库(repertoire)中的序列。

[0511] 如本文中所使用,“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别(例如,IgM或IgG1)。

[0512] 短语“识别抗原的抗体”和“对抗原具特异性的抗体”在本文中可与术语“与抗原特异性结合的抗体”互换使用。

[0513] 术语“人类抗体衍生物”指人类抗体的任何修饰形式,包括抗体与另一种活性医药成分或抗体的结合物。术语“结合物”、“抗体-药物结合物”、“ADC”或“免疫结合物”是指与另一治疗部分结合的抗体或其片段,所述治疗部分可使用所属领域中可获得的方法与本文中所描述的抗体结合。

[0514] 术语“人类化抗体(humanized antibody/humanized antibodies)”和“人类化”意指其中来源于另一哺乳动物物种(如小鼠)的种系的CDR序列已移植到人类构架序列上的抗体。可在人类构架序列内进行其它构架区修饰。非人类(例如鼠类)抗体的人类化形式是含有来源于非人类免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。在大多数情况下,人类化抗体是其中来自受体高变区的残基被来自具有所希望的抗体特异性、亲和力和能力的非人类物种(供体抗体),例如小鼠、大鼠、兔或非人类灵长类动物的15高变区的残基置换的人类免疫球蛋白(受体抗体)。在一些情况下,人类免疫球蛋白的Fv构架区(FR)残基被相应非人类残基替换。此外,人类化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步改进抗体性能。一般来说,人类化抗体将包含至少一个并且典型地两个可变域中的基本上全部,其中全部或基本上全部的高变环都对应于非人类免疫球蛋白的高变环并且全部或基本上全部的FR 区都是人类免疫球蛋白序列的FR区。人类化抗体任选地还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc) 的至少一部分,典型地是人类免疫球蛋白的至少一部分。对于更多细节,参见Jones等人,《自然》1986,321,522-525;Riechmann等人,《自然》1988,332,323-329;和Presta,《结构生物学评论(Curr.Op.Struct.Biol.)》1992,2,593-596。还可以修饰本文中所描述的抗体以采用已知在效应功能和/或FcR结合方面得到改进(例如减少)的任何Fc变

体。Fc变体可以包括(例如)以下中公开的氨基酸取代中的任一种:国际专利申请公开第WO 1988/07089 A1 号、第WO 1996/14339 A1号、第WO 1998/05787 A1号、第WO 1998/23289 A1号、第WO 1999/51642 A1号、第WO 99/58572 A1号、第WO 2000/09560 A2号、第WO 2000/32767 A1 号、第WO 2000/42072 A2号、第WO 2002/44215 A2号、第WO 2002/060919 A2号、第WO 2003/074569 A2号、第WO 2004/016750 A2号、第WO 2004/029207 A2号、第WO 2004/035752 A2号、第WO 2004/063351 A2号、第WO 2004/074455 A2号、第WO 2004/099249 A2号、第WO 2005/040217 A2号、第WO 2005/070963 A1号、第WO 2005/077981 A2号、第WO 2005/092925 A2号、第WO 2005/123780 A2号、第WO 2006/019447 A1号、第WO 2006/047350 A2号和第WO 2006/085967 A2号;以及美国专利第5,648,260号、第5,739,277号、第5,834,250 号、第5,869,046号、第6,096,871号、第6,121,022号、第6,194,551号、第6,242,195号、第 6,277,375号、第6,528,624号、第6,538,124号、第6,737,056号、第6,821,505号、第6,998,253 号和第7,083,784号;其公开内容以引用的方式并入本文中。

[0515] 术语“嵌合抗体”意指其中可变区序列来源于一种物种且恒定区序列衍生自另一物种的抗体,例如其中可变区序列来源于小鼠抗体且恒定区序列来源于人类抗体的抗体。

[0516] “双功能抗体”是具有两个抗原结合位点的小抗体片段。片段包含同一多肽链中与轻链可变域(V_L)连接的重链可变域(V_H) (V_H-V_L或V_L-V_H)。通过使用太短以至于不允许在同一链上的两个域之间配对的连接子,迫使所述域与另一条链的互补域配对且产生两个抗原结合位点。双功能抗体更充分地描述于例如欧洲专利第EP 404,097号、国际专利公开第WO 93/11161号和Bolliger等人,《美国科学院院报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》,1993,90,6444-6448中。

[0517] 术语“糖基化”是指抗体的修饰衍生物。非糖基化抗体缺乏糖基化。可以改变糖基化以例如增加抗体对抗原的亲和力。这类碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。举例来说,可以进行一个或多个氨基酸取代,从而导致消除一个或多个可变区构架糖基化位点,由此消除在所述位点处的糖基化。如美国专利第5,714,350号和第6,350,861号中所述,非糖基化可以增加抗体对抗原的亲和力。另外地或可替代地,可以制备具有改变的糖基化类型的抗体,如岩藻糖基残基的量减少的低岩藻糖基化抗体或平分型 GlcNac结构增加的抗体。已证明这种改变的糖基化模式增加了抗体的能力。可以通过例如在一个具有改变的糖基化机构的宿主细胞中表达抗体来实现这种碳水化合物修饰。在所属领域中已描述具有改变的糖基化机构的细胞,并且这些细胞可以用作宿主细胞(其中表达本发明的重组抗体以由此产生一种具有改变的糖基化的抗体)。举例来说,细胞系Ms704、Ms705 和Ms709缺乏岩藻糖基转移酶基因FUT8(α(1,6)岩藻糖基转移酶),使得在Ms704、Ms705 和Ms709细胞系中表达的抗体在其碳水化合物上缺乏岩藻糖。Ms704、Ms705和Ms709 FUT8-/-细胞系是通过使用两个替换载体靶向破坏CHO/DG44细胞中的FUT8基因而产生的 (参见例如美国专利公开第2004/0110704号或Yamane-Ohnuki等人,《生物技术与生物工程 (Biotechnol.Bioeng.)》,2004,87,614-622)。作为另一实例,欧洲专利第EP 1,176,195号描述了一种具有功能性破坏的FUT8基因的细胞系,所述FUT8基因编码岩藻糖基转移酶,使得这类细胞系中表达的抗体通过还原或消除α1,6键相关酶来展现低岩藻糖基化;并且还描述将岩藻糖添加到结合抗体的Fc区的N-乙酰氨基葡萄糖而具有低酶活性或不具有酶活性的细胞系,例如大鼠骨髓瘤细胞系YB2/0(ATCC CRL 1662)。国际专利公开WO

03/035835描述了一种变体CHO细胞系Lec13细胞，其将岩藻糖连接到Asn(297)连接的碳水化合物上的能力降低，还导致在所述宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化(也参见Shields等人，《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》，2002,277,26733-26740)。国际专利公开WO 99/54342描述了经工程改造以表达糖蛋白修饰的糖基转移酶(例如β(1,4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶III(GnTIII))的细胞系，以使得在经工程改造的细胞系中表达的抗体展现增加的平分型GlcNac结构，这使得抗体的ADCC活性增加(也参见Umana等人，《自然·生物技术(Nat.Biotech.)》1999,17, 176-180)。替代地，可使用岩藻糖苷酶将抗体的岩藻糖残基裂解掉。举例来说，岩藻糖苷酶α-L-岩藻糖苷酶去除抗体中的岩藻糖基残基，如Tarentino等人，《生物化学(Biochem.)》，1975, 14,5516-5523中所描述。

[0518] “聚乙二醇化”是指通常与聚乙二醇(PEG)(如PEG的反应性酯或醛衍生物)在一个或多个PEG基团能附接到抗体或抗体片段的条件下反应的修饰抗体或其片段。聚乙二醇化可例如增加抗体的生物学(例如，血清)半衰期。优选地，通过与反应性PEG分子(或类似的反应性水溶性聚合物)的酰化反应或烷基化反应进行聚乙二醇化。如本文中所使用，术语“聚乙二醇”旨在涵盖已用于衍生其它蛋白质的PEG形式中的任一种，例如单(C_1-C_{10})烷氧基-聚乙二醇或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。待聚乙二醇化的抗体是非糖基化抗体。用于聚乙二醇化的方法为所属领域中已知的并且可应用于本发明的抗体，如例如欧洲专利第 EP 0154316号和第EP 0401384号以及美国专利第5,824,778号中所描述，其各自的公开内容以引用的方式并入本文中。

[0519] 术语“生物类似物”意指包括单克隆抗体或蛋白质的生物产品，尽管在临床上的失活组分方面存在较小差异但其高度类似于美国已授权的参考生物产品，并且在产品的安全性、纯度和效力方面，生物产品与参考产品之间不存在有临床意义的差异。此外，类似的生物医药或“生物类似物”医药为与已经由欧洲医药管理局授权使用的另一种生物医药类似的生物医药。其它国家和地区管理机构也同义地使用术语“生物类似物”。生物产品或生物医药是由例如细菌或酵母菌的生物来源制成或衍生的医药。其可由相对较小的分子(如人类胰岛素或促红细胞生成素)或复合分子(如单克隆抗体)组成。举例来说，如果参考IL-2蛋白质为阿地白介素(PROLEUKIN)，那么由药物监管机构批准的参考阿地白介素的蛋白质与阿地白介素“生物类似”或为阿地白介素的“生物类似物”。在欧洲，类似的生物医药或“生物类似物”医药为与已经由欧洲医药管理局(European Medicines Agency;EMA)授权使用的另一种生物医药类似的生物医药。在欧洲，类似生物应用的相关法律基础为修订的(EC)726/2004号法规的第6条和2001/83/EC法令的第10(4)条，且因此在欧洲，根据(EC)726/2004号法规的第6条和2001/83/EC法令的第10(4)条，生物类似物可以被授权、批准授权或进行授权申请。在欧洲，已经授权的初始生物药品可称为“参考药品”。关于类似生物药品的CHMP 指南中概述了对于视为生物类似物的产品的一些要求。另外，EMA将逐个产品提供和在其网站上公布产品特定指南，包括关于单克隆抗体生物类似物的指南。如本文所描述的生物类似物在品质特征、生物活性、作用机理、安全特性和/或疗效方面可类似于参考药品。另外，生物类似物可用于或旨在用于治疗与参考药品相同的病状。因此，如本文所描述的生物类似物可认为具有与参考药品类似或高度类似的品质特征。替代地或另外，如本文所描述的生物类似物可认为具有与参考药品类似或高度类似的生物活性。替代地或另外，如本文所描述的生物类似物可认为具有与参考药品类似或高度类似的安全特性。替代地或另

外，如本文所描述的生物类似物可认为具有与参考药品类似或高度类似的疗效。如本文所描述，将欧洲的生物类似物与已经由EMA授权的参考药品进行比较。然而，在一些情况下，在某些研究中可以将生物类似物与已经在欧洲经济区之外授权的生物药品(非EEA授权的“比较物”)进行比较。这类研究包括例如一些临床和活体内非临床研究。如本文中所使用，术语“生物类似物”还涉及已经或可以与非EEA授权的比较物进行比较的生物药品。某些生物类似物为蛋白质，例如抗体、抗体片段(例如抗原结合部分)和融合蛋白。蛋白质生物类似物可具有在氨基酸结构中具有较小修饰(包括例如氨基酸的缺失、添加和/或取代)的氨基酸序列，其并不显著地影响多肽的功能。生物类似物可以包含与其参考药品的氨基酸序列具有97％或更大(例如，97％、98％、99％或100％)的序列一致性的氨基酸序列。生物类似物可以包含一个或多个转译后修饰，例如但不限于与参考药品的转译后修饰不同的糖基化、氧化、去酰胺化和/或截短，限制条件为差异并不导致药品的安全性和/或疗效改变。生物类似物可以具有与参考药品一致或不同的糖基化模式。确切地说，尽管非排他性地，但如果差异能解决或旨在解决与参考药品相关的安全性问题，那么生物类似物可以具有不同的糖基化模式。另外，只要不损害药品的安全性和疗效，生物类似物可在例如其强度、医药形式、调配物、赋形剂和/或呈递方面与参考药品有所偏差。生物类似物可以包含与参考药品相比在例如药代动力学(PK)和/或药效学(PD)特性方面的差异，但仍认为其充分类似于参考药品，以便授权或考虑适合于授权。在某些情形中，生物类似物展现与参考药品相比不同的结合特征，其中例如EMA的管理机构认为不同的结合特征并不成为授权为类似生物产品的障碍。其它国家和地区管理机构也同义地使用术语“生物类似物”。

[0520] III.TIL制造工艺-2A

[0521] 图2中描绘了含有这些特征中的一些的称为工艺2A的示范性TIL工艺，并且在图F和 G中描述了本发明的这个实施例相对于工艺1C的一些优势。图1中示出工艺2A的实施例。

[0522] 如本文所论述，本发明可以包括关于再刺激冷冻保存的TIL以增加其代谢活性且因此增加在移植到患者体内之前的相对健康的步骤，和测试所述代谢健康的方法。如本文中一般概述，TIL通常是从患者样品中获取并且在移植到患者体内之前进行操控以扩增其数量。在一些实施例中，如下文所论述，可以任选地对TIL进行基因操控。

[0523] 在一些实施例中，可以将TIL冷冻保存。解冻后，在输注到患者体内之前还可以对其进行再刺激以增加其代谢。

[0524] 在一些实施例中，将第一次扩增(包括称为preREP的工艺以及图1中示出为步骤A的工艺)缩短为3至14天并且将第二次扩增(包括称为REP的工艺以及图1中示出为步骤B 的工艺)缩短为7至14天，如下文以及实例和图式中详细地论述。在一些实施例中，将第一次扩增(例如，图1中描述为步骤B的扩增)缩短为11天并且将第二次扩增(例如，如图1 中的步骤D中描述的扩增)缩短为11天。在一些实施例中，将第一次扩增和第二次扩增(例如，图1中描述为步骤B和步骤D的扩增)的组合缩短为22天，如下文以及实例和图式中详细地论述。

[0525] 下文的“步骤”标识A、B、C等参考图1并且参考本文中所描述的某些实施例。下文和图1中的步骤排序是示范性的并且本申请和本文所公开的方法涵盖步骤的任何组合或次序以及附加步骤、重复步骤和/或省略步骤。

[0526] A.步骤A:获得患者肿瘤样品

[0527] 一般来说，最初从患者肿瘤样品中获得TIL(“初始TIL”)且接着将其扩增为较大群

体用于如本文所描述进一步操控、任选地冷冻保存、如本文中所概述再刺激并且任选地评估表型和代谢参数作为TIL健康的指示。

[0528] 可以使用所属领域中已知的方法，通常通过手术切除、穿刺活检、核心活检、小型活检或用于获得含有肿瘤和TIL细胞的混合物的样品的其它手段来获得患者肿瘤样品。在一些实施例中，使用多病灶采样。在一些实施例中，手术切除、穿刺活检、核心活检、小型活检或用于获得含有肿瘤和TIL细胞的混合物的样品的其它手段包括多病灶采样(即，从患者的一个或多个肿瘤部位和/或位置，以及同一位置或极为接近的一个或多个肿瘤获得样品)。一般来说，肿瘤样品可以来自任何实体肿瘤，包括原发性肿瘤、浸润性肿瘤或转移性肿瘤。肿瘤样品还可以是液体肿瘤，例如获自恶性血液病的肿瘤。实体肿瘤可以是肺组织。在一些实施例中，适用的TIL获自非小细胞肺癌(NSCLC)。

[0529] 获得后，通常使用锐器切割将肿瘤样品碎裂成1至约8mm^{3}的小片段，其中约2-3mm^{3}是特别适用的。使用酶促肿瘤消化从这些碎片培养TIL。这类肿瘤消化可以通过在酶促介质(例如，罗斯威尔帕克纪念研究所(Roswell Park Memorial Institute;RPMI)1640缓冲液、2mM 谷氨酸、10mcg/mL庆大霉素、30单位/毫升的DNA酶和1.0mg/mL胶原蛋白酶)中培育，接着进行机械解离(例如，使用组织解离器)来产生。肿瘤消化可以通过将肿瘤放置于酶促介质中且将肿瘤机械地解离大致1分钟，接着在37℃/5％CO_2下培育30分钟，接着进行机械解离并且在前述条件下培育的重复循环直到仅存在小组织片段而产生。在此工艺结束时，如果细胞悬浮液含有大量红细胞或死细胞，那么可以使用FICOLL分支链亲水性多糖进行密度梯度分离以去除这些细胞。可使用所属领域中已知的替代方法，例如美国专利申请公开第2012/0244133 A1号中描述的那些方法，其公开内容以引用的方式并入本文中。任一个前述方法可用于任一个本文所描述的用于扩增TIL的方法或治疗癌症的方法的实施例中。

[0530] 如上文所指示，在一些实施例中，TIL来源于实体肿瘤。在一些实施例中，不碎裂实体肿瘤。在一些实施例中，不碎裂实体肿瘤且使其作为完整肿瘤进行酶促消化。在一些实施例中，将肿瘤在包含胶原蛋白酶、DNA酶和玻尿酸酶的酶混合物中消化。在一些实施例中，将肿瘤在包含胶原蛋白酶、DNA酶和玻尿酸酶的酶混合物中消化1-2小时。在一些实施例中，将肿瘤在包含胶原蛋白酶、DNA酶和玻尿酸酶的酶混合物中在37℃、5％CO_2下消化1-2小时。在一些实施例中，将肿瘤在包含胶原蛋白酶、DNA酶和玻尿酸酶的酶混合物中在37℃、 5％CO_2下旋转消化1-2小时。在一些实施例中，将肿瘤以恒定旋转消化过夜。在一些实施例中，将肿瘤在37℃、5％CO_2下以恒定旋转消化过夜。在一些实施例中，将完整肿瘤与酶组合以形成肿瘤消化反应混合物。

[0531] 在一些实施例中，在无菌缓冲液中用冻干的酶重构肿瘤。在一些实施例中，缓冲液为无菌HBSS。

[0532] 在一些实施例中，酶混合物包含胶原蛋白酶。在一些实施例中，胶原蛋白酶为胶原蛋白酶IV。在一些实施例中，胶原蛋白酶的工作储备液为100mg/ml 10×工作储备液。

[0533] 在一些实施例中，酶混合物包含DNA酶。在一些实施例中，DNA酶的工作储备液为10,000 IU/ml 10×工作储备液。

[0534] 在一些实施例中，酶混合物包含玻尿酸酶。在一些实施例中，玻尿酸酶的工作储备液为 10mg/ml 10×工作储备液。

[0535] 在一些实施例中，酶混合物包含10mg/ml胶原蛋白酶、1000IU/ml DNA酶和1mg/ml

玻尿酸酶。

[0536] 在一些实施例中，酶混合物包含10mg/ml胶原蛋白酶、500IU/ml DNA酶和1mg/ml玻尿酸酶。

[0537] 一般来说，采集的细胞悬浮液称作“初始细胞群体”或“新采集的”细胞群体。

[0538] 在一些实施例中，碎裂包括物理碎裂，包括例如切割以及消化。在一些实施例中，碎裂为物理碎裂。在一些实施例中，碎裂为切割。在一些实施例中，通过消化进行碎裂。在一些实施例中，最初可以从酶促肿瘤消化物和获自患者的肿瘤碎片中培养TIL。在一实施例中，最初可以从酶促肿瘤消化物和获自患者的肿瘤碎片中培养TIL。

[0539] 在一些实施例中，在肿瘤为实体肿瘤的情况下，在例如步骤A(如图1中提供)中获得肿瘤样品之后，使肿瘤经历物理碎裂。在一些实施例中，在冷冻保存之前进行碎裂。在一些实施例中，在冷冻保存之后进行碎裂。在一些实施例中，在获得肿瘤之后且在不存在任何冷冻保存的情况下进行碎裂。在一些实施例中，将肿瘤碎裂并且将10、20、30、40或更多个碎片或片段放置在用于第一次扩增的每个容器中。在一些实施例中，将肿瘤碎裂并且将30或40个碎片或片段放置在用于第一次扩增的每个容器中。在一些实施例中，将肿瘤碎裂并且将 40个碎片或片段放置在用于第一次扩增的每个容器中。在一些实施例中，多个碎片包含约4 至约50个碎片，其中每个碎片具有约27mm^3的体积。在一些实施例中，多个碎片包含约30 至约60个碎片，总体积为约1300mm^3至约1500mm^3。在一些实施例中，多个碎片包含约 50个碎片，总体积为约1350mm^3。在一些实施例中，多个碎片包含约50个碎片，总质量为约1克至约1.5克。在一些实施例中，多个碎片包含约4个碎片。

[0540] 在一些实施例中，TIL是获自肿瘤碎片。在一些实施例中，通过锐器切割获得肿瘤碎片。在一些实施例中，肿瘤碎片介于约1mm^3与10mm^3之间。在一些实施例中，肿瘤碎片介于约 1mm^3与8mm^3之间。在一些实施例中，肿瘤碎片为约1mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约2mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约3mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约4mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约5mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约6mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约7mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约8mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约9mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约10mm^3。在一些实施例中，肿瘤为1-4 mm×1-4mm×1-4mm。在一些实施例中，肿瘤为1mm×1mm×1mm。在一些实施例中，肿瘤为2mm×2mm×2mm。在一些实施例中，肿瘤为3mm×3mm×3mm。在一些实施例中，肿瘤为4mm×4mm×4mm。

[0541] 在一些实施例中，切除肿瘤以使每个片段上的出血性、坏死和/或脂肪组织的量最小化。在一些实施例中，切除肿瘤以使每个片段上的出血性组织的量最小化。在一些实施例中，切除肿瘤以使每个片段上的坏死组织的量最小化。在一些实施例中，切除肿瘤以使每个片段上的脂肪组织的量最小化。

[0542] 在一些实施例中，进行肿瘤碎裂以维持肿瘤内部结构。在一些实施例中，在不用手术刀进行锯切动作的情况下进行肿瘤碎裂。在一些实施例中，TIL是获自肿瘤消化物。在一些实施例中，通过在酶介质(例如(但不限于)RPMI 1640、2mM GlutaMAX、10mg/mL庆大霉素、30U/mL DNA酶和1.0mg/mL胶原蛋白酶)中培育，接着进行机械解离(GentleMACS，加利福尼亚州奥本(Auburn,CA)的美天旎生物技术公司)来产生肿瘤消化物。将肿瘤放置于酶介质中之后，可对肿瘤进行机械解离大致1分钟。接着可以将溶液在37℃/5%CO_2下培育30分钟并且对其再次进行机械破碎大致1分钟。在37℃/5%CO_2下再培育30分钟之后，可对肿瘤进行

第三次机械破碎大致1分钟。在一些实施例中，在第三次机械破碎后，如果存在较大组织片段，那么可在或不在37℃/5％CO_2下再培育30分钟的情况下，对样品再施加1 或2次机械解离。在一些实施例中，在最终培育结束时，如果细胞悬浮液含有大量红细胞或死细胞，那么可使用Ficoll进行密度梯度分离以去除这些细胞。

[0543] 在一些实施例中，在第一次扩增步骤之前采集的细胞悬浮液称作“初始细胞群体”或“新采集的”细胞群体。

[0544] 在一些实施例中，在采集样品之后可任选地冷冻细胞，并且在进入步骤B中所描述的扩增之前进行冷冻存储，所述步骤B是在下文进行进一步详细描述以及在图1中进行示例说明。

[0545] B.步骤B:第一次扩增

[0546] 在一些实施例中，本发明方法能够获得年轻TIL，其在给予个体/患者后能够增加复制周期，并且因此可提供相对于较老的TIL(即，在给予个体/患者之前已进一步经历更多轮复制的TIL)的附加治疗益处。以下文献中已描述年轻TIL的特征:例如Donia等人，《斯堪的纳维亚免疫学杂志(Scandinavian Journal of Immunology)》,75:157-167(2012)；Dudley等人，《临床癌症研究(Clin Cancer Res)》,16:6122-6131(2010)；Huang等人，《免疫治疗学杂志(J Immunother)》,28(3):258-267(2005)；Besser等人，《临床癌症研究》,19(17):OF1-OF9(2013)； Besser等人，《免疫治疗学杂志》32:415-423(2009)；Robbins等人，《免疫学杂志(J Immunol)》 2004;173:7125-7130;Shen等人，《免疫治疗学杂志》,30:123-129(2007)；Zhou等人，《免疫治疗学杂志》,28:53-62(2005)；和Tran等人，《免疫治疗学杂志》,31:742-751(2008)，其均以全文引用的方式并入本文中。

[0547] T淋巴细胞和B淋巴细胞的多种抗原受体是通过有限但大量的基因片段的体细胞重组产生的。这些基因片段:V(可变)、D(多样性)、J(连接)和C(恒定)确定免疫球蛋白与T细胞受体(TCR)的结合特异性和下游应用。本发明提供一种用于产生TIL的方法，所述TIL展现并且增加T细胞库多样性。在一些实施例中，通过本发明方法获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中，与新采集的TIL和/或使用除本文提供的那些方法之外的其它方法(包括例如除图1中实施的那些方法之外的方法)制备的TIL相比，通过本发明方法获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中，与新采集的TIL和/或使用称为工艺1C的方法(如图5和/或图6中所示)制备的TIL相比，通过本发明方法获得的TIL展现 T细胞库多样性的增加。在一些实施例中，第一次扩增中获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中，多样性的增加是免疫球蛋白多样性和/或T细胞受体多样性的增加。在一些实施例中，免疫球蛋白的多样性是在免疫球蛋白重链中。在一些实施例中，免疫球蛋白的多样性是在免疫球蛋白轻链中。在一些实施例中，多样性是在T细胞受体中。在一些实施例中，多样性是在选自以下组成的组的一种T细胞受体中:α、β、γ 和δ受体。在一些实施例中，T细胞受体(TCR)α和/或β的表达增加。在一些实施例中，T细胞受体(TCR)α的表达增加。在一些实施例中，T细胞受体(TCR)β的表达增加。在一些实施例中，TCRab (即，TCRα/β)的表达增加。

[0548] 在切割或消化肿瘤碎片之后，例如图1的步骤A中所描述，在含有IL-2的血清中在有利于TIL生长超过肿瘤和其它细胞的条件下培养所得细胞。在一些实施例中，在2mL孔中的包含灭活的人类AB血清与6000IU/mL IL-2的培养基中培育肿瘤消化物。将所述初始细胞

群体培养数天(通常3至14天)的时间段,得到块状TIL群体,通常约1×10^8个块状TIL细胞。在一些实施例中,将所述初始细胞群体培养7至14天的时间段,得到块状TIL群体,通常约 1×10^8个块状TIL细胞。在一些实施例中,将所述初始细胞群体培养10至14天的时间段,得到块状TIL群体,通常约1×10^8个块状TIL细胞。在一些实施例中,将所述初始细胞群体培养约11天的时间段,得到块状TIL群体,通常约1×10^8个块状TIL细胞。

[0549] 在一优选实施例中,可以使用如下文和本文所述的初始块状TIL扩增步骤(例如图1的步骤B中所描述的那些,其可包括如下文和本文所述的称为pre-REP的工艺),接着如下文步骤D和本文所述的第二次扩增(步骤D,包括称为快速扩增方案(REP)步骤的工艺),接着任选的冷冻保存且接着如下文和本文所述的第二个步骤D(包括称为再刺激REP步骤的工艺) 进行TIL的扩增。从所述工艺获得的TIL可任选地表征如本文所描述的表型特征和代谢参数。

[0550] 在例如使用Costar 24孔细胞培养集群的24孔平底培养板(纽约康宁镇的康宁公司 (Corning Incorporated,Corning,NY))中开始TIL培养的实施例中,每个孔可以接种含1×10^6个肿瘤消化细胞或一个肿瘤碎片的2mL含IL-2(6000IU/mL;加利福尼亚州爱莫利维尔的凯龙公司(Chiron Corp.,Emeryville,CA))的完全培养基(CM)。在一些实施例中,肿瘤碎片介于约1mm^{3}与10mm^{3}之间。

[0551] 在一些实施例中,第一次扩增培养基称为“CM”,培养基的缩写。在一些实施例中,步骤B的CM由补充有10%人类AB血清、25mM Hepes和10mg/mL庆大霉素的RPMI 1640 及GlutaMAX组成。在具有40mL容量和10cm^{2}气体可渗透硅胶底部的气体可渗透烧瓶(例如,G-Rex10;明尼苏达州新布莱顿的威尔森沃尔夫制造公司(Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton,MN))(图1)中开始培养的实施例中,每个烧瓶装载有含10-40$\times10^6$个活的肿瘤消化细胞或5-30个肿瘤碎片的10-40mL含IL-2的CM。将G-Rex10和24孔培养板都在 37℃/5% CO_2下在含湿气培育箱中培育并且在培养开始后5天,去除一半培养基并用新鲜CM 和IL-2替换,并且在第5天后,每2-3天更换一半培养基。

[0552] 在制备肿瘤碎片之后,在含有IL-2的血清中在有利于TIL生长超过肿瘤和其它细胞的条件下培养所得细胞(即,碎片)。在一些实施例中,将肿瘤消化物培育在2mL孔中的包含灭活人类AB血清(或在一些情况下,如本文中所概述,在存在aAPC细胞群体的情况下)及6000IU/mL IL-2的培养基中。将所述初始细胞群体培养数天(通常10至14天)的时间段,得到块状TIL群体,通常约1×10^8个块状TIL细胞。在一些实施例中,第一次扩增期间的生长培养基包含IL-2或其变体。在一些实施例中,IL为重组人类IL-2(rhIL-2)。在一些实施例中,对于1mg小瓶,IL-2储备溶液具有20-30$\times10^6$IU/mg的比活性。在一些实施例中,对于 1mg小瓶,IL-2储备溶液具有20$\times10^6$IU/mg的比活性。在一些实施例中,对于1mg小瓶, IL-2储备溶液具有25$\times10^6$IU/mg的比活性。在一些实施例中,对于1mg小瓶,IL-2储备溶液具有30$\times10^6$IU/mg的比活性。在一些实施例中,IL-2储备溶液的最终浓度为4-8$\times10^6$IU/mg IL-2。在一些实施例中,IL-2储备溶液的最终浓度为5-7$\times10^6$IU/mg IL-2。在一些实施例中, IL-2储备溶液的最终浓度为6$\times10^6$IU/mg IL-2。在一些实施例中,如实例5中所描述来制备IL-2储备溶液。在一些实施例中,第一次扩增培养基包含约10,000IU/mL IL-2、约9,000IU/mL IL-2、约8,000IU/mL IL-2、约7,000IU/mL IL-2、约6000IU/mL IL-2或约5,000IU/mL IL-2。在一些实施例中,第一次扩增培养基包含约9,000IU/mL IL-2至约5,000IU/mL IL-2。在一

些实施例中，第一次扩增培养基包含约8,000IU/mL IL-2至约6,000IU/mL IL-2。在一些实施例中，第一次扩增培养基包含约7,000IU/mL IL-2至约6,000IU/mL IL-2。在一些实施例中，第一次扩增培养基包含约6,000IU/mL IL-2。在一实施例中，细胞培养基进一步包含IL-2。在一些实施例中，细胞培养基包含约3000IU/mL IL-2。在一实施例中，细胞培养基进一步包含IL-2。在一优选实施例中，细胞培养基包含约3000IU/mL IL-2。在一实施例中，细胞培养基包含约 1000IU/mL、约1500IU/mL、约2000IU/mL、约2500IU/mL、约3000IU/mL、约3500IU/mL、约4000IU/mL、约4500IU/mL、约5000IU/mL、约5500IU/mL、约6000IU/mL、约6500IU/mL、约7000IU/mL、约7500IU/mL或约8000IU/mL IL-2。在一实施例中，细胞培养基包含在1000 与2000IU/mL之间、在2000与3000IU/mL之间、在3000与4000IU/mL之间、在4000与5000IU/mL之间、在5000与6000IU/mL之间、在6000与7000IU/mL之间、在7000与8000 IU/mL之间或约8000IU/mL的IL-2。

[0553] 在一些实施例中，第一次扩增培养基包含约500IU/mL IL-15、约400IU/mL IL-15、约 300IU/mL IL-15、约200IU/mL IL-15、约180IU/mL IL-15、约160IU/mL IL-15、约140IU/mL IL-15、约120IU/mL IL-15或约100IU/mL IL-15。在一些实施例中，第一次扩增培养基包含约500IU/mL IL-15至约100IU/mL IL-15。在一些实施例中，第一次扩增培养基包含约400IU/mL IL-15至约100IU/mL IL-15。在一些实施例中，第一次扩增培养基包含约300IU/mL IL-15至约100IU/mL IL-15。在一些实施例中，第一次扩增培养基包含约200IU/mL IL-15。在一些实施例中，细胞培养基包含约180IU/mL IL-15。在一实施例中，细胞培养基进一步包含IL-15。在一优选实施例中，细胞培养基包含约180IU/mL IL-15。

[0554] 在一些实施例中，第一次扩增培养基包含约20IU/mL IL-21、约15IU/mL IL-21、约12 IU/mL IL-21、约10IU/mL IL-21、约5IU/mL IL-21、约4IU/mL IL-21、约3IU/mL IL-21、约 2IU/mL IL-21、约1IU/mL IL-21或约0.5IU/mL IL-21。在一些实施例中，第一次扩增培养基包含约20IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施例中，第一次扩增培养基包含约15 IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施例中，第一次扩增培养基包含约12IU/mL IL-21 至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施例中，第一次扩增培养基包含约10IU/mL IL-21至约0.5 IU/mL IL-21。在一些实施例中，第一次扩增培养基包含约5IU/mL IL-21至约1IU/mL IL-21。在一些实施例中，第一次扩增培养基包含约2IU/mL IL-21。在一些实施例中，细胞培养基包含约1IU/mL IL-21。在一些实施例中，细胞培养基包含约0.5IU/mL IL-21。在一实施例中，细胞培养基进一步包含IL-21。在一优选实施例中，细胞培养基包含约1IU/mL IL-21。

[0555] 在一实施例中，细胞培养基包含OKT-3抗体。在一些实施例中，细胞培养基包含约30 ng/mL OKT-3抗体。在一实施例中，细胞培养基包含约0.1ng/mL、约0.5ng/mL、约1ng/mL、约2.5ng/mL、约5ng/mL、约7.5ng/mL、约10ng/mL、约15ng/mL、约20ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200ng/mL、约500ng/mL和约1μg/mL OKT-3抗体。在一实施例中，细胞培养基包含在0.1ng/mL与1ng/mL之间、在1ng/mL与5ng/mL之间、在5ng/mL 与10ng/mL之间、在10ng/mL与20ng/mL之间、在20ng/mL与30ng/mL之间、在30ng/mL 与40ng/mL之间、在40ng/mL与50ng/mL之间和在50ng/mL与100ng/mL之间的OKT-3 抗体。在一些实施例中，细胞培养基不包含OKT-3抗体。在一些实施例中，OKT-3抗体为莫罗单抗。

[0556] 表3:莫罗单抗的氨基酸序列(示范性OKT-3抗体)

[0557]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）
SEQ ID NO:1 莫罗单抗重链	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 莫罗单抗轻链	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

[0558] 在一些实施例中,细胞培养基包含含有一种或多种TNFRSF激动剂的细胞培养基。在一些实施例中,TNFRSF激动剂包含4-1BB激动剂。在一些实施例中,TNFRSF激动剂为4-1BB激动剂,并且4-1BB激动剂是选自以下组成的组:乌瑞鲁单抗、乌托米单抗、EU-101、融合蛋白,以及其片段、衍生物、变体、生物类似物及组合。在一些实施例中,以足以在细胞培养基中达到0.1μg/mL与100μg/mL之间的浓度的浓度添加TNFRSF激动剂。在一些实施例中,以足以在细胞培养基中达到20μg/mL与40μg/mL之间的浓度的浓度添加TNFRSF激动剂。

[0559] 在一些实施例中,除了一种或多种TNFRSF激动剂之外,细胞培养基进一步包含起始浓度为约3000IU/mL的IL-2和起始浓度为约30ng/mL的OKT-3抗体,且其中一种或多种TNFRSF激动剂包含4-1BB激动剂。

[0560] 在一些实施例中,第一次扩增培养基称为“CM”,培养基的缩写。在一些实施例中,其称为CM1(培养基1)。在一些实施例中,CM由补充有10%人类AB血清、25mM Hepes和 10mg/mL庆大霉素的RPMI 1640及GlutaMAX组成。在具有40mL容量和10cm^2气体可渗透硅胶底部的气体可渗透烧瓶(例如,G-Rex10;明尼苏达州新布莱顿的威尔森沃尔夫制造公司)(图1)中开始培养的实施例中,每个烧瓶装载有含10-40×10^6个活的肿瘤消化细胞或 5-30个肿瘤碎片的10-40mL含IL-2的CM。将G-Rex10和24孔培养板都在37℃/5%CO_2下在含湿气培育箱中培育并且在培养开始后5天,去除一半培养基并用新鲜CM和IL-2替换,并且在第5天后,每2-3天更换一半培养基。在一些实施例中,CM为实例(参见实例1)中描述的CM1。在一些实施例中,在初始细胞培养基或第一细胞培养基中进行第一次扩增。在一些实施例中,初始细胞培养基或第一细胞培养基包含IL-2。

[0561] 在一些实施例中,将第一次扩增(包括例如图1的步骤B中描述的那些工艺,其可以包括有时称为pre-REP的那些工艺)工艺缩短为3-14天,如实例和图式中所论述。在一些实施例中,将第一次扩增(包括例如图1的步骤B中描述的那些工艺,其可以包括有时称为pre-REP 的那些工艺)缩短为7至14天,如实例中所论述且如图4和5中所示,以及包括例如,如图1的步骤B中所描述的扩增。在一些实施例中,将步骤B的第一次扩增缩短为10-14天。在一些实施例中,将第一次扩增缩短为11天,如例如图1的步骤B中所描述的扩增所论述。

[0562] 在一些实施例中,第一次TIL扩增可以进行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、 8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天。在一些实施例中,第一次TIL扩增可以进行1天至14天。在一些实施例中,第一次TIL扩增可以进行2天至14天。在一些实施例中,第一次TIL扩增可以进行3天至14天。在一些实施例中,第一次TIL扩增可以进行4天至 14天。在一些实施例中,第一次TIL扩增可以进行5天至14天。在一些实施例中,第一次 TIL扩增可以进行6天至

14天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行7天至14天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行8天至14天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行9天至14天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行10天至14天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行11天至14天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行12天至14天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行13天至14天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行14天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行1天至11 天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行2天至11天。在一些实施例中，第一次TIL 扩增可以进行3天至11天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行4天至11天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行5天至11天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行6天至11天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行7天至11天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行8天至11天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行9 天至11天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行10天至11天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行11天。

[0563] 在一些实施例中，在第一次扩增期间，以组合形式采用IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21的组合。在一些实施例中，在第一次扩增期间，包括例如在根据图1的步骤B工艺期间，以及如本文所描述，可以包括IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21以及其任何组合。在一些实施例中，在第一次扩增期间，以组合形式采用IL-2、IL-15和IL-21的组合。在一些实施例中，在根据图1的步骤B工艺期间并且如本文所描述，可以包括IL-2、IL-15和IL-21以及其任何组合。

[0564] 在一些实施例中，将第一次扩增(包括称为pre-REP的工艺;例如根据图1的步骤B)工艺缩短为3至14天，如实例和图式中所论述。在一些实施例中，将步骤B的第一次扩增缩短为7至14天。在一些实施例中，将步骤B的第一次扩增缩短为10至14天。在一些实施例中，将第一次扩增缩短为11天。

[0565] 在一些实施例中，在封闭系统生物反应器中进行第一次扩增，例如根据图1的步骤B。在一些实施例中，如本文所描述，采用封闭系统进行TIL扩增。在一些实施例中，采用单一生物反应器。在一些实施例中，采用的单一生物反应器为例如G-REX-10或G-REX-100。在一些实施例中，封闭系统生物反应器为单一生物反应器。

[0566] C.步骤C:第一次扩增到第二次扩增的转变

[0567] 在一些情况下，可以使用下文所论述的方案立即冷冻保存从第一次扩增中获得的块状 TIL群体，包括例如从图1中所指示的例如步骤B中获得的TIL群体。替代地，可以对从第一次扩增中获得的TIL群体(称为第二TIL群体)进行第二次扩增(其可以包括有时称为REP 的扩增)且接着如下文所论述冷冻保存。类似地，在基因修饰的TIL将用于疗法的情况下，第一TIL群体(有时称为块状TIL群体)或第二TIL群体(在一些实施例中，其可以包括称为REP TIL群体的群体)可以在扩增之前或在第一次扩增之后并在第二次扩增之前进行基因修饰以用于合适的治疗。

[0568] 在一些实施例中，将从第一次扩增(例如，如图1中所指示的步骤B)中获得的TIL存储直到表型选择。在一些实施例中，并不存储从第一次扩增(例如，如图1中所指示的步骤B)中获得的TIL，而是直接进行第二次扩增。在一些实施例中，在第一次扩增之后并在第二次扩增之前，不冷冻保存从第一次扩增中获得的TIL。在一些实施例中，在进行碎裂后的约3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，在进行碎裂后的约3天至14天进行第一次扩增到第二次扩增的

转变。在一些实施例中，在进行碎裂后的约4天至14天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，在进行碎裂后的约4天至10天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，在进行碎裂后的约7天至14天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，在进行碎裂后的约14天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。

[0569] 在一些实施例中，在进行碎裂后的1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9 天、10天、11天、12天、13天或14天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，在进行碎裂后的1天至14天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行2天至14天。在一些实施例中，进行碎裂后的3天至14天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的4天至14天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的5天至14天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的6天至14天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的7天至14天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的8天至14天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的9天至14天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的10天至14天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的11 天至14天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的12天至14 天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的13天至14天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的14天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的1天至11天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的2天至11天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的3天至11天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的4天至11天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的5天至11天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的6天至11天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的7天至11天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的8天至11天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的9天至11天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的10天至11天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中，进行碎裂后的11天进行第一次扩增到第二次扩增的转变。

[0570] 在一些实施例中，在第一次扩增之后并在第二次扩增之前不存储TIL，且将TIL直接进行第二次扩增(例如在一些实施例中，在如图1所示的步骤B到步骤D的转变期间不存在存储)。在一些实施例中，如本文所描述，在封闭系统中进行转变。在一些实施例中，来自第一次扩增的TIL(第二TIL群体)直接进行第二次扩增，而不具有转变期。

[0571] 在一些实施例中，在封闭系统生物反应器中进行第一次扩增到第二次扩增的转变，例如根据图1的步骤C。在一些实施例中，如本文所描述，采用封闭系统进行TIL扩增。在一些实施例中，采用单一生物反应器。在一些实施例中，采用的单一生物反应器为例如G-REX-10 或G-REX-100。在一些实施例中，封闭系统生物反应器为单一生物反应器。

[0572] 1.细胞因子

[0573] 本文中所描述的扩增方法通常使用具有高剂量的细胞因子(确切地说，IL-2)的培养基，如所属领域中所已知。

[0574] 替代地，另外可能使用细胞因子的组合进行TIL的快速扩增和或第二次扩增，其中IL-2、IL-15和IL-21中的两个或更多个的组合是如国际公开第WO 2015/189356号和W国际公开第 WO 2015/189357号中通常概述，其以全文引用的方式明确地并入本文中。因此，可能的组合包括IL-2和IL-15、IL-2和IL-21、IL-15和IL-21以及IL-2、IL-15和IL-21，后者特别适用于许多实施例中。使用细胞因子的组合特别有利于产生淋巴细胞，且确切地说如本文所描述的T细胞。

[0575] 表4:白细胞介素的氨基酸序列。

[0576]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO:3 重组人类IL-2 (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN RWITFCQSII STLT	60 120 134
SEQ ID NO:4 阿地白介素	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFSQSIIST LT	60 120 132
SEQ ID NO:5 重组人类IL-4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI MREKYSKCSS	60 120 130
SEQ ID NO:6 重组人类IL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH	60 120 153
SEQ ID NO:7 重组人类IL-15 (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS	60 115
SEQ ID NO:8 重组人类IL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ HLSSRTHGSE DS	60 120 132

[0577] D.步骤D:第二次扩增

[0578] 在一些实施例中，在采集和初始大量处理之后，例如在如图1中所指示的步骤A和步骤B，以及称为步骤C的转变之后，TIL细胞群体的数量得到扩增。所述进一步扩增在本文中称作第二次扩增，其可以包括所属领域中通常称为快速扩增工艺的扩增工艺(REP;以及如图1 的步骤D中所指示的工艺)。通常在气体可渗透容器中使用包含多种组分(包括饲养细胞、细胞因子源和抗CD3抗体)的培养基来完成第二次扩增。

[0579] 在一些实施例中，TIL的第二次扩增或第二次TIL扩增(其可以包括有时称为REP的扩增;以及如图1的步骤D中所指示的工艺)可以使用所属领域的技术人员已知的任何TIL烧瓶或容器来进行。在一些实施例中，第二次TIL扩增可以进行7天、8天、9天、10天、11 天、12天、13天或14天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可以进行约7天至约14天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可以进行约8天至约14天。在一些实施例中，第二次TIL 扩增可以进行约9天至约14天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可以进行约10天至约14 天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可以进行约11天至约14天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可以进行约12天至约14天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可以进行约13 天至约14天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可以进行约14天。

[0580] 在一实施例中，可以使用本公开的方法(包括例如称为REP的扩增;以及如图1的步骤 D中所指示的工艺)在气体可渗透容器中进行第二次扩增。举例来说，可以在存在白细胞介素-2(IL-2)或白细胞介素-15(IL-15)的情况下使用非特异性T细胞受体刺激迅速地扩增TIL。非特异性T细胞受体刺激可以包括例如抗CD3抗体，例如约30ng/ml的OKT3，一种小鼠单克隆抗CD3抗体(可商购自新泽西州拉里坦(Raritan,NJ)的Ortho-McNeil或加利福尼亚州奥本的美天旎生物技术公司)或UHCT-1(可商购自美国加利福尼亚州圣地亚哥的

BioLegend)。通过在第二次扩增期间包括癌症的一种或多种抗原,包括其抗原部分,例如一个或多个表位,可以扩增TIL以在活体外诱导TIL的进一步刺激,任选地在存在T细胞生长因子(例如300IU/mL IL-2或IL-15)的情况下,所述抗原能够任选地由载体,例如人类白细胞抗原A2(HLA-A2)结合肽,例如0.3μM MART-1:26-35(27L)或gpl 00:209-217(210M) 表达。其它合适的抗原可以包括例如NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶癌症抗原、MAGE-A3、SSX-2和VEGFR2,或其抗原部分。还可以通过用在表达HLA-A2的抗原呈递细胞上进行脉冲的相同癌症抗原再刺激,迅速地扩增TIL。替代地,可以用例如实例辐照的自体淋巴细胞或用辐照的HLA-A2+同种异体淋巴细胞和IL-2进一步再刺激TIL。在一些实施例中,再刺激作为第二次扩增的一部分来进行。在一些实施例中,在辐照的自体淋巴细胞的存在下或在辐照的HLA-A2+同种异体淋巴细胞和IL-2的情况下进行第二次扩增。

[0581] 在一实施例中,细胞培养基进一步包含IL-2。在一些实施例中,细胞培养基包含约3000 IU/mL IL-2。在一实施例中,细胞培养基包含约1000IU/mL、约1500IU/mL、约2000IU/mL、约2500IU/mL、约3000IU/mL、约3500IU/mL、约4000IU/mL、约4500IU/mL、约5000IU/mL、约5500IU/mL、约6000IU/mL、约6500IU/mL、约7000IU/mL、约7500IU/mL或约8000IU/mL IL-2。在一实施例中,细胞培养基包含在1000与2000IU/mL之间、在2000与3000IU/mL 之间、在3000与4000IU/mL之间、在4000与5000IU/mL之间、在5000与6000IU/mL之间、在6000与7000IU/mL之间、在7000与8000IU/mL之间或在8000IU/mL之间的IL-2。

[0582] 在一实施例中,细胞培养基包含OKT-3抗体。在一些实施例中,细胞培养基包含约30 ng/mL OKT-3抗体。在一实施例中,细胞培养基包含约0.1ng/mL、约0.5ng/mL、约1ng/mL、约2.5ng/mL、约5ng/mL、约7.5ng/mL、约10ng/mL、约15ng/mL、约20ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200ng/mL、约500ng/mL和约1μg/mL OKT-3抗体。在一实施例中,细胞培养基包含在0.1ng/mL与1ng/mL之间、在1ng/mL与5ng/mL之间、在5ng/mL 与10ng/mL之间、在10ng/mL与20ng/mL之间、在20ng/mL与30ng/mL之间、在30ng/mL 与40ng/mL之间、在40ng/mL与50ng/mL之间和在50ng/mL与100ng/mL之间的OKT-3 抗体。在一些实施例中,细胞培养基不包含OKT-3抗体。在一些实施例中,OKT-3抗体为莫罗单抗。

[0583] 在一些实施例中,细胞培养基包含含有一种或多种TNFRSF激动剂的细胞培养基。在一些实施例中,TNFRSF激动剂包含4-1BB激动剂。在一些实施例中,TNFRSF激动剂为4-1BB激动剂,并且4-1BB激动剂是选自以下组成的组:乌瑞鲁单抗、乌托米单抗、EU-101、融合蛋白,以及其片段、衍生物、变体、生物类似物及组合。在一些实施例中,以足以在细胞培养基中达到0.1μg/mL与100μg/mL之间的浓度的浓度添加TNFRSF激动剂。在一些实施例中,以足以在细胞培养基中达到20μg/mL与40μg/mL之间的浓度的浓度添加TNFRSF激动剂。

[0584] 在一些实施例中,除了一种或多种TNFRSF激动剂之外,细胞培养基进一步包含起始浓度为约3000IU/mL的IL-2和起始浓度为约30ng/mL的OKT-3抗体,且其中一种或多种TNFRSF激动剂包含4-1BB激动剂。

[0585] 在一些实施例中,在第二次扩增期间,以组合的形式采用IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21 的组合。在一些实施例中,在第二次扩增期间,包括例如在根据图1的步骤D工艺期间,以及如本文中所描述,可以包括IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21以及其任何组合。在一些实施例中,在第二次扩增期间,以组合形式采用IL-2、IL-15和IL-21的组合。在一些实施例

中，在根据图1的步骤D工艺期间且如本文所描述，可以包括IL-2、IL-15和IL-21以及其任何组合。

[0586] 在一些实施例中，可以在包含IL-2、OKT-3、抗原呈递饲养细胞和任选的TNFRSF激动剂的补充细胞培养基中进行第二次扩增。在一些实施例中，在补充细胞培养基中进行第二次扩增。在一些实施例中，补充细胞培养基包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，第二细胞培养基包含IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC；也称为抗原呈递饲养细胞)。在一些实施例中，在包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞(即，抗原呈递细胞)的细胞培养基中进行第二次扩增。

[0587] 在一些实施例中，第二次扩增培养基包含约500IU/mL IL-15、约400IU/mL IL-15、约 300IU/mL IL-15、约200IU/mL IL-15、约180IU/mL IL-15、约160IU/mL IL-15、约140IU/mL IL-15、约120IU/mL IL-15或约100IU/mL IL-15。在一些实施例中，第二次扩增培养基包含约500IU/mL IL-15至约100IU/mL IL-15。在一些实施例中，第二次扩增培养基包含约400IU/mL IL-15至约100IU/mL IL-15。在一些实施例中，第二次扩增培养基包含约300IU/mL IL-15至约100IU/mL IL-15。在一些实施例中，第二次扩增培养基包含约200IU/mL IL-15。在一些实施例中，细胞培养基包含约180IU/mL IL-15。在一实施例中，细胞培养基进一步包含IL-15。在一优选实施例中，细胞培养基包含约180IU/mL IL-15。

[0588] 在一些实施例中，第二次扩增培养基包含约20IU/mL IL-21、约15IU/mL IL-21、约12 IU/mL IL-21、约10IU/mL IL-21、约5IU/mL IL-21、约4IU/mL IL-21、约3IU/mL IL-21、约 2IU/mL IL-21、约1IU/mL IL-21或约0.5IU/mL IL-21。在一些实施例中，第二次扩增培养基包含约20IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施例中，第二次扩增培养基包含约15 IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施例中，第二次扩增培养基包含约12IU/mL IL-21 至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施例中，第二次扩增培养基包含约10IU/mL IL-21至约0.5 IU/mL IL-21。在一些实施例中，第二次扩增培养基包含约5IU/mL IL-21至约1IU/mL IL-21。在一些实施例中，第二次扩增培养基包含约2IU/mL IL-21。在一些实施例中，细胞培养基包含约1IU/mL IL-21。在一些实施例中，细胞培养基包含约0.5IU/mL IL-21。在一实施例中，细胞培养基进一步包含IL-21。在一优选实施例中，细胞培养基包含约1IU/mL IL-21。

[0589] 在一些实施例中，抗原呈递饲养细胞(APC)为PBMC。在一实施例中，快速扩增和/或第二次扩增中的TIL与PBMC和/或抗原呈递细胞的比率为约1比25、约1比50、约1比100、约1比125、约1比150、约1比175、约1比200、约1比225、约1比250、约1比275、约1比300、约1比325、约1比350、约1比375、约1比400或约1比500。在一实施例中，快速扩增和/或第二次扩增中的TIL与PBMC的比率是在1比50与1比300之间。在一实施例中，快速扩增和/或第二次扩增中的TIL与PBMC的比率是在1比100与1比200之间。

[0590] 在一实施例中，在烧瓶中进行REP和/或第二次扩增，其中将块状TIL在150ml培养基与100或200倍过量的灭活饲养细胞、30mg/mL OKT3抗CD3抗体和3000IU/mL IL-2混合。进行培养基更换(通过吸入新鲜培养基更换通常2/3的培养基)直到将细胞转移到替代的生长室中。替代的生长室包括G-REX烧瓶和气体可渗透容器，如下文更充分地论述。

[0591] 在一些实施例中，将第二次扩增(其可以包括称为REP工艺的工艺)缩短为7-14天，如实例和图式中所论述。在一些实施例中，将第二次扩增缩短为11天。

[0592] 在一实施例中，可以使用T-175烧瓶和如先前所描述的气体可渗透袋(Tran等人，《免疫治疗学杂志》2008,31,742-51;Dudley等人,《免疫治疗学杂志》,2003,26,332-42)或气体可渗透的培养皿(G-Rex烧瓶)进行REP和/或第二次扩增。在一些实施例中，在T-175烧瓶中进行第二次扩增(包括称为快速扩增的扩增)，并且可以将悬浮于150mL培养基中的约1×10^6个TIL添加到每个T-175烧瓶中。可以在CM与补充有3000IU/mL IL-2和30ng/ml抗CD3的AIM-V培养基的1比1混合物中培养TIL。可以在37℃/5％CO_2下培育T-175烧瓶。可以在第5天使用具有3000IU/mL IL-2的50/50培养基更换一半培养基。在一些实施例中，在第7天，可以将两个T-175烧瓶中的细胞合并到3L袋中，并且将具有5％人类AB血清和 3000IU/mL IL-2的300mL AIM V添加到300ml TIL悬浮液中。每天或每两天对每个袋中的细胞数量进行计数，并且添加新鲜培养基以保持细胞计数介于0.5与2.0×10^6个细胞/毫升之间。

[0593] 在一实施例中，可以在具有100cm气体可渗透硅胶底部的500mL容量的气体可渗透烧瓶(G-Rex 100，可商购自美国明尼苏达州新布莱顿的威尔森沃尔夫制造公司)中进行第二次扩增(其可以包括称为REP的扩增，以及图1的步骤D中涉及的那些)，可以将5×10^6或10×10^6个TIL与PBMC一起培养在补充有5％人类AB血清、3000IU/mL IL-2和30ng/ml抗CD3(OKT3)的400mL 50/50培养基中。可以在37℃/5％CO_2下培育G-Rex 100烧瓶。在第5天，可以去除250mL上清液并将其放置到离心瓶中且以1500rpm(491×g)离心10分钟。可以用具有5％人类AB血清、3000IU/mL IL-2的150mL新鲜培养基重新悬浮TIL沉淀，并且将其添加回最初的G-Rex 100烧瓶中。当在G-Rex 100烧瓶中连续扩增TIL时，在第7天，可以将每个G-Rex 100中的TIL悬浮于存在于每个烧瓶中的300mL培养基中，并且可将细胞悬浮液分成3份可用于接种3个G-Rex 100烧瓶的100mL等分试样。随后可以将具有5％人类 AB血清和3000IU/mL IL-2的150mL AIM-V添加到每个烧瓶中。可以在37℃/5％CO_2下培育G-Rex 100烧瓶，并且在4天后，可以将具有3000IU/mL IL-2的150mL AIM-V添加到每个G-REX 100烧瓶中。可以在培养的第14天采集细胞。

[0594] 在一实施例中，在烧瓶中进行第二次扩增(包括称为REP的扩增)，其中将块状TIL在 150ml培养基中与100或200倍过量的灭活饲养细胞、30mg/mL OKT3抗CD3抗体和3000IU/mL IL-2混合。在一些实施例中，进行培养基更换直到将细胞转移到替代的生长室中。在一些实施例中，通过吸入新鲜培养基来更换2/3的培养基。在一些实施例中，替代的生长室包括G-REX烧瓶和气体可渗透容器，如下文更充分地论述。

[0595] 在一实施例中，进行第二次扩增(包括称为REP的扩增)且进一步包含选择具有优良肿瘤反应性的TIL的步骤。可以使用所属领域中已知的任何选择方法。举例来说，美国专利申请公开第2016/0010058 A1号(其公开内容以引用的方式并入本文中)中描述的方法可用于选择具有优良肿瘤反应性的TIL。

[0596] 任选地，可在第二次扩增(包括称为REP扩增的扩增)之后使用所属领域中已知的标准分析来进行细胞存活率分析。举例来说，可对具有块状TIL的样品进行锥虫蓝排除分析，其选择性地标记死细胞且进行存活率评估。在一些实施例中，可以使用Cellometer K2自动化细胞计数器(马萨诸塞州劳伦斯市(Lawrence,MA)的Nexcelom Bioscience)对TIL样品进行计数和存活率测定。在一些实施例中，根据标准Cellometer K2图像细胞仪自动细胞计数器方案确定存活率。

[0597] 在一些实施例中，可以使用T-175烧瓶和如先前描述的气体可渗透袋(Tran KQ,

Zhou J, Durflinger KH等人,2008,《免疫疗法杂志》,31:742-751和Dudley ME, Wunderlich JR,Shelton TE等人,2003,《免疫疗法杂志》,26:332-342)或气体可渗透G-Rex烧瓶来进行TIL的第二次扩增(包括称为REP的扩增)。在一些实施例中,使用烧瓶进行第二次扩增。在一些实施例中,使用气体可渗透G-Rex烧瓶进行第二次扩增。在一些实施例中,在T-175烧瓶中进行第二次扩增,并且将约1×10^6个TIL悬浮于约150mL培养基中且将其添加到每个T-175烧瓶中。TIL用辐照的(50Gy)同种异体PBMC作为"饲养"细胞以1比100的比率培养,并且将细胞培养在CM与补充有3000IU/mL IL-2和30ng/mL抗CD3的AIM-V培养基(50/50培养基)的1比1混合物中。在37℃/5%CO_2下培育T-175烧瓶。在一些实施例中,在第5天使用具有3000IU/mL IL-2的50/50培养基来更换一半培养基。在一些实施例中,在第7天,可以将2个T-175烧瓶中的细胞合并到3L袋中,并且将具有5%人类AB血清和3000IU/mL IL-2的300mL AIM-V添加到300ml TIL悬浮液中。可以每天或每两天对每个袋中的细胞数量进行计数,并且可以添加新鲜培养基以保持细胞计数介于约0.5与约2.0×10^6个细胞/毫升之间。

[0598] 在一些实施例中,在具有100cm^2气体可渗透硅胶底部的500mL容量烧瓶(G-Rex 100,威尔森沃尔夫制造公司)(图1)中进行第二次扩增(包括称为REP的扩增),将约5×10^6或 10×10^6个TIL与辐照的同种异体PBMC以1比100的比率培养在补充有3000IU/mL IL-2和30ng/mL抗CD3的400mL 50/50培养基中。在37℃/5%CO_2下培育G-Rex 100烧瓶。在一些实施例中,在第5天,去除250mL上清液且将其放置到离心瓶中并且以1500rpm(491g) 离心10分钟。接着可以用具有3000IU/mL IL-2的150mL新鲜50/50培养基再悬浮TIL沉淀,并且将其添加回最初的G-Rex 100烧瓶中。在G-Rex 100烧瓶中连续扩增TIL的实施例中,在第7天,将每个G-Rex 100中的TIL悬浮于存在于每个烧瓶中的300mL培养基中,并且将细胞悬浮液分成三份可用于接种3个G-Rex 100烧瓶的100mL等分试样。随后将具有5%人类AB血清和3000IU/mL IL-2的150mL AIM-V添加到每个烧瓶中。在37℃/5%CO_2下培育 G-Rex 100烧瓶,并且在4天之后,将具有3000IU/mL IL-2的150mL AIM-V添加到每个G-Rex 100烧瓶中。在培养的第14天采集细胞。

[0599] T淋巴细胞和B淋巴细胞的多种抗原受体是通过有限但大量的基因片段的体细胞重组产生的。这些基因片段:V(可变)、D(多样性)、J(连接)和C(恒定)确定免疫球蛋白与T细胞受体(TCR)的结合特异性和下游应用。本发明提供一种用于产生TIL的方法,所述TIL展现并且增加T细胞库多样性。在一些实施例中,通过本发明方法获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中,第二次扩增中获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中,多样性的增加是免疫球蛋白多样性和/或T细胞受体多样性的增加。在一些实施例中,免疫球蛋白的多样性是在免疫球蛋白重链中。在一些实施例中,免疫球蛋白的多样性是在免疫球蛋白轻链中。在一些实施例中,多样性是在T细胞受体中。在一些实施例中,多样性是在选自以下组成的组的一种T细胞受体中:α、β、γ和δ受体。在一些实施例中,T 细胞受体(TCR)α和/或β的表达增加。在一些实施例中,T细胞受体(TCR)α的表达增加。在一些实施例中,T细胞受体(TCR)β的表达增加。在一些实施例中,TCRab(即,TCRα/β) 的表达增加。

[0600] 在一些实施例中,第二次扩增培养基(例如,有时称为CM2或第二细胞培养基)包含IL-2、OKT-3以及抗原呈递饲养细胞(APC),如下文更详细地论述。

[0601] 在一些实施例中,在封闭系统生物反应器中进行第二次扩增,例如根据图1的步骤D。在一些实施例中,如本文所描述,采用封闭系统进行TIL扩增。在一些实施例中,采用单一

生物反应器。在一些实施例中，采用的单一生物反应器为例如G-REX-10或G-REX-100。在一些实施例中，封闭系统生物反应器为单一生物反应器。

[0602] 1.饲养细胞和抗原呈递细胞

[0603] 在一实施例中，本文中所描述的第二次扩增程序(例如，包括如图1的步骤D中描述的那些扩增，以及称为REP的那些扩增)在REP TIL扩增期间和/或在第二次扩增期间需要过量的饲养细胞。在许多实施例中，饲养细胞为获自健康血液供体的标准全血单位的外周血单核细胞(PBMC)。使用标准方法(例如Ficoll-Paque梯度分离)获得PBMC。

[0604] 一般来说，通过辐照或热处理灭活同种异体PBMC，且将其用于REP程序中，如实例中所描述，其提供一种用于评估辐照的同种异体PBMC的复制不胜任的示范性方案。

[0605] 在一些实施例中，如果第14天的活细胞总数小于在REP第0天和/或第二次扩增第0天 (即，第二次扩增开始当天)置于培养物中的初始活细胞数量，那么认为PBMC为复制不胜任的且认可用于本文中所描述的TIL扩增程序中。

[0606] 在一些实施例中，如果在存在OKT3和IL-2的情况下培养，第7天和第14天的活细胞总数相比于在REP第0天和/或第二次扩增第0天(即，第二次扩增开始当天)置于培养物中的初始活细胞数量并未增加，那么认为PBMC为复制不胜任的且认可用于本文中所描述的 TIL扩增程序中。在一些实施例中，在存在30ng/ml OKT3抗体和3000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。

[0607] 在一些实施例中，如果在存在OKT3和IL-2的情况下培养，第7天和第14天的活细胞总数相比于在REP第0天和/或第二次扩增第0天(即，第二次扩增开始当天)置于培养物中的初始活细胞数量并未增加，那么认为PBMC为复制不胜任的且认可用于本文中所描述的 TIL扩增程序中。在一些实施例中，在存在5-60ng/ml OKT3抗体和1000-6000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中，在存在10-50ng/ml OKT3抗体和2000-5000IU/ml IL-2 的情况下培养PBMC。在一些实施例中，在存在20-40ng/ml OKT3抗体和2000-4000IU/ml IL-2 的情况下培养PBMC。在一些实施例中，在存在25-35ng/ml OKT3抗体和2500-3500IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。

[0608] 在一些实施例中，抗原呈递饲养细胞为PBMC。在一些实施例中，抗原呈递饲养细胞为人造抗原呈递饲养细胞。在一实施例中，第二次扩增中的TIL与抗原呈递饲养细胞的比率为约1比25、约1比50、约1比100、约1比125、约1比150、约1比175、约1比200、约 1比225、约1比250、约1比275、约1比300、约1比325、约1比350、约1比375、约 1比400或约1比500。在一实施例中，第二次扩增中的TIL与抗原呈递饲养细胞的比率在1 比50与1比300之间。在一实施例中，第二次扩增中的TIL与抗原呈递饲养细胞的比率在1 比100与1比200之间。

[0609] 在一实施例中，本文中所描述的第二次扩增程序需要约2.5×10^9个饲养细胞与约100×10^6个TIL的比率。在另一实施例中，本文中所描述的第二次扩增程序需要约2.5×10^9个饲养细胞与约50×10^6个TIL的比率。在又一实施例中，本文中所描述的第二次扩增程序需要约2.5×10^9个饲养细胞与约25×10^6个TIL的比率。

[0610] 在一实施例中，本文中所描述的第二次扩增程序在第二次扩增期间需要过量的饲养细胞。在许多实施例中，饲养细胞为获自健康血液供体的标准全血单位的外周血单核细胞(PBMC)。使用标准方法(例如Ficoll-Paque梯度分离)获得PBMC。在一实施例中，使用人造抗原呈递 (aAPC)细胞代替PBMC。

[0611] 一般来说,通过辐照或热处理灭活同种异体PBMC,且将其用于本文中所描述的TIL扩增程序,包括图式和实例中描述的示范性程序中。

[0612] 在一实施例中,在第二次扩增中使用人造抗原呈递细胞代替PBMC或与PBMC组合。

[0613] 2.细胞因子

[0614] 本文中所描述的扩增方法通常使用具有高剂量的细胞因子(确切地说,IL-2)的培养基,如所属领域中所已知。

[0615] 替代地,另外可能使用细胞因子的组合进行TIL的快速扩增和或第二次扩增,其中IL-2、IL-15和IL-21中的两个或更多个的组合是如国际公开第WO 2015/189356号和W国际公开第 WO 2015/189357号中通常概述,其以全文引用的方式明确地并入本文中。因此,可能的组合包括IL-2和IL-15、IL-2和IL-21、IL-15和IL-21以及IL-2、IL-15和IL-21,后者特别适用于许多实施例中。使用细胞因子的组合特别有利于产生淋巴细胞,且确切地说如本文所描述的T细胞。

[0616] E.步骤E:采集TIL

[0617] 在第二次扩增步骤之后,可以采集细胞。在一些实施例中,在例如图1中所提供的一个、两个、三个、四个或更多个扩增步骤之后采集TIL。在一些实施例中,在例如图1中所提供的两个扩增步骤之后采集TIL。

[0618] 可以任何适当且无菌的方式,包括例如通过离心来采集TIL。用于TIL采集的方法为所属领域中众所周知的,且任何这类已知的方法可用于本发明方法。在一些实施例中,使用自动化系统采集TIL。

[0619] 细胞采集器和/或细胞处理系统可商购自多个来源,包括例如Fresenius Kabi、Tomtec Life Science、珀金埃尔默公司(Perkin Elmer)和Inotech Biosystems国际公司。任何基于细胞的采集器均可用于本发明方法。在一些实施例中,细胞采集器和/或细胞处理系统为基于膜的细胞采集器。在一些实施例中,通过细胞处理系统,例如LOVO系统(由Fresenius Kabi制造) 进行细胞采集。术语“LOVO细胞处理系统”也指由任何供应商制造的在无菌和/或封闭系统环境中可以将包含细胞的溶液泵送至膜或滤波器(例如旋转膜或旋转过滤器),允许连续流动并进行细胞处理以在没有沉淀的情况下去除上清液或细胞培养基的任何仪器或装置。在一些实施例中,细胞采集器和/或细胞处理系统可以在封闭无菌的系统中进行细胞分离、洗涤、流体交换、浓缩和/或其它细胞处理步骤。

[0620] 在一些实施例中,从封闭系统生物反应器中进行采集,例如根据图1的步骤E。在一些实施例中,如本文所描述,采用封闭系统进行TIL扩增。在一些实施例中,采用单一生物反应器。在一些实施例中,采用的单一生物反应器为例如G-REX-10或G-REX-100。在一些实施例中,封闭系统生物反应器为单一生物反应器。

[0621] 在一些实施例中,根据实例G中描述的工艺执行根据图1的步骤E。在一些实施例中,通过注射器在无菌条件下进入封闭系统以维持系统的无菌性和封闭性。在一些实施例中,采用如实例G中所描述的封闭系统。

[0622] 在一些实施例中,根据实例G中所描述的方法采集TIL。在一些实施例中,使用如章节 8.5中所描述的方法采集第1天与第11天之间的TIL(在实例G中称为第11天TIL采集)。在一些实施例中,使用如章节8.12中所描述的方法采集第12天与第22天之间的TIL(在实例G中称为第22天TIL采集)。

[0623] F.步骤F:最终调配/转移到输注袋中

[0624] 在完成如图1中以示范性顺序提供且如上文和本文详细概述的步骤A至E之后,将细胞转移到容器中以用于向患者给药。在一些实施例中,一旦使用上文所描述的扩增方法获得治疗上足够数量的TIL,就将其转移到容器中以用于向患者给药。

[0625] 在一实施例中,使用本公开的APC扩增的TIL以医药组合物形式给予患者。在一实施例中,医药组合物为TIL于无菌缓冲液中的悬浮液。可以通过如所属领域中已知的任何合适途径给予使用本公开的PBMC扩增的TIL。在一些实施例中,T细胞是以单次动脉内或静脉内输注形式给药,优选地持续大致30至60分钟。其它合适的给药途径包括腹膜内、鞘内和淋巴管内。

[0626] G.任选的细胞培养基组分

[0627] 1.抗CD3抗体

[0628] 在一些实施例中,本文中所描述的扩增方法(包括称为REP的那些,参见例如图1)中使用的培养基还包括抗CD3抗体。抗CD3抗体与IL-2结合诱导TIL群体中的T细胞活化和细胞分裂。全长抗体以及Fab和F(ab')2片段可见到这种效果,前者通常是优选的;参见例如Tsoukas等人,《免疫学杂志》,1985,135,1719,其以全文引用的方式并入本文中。

[0629] 如所属领域的技术人员将了解,存在多种适合用于本发明的抗人类CD3抗体,包括来自各种哺乳动物的抗人类CD3多克隆抗体和单克隆抗体,包括(但不限于)鼠类、人类、灵长类动物、大鼠和犬类抗体。在特定实施例中,使用OKT3抗CD3抗体(可商购自新泽西州拉里坦的Ortho-McNeil或加利福尼亚州奥本的美天旎生物技术)。

[0630] 表5:莫罗单抗的氨基酸序列(示范性OKT-3抗体)

[0631]

标识符	序列(单字母氨基酸符号)	
SEQ ID NO:1 莫罗单抗重链	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID NO:2 莫罗单抗轻链	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC	60 120 180 213

[0632] 2. 4-1BB(CD137)激动剂

[0633] 在一实施例中,TNFRSF激动剂为4-1BB(CD137)激动剂。4-1BB激动剂可以是所属领域中已知的任何4-1BB结合分子。4-1BB结合分子可以是能够结合人类或哺乳动物4-1BB的单克隆抗体或融合蛋白。4-1BB激动剂或4-1BB结合分子可以包含免疫球蛋白分子的任何同种型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、 IgA1和IgA2)或亚类别的免疫球蛋白重链。4-1BB激动剂或4-1BB结合分子可以同时具有重链和轻链。如本文中所使用,术语结合分子还包括结合至4-1BB的抗体(包括全长抗体),单克隆抗体(包括全长单克隆抗体),多克隆抗体,多特异性抗体(例如,双特异性抗体),人类、人类化或嵌合抗体,和抗体片段,例如Fab片段、F(ab′)片段、由Fab表达库产生的片段、以上任一种的表位结合片段,以及工程改造形式的抗体,例如scFv分子。在一实施例中, 4-1BB激动剂是一种为全人类抗体的抗原结合蛋白。在一实施例中,4-1BB激动剂是一种为人类化抗体的

抗原结合蛋白。在一些实施例中，用于本公开方法和组合物的4-1BB激动剂包括抗4-1BB抗体、人类抗4-1BB抗体、小鼠抗4-1BB抗体、哺乳动物抗4-1BB抗体、单克隆抗4-1BB抗体、多克隆抗4-1BB抗体、嵌合抗4-1BB抗体、抗4-1BB纤连蛋白、抗4-1BB 域抗体、单链抗4-1BB片段、重链抗4-1BB片段、轻链抗4-1BB片段、抗4-1BB融合蛋白，以及其片段、衍生物、结合物、变体或生物类似物。已知激动性抗4-1BB抗体能诱导较强的免疫反应。Lee等人，《科学公共图书馆综合卷(PLOS One)》，2013,8,e69677。在一优选实施例中，4-1BB激动剂为激动性抗4-1BB人类化或完全人类单克隆抗体(即，来源于单细胞系的抗体)。在一实施例中，4-1BB激动剂为EU-101(Eutilex有限公司)、乌托米单抗或乌瑞鲁单抗，或其片段、衍生物、结合物、变体或生物类似物。在一优选实施例中，4-1BB激动剂为乌托米单抗或乌瑞鲁单抗，或其片段、衍生物、结合物、变体或生物类似物。

[0634] 在一优选实施例中，4-1BB激动剂或4-1BB结合分子还可以是融合蛋白。在一优选实施例中，与通常具有两个配体结合域的激动性单克隆抗体相比，多聚体4-1BB激动剂，例如三聚体或六聚体4-1BB激动剂(具有三个或六个配体结合域)可以诱导优良的受体(4-1BBL) 集群和内部细胞信号传导复合物形成。包含三个TNFRSF结合域和IgG1-Fc并任选地进一步连接这些融合蛋白中的两个或更多个的三聚体(三价)或六聚体(或六价)或更大融合蛋白描述于例如Gieffers等人，《分子癌症治疗(Mol.Cancer Therapeutics)》，2013,12,2735-47中。

[0635] 已知激动性4-1BB抗体和融合蛋白能诱导较强的免疫反应。在一优选实施例中，4-1BB 激动剂是以足以降低毒性的方式特异性结合于4-1BB抗原的单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施例中，4-1BB激动剂是消除抗体依赖性细胞毒性(例如NK细胞的细胞毒性)的激动性 4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施例中，4-1BB激动剂是消除抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的激动性4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施例中，4-1BB激动剂是消除补体依赖性细胞毒性(CDC)的激动性4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施例中，4-1BB激动剂是消除Fc区功能性的激动性4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。

[0636] 在一些实施例中，4-1BB激动剂的特征在于以高亲和力和激动活性结合于人类4-1BB (SEQ ID NO:9)。在一实施例中，4-1BB激动剂是结合于人类4-1BB(SEQ ID NO:9)的结合分子。在一实施例中，4-1BB激动剂是结合于鼠类4-1BB(SEQ ID NO:10)的结合分子。表 6 中汇总了4-1BB激动剂或结合分子所结合的4-1BB抗原的氨基酸序列。

[0637] 表6. 4-1BB抗原的氨基酸序列。

[0638]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO:9 人类4-1BB，肿瘤坏死因子受体超家族成员 9（智人）	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG CSCRFPEEEE GGCEL	60 120 180 240 255
SEQ ID NO:10 鼠类4-1BB，肿瘤坏死因子受体超家族成员 9（小家鼠(Mus musculus)）	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG GHSLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKTT GAAQEEDACS CRCPQEEEGG GGYEL	60 120 180 240 256

[0639] 在一些实施例中，所描述的组合物、工艺和方法包括以约100pM或更低的K_D结合人类或鼠类4-1BB、以约90pM或更低的K_D结合人类或鼠类4-1BB、以约80pM或更低的K_D结合人类或鼠类4-1BB、以约70pM或更低的K_D结合人类或鼠类4-1BB、以约60pM或更低的K_D结合人类或

鼠类4-1BB、以约50pM或更低的K_D结合人类或鼠类4-1BB、以约40pM 或更低的K_D结合人类或鼠类4-1BB或以约30pM或更低的K_D结合人类或鼠类4-1BB的 4-1BB激动剂。

[0640] 在一些实施例中，所描述的组合物、工艺和方法包括以约$7.5\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约$7.5\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约$8\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约$8.5\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约$9\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约 $9.5\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类4-1BB或以约$1\times10^6$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类4-1BB的4-1BB激动剂。

[0641] 在一些实施例中，所描述的组合物、工艺和方法包括以约2×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约2.1×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约2.2×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约2.3×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约2.4×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约2.5×10^{-5} 1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约2.6×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB或以约2.7×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约2.8×10^{-5}1/s 或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约2.9×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB或以约3×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB的4-1BB激动剂。

[0642] 在一些实施例中，所描述的组合物、工艺和方法包括以约10nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类4-1BB、以约9nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类4-1BB、以约8nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类4-1BB、以约7nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类4-1BB、以约6nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类4-1BB、以约5nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类4-1BB、以约4nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类4-1BB、以约3nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类 4-1BB、以约2nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类4-1BB或以约1nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类4-1BB的4-1BB激动剂。

[0643] 在一优选实施例中，4-1BB激动剂为乌托米单抗(又称为PF-05082566或MOR-7480)或其片段、衍生物、结合物、变体或生物类似物。乌托米单抗购自辉瑞公司(Pfizer,Inc)。乌托米单抗为免疫球蛋白G2-λ、抗[智人TNFRSF9(肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员9，4-1BB,T细胞抗原ILA,CD137)]、智人(完全人类)单克隆抗体。表EE中阐述乌托米单抗的氨基酸序列。乌托米单抗包含在Asn59和Asn292处的糖基化位点；在位置22-96(V_H-V_L)、143-199(C_H1-C_L)、256-316(C_H2)和362-420(C_H3)处的重链链内二硫桥；在位置22'-87' (V_H-V_L)和136'-195'(C_H1-C_L)处的轻链链内二硫桥；在IgG2A异构体位置218-218、219-219、222-222和225-225处，在IgG2A/B异构体位置218-130、219-219、222-222和225-225处，和在IgG2B异构体位置219-130(2)、222-222和225-225处的链间重链-重链二硫桥；以及在 IgG2A异构体位置130-213'(2)、IgG2A/B异构体位置218-213'和130-213'处和在IgG2B异构体位置218-213'(2)处的链间重链-轻链二硫桥。乌托米单抗和其变体及片段的制备和性质描述于美国专利第8,821,867号；第8,337,850号和第9,468,678号，以及国际专利申请公开第WO 2012/032433 A1号中，其每一个的公开内容以引用的方式并入本文中。乌托米单抗的临床前特征描述于Fisher等人，《癌症免疫学与免疫治疗学(Cancer Immunolog.&Immunother.)》2012,61,1721-33。乌托米单抗在多种血液和实体肿瘤病症中的当前临床试验包括美国国家卫生

研究院临床试验数据库(U.S.National Institutes of Health clinicaltrials.gov)标识符NCT02444793、NCT01307267、NCT02315066和NCT02554812。

[0644] 在一实施例中,4-1BB激动剂包含由SEQ ID NO:11所载的重链和由SEQ ID NO:12所载的轻链。在一实施例中,4-1BB激动剂包含分别具有SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列的重链和轻链,或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或结合物。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列至少99%一致的重链和轻链。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列至少98%一致的重链和轻链。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列至少97%一致的重链和轻链。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列至少96%一致的重链和轻链。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:11 和SEQ ID NO:12中所示的序列至少95%一致的重链和轻链。

[0645] 在一实施例中,4-1BB激动剂包含乌托米单抗的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一实施例中,4-1BB激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:13中所示的序列,并且4-1BB 激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:14中所示的序列和其保守性氨基酸取代。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中所示的序列至少99%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中所示的序列至少98%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中所示的序列至少97%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中所示的序列至少96%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中所示的序列至少95%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,4-1BB激动剂包含scFv抗体,所述scFv抗体包含各自与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中所示的序列至少99%一致的V_H和V_L区。

[0646] 在一实施例中,4-1BB激动剂包含分别具有SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3域,以及分别具有SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3域。

[0647] 在一实施例中,4-1BB激动剂为由药物管理机构参考乌托米单抗批准的4-1BB激动剂生物类似单克隆抗体。在一实施例中,生物类似单克隆抗体包含4-1BB抗体,所述4-1BB抗体包含与参考药品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97%序列一致性(例如,97%、98%、99%或100%序列一致性)并且与参考药品或参考生物产品相比包含一个或多个转译后修饰的氨基酸序列,其中参考药品或参考生物产品为乌托米单抗。在一些实施例中,一个或多个转译后修饰是选自以下中的一个或多个:糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中,生物类似物为授权或提交授权的4-1BB激动剂抗体,其中以不同于参考药品或参考生物产品的配方的配方提供4-1BB激动剂抗体,其中参考药品或参考生物产品为乌托米单抗。4-1BB 激动剂抗体可由药物管理机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品为乌托米单抗。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的

组合物形式提供,其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品为乌托米单抗。

[0648] 表7.与乌托米单抗相关的4-1BB激动剂抗体的氨基酸序列。

[0649]

标识符	序列(单字母氨基酸符号)	
SEQ ID NO:11 乌托米单抗的重链	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTNY SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G	60 120 180 240 300 360 420 441
SEQ ID NO:12 乌托米单抗的轻链	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS	60 120 180 214
SEQ ID NO:13 乌托米单抗的重链可变区	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
SEQ ID NO:14 乌托米单抗的轻链可变区	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL	60 108
SEQ ID NO:15 乌托米单抗的重链CDR1	STYWIS	6
SEQ ID NO:16 乌托米单抗的重链CDR2	KIYPGDSYTN YSPSFQG	17
SEQ ID NO:17 乌托米单抗的重链CDR3	RGYGIFDY	8
SEQ ID NO:18 乌托米单抗的轻链CDR1	SGDNIGDQYA H	11
SEQ ID NO:19 乌托米单抗的轻链CDR2	QDKNRPS	7
SEQ ID NO:20 乌托米单抗的轻链CDR3	ATYTGFGSLA V	11

[0650] 在一优选实施例中,4-1BB激动剂为单克隆抗体乌瑞鲁单抗(又称为BMS-663513和20H4.9.h4a)或其片段、衍生物、变体或生物类似物。乌托米单抗购自百时美施贵宝公司(Bristol-Myers Squibb,Inc.)和Creative Biolabs公司。乌瑞鲁单抗为免疫球蛋白G4-κ、抗[智人TNFRSF9(肿瘤坏死因子受体超家族成员9,4-1BB,T细胞抗原ILA,CD137)]、智人(完全人类)单克隆抗体。表EE中阐述乌瑞鲁单抗的氨基酸序列。乌瑞鲁单抗包含在位置298(和298″)处的N-糖基化位点;在位置22-95(V_H-V_L)、148-204(C_H1-C_L)、262-322(C_H2) 和368-426(C_H3)处(和在位置22″-95″、148″-204″、262″-322″和368″-426″处)的重链链内二硫桥;在位置23'-88'(V_H-V_L)和136'-196'(C_H1-C_L)处(和在位置23″'-88″'和136″'-196″' 处)的轻链链内二硫桥;在位置227-227″和230-230″处的链间重链-重链二硫桥;以及在135-216'和135″-216″'处的链间重链-轻链二硫桥。乌瑞鲁单抗和其变体及片段的制备和性质描述于美国专利第7,288,638号和第8,962,804号中,其公开内容以引用的方式并入本文中。乌瑞鲁单抗的临床前和临床特征描述于Segal等人,《临床癌症研究(Clin.Cancer Res.)》2016 中,可访问http:/dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1272。乌瑞鲁单抗在多种血液和实体肿瘤病症中的当前临床试验包括美国国家卫生研究院临床试验数据库标识符NCT01775631、NCT02110082、NCT02253992和NCT01471210。

[0651] 在一实施例中,4-1BB激动剂包含由SEQ ID NO:21所载的重链和由SEQ ID NO:22所载的轻链。在一实施例中,4-1BB激动剂包含分别具有SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22中所示的序列的重链和轻链,或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或结合物。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22中所示的序列至少99%一致的重链和轻链。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:21

和SEQ ID NO:22中所示的序列至少98％一致的重链和轻链。在一实施例中，4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22中所示的序列至少97％一致的重链和轻链。在一实施例中，4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22中所示的序列至少96％一致的重链和轻链。在一实施例中，4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:21 和SEQ ID NO:22中所示的序列至少95％一致的重链和轻链。

[0652] 在一实施例中，4-1BB激动剂包含乌瑞鲁单抗的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一实施例中，4-1BB激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:23中所示的序列，并且4-1BB 激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:24中所示的序列和其保守性氨基酸取代。在一实施例中，4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中所示的序列至少99％一致的V_H和V_L区。在一实施例中，4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中所示的序列至少98％一致的V_H和V_L区。在一实施例中，4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中所示的序列至少97％一致的V_H和V_L区。在一实施例中，4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中所示的序列至少96％一致的V_H和V_L区。在一实施例中，4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中所示的序列至少95％一致的V_H和V_L区。在一实施例中，4-1BB激动剂包含scFv抗体，所述scFv抗体包含各自与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中所示的序列至少99％一致的V_H和V_L区。

[0653] 在一实施例中，4-1BB激动剂包含分别具有SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3域，以及分别具有SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3域。

[0654] 在一实施例中，4-1BB激动剂为由药物管理机构参考乌瑞鲁单抗批准的4-1BB激动剂生物类似单克隆抗体。在一实施例中，生物类似单克隆抗体包含4-1BB抗体，所述4-1BB抗体包含与参考药品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97％序列一致性(例如，97％、98％、99％或100％序列一致性)并且与参考药品或参考生物产品相比包含一个或多个转译后修饰的氨基酸序列，其中参考药品或参考生物产品为乌瑞鲁单抗。在一些实施例中，一个或多个转译后修饰是选自以下中的一个或多个：糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中，生物类似物为授权或提交授权的4-1BB激动剂抗体，其中以不同于参考药品或参考生物产品的配方的配方提供4-1BB激动剂抗体，其中参考药品或参考生物产品为乌瑞鲁单抗。4-1BB 激动剂抗体可由药物管理机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品为乌瑞鲁单抗。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品为乌瑞鲁单抗。

[0655] 表8：与乌瑞鲁单抗相关的4-1BB激动剂抗体的氨基酸序列。

[0656]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）
SEQ ID NO:21 乌瑞鲁单抗的重链	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 乌瑞鲁单抗的轻链	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 乌瑞鲁单抗的可变重链	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP 60 EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP 120
SEQ ID NO:24 乌瑞鲁单抗的可变轻链	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP 60 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ 110
SEQ ID NO:25 乌瑞鲁单抗的重链 CDR1	GYYWS 5
SEQ ID NO:26 乌瑞鲁单抗的重链 CDR2	EINHGGYVTY NPSLES 16
SEQ ID NO:27 乌瑞鲁单抗的重链 CDR3	DYGPGNYDWY FDL 13
SEQ ID NO:28 乌瑞鲁单抗的轻链 CDR1	RASQSVSSYL A 11
SEQ ID NO:29 乌瑞鲁单抗的轻链 CDR2	DASNRAT 7
SEQ ID NO:30 乌瑞鲁单抗的轻链 CDR3	QQRSDWPPAL T 11

[0657] 在一实施例中，4-1BB激动剂是选自以下组成的组：1D8、3Elor、4B4(BioLegend 309809)、H4-1BB-M127(BD Pharmingen 552532)、BBK2(赛默飞世尔MS621PABX)、145501(Leinco Technologies B591)、由寄存为ATCC号HB-11248并且在美国专利第6,974,863号中公开的细胞系产生的抗体、5F4(BioLegend31 1503)、C65-485(BD Pharmingen 559446)、美国专利申请公开第US 2005/0095244号中公开的抗体、美国专利第7,288,638号中公开的抗体(例如 20H4.9-IgG1(BMS-663031))、美国专利第6,887,673号中公开的抗体(例如4E9或 BMS-554271)、美国专利第7,214,493号中公开的抗体、美国专利第6,303,121号中公开的抗体、美国专利第6,569,997号中公开的抗体、美国专利第6,905,685号中公开的抗体(例如4E9 或BMS-554271)、美国专利第6,362,325号中公开的抗体(例如1D8或BMS-469492；3H3或BMS-469497；或3E1)、美国专利第6,974,863号中公开的抗体(例如53A2)；美国专利第 6,210,669号中公开的抗体(例如1D8、3B8或3E1)、美国专利第5,928,893号中描述的抗体、美国专利第6,303,121号中公开的抗体、美国专利第6,569,997号中公开的抗体、国际专利申请公开第WO 2012/177788号、第WO 2015/119923号和第WO 2010/042433号中公开的抗体，和其片段、衍生物、结合物、变体或生物类似物，其中每一个前述专利或专利申请公开的公开内容以引用的方式并入本文中。

[0658] 在一实施例中，4-1BB激动剂为以下中描述的4-1BB激动性融合蛋白：国际专利申请公开第WO 2008/025516 A1号、第WO 2009/007120 A1号、第WO 2010/003766 A1号、第WO 2010/010051 A1号和第WO 2010/078966 A1号；美国专利申请公开第US 2011/0027218 A1号、第US 2015/0126709 A1号、第US 2011/0111494 A1号、第US 2015/0110734 A1号和第US 2015/0126710 A1号；以及美国专利第9,359,420号、第9,340,599号、第8,921,519和第8,450 460号，其公开内容以引用的方式并入本文中。

[0659] 在一实施例中，4-1BB激动剂为如结构I-A描绘的4-1BB激动性融合蛋白(C端Fc抗体片段融合蛋白)或如结构I-B描绘的4-1BB激动性融合蛋白(N端Fc抗体片段融合蛋白)，或

其片段、衍生物、结合物、变体或生物类似物(参见图50)。在结构I-A和I-B中,圆柱体是指单独的多肽结合域。结构I-A和I-B包含来源于例如4-1BBL或结合4-1BB的抗体的三个线性连接的TNFRSF结合域,所述结合域折叠以形成三价蛋白质,接着通过IgG1-Fc(包括C_H3及C_H2域)连接至第二个三价蛋白质,接着用以通过二硫键(小细长卵形)将两个三价蛋白质连接在一起,使所述结构稳定并且提供能够将六个受体和信号传导蛋白质的胞内信号传导域聚集在一起以形成信号传导复合物的激动剂。以圆柱体形式表示的TNFRSF结合域可为scFv域,包含例如,由可包含亲水性残基和具有灵活性的Gly及Ser序列以及具有溶解性的Glu及Lys的连接子连接的V_H和V_L链。可以使用任何scFv域设计,例如de Marco,《微生物细胞工厂(Microbial Cell Factories)》,2011,10,44;Ahmad等人,《临床与发育免疫学(Clin. & Dev.Immunol.)》2012,980250;Monnier等人,《抗体(Antibodies)》,2013,2,193-208;或并入本文中其它地方的参考文献中。这种形式的融合蛋白结构描述于美国专利第9,359,420号、第9,340,599号、第8,921,519号和第8,450,460号中,其公开内容以引用的方式并入本文中。

[0660] 表GG中给出结构I-A的其它多肽域的氨基酸序列。Fc域优选地包含完整恒定域(SEQ ID NO:31的氨基酸17-230)、完整铰链域(SEQ ID NO:31的氨基酸1-16)或铰链域的一部分(例如,SEQ ID NO:31的氨基酸4-16)。连接C端Fc抗体的优选连接子可选自SEQ ID NO:32至 SEQ ID NO:41中所给出的实施例,包括适合于融合其它多肽的连接子。

[0661] 表9:具有C端Fc抗体片段融合蛋白设计(结构I-A)的TNFRSF融合蛋白(包括4-1BB融合蛋白)的氨基酸序列。

[0662]

标识符	序列(单字母氨基酸符号)	
SEQ ID NO:31 Fc域	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 230
SEQ ID NO:32 连接子	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
SEQ ID NO:33 连接子	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
SEQ ID NO:34 连接子	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
SEQ ID NO:35 连接子	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
SEQ ID NO:36 连接子	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
SEQ ID NO:37 连接子	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
SEQ ID NO:38 连接子	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE	24
SEQ ID NO:39 连接子	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE	23
SEQ ID NO:40 连接子	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E	21
SEQ ID NO:41 连接子	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE	25

[0663] 表HH中给出结构I-B的其它多肽域的氨基酸序列。如果Fc抗体片段与如结构I-B中的 TNRFSF融合蛋白的N端融合,那么Fc模块的序列优选为示于SEQ ID NO:42中的序列,并且连接子序列优选地选自SED ID NO:43至SEQ ID NO:45中所阐述的那些实施例。

[0664] 表10:具有N端Fc抗体片段融合蛋白设计(结构I-B)的TNFRSF融合蛋白(包括4-1BB融合蛋白)的氨基酸序列。

[0665]

标识符	序列(单字母氨基酸符号)	
SEQ ID NO:42 Fc域	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	60 120 180 240 246
SEQ ID NO:43 连接子	SGSGSGSGSG S	11
SEQ ID NO:44 连接子	SSSSSSGSGS GS	12
SEQ ID NO:45 连接子	SSSSSSGSGS GSGSGS	16

[0666] 在一实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一个或多个选自以下组成的组的4-1BB结合域：乌托米单抗的可变重链和可变轻链、乌瑞鲁单抗的可变重链和可变轻链、乌托米单抗的可变重链和可变轻链、选自表GG中描述的可变重链和可变轻链的可变重链和可变轻链、前述可变重链和可变轻链的任何组合，以及其片段、衍生物、结合物、变体和生物类似物。

[0667] 在一实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一个或多个包含4-1BBL 序列的4-1BB结合域。在一实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一个或多个包含根据SEQ ID NO:46的序列的4-1BB结合域。在一实施例中，根据结构I-A或 I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一个或多个包含可溶性4-1BBL序列的4-1BB结合域。在一实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一个或多个包含根据SEQ ID NO:47的序列的4-1BB结合域。

[0668] 在一实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一个或多个4-1BB结合域，所述4-1BB结合域为包含各自分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中所示的序列至少95％一致的V_H和V_L区的scFv域，其中V_H和V_L域由连接子连接。在一实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一个或多个4-1BB结合域，所述4-1BB结合域为包含各自分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中所示的序列至少95％一致的V_H和V_L区的scFv域，其中V_H和V_L域由连接子连接。在一实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB 激动剂融合蛋白包含一个或多个4-1BB结合域，所述4-1BB结合域为包含各自与表11中给出的V_H和V_L序列至少95％一致的V_H和V_L区的scFv域，其中V_H和V_L域由连接子连接。

[0669] 表11：适用作融合蛋白中的4-1BB结合域或scFv 4-1BB激动剂抗体的其它多肽域。

[0670]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）
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 KAGVYYVFFQ 60 LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL 120 SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE 168
SEQ ID NO:48 4B4-1-1 版本 1 的可变重链	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS 118
SEQ ID NO:49 4B4-1-1 版本 1 的可变轻链	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:50 4B4-1-1 版本 2 的可变重链	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA 119
SEQ ID NO:51 4B4-1-1 版本 2 的可变轻链	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:52 H39E3-2 的可变重链	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP 60 GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT 120
SEQ ID NO:53 H39E3-2 的可变轻链	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL 60 WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA 110

[0671] 在一实施例中，4-1BB激动剂为4-1BB激动性单链融合多肽，其包含(i)第一可溶性4-1BB 结合域、(ii)第一肽连接子、(iii)第二可溶性4-1BB结合域、(iv)第二肽连接子和(v)第三可溶性4-1BB结合域，进一步包含在N末端和/或C末端的额外域，且其中所述额外域为Fab或Fc片段域。在一实施例中，4-1BB激动剂为4-1BB激动性单链融合多肽，其包含(i)第一可溶性4-1BB结合域、(ii)第一肽连接子、(iii)第二可溶性4-1BB结合域、(iv)第二肽

连接子和(v)第三可溶性4-1BB结合域,进一步包含在N末端和/或C末端的额外域,其中所述额外域为Fab或Fc片段域,其中每一个可溶性4-1BB域缺乏茎区(其有助于三聚合并且提供到细胞膜的一定距离,但不是4-1BB结合域的一部分)并且第一和第二肽连接子独立地具有3-8个氨基酸的长度。

[0672] 在一实施例中,4-1BB激动剂为4-1BB激动性单链融合多肽,其包含(i)第一可溶性肿瘤坏死因子(TNF)超家族细胞因子域、(ii)第一肽连接子、(iii)第二可溶性TNF超家族细胞因子域、(iv)第二肽连接子和(v)第三可溶性TNF超家族细胞因子域,其中每一个可溶性TNF超家族细胞因子域缺乏茎区并且第一和第二肽连接子独立地具有3-8个氨基酸的长度,且其中每个TNF超家族细胞因子域为4-1BB结合域。

[0673] 在一实施例中,4-1BB激动剂为4-1BB激动性scFv抗体,其包含前述任一个V_H域与前述任一个V_L域连接。

[0674] 在一实施例中,4-1BB激动剂为BPS Bioscience 4-1BB激动剂抗体目录号79097-2,可商购自美国加利福尼亚州圣地亚哥的BPS Bioscience。在一实施例中,4-1BB激动剂为Creative Biolabs 4-1BB激动剂抗体目录号MOM-18179,可商购自美国纽约州希尔兰(Shireley,NY, USA)的Creative Biolabs。

[0675] 3.OX40(CD134)激动剂

[0676] 在一实施例中,TNFRSF激动剂为OX40(CD134)激动剂。OX40激动剂可以是所属领域中已知的任何OX40结合分子。OX40结合分子可以是能够结合至人类或哺乳动物OX40 的单克隆抗体或融合蛋白。OX40激动剂或OX40结合分子可以包含免疫球蛋白分子的任何同种型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、 IgA1和IgA2)或亚类别的免疫球蛋白重链。OX40激动剂或OX40结合分子可以同时具有重链和轻链。如本文中所使用,术语结合分子还包括结合至OX40的抗体(包括全长抗体),单克隆抗体(包括全长单克隆抗体),多克隆抗体,多特异性抗体(例如,双特异性抗体),人类、人类化或嵌合抗体,和抗体片段,例如Fab片段、F(ab′)片段、由Fab表达库产生的片段、以上任一种的表位结合片段,以及工程改造形式的抗体,例如scFv分子。在一实施例中,OX40 激动剂为抗原结合蛋白,即全人类抗体。在一实施例中,OX40激动剂是一种为人类化抗体的抗原结合蛋白。在一些实施例中,用于本公开方法和组合物的OX40激动剂包括抗OX40 抗体、人类抗OX40抗体、小鼠抗OX40抗体、哺乳动物抗OX40抗体、单克隆抗OX40抗体、多克隆抗OX40抗体、嵌合抗OX40抗体、抗OX40纤连蛋白、抗OX40域抗体、单链抗OX40片段、重链抗OX40片段、轻链抗OX40片段、抗OX40融合蛋白,以及其片段、衍生物、结合物、变体或生物类似物。在一优选实施例中,OX40激动剂为激动性抗OX40 人类化或完全人类单克隆抗体(即,来源于单细胞系的抗体)。

[0677] 在一优选实施例中,OX40激动剂或OX40结合分子还可以是融合蛋白。包含与OX40L融合的Fc域的OX40融合蛋白描述于例如Sadun等人,《免疫治疗杂志》,2009,182,1481-89中。在一优选实施例中,与通常具有两个配体结合域的激动性单克隆抗体相比,多聚体OX40激动剂,例如三聚体或六聚体OX40激动剂(具有三个或六个配体结合域)可以诱导优良的受体(OX40L)集群和内部细胞信号传导复合物形成。包含三个TNFRSF结合域和IgG1-Fc 并任选地进一步连接这些融合蛋白中的两个或更多个的三聚体(三价)或六聚体(或六价) 或更大融合蛋白描述于例如Gieffers等人,《分子癌症治疗》,2013,12,2735-47中。

[0678] 已知激动性OX40抗体和融合蛋白能诱导较强的免疫反应。Curti等人,《癌症研究》,2013, 73,7189-98。在一优选实施例中,OX40激动剂是以足以降低毒性的方式特异性结合于OX40 抗原的单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施例中,OX40激动剂是消除抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)(例如NK细胞的细胞毒性)的激动性OX40单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施例中,OX40激动剂是消除抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的激动性OX40单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施例中,OX40激动剂是消除补体依赖性细胞毒性(CDC)的激动性OX40单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施例中,OX40激动剂是消除Fc区功能性的激动性OX40 单克隆抗体或融合蛋白。

[0679] 在一些实施例中,OX40激动剂的特征在于以高亲和力和激动活性结合于人类OX40(SEQ ID NO:54)。在一实施例中,OX40激动剂是结合于人类OX40(SEQ ID NO:54)的结合分子。在一实施例中,OX40激动剂是结合于鼠类OX40(SEQ ID NO:55)的结合分子。表12中汇总了OX40激动剂或结合分子所结合的OX40抗原的氨基酸序列。

[0680] 表12:OX40抗原的氨基酸序列。

[0681]

标识符	序列(单字母氨基酸符号)	
SEQ ID NO:54 人类OX40(智人)	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI	60 120 180 240 277
SEQ ID NO:55 鼠类OX40(小家鼠)	MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI	60 120 180 240 272

[0682] 在一些实施例中,所描述的组合物、工艺和方法包括以约100pM或更低的K_D结合人类或鼠类OX40、以约90pM或更低的K_D结合人类或鼠类OX40、以约80pM或更低的K_D结合人类或鼠类OX40、以约70pM或更低的K_D结合人类或鼠类OX40、以约60pM或更低的 K_D结合人类或鼠类OX40、以约50pM或更低的K_D结合人类或鼠类OX40、以约40pM或更低的K_D结合人类或鼠类OX40或以约30pM或更低的K_D结合人类或鼠类OX40的OX40激动剂。

[0683] 在一些实施例中,所描述的组合物、工艺和方法包括以约$7.5\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类OX40、以约$7.5\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类OX40、以约 $8\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类OX40、以约$8.5\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类OX40、以约$9\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类OX40、以约9.5×10^5 1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类OX40或以约$1\times10^6$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类OX40的OX40激动剂。

[0684] 在一些实施例中,所描述的组合物、工艺和方法包括以约2×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类OX40、以约2.1×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类OX40、以约2.2×10^{-5} 1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类OX40、以约2.3×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类OX40、以约2.4×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类OX40、以约2.5×10^{-5}1/s 或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类OX40、以约2.6×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类 OX40或以约2.7×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类OX40、以约2.8×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类OX40、以约2.9×10^{-5}或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类OX40或以约3×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类OX40的OX40激动剂。

[0685] 在一些实施例中,所描述的组合物、工艺和方法包括以约10nM或更低的IC_{50}结合于

人类或鼠类OX40、以约9nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类OX40、以约8nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类OX40、以约7nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类OX40、以约6nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类OX40、以约5nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类OX40、以约4nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类OX40、以约3nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类 OX40、以约2nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类OX40或以约1nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类OX40的OX40激动剂。

[0686] 在一些实施例中,OX40激动剂为他沃立珠单抗,又称为MEDI0562或MEDI-0562。他沃立珠单抗购自阿斯利康公司(AstraZeneca,Inc)的MedImmune子公司。他沃立珠单抗为免疫球蛋白G1-κ、抗[智人TNFRSF4(肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员4,OX40,CD134)]、人类化和嵌合单克隆抗体。表KK中阐述他沃立珠单抗的氨基酸序列。他沃立珠单抗包含在位置301和301″处的N-糖基化位点,具有岩藻糖基化复合双触角CHO型聚糖;在位置22-95(V_H-V_L)、148-204(C_H1-C_L)、265-325(C_H2)和371-429(C_H3)处(和在位置22″-95″、148″-204″、265″-325″和371″-429″处)的重链链内二硫桥;在位置23'-88'(V_H-V_L)和134'-194'(C_H1-C_L) 处(和在位置23″'-88″'和134″'-194″'处)的轻链链内二硫桥;在位置230-230″和233-233″处的链间重链-重链二硫桥;以及在224-214'和224″-214″'处的链间重链-轻链二硫桥。他沃立珠单抗在多种实体肿瘤病症中的当前临床试验包括美国国家卫生研究院临床研究数据库标识符 NCT02318394和NCT02705482。

[0687] 在一实施例中,OX40激动剂包含由SEQ ID NO:56所载的重链和由SEQ ID NO:57所载的轻链。在一实施例中,OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57中所示的序列的重链和轻链,或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或结合物。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57中所示的序列至少99%一致的重链和轻链。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57中所示的序列至少98%一致的重链和轻链。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57中所示的序列至少97%一致的重链和轻链。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57中所示的序列至少96%一致的重链和轻链。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57中所示的序列至少95%一致的重链和轻链。

[0688] 在一实施例中,OX40激动剂包含他沃立珠单抗的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一实施例中,OX40激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:58中所示的序列,并且OX40 激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:59中所示的序列和其保守性氨基酸取代。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59中所示的序列至少99%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59中所示的序列至少98%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59中所示的序列至少97%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59中所示的序列至少96%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59 中所示的序列至少95%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含scFv抗体,所述scFv抗体包含各自与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59中所示的序列至少99%一致的V_H和 V_L区。

[0689] 在一实施例中,OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61和SEQ ID NO:62中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3域,以及分别具有

SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64和SEQ ID NO:65中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3域。

[0690] 在一实施例中，OX40激动剂为由药物管理机构参考他沃立珠单抗批准的OX40激动剂生物类似单克隆抗体。在一实施例中，生物类似单克隆抗体包含OX40抗体，所述OX40抗体包含与参考药品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97％序列一致性(例如，97％、98％、99％或100％序列一致性)并且与参考药品或参考生物产品相比包含一个或多个转译后修饰的氨基酸序列，其中参考药品或参考生物产品为他沃立珠单抗。在一些实施例中，一个或多个转译后修饰是选自以下中的一个或多个：糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中，生物类似物为授权或提交授权的OX40激动剂抗体，其中以不同于参考药品或参考生物产品的配方的配方提供OX40激动剂抗体，其中参考药品或参考生物产品为他沃立珠单抗。OX40 激动剂抗体可由药物管理机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品为他沃立珠单抗。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品为他沃立珠单抗。

[0691] 表13：与他沃立珠单抗相关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列。

[0692]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）
SEQ ID NO:56 他沃立珠单抗的重链	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 他沃立珠单抗的轻链	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 他沃立珠单抗的重链可变区	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSKKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT 118
SEQ ID NO:59 他沃立珠单抗的轻链可变区	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR 108
SEQ ID NO:60 他沃立珠单抗的重链CDR1	GSFSSGYWN 9
SEQ ID NO:61 他沃立珠单抗的重链CDR2	YIGYISYNGI TYH 13
SEQ ID NO:62 他沃立珠单抗的重链CDR3	RYKYDYDGGH AMDY 14
SEQ ID NO:63 他沃立珠单抗的轻链CDR1	QDISNYLN 8
SEQ ID NO:64 他沃立珠单抗的轻链CDR2	LLIYYTSKLH S 11
SEQ ID NO:65 他沃立珠单抗的轻链CDR3	QQGSALPW 8

[0693] 在一些实施例中，OX40激动剂为11D4，其为购自辉瑞公司的全人类抗体。11D4的制备和性质描述于美国专利第7,960,515号；第8,236,930号；和第9,028,824号中，其公开内容以引用的方式并入本文中。表LL中阐述11D4的氨基酸序列。

[0694] 在一实施例中，OX40激动剂包含由SEQ ID NO:66所载的重链和由SEQ ID NO:67所载的轻链。在一实施例中，OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67中所示

的序列的重链和轻链，或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或结合物。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67中所示的序列至少99％一致的重链和轻链。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67中所示的序列至少98％一致的重链和轻链。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67中所示的序列至少97％一致的重链和轻链。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67中所示的序列至少96％一致的重链和轻链。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67中所示的序列至少95％一致的重链和轻链。

[0695] 在一实施例中，OX40激动剂包含11D4的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一实施例中，OX40激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:68中所示的序列，并且OX40激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:69中所示的序列和其保守性氨基酸取代。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69中所示的序列至少99％一致的 V_H和V_L区。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69 中所示的序列至少98％一致的V_H和V_L区。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69中所示的序列至少97％一致的V_H和V_L区。在一实施例中，OX40 激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69中所示的序列至少96％一致的V_H和 V_L区。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69中所示的序列至少95％一致的V_H和V_L区。

[0696] 在一实施例中，OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3域，以及分别具有SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:75中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3域。

[0697] 在一实施例中，OX40激动剂为由药物管理机构参考11D4批准的OX40激动剂生物类似单克隆抗体。在一实施例中，生物类似单克隆抗体包含OX40抗体，所述OX40抗体包含与参考药品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97％序列一致性(例如，97％、98％、99％或100％序列一致性)并且与参考药品或参考生物产品相比包含一个或多个转译后修饰的氨基酸序列，其中参考药品或参考生物产品为11D4。在一些实施例中，一个或多个转译后修饰是选自以下中的一个或多个：糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中，生物类似物为授权或提交授权的OX40激动剂抗体，其中以不同于参考药品或参考生物产品的配方的配方提供OX40激动剂抗体，其中参考药品或参考生物产品为11D4。OX40激动剂抗体可由药物管理机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品为11D4。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品为11D4。

[0698] 表14：与11D4相关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列。

[0699]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO:66 11D4的重链	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPPCPAP PVAGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK	60 120 180 240 300 360 420 444
SEQ ID NO:67 11D4的轻链	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
SEQ ID NO:68 11D4的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
SEQ ID NO:69 11D4的轻链可变区	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK	60 107
SEQ ID NO:70 11D4的重链CDR1	SYSMN	5
SEQ ID NO:71 11D4的重链CDR2	YISSSSSTID YADSVKG	17
SEQ ID NO:72 11D4的重链CDR3	ESGWYLFDY	9
SEQ ID NO:73 11D4的轻链CDR1	RASQGISSWL A	11
SEQ ID NO:74 11D4的轻链CDR2	AASSLQS	7
SEQ ID NO:75 11D4的轻链CDR3	QQYNSYPPT	9

[0700] 在一些实施例中，OX40激动剂为18D8，其为购自辉瑞公司的全人类抗体。18D8的制备和性质描述于美国专利第7,960,515号；第8,236,930号；和第9,028,824号中，其公开内容以引用的方式并入本文中。表MM中阐述18D8的氨基酸序列。

[0701] 在一实施例中，OX40激动剂包含由SEQ ID NO:76所载的重链和由SEQ ID NO:77所载的轻链。在一实施例中，OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77中所示的序列的重链和轻链，或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或结合物。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77中所示的序列至少99％一致的重链和轻链。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77中所示的序列至少98％一致的重链和轻链。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77中所示的序列至少97％一致的重链和轻链。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77中所示的序列至少96％一致的重链和轻链。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77中所示的序列至少95％一致的重链和轻链。

[0702] 在一实施例中，OX40激动剂包含18D8的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一实施例中，OX40激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:78中所示的序列，并且OX40激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:79中所示的序列和其保守性氨基酸取代。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79中所示的序列至少99％一致的V_H和V_L区。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79 中所示的序列至少98％一致的V_H和V_L区。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79中所示的序列至少97％一致的V_H和V_L区。在一实施例中，OX40 激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79中所示的序列至少96％一致的V_H和 V_L区。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79中所示的序列至少95％一致的V_H和V_L区。

[0703] 在一实施例中,OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81和SEQ ID NO:82中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3域,以及分别具有SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84和SEQ ID NO:85中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3域。

[0704] 在一实施例中,OX40激动剂为由药物管理机构参考18D8批准的OX40激动剂生物类似单克隆抗体。在一实施例中,生物类似单克隆抗体包含OX40抗体,所述OX40抗体包含与参考药品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97%序列一致性(例如,97%、98%、99%或100%序列一致性)并且与参考药品或参考生物产品相比包含一个或多个转译后修饰的氨基酸序列,其中参考药品或参考生物产品为18D8。在一些实施例中,一个或多个转译后修饰是选自以下中的一个或多个:糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中,生物类似物为授权或提交授权的OX40激动剂抗体,其中以不同于参考药品或参考生物产品的配方的配方提供OX40激动剂抗体,其中参考药品或参考生物产品为18D8。OX40激动剂抗体可由药物管理机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品为18D8。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品为18D8。

[0705] 表15:与18D8相关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列。

[0706]

标识符	序列(单字母氨基酸符号)	
SEQ ID NO:76 18D8的重链	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID NO:77 18D8的轻链	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	60 120 180 213
SEQ ID NO:78 18D8的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSS	60 120 124
SEQ ID NO:79 18D8的轻链可变区	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK	60 106
SEQ ID NO:80 18D8的重链CDR1	DYAMH	5
SEQ ID NO:81 18D8的重链CDR2	GISWNSGSIG YADSVKG	17
SEQ ID NO:82 18D8的重链CDR3	DQSTADYYFY YGMDV	15
SEQ ID NO:83 18D8的轻链CDR1	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID NO:84 18D8的轻链CDR2	DASNRAT	7
SEQ ID NO:85 18D8的轻链CDR3	QQRSNWPT	8

[0707] 在一些实施例中,OX40激动剂为Hu119-122,其为购自葛兰素史克公司(GlaxoSmithKline plc)的人类化抗体。Hu119-122的制备和性质描述于美国专利第9,006,399号和第9,163,085 号,以及国际专利公开第WO 2012/027328号中,其公开内容以引用的方式并入本文中。表 NN中阐述Hu119-122的氨基酸序列。

[0708] 在一实施例中,OX40激动剂包含Hu119-122的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一实施例中,OX40激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:86中所示的序列,并且OX40激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:87中所示的序列和其保守性氨基酸取代。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87中所示的序列至少99%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87中所示的序列至少98%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87中所示的序列至少97%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87中所示的序列至少96%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87 中所示的序列至少95%一致的V_H和V_L区。

[0709] 在一实施例中,OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3域,以及分别具有SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3域。

[0710] 在一实施例中,OX40激动剂为由药物管理机构参考Hu119-122批准的OX40激动剂生物类似单克隆抗体。在一实施例中,生物类似单克隆抗体包含OX40抗体,所述OX40抗体包含与参考药品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97%序列一致性(例如,97%、98%、99%或100%序列一致性)并且与参考药品或参考生物产品相比包含一个或多个转译后修饰的氨基酸序列,其中参考药品或参考生物产品为Hu119-122。在一些实施例中,一个或多个转译后修饰是选自以下中的一个或多个:糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中,生物类似物为授权或提交授权的OX40激动剂抗体,其中以不同于参考药品或参考生物产品的配方的配方提供OX40激动剂抗体,其中参考药品或参考生物产品为Hu119-122。OX40激动剂抗体可由药物管理机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品为Hu119-122。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品为Hu119-122。

[0711] 表16:与Hu119-122相关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列。

[0712]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO:86 Hu119-122的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
SEQ ID NO:87 Hu119-122的轻链可变区	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
SEQ ID NO:88 Hu119-122的重链CDR1	SHDMS	5
SEQ ID NO:89 Hu119-122的重链CDR2	AINSDGGSTY YPDTMER	17
SEQ ID NO:90 Hu119-122的重链CDR3	HYDDYYAWFA Y	11
SEQ ID NO:91 Hu119-122的轻链CDR1	RASKSVSTSG YSYMH	15
SEQ ID NO:92 Hu119-122的轻链CDR2	LASNLES	7
SEQ ID NO:93 Hu119-122的轻链CDR3	QHSRELPLT	9

[0713] 在一些实施例中，OX40激动剂为Hu106-222，其为购自葛兰素史克公司的人类化抗体。Hu106-222的制备和性质描述于美国专利第9,006,399号和第9,163,085号，以及国际专利公开第WO 2012/027328号中，其公开内容以引用的方式并入本文中。表00中阐述Hu106-222 的氨基酸序列。

[0714] 在一实施例中，OX40激动剂包含Hu106-222的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一实施例中，OX40激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:94中所示的序列，并且OX40激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:95中所示的序列和其保守性氨基酸取代。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95中所示的序列至少99％一致的V_H和V_L区。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95中所示的序列至少98％一致的V_H和V_L区。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95中所示的序列至少97％一致的V_H和V_L区。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95中所示的序列至少96％一致的V_H和V_L区。在一实施例中，OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95 中所示的序列至少95％一致的V_H和V_L区。

[0715] 在一实施例中，OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:97和SEQ ID NO:98中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3域，以及分别具有SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:100和SEQ ID NO:101中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3域。

[0716] 在一实施例中，OX40激动剂为由药物管理机构参考Hu106-222批准的OX40激动剂生物类似单克隆抗体。在一实施例中，生物类似单克隆抗体包含OX40抗体，所述OX40抗体包含与参考药品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97％序列一致性(例如，97％、98％、99％或100％序列一致性)并且与参考药品或参考生物产品相比包含一个或多个转译后修饰的氨基酸序列，其中参考药品或参考生物产品为Hu106-222。在一些实施例中，一个或多个转译后修饰是选自以下中的一个或多个：糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中，生物类似物为授权或提交授权的OX40激动剂抗体，其中以不同于参考药品或参考生物

产品的配方的配方提供OX40激动剂抗体，其中参考药品或参考生物产品为Hu106-222。OX40激动剂抗体可由药物管理机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品为Hu106-222。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品为Hu106-222。

[0717] 表17：与Hu106-222相关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列。

[0718]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO:94 Hu106-222 的重链可变区	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	60 120 122
SEQ ID NO:95 Hu106-222 的轻链可变区	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO:96 Hu106-222 的重链CDR1	DYSMH	5
SEQ ID NO:97 Hu106-222 的重链CDR2	WINTETGEPT YADDFKG	17
SEQ ID NO:98 Hu106-222 的重链CDR3	PYYDYVSYYA MDY	13
SEQ ID NO:99 Hu106-222 的轻链CDR1	KASQDVSTAV A	11
SEQ ID NO:100 Hu106-222 的轻链CDR2	SASYLYT	7
SEQ ID NO:101 Hu106-222 的轻链CDR3	QQHYSTPRT	9

[0719] 在一些实施例中，OX40激动剂抗体为MEDI6469(也称为9B12)。MEDI6469为鼠类单克隆抗体。Weinberg等人，《免疫治疗学杂志》2006,29,575-585。在一些实施例中，OX40 激动剂为由9B12杂交瘤产生的抗体，所述9B12杂交瘤由Biovest公司(美国马萨诸塞州马尔文(Malvern,MA,USA))寄存，如Weinberg等人，《免疫治疗学杂志》2006,29,575-585 中所描述，其公开内容以全文引用的方式并入本文中。在一些实施例中，抗体包含MEDI6469 的CDR序列。在一些实施例中，抗体包含MEDI6469的重链可变区序列和/或轻链可变区序列。

[0720] 在一实施例中，OX40激动剂为L106BD(Pharmingen产品号340420)。在一些实施例中，OX40激动剂包含抗体L106(BD Pharmingen产品号340420)的CDR。在一些实施例中，OX40 激动剂包含抗体L106(BD Pharmingen产品号340420)的重链可变区序列和/或轻链可变区序列。在一实施例中，OX40激动剂为ACT35(圣克鲁斯生物技术(Santa Cruz Biotechnology)，产品目录号20073)。在一些实施例中，OX40激动剂包含抗体ACT35(圣克鲁斯生物技术，产品目录号20073)的CDR。在一些实施例中，OX40激动剂包含抗体ACT35(圣克鲁斯生物技术，产品目录号20073)的重链可变区序列和/或轻链可变区序列。在一实施例中，OX40 激动剂为鼠类单克隆抗体抗mCD134/mOX40(克隆株OX86)，可商购自新罕布什尔州西黎巴嫩(West Lebanon,NH)的BioXcell公司，InVivoMAb。

[0721] 在一实施例中，OX40激动剂是选自以下中描述的OX40激动剂：国际专利申请公开第 WO 95/12673号、第WO 95/21925号、第WO 2006/121810号、第WO 2012/027328号、第 WO

2013/028231号、第WO 2013/038191号和第WO 2014/148895号;欧洲专利申请EP 0672141;美国专利申请公开第US 2010/136030号、第US 2014/377284号、第US 2015/190506 号和第US 2015/132288号(包括克隆株20E5和12H3);以及美国专利第7,504,101号、第 7,550,140号、第7,622,444号、第7,696,175号、第7,960,515号、第7,961,515号、第8,133,983 号、第9,006,399号和第9,163,085号,其公开内容以全文引用的方式并入本文中。

[0722] 在一实施例中,OX40激动剂为如结构I-A描绘的OX40激动性融合蛋白(C端Fc抗体片段融合蛋白)或如结构I-B描绘的OX40激动性融合蛋白(N端Fc抗体片段融合蛋白),或其片段、衍生物、结合物、变体或生物类似物。结构I-A和I-B的性质描述于上文以及美国专利第9,359,420号、第9,340,599号、第8,921,519号和第8,450,460号中,其公开内容以引用的方式并入本文中。表GG中给出结构I-A的多肽域的氨基酸序列。Fc域优选地包含完整恒定域(SEQ ID NO:31的氨基酸17-230)、完整铰链域(SEQ ID NO:31的氨基酸1-16)或铰链域的一部分(例如,SEQ ID NO:31的氨基酸4-16)。连接C端Fc抗体的优选连接子可选自SEQ ID NO:32至SEQ ID NO:41中所给出的实施例,包括适合于融合其它多肽的连接子。同样地,表HH中给出结构I-B的多肽域的氨基酸序列。如果Fc抗体片段与如结构I-B中的 TNRFSF融合蛋白的N端融合,那么Fc模块的序列优选为示于SEQ ID NO:42中的序列,并且连接子序列优选地选自SED ID NO:43至SEQ ID NO:45中所阐述的那些实施例。

[0723] 在一实施例中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个或多个选自以下组成的组的OX40结合域:他沃立珠单抗的可变重链和可变轻链、11D4的可变重链和可变轻链、18D8的可变重链和可变轻链、Hu119-122的可变重链和可变轻链、Hu106-222的可变重链和可变轻链、选自表OO中描述的可变重链和可变轻链的可变重链和可变轻链、前述可变重链和可变轻链的任何组合,以及其片段、衍生物、结合物、变体和生物类似物。

[0724] 在一实施例中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个或多个包含OX40L 序列的OX40结合域。在一实施例中,结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个或多个包含根据SEQ ID NO:102的序列的OX40结合域。在一实施例中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个或多个包含可溶性OX40L序列的OX40结合域。在一实施例中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个或多个包含根据SEQ ID NO:103 的序列的OX40结合域。在一实施例中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个或多个包含根据SEQ ID NO:104的序列的OX40结合域。

[0725] 在一实施例中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个或多个OX40结合域,所述OX40结合域为包含各自分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59中所示的序列至少95%一致的V_H和V_L区的scFv域,其中V_H和V_L域由连接子连接。在一实施例中,根据结构 I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个或多个OX40结合域,所述OX40结合域为包含各自分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69中所示的序列至少95%一致的V_H和V_L区的scFv 域,其中V_H和V_L域由连接子连接。在一实施例中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个或多个OX40结合域,所述OX40结合域为包含各自分别与SEQ ID NO:78 和SEQ ID NO:79中所示的序列至少95%一致的V_H和V_L区的scFv域,其中V_H和V_L域由连接子连接。在一实施例中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个或多个OX40 结合域,所述OX40结合域为包含各自分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87中所示的序列至少95%一致的V_H和V_L区的scFv域,其中V_H和V_L域由连接子连接。在一实施例中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融

合蛋白包含一个或多个OX40结合域，所述OX40结合域为包含各自分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95中所示的序列至少95％一致的V_H和V_L区的scFv域，其中V_H和V_L域由连接子连接。在一实施例中，根据结构I-A或I-B的OX40 激动剂融合蛋白包含一个或多个OX40结合域，所述OX40结合域为包含各自与表18中给出的V_H和V_L序列至少95％一致的V_H和V_L区的scFv域，其中V_H和V_L域由连接子连接。

[0726] 表18：适用作融合蛋白中的OX40结合域(例如，结构I-A和I-B)或scFv OX40激动剂抗体的其它多肽域。

[0727]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO:102 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF CVL	60 120 180 183
SEQ ID NO:103 OX40L可溶性域	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL IHQNPGEFCV L	60 120 131
SEQ ID NO:104 OX40L可溶性域（替代域）	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ NPGEFCVL	60 120 128
SEQ ID NO:105 008的可变重链	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS	60 120
SEQ ID NO:106 008的可变轻链	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK	60 108
SEQ ID NO:107 011的可变重链	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA	60 120
SEQ ID NO:108 011的可变轻链	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK	60 108
SEQ ID NO:109 021的可变重链	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS	60 120
SEQ ID NO:110 021的可变轻链	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK	60 108
SEQ ID NO:111 023的可变重链	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS	60 120
SEQ ID NO:112 023的可变轻链	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR	60 108
SEQ ID NO:113重链可变区	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS	60 119
SEQ ID NO:114轻链可变区	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR	60 108
SEQ ID NO:115重链可变区	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS P	60 120 121
SEQ ID NO:116轻链可变区	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR	60 108
SEQ ID NO:117 人类化抗体的重链可变区	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV SS	60 120 122
SEQ ID NO:118 人类化抗体的重链可变区	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	60 120 122
SEQ ID NO:119 人类化抗体的轻链可变区	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO:120 人类化抗体的轻链可变区	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO:121 人类化抗体的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA	60 120

[0728]

SEQ ID NO:122 人类化抗体的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
SEQ ID NO:123 人类化抗体的轻链可变区	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K	60 111
SEQ ID NO:124 人类化抗体的轻链可变区	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
SEQ ID NO:125 重链可变区域	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG EVFYFDYWGQ GTTLTVSS	60 120 138
SEQ ID NO:126 轻链可变区	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG TKLELK	60 120 126

[0729] 在一实施例中,OX40激动剂为OX40激动性单链融合多肽,其包含(i)第一可溶性OX40 结合域、(ii)第一肽连接子、(iii)第二可溶性OX40结合域、(iv)第二肽连接子和(v)第三可溶性OX40结合域,进一步包含在N末端和/或C末端的额外域,且其中所述额外域为Fab或Fc片段域。在一实施例中,OX40激动剂为OX40激动性单链融合多肽,其包含(i) 第一可溶性OX40结合域、(ii)第一肽连接子、(iii)第二可溶性OX40结合域、(iv)第二肽连接子和(v)第三可溶性OX40结合域,进一步包含在N末端和/或C末端的额外域,其中所述额外域为Fab或Fc片段域,其中每一个可溶性OX40域缺乏茎区(其有助于三聚合并且提供到细胞膜的一定距离,但不是OX40结合域的一部分)并且第一和第二肽连接子独立地具有3-8个氨基酸的长度。

[0730] 在一实施例中,OX40激动剂为OX40激动性单链融合多肽,其包含(i)第一可溶性肿瘤坏死因子(TNF)超家族细胞因子域、(ii)第一肽连接子、(iii)第二可溶性TNF超家族细胞因子域、(iv)第二肽连接子和(v)第三可溶性TNF超家族细胞因子域,其中每一个可溶性TNF超家族细胞因子域缺乏茎区并且第一和第二肽连接子独立地具有3-8个氨基酸的长度,且其中每个TNF超家族细胞因子域为OX40结合域。

[0731] 在一些实施例中,OX40激动剂为MEDI6383。MEDI6383为OX40激动性融合蛋白并且可如美国专利第6,312,700号中所描述来制备,其公开内容以引用的方式并入本文中。

[0732] 在一实施例中,OX40激动剂为OX40激动性scFv抗体,其包含前述任一个V_H域与前述任一个V_L域连接。

[0733] 在一实施例中,OX40激动剂为Creative Biolabs OX40激动剂单克隆抗体MOM-18455,可商购自美国纽约州希尔兰的Creative Biolabs公司。

[0734] 在一实施例中,OX40激动剂为可商购自美国加利福尼亚州圣地亚哥的BioLegend公司的 OX40激动抗体克隆株Ber-ACT35。

[0735] H.任选的细胞存活率分析

[0736] 任选地,可在第一次扩增(有时称为初始大量扩增)之后使用所属领域中已知的标准分析来进行细胞存活率分析。举例来说,可对具有块状TIL的样品进行锥虫蓝排除分析,其选择性地标记死细胞且进行存活率评估。用于测试存活率的其它分析可以包括(但不限于)阿尔玛蓝分析(Alamar blue assay);和MTT分析。

[0737] 1.细胞计数、存活率、流式细胞测量术

[0738] 在一些实施例中,测量细胞计数和/或存活率。例如但不限于CD3、CD4、CD8和CD56以及本文所公开或描述的任何其它的标记的表达可以通过用抗体(例如(但不限于)可商购自BD Bio-sciences(BD Biosciences,加利福尼亚州圣何塞(San Jose,CA))的那些抗体)使用FACSCanto™流式细胞仪(BD Biosciences)进行流式细胞测量术来测量。可以使用一次

性 c芯片血细胞计数器(VWR,伊利诺伊州巴达维亚(Batavia,IL))对细胞进行人工地计数,并且可以使用所属领域中已知的任何方法(包括(但不限于)锥虫蓝染色)来评估存活率。还可以基于USSN 15/863,634来分析细胞存活率,其以全文引用的方式并入本文中。

[0739] 在一些情况下,可以使用下文论述的方案立即冷冻保存块状TIL群体。替代地,块状TIL 群体可以经受REP且接着如下文所论述进行冷冻保存。类似地,在基因修饰的TIL将用于疗法的情况下,可以使大量或REP TIL群体进行基因修饰以用于合适的治疗。

[0740] 根据本公开,用于分析TIL的存活率和/或进一步用于向个体给药的方法。在一些实施例中,用于分析肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的方法包含:

[0741] (i)获得第一TIL群体;

[0742] (ii)通过在包含IL-2和任选的OKT-3的细胞培养基中培养第一TIL群体来进行第一次扩增,以产生第二TIL群体;以及

[0743] (iii)通过用额外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)补充第二TIL群体的细胞培养基来进行第二次扩增,以产生第三TIL群体,其中第三TIL群体的数量比第二TIL群体的数量大至少50倍;

[0744] (iv)采集、洗涤且冷冻保存第三TIL群体;

[0745] (v)将冷冻保存的TIL存储在极低温度下;

[0746] (vi)解冻第三TIL群体以提供解冻的第三TIL群体;以及

[0747] (vii)通过用IL-2、OKT-3和APC补充第三群体的细胞培养基来对解冻的第三TIL群体的一部分进行额外的第二次扩增,持续至少3天的额外扩增时段(有时称为reREP时段),其中进行第三次扩增以获得第四TIL群体,其中将第四TIL群体中的TIL数量与第三TIL群体中的TIL数量进行比较以获得比率;

[0748] (viii)基于步骤(vii)中的比率确定解冻的TIL群体是否适合于向患者给药;

[0749] (ix)当在步骤(viii)中确定第四TIL群体中的TIL数量与第三TIL群体中的TIL数量的比率大于5:1时,向患者给予治疗有效剂量的解冻的第三TIL群体。

[0750] 在一些实施例中,在步骤(vii)之后分析TIL的存活率。

[0751] 本公开还提供用于分析TIL的其它方法。在一些实施例中,本公开提供一种用于TIL的方法,其包含:

[0752] (i)获得第一冷冻保存TIL群体的一部分;

[0753] (ii)解冻第一冷冻保存TIL群体的所述部分;

[0754] (iii)通过在包含IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基中培养第一TIL群体的所述部分来进行第一次扩增,持续至少3天的额外扩增时段(有时称为reREP时段),以产生第二TIL群体,其中将第一TIL群体的所述部分与第二TIL群体进行比较以获得TIL数量的比率,其中第二TIL群体中的TIL数量与第一TIL群体的所述部分中的TIL数量的比率大于5:1;

[0755] (iv)基于步骤(iii)中的比率确定第一TIL群体是否适用于向患者治疗性给药;

[0756] (v)当在步骤(iv)中确定第二TIL群体中的TIL数量与第一TIL群体中的TIL数量的比率大于5:1时,确定第一TIL群体适用于治疗性给药。

[0757] 在一些实施例中,第二TIL群体中的TIL数量与第一TIL群体的所述部分中的TIL数量的比率大于50:1。

[0758] 在一些实施例中,所述方法进一步包含根据如本文中所提供的任一个实施例中所描述的方法对来自步骤(i)的全部第一冷冻保存TIL群体进行扩增。

[0759] 在一些实施例中,所述方法进一步包含向患者给予来自步骤(i)的全部第一冷冻保存TIL 群体。

[0760] 2.细胞培养物

[0761] 在一实施例中,用于扩增TIL的方法,包括上文所论述以及图1中示范的那些方法,可以包括使用约5,000mL至约25,000mL细胞培养基、约5,000mL至约10,000mL细胞培养基或约5,800mL至约8,700mL细胞培养基。在一些实施例中,培养基为无血清培养基。在一些实施例中,第一次扩增中的培养基是无血清的。在一些实施例中,第二次扩增中的培养基是无血清的。在一些实施例中,第一次扩增和第二次中的培养基均是无血清的。在一实施例中,扩增TIL的数量使用不超过一种类型的细胞培养基。可以使用任何合适的细胞培养基,例如AIM-V细胞培养基(L-谷氨酰胺、50μM硫酸链霉素和10μM硫酸庆大霉素)细胞培养基(英杰生命技术有限公司(Invitrogen),加利福尼亚州卡尔斯巴德(Carlsbad CA))。在这方面,本发明方法有利地减少扩增TIL数量所需的培养基量和培养基类型的数量。在一实施例中,扩增TIL的数量可以包含以不超过每三天或每四天的频率饲养细胞。在气体可渗透容器中扩增细胞的数量通过降低扩增细胞所必需的饲养频率简化了扩增细胞数量所必需的程序。

[0762] 在一实施例中,第一和/或第二气体可渗透容器中的细胞培养基并未过滤。使用未过滤的细胞培养基可以简化扩增细胞数量必需的程序。在一实施例中,第一和/或第二气体可渗透容器中的细胞培养基不含β-巯基乙醇(BME)。

[0763] 在一实施例中,所述方法的持续期间包含从哺乳动物获得肿瘤组织样品;在其中含有细胞培养基的第一气体可渗透容器中培养肿瘤组织样品;从肿瘤组织样品中获得TIL;在含有细胞培养基的第二气体可渗透容器中扩增TIL的数量持续约7至14天,例如约11天的持续时间。在一些实施例中,pre-REP为约7至14天,例如约11天。在一些实施例中,REP为约7至14天,例如约11天。

[0764] 在一实施例中,在气体可渗透容器中扩增TIL。已将气体可渗透容器用于使用PBMC使用所属领域中已知的方法、组合物和装置,包括描述于美国专利申请公开第2005/0106717 A1 号中的那些来扩增TIL,其公开内容以引用的方式并入本文中。在一实施例中,在气体可渗透袋中扩增TIL。在一实施例中,使用在气体可渗透袋中扩增TIL的细胞扩增系统,例如Xuri 细胞扩增系统W25(通用电气医疗集团(GE Healthcare))来扩增TIL。在一实施例中,使用在气体可渗透袋中扩增TIL的细胞扩增系统,例如WAVE生物反应器系统,又称为Xuri细胞扩增系统W5(通用电气医疗集团)来扩增TIL。在一实施例中,细胞扩增系统包括体积为选自以下组成的组的气体可渗透细胞袋:约100mL、约200mL、约300mL、约400mL、约500mL、约600mL、约700mL、约800mL、约900mL、约1L、约2L、约3L、约4L、约5L、约6L、约7L、约8L、约9L和约10L。

[0765] 在一实施例中,可以在G-Rex烧瓶(可商购自威尔森沃尔夫制造公司)中扩增TIL。这类实施例允许细胞群体从约5×10^5个细胞/平方厘米扩增到10×10^6与30×10^6个细胞/平方厘米之间。在一实施例中,这不需要进料。在一实施例中,这不需要进料,只要培养基驻留在 G-Rex烧瓶中的约10cm高度处即可。在一实施例中,这不需要进料但需要添加一种或多种细胞因子。在一实施例中,细胞因子可以大剂量添加而不需要将细胞因子与培养基混合。

这类容器、装置和方法为所属领域中已知的且用以扩增TIL，并且包括以下中所描述的那些:美国专利申请公开第US 2014/0377739A1号、国际公开第WO 2014/210036 A1号、美国专利申请公开第us 2013/0115617 A1号、国际公开第WO 2013/188427 A1号、美国专利申请公开第US 2011/0136228 A1号、美国专利第US 8,809,050 B2号、国际公开第WO 2011/072088 A2 号、美国专利申请公开第US 2016/0208216 A1号、美国专利申请公开第US 2012/0244133 A1 号、国际公开第WO 2012/129201 A1号、美国专利申请公开第US 2013/0102075 A1号、美国专利第US 8,956,860 B2号、国际公开第WO 2013/173835 A1号、美国专利申请公开第US 2015/0175966 A1号，其公开内容以引用的方式并入本文中。这类工艺也描述于Jin等人，《免疫治疗杂志》，2012，35:283-292中。

[0766] I.TIL的任选基因工程改造

[0767] 在一些实施例中，对TIL进行任选地基因工程改造以包括额外功能，包括(但不限于) 高亲和力T细胞受体(TCR)，例如靶向肿瘤相关抗原的TCR(例如MAGE-1、HER2或 NY-ESO-1)，或结合于肿瘤相关细胞表面分子(例如，间皮素)或谱系限制的细胞表面分子 (例如，CD19)的嵌合抗原受体(CAR)。

[0768] J.任选的TIL冷冻保存

[0769] 如上文所论述，且如图1中提供的步骤A至E中所示范，可以在整个TIL扩增工艺中的多个点处进行冷冻保存。在一些实施例中，可以冷冻保存第二次扩增(如例如根据图1的步骤D所提供)之后的扩增TIL群体。通常可以通过将TIL群体放入冷冻溶液(例如85％补体灭活的AB血清和15％二甲亚砜(DMSO))中来实现冷冻保存。将含细胞的溶液放入极低温瓶中且在-80℃下存储24小时，任选的转移到气态氮冷冻柜中用于冷冻保存。参见Sadeghi 等人，《肿瘤学学报》，2013，52，978-986。在一些实施例中，将TIL冷冻保存在5％DMSO中。在一些实施例中，将TIL冷冻保存在细胞培养基加5％DMSO中。在一些实施例中，根据实例F和G中提供的方法冷冻保存TIL。

[0770] 适当时，从冷冻柜中移出细胞且将其在37℃水浴中解冻直到大致4/5的溶液被解冻。通常将细胞再悬浮于完全培养基中并任选地洗涤一次或多次。在一些实施例中，如所属领域中已知，可以对解冻的TIL进行计数并评估存活率。

[0771] K.用于TIL制造的封闭系统

[0772] 本发明提供封闭系统在TIL培养工艺期间的用途。这类封闭系统允许避免和/或减少微生物污染，允许使用较少的烧瓶，并且允许成本降低。在一些实施例中，封闭系统使用两个容器。

[0773] 这类封闭系统为所属领域中众所周知的并且可见于例如http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm和https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/ GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm中。

[0774] 无菌连接装置(STCD)在两段相容的导管之间产生无菌焊缝。此程序准许各种容器和导管直径的无菌连接。在一些实施例中，封闭系统包括鲁尔锁(luer lock)和如例如实例G中所描述的热密封系统。在一些实施例中，通过注射器在无菌条件下进入封闭系统以维持系统的无菌性质和封闭性质。在一些实施例中，采用如实例G中所描述的封闭系统。在一些实施例中，根据实例G，“最终调配和填充”部分中描述的方法将TIL调配到最终产物调配物容器中。

[0775] 在一些实施例中，从获得肿瘤碎片时起，封闭系统使用一个容器直到准备将TIL用于向患者给药或冷冻保存。在一些实施例中，当使用两个容器时，第一容器为封闭的G-容器并且在不打开第一封闭G-容器的情况下将TIL群体离心并转移到输注袋中。在一些实施例中，当使用两个容器时，输注袋为含有HypoThermosol的输注袋。封闭系统或封闭的TIL细胞培养系统的特征在于一旦已添加肿瘤样品和/或肿瘤碎片后，就将系统从外部紧密地密封，以形成不含细菌、真菌侵入和/或任何其它微生物污染的封闭环境。

[0776] 在一些实施例中，微生物污染的减少介于约5％与约100％之间。在一些实施例中，微生物污染的减少介于约5％与约95％之间。在一些实施例中，微生物污染的减少介于约5％与约 90％之间。在一些实施例中，微生物污染的减少介于约10％与约90％之间。在一些实施例中，微生物污染的减少介于约15％与约85％之间。在一些实施例中，微生物污染的减少为约5％、约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％、约97％、约98％、约99％或约100％。

[0777] 封闭系统允许在不存在微生物污染和/或微生物污染明显减少的情况下的TIL生长。

[0778] 此外，TIL细胞培养环境的pH、二氧化碳分压和氧气分压各自随着培养细胞而变化。因此，即使循环适合于细胞培养的培养基，但封闭环境仍需要恒定地保持为用于TIL增殖的最优环境。为此目的，需要借助于传感器监测封闭环境的培养液体内的pH、二氧化碳分压和氧气分压的物理因素，其信号用以控制安装在培养环境入口的气体交换器，并根据培养液体中的变化实时调节封闭环境的气体分压以便优化细胞培养环境。在一些实施例中，本发明提供一种封闭细胞培养系统，其在封闭环境的入口处并入配备有监测装置的气体交换器，所述监测装置测量封闭环境的pH、二氧化碳分压和氧气分压，并通过基于来自监测装置的信号自动地调节气体浓度来优化细胞培养环境。

[0779] 在一些实施例中，连续地或间歇地控制封闭环境内的压力。也就是说，可以借助例如压力维持装置来改变封闭环境中的压力，由此确保所述空间适合于正压状态下的TIL生长，或促进负压状态下的流体渗出，且因此促进细胞增殖。此外，通过间歇地施加负压，有可能借助于封闭环境体积的暂时收缩而均匀地且有效地替换封闭环境中的循环液体。

[0780] 在一些实施例中，可以取代或添加用于TIL增殖的最优培养组分，并且可以添加包括例如IL-2和/或OKT3以及组合的因子。

[0781] L.任选的TIL冷冻保存

[0782] 可以任选地冷冻保存块状TIL群体或扩增的TIL群体。在一些实施例中，对治疗性TIL 群体进行冷冻保存。在一些实施例中，对第二次扩增之后采集的TIL进行冷冻保存。在一些实施例中，在图1的示范性步骤F中对TIL进行冷冻保存。在一些实施例中，将TIL冷冻保存在输注袋中。在一些实施例中，将TIL放入输注袋之前进行冷冻保存。在一些实施例中，将TIL冷冻保存且不放入输注袋中。在一些实施例中，使用冷冻保存培养基进行冷冻保存。在一些实施例中，冷冻保存培养基含有二甲亚砜(DMSO)。这通常通过将TIL群体放入冷冻溶液(例如85％补体灭活的AB血清和15％二甲亚砜(DMSO))中来实现。将含细胞的溶液放入极低温瓶中且在-80℃下存储24小时，任选的转移到气态氮冷冻柜中用于冷冻保存。参见Sadeghi等人，《肿瘤学学报》，2013,52,978-986。

[0783] 适当时，从冷冻柜中移出细胞且将其在37℃水浴中解冻直到大致4/5的溶液被解冻。通常将细胞再悬浮于完全培养基中并任选地洗涤一次或多次。在一些实施例中，如所属领域中已知，可以对解冻的TIL进行计数并评估存活率。

[0784] 在一优选实施例中，使用CS10冷冻保存培养基(CryoStor 10，BioLife Solutions)对TIL 群体进行冷冻保存。在一优选实施例中，使用含有二甲亚砜(DMSO)的冷冻保存培养基对 TIL群体进行冷冻保存。在一优选实施例中，使用1:1(体积:体积)比率的CS10和细胞培养基对TIL群体进行冷冻保存。在一优选实施例中，使用进一步包含额外IL-2的约1:1(体积: 体积)比率的CS10和细胞培养基对TIL群体进行冷冻保存。

[0785] 如上文步骤A至E中所论述，可以在整个TIL扩增工艺中的多个点处进行冷冻保存。在一些实施例中，在根据步骤B的第一次扩增之后的块状TIL群体或在一个或多个根据步骤D 的第二次扩增之后的扩增TIL群体可以进行冷冻保存。通常可以通过将TIL群体放入冷冻溶液(例如85％补体灭活的AB血清和15％二甲亚砜(DMSO))中来实现冷冻保存。将含细胞的溶液放入极低温瓶中且在-80℃下存储24小时，任选的转移到气态氮冷冻柜中用于冷冻保存。参见Sadeghi等人，《肿瘤学学报》，2013,52,978-986。

[0786] 适当时，从冷冻柜中移出细胞且将其在37℃水浴中解冻直到大致4/5的溶液被解冻。通常将细胞再悬浮于完全培养基中并任选地洗涤一次或多次。在一些实施例中，如所属领域中已知，可以对解冻的TIL进行计数并评估存活率。

[0787] 在一些情况下，可以使用下文论述的方案立即冷冻保存步骤B TIL群体。替代地，可以对块状TIL群体进行步骤C和步骤D并接着在步骤D之后进行冷冻保存。类似地，在基因修饰的TIL将用于疗法的情况下，可以对步骤B或步骤D TIL群体进行基因修饰以用于合适的治疗。

[0788] IV.TIL制造工艺(GEN3工艺的实施例，任选地包括确定成分培养基)

[0789] 在不受任何特定理论限制的情况下，据信如本发明的方法中所描述的引发T细胞活化的引发第一次扩增，接着促进T细胞活化的快速第二次扩增，允许制备保留“较年轻”表型的扩增T细胞，且因此相比于通过其它方法扩增的T细胞，预期本发明的扩增T细胞对癌细胞展现更大的细胞毒性。确切地说，据信如通过本发明的方法教示的通过暴露于抗CD3抗体(例如OKT-3)、IL-2和任选的抗原呈递细胞(APC)引发且接着通过随后暴露于额外抗CD-3抗体(例如OKT-3)、IL-2和APC促进的T细胞活化，限制或避免了培养中的T细胞成熟，从而产生具有较不成熟表型的T细胞群体，所述T细胞因在培养中扩增而耗竭较少并且对癌细胞展现更大的细胞毒性。在一些实施例中，将快速第二次扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现规模扩大的培养：(a)通过在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养T细胞来进行快速第二次扩增，持续约3至4天的时段，且接着(b)实现将小规模培养中的T细胞转移到大于第一容器(例如G-REX 500MCS容器)的第二容器，且在第二容器中的较大规模培养中培养来自小规模培养的T细胞，持续约4至7天的时段。在一些实施例中，将快速扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现向外扩展的培养：(a)通过在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中的第一小规模培养中培养T细胞来进行快速第二次扩增，持续约3至4天的时段，且接着(b)实现将T细胞从第一小规模培养转移并分配到至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个大小与第一容器相等的第二容器中，其中在每个第二容器中，在第二小规模培养中培养从第一小规模培养转移到这个第二容器的T细

胞部分，持续约4至7天的时段。在一些实施例中，将快速扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现向外扩展和规模扩大的培养：(a)通过在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养T细胞来进行快速第二次扩增，持续约3至4天的时段，且接着(b)实现将T细胞从小规模培养转移并分配到至少2、3、4、 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个大小比第一容器更大的第二容器(例如G-REX 500MCS容器)中，其中在每个第二容器中，在更大规模培养中培养从小规模培养转移到这个第二容器的T细胞部分，持续约4至7天的时段。在一些实施例中，将快速扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现向外扩展和规模扩大的培养：(a)通过在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养T细胞来进行快速第二次扩增，持续约4天的时段，且接着(b)实现将T细胞从小规模培养转移并分配到至少2、3或 4个大小比第一容器更大的第二容器(例如G-REX 500MCS容器)中，其中在每个第二容器中，在更大规模培养中培养从小规模培养转移到这个第二容器的T细胞部分，持续约5天的时段。

[0790] 在一些实施例中，在由引发第一次扩增实现的T细胞活化开始减少、减弱、衰退或消退之后进行快速第二次扩增。

[0791] 在一些实施例中，在由引发第一次扩增实现的T细胞活化下降了或下降了约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％之后，进行快速第二次扩增。

[0792] 在一些实施例中，在由引发第一次扩增实现的T细胞活化下降了或下降了约1％至100％范围内的百分比之后，进行快速第二次扩增。

[0793] 在一些实施例中，在由引发第一次扩增实现的T细胞活化下降了或下降了约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％范围内的百分比之后，进行快速第二次扩增。

[0794] 在一些实施例中，在由引发第一次扩增实现的T细胞活化下降了至少或约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％之后，进行快速第二次扩增。

[0795] 在一些实施例中，在由引发第一次扩增实现的T细胞活化下降了最多或约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％之后，进行快速第二次扩增。

[0796] 在一些实施例中，由引发第一次扩增实现的T细胞活化的降低是通过T细胞响应于用抗原刺激而释放的干扰素γ的量的减少确定。

[0797] 在一些实施例中，在最多或约7天或约8天的时段期间进行T细胞的引发第一次扩增。

[0798] 在一些实施例中，在最多或约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天的时段期间进行T细胞的引发第一次扩增。

[0799] 在一些实施例中，在1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天的时段期间进行T 细胞的引发第一次扩增。

[0800] 在一些实施例中，在最多或约11天的时段期间进行T细胞的快速第二次扩增。

[0801] 在一些实施例中，在最多或约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、 10天或11天的时段期间进行T细胞的快速第二次扩增。

[0802] 在一些实施例中，在1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11 天的时段期间进行T细胞的快速第二次扩增。

[0803] 在一些实施例中，在1天或约1天至7天或约7天的时段期间进行T细胞的引发第一次扩增，且在1天或约1天至11天或约11天的时段期间进行T细胞的快速第二次扩增。

[0804] 在一些实施例中，在最多或约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天的时段期间进行T细胞的引发第一次扩增，且在最多或约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、 8天、9天、10天或11天的时段期间进行T细胞的快速第二次扩增。

[0805] 在一些实施例中，在1天或约1天至8天或约8天的时段期间进行T细胞的引发第一次扩增，且在1天或约1天至9天或约9天的时段期间进行T细胞的快速第二次扩增。

[0806] 在一些实施例中，在8天的时段期间进行T细胞的引发第一次扩增，且在9天的时段期间进行T细胞的快速第二次扩增。

[0807] 在一些实施例中，在1天或约1天至7天或约7天的时段期间进行T细胞的引发第一次扩增，且在1天或约1天至9天或约9天的时段期间进行T细胞的快速第二次扩增。

[0808] 在一些实施例中，在7天的时段期间进行T细胞的引发第一次扩增，且在9天的时段期间进行T细胞的快速第二次扩增。

[0809] 在一些实施例中，T细胞为肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

[0810] 在一些实施例中，T细胞为骨髓浸润淋巴细胞(MIL)。

[0811] 在一些实施例中，T细胞为外周血淋巴细胞(PBL)。

[0812] 在一些实施例中，T细胞获自患有癌症的供体。

[0813] 在一些实施例中，T细胞为获自从患有癌症的患者切除的肿瘤的TIL。

[0814] 在一些实施例中，T细胞为获自患有恶性血液病的患者的骨髓的MIL。

[0815] 在一些实施例中，T细胞为获自供体的外周血单核细胞(PBMC)的PBL。在一些实施例中，供体患有癌症。在一些实施例中，癌症是选自由以下组成的组的癌症：黑素瘤、卵巢癌、子宫内膜癌、甲状腺癌、子宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人类乳头瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包括头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、成胶质细胞瘤 (包括GBM)、胃肠癌、肾癌和肾细胞癌。在一些实施例中，癌症是选自由以下组成的组：黑素瘤、卵巢癌、子宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人类乳头瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包括头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、成胶质细胞瘤(包括GBM)、胃肠癌、肾癌和肾细胞癌。在一些实施例中，供体患有肿瘤。在一些实施例中，肿瘤是液体肿瘤。在一些实施例中，肿瘤是实体肿瘤。在一些实施例中，供体患有恶性血液病。

[0816] 在本公开的某些方面，免疫效应细胞(例如，T细胞)可使用所属领域的技术人员已知的任何数量的技术(例如FICOLL分离)从个体收集的血液单元获得。在一个优选的方面，来自个体的循环血液的细胞是通过单采术获得的。单采术产物通常含有淋巴细胞，包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核白细胞、红细胞和血小板。在一方面，可以洗涤通过单采术收集的细胞以去除血浆级分，并且任选地，将细胞放置于适当的缓冲液或培养基中以用于后续处理步骤。在一个实施例中，细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤。在一替代实施例中，洗涤溶液缺乏钙，并且可能缺乏镁，或可能缺乏许多(如果不是全部的话)二价阳离子。在一方面，通过裂解红细胞并耗竭单核细胞，例如通过PERCOLL梯度离心或通过逆流离心淘析，从外周血淋巴细胞分离T细胞。

[0817] 在一些实施例中，T细胞为从全血中分离的PBL或从供体中富集淋巴细胞的单采术产物。在一些实施例中，供体患有癌症。在一些实施例中，癌症是选自由以下组成的组的癌症：黑素瘤、卵巢癌、子宫内膜癌、甲状腺癌、子宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人类乳头瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包括头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、成胶质细胞瘤(包括GBM)、胃肠癌、肾癌和肾细胞癌。在一些实施例中，癌症是选自由以下组成的组：黑素瘤、卵巢癌、子宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人类乳头瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包括头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、成胶质细胞瘤 (包括GBM)、胃肠癌、肾癌和肾细胞癌。在一些实施例中，供体患有肿瘤。在一些实施例中，肿瘤是液体肿瘤。在一些实施例中，肿瘤是实体肿瘤。在一些实施例中，供体患有恶性血液病。在一些实施例中，通过使用正向或负向选择方法，即使用针对T细胞表型的标记物(例如，CD3+CD45+)去除PBL，或去除非T细胞表型细胞，留下PBL，从富集淋巴细胞的全血或单采术产物中分离PBL。在其它实施例中，通过梯度离心分离PBL。在从供体组织分离 PBL后，可根据本文所描述的任何方法的引发第一次扩增步骤，在引发第一次扩增培养中通过接种合适数量的分离PBL(在一些实施例中，大致1×10^7个PBL)来起始PBL的引发第一次扩增。

[0818] 图8(确切地说，例如图8B和/或图8C)中描绘了含有这些特征中的一些的称为工艺3 (在本文中也称为GEN3)的示范性TIL工艺，并且在图1、2、30和31(确切地说，例如图 8B和/或图8C)中描述了本发明的这个实施例相对于工艺2A的一些优势。图1和30(确切地说，例如图8B和/或图8C)中示出工艺3的两个实施例。工艺2A或Gen 2还描述于美国专利公开第2018/0280436号中，其以全文引用的方式并入本文中。Gen 3工艺还描述于2018 年11月5日申请的USSN 62/755,954(116983-5045-PR)中。

[0819] 如本文所论述和通常概述，TIL取自患者样品且操控以在移植到患者中之前使用本文所描述且称为Gen 3的TIL扩增工艺扩增其数量。在一些实施例中，如下文所论述，可以任选地对TIL进行基因操控。在一些实施例中，可以在扩增之前或之后将TIL冷冻保存。解冻后，在输注到患者体内之前还可以对其进行再刺激以增加其代谢。

[0820] 在一些实施例中，将引发第一次扩增(包括本文中称为预快速扩增(Pre-REP)的工艺，以及图8(确切地说，例如图8B和/或图8C)中显示为步骤B的工艺)缩短为1至8天，且将快速第二次扩增(包括本文中称为快速扩增方案(REP)的工艺以及图1(确切地说，例如图8B和/或图8C)中显示为步骤D的工艺)缩短为1至9天，如下文以及在实例和图式中详细地论述。在一些实施例中，将引发第一次扩增(包括本文中称为预快速扩增(Pre-REP)的工艺，以及图1(确切地说，例如图8B和/或图8C)中显示为步骤B的工艺)缩短为1至8 天，且将快速第

二次扩增(包括本文中称为快速扩增方案(REP)的工艺以及图1(确切地说,例如图8B和/或图8C)中显示为步骤D的工艺)缩短为1至8天,如下文以及在实例和图式中详细地论述。在一些实施例中,将引发第一次扩增(包括本文中称为预快速扩增(Pre-REP) 的工艺,以及图1(确切地说,例如图8B和/或图8C)中显示为步骤B的工艺)缩短为1至 7天,且将快速第二次扩增(包括本文中称为快速扩增方案(REP)的工艺以及图1(确切地说,例如图8B和/或图8C)中显示为步骤D的工艺)缩短为1至9天,如下文以及在实例和图式中详细地论述。在一些实施例中,将引发第一次扩增(包括本文中称为预快速扩增 (Pre-REP)的工艺,以及图1(确切地说,例如图1B和/或图8C)中显示为步骤B的工艺) 缩短为1至7天,且将快速第二次扩增(包括本文中称为快速扩增方案(REP)的工艺以及图1(确切地说,例如图8B和/或图8C)中显示为步骤D的工艺)缩短为1至10天,如下文以及在实例和图式中详细地论述。在一些实施例中,将引发第一次扩增(例如,在图1(确切地说,例如图8B和/或图8C)中描述为步骤B的扩增)缩短为8天,且快速第二次扩增(例如,如图1(确切地说,例如图8B和/或图8C)中的步骤D中所描述的扩增)为7至9天。在一些实施例中,引发第一次扩增(例如,在图1(确切地说,例如图8B和/或图8C)中描述为步骤B的扩增)为8天,且快速第二次扩增(例如,如图1(确切地说,例如图8B和/ 或图8C)中的步骤D中所描述的扩增)为8至9天。在一些实施例中,将引发第一次扩增(例如,在图1(确切地说,例如图8B和/或图8C)中描述为步骤B的扩增)缩短为7天,且快速第二次扩增(例如,如图1(确切地说,例如图8B和/或图8C)中的步骤D中所描述的扩增)为7至8天。在一些实施例中,将引发第一次扩增(例如,在图8(确切地说,例如图 8B和/或图8C)中描述为步骤B的扩增)缩短为8天,且快速第二次扩增(例如,如图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)中的步骤D中所描述的扩增)为8天。在一些实施例中,引发第一次扩增(例如,在图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)中描述为步骤B的扩增) 为8天,且快速第二次扩增(例如,如图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)中的步骤D 中所描述的扩增)为9天。在一些实施例中,引发第一次扩增(例如,在图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)中描述为步骤B的扩增)为8天,且快速第二次扩增(例如,如图8 (确切地说,例如图8B和/或图8C)中的步骤D中所描述的扩增)为10天。在一些实施例中,引发第一次扩增(例如,在图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)中描述为步骤B的扩增) 为7天,且快速第二次扩增(例如,如图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)中的步骤D 中所描述的扩增)为7至10天。在一些实施例中,引发第一次扩增(例如,在图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)中描述为步骤B的扩增)为7天,且快速第二次扩增(例如,如图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)中的步骤D中所描述的扩增)为8至10天。在一些实施例中,引发第一次扩增(例如,在图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)中描述为步骤B的扩增)为7天,且快速第二次扩增(例如,如图8(确切地说,例如图8B和/或图 8C)中的步骤D中所描述的扩增)为9至10天。在一些实施例中,将引发第一次扩增(例如,在图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)中描述为步骤B的扩增)缩短为7天,且快速第二次扩增(例如,如图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)中的步骤D中所描述的扩增)为7至9天。在一些实施例中,引发第一次扩增和快速第二次扩增(例如,在图1(确切地说,例如图1B和/或图8C)中描述为步骤B和步骤D的扩增)的组合为14-16天,如下文以及实例和图式中详细地论述。确切地说,认为本发明的某些实施例包含引发第一次扩增步骤,其中通过在IL-2的存在下暴露于抗CD3抗体(例如OKT-3)或在至少IL-2和抗CD3 抗体(例如OKT-3)的存在下暴露于抗原来活化TIL。在某些实施例中,在如上文所描述的引发第一次扩增步骤中活

化的TIL为第一TIL群体，即其为初始细胞群体。

[0821] 下文的“步骤”标识A、B、C等参考图8(确切地说，例如图8B和/或图8C)中的非限制性实例并且参考本文描述的某些非限制性实施例。下文和图8中的步骤排序(确切地说，例如图8B和/或图8C)为示范性的并且本申请和本文所公开的方法涵盖步骤的任何组合或次序以及附加步骤、重复步骤和/或省略步骤。

[0822] A.步骤A:获得患者肿瘤样品

[0823] 一般来说，最初从患者肿瘤样品(“初始TIL”)或从循环淋巴细胞(例如外周血淋巴细胞，包括具有TIL样特征的外周血淋巴细胞)获得TIL，且接着将其扩增为较大群体用于如本文所描述进一步操控、任选地冷冻保存并且任选地评估表型和代谢参数作为TIL健康的指示。

[0824] 可以使用所属领域中已知的方法，通常通过手术切除、穿刺活检或其它获得含有肿瘤和 TIL细胞的混合物的样品的方式来获得患者肿瘤样品。一般来说，肿瘤样品可以来自任何实体肿瘤，包括原发性肿瘤、浸润性肿瘤或转移性肿瘤。肿瘤样品还可以是液体肿瘤，例如获自恶性血液病的肿瘤。实体肿瘤可以是任何癌症类型，包括(但不限于)乳腺癌、胰脏癌、前列腺癌、结肠直肠癌、肺癌、脑癌、肾癌、胃癌和皮肤癌(包括(但不限于)鳞状细胞癌、基底细胞癌和黑素瘤)。在一些实施例中，癌症是选自子宫颈癌、头颈癌(包括例如头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、成胶质细胞瘤(GBM)、胃肠癌、卵巢癌、肉瘤、胰脏癌、膀胱癌、乳癌、三阴性乳癌和非小细胞肺癌。在一些实施例中，适用TIL获自恶性黑素瘤肿瘤，因为据报道这些恶性黑素瘤肿瘤具有特别高含量的TIL。

[0825] 获得后，通常使用锐器切割将肿瘤样品碎裂成1至约8mm^3的小片段，其中约2-3mm^3是特别适用的。使用酶促肿瘤消化从这些碎片培养TIL。这类肿瘤消化可以通过在酶促介质(例如，罗斯威尔帕克纪念研究所(RPMI)1640缓冲液、2mM谷氨酸、10mcg/mL庆大霉素、30单位/毫升的DNA酶和1.0mg/mL胶原蛋白酶)中培育，接着进行机械解离(例如，使用组织解离器)来产生。肿瘤消化可以通过将肿瘤放置于酶促介质中且将肿瘤机械地解离大致1分钟，接着在37℃/5％CO_2下培育30分钟，接着进行机械解离并且在前述条件下培育的重复循环直到仅存在小组织片段而产生。在此工艺结束时，如果细胞悬浮液含有大量红细胞或死细胞，那么可以使用FICOLL分支链亲水性多糖进行密度梯度分离以去除这些细胞。可使用所属领域中已知的替代方法，例如美国专利申请公开第2012/0244133 A1号中描述的那些方法，其公开内容以引用的方式并入本文中。任一个前述方法可用于任一个本文所描述的用于扩增TIL的方法或治疗癌症的方法的实施例中。

[0826] 如上文所指示，在一些实施例中，TIL来源于实体肿瘤。在一些实施例中，不碎裂实体肿瘤。在一些实施例中，不碎裂实体肿瘤且使其作为完整肿瘤进行酶促消化。在一些实施例中，将肿瘤在包含胶原蛋白酶、DNA酶和玻尿酸酶的酶混合物中消化。在一些实施例中，将肿瘤在包含胶原蛋白酶、DNA酶和玻尿酸酶的酶混合物中消化1-2小时。在一些实施例中，将肿瘤在包含胶原蛋白酶、DNA酶和玻尿酸酶的酶混合物中在37℃、5％CO_2下消化1-2小时。在一些实施例中，将肿瘤在包含胶原蛋白酶、DNA酶和玻尿酸酶的酶混合物中在37℃、5％CO_2下旋转消化1-2小时。在一些实施例中，将肿瘤以恒定旋转消化过夜。在一些实施例中，将肿瘤在37℃、5％CO_2下以恒定旋转消化过夜。在一些实施例中，将完整肿瘤与酶组合以形成肿瘤消化反应混合物。

[0827] 在一些实施例中，在无菌缓冲液中用冻干的酶重构肿瘤。在一些实施例中，缓冲液为无菌HBSS。

[0828] 在一些实施例中，酶混合物包含胶原蛋白酶。在一些实施例中，胶原蛋白酶为胶原蛋白酶IV。在一些实施例中，胶原蛋白酶的工作储备液为100mg/ml 10×工作储备液。

[0829] 在一些实施例中，酶混合物包含DNA酶。在一些实施例中，DNA酶的工作储备液为10,000 IU/ml 10×工作储备液。

[0830] 在一些实施例中，酶混合物包含玻尿酸酶。在一些实施例中，玻尿酸酶的工作储备液为10mg/ml 10×工作储备液。

[0831] 在一些实施例中，酶混合物包含10mg/ml胶原蛋白酶、1000IU/ml DNA酶和1mg/ml玻尿酸酶。

[0832] 在一些实施例中，酶混合物包含10mg/ml胶原蛋白酶、500IU/ml DNA酶和1mg/ml玻尿酸酶。

[0833] 一般来说，从肿瘤获得的细胞悬浮液称作“初始细胞群体”或“新获得的”或“新分离的”细胞群体。在某些实施例中，将新获得的TIL细胞群体暴露于包含抗原呈现细胞IL-12和OKT-3的细胞培养基。

[0834] 在一些实施例中，碎裂包括物理碎裂，包括例如切割以及消化。在一些实施例中，碎裂为物理碎裂。在一些实施例中，碎裂为切割。在一些实施例中，通过消化进行碎裂。在一些实施例中，最初可以从酶促肿瘤消化物和获自患者的肿瘤碎片中培养TIL。在一实施例中，最初可以从酶促肿瘤消化物和获自患者的肿瘤碎片中培养TIL。

[0835] 在一些实施例中，在肿瘤为实体肿瘤的情况下，在例如步骤A(如图8(确切地说，例如图8B和/或图8C)中所提供)中获得肿瘤样品之后，使肿瘤经历物理碎裂。在一些实施例中，在冷冻保存之前进行碎裂。在一些实施例中，在冷冻保存之后进行碎裂。在一些实施例中，在获得肿瘤之后且在不存在任何冷冻保存的情况下进行碎裂。在一些实施例中，碎裂的步骤为活体外或离体工艺。在一些实施例中，将肿瘤碎裂并且将10、20、30、40或更多个碎片或片段放置在用于引发第一次扩增的每个容器中。在一些实施例中，将肿瘤碎裂并且将30或40个碎片或片段放置在用于引发第一次扩增的每个容器中。在一些实施例中，将肿瘤碎裂并且将40个碎片或片段放置在用于引发第一次扩增的每个容器中。在一些实施例中，多个碎片包含约4至约50个碎片，其中每个碎片具有约27mm^3的体积。在一些实施例中，多个碎片包含约30至约60个碎片，总体积为约1300mm^3至约1500mm^3。在一些实施例中，多个碎片包含约50个碎片，总体积为约1350mm^3。在一些实施例中，多个碎片包含约50个碎片，总质量为约1克至约1.5克。在一些实施例中，多个碎片包含约4个碎片。

[0836] 在一些实施例中，TIL是获自肿瘤碎片。在一些实施例中，通过锐器切割获得肿瘤碎片。在一些实施例中，肿瘤碎片介于约1mm^3与10mm^3之间。在一些实施例中，肿瘤碎片介于约 1mm^3与8mm^3之间。在一些实施例中，肿瘤碎片为约1mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约2mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约3mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约4mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约5mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约6mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约7mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约8mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约9mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约10mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为1-4mm×1-4mm×1-4mm。在一些实施例中，肿瘤碎片为1mm×1mm×1mm。在一些实施例中，肿瘤碎片为2mm×2mm×

2mm。在一些实施例中，肿瘤碎片为3mm×3mm×3mm。在一些实施例中，肿瘤碎片为4mm×4mm×4mm。

[0837] 在一些实施例中，碎裂肿瘤以使每个片段上的出血性、坏死和/或脂肪组织的量最小化。在一些实施例中，碎裂肿瘤以使每个片段上的出血性组织的量最小化。在一些实施例中，碎裂肿瘤以使每个片段上的坏死组织的量最小化。在一些实施例中，碎裂肿瘤以使每个片段上的脂肪组织的量最小化。在某些实施例中，肿瘤碎裂的步骤为活体外或离体方法。

[0838] 在一些实施例中，进行肿瘤碎裂以维持肿瘤内部结构。在一些实施例中，在不用手术刀进行锯切动作的情况下进行肿瘤碎裂。在一些实施例中，TIL是获自肿瘤消化物。在一些实施例中，通过在酶介质(例如(但不限于)RPMI 1640、2mM GlutaMAX、10mg/mL庆大霉素、30U/mL DNA酶和1.0mg/mL胶原蛋白酶)中培育，接着进行机械解离(GentleMACS，加利福尼亚州奥本的美天旎生物技术公司)来产生肿瘤消化物。将肿瘤放置于酶介质中之后，可对肿瘤进行机械解离大致1分钟。接着可以将溶液在37℃/5％CO_2下培育30分钟并且对其再次进行机械破碎大致1分钟。在37℃/5％CO_2下再培育30分钟之后，可对肿瘤进行第三次机械破碎大致1分钟。在一些实施例中，在第三次机械破碎后，如果存在较大组织片段，那么可在或不在37℃/5％CO_2下再培育30分钟的情况下，对样品再施加1或2次机械解离。在一些实施例中，在最终培育结束时，如果细胞悬浮液含有大量红细胞或死细胞，那么可使用 Ficoll进行密度梯度分离以去除这些细胞。

[0839] 在一些实施例中，在引发第一次扩增步骤之前的细胞悬浮液称作“初始细胞群体”或“新获得的”或“新分离的”细胞群体。

[0840] 在一些实施例中，细胞可任选地在样品分离之后(例如，在获得肿瘤样品之后和/或在从肿瘤样品获得细胞悬浮液之后)冷冻并且在进入步骤B中所描述的扩增之前进行冷冻存储，所述步骤B在下文进行进一步详细描述以及在图8(确切地说，例如图8B)中进行示例说明。

[0841] 1.核心/小型活检衍生的TIL

[0842] 在一些实施例中，最初从通过核心活检或类似程序获得的患者肿瘤样品(“初始TIL”) 获得TIL且接着将其扩增为较大群体用于如本文所描述进一步操控、任选地冷冻保存并且任选地评估表型和代谢参数。

[0843] 在一些实施例中，可以使用所属领域中已知的方法，通常通过小型活检、核心活检、穿刺活检或其它获得含有肿瘤和TIL细胞的混合物的样品的方式来获得患者肿瘤样品。一般来说，肿瘤样品可以来自任何实体肿瘤，包括原发性肿瘤、浸润性肿瘤或转移性肿瘤。肿瘤样品还可以是液体肿瘤，例如获自恶性血液病的肿瘤。在一些实施例中，样品可以来自多个小肿瘤样品或活组织切片。在一些实施例中，样品可包含来自同一患者的单个肿瘤的多个肿瘤样品。在一些实施例中，样品可包含来自同一患者的一个、两个、三个或四个肿瘤的多个肿瘤样品。在一些实施例中，样品可包含来自同一患者的多个肿瘤的多个肿瘤样品。实体肿瘤可以是肺癌和/或非小细胞肺癌(NSCLC)。

[0844] 一般来说，从肿瘤核心或碎片获得的细胞悬浮液称作“初始细胞群体”或“新获得的”或“新分离的”细胞群体。在某些实施例中，将新获得的TIL细胞群体暴露于包含抗原呈现细胞IL-2和OKT-3的细胞培养基。

[0845] 在一些实施例中，如果肿瘤为转移性的且已在过去有效地治疗/去除原发性病灶，

那么可能需要去除转移性病灶中的一个。在一些实施例中，最小创伤性方法是在获得时去除皮肤病灶，或颈部或腋下区域上的淋巴结。在一些实施例中，去除皮肤病灶或去除其小活组织切片。在一些实施例中，去除其淋巴结或小活组织切片。在一些实施例中，可以采用肺或肝脏转移病灶，或其腹内或胸部淋巴结或小活组织切片。

[0846] 在一些实施例中，肿瘤为黑素瘤。在一些实施例中，黑素瘤的小活组织切片包含胎痣或其部分。

[0847] 在一些实施例中，小型活检为钻取活检。在一些实施例中，用按压到皮肤中的圆形刀片获得钻取活组织切片。在一些实施例中，用按压到皮肤中的圆形刀片获得钻取活组织切片。周围有可疑胎痣。在一些实施例中，用按压到皮肤中的圆形刀片获得钻取活组织切片，且去除皮肤的圆形片段。在一些实施例中，小型活检为钻取活检并且去除肿瘤的圆形部分。

[0848] 在一些实施例中，小型活检为切除活检。在一些实施例中，小型活检为切除活检且去除全部胎痣或生长。在一些实施例中，小型活检为切除活检，并且去除全部胎痣或生长以及正常出现的皮肤的小边界。

[0849] 在一些实施例中，小型活检为切取活检。在一些实施例中，小型活检为切取活检并且仅获取胎痣或生长的最不规律部分。在一些实施例中，小型活检为切取活检并且当其它技术无法完成时，例如在可疑胎痣非常大的情况下使用切取活检。

[0850] 在一些实施例中，小型活检为肺活检。在一些实施例中，通过支气管镜检查法获得小活组织切片。一般来说，支气管镜检查法是将患者置于麻醉下，且小型工具经过鼻或口腔，沿喉部向下并进入支气管通道，其中小型工具用于去除一些组织。在一些实施例中，在无法通过支气管镜检查法到达肿瘤或生长的情况下，可以采用经胸穿刺活检。一般来说，对于经胸穿刺活检，患者还处于麻醉下并且针通过皮肤直接插入到可疑部位中以去除小组织样品。在一些实施例中，经胸穿刺活检可能需要介入放射学(例如，使用x射线或CT扫描来引导针)。在一些实施例中，通过穿刺活检获得小活组织切片。在一些实施例中，小活组织切片是通过内窥镜超声波(例如，具有光且通过口腔放置到食道中的内窥镜)获得。在一些实施例中，以手术方式获得小活组织切片。

[0851] 在一些实施例中，小型活检为头颈部活检。在一些实施例中，小型活检为切取活检。在一些实施例中，小型活检为切取活检，其中从观察异常的区域切割一小块组织。在一些实施例中，如果容易接近异常区域，那么可取得样品而无需住院。在一些实施例中，如果肿瘤在口腔或咽喉内部更深，那么可能需要在手术室中以全身麻醉进行活检。在一些实施例中，小型活检为切除活检。在一些实施例中，小型活检为切除活检，其中去除整个区域。在一些实施例中，小型活检为细针抽吸(fine needle aspiration;FNA)。在一些实施例中，小型活检为细针抽吸(FNA)，其中连接到注射器的极薄的针用于从肿瘤或肿块提取(抽吸)细胞。在一些实施例中，小型活检为钻取活检。在一些实施例中，小型活检为钻取活检，其中使用穿孔镊子去除一块可疑区域。

[0852] 在一些实施例中，小型活检为子宫颈活检。在一些实施例中，通过阴道镜检查获得小活组织切片。一般来说，阴道镜检查方法采用使用连接至放大双目镜(阴道镜)的照明放大仪器，接着将其用于活检子宫颈表面的小部分。在一些实施例中，小型活检为锥切/锥形活检。在一些实施例中，小型活检为锥切/锥形活检，其中可能需要门诊手术以从子宫颈去

除较大块的组织。在一些实施例中，锥形活检是除帮助确认诊断外，锥形活检可用作初始治疗。

[0853] 术语“实体肿瘤”是指通常不含囊肿或液体区域的异常组织块。实体肿瘤可以是良性或恶性的。术语“实体肿瘤癌症”是指恶性、赘生性或癌性实体肿瘤。实体肿瘤癌症包括肺癌。在一些实施例中，癌症为非小细胞肺癌(NSCLC)。实体肿瘤的组织结构包括相互依赖的组织隔室，包括薄壁组织(癌细胞)和其中分散有癌细胞且可提供支持微环境的支持基质细胞。

[0854] 在一些实施例中，来自肿瘤的样品是以细针抽吸(FNA)、核心活检、小型活检(包括例如钻取活检)形式获得。在一些实施例中，首先将样品放置到G-Rex 10中。在一些实施例中，当存在1或2个核心活检和/或小型活检样品时，首先将样品放置到G-Rex 10中。在一些实施例中，当存在3、4、5、6、8、9或10个或更多个核心活检和/或小型活检样品时，首先将样品放置到G-Rex 100中。在一些实施例中，当存在3、4、5、6、8、9或10个或更多个核心活检和/或小型活检样品时，首先将样品放置到G-Rex 500中。

[0855] FNA可获自肺肿瘤，包括例如NSCLC。在一些实施例中，FNA是获自肺肿瘤，例如来自患有非小细胞肺癌(NSCLC)的患者的肺肿瘤。在一些情况下，患有NSCLC的患者先前已经历手术治疗。

[0856] 本文所描述的TIL可获自FNA样品。在一些情况下，使用范围介于18号针到25号针的精细规格针从患者获得或分离FNA样品。精细规格针可以是18号、19号、20号、21号、22号、23号、24号或25号。在一些实施例中，来自患者的FNA样品可含有至少400,000个 TIL，例如400,000个TIL、450,000个TIL、500,000个TIL、550,000个TIL、600,000个TIL、650,000个TIL、700,000个TIL、750,000个TIL、800,000个TIL、850,000个TIL、900,000 个TIL、950,000个TIL或更多。

[0857] 在一些情况下，本文所描述的TIL获自核心活检样品。在一些情况下，使用范围介于11 号针到16号针的手术或医疗针从患者获得或分离核心活检样品。针可以是11号、12号、13 号、14号、15号或16号。在一些实施例中，来自患者的核心活检样品可含有至少400,000 个TIL，例如400,000个TIL、450,000个TIL、500,000个TIL、550,000个TIL、600,000个TIL、650,000个TIL、700,000个TIL、750,000个TIL、800,000个TIL、850,000个TIL、900,000个TIL、950,000个TIL或更多。

[0858] 一般来说，采集的细胞悬浮液称作“初始细胞群体”或“新采集的”细胞群体。

[0859] 在一些实施例中，TIL不是获自肿瘤消化物。在一些实施例中，不碎裂实体肿瘤核心。

[0860] 在一些实施例中，TIL是获自肿瘤消化物。在一些实施例中，通过在酶介质(例如(但不限于)RPMI 1640、2mM GlutaMAX、10mg/mL庆大霉素、30U/mL DNA酶和1.0mg/mL 胶原蛋白酶)中培育，接着进行机械解离(GentleMACS，加利福尼亚州奥本的美天旎生物技术公司)来产生肿瘤消化物。将肿瘤放置于酶介质中之后，可对肿瘤进行机械解离大致1分钟。接着可以将溶液在37℃/5％CO_2下培育30分钟并且对其再次进行机械破碎大致1分钟。在37℃/5％CO_2下再培育30分钟之后，可对肿瘤进行第三次机械破碎大致1分钟。在一些实施例中，在第三次机械破碎后，如果存在较大组织片段，那么可在或不在37℃/5％CO_2下再培育30分钟的情况下，对样品再施加1或2次机械解离。在一些实施例中，在最终培育结束时，如

果细胞悬浮液含有大量红细胞或死细胞，那么可使用Ficoll进行密度梯度分离以去除这些细胞。

[0861] 2.从外周血中扩增外周血淋巴细胞(PBL)的方法

[0862] PBL方法1。在本发明的一实施例中，使用本文所描述的方法扩增PBL。在本发明的一实施例中，方法包含从全血获得PBMC样品。在一实施例中，方法包含通过使用非CD19+ 级分的负向选择从PBMC分离纯T细胞来富集T细胞。在一实施例中，方法包含通过使用非 CD19级分的基于磁珠的负向选择从PBMC分离纯T细胞来富集T细胞。

[0863] 在本发明的一实施例中，如下进行PBL方法1：在第0天，解冻冷冻保存的PBMC样品并且对PBMC计数。使用人类Pan T细胞分离试剂盒和LS管柱(美天旎生物技术公司)分离T细胞。

[0864] PBL方法2。在本发明的一实施例中，使用包含从全血获得PBMC样品的PBL方法2扩增PBL。通过在37℃下培育PBMC至少三个小时且接着分离非粘附性细胞来富集来自PBMC 的T细胞。

[0865] 在本发明的一实施例中，如下进行PBL方法2：在第0天，解冻冷冻保存的PMBC样品，且将PBMC细胞以600万个细胞/孔接种于6孔培养板的CM-2培养基中并且在37摄氏度下培育3小时。3小时后，去除作为PBL的非粘附性细胞并且对其进行计数。

[0866] PBL方法3。在本发明的一实施例中，使用包含从外周血获得PBMC样品的PBL方法3扩增PBL。使用CD19+选择分离B细胞，并且使用PBMC样品的非CD19+级分的负向选择来选择T细胞。

[0867] 在本发明的一实施例中，如下进行PBL方法3：在第0天，解冻来源于外周血的冷冻保存的PBMC样品并且对其进行计数。使用人类CD19Multisort试剂盒(美天旎生物技术公司) 分选CD19+B细胞。在非CD19细胞级分中，使用人类Pan T细胞分离试剂盒和LS管柱(美天旎生物技术公司)纯化T细胞。

[0868] 在一实施例中，从全血样品中分离PBMC。在一实施例中，PBMC样品用作扩增PBL的起始材料。在一实施例中，在扩增工艺之前冷冻保存样品。在另一实施例中，新鲜样品用作扩增PBL的起始材料。在本发明的一实施例中，使用所属领域中已知的方法从PBMC分离T 细胞。在一实施例中，使用人类Pan T细胞分离试剂盒和LS管柱分离T细胞。在本发明的一实施例中，使用所属领域中已知的抗体选择方法，例如CD19负向选择从PBMC分离T细胞。

[0869] 在本发明的一实施例中，将PBMC样品在有效鉴别非粘附性细胞的所需温度下培育一定时间段。在本发明的一实施例中，培育时间为约3小时。在本发明的一实施例中，温度为约 37℃。接着使用上文所描述的工艺扩增非粘附性细胞。

[0870] 在一些实施例中，PBMC样品来自已经任选地用包含激酶抑制剂或ITK抑制剂的方案预治疗的个体或患者。在一些实施例中，肿瘤样品来自已经用包含激酶抑制剂或ITK抑制剂的方案预治疗的个体或患者。在一些实施例中，PBMC样品来自已经用包含激酶抑制剂或ITK 抑制剂的方案预治疗，已经历至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5 个月、至少6个月或1年或更久的治疗的个体或患者。在另一实施例中，PBMC来源于目前进行ITK抑制剂方案，例如依鲁替尼(ibrutinib)的患者。

[0871] 在一些实施例中，PBMC样品来自已经用包含激酶抑制剂或ITK抑制剂的方案预治疗且难以用激酶抑制剂或ITK抑制剂，例如依鲁替尼治疗的个体或患者。

[0872] 在一些实施例中,PBMC样品来自已经用包含激酶抑制剂或ITK抑制剂的方案预治疗但不再经历激酶抑制剂或ITK抑制剂的治疗的个体或患者。在一些实施例中,PBMC样品来自个体或患者,所述个体或患者已经用包含激酶抑制剂或ITK抑制剂的方案预治疗但不再经历激酶抑制剂或ITK抑制剂的治疗且尚未经历至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月或至少1年或更久的治疗。在另一实施例中,PBMC来源于先前已暴露于ITK抑制剂,但在至少3个月、至少6个月、至少9个月或至少1年内尚未治疗的患者。

[0873] 在本发明的一实施例中,在第0天,针对CD19+而选择细胞且相应地进行分选。在本发明的一实施例中,使用结合抗体的珠粒进行选择。在本发明的一实施例中,在第0天从PBMC 中分离纯T细胞。

[0874] 在本发明的一实施例中,对于不用依鲁替尼或其它ITK抑制剂预治疗的患者,10-15ml 的血沉棕黄层(Buffy Coat)将产生约5×10^9个PBMC,其继而将产生约5.5×10^7个PBL。

[0875] 在本发明的一个实施例中,对于用BTK或其它ITK抑制剂预治疗的患者,扩增工艺将产生约20×10^9个PBL。在本发明的一实施例中,40.3×10^6个PBMC将产生约4.7×10^5个PBL。

[0876] 在前述实施例中的任一个中,可以从全血样品、通过单采术、从血沉棕黄层或由所属领域中已知用于获得PBMC的任何其它方法衍生PBMC。

[0877] 3.从来源于骨髓的PBMC中扩增骨髓浸润淋巴细胞(MIL)的方法

[0878] MIL方法3。在本发明的一实施例中,方法包含从骨髓获得PBMC。在第0天,针对 CD3+/CD33+/CD20+/CD14+而选择PBMC并且进行分选,且超声处理非 CD3+/CD33+/CD20+/CD14+细胞级分并且将超声处理的细胞级分的一部分添加回到所选细胞级分中。

[0879] 在本发明的一实施例中,如下进行MIL方法3:在第0天,解冻冷冻保存的PBMC样品并且对PBMC计数。细胞用CD3、CD33、CD20和CD14抗体染色并且使用分选的S3e细胞 (伯乐(Bio-Rad))进行分选。将细胞分选成两种级分:免疫细胞级分(或MIL级分) (CD3+CD33+CD20+CD14+)和AML原始细胞级分(非CD3+CD33+CD20+CD14+)。

[0880] 在本发明的一实施例中,PBMC是获自骨髓。在一实施例中,通过单采术、抽吸、穿刺活检或所属领域中已知的其它类似手段从骨髓获得PBMC。在一实施例中,PBMC为新鲜的。在另一实施例中,冷冻保存PBMC。

[0881] 在本发明的一实施例中,从10-50ml骨髓抽吸物中扩增MIL。在本发明的一实施例中,从患者获得10ml骨髓抽吸物。在另一实施例中,从患者获得20ml骨髓抽吸物。在另一实施例中,从患者获得30ml骨髓抽吸物。在另一实施例中,从患者获得40ml骨髓抽吸物。在另一实施例中,从患者获得50ml骨髓抽吸物。

[0882] 在本发明的一实施例中,由约10-50ml骨髓抽吸物产生的PBMC的数量为约5×10^7至约 10×10^7个PBMC。在另一实施例中,所产生的PMBC的数量为约7×10^7个PBMC。

[0883] 在本发明的一实施例中,约5×10^7至约10×10^7个PBMC产生约0.5×10^6至约1.5×10^6个 MIL。在本发明的一实施例中,产生约1×10^6个MIL。

[0884] 在本发明的一实施例中,来源于骨髓抽吸物的12×10^6个PBMC产生大致1.4×10^5个MIL。

[0885] 在前述实施例中的任一个中,可以从全血样品、从骨髓、通过单采术、从血沉棕黄层或由所属领域中已知用于获得PBMC的任何其它方法衍生PBMC。

[0886] B.步骤B:引发第一次扩增

[0887] 在一些实施例中,本发明方法提供较年轻TIL,其可提供相对于较老的TIL(即,在给予个体/患者之前已进一步经历更多轮复制的TIL)的附加治疗益处。以下文献中已描述年轻TIL 的特征:例如Donia等人,《斯堪的纳维亚免疫学杂志》,75:157-167(2012);Dudley等人,《临床癌症研究》,16:6122-6131(2010);Huang等人,《免疫治疗学杂志》,28(3):258-267(2005);Besser等人,《临床癌症研究》,19(17):OF1-OF9(2013);Besser等人,《免疫治疗学杂志》 32:415-423(2009);Robbins等人,《免疫学杂志》2004;173:7125-7130;Shen等人,《免疫治疗学杂志》,30:123-129(2007);Zhou等人,《免疫治疗学杂志》,28:53-62(2005);和Tran 等人,《免疫治疗学杂志》,31:742-751(2008),其均以全文引用的方式并入本文中。

[0888] 在切割或消化肿瘤碎片和/或肿瘤碎片之后,例如图1(确切地说,例如图1B和/或图8C) 的步骤A中所描述,在含有IL-2、OKT-3和饲养细胞(例如,抗原呈递饲养细胞)血清中在有利于TIL生长超过肿瘤和其它细胞的条件下培养所得细胞。在一些实施例中,在培养起始时将IL-2、OKT-3和饲养细胞与肿瘤消化物和/或肿瘤碎片一起添加(例如,在第0天)。在一些实施例中,将肿瘤消化物和/或肿瘤碎片在容器中培育,每个容器具有最多60个碎片并且具有6000IU/mL的IL-2。在一些实施例中,将所述初始细胞群体培养数天(通常1至8天)的时段,得到块状TIL群体,通常约1×10^8个块状TIL细胞。在一些实施例中,将所述初始细胞群体培养数天(通常1至7天)的时段,得到块状TIL群体,通常约1×10^8个块状TIL 细胞。在一些实施例中,引发第一次扩增进行1至8天的时段,得到块状TIL群体,通常约 1×10^8个块状TIL细胞。在一些实施例中,引发第一次扩增进行1至7天的时段,得到块状 TIL群体,通常约1×10^8个块状TIL细胞。在一些实施例中,引发第一次扩增进行5至8天的时段,得到块状TIL群体,通常约1×10^8个块状TIL细胞。在一些实施例中,引发第一次扩增进行5至7天的时段,得到块状TIL群体,通常约1×10^8个块状TIL细胞。在一些实施例中,引发第一次扩增进行约6至8天的时段,得到块状TIL群体,通常约1×10^8个块状TIL 细胞。在一些实施例中,引发第一次扩增进行约6至7天的时段,得到块状TIL群体,通常约1×10^8个块状TIL细胞。在一些实施例中,引发第一次扩增进行约7至8天的时段,得到块状TIL群体,通常约1×10^8个块状TIL细胞。在一些实施例中,引发第一次扩增进行约7 天的时段,得到块状TIL群体,通常约1×10^8个块状TIL细胞。在一些实施例中,引发第一次扩增进行约8天的时段,得到块状TIL群体,通常约1×10^8个块状TIL细胞。

[0889] 在一优选实施例中,可以使用如下文和本文所描述的引发第一次扩增步骤(例如,图8 (确切地说,例如图8B和/或图8C)的步骤B中所描述的那些,其可包括称为pre-REP或引发REP的工艺且其含有来自第0天和/或培养起始的饲养细胞),接着如下文在步骤D和本文所描述的快速第二次扩增(步骤D,包括称为快速扩增方案(REP)步骤的工艺),接着任选的低温保存且接着如下文和本文所描述的第二个步骤D(包括称为再刺激REP步骤的工艺) 进行TIL的扩增。从所述工艺获得的TIL可任选地表征如本文所描述的表型特征和代谢参数。在一些实施例中,肿瘤碎片介于约$1mm^3$与$10mm^3$之间。

[0890] 在一些实施例中,第一次扩增培养基称为“CM”,培养基的缩写。在一些实施例中,步骤B的CM由补充有10%人类AB血清、25mM Hepes和10mg/mL庆大霉素的RPMI 1640 及GlutaMAX组成。

[0891] 在一些实施例中,存在少于或等于240个肿瘤碎片。在一些实施例中,存在少于或

等于 240个放置于少于或等于4个容器中的肿瘤碎片。在一些实施例中，容器为GREX100 MCS 烧瓶。在一些实施例中，将少于或等于60个肿瘤碎片放置于1个容器中。在一些实施例中，每个容器包含每容器少于或等于500mL培养基。在一些实施例中，培养基包含IL-2。在一些实施例中，培养基包含6000IU/mL IL-2。在一些实施例中，培养基包含抗原呈递饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”)。在一些实施例中，培养基包含每容器2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，培养基包含OKT-3。在一些实施例中，培养基包含每容器30 ng/mL OKT-3。在一些实施例中，容器为GREX100 MCS烧瓶。在一些实施例中，培养基包含6000IU/mL IL-2、30ng OKT-3和2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，培养基包含每容器6000IU/mL IL-2、30ng/mL OKT-3和2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。

[0892] 在制备肿瘤碎片之后，在含有IL-2、抗原呈递饲养细胞和OKT-3的培养基中，在有利于 TIL生长超过肿瘤和其它细胞并且允许TIL引发和相对于第0天起始培养的加速生长的条件下培养所得细胞(即，作为初始细胞群体的碎片)。在一些实施例中，将肿瘤消化物和/或肿瘤碎片与6000IU/mL IL-2以及抗原呈递饲养细胞和OKT-3一起培育。将所述初始细胞群体培养数天(通常1至8天)的时段，得到块状TIL群体，通常约1×10^8个块状TIL细胞。在一些实施例中，引发第一次扩增期间的生长培养基包含IL-2或其变体，以及抗原呈递饲养细胞和OKT-3。在一些实施例中，将所述初始细胞群体培养数天(通常1至7天)的时段，得到块状TIL群体，通常约1×10^8个块状TIL细胞。在一些实施例中，引发第一次扩增期间的生长培养基包含IL-2或其变体，以及抗原呈递饲养细胞和OKT-3。在一些实施例中，IL-2为重组人类IL-2(rhIL-2)。在一些实施例中，对于1mg小瓶，IL-2储备溶液具有20-30$\times10^6$IU/mg的比活性。在一些实施例中，对于1mg小瓶，IL-2储备溶液具有20$\times10^6$IU/mg的比活性。在一些实施例中，对于1mg小瓶，IL-2储备溶液具有25$\times10^6$IU/mg的比活性。在一些实施例中，对于1mg小瓶，IL-2储备溶液具有30$\times10^6$IU/mg的比活性。在一些实施例中，IL-2 储备溶液的最终浓度为4-8$\times10^6$IU/mg IL-2。在一些实施例中，IL-2储备溶液的最终浓度为 5-7$\times10^6$IU/mg IL-2。在一些实施例中，IL-2储备溶液的最终浓度为6$\times10^6$IU/mg IL-2。在一些实施例中，如实例C中所描述来制备IL-2储备溶液。在一些实施例中，引发第一次扩增培养基包含约10,000IU/mL IL-2、约9,000IU/mL IL-2、约8,000IU/mL IL-2、约7,000IU/mL IL-2、约6000IU/mL IL-2或约5,000IU/mL IL-2。在一些实施例中，引发第一次扩增培养基包含约9,000IU/mL IL-2至约5,000IU/mL IL-2。在一些实施例中，引发第一次扩增培养基包含约8,000 IU/mL IL-2至约6,000IU/mL IL-2。在一些实施例中，引发第一次扩增培养基包含约7,000 IU/mL IL-2至约6,000IU/mL IL-2。在一些实施例中，引发第一次扩增培养基包含约6,000 IU/mL IL-2。在一实施例中，细胞培养基进一步包含IL-2。在一些实施例中，引发第一次扩增细胞培养基包含约3000IU/mL IL-2。在一实施例中，引发第一次扩增细胞培养基进一步包含IL-2。在一优选实施例中，引发第一次扩增细胞培养基包含约3000IU/mL IL-2。在一实施例中，引发第一次扩增细胞培养基包含约1000IU/mL、约1500IU/mL、约2000IU/mL、约 2500IU/mL、约3000IU/mL、约3500IU/mL、约4000IU/mL、约4500IU/mL、约5000IU/mL、约5500IU/mL、约6000IU/mL、约6500IU/mL、约7000IU/mL、约7500IU/mL或约8000IU/mL 的IL-2。在一实施例中，引发第一次扩增细胞培养基包含在1000与2000IU/mL之间、在2000 与3000IU/mL之间、在3000与4000IU/mL之间、在4000与5000IU/mL之间、在5000与 6000IU/mL之间、在6000与7000IU/mL之间、在7000与8000IU/mL之间或约8000IU/mL 的IL-2。

[0893] 在一些实施例中，引发第一次扩增培养基包含约500IU/mL IL-15、约400IU/mL IL-15、约300IU/mL IL-15、约200IU/mL IL-15、约180IU/mL IL-15、约160IU/mL IL-15、约140IU/mL IL-15、约120IU/mL IL-15或约100IU/mL IL-15。在一些实施例中，引发第一次扩增培养基包含约500IU/mL IL-15至约100IU/mL IL-15。在一些实施例中，引发第一次扩增培养基包含约400IU/mL IL-15至约100IU/mL IL-15。在一些实施例中，引发第一次扩增培养基包含约300IU/mL IL-15至约100IU/mL IL-15。在一些实施例中，引发第一次扩增培养基包含约 200IU/mL IL-15。在一些实施例中，引发第一次扩增细胞培养基包含约180IU/mL IL-15。在一实施例中，引发第一次扩增细胞培养基进一步包含IL-15。在一优选实施例中，引发第一次扩增细胞培养基包含约180IU/mL IL-15。

[0894] 在一些实施例中，引发第一次扩增培养基包含约20IU/mL IL-21、约15IU/mL IL-21、约 12IU/mL IL-21、约10IU/mL IL-21、约5IU/mL IL-21、约4IU/mL IL-21、约3IU/mL IL-21、约2IU/mL IL-21、约1IU/mL IL-21或约0.5IU/mL IL-21。在一些实施例中，引发第一次扩增培养基包含约20IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施例中，引发第一次扩增培养基包含约15IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施例中，引发第一次扩增培养基包含约12IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施例中，引发第一次扩增培养基包含约 10IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施例中，引发第一次扩增培养基包含约5IU/mL IL-21至约1IU/mL IL-21。在一些实施例中，引发第一次扩增培养基包含约2IU/mL IL-21。在一些实施例中，引发第一次扩增细胞培养基包含约1IU/mL IL-21。在一些实施例中，引发第一次扩增细胞培养基包含约0.5IU/mL IL-21。在一实施例中，细胞培养基进一步包含IL-21。在一优选实施例中，引发第一次扩增细胞培养基包含约1IU/mL IL-21。

[0895] 在一实施例中，引发第一次扩增细胞培养基包含OKT-3抗体。在一些实施例中，引发第一次扩增细胞培养基包含约30ng/mL OKT-3抗体。在一实施例中，引发第一次扩增细胞培养基包含约0.1ng/mL、约0.5ng/mL、约1ng/mL、约2.5ng/mL、约5ng/mL、约7.5ng/mL、约10ng/mL、约15ng/mL、约20ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200 ng/mL、约500ng/mL和约1μg/mL OKT-3抗体。在一实施例中，细胞培养基包含在0.1ng/mL 与1ng/mL之间、在1ng/mL与5ng/mL之间、在5ng/mL与10ng/mL之间、在10ng/mL与 20ng/mL之间、在20ng/mL与30ng/mL之间、在30ng/mL与40ng/mL之间、在40ng/mL 与50ng/mL之间和在50ng/mL与100ng/mL之间的OKT-3抗体。在一实施例中，细胞培养基包含15ng/ml与30ng/mL之间的OKT-3抗体。在一实施例中，细胞培养基包含30ng/mL OKT-3抗体。在一些实施例中，OKT-3抗体为莫罗单抗。

[0896] 表19:莫罗单抗的氨基酸序列(示范性OKT-3抗体)

[0897]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO:1 莫罗单抗重链	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID NO:2 莫罗单抗轻链	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC	60 120 180 213

[0898] 在一些实施例中，引发第一次扩增细胞培养基包含含有一种或多种TNFRSF激动剂的细胞培养基。在一些实施例中，TNFRSF激动剂包含4-1BB激动剂。在一些实施例中，TNFRSF激动剂为4-1BB激动剂，并且4-1BB激动剂是选自以下组成的组：乌瑞鲁单抗、乌托米单抗、EU-101、融合蛋白，以及其片段、衍生物、变体、生物类似物及组合。在一些实施例中，以足以在细胞培养基中达到0.1μg/mL与100μg/mL之间的浓度的浓度添加TNFRSF激动剂。在一些实施例中，以足以在细胞培养基中达到20μg/mL与40μg/mL之间的浓度的浓度添加 TNFRSF激动剂。

[0899] 在一些实施例中，除了一种或多种TNFRSF激动剂之外，引发第一次扩增细胞培养基进一步包含起始浓度为约3000IU/mL的IL-2和起始浓度为约30ng/mL的OKT-3抗体，且其中一种或多种TNFRSF激动剂包含4-1BB激动剂。在一些实施例中，除了一种或多种TNFRSF激动剂之外，引发第一次扩增细胞培养基进一步包含起始浓度为约6000IU/mL的IL-2和起始浓度为约30ng/mL的OKT-3抗体，且其中一种或多种TNFRSF激动剂包含4-1BB激动剂。

[0900] 在一些实施例中，引发第一次扩增培养基称为“CM”，培养基的缩写。在一些实施例中，其称为CM1(培养基1)。在一些实施例中，CM由补充有10％人类AB血清、25mM Hepes 和10mg/mL庆大霉素的RPMI 1640及GlutaMAX组成。在一些实施例中，CM为实例中描述的CM1，参见实例A。在一些实施例中，引发第一次扩增在初始细胞培养基或第一细胞培养基中进行。在一些实施例中，引发第一次扩增培养基或初始细胞培养基或第一细胞培养基包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞(在本文中也称为饲养细胞)。

[0901] 在一些实施例中，本文所公开的扩增工艺中使用的培养基为无血清培养基或确定成分培养基。在一些实施例中，无血清或确定成分培养基包含基底细胞培养基和血清补充剂和/或血清替代物。在一些实施例中，无血清或确定成分培养基用于预防和/或减少部分由于含血清培养基的批次间变化而引起的实验变化。

[0902] 在一些实施例中，无血清或确定成分培养基包含基底细胞培养基和血清补充剂和/或血清替代物。在一些实施例中，基底细胞培养基包括(但不限于)CCTS™ OpTmizer™ T细胞扩增基础培养基、CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM、CTS™ AIM-V培养基、CTS™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T细胞扩增无异种培养基、杜尔贝科氏改良伊格尔氏培养基(Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium;DMEM)、最小必需培养基(Minimal Essential Medium;MEM)、伊格尔氏基础培养基(Basal Medium Eagle;BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必需培养基(αMEM)、格拉斯哥氏最小必需培养基(Glasgow’s Minimal Essential Medium;G-MEM)、RPMI生长培养基和伊思考夫改良杜尔贝可培养基(Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium)。

[0903] 在一些实施例中，血清补充剂或血清替代物包括(但不限于)以下中的一种或多

种:CTS™ OpTmizer T细胞扩增血清补充剂、CTS™免疫细胞血清替代物、一种或多种白蛋白或白蛋白替代品、一种或多种氨基酸、一种或多种维生素、一种或多种转铁蛋白或转铁蛋白替代品、一种或多种抗氧化剂、一种或多种胰岛素或胰岛素替代品、一种或多种胶原蛋白前体、一种或多种抗生素和一种或多种微量元素。在一些实施例中,确定成分培养基包含白蛋白和一种或多种选自由以下组成的组的成分:甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、硫胺素、还原型谷胱甘肽、L-抗坏血酸-2-磷酸酯、铁饱和转铁蛋白、胰岛素以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+}和Zr^{4+}的化合物。在一些实施例中,确定成分培养基进一步包含L-谷氨酰胺、碳酸氢钠和/或2-巯基乙醇。

[0904] 在一些实施例中,CTS™OpTmizer™ T细胞免疫细胞血清替代物用于常规生长培养基,包括(但不限于)CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增基础培养基、CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM、CTS™ AIM-V培养基、CST™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T细胞扩增无异种培养基、杜尔贝科氏改良伊格尔氏培养基(DMEM)、最小必需培养基(MEM)、伊格尔氏基础培养基 (BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必需培养基(αMEM)、格拉斯哥氏最小必需培养基 (G-MEM)、RPMI生长培养基和伊思考夫改良杜尔贝可培养基。

[0905] 在一些实施例中,无血清或确定成分培养基中的总血清替代物浓度(体积%)为总无血清或确定成分培养基的约1体积%、2体积%、3体积%、4体积%、5体积%、6体积%、7体积%、8体积%、9体积%、10体积%、11体积%、12体积%、13体积%、14体积%、15体积%、16体积%、17体积%、18体积%、19体积%或20体积%。在一些实施例中,总血清替代物浓度为无血清或确定成分培养基的总体积的约3%。在一些实施例中,总血清替代物浓度为无血清或确定成分培养基的总体积的约5%。在一些实施例中,总血清替代物浓度为无血清或确定成分培养基的总体积的约10%。

[0906] 在一些实施例中,无血清或确定成分培养基为CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM(赛默飞世尔科学(ThermoFisher Scientific))。CTS™ OpTmizer™的任何调配物适用于本发明。CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM为在使用前混合在一起的1L CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增基础培养基和26mL CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增补充剂的组合。在一些实施例中,CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)。在一些实施例中,CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)以及55mM的2-巯基乙醇。在一些实施例中,CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学),并且2-巯基乙醇在培养基中的最终浓度为55μM。

[0907] 在一些实施例中,确定成分培养基为CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM(赛默飞世尔科学)。CTS™ OpTmizer™的任何调配物适用于本发明。CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM为在使用前混合在一起的1L CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增基础培养基和26mL CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增补充剂的组合。在一些实施例中,CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)以及55mM的2-巯基乙醇。在一些实施例中,CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)、55mM 2-巯基乙醇和2mM L-谷氨酰胺。在一些实施例中,

CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR) (赛默飞世尔科学)、55mM 2-巯基乙醇和2mM L-谷氨酰胺,且进一步包含约1000IU/mL至约8000IU/mL IL-2。在一些实施例中,CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的 CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)、55mM 2-巯基乙醇和2mM L-谷氨酰胺,且进一步包含约3000IU/mL IL-2。在一些实施例中,CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM 补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)、55mM 2-巯基乙醇和2 mM L-谷氨酰胺,且进一步包含约6000IU/mL IL-2。在一些实施例中,CTS™OpTmizer™ T 细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)和55mM 2-巯基乙醇,且进一步包含约1000IU/mL至约8000IU/mL IL-2。在一些实施例中, CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)和55mM 2-巯基乙醇,且进一步包含约3000IU/mL IL-2。在一些实施例中, CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)和55mM 2-巯基乙醇,且进一步包含约1000IU/mL至约6000IU/mL IL-2。在一些实施例中,CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)和约2mM谷氨酰胺,且进一步包含约1000IU/mL至约8000IU/mL IL-2。在一些实施例中,CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)和约2mM谷氨酰胺,且进一步包含约3000IU/mL IL-2。在一些实施例中,CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)和约2mM谷氨酰胺,且进一步包含约6000IU/mL IL-2。在一些实施例中,CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学),并且2-巯基乙醇在培养基中的最终浓度为55μM。

[0908] 在一些实施例中,无血清培养基或确定成分培养基补充有浓度为约0.1mM至约10mM、0.5mM至约9mM、1mM至约8mM、2mM至约7mM、3mM至约6mM或4mM至约5mM 的谷氨酰胺(即,GlutaMAX®)。在一些实施例中,无血清培养基或确定成分培养基补充有浓度为约2mM的谷氨酰胺(即,GlutaMAX®)。

[0909] 在一些实施例中,无血清培养基或确定成分培养基补充有浓度为约5mM至约150mM、10mM至约140mM、15mM至约130mM、20mM至约120mM、25mM至约110mM、30 mM至约100mM、35mM至约95mM、40mM至约90mM、45mM至约85mM、50mM 至约80mM、55mM至约75mM、60mM至约70mM或约65mM的2-巯基乙醇。在一些实施例中,无血清培养基或确定成分培养基补充有浓度为约55mM的2-巯基乙醇。在一些实施例中,2-巯基乙醇在培养基中的最终浓度为55μM。

[0910] 在一些实施例中,国际PCT公开第WO/1998/030679号(其以引用的方式并入本文中) 中描述的确定成分培养基适用于本发明。在所述公开中,描述了无血清真核细胞培养基。无血清的真核细胞培养基包括补充有能够支持细胞在无血清培养物中生长的无血清补充剂的基底细胞培养基。无血清真核细胞培养基补充剂包含或通过将一种或多种选自由以下组成的组的成分组合来获得:一种或多种白蛋白或白蛋白替代品、一种或多种氨基酸、一种或多种维生素、一种或多种转铁蛋白或转铁蛋白替代品、一或多种抗氧化剂、一种或多种胰岛素或胰岛素替代品、一种或多种胶原蛋白前体、一种或多种微量元素和一种或多种抗生素。在一些实施例中,确定成分培养基进一步包含L-谷氨酰胺、碳酸氢钠和/或β-巯基乙

醇。在一些实施例中，确定成分培养基包含白蛋白或白蛋白替代品以及一种或多种选自由以下组成的组的成分：一种或多种氨基酸、一种或多种维生素、一种或多种转铁蛋白或转铁蛋白替代品、一种或多种抗氧化剂、一种或多种胰岛素或胰岛素替代品、一种或多种胶原蛋白前体和一种或多种微量元素。在一些实施例中，确定成分培养基包含白蛋白和一种或多种选自由以下组成的组的成分：甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、硫胺素、还原型谷胱甘肽、L-抗坏血酸-2-磷酸酯、铁饱和转铁蛋白、胰岛素以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+}和Zr^{4+}的化合物。在一些实施例中，基底细胞培养基选自以下组成的组：杜尔贝科氏改良伊格尔氏培养基(DMEM)、最小必需培养基(MEM)、伊格尔氏基础培养基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必需培养基(αMEM)、格拉斯哥氏最小必需培养基(G-MEM)、RPMI生长培养基和伊思考夫改良杜尔贝可培养基。

[0911] 在一些实施例中，在确定成分培养基中甘氨酸的浓度在约5-200mg/L范围内，L-组氨酸的浓度为约5-250mg/L，L-异亮氨酸的浓度为约5-300mg/L，L-甲硫氨酸的浓度为约5-200 mg/L，L-苯丙氨酸的浓度为约5-400mg/L，L-脯氨酸的浓度为约1-1000mg/L，L-羟脯氨酸的浓度为约1-45mg/L，L-丝氨酸的浓度为约1-250mg/L，L-苏氨酸的浓度为约10-500mg/L，L-色氨酸的浓度为约2-110mg/L，L-酪氨酸的浓度为约3-175mg/L，L-缬氨酸的浓度为约5-500 mg/L，硫胺素的浓度为约1-20mg/L，还原型谷胱甘肽的浓度为约1-20mg/L，L-抗坏血酸-2- 磷酸酯的浓度为约1-200mg/L，铁饱和转铁蛋白的浓度为约1-50mg/L，胰岛素的浓度为约 1-100mg/L，亚硒酸钠的浓度为约0.000001-0.0001mg/L，并且白蛋白(例如，AlbuMAX® I) 的浓度为约5000-50,000mg/L。

[0912] 在一些实施例中，确定成分培养基中的非痕量元素部分成分是以下表A中标题“1×培养基中的浓度范围”下的列中所列出的浓度范围存在。在其它实施例中，确定成分培养基中的非痕量元素部分成分是以下表A中标题“1×培养基的优选实施例”下的列中所列出的最终浓度存在。在其它实施例中，确定成分培养基为包含无血清补充剂的基底细胞培养基。在这些实施例中的一些中，无血清补充剂包含具有以下类型且呈下表A中标题“补充剂的优选实施例”下的列中所列出的浓度的非痕量元素部分成分。

[0913] 表A：非痕量元素部分成分的浓度

[0914]

成分	补充剂的优选实施例（mg/L）（约）	1×培养基中的浓度范围（mg/L）（约）	1×培养基中的优选实施例（mg/L）（约）
甘氨酸	150	5-200	53
L-组氨酸	940	5-250	183
L-异亮氨酸	3400	5-300	615
L-甲硫氨酸	90	5-200	44
L-苯丙氨酸	1800	5-400	336
L-脯氨酸	4000	1-1000	600
L-羟脯氨酸	100	1-45	15
L-丝氨酸	800	1-250	162
L-苏氨酸	2200	10-500	425
L-色氨酸	440	2-110	82
L-酪氨酸	77	3-175	84
L-缬氨酸	2400	5-500	454
硫胺素	33	1-20	9
还原型谷胱甘肽	10	1-20	1.5
抗坏血酸-2-PO_4 (镁盐)	330	1-200	50
转铁蛋白（铁饱和）	55	1-50	8
胰岛素	100	1-100	10
亚硒酸钠	0.07	0.000001-0.0001	0.00001
AlbuMAX®I	83,000	5000-50,000	12,500

[0915] 在一些实施例中，确定成分培养基的容积渗透浓度在约260与350mOsmol之间。在一些实施例中，容积渗透浓度在约280与310mOsmol之间。在一些实施例中，确定成分培养基补充有最多约3.7g/L或约2.2g/L碳酸氢钠。确定成分培养基可以进一步补充有L-谷氨酰胺(最终浓度为约2mM)、一种或多种抗生素、非必需氨基酸(NEAA;最终浓度为约100μM)、2-巯基乙醇(最终浓度为约100μM)。

[0916] 在一些实施例中，Smith等人，“《使用新型无异种CTS免疫细胞血清替代物离体扩增用于过继免疫治疗的人类T细胞(Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement)》，”《临床转化免疫学(Clin Transl Immunology)》，4(1)2015(数字对象标识符:10.1038/cti.2014.31)中描述的确定成分培养基适用于本发明。简单来说，RPMI或CTS™ OpTmizer™用作基底细胞培养基，且补充有 0、2%、5%或10%CTS™免疫细胞血清替代物。

[0917] 在一实施例中，第一和/或第二气体可渗透容器中的细胞培养基并未过滤。使用未过滤的细胞培养基可以简化扩增细胞数量必需的程序。在一实施例中，第一和/或第二气体可渗透容器中的细胞培养基不含β-巯基乙醇(BME或βME;也称为2-巯基乙醇，CAS 60-24-2)。

[0918] 在一些实施例中，引发第一次扩增(包括例如图1(确切地说，例如图1B和/或图8C)的步骤B中描述的那些工艺，其可包括有时称为pre-REP或引发REP的那些工艺)工艺为1 至8天，如实例和图式中所论述。在一些实施例中，引发第一次扩增(包括例如图1(确切地说，例如图1B和/或图8C)的步骤B中描述的那些工艺，其可包括有时称为pre-REP或引发REP的那些工艺)工艺为2至8天。在一些实施例中，引发第一次扩增(包括例如图1(确切地说，例如图1B和/或图8C)的步骤B中描述的那些工艺，其可包括有时称为pre-REP或引发REP的那些工艺)工艺为3至8天。在一些实施例中，引发第一次扩增(包括例如图1 (确切地说，例如图

8B和/或图8C)的步骤B中描述的那些工艺,其可包括有时称为pre-REP 或引发REP的那些工艺)工艺为4至8天,如实例和图式中所论述。在一些实施例中,引发第一次扩增(包括例如图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)的步骤B中描述的那些工艺,其可包括有时称为pre-REP或引发REP的那些工艺)工艺为1至7天,如实例和图式中所论述。在一些实施例中,引发第一次扩增(包括例如图1(确切地说,例如图1B和/或图8C) 的步骤B中描述的那些工艺,其可包括有时称为pre-REP或引发REP的那些工艺)工艺为2 至8天。在一些实施例中,引发第一次扩增(包括例如图8(确切地说,例如图8B和/或图 8C)的步骤B中描述的那些工艺,其可包括有时称为pre-REP或引发REP的那些工艺)工艺为2至7天。在一些实施例中,引发第一次扩增(包括例如图8(确切地说,例如图8B和/ 或图8C)的步骤B中描述的那些工艺,其可包括有时称为pre-REP或引发REP的那些工艺) 工艺为3至8天。在一些实施例中,引发第一次扩增(包括例如图8(确切地说,例如图8B 和/或图8C)的步骤B中描述的那些工艺,其可包括有时称为pre-REP或引发REP的那些工艺)工艺为3至7天。在一些实施例中,引发第一次扩增(包括例如图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)的步骤B中描述的那些工艺,其可包括有时称为pre-REP或引发REP的那些工艺)工艺为4至8天。在一些实施例中,引发第一次扩增(包括例如图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)的步骤B中描述的那些工艺,其可包括有时称为pre-REP或引发REP 的那些工艺)工艺为4至7天。在一些实施例中,引发第一次扩增(包括例如图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)的步骤B中描述的那些工艺,其可包括有时称为pre-REP或引发 REP的那些工艺)工艺为5至8天。在一些实施例中,引发第一次扩增(包括例如图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)的步骤B中描述的那些工艺,其可包括有时称为pre-REP或引发REP的那些工艺)工艺为5至7天。在一些实施例中,引发第一次扩增(包括例如图8 (确切地说,例如图8B和/或图8C)的步骤B中描述的那些工艺,其可包括有时称为pre-REP 或引发REP的那些工艺)工艺为6至8天。在一些实施例中,引发第一次扩增(包括例如图 8(确切地说,例如图8B和/或图8C)的步骤B中描述的那些工艺,其可包括有时称为pre-REP 或引发REP的那些工艺)工艺为6至7天。在一些实施例中,引发第一次扩增(包括例如图 1(确切地说,例如图8B和/或图8C)的步骤B中提供的那些工艺,其可包括有时称为pre-REP 或引发REP的那些工艺)工艺为7至8天。在一些实施例中,引发第一次扩增(包括例如图 8(确切地说,例如图8B和/或图8C)的步骤B中提供的那些工艺,其可包括有时称为pre-REP 或引发REP的那些工艺)工艺为8天。在一些实施例中,引发第一次扩增(包括例如图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)的步骤B中提供的那些工艺,其可包括有时称为pre-REP或引发REP的那些工艺)工艺为7天。

[0919] 在一些实施例中,引发第一次TIL扩增可从发生碎裂和/或起始第一引发扩增步骤时开始进行1天至8天。在一些实施例中,引发第一次TIL扩增可从发生碎裂和/或起始第一引发扩增步骤时开始进行1天至7天。在一些实施例中,引发第一次TIL扩增可从发生碎裂和/或起始第一引发扩增步骤时开始进行2天至8天。在一些实施例中,引发第一次TIL扩增可从发生碎裂和/或起始第一引发扩增步骤时开始进行2天至7天。在一些实施例中,引发第一次TIL 扩增可从发生碎裂和/或起始第一引发扩增步骤时开始进行3天至8天。在一些实施例中,引发第一次TIL扩增可从发生碎裂和/或起始第一引发扩增步骤时开始进行3天至7天。在一些实施例中,引发第一次TIL扩增可从发生碎裂和/或起始第一引发扩增步骤时开始进行4天至 8天。在一些实施例中,引发第一次TIL扩增可从发生碎裂和/或起始第一引发

扩增步骤时开始进行4天至7天。在一些实施例中，引发第一次TIL扩增可从发生碎裂和/或起始第一引发扩增步骤时开始进行5天至8天。在一些实施例中，引发第一次TIL扩增可从发生碎裂和/ 或起始第一引发扩增步骤时开始进行5天至7天。在一些实施例中，引发第一次TIL扩增可从发生碎裂和/或起始第一引发扩增步骤时开始进行6天至8天。在一些实施例中，引发第一次TIL扩增可从发生碎裂和/或起始第一引发扩增步骤时开始进行6天至7天。在一些实施例中，引发第一次TIL扩增可从发生碎裂和/或起始第一引发扩增步骤时开始进行7至8天。在一些实施例中，引发第一次TIL扩增可从发生碎裂和/或起始第一引发扩增步骤时开始进行8 天。在一些实施例中，引发第一次TIL扩增可从发生碎裂和/或起始第一引发扩增步骤时开始进行7天。

[0920] 在一些实施例中，TIL的引发第一次扩增可以进行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行1天至8天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行1天至7天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行2天至8天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行2天至7天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行3天至8天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行3天至7天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行4天至8天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行4 天至7天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行5天至8天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行5天至7天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行6天至8天。

[0921] 在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行6天至7天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行7天至8天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行8天。在一些实施例中，第一次TIL扩增可以进行7天。

[0922] 在一些实施例中，在引发第一次扩增期间，以组合形式采用IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21 的组合。在一些实施例中，在引发第一次扩增期间，包括例如在根据图8(确切地说，例如图8B和/或图8C)的步骤B工艺期间，以及如本文所描述，可以包括IL-2、IL-7、IL-15和/ 或IL-21以及其任何组合。在一些实施例中，在引发第一次扩增期间，以组合形式采用IL-2、IL-15和IL-21的组合。在一些实施例中，在根据图8(确切地说，例如图8B和/或图8C)的步骤B工艺期间并且如本文所描述，可以包括IL-2、IL-15和IL-21以及其任何组合。

[0923] 在一些实施例中，在封闭系统生物反应器中进行引发第一次扩增，例如根据图8(确切地说，例如图8B和/或图8C)的步骤B。在一些实施例中，如本文所描述，采用封闭系统进行TIL扩增。在一些实施例中，采用生物反应器。在一些实施例中，生物反应器用作容器。在一些实施例中，采用的生物反应器为例如G-REX-10或G-REX-100。在一些实施例中，采用的生物反应器为G-REX-100。在一些实施例中，采用的生物反应器为G-REX-10。

[0924] 1.饲养细胞和抗原呈递细胞

[0925] 在一实施例中，本文所描述的引发第一次扩增程序(例如，包括例如图1(确切地说，例如图8B和/或图8C)的步骤B中描述的那些扩增，以及称为pre-REP或引发REP的那些扩增)在起始TIL扩增时不需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”)，而是在引发第一次扩增期间添加。在一实施例中，本文所描述的引发第一次扩增程序(例如，包括例如图8(确切地说，例如图8B和/或图8C)的步骤B中描述的那些扩增，以及称为pre-REP或引发REP的那些扩增)在起始TIL扩增时不需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”)，而是在引发第一次扩增期间在第4天至第8天期间的任何时间添加。在一实施例中，本文所描述的

引发第一次扩增程序(例如,包括例如图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)的步骤B中描述的那些扩增,以及称为pre-REP或引发REP的那些扩增)在起始TIL扩增时不需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”),而是在引发第一次扩增期间在第4天至第 7天期间的任何时间添加。在一实施例中,本文所描述的引发第一次扩增程序(例如,包括例如图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)的步骤B中描述的那些扩增,以及称为pre-REP 或引发REP的那些扩增)在起始TIL扩增时不需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”),而是在引发第一次扩增期间在第5天至第8天期间的任何时间添加。在一实施例中,本文所描述的引发第一次扩增程序(例如,包括例如图8(确切地说,例如图8B和/或图8C) 的步骤B中描述的那些扩增,以及称为pre-REP或引发REP的那些扩增)在起始TIL扩增时不需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”),而是在引发第一次扩增期间在第5天至第7天期间的任何时间添加。在一实施例中,本文所描述的引发第一次扩增程序(例如,包括例如图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)的步骤B中描述的那些扩增,以及称为pre-REP 或引发REP的那些扩增)在起始TIL扩增时不需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”),而是在引发第一次扩增期间在第6天至第8天期间的任何时间添加。在一实施例中,本文所描述的引发第一次扩增程序(例如,包括例如图8(确切地说,例如图8B和/或图8C) 的步骤B中描述的那些扩增,以及称为pre-REP或引发REP的那些扩增)在起始TIL扩增时不需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”),而是在引发第一次扩增期间在第6天至第7天期间的任何时间添加。在一实施例中,本文所描述的引发第一次扩增程序(例如,包括例如图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)的步骤B中描述的那些扩增,以及称为pre-REP 或引发REP的那些扩增)在起始TIL扩增时不需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”),而是在引发第一次扩增期间在第7天或第8天期间的任何时间添加。在一实施例中,本文所描述的引发第一次扩增程序(例如,包括例如图8(确切地说,例如图8B和/或图8C) 的步骤B中描述的那些扩增,以及称为pre-REP或引发REP的那些扩增)在起始TIL扩增时不需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”),而是在引发第一次扩增期间在第7天期间的任何时间添加。在一实施例中,本文所描述的引发第一次扩增程序(例如,包括例如图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)的步骤B中描述的那些扩增,以及称为pre-REP或引发REP的那些扩增)在起始TIL扩增时不需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”),而是在引发第一次扩增期间在第8天期间的任何时间添加。

[0926] 在一实施例中,本文所描述的引发第一次扩增程序(例如,包括例如图8(确切地说,例如图8B)的步骤B中描述的那些扩增,以及称为pre-REP或引发REP的那些扩增)在起始TIL扩增时且在引发第一次扩增期间需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”)。在许多实施例中,饲养细胞为获自同种异体健康血液供体的标准全血单位的外周血单核细胞(PBMC)。使用标准方法(例如Ficoll-Paque梯度分离)获得PBMC。在一些实施例中,在引发第一次扩增期间使用2.5×10^8个饲养细胞。在一些实施例中,在引发第一次扩增期间每个容器使用2.5×10^8个饲养细胞。在一些实施例中,在引发第一次扩增期间每个GREX-10使用2.5×10^8个饲养细胞。在一些实施例中,在引发第一次扩增期间每个GREX-100使用2.5×10^8个饲养细胞。

[0927] 一般来说,通过辐照或热处理灭活同种异体PBMC,且将其用于REP程序中,如实例中所描述,其提供一种用于评估辐照的同种异体PBMC的复制不胜任的示范性方案。

[0928] 在一些实施例中，如果第14天的活细胞总数小于在引发第一次扩增第0天置于培养物中的初始活细胞数量，那么认为PBMC为复制不胜任的且认可用于本文所描述的TIL扩增程序中。

[0929] 在一些实施例中，如果在OKT3和IL-2的存在下培养，第7天的活细胞总数相比于在引发第一次扩增第0天置于培养物中的初始活细胞数量并未增加，那么认为PBMC为复制不胜任的且认可用于本文所描述的TIL扩增程序中。在一些实施例中，在存在30ng/ml OKT3抗体和3000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中，在存在30ng/ml OKT3抗体和6000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。

[0930] 在一些实施例中，如果在OKT3和IL-2的存在下培养，第7天的活细胞总数相比于在引发第一次扩增第0天置于培养物中的初始活细胞数量并未增加，那么认为PBMC为复制不胜任的且认可用于本文所描述的TIL扩增程序中。在一些实施例中，在存在5-60ng/mL OKT3抗体和1000-6000IU/mL IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中，在存在10-50ng/ml OKT3抗体和2000-5000IU/mL IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中，在存在20-40 ng/mL OKT3抗体和2000-4000IU/mL IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中，在存在 25-35ng/mL OKT3抗体和2500-3500IU/mL IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中，在存在30ng/ml OKT3抗体和6000IU/mL IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中，在存在 15ng/mL OKT3抗体和3000IU/mL IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中，在存在15 ng/mL OKT3抗体和6000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。

[0931] 在一些实施例中，抗原呈递饲养细胞为PBMC。在一些实施例中，抗原呈递饲养细胞为人造抗原呈递饲养细胞。在一实施例中，第二次扩增中的TIL与抗原呈递饲养细胞的比率为约1比25、约1比50、约1比100、约1比125、约1比150、约1比175、约1比200、约 1比225、约1比250、约1比275、约1比300、约1比325、约1比350、约1比375、约 1比400或约1比500。在一实施例中，第二次扩增中的TIL与抗原呈递饲养细胞的比率在1 比50与1比300之间。在一实施例中，第二次扩增中的TIL与抗原呈递饲养细胞的比率在1 比100与1比200之间。

[0932] 在一实施例中，本文中所描述的引发第一次扩增程序需要约2.5×10^8个饲养细胞与约 100×10^6个TIL的比率。在另一实施例中，本文中所描述的引发第一次扩增程序需要约2.5×10^8个饲养细胞与约50×10^6个TIL的比率。在又一实施例中，本文所描述的引发第一次扩增需要约2.5×10^8个饲养细胞与约25×10^6个TIL。在又一实施例中，本文所描述的引发第一次扩增需要约2.5×10^8个饲养细胞。在又一实施例中，引发第一次扩增需要用于快速第二次扩增的饲养细胞数量的四分之一、三分之一、十二分之五或二分之一。

[0933] 在一些实施例中，引发第一次扩增中的培养基包含IL-2。在一些实施例中，引发第一次扩增中的培养基包含6000IU/mL IL-2。在一些实施例中，引发第一次扩增中的培养基包含抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，引发第一次扩增中的培养基包含每容器2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，引发第一次扩增中的培养基包含OKT-3。在一些实施例中，培养基包含每容器30ng OKT-3。在一些实施例中，容器为GREX100 MCS烧瓶。在一些实施例中，培养基包含6000IU/mL IL-2、30ng/mL OKT-3和2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，培养基包含每容器6000IU/mL IL-2、30ng/mL OKT-3和2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，培养基包含每容器500mL培养基和15μg OKT-3/2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，培养基包含每容器500mL培养基和15μg OKT-3。

在一些实施例中，容器为GREX100 MCS烧瓶。在一些实施例中，培养基包含500mL培养基、6000IU/mL IL-2、30ng/mL OKT-3和2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，培养基包含每容器500mL培养基、6000IU/mL IL-2、15μg OKT-3和2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，培养基包含每容器500mL培养基和15μg OKT-3/2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。

[0934] 在一实施例中，本文中所描述的引发第一次扩增程序在第二次扩增期间需要相对于TIL 过量的饲养细胞。在许多实施例中，饲养细胞为获自同种异体健康血液供体的标准全血单位的外周血单核细胞(PBMC)。使用标准方法(例如Ficoll-Paque梯度分离)获得PBMC。在一实施例中，使用人造抗原呈递(aAPC)细胞代替PBMC。

[0935] 一般来说，通过辐照或热处理灭活同种异体PBMC，且将其用于本文中所描述的TIL扩增程序，包括图式和实例中描述的示范性程序中。

[0936] 在一实施例中，在引发第一次扩增中使用人造抗原呈递细胞代替PBMC或与PBMC组合。

[0937] 2.细胞因子

[0938] 本文中所描述的扩增方法通常使用具有高剂量的细胞因子(确切地说，IL-2)的培养基，如所属领域中所已知。

[0939] 替代地，另外可能使用细胞因子的组合进行TIL的引发第一次扩增，其中IL-2、IL-15 和IL-21中的两个或更多个的组合是如国际公开第WO 2015/189356号和第WO 2015/189357 号中通常概述，其以全文引用的方式明确地并入本文中。因此，可能的组合包括IL-2和IL-15、IL-2和IL-21、IL-15和IL-21以及IL-2、IL-15和IL-21，后者特别适用于许多实施例中。使用细胞因子的组合特别有利于产生淋巴细胞，且确切地说如本文所描述的T细胞。

[0940] 表20：白细胞介素的氨基酸序列。

[0941]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO:3 重组人类IL-2 (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN RWITFCQSII STLT	60 120 134
SEQ ID NO:4 阿地白介素	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFSQSIIST LT	60 120 132
SEQ ID NO:5 重组人类IL-4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI MREKYSKCSS	60 120 130
SEQ ID NO:6 重组人类IL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH	60 120 153
SEQ ID NO:7 重组人类IL-15 (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS	60 115
SEQ ID NO:8 重组人类IL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ HLSSRTHGSE DS	60 120 132

[0942] C.步骤C：引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变

[0943] 在一些情况下，从引发第一次扩增(其可包括有时称为pre-REP的扩增)获得的块状TIL 群体，包括例如从例如图8(确切地说，例如图8B和/或图8C)中所指示的步骤B获得的TIL 群体，可进行快速第二次扩增(其可包括有时称为快速扩增方案(REP)的扩增)且接着如下文所论述进行冷冻保存。类似地，在基因修饰的TIL将用于疗法的情况下，来自引发第

一次扩增的扩增TIL群体或来自快速第二次扩增的扩增TIL群体可进行基因修饰,以用于扩增步骤之前或引发第一次扩增之后和在快速第二次扩增之前的合适治疗。

[0944] 在一些实施例中,将从引发第一次扩增(例如,从如图1(确切地说,例如图1B和/或图8C)中所指示的步骤B)中获得的TIL存储直到表型选择。在一些实施例中,并不存储从引发第一次扩增(例如,从图1(确切地说,图1B和/或图8C)中所指示的步骤B)获得的 TIL,而是直接进行快速第二次扩增。在一些实施例中,在引发第一次扩增之后并在快速第二次扩增之前,不冷冻保存从引发第一次扩增中获得的TIL。在一些实施例中,在进行肿瘤碎裂和/或起始第一引发扩增步骤后的约2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天进行引发第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中,在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤后的约3天至7天进行引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变。在一些实施例中,在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤后的约3天至8天进行引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变。在一些实施例中,在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤后的约4天至7天进行引发第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中,在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤后的约4天至8天进行引发第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中,在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤后的约5天至7天进行引发第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中,在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤后的约5天至8天进行引发第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中,在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤后的约6天至7天进行引发第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中,在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤后的约6天至8天进行引发第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中,在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤后的约7天至8天进行引发第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中,在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤后的约7天进行引发第一次扩增到第二次扩增的转变。在一些实施例中,在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤后的约8天进行引发第一次扩增到第二次扩增的转变。

[0945] 在一些实施例中,在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤后的1天、2天、3天、4天、 5天、6天、7天或8天进行引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变。在一些实施例中,引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变发生在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤的1天至 7天。在一些实施例中,引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变发生在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤的1天至8天。在一些实施例中,引发第一次扩增到第二次扩增的转变发生在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤的2天至7天。在一些实施例中,引发第一次扩增到第二次扩增的转变发生在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤的2天至8天。在一些实施例中,引发第一次扩增到第二次扩增的转变发生在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤的3 天至7天。在一些实施例中,引发第一次扩增到第二次扩增的转变发生在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤的3天至8天。在一些实施例中,引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变发生在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤的4天至7天。在一些实施例中,引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变发生在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤的4天至8天。在一些实施例中,引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变发生在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤的5天至7天。在一些实施例中,引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变发生在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤的5天至8天。在一些实施例中,引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变发生在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步

骤的6天至7天。在一些实施例中，引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变发生在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤的6天至8天。在一些实施例中，引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变发生在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤的7天至8天。在一些实施例中，引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变发生在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤的7天。在一些实施例中，引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变发生在进行碎裂和/或起始第一引发扩增步骤的8天。

[0946] 在一些实施例中，在初始第一次扩增之后和在快速第二次扩增之前不存储TIL，并且TIL 直接进行快速第二次扩增(举例来说，在一些实施例中，在如图8(确切地说，例如图8B和 /或图8C)中所示的步骤B到步骤D的转变期间不存在存储)。在一些实施例中，如本文所描述，在封闭系统中进行转变。在一些实施例中，来自引发第一次扩增的TIL(第二TIL群体) 直接进行快速第二次扩增，而不具有转变期。

[0947] 在一些实施例中，在封闭系统生物反应器中进行引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变，例如根据图8(确切地说，例如图8B和/或图8C)的步骤C。在一些实施例中，如本文所描述，采用封闭系统进行TIL扩增。在一些实施例中，采用单一生物反应器。在一些实施例中，采用的单一生物反应器为例如GREX-10或GREX-100。在一些实施例中，封闭系统生物反应器为单一生物反应器。在一些实施例中，引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变涉及容器大小的扩大。在一些实施例中，在比快速第二次扩增更小的容器中进行引发第一次扩增。在一些实施例中，在GREX-100中进行引发第一次扩增并且在GREX-500中进行快速第二次扩增。

[0948] D.步骤D:快速第二次扩增

[0949] 在一些实施例中，在采集和引发第一次扩增之后，在步骤A和步骤B，以及称为如图8 (确切地说，例如图8B和/或图8C)中所指示的步骤C的转变之后，TIL细胞群体的数量进一步得到扩增。所述进一步扩增在本文中称为快速第二次扩增，其可包括所属领域中通常称为快速扩增工艺的扩增工艺(快速扩增方案或REP;以及如图8(确切地说，例如图8B)的步骤D中所指示的工艺)。通常在气体可渗透容器中使用包含多种组分(包括饲养细胞、细胞因子源和抗CD3抗体)的培养基来完成快速第二次扩增。在一些实施例中，在起始快速第二次扩增后的1天、2天、3天或4天(即，在整个Gen 3工艺的第8天、第9天、第10天或第11天)，将TIL转移到较大体积容器。

[0950] 在一些实施例中，TIL的快速第二次扩增(其可以包括有时称为REP的扩增;以及如图 1(确切地说，例如图1B和/或图8C)的步骤D中所指示的工艺)可以使用所属领域的技术人员已知的任何TIL烧瓶或容器来进行。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约1天至约9天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约1天至约10天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约2天至约9天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约2天至约10天。在一些实施例中，第二次 TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约3天至约9天。在一些实施例中，第二次TIL 扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约3天至约10天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约4天至约9天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之

后进行约4天至约10天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约5天至约9天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约5天至约10天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约6天至约9天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约6天至约10天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约7天至约9天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约7天至约10天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约 8天至约9天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约8天至约10天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约9天至约 10天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约1天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约2天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约3天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约4天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约5天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约6天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约7天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约8天。在一些实施例中，第二次TIL扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约9天。在一些实施例中，第二次TIL 扩增可在起始快速第二次扩增之后进行约10天。

[0951] 在一实施例中，可以使用本公开的方法(包括例如称为REP的扩增;以及如图8(确切地说，例如图8B和/或图8C)的步骤D中所指示的工艺)在气体可渗透容器中进行快速第二次扩增。在一些实施例中，在快速第二次扩增中在IL-2、OKT-3和饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”)的存在下扩增TIL。在一些实施例中，在快速第二扩增中在IL-2、OKT-3 和饲养细胞的存在下扩增TIL，其中将饲养细胞添加到存在于引发第一次扩增中的饲养细胞的两倍、2.4倍、2.5倍、3倍、3.5倍或4倍浓度的最终浓度。举例来说，可以在存在白细胞介素-2(IL-2)或白细胞介素-15(IL-15)的情况下使用非特异性T细胞受体刺激迅速地扩增TIL。非特异性T细胞受体刺激可以包括例如抗CD3抗体，例如约30ng/ml的OKT3，一种小鼠单克隆抗CD3抗体(可商购自新泽西州拉里坦的Ortho-McNeil或加利福尼亚州奥本的美天旎生物技术公司)或UHCT-1(可商购自美国加利福尼亚州圣地亚哥的BioLegend)。通过在第二次扩增期间包括癌症的一种或多种抗原，包括其抗原部分，例如一个或多个表位，可以扩增TIL以在活体外诱导TIL的进一步刺激，任选地在存在T细胞生长因子(例如300IU/mL IL-2或IL-15)的情况下，所述抗原能够任选地由载体，例如人类白细胞抗原A2(HLA-A2) 结合肽，例如0.3μM MART-1:26-35(27L)或gpl 00:209-217(210M)表达。其它合适的抗原可以包括例如NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶癌症抗原、MAGE-A3、SSX-2和VEGFR2，或其抗原部分。还可以通过用在表达HLA-A2的抗原呈递细胞上进行脉冲的相同癌症抗原再刺激，迅速地扩增TIL。替代地，可以用例如实例辐照的自体淋巴细胞或用辐照的HLA-A2+ 同种异体淋巴细胞和IL-2进一步再刺激TIL。在一些实施例中，再刺激作为第二次扩增的一部分来进行。在一些实施例中，在辐照的自体淋巴细胞的存在下或在辐照的HLA-A2+同种异体淋巴细胞和IL-2的情况下进行第二次扩增。

[0952] 在一实施例中，细胞培养基进一步包含IL-2。在一些实施例中，细胞培养基包含约

3000 IU/mL IL-2。在一实施例中，细胞培养基包含约1000IU/mL、约1500IU/mL、约2000IU/mL、约2500IU/mL、约3000IU/mL、约3500IU/mL、约4000IU/mL、约4500IU/mL、约5000IU/mL、约5500IU/mL、约6000IU/mL、约6500IU/mL、约7000IU/mL、约7500IU/mL或约8000IU/mL IL-2。在一实施例中，细胞培养基包含在1000与2000IU/mL之间、在2000与3000IU/mL 之间、在3000与4000IU/mL之间、在4000与5000IU/mL之间、在5000与6000IU/mL之间、在6000与7000IU/mL之间、在7000与8000IU/mL之间或在8000IU/mL之间的IL-2。

[0953] 在一实施例中，细胞培养基包含OKT-3抗体。在一些实施例中，细胞培养基包含约30 ng/mL OKT-3抗体。在一实施例中，细胞培养基包含约0.1ng/mL、约0.5ng/mL、约1ng/mL、约2.5ng/mL、约5ng/mL、约7.5ng/mL、约10ng/mL、约15ng/mL、约20ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200ng/mL、约500ng/mL和约1μg/mL OKT-3抗体。在一实施例中，细胞培养基包含在0.1ng/mL与1ng/mL之间、在1ng/mL与5ng/mL之间、在5ng/mL 与10ng/mL之间、在10ng/mL与20ng/mL之间、在20ng/mL与30ng/mL之间、在30ng/mL 与40ng/mL之间、在40ng/mL与50ng/mL之间和在50ng/mL与100ng/mL之间的OKT-3 抗体。在一实施例中，细胞培养基包含15ng/ml与30ng/mL之间的OKT-3抗体。在一实施例中，细胞培养基包含30ng/ml与60ng/mL之间的OKT-3抗体。在一实施例中，细胞培养基包含约30ng/mL OKT-3。在一实施例中，细胞培养基包含约60ng/mL OKT-3。在一些实施例中，OKT-3抗体为莫罗单抗。

[0954] 在一些实施例中，快速第二次扩增中的培养基包含IL-2。在一些实施例中，培养基包含 6000IU/mL IL-2。在一些实施例中，快速第二次扩增中的培养基包含抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，快速第二次扩增中的培养基包含每容器7.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，快速第二次扩增中的培养基包含OKT-3。在一些实施例中，快速第二次扩增中的培养基包含每容器500mL培养基和30μg OKT-3。在一些实施例中，容器为GREX100 MCS 烧瓶。在一些实施例中，快速第二次扩增中的培养基中包含6000IU/mL IL-2、60ng/mL OKT-3 和7.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，培养基包含每容器500mL培养基和6000 IU/mL IL-2、30μg OKT-3以及7.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。

[0955] 在一些实施例中，快速第二次扩增中的培养基包含IL-2。在一些实施例中，培养基包含 6000IU/mL IL-2。在一些实施例中，快速第二次扩增中的培养基包含抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，培养基包含每容器5×10^8个与7.5×10^8个之间的抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，快速第二次扩增中的培养基包含OKT-3。在一些实施例中，快速第二次扩增中的培养基包含每容器500mL培养基和30μg OKT-3。在一些实施例中，容器为GREX100 MCS烧瓶。在一些实施例中，快速第二次扩增中的培养基包含6000IU/mL IL-2、60ng/mL OKT-3和 5×10^8个与7.5×10^8个之间的抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，快速第二次扩增中的培养基包含每容器500mL培养基和6000IU/mL IL-2、30μg OKT-3以及5×10^8个与7.5×10^8个之间的抗原呈递饲养细胞。

[0956] 在一些实施例中，细胞培养基包含含有一种或多种TNFRSF激动剂的细胞培养基。在一些实施例中，TNFRSF激动剂包含4-1BB激动剂。在一些实施例中，TNFRSF激动剂为4-1BB激动剂，并且4-1BB激动剂是选自以下组成的组：乌瑞鲁单抗、乌托米单抗、EU-101、融合蛋白，以及其片段、衍生物、变体、生物类似物及组合。在一些实施例中，以足以在细胞培养基中达到0.1μg/mL与100μg/mL之间的浓度的浓度添加TNFRSF激动剂。在一些实施例中，以足

以在细胞培养基中达到20μg/mL与40μg/mL之间的浓度的浓度添加TNFRSF激动剂。

[0957] 在一些实施例中,除了一种或多种TNFRSF激动剂之外,细胞培养基进一步包含起始浓度为约3000IU/mL的IL-2和起始浓度为约30ng/mL的OKT-3抗体,且其中一种或多种TNFRSF激动剂包含4-1BB激动剂。

[0958] 在一些实施例中,在第二次扩增期间,以组合的形式采用IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21 的组合。在一些实施例中,在第二次扩增期间,包括例如在根据图8(确切地说,例如图8B 和/或图8C)的步骤D工艺期间,以及如本文所描述,可以包括IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21 以及其任何组合。在一些实施例中,在第二次扩增期间,以组合形式采用IL-2、IL-15和IL-21 的组合。在一些实施例中,在根据图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)的步骤D工艺期间并且如本文所描述,可以包括IL-2、IL-15和IL-21以及其任何组合。

[0959] 在一些实施例中,可以在包含IL-2、OKT-3、抗原呈递饲养细胞和任选的TNFRSF激动剂的补充细胞培养基中进行第二次扩增。在一些实施例中,在补充细胞培养基中进行第二次扩增。在一些实施例中,补充细胞培养基包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中,第二细胞培养基包含IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC;也称为抗原呈递饲养细胞)。在一些实施例中,在包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞(即,抗原呈递细胞)的细胞培养基中进行第二次扩增。

[0960] 在一些实施例中,第二次扩增培养基包含约500IU/mL IL-15、约400IU/mL IL-15、约 300IU/mL IL-15、约200IU/mL IL-15、约180IU/mL IL-15、约160IU/mL IL-15、约140IU/mL IL-15、约120IU/mL IL-15或约100IU/mL IL-15。在一些实施例中,第二次扩增培养基包含约500IU/mL IL-15至约100IU/mL IL-15。在一些实施例中,第二次扩增培养基包含约400IU/mL IL-15至约100IU/mL IL-15。在一些实施例中,第二次扩增培养基包含约300IU/mL IL-15至约100IU/mL IL-15。在一些实施例中,第二次扩增培养基包含约200IU/mL IL-15。在一些实施例中,细胞培养基包含约180IU/mL IL-15。在一实施例中,细胞培养基进一步包含IL-15。在一优选实施例中,细胞培养基包含约180IU/mL IL-15。

[0961] 在一些实施例中,第二次扩增培养基包含约20IU/mL IL-21、约15IU/mL IL-21、约12 IU/mL IL-21、约10IU/mL IL-21、约5IU/mL IL-21、约4IU/mL IL-21、约3IU/mL IL-21、约 2IU/mL IL-21、约1IU/mL IL-21或约0.5IU/mL IL-21。在一些实施例中,第二次扩增培养基包含约20IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施例中,第二次扩增培养基包含约15 IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施例中,第二次扩增培养基包含约12IU/mL IL-21 至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施例中,第二次扩增培养基包含约10IU/mL IL-21至约0.5 IU/mL IL-21。在一些实施例中,第二次扩增培养基包含约5IU/mL IL-21至约1IU/mL IL-21。在一些实施例中,第二次扩增培养基包含约2IU/mL IL-21。在一些实施例中,细胞培养基包含约1IU/mL IL-21。在一些实施例中,细胞培养基包含约0.5IU/mL IL-21。在一实施例中,细胞培养基进一步包含IL-21。在一优选实施例中,细胞培养基包含约1IU/mL IL-21。

[0962] 在一些实施例中,抗原呈递饲养细胞(APC)为PBMC。在一实施例中,快速扩增和/或第二次扩增中的TIL与PBMC和/或抗原呈递细胞的比率为1比10、约1比15、约1比20、约1比25、约1比30、约1比35、约1比40、约1比45、约1比50、约1比75、约1比 100、约1比125、约1比150、约1比175、约1比200、约1比225、约1比250、约1比 275、约1比300、约1比325、约1比350、

约1比375、约1比400或约1比500。在一实施例中，快速扩增和/或第二次扩增中的TIL与PBMC的比率是在1比50与1比300之间。在一实施例中，快速扩增和/或第二次扩增中的TIL与PBMC的比率是在1比100与1比200 之间。

[0963] 在一实施例中，在烧瓶中进行REP和/或快速第二次扩增，其中将块状TIL在150ml培养基中与100倍或200倍过量的灭活饲养细胞、30ng/mL OKT3抗CD3抗体和6000IU/mL IL-2 混合，其中饲养细胞浓度为引发第一次扩增中的饲养细胞浓度的至少1.1倍(1.1×)、1.2×、1.3×、1.4×、1.5×、1.6×、1.7×、1.8×、1.8×、2×、2.1×2.2×、2.3×、2.4×、2.5×、2.6×、2.7×、2.8×、2.9×、3.0×、3.1×、3.2×、3.3×、3.4×、3.5×、3.6×、3.7×、3.8×、3.9×或4.0×。进行培养基更换(通常通过抽吸2/3用过的培养基且用具有相等体积的新鲜培养基替代来更换2/3 培养基)直到将细胞转移至替代的生长室中。替代的生长室包括G-REX烧瓶和气体可渗透容器，如下文更充分地论述。

[0964] 在一些实施例中，快速第二次扩增(其可以包括称为REP工艺的工艺)为7至9天，如实例和图式中所论述。在一些实施例中，第二次扩增为7天。在一些实施例中，第二次扩增为8天。在一些实施例中，第二次扩增为9天。

[0965] 在一实施例中，可以在具有100cm气体可渗透硅胶底部的500mL容量的气体可渗透烧瓶(G-Rex 100，可商购自美国明尼苏达州新布莱顿的威尔森沃尔夫制造公司)中进行第二次扩增(其可以包括称为REP的扩增，以及图8(确切地说，例如图8B和/或图8C)的步骤D中涉及的那些)，可以将5×10^6或10×10^6个TIL与PBMC一起培养在补充有5％人类AB血清、3000IU/mL IL-2和30ng/ml抗CD3(OKT3)的400mL 50/50培养基中。可以在37℃/5％CO_2下培育G-Rex 100烧瓶。在第5天，可以去除250mL上清液并将其放置到离心瓶中且以1500 rpm(491×g)离心10分钟。可以用具有5％人类AB血清、6000IU/mL IL-2的150mL新鲜培养基重新悬浮TIL沉淀，并且将其添加回最初的GREX-100烧瓶中。当TIL在GREX-100 烧瓶中连续扩增时，在第10天或第11天，可将TIL移动到较大烧瓶，例如GREX-500。可以在培养的第14天采集细胞。可以在培养的第15天采集细胞。可以在培养的第16天采集细胞。在一些实施例中，进行培养基更换直到将细胞转移到替代的生长室中。在一些实施例中，通过抽吸用过的培养基且用相等体积的新鲜培养基替代来更换2/3的培养基。在一些实施例中，替代的生长室包括GREX烧瓶和气体可渗透容器，如下文更充分地论述。

[0966] 在一些实施例中，本文所公开的扩增工艺中使用的培养基为无血清培养基或确定成分培养基。在一些实施例中，无血清或确定成分培养基包含基底细胞培养基和血清补充剂和/或血清替代物。在一些实施例中，无血清或确定成分培养基用于预防和/或减少部分由于含血清培养基的批次间变化而引起的实验变化。

[0967] 在一些实施例中，无血清或确定成分培养基包含基底细胞培养基和血清补充剂和/或血清替代物。在一些实施例中，基底细胞培养基包括(但不限于)CCTS™ OpTmizer™ T细胞扩增基础培养基、CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM、CTS™AIM-V培养基、CTS™AIM-V SFM、LymphoONE™ T细胞扩增无异种培养基、杜尔贝科氏改良伊格尔氏培养基(DMEM)、最小必需培养基(MEM)、伊格尔氏基础培养基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必需培养基(αMEM)、格拉斯哥氏最小必需培养基(G-MEM)、RPMI生长培养基和伊思考夫改良杜尔贝可培养基。

[0968] 在一些实施例中，血清补充剂或血清替代物包括(但不限于)以下中的一种或多

种:CTS™ OpTmizer T细胞扩增血清补充剂、CTS™免疫细胞血清替代物、一种或多种白蛋白或白蛋白替代品、一种或多种氨基酸、一种或多种维生素、一种或多种转铁蛋白或转铁蛋白替代品、一种或多种抗氧化剂、一种或多种胰岛素或胰岛素替代品、一种或多种胶原蛋白前体、一种或多种抗生素和一种或多种微量元素。在一些实施例中,确定成分培养基包含白蛋白和一种或多种选自由以下组成的组的成分:甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、硫胺素、还原型谷胱甘肽、L-抗坏血酸-2-磷酸酯、铁饱和转铁蛋白、胰岛素以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+}和Zr^{4+}的化合物。在一些实施例中,确定成分培养基进一步包含L-谷氨酰胺、碳酸氢钠和/或2-巯基乙醇。

[0969] 在一些实施例中,CTS™ OpTmizer™ T细胞免疫细胞血清替代物用于常规生长培养基,包括(但不限于)CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增基础培养基、CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增 SFM、CTS™AIM-V培养基、CST™AIM-V SFM、LymphoONE™ T细胞扩增无异种培养基、杜尔贝科氏改良伊格尔氏培养基(DMEM)、最小必需培养基(MEM)、伊格尔氏基础培养基 (BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必需培养基(αMEM)、格拉斯哥氏最小必需培养基 (G-MEM)、RPMI生长培养基和伊思考夫改良杜尔贝可培养基。

[0970] 在一些实施例中,无血清或确定成分培养基中的总血清替代物浓度(体积%)为总无血清或确定成分培养基的约1体积%、2体积%、3体积%、4体积%、5体积%、6体积%、7体积%、8体积%、9体积%、10体积%、11体积%、12体积%、13体积%、14体积%、15体积%、16体积%、17体积%、18体积%、19体积%或20体积%。在一些实施例中,总血清替代物浓度为无血清或确定成分培养基的总体积的约3%。在一些实施例中,总血清替代物浓度为无血清或确定成分培养基的总体积的约5%。在一些实施例中,总血清替代物浓度为无血清或确定成分培养基的总体积的约10%。

[0971] 在一些实施例中,无血清或确定成分培养基为CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM(赛默飞世尔科学)。CTS™ OpTmizer™的任何调配物适用于本发明。CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM为在使用前混合在一起的1L CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增基础培养基和26mL CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增补充剂的组合。在一些实施例中,CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)以及55mM的 2-巯基乙醇。

[0972] 在一些实施例中,确定成分培养基为CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM(赛默飞世尔科学)。CTS™ OpTmizer™的任何调配物适用于本发明。CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM为在使用前混合在一起的1L CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增基础培养基和26mL CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增补充剂的组合。在一些实施例中,CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)以及55mM的2-巯基乙醇。在一些实施例中,CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)、55mM 2-巯基乙醇和2mM L-谷氨酰胺。在一些实施例中,CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR) (赛默飞世尔科学)、55mM 2-巯基乙醇和2mM L-谷氨酰胺,且进一步包含约1000IU/mL至约8000IU/mL IL-2。在一些实施例中,CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的 CTS™免疫细胞血清

替代物(SR)(赛默飞世尔科学)、55mM 2-巯基乙醇和2mM L-谷氨酰胺,且进一步包含约3000IU/mL IL-2。在一些实施例中,CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM 补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)、55mM 2-巯基乙醇和2 mM L-谷氨酰胺,且进一步包含约6000IU/mL IL-2。在一些实施例中,CTS™OpTmizer™ T 细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)和55mM 2-巯基乙醇,且进一步包含约1000IU/mL至约8000IU/mL IL-2。在一些实施例中, CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)和55mM 2-巯基乙醇,且进一步包含约3000IU/mL IL-2。在一些实施例中, CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)和55mM 2-巯基乙醇,且进一步包含约1000IU/mL至约6000IU/mL IL-2。在一些实施例中,CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)和约2mM谷氨酰胺,且进一步包含约1000IU/mL至约8000IU/mL IL-2。在一些实施例中,CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)和约2mM谷氨酰胺,且进一步包含约3000IU/mL IL-2。在一些实施例中,CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM补充有约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科学)和约2mM谷氨酰胺,且进一步包含约6000IU/mL IL-2。

[0973] 在一些实施例中,无血清培养基或确定成分培养基补充有浓度为约0.1mM至约10mM、0.5mM至约9mM、1mM至约8mM、2mM至约7mM、3mM至约6mM或4mM至约5mM 的谷氨酰胺(即,GlutaMAX®)。在一些实施例中,无血清培养基或确定成分培养基补充有浓度为约2mM的谷氨酰胺(即,GlutaMAX®)。

[0974] 在一些实施例中,无血清培养基或确定成分培养基补充有浓度为约5mM至约150mM、 10mM至约140mM、15mM至约130mM、20mM至约120mM、25mM至约110mM、30 mM至约100mM、35mM至约95mM、40mM至约90mM、45mM至约85mM、50mM 至约80mM、55mM至约75mM、60mM至约70mM或约65mM的2-巯基乙醇。在一些实施例中,无血清培养基或确定成分培养基补充有浓度为约55mM的2-巯基乙醇。

[0975] 在一些实施例中,国际PCT公开第WO/1998/030679号(其以引用的方式并入本文中) 中描述的确定成分培养基适用于本发明。在所述公开中,描述了无血清真核细胞培养基。无血清的真核细胞培养基包括补充有能够支持细胞在无血清培养物中生长的无血清补充剂的基底细胞培养基。无血清真核细胞培养基补充剂包含或通过将一种或多种选自由以下组成的组的成分组合来获得:一种或多种白蛋白或白蛋白替代品、一种或多种氨基酸、一种或多种维生素、一种或多种转铁蛋白或转铁蛋白替代品、一或多种抗氧化剂、一种或多种胰岛素或胰岛素替代品、一种或多种胶原蛋白前体、一种或多种微量元素和一种或多种抗生素。在一些实施例中,确定成分培养基进一步包含L-谷氨酰胺、碳酸氢钠和/或β-巯基乙醇。在一些实施例中,确定成分培养基包含白蛋白或白蛋白替代品以及一种或多种选自由以下组成的组的成分:一种或多种氨基酸、一种或多种维生素、一种或多种转铁蛋白或转铁蛋白替代品、一种或多种抗氧化剂、一种或多种胰岛素或胰岛素替代品、一种或多种胶原蛋白前体和一种或多种微量元素。在一些实施例中,确定成分培养基包含白蛋白和一种或多种选自由以下组成的组的成分:甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、硫胺素、还原

型谷胱甘肽、L-抗坏血酸-2-磷酸酯、铁饱和转铁蛋白、胰岛素以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+}和Zr^{4+}的化合物。在一些实施例中，基底细胞培养基选自以下组成的组：杜尔贝科氏改良伊格尔氏培养基(DMEM)、最小必需培养基(MEM)、伊格尔氏基础培养基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必需培养基(αMEM)、格拉斯哥氏最小必需培养基(G-MEM)、RPMI生长培养基和伊思考夫改良杜尔贝可培养基。

[0976] 在一些实施例中，在确定成分培养基中甘氨酸的浓度在约5-200mg/L范围内，L-组氨酸的浓度为约5-250mg/L，L-异亮氨酸的浓度为约5-300mg/L，L-甲硫氨酸的浓度为约5-200 mg/L，L-苯丙氨酸的浓度为约5-400mg/L，L-脯氨酸的浓度为约1-1000mg/L，L-羟脯氨酸的浓度为约1-45mg/L，L-丝氨酸的浓度为约1-250mg/L，L-苏氨酸的浓度为约10-500mg/L，L-色氨酸的浓度为约2-110mg/L，L-酪氨酸的浓度为约3-175mg/L，L-缬氨酸的浓度为约5-500 mg/L，硫胺素的浓度为约1-20mg/L，还原型谷胱甘肽的浓度为约1-20mg/L，L-抗坏血酸-2- 磷酸酯的浓度为约1-200mg/L，铁饱和转铁蛋白的浓度为约1-50mg/L，胰岛素的浓度为约 1-100mg/L，亚硒酸钠的浓度为约0.000001-0.0001mg/L，并且白蛋白(例如，AlbuMAX®I) 的浓度为约5000-50,000mg/L。

[0977] 在一些实施例中，确定成分培养基中的非痕量元素部分成分是以下表A中标题“1×培养基中的浓度范围”下的列中所列出的浓度范围存在。在其它实施例中，确定成分培养基中的非痕量元素部分成分是以下表A中标题“1×培养基的优选实施例”下的列中所列出的最终浓度存在。在其它实施例中，确定成分培养基为包含无血清补充剂的基底细胞培养基。在这些实施例中的一些中，无血清补充剂包含具有以下类型且呈下表A中标题“补充剂的优选实施例”下的列中所列出的浓度的非痕量元素部分成分。

[0978] 表A：非痕量元素部分成分的浓度

[0979]

成分	补充剂的优选实施例（mg/L）（约）	1×培养基中的浓度范围（mg/L）（约）	1×培养基中的优选实施例（mg/L）（约）
甘氨酸	150	5-200	53
L-组氨酸	940	5-250	183
L-异亮氨酸	3400	5-300	615
L-甲硫氨酸	90	5-200	44
L-苯丙氨酸	1800	5-400	336
L-脯氨酸	4000	1-1000	600
L-羟脯氨酸	100	1-45	15
L-丝氨酸	800	1-250	162
L-苏氨酸	2200	10-500	425
L-色氨酸	440	2-110	82
L-酪氨酸	77	3-175	84
L-缬氨酸	2400	5-500	454
硫胺素	33	1-20	9
还原型谷胱甘肽	10	1-20	1.5
抗坏血酸-2-PO_4(镁盐)	330	1-200	50
转铁蛋白（铁饱和）	55	1-50	8
胰岛素	100	1-100	10
亚硒酸钠	0.07	0.000001-0.0001	0.00001
AlbuMAX®I	83,000	5000-50,000	12,500

[0980] 在一些实施例中，确定成分培养基的容积渗透浓度在约260与350mOsmol之间。在一些实施例中，容积渗透浓度在约280与310mOsmol之间。在一些实施例中，确定成分培养基补充有最多约3.7g/L或约2.2g/L碳酸氢钠。确定成分培养基可以进一步补充有L-谷氨酰胺(最终浓度为约2mM)、一种或多种抗生素、非必需氨基酸(NEAA;最终浓度为约100μM)、2-巯基乙醇(最终浓度为约100μM)。

[0981] 在一些实施例中，Smith等人，“《使用新型无异种CTS免疫细胞血清替代物离体扩增用于过继免疫治疗的人类T细胞》，”《临床转化免疫学》，4(1)2015(数字对象标识符：10.1038/cti.2014.31)中描述的确定成分培养基适用于本发明。简单来说，RPMI或CTS™ OpTmizer™用作基底细胞培养基，且补充有0、2％、5％或10％CTS™免疫细胞血清替代物。

[0982] 在一实施例中，第一和/或第二气体可渗透容器中的细胞培养基并未过滤。使用未过滤的细胞培养基可以简化扩增细胞数量必需的程序。在一实施例中，第一和/或第二气体可渗透容器中的细胞培养基不含β-巯基乙醇(BME或βME;也称为2-巯基乙醇，CAS 60-24-2)。

[0983] 在一实施例中，进行快速第二次扩增(包括称为REP的扩增)并进一步包含其中选择TIL以获得优良的肿瘤反应性的步骤。可以使用所属领域中已知的任何选择方法。举例来说，美国专利申请公开第2016/0010058 A1号(其公开内容以引用的方式并入本文中)中描述的方法可用于选择具有优良肿瘤反应性的TIL。

[0984] 任选地，可在快速第二次扩增(包括称为REP扩增的扩增)之后使用所属领域中已知的标准分析来进行细胞存活率分析。举例来说，可对具有块状TIL的样品进行锥虫蓝排除分析，其选择性地标记死细胞且进行存活率评估。在一些实施例中，可以使用Cellometer K2自动化细胞计数器(马萨诸塞州劳伦斯市的Nexcelom Bioscience)对TIL样品进行计数和存活率测定。在一些实施例中，根据标准Cellometer K2图像细胞仪自动细胞计数器方案确定存活率。

[0985] T淋巴细胞和B淋巴细胞的多种抗原受体是通过有限但大量的基因片段的体细胞重组产生的。这些基因片段:V(可变)、D(多样性)、J(连接)和C(恒定)确定免疫球蛋白与T细胞受体(TCR)的结合特异性和下游应用。本发明提供一种用于产生TIL的方法，所述TIL展现并且增加T细胞库多样性。在一些实施例中，通过本发明方法获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中，第二次扩增中获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中，多样性的增加是免疫球蛋白多样性和/或T细胞受体多样性的增加。在一些实施例中，免疫球蛋白的多样性是在免疫球蛋白重链中。在一些实施例中，免疫球蛋白的多样性是在免疫球蛋白轻链中。在一些实施例中，多样性是在T细胞受体中。在一些实施例中，多样性是在选自以下组成的组的一种T细胞受体中:α、β、γ和δ受体。在一些实施例中，T 细胞受体(TCR)α和/或β的表达增加。在一些实施例中，T细胞受体(TCR)α的表达增加。在一些实施例中，T细胞受体(TCR)β的表达增加。在一些实施例中，TCRab(即，TCRα/β) 的表达增加。

[0986] 在一些实施例中，快速第二次扩增培养基(例如，有时称为CM2或第二细胞培养基)包含IL-2、OKT-3以及抗原呈递饲养细胞(APC)，如下文更详细地论述。在一些实施例中，快速第二次扩增培养基(例如，有时称为CM2或第二细胞培养基)包含6000IU/mL IL-2、30 微克/烧瓶OKT-3以及7.5×10^8个抗原呈递饲养细胞(APC)，如下文更详细地论述。在一些实施例中，快速第二次扩增培养基(例如，有时称为CM2或第二细胞培养基)包含IL-2、OKT-3以

及抗原呈递饲养细胞(APC),如下文更详细地论述。在一些实施例中,快速第二次扩增培养基(例如,有时称为CM2或第二细胞培养基)包含6000IU/mL IL-2、30微克/烧瓶 OKT-3以及5×10^8个抗原呈递饲养细胞(APC),如下文更详细地论述。

[0987] 在一些实施例中,在封闭系统生物反应器中进行快速第二次扩增,例如根据图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)的步骤D。在一些实施例中,如本文所描述,采用封闭系统进行TIL扩增。在一些实施例中,采用生物反应器。在一些实施例中,生物反应器用作容器。在一些实施例中,采用的生物反应器为例如G-REX-100或G-REX-500。在一些实施例中,采用的生物反应器为G-REX-100。在一些实施例中,采用的生物反应器为G-REX-500。

[0988] 1.饲养细胞和抗原呈递细胞

[0989] 在一实施例中,本文所描述的快速第二次扩增程序(例如,包括例如图8(确切地说,例如图8B和/或图8C)的步骤D中描述的那些扩增,以及称为REP的那些扩增)在REP TIL扩增期间和/或在快速第二次扩增期间需要过量的饲养细胞。在许多实施例中,饲养细胞为获自健康血液供体的标准全血单位的外周血单核细胞(PBMC)。使用标准方法(例如Ficoll-Paque 梯度分离)获得PBMC。

[0990] 一般来说,通过辐照或热处理灭活同种异体PBMC,且将其用于REP程序中,如实例中所描述,其提供一种用于评估辐照的同种异体PBMC的复制不胜任的示范性方案。

[0991] 在一些实施例中,如果第7天或第14天的活细胞总数小于REP第0天和/或第二次扩增第0天(即,第二次扩增开始当天)置于培养物中的初始活细胞数量,那么认为PBMC为复制不胜任的且认可用于本文中所描述的TIL扩增程序中。

[0992] 在一些实施例中,如果在OKT3和IL-2的存在下培养,第7天和第14天的活细胞总数相比于在REP第0天和/或第二次扩增第0天(即,第二次扩增开始当天)置于培养物中的初始活细胞数量并未增加,那么认为PBMC为复制不胜任的且认可用于本文中所描述的TIL扩增程序中。在一些实施例中,在存在30ng/ml OKT3抗体和3000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中,在存在60ng/ml OKT3抗体和6000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中,在存在60ng/ml OKT3抗体和3000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中,在存在30ng/ml OKT3抗体和6000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。

[0993] 在一些实施例中,如果在OKT3和IL-2的存在下培养,第7天和第14天的活细胞总数相比于在REP第0天和/或第二次扩增第0天(即,第二次扩增开始当天)置于培养物中的初始活细胞数量并未增加,那么认为PBMC为复制不胜任的且认可用于本文中所描述的TIL扩增程序中。在一些实施例中,在存在30-60ng/ml OKT3抗体和1000-6000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中,在存在30-60ng/ml OKT3抗体和2000-5000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中,在存在30-60ng/ml OKT3抗体和2000-4000IU/ml IL-2 的情况下培养PBMC。在一些实施例中,在存在30-60ng/ml OKT3抗体和2500-3500IU/ml IL-2 的情况下培养PBMC。在一些实施例中,在存在30-60ng/ml OKT3抗体和6000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。

[0994] 在一些实施例中,抗原呈递饲养细胞为PBMC。在一些实施例中,抗原呈递饲养细胞为人造抗原呈递饲养细胞。在一实施例中,第二次扩增中的TIL与抗原呈递饲养细胞的比率为约1比10、约1比25、约1比50、约1比100、约1比125、约1比150、约1比175、约1 比200、约1比225、约1比250、约1比275、约1比300、约1比325、约1比350、约1 比375、约1比400或约1比

500。在一实施例中，第二次扩增中的TIL与抗原呈递饲养细胞的比率在1比50与1比300之间。在一实施例中，第二次扩增中的TIL与抗原呈递饲养细胞的比率在1比100与1比200之间。

[0995] 在一实施例中，本文所描述的第二次扩增程序需要约5×10^8个饲养细胞与约100×10^6个 TIL的比率。在一实施例中，本文所描述的第二次扩增程序需要约7.5×10^8个饲养细胞与约 100×10^6个TIL的比率。在另一实施例中，本文所描述的第二次扩增程序需要约5×10^8个饲养细胞与约50×10^6个TIL的比率。在另一实施例中，本文所描述的第二次扩增程序需要约 7.5×10^8个饲养细胞与约50×10^6个TIL的比率。在又一实施例中，本文所描述的第二次扩增程序需要约5×10^8个饲养细胞与约25×10^6个TIL。在又一实施例中，本文所描述的第二次扩增程序需要约7.5×10^8个饲养细胞与约25×10^6个TIL。在又一实施例中，快速第二次扩增需要的饲养细胞数量是快速第二次扩增的两倍。在又一实施例中，当本文所描述的引发第一次扩增需要约2.5×10^8个饲养细胞时，快速第二次扩增需要约5×10^8个饲养细胞。在又一实施例中，当本文所描述的引发第一次扩增需要约2.5×10^8个饲养细胞时，快速第二次扩增需要约 7.5×10^8个饲养细胞。在又一实施例中，快速第二次扩增需要的饲养细胞数量是引发第一次扩增的两倍（2.0×）、2.5×、3.0×、3.5×或4.0×。

[0996] 在一实施例中，本文所描述的快速第二次扩增程序在快速第二次扩增期间需要过量的饲养细胞。在许多实施例中，饲养细胞为获自同种异体健康血液供体的标准全血单位的外周血单核细胞(PBMC)。使用标准方法(例如Ficoll-Paque梯度分离)获得PBMC。在一实施例中，使用人造抗原呈递(aAPC)细胞代替PBMC。在一些实施例中，将PBMC以添加到引发第一次扩增中的PBMC的两倍浓度添加到快速第二次扩增中。

[0997] 一般来说，通过辐照或热处理灭活同种异体PBMC，且将其用于本文中所描述的TIL扩增程序，包括图式和实例中描述的示范性程序中。

[0998] 在一实施例中，在快速第二次扩增中使用人造抗原呈递细胞代替PBMC或与PBMC组合。

[0999] 2.细胞因子

[1000] 本文所描述的快速第二次扩增方法通常使用具有高剂量的细胞因子(确切地说，IL-2) 的培养基，如所属领域中所已知。

[1001] 替代地，另外可能使用细胞因子的组合进行TIL的快速第二次扩增，其中IL-2、IL-15 和IL-21中的两个或更多个的组合是如WO 2015/189356和WO 2015/189357中通常概述，其以全文引用的方式明确地并入本文中。因此，可能的组合包括IL-2和IL-15、IL-2和IL-21、 IL-15和IL-21以及IL-2、IL-15和IL-21，后者特别适用于许多实施例中。使用细胞因子的组合特别有利于产生淋巴细胞，且确切地说如本文所描述的T细胞。

[1002] E.步骤E:采集TIL

[1003] 在快速第二次扩增步骤之后，可以采集细胞。在一些实施例中，在例如图8(确切地说，例如图8B和/或图8C)中所提供的一个、两个、三个、四个或更多个扩增步骤之后采集TIL。在一些实施例中，在例如图8(确切地说，图8B和/或图8C)中所提供的两个扩增步骤之后采集TIL。在一些实施例中，在例如图8(确切地说，例如图8B和/或图8C)中所提供的两个扩增步骤(一个引发第一次扩增和一个快速第二次扩增)之后采集TIL。

[1004] 可以任何适当且无菌的方式，包括例如通过离心来采集TIL。用于TIL采集的方法

为所属领域中众所周知的并且任何这类已知的方法可用于本发明方法。在一些实施例中，使用自动化系统采集TIL。

[1005] 细胞采集器和/或细胞处理系统可商购自多个来源，包括例如Fresenius Kabi、Tomtec Life Science、珀金埃尔默公司和Inotech Biosystems国际公司。任何基于细胞的采集器均可用于本发明方法。在一些实施例中，细胞采集器和/或细胞处理系统为基于膜的细胞采集器。在一些实施例中，通过细胞处理系统，例如LOVO系统(由Fresenius Kabi制造)进行细胞采集。术语“LOVO细胞处理系统”也指由任何供应商制造的在无菌和/或封闭系统环境中可以将包含细胞的溶液泵送至膜或滤波器(例如旋转膜或旋转过滤器)，允许连续流动并进行细胞处理以在没有沉淀的情况下去除上清液或细胞培养基的任何仪器或装置。在一些实施例中，细胞采集器和/或细胞处理系统可以在封闭无菌的系统中进行细胞分离、洗涤、流体交换、浓缩和 /或其它细胞处理步骤。

[1006] 在一些实施例中，在封闭系统生物反应器中进行快速第二次扩增，例如根据图8(确切地说，例如图8B和/或图8C)的步骤D。在一些实施例中，如本文所描述，采用封闭系统进行TIL扩增。在一些实施例中，采用生物反应器。在一些实施例中，生物反应器用作容器。在一些实施例中，采用的生物反应器为例如G-REX-100或G-REX-500。在一些实施例中，采用的生物反应器为G-REX-100。在一些实施例中，采用的生物反应器为G-REX-500。

[1007] 在一些实施例中，根据本文所描述的工艺进行根据图8(确切地说，例如图8B和/或图 8C)的步骤E。在一些实施例中，通过注射器在无菌条件下进入封闭系统以维持系统的无菌性和封闭性。在一些实施例中，采用如本文所描述的封闭系统。

[1008] 在一些实施例中，根据本文所描述的方法采集TIL。在一些实施例中，使用如本文所描述的方法采集第14天与第16天之间的TIL。在一些实施例中，在14天使用如本文所描述的方法采集TIL。在一些实施例中，在15天使用如本文所描述的方法采集TIL。在一些实施例中，在16天使用如本文所描述的方法采集TIL。

[1009] F.步骤F:最终调配/转移到输注袋中

[1010] 在完成如图8(确切地说，例如图8B)中以示范性顺序提供且如上文和本文详细概述的步骤A至E之后，将细胞转移到容器中以用于向患者给药。在一些实施例中，一旦使用上文所描述的扩增方法获得治疗上足够数量的TIL，就将其转移到容器中以用于向患者给药。

[1011] 在一实施例中，使用本公开的方法扩增的TIL是以医药组合物形式给予患者。在一实施例中，医药组合物为TIL于无菌缓冲液中的悬浮液。如本文所公开来扩增的TIL可以通过如所属领域中已知的任何合适途径给予。在一些实施例中，TIL以单次动脉内或静脉内输注形式给予，优选地持续大致30至60分钟。其它合适的给药途径包括腹膜内、鞘内和淋巴管内。

[1012] G.PBMC饲养细胞比率

[1013] 在一些实施例中，本文所描述的扩增方法(参见例如图8(确切地说，图8B和/或图8C)) 中所用的培养基包括抗CD3抗体，例如OKT-3。抗CD3抗体与IL-2结合诱导TIL群体中的T细胞活化和细胞分裂。全长抗体以及Fab和F(ab')2片段可见到这种效果，前者通常是优选的;参见例如Tsoukas等人，《免疫学杂志》，1985,135,1719，其以全文引用的方式并入本文中。

[1014] 在一实施例中，如下计算PBMC饲养层的数量：

[1015] A.T细胞(10微米直径)的体积:$V=(4/3)\pi r^3=523.6\mu m^3$

[1016] B.具有40μm(4个胞元)高度的G-Rex 100(M)的体积:$V=(4/3)\pi r^3=4\times10^{12}\mu m^3$

[1017] C.填充柱B需要的细胞数:$4\times10^{12}\mu m^3/523.6\mu m^3=7.6\times10^8\mu m^3*0.64=4.86\times10^8$

[1018] D.可在4D空间中被最优地活化的细胞数:$4.86\times10^8/24=20.25\times10^6$

[1019] E.外推到G-Rex 500的饲养细胞和TIL的数量:TIL:100×10^6且饲养细胞:2.5×10^9

[1020] 在所述计算中,使用对具有100cm^2底座的圆柱体中的TIL的活化提供二十面体几何形状所需的单核细胞数的近似值。计算得出了用于紧密反映NCI实验数据的T细胞的阈值活化的实验结果为约5×10^8。(1) (C)乘数(0.64)是如由Jaeger和Nagel在1992年计算的等效球体的任意填料密度(2)。(D)除数24是可接触4维空间“牛顿数(Newton number)”中的类似物体的等效球体的数量(3)。

[1021] (1)Jin,Jianjian等人,《人类肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)在气体可渗透烧瓶中生长到患者治疗所需的数量的简化方法(Simplified Method of the Growth of Human Tumor Infiltrating Lymphocytes(TIL)in Gas-Permeable Flasks to Numbers Needed for Patient Treatment)》.《免疫疗法杂志》2012年4月;35(3):283-292。

[1022] (2)Jaeger HM,Nagel SR.《颗粒态的物理学(Physics of the granular state)》.《科学 (Science)》.1992年3月20日;255(5051):1523-31。

[1023] (3)O.R.Musin(2003).“《二十五球体的问题(The problem of the twenty-five spheres)》”.《俄罗斯数学调查(Russ.Math.Surv.)》58(4):794-795。

[1024] 在一实施例中,在引发第一次扩增期间外源供应的抗原呈递饲养细胞的数量为在快速第二次扩增期间外源供应的抗原呈递饲养细胞数量的大致二分之一。在某些实施例中,方法包含在包含与快速第二次扩增的细胞培养基相比大致少50%的抗原呈递细胞的细胞培养基中进行引发第一次扩增。

[1025] 在另一实施例中,在快速第二次扩增期间外源供应的抗原呈递饲养细胞(APC)的数量大于在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量。

[1026] 在另一实施例中,在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为20:1的范围。

[1027] 在另一实施例中,在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为10:1的范围。

[1028] 在另一实施例中,在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为9:1的范围。

[1029] 在另一实施例中,在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为8:1的范围。

[1030] 在另一实施例中,在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为7:1的范围。

[1031] 在另一实施例中,在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为6:1的范围。

[1032] 在另一实施例中,在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为5:1的范围。

[1033] 在另一实施例中,在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩

增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为4:1的范围。

[1034] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为3:1的范围。

[1035] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.9:1的范围。

[1036] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.8:1的范围。

[1037] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.7:1的范围。

[1038] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.6:1的范围。

[1039] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.5:1的范围。

[1040] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.4:1的范围。

[1041] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.3:1的范围。

[1042] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.2:1的范围。

[1043] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.1:1的范围。

[1044] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2:1的范围。

[1045] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为10:1的范围。

[1046] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为5:1的范围。

[1047] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为4:1的范围。

[1048] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为3:1的范围。

[1049] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.9:1的范围。

[1050] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.8:1的范围。

[1051] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.7:1的范围。

[1052] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.6:1的范围。

[1053] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.5:1的范围。

[1054] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.4:1的范围。

[1055] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.3:1的范围。

[1056] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.2:1的范围。

[1057] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.1:1的范围。

[1058] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率为或约为2:1。

[1059] 在另一实施例中，在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量的比率为或约为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。

[1060] 在另一实施例中，在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量为或约为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个APC，并且在快速第二次扩增期间外源供应的APC 数量为或约为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个APC。

[1061] 在另一实施例中，在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量是选自为或约为1.5×10^8个APC至为或约为3×10^8个APC的范围，并且在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量是选自为或约为4×10^8个APC至为或约为7.5×10^8个APC的范围。

[1062] 在另一实施例中，在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量是选自为或约为2×10^8个 APC至为或约为2.5×10^8个APC的范围，并且在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量是选自为或约为4.5×10^8个APC至为或约为5.5×10^8个APC的范围。

[1063] 在另一实施例中，在引发第一次扩增期间外源供应的APC数量为或约为2.5×10^8个APC，并且在快速第二次扩增期间外源供应的APC数量为或约为5×10^8个APC。

[1064] 在一实施例中，在引发第一次扩增的第0天添加的APC(包括例如PBMC)数量为在引发第一次扩增的第7天(例如，方法的第7天)添加的PBMC数量的大致二分之一。在某些实施

例中,方法包含在引发第一次扩增的第0天将抗原呈递细胞添加到第一TIL群体中和在第7天将抗原呈递细胞添加到第二TIL群体中,其中在第0天添加的抗原呈递细胞数量为在引发第一次扩增的第7天(例如,方法的第7天)添加的抗原呈递细胞数量的大致50%。

[1065] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量大于在引发第一次扩增的第0天外源供应的PBMC数量。

[1066] 在另一实施例中,将在引发第一次扩增中外源供应的APC以选自为或约为1.0×10^6个 APC/cm^2至为或约为4.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于培养瓶中。

[1067] 在另一实施例中,将在引发第一次扩增中外源供应的APC以选自为或约为1.5×10^6个 APC/cm^2至为或约为3.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于培养瓶中。

[1068] 在另一实施例中,将在引发第一次扩增中外源供应的APC以选自为或约为2×10^6个 APC/cm^2至为或约为3×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于培养瓶中。

[1069] 在另一实施例中,将在引发第一次扩增中外源供应的APC以为或约为2×10^6个APC/cm^2的密度接种于培养瓶中。

[1070] 在另一实施例中,将在引发第一次扩增中外源供应的APC以以下密度接种于培养瓶中:为或约为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个APC/cm^2。

[1071] 在另一实施例中,将在快速第二次扩增中外源供应的APC以选自为或约为2.5×10^6个 APC/cm^2至为或约为7.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于培养瓶中。

[1072] 在另一实施例中,将在快速第二次扩增中外源供应的APC以选自为或约为3.5×10^6个 APC/cm^2至约6.0×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于培养瓶中。

[1073] 在另一实施例中,将在快速第二次扩增中外源供应的APC以选自为或约为4.0×10^6个 APC/cm^2至约5.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于培养瓶中。

[1074] 在另一实施例中,将在快速第二次扩增中外源供应的APC以选自为或约为4.0×10^6个 APC/cm^2的范围的密度接种于培养瓶中。

[1075] 在另一实施例中,将在快速第二次扩增中外源供应的APC以以下密度接种于培养瓶中:为或约为2.5×10^6个APC/cm^2、2.6×10^6个APC/cm^2、2.7×10^6个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个APC/cm^2。

[1076] 在另一实施例中,将在引发第一次扩增中外源供应的APC以以下密度接种于培养瓶中:为或约为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

$\times10^6$、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个APC/cm^2，并且将在快速第二次扩增中外源供应的APC以以下密度接种于培养瓶中：为或约为2.5×10^6个APC/cm^2、2.6×10^6个APC/cm^2、2.7×10^6个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个APC/cm^2。

[1077] 在另一实施例中，将在引发第一次扩增中外源供应的APC以选自为或约为1.0×10^6个 APC/cm^2至为或约为4.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于培养瓶中，并且将在快速第二次扩增中外源供应的APC以选自为或约为2.5×10^6个APC/cm^2至为或约为7.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于培养瓶中。

[1078] 在另一实施例中，将在引发第一次扩增中外源供应的APC以选自为或约为1.5×10^6个 APC/cm^2至为或约为3.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于培养瓶中，并且将在快速第二次扩增中外源供应的APC以选自为或约为3.5×10^6个APC/cm^2至为或约为6×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于培养瓶中。

[1079] 在另一实施例中，将在引发第一次扩增中外源供应的APC以选自为或约为2×10^6个 APC/cm^2至为或约为3×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于培养瓶中，并且将在快速第二次扩增中外源供应的APC以选自为或约为4×10^6个APC/cm^2至为或约为5.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于培养瓶中。

[1080] 在另一实施例中，将在引发第一次扩增中外源供应的APC以为或约为2×10^6个APC/cm^2的密度接种于培养瓶中，且将在快速第二次扩增中外源供应的APC以为或约为4×10^6个 APC/cm^2的密度接种于培养瓶中。

[1081] 在另一实施例中，在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的PBMC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为20:1的范围。

[1082] 在另一实施例中，在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的PBMC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为10:1的范围。

[1083] 在另一实施例中，在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的PBMC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为9:1的范围。

[1084] 在另一实施例中，在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为8:1的范围。

[1085] 在另一实施例中，在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为7:1的范围。

[1086] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为6:1的范围。

[1087] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为5:1的范围。

[1088] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为4:1的范围。

[1089] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为3:1的范围。

[1090] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.9:1的范围。

[1091] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.8:1的范围。

[1092] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.7:1的范围。

[1093] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.6:1的范围。

[1094] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.5:1的范围。

[1095] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.4:1的范围。

[1096] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.3:1的范围。

[1097] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.2:1的范围。

[1098] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.1:1的范围。

[1099] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2:1的范围。

[1100] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为10:1的范围。

[1101] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为5:1的范围。

[1102] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为4:1的范围。

[1103] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为3:1的范围。

[1104] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.9:1的范围。

[1105] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.8:1的范围。

[1106] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.7:1的范围。

[1107] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.6:1的范围。

[1108] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.5:1的范围。

[1109] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.4:1的范围。

[1110] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.3:1的范围。

[1111] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.2:1的范围。

[1112] 在另一实施例中，在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.1:1的范围。

[1113] 在另一实施例中，在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率为或约为2:1。

[1114] 在另一实施例中，在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量与在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量的比率为或约为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。

[1115] 在另一实施例中，在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量为或约为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个APC(包括例如PBMC)，并且在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量为或约为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个APC(包括例如PBMC)。

[1116] 在另一实施例中，在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量是选自为或约为1×10^8个APC(包括例如PBMC)至为或约为3.5×10^8个APC(包括例如PBMC)的范围，并且在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量是选自为或约为3.5×10^8个APC(包括例如PBMC)至为或约为1×10^9个APC(包括例如PBMC)的范围。

[1117] 在另一实施例中，在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量是选自为或约为1.5×10^8个APC至为或约为3×10^8个APC(包括例如PBMC)的范围，并且在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量是选自为或约为4×10^8个APC(包括例如PBMC)至为或约为7.5×10^8个APC(包括例如PBMC)的范围。

[1118] 在另一实施例中，在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量是选自为或约为2×10^8个APC(包括例如PBMC)至为或约为2.5×10^8个APC(包括例如PBMC)的范围，并且在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量是选自为或约为4.5×10^8个APC(包括例如PBMC)至为或约为5.5×10^8个APC(包括例如PBMC)的范围。

[1119] 在另一实施例中，在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量为或约为2.5×10^8个APC(包括例如PBMC)，且在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)数量为或约为5×10^8个APC(包括例如PBMC)。

[1120] 在一实施例中，在引发第一次扩增的第0天添加的APC(包括例如PBMC)层的数量为

在快速第二次扩增的第7天添加的APC(包括例如PBMC)层的数量的大致二分之一。在某些实施例中,方法包含在引发第一次扩增的第0天将抗原呈递细胞层添加到第一TIL群体中和在第7天将抗原呈递细胞层添加到第二TIL群体中,其中在第0天添加的抗原呈递细胞层的数量为在第7天添加的抗原呈递细胞层的数量的大致50%。

[1121] 在另一实施例中,在快速第二次扩增的第7天外源供应的APC(包括例如PBMC)层的数量大于在引发第一次扩增的第0天外源供应的APC(包括例如PBMC)层的数量。

[1122] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在具有为或约为2个细胞层的平均厚度的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,且快速第二次扩增的第7天发生在存在具有为或约为4个细胞层的平均厚度的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下。

[1123] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在具有为或约为一个细胞层的平均厚度的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,且快速第二次扩增的第7天发生在存在具有为或约为3个细胞层的平均厚度的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下。

[1124] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在具有为或约为1.5个细胞层至为或约为2.5个细胞层的平均厚度的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,且快速第二次扩增的第7天发生在存在具有为或约为3个细胞层的平均厚度的层叠APC(包括例如PBMC) 的情况下。

[1125] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在具有为或约为一个细胞层的平均厚度的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,且快速第二次扩增的第7天发生在存在具有为或约为2个细胞层的平均厚度的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下。

[1126] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在具有以下平均厚度的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下:为或约为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个细胞层,并且快速第二次扩增的第7天发生在存在具有以下平均厚度的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下:为或约为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个细胞层。

[1127] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在具有为或约为1个细胞层至为或约为2个细胞层的平均厚度的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,且快速第二次扩增的第7天发生在存在具有为或约为3个细胞层至为或约为10个细胞层的平均厚度的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下。

[1128] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在具有为或约为2个细胞层至为或约为3个细胞层的平均厚度的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,且快速第二次扩增的第7天发生在存在具有为或约为4个细胞层至为或约为8个细胞层的平均厚度的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下。

[1129] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在具有为或约为2个细胞层的平均厚度的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,且快速第二次扩增的第7天发生在存在具有为或约为4个细胞层至为或约为8个细胞层的平均厚度的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下。

[1130] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在具有为或约为1、2或3个细

胞层的平均厚度的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,且快速第二次扩增的第7天发生在存在具有为或约为3、4、5、6、7、8、9或10个细胞层的平均厚度的层叠APC(包括例如PBMC) 的情况下。

[1131] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,并且快速第二次扩增的第7 天发生在存在第二平均厚度等于第二APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如 PBMC)的情况下,其中第一APC(包括例如PBMC)层数与第二APC(包括例如PBMC) 层数的比率是选自为或约为1:1.1至为或约为1:10的范围。

[1132] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,并且快速第二次扩增的第7 天发生在存在第二平均厚度等于第二APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如 PBMC)的情况下,其中第一APC(包括例如PBMC)层数与第二APC(包括例如PBMC) 层数的比率是选自为或约为1:1.1至为或约为1:8的范围。

[1133] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,并且快速第二次扩增的第7 天发生在存在第二平均厚度等于第二APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如 PBMC)的情况下,其中第一APC(包括例如PBMC)层数与第二APC(包括例如PBMC) 层数的比率是选自为或约为1:1.1至为或约为1:7的范围。

[1134] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,并且快速第二次扩增的第7 天发生在存在第二平均厚度等于第二APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如 PBMC)的情况下,其中第一APC(包括例如PBMC)层数与第二APC(包括例如PBMC) 层数的比率是选自为或约为1:1.1至为或约为1:6的范围。

[1135] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,并且快速第二次扩增的第7 天发生在存在第二平均厚度等于第二APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如 PBMC)的情况下,其中第一APC(包括例如PBMC)层数与第二APC(包括例如PBMC) 层数的比率是选自为或约为1:1.1至为或约为1:5的范围。

[1136] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,并且快速第二次扩增的第7 天发生在存在第二平均厚度等于第二APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如 PBMC)的情况下,其中第一APC(包括例如PBMC)层数与第二APC(包括例如PBMC) 层数的比率是选自为或约为1:1.1至为或约为1:4的范围。

[1137] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,并且快速第二次扩增的第7 天发生在存在第二平均厚度等于第二APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如 PBMC)的情况下,其中第一APC(包括例如PBMC)层数与第二APC(包括例如PBMC) 层数的比率是选自为或约为1:1.1至为或约为1:3的范围。

[1138] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一APC

(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,并且快速第二次扩增的第7 天发生在存在第二平均厚度等于第二APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如 PBMC)的情况下,其中第一APC(包括例如PBMC)层数与第二APC(包括例如PBMC) 层数的比率是选自为或约为1:1.1至为或约为1:2的范围。

[1139] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,并且快速第二次扩增的第7 天发生在存在第二平均厚度等于第二APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如 PBMC)的情况下,其中第一APC(包括例如PBMC)层数与第二APC(包括例如PBMC) 层数的比率是选自为或约为1:1.2至为或约为1:8的范围。

[1140] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,并且快速第二次扩增的第7 天发生在存在第二平均厚度等于第二APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如 PBMC)的情况下,其中第一APC(包括例如PBMC)层数与第二APC(包括例如PBMC) 层数的比率是选自为或约为1:1.3至为或约为1:7的范围。

[1141] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,并且快速第二次扩增的第7 天发生在存在第二平均厚度等于第二APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如 PBMC)的情况下,其中第一APC(包括例如PBMC)层数与第二APC(包括例如PBMC) 层数的比率是选自为或约为1:1.4至为或约为1:6的范围。

[1142] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,并且快速第二次扩增的第7 天发生在存在第二平均厚度等于第二APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如 PBMC)的情况下,其中第一APC(包括例如PBMC)层数与第二APC(包括例如PBMC) 层数的比率是选自为或约为1:1.5至为或约为1:5的范围。

[1143] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,并且快速第二次扩增的第7 天发生在存在第二平均厚度等于第二APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如 PBMC)的情况下,其中第一APC(包括例如PBMC)层数与第二APC(包括例如PBMC) 层数的比率是选自为或约为1:1.6至为或约为1:4的范围。

[1144] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,并且快速第二次扩增的第7 天发生在存在第二平均厚度等于第二APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如 PBMC)的情况下,其中第一APC(包括例如PBMC)层数与第二APC(包括例如PBMC) 层数的比率是选自为或约为1:1.7至为或约为1:3.5的范围。

[1145] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,并且快速第二次扩增的第7 天发生在存在第二平均厚度等于第二APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如 PBMC)的情况下,其中第一APC(包括例如PBMC)层数与第二APC(包括例如PBMC) 层数的比率是选自为或约为1:1.8至为或约为1:3的范围。

[1146] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,并且快速第二次扩增的第7 天发生在存在第二平均厚度等于第二APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如 PBMC)的情况下,其中第一APC(包括例如PBMC)层数与第二APC(包括例如PBMC) 层数的比率是选自为或约为1:1.9至为或约为1:2.5的范围。

[1147] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,并且快速第二次扩增的第7 天发生在存在第二平均厚度等于第二APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如 PBMC)的情况下,其中第一APC(包括例如PBMC)层数与第二APC(包括例如PBMC) 层数的比率为或约为1:2。

[1148] 在另一实施例中,引发第一次扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如PBMC)的情况下,并且快速第二次扩增的第7 天发生在存在第二平均厚度等于第二APC(包括例如PBMC)层数的层叠APC(包括例如 PBMC)的情况下,其中第一APC(包括例如PBMC)层数与第二APC(包括例如PBMC) 层数的比率是选自以下:为或约为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。

[1149] 在一些实施例中,引发第一次扩增中APC的数量是选自约1.0×10^6个APC/cm^2至约4.5×10^6个APC/cm^2的范围,并且快速第二次扩增中APC的数量是选自约2.5×10^6个APC/cm^2至约7.5×10^6个APC/cm^2的范围。

[1150] 在一些实施例中,引发第一次扩增中APC的数量是选自约1.5×10^6个APC/cm^2至约3.5×10^6个APC/cm^2的范围,并且快速第二次扩增中APC的数量是选自约3.5×10^6个APC/cm^2至约6.0×10^6个APC/cm^2的范围。

[1151] 在一些实施例中,引发第一次扩增中APC的数量是选自约2.0×10^6个APC/cm^2至约3.0×10^6个APC/cm^2的范围,并且快速第二次扩增中APC的数量是选自约4.0×10^6个APC/cm^2至约5.5×10^6个APC/cm^2的范围。

[1152] H.任选的细胞培养基组分

[1153] 1.抗CD3抗体

[1154] 在一些实施例中,本文所描述的扩增方法(参见例如图8(确切地说,例如图8B))中所使用的培养基包括抗CD3抗体。抗CD3抗体与IL-2结合诱导TIL群体中的T细胞活化和细胞分裂。全长抗体以及Fab和F(ab')2片段可见到这种效果,前者通常是优选的;参见例如Tsoukas等人,《免疫学杂志》,1985,135,1719,其以全文引用的方式并入本文中。

[1155] 如所属领域的技术人员将了解,存在多种适合用于本发明的抗人类CD3抗体,包括来自各种哺乳动物的抗人类CD3多克隆抗体和单克隆抗体,包括(但不限于)鼠类、人类、灵

长类动物、大鼠和犬类抗体。在特定实施例中，使用OKT3抗CD3抗体(可商购自新泽西州拉里坦的Ortho-McNeil或加利福尼亚州奥本的美天旎生物技术)。

[1156] 表21:莫罗单抗的氨基酸序列(示范性OKT-3抗体)

[1157]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）
SEQ ID NO:1 莫罗单抗重链	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 莫罗单抗轻链	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

[1158] 2．4-1BB(CD137)激动剂

[1159] 在一实施例中，引发第一次扩增和/或快速第二次扩增的细胞培养基包含TNFRSF激动剂。在一实施例中，TNFRSF激动剂为4-1BB(CD137)激动剂。4-1BB激动剂可以是所属领域中已知的任何4-1BB结合分子。4-1BB结合分子可以是能够结合人类或哺乳动物4-1BB的单克隆抗体或融合蛋白。4-1BB激动剂或4-1BB结合分子可以包含免疫球蛋白分子的任何同种型(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、 IgA1和IgA2)或亚类别的免疫球蛋白重链。4-1BB激动剂或4-1BB结合分子可以同时具有重链和轻链。如本文中所使用，术语结合分子还包括结合至4-1BB的抗体(包括全长抗体)，单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)，多克隆抗体，多特异性抗体(例如，双特异性抗体)，人类、人类化或嵌合抗体，和抗体片段，例如Fab片段、F(ab′)片段、由Fab表达库产生的片段、以上任一种的表位结合片段，以及工程改造形式的抗体，例如scFv分子。在一实施例中， 4-1BB激动剂是一种为全人类抗体的抗原结合蛋白。在一实施例中，4-1BB激动剂是一种为人类化抗体的抗原结合蛋白。在一些实施例中，用于本公开方法和组合物的4-1BB激动剂包括抗4-1BB抗体、人类抗4-1BB抗体、小鼠抗4-1BB抗体、哺乳动物抗4-1BB抗体、单克隆抗4-1BB抗体、多克隆抗4-1BB抗体、嵌合抗4-1BB抗体、抗4-1BB纤连蛋白、抗4-1BB 域抗体、单链抗4-1BB片段、重链抗4-1BB片段、轻链抗4-1BB片段、抗4-1BB融合蛋白，以及其片段、衍生物、结合物、变体或生物类似物。已知激动性抗4-1BB抗体能诱导较强的免疫反应。Lee等人，《科学公共图书馆综合卷(PLOS One)》，2013,8,e69677。在一优选实施例中，4-1BB激动剂为激动性抗4-1BB人类化或完全人类单克隆抗体(即，来源于单细胞系的抗体)。在一实施例中，4-1BB激动剂为EU-101(Eutilex有限公司)、乌托米单抗或乌瑞鲁单抗，或其片段、衍生物、结合物、变体或生物类似物。在一优选实施例中，4-1BB激动剂为乌托米单抗或乌瑞鲁单抗，或其片段、衍生物、结合物、变体或生物类似物。

[1160] 在一优选实施例中，4-1BB激动剂或4-1BB结合分子还可以是融合蛋白。在一优选实施例中，与通常具有两个配体结合域的激动性单克隆抗体相比，多聚体4-1BB激动剂，例如三聚体或六聚体4-1BB激动剂(具有三个或六个配体结合域)可以诱导优良的受体(4-1BBL) 集群和内部细胞信号传导复合物形成。包含三个TNFRSF结合域和IgG1-Fc并任选地进一步连接这些融合蛋白中的两个或更多个的三聚体(三价)或六聚体(或六价)或更大融合蛋白描述于例如Gieffers等人，《分子癌症治疗》，2013,12,2735-47中。

[1161] 已知激动性4-1BB抗体和融合蛋白能诱导较强的免疫反应。在一优选实施例中，4-1BB 激动剂是以足以降低毒性的方式特异性结合于4-1BB抗原的单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施例中，4-1BB激动剂是消除抗体依赖性细胞毒性(例如NK细胞的细胞毒性)的激动性 4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施例中，4-1BB激动剂是消除抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的激动性4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施例中，4-1BB激动剂是消除补体依赖性细胞毒性(CDC)的激动性4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施例中，4-1BB激动剂是消除Fc区功能性的激动性4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。

[1162] 在一些实施例中，4-1BB激动剂的特征在于以高亲和力和激动活性结合于人类4-1BB (SEQ ID NO:9)。在一实施例中，4-1BB激动剂是结合于人类4-1BB(SEQ ID NO:9)的结合分子。在一实施例中，4-1BB激动剂是结合于鼠类4-1BB(SEQ ID NO:10)的结合分子。表22中汇总了4-1BB激动剂或结合分子所结合的4-1BB抗原的氨基酸序列。

[1163] 表22. 4-1BB抗原的氨基酸序列。

[1164]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO:9 人类4-1BB，肿瘤坏死因子受体超家族成员9（智人）	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG CSCRFPEEEE GGCEL	60 120 180 240 255
SEQ ID NO:10 鼠类4-1BB，肿瘤坏死因子受体超家族成员9（小家鼠）	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG GHSLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKTT GAAQEEDACS CRCPQEEEGG GGYEL	60 120 180 240 256

[1165] 在一些实施例中，所描述的组合物、工艺和方法包括以约100pM或更低的K_D结合人类或鼠类4-1BB、以约90pM或更低的K_D结合人类或鼠类4-1BB、以约80pM或更低的K_D结合人类或鼠类4-1BB、以约70pM或更低的K_D结合人类或鼠类4-1BB、以约60pM或更低的K_D结合人类或鼠类4-1BB、以约50pM或更低的K_D结合人类或鼠类4-1BB、以约40pM 或更低的K_D结合人类或鼠类4-1BB或以约30pM或更低的K_D结合人类或鼠类4-1BB的 4-1BB激动剂。

[1166] 在一些实施例中，所描述的组合物、工艺和方法包括以约$7.5\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约$7.5\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约$8\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约$8.5\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约$9\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约 $9.5\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类4-1BB或以约$1\times10^6$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类4-1BB的4-1BB激动剂。

[1167] 在一些实施例中，所描述的组合物、工艺和方法包括以约2×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约2.1×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约2.2×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约2.3×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约2.4×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约2.5×10^{-5} 1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约2.6×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB或以约2.7×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约2.8×10^{-5}1/s 或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB、以约2.9×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB或以约3×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类4-1BB的4-1BB激动剂。

[1168] 在一些实施例中，所描述的组合物、工艺和方法包括以约10nM或更低的IC_{50}结合于

人类或鼠类4-1BB、以约9nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类4-1BB、以约8nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类4-1BB、以约7nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类4-1BB、以约6nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类4-1BB、以约5nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类4-1BB、以约4nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类4-1BB、以约3nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类 4-1BB、以约2nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类4-1BB或以约1nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类4-1BB的4-1BB激动剂。

[1169] 在一优选实施例中,4-1BB激动剂为乌托米单抗(又称为PF-05082566或MOR-7480)或其片段、衍生物、结合物、变体或生物类似物。乌托米单抗购自辉瑞公司。乌托米单抗为免疫球蛋白G2-λ、抗[智人TNFRSF9(肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员9,4-1BB,T 细胞抗原ILA,CD137)]、智人(完全人类)单克隆抗体。表7中阐述乌托米单抗的氨基酸序列。乌托米单抗包含在Asn59和Asn292处的糖基化位点;在位置22-96(V_H-V_L)、143-199 (C_H1-C_L)、256-316(C_H2)和362-420(C_H3)处的重链链内二硫桥;在位置22'-87'(V_H-V_L) 和136'-195'(C_H1-C_L)处的轻链链内二硫桥;在IgG2A异构体位置218-218、219-219、222-222 和225-225处,在IgG2A/B异构体位置218-130、219-219、222-222和225-225处,和在IgG2B 异构体位置219-130(2)、222-222和225-225处的链间重链-重链二硫桥;以及在IgG2A异构体位置130-213'(2)、IgG2A/B异构体位置218-213'和130-213'处和在IgG2B异构体位置 218-213'(2)处的链间重链-轻链二硫桥。乌托米单抗和其变体及片段的制备和性质描述于美国专利第8,821,867号;第8,337,850号和第9,468,678号,以及国际专利申请公开第WO 2012/032433 A1号中,其每一个的公开内容以引用的方式并入本文中。乌托米单抗的临床前特征描述于Fisher等人,《癌症免疫学与免疫治疗学》2012,61,1721-33。乌托米单抗在多种血液和实体肿瘤病症中的当前临床试验包括美国国家卫生研究院临床试验数据库标识符NCT02444793、NCT01307267、NCT02315066和NCT02554812。

[1170] 在一实施例中,4-1BB激动剂包含由SEQ ID NO:11所载的重链和由SEQ ID NO:12所载的轻链。在一实施例中,4-1BB激动剂包含分别具有SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列的重链和轻链,或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或结合物。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列至少99%一致的重链和轻链。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列至少98%一致的重链和轻链。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列至少97%一致的重链和轻链。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列至少96%一致的重链和轻链。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:11 和SEQ ID NO:12中所示的序列至少95%一致的重链和轻链。

[1171] 在一实施例中,4-1BB激动剂包含乌托米单抗的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一实施例中,4-1BB激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:13中所示的序列,并且4-1BB 激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:14中所示的序列和其保守性氨基酸取代。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中所示的序列至少99%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中所示的序列至少98%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中所示的序列至少97%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,4-1BB激

动剂包含各自分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中所示的序列至少96％一致的V_H和V_L区。在一实施例中，4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中所示的序列至少95％一致的V_H和V_L区。在一实施例中，4-1BB激动剂包含scFv抗体，所述scFv抗体包含各自与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中所示的序列至少99％一致的V_H和V_L区。

[1172] 在一实施例中，4-1BB激动剂包含分别具有SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3域，以及分别具有SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3域。

[1173] 在一实施例中，4-1BB激动剂为由药物管理机构参考乌托米单抗批准的4-1BB激动剂生物类似单克隆抗体。在一实施例中，生物类似单克隆抗体包含4-1BB抗体，所述4-1BB抗体包含与参考药品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97％序列一致性(例如，97％、98％、99％或100％序列一致性)并且与参考药品或参考生物产品相比包含一个或多个转译后修饰的氨基酸序列，其中参考药品或参考生物产品为乌托米单抗。在一些实施例中，一个或多个转译后修饰是选自以下中的一个或多个：糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中，生物类似物为授权或提交授权的4-1BB激动剂抗体，其中以不同于参考药品或参考生物产品的配方的配方提供4-1BB激动剂抗体，其中参考药品或参考生物产品为乌托米单抗。4-1BB 激动剂抗体可由药物管理机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品为乌托米单抗。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品为乌托米单抗。

[1174] 表23.与乌托米单抗相关的4-1BB激动剂抗体的氨基酸序列。

[1175]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）
SEQ ID NO:11 乌托米单抗的重链	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 乌托米单抗的轻链	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 乌托米单抗的重链可变区	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN 60 YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS 118
SEQ ID NO:14 乌托米单抗的轻链可变区	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL 108
SEQ ID NO:15 乌托米单抗的重链CDR1	STYWIS 6
SEQ ID NO:16 乌托米单抗的重链CDR2	KIYPGDSYTN YSPSFQG 17
SEQ ID NO:17 乌托米单抗的重链CDR3	RGYGIFDY 8
SEQ ID NO:18 乌托米单抗的轻链CDR1	SGDNIGDQYA H 11
SEQ ID NO:19 乌托米单抗的轻链CDR2	QDKNRPS 7
SEQ ID NO:20 乌托米单抗的轻链CDR3	ATYTGFGSLA V 11

[1176] 在一优选实施例中,4-1BB激动剂为单克隆抗体乌瑞鲁单抗(又称为BMS-663513和20H4.9.h4a)或其片段、衍生物、变体或生物类似物。乌托米单抗购自百时美施贵宝公司和Creative Biolabs公司。乌瑞鲁单抗为免疫球蛋白G4-κ、抗[智人TNFRSF9(肿瘤坏死因子受体超家族成员9,4-1BB,T细胞抗原ILA,CD137)]、智人(完全人类)单克隆抗体。表 EE中阐述乌瑞鲁单抗的氨基酸序列。乌瑞鲁单抗包含在位置298(和298″)处的N-糖基化位点;在位置22-95(V_H-V_L)、148-204(C_H1-C_L)、262-322(C_H2)和368-426(C_H3)处(和在位置22″-95″、148″-204″、262″-322″和368″-426″处)的重链链内二硫桥;在位置23'-88' (V_H-V_L)和136'-196'(C_H1-C_L)处(和在位置23″'-88″'和136″'-196″'处)的轻链链内二硫桥;在位置227-227″和230-230″处的链间重链-重链二硫桥;以及在135-216'和135″-216″'处的链间重链-轻链二硫桥。乌瑞鲁单抗和其变体及片段的制备和性质描述于美国专利第7,288,638号和第8,962,804号中,其公开内容以引用的方式并入本文中。乌瑞鲁单抗的临床前和临床特征描述于Segal等人,《临床癌症研究》2016中,可访问http:/dx.doi.org/ 10.1158/1078-0432.CCR-16-1272。乌瑞鲁单抗在多种血液和实体肿瘤病症中的当前临床试验包括美国国家卫生研究院临床试验数据库标识符NCT01775631、NCT02110082、NCT02253992 和NCT01471210。

[1177] 在一实施例中,4-1BB激动剂包含由SEQ ID NO:21所载的重链和由SEQ ID NO:22所载的轻链。在一实施例中,4-1BB激动剂包含分别具有SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22中所示的序列的重链和轻链,或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或结合物。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22中所示的序列至少99%一致的重链和轻链。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22中所示的序列至少98%一致的重链和轻链。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22中所示的序列至少97%一致的重链和轻链。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22中所示的序列至少96%一致的重链和轻链。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:21 和SEQ ID NO:22中所示的序列至少95%一致的重链和轻链。

[1178] 在一实施例中,4-1BB激动剂包含乌瑞鲁单抗的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一实施例中,4-1BB激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:23中所示的序列,并且4-1BB 激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:24中所示的序列和其保守性氨基酸取代。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中所示的序列至少99%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中所示的序列至少98%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中所示的序列至少97%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中所示的序列至少96%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,4-1BB激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中所示的序列至少95%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,4-1BB激动剂包含scFv抗体,所述scFv抗体包含各自与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中所示的序列至少99%一致的V_H和V_L区。

[1179] 在一实施例中,4-1BB激动剂包含分别具有SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3域,以及分别具有SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的轻

链CDR1、CDR2和CDR3域。

[1180] 在一实施例中，4-1BB激动剂为由药物管理机构参考乌瑞鲁单抗批准的4-1BB激动剂生物类似单克隆抗体。在一实施例中，生物类似单克隆抗体包含4-1BB抗体，所述4-1BB抗体包含与参考药品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97％序列一致性(例如，97％、98％、99％或100％序列一致性)并且与参考药品或参考生物产品相比包含一个或多个转译后修饰的氨基酸序列，其中参考药品或参考生物产品为乌瑞鲁单抗。在一些实施例中，一个或多个转译后修饰是选自以下中的一个或多个：糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中，生物类似物为授权或提交授权的4-1BB激动剂抗体，其中以不同于参考药品或参考生物产品的配方的配方提供4-1BB激动剂抗体，其中参考药品或参考生物产品为乌瑞鲁单抗。4-1BB 激动剂抗体可由药物管理机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品为乌瑞鲁单抗。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品为乌瑞鲁单抗。

[1181] 表24：与乌瑞鲁单抗相关的4-1BB激动剂抗体的氨基酸序列。

[1182]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO:21 乌瑞鲁单抗的重链	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN PSLESRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 448
SEQ ID NO:22 乌瑞鲁单抗的轻链	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC	60 120 180 216
SEQ ID NO:23 乌瑞鲁单抗的可变重链	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP	60 120
SEQ ID NO:24 乌瑞鲁单抗的可变轻链	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ	60 110
SEQ ID NO:25 乌瑞鲁单抗的重链CDR1	GYYWS	5
SEQ ID NO:26 乌瑞鲁单抗的重链CDR2	EINHGGYVTY NPSLES	16
SEQ ID NO:27 乌瑞鲁单抗的重链CDR3	DYGPGNYDWY FDL	13
SEQ ID NO:28 乌瑞鲁单抗的轻链CDR1	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID NO:29 乌瑞鲁单抗的轻链CDR2	DASNRAT	7
SEQ ID NO:30 乌瑞鲁单抗的轻链CDR3	QQRSDWPPAL T 11	

[1183] 在一实施例中，4-1BB激动剂是选自以下组成的组：1D8、3Elor、4B4(BioLegend 309809)、H4-1BB-M127(BD Pharmingen 552532)、BBK2(赛默飞世尔MS621PABX)、145501(Leinco Technologies B591)、由寄存为ATCC号HB-11248并且在美国专利第6,974,863号中公开的细胞系产生的抗体、5F4(BioLegend31 1503)、C65-485(BD Pharmingen 559446)、美国专利申请公开第US 2005/0095244号中公开的抗体、美国专利第7,288,638号中公开的抗体(例如 20H4.9-IgG1(BMS-663031))、美国专利第6,887,673号中公开的抗体(例如4E9或 BMS-554271)、美国专利第7,214,493号中公开的抗体、美国专利第6,303,121号中公开

的抗体、美国专利第6,569,997号中公开的抗体、美国专利第6,905,685号中公开的抗体(例如4E9 或BMS-554271)、美国专利第6,362,325号中公开的抗体(例如1D8或BMS-469492;3H3或BMS-469497;或3E1)、美国专利第6,974,863号中公开的抗体(例如53A2);美国专利第 6,210,669号中公开的抗体(例如1D8、3B8或3E1)、美国专利第5,928,893号中描述的抗体、美国专利第6,303,121号中公开的抗体、美国专利第6,569,997号中公开的抗体、国际专利申请公开第WO 2012/177788号、第WO 2015/119923号和第WO 2010/042433号中公开的抗体,和其片段、衍生物、结合物、变体或生物类似物,其中每一个前述专利或专利申请公开的公开内容以引用的方式并入本文中。

[1184] 在一实施例中,4-1BB激动剂为以下中描述的4-1BB激动性融合蛋白:国际专利申请公开第WO 2008/025516 A1号、第WO 2009/007120 A1号、第WO 2010/003766 A1号、第WO 2010/010051 A1号和第WO 2010/078966 A1号;美国专利申请公开第US 2011/0027218 A1号、第US 2015/0126709 A1号、第US 2011/0111494 A1号、第US 2015/0110734 A1号和第US 2015/0126710 A1号;以及美国专利第9,359,420号、第9,340,599号、第8,921,519和第8,450 460号,其公开内容以引用的方式并入本文中。

[1185] 在一实施例中,4-1BB激动剂为如结构I-A描绘的4-1BB激动性融合蛋白(C端Fc抗体片段融合蛋白)或如结构I-B描绘的4-1BB激动性融合蛋白(N端Fc抗体片段融合蛋白),或其片段、衍生物、结合物、变体或生物类似物(参见图50)。在结构I-A和I-B中,圆柱体是指单独的多肽结合域。结构I-A及I-B包含来源于例如4-1BBL(4-1BB配体、CD137配体 (CD137L)或肿瘤坏死因子超家族成员9(TNFSF9))或结合4-1BB的抗体的三个线性连接的TNFRSF结合域,所述结合域折叠以形成三价蛋白质,接着通过IgG1-Fc(包括C_H3及C_H2 域)连接至第二个三价蛋白质,接着用以通过二硫键(小细长卵形)将两个三价蛋白质连接在一起,使所述结构稳定并且提供能够将六个受体和信号传导蛋白质的胞内信号传导域聚集在一起以形成信号传导复合物的激动剂。以圆柱体形式表示的TNFRSF结合域可为scFv域,包含例如,由可包含亲水性残基和具有灵活性的Gly及Ser序列以及具有溶解性的Glu及Lys 的连接子连接的V_H和V_L链。可以使用任何scFv域设计,例如de Marco,《微生物细胞工厂》, 2011,10,44;Ahmad等人,《临床与发育免疫学》2012,980250;Monnier等人,《抗体》,2013, 2,193-208;或并入本文中其它地方的参考文献中。这种形式的融合蛋白结构描述于美国专利第9,359,420号、第9,340,599号、第8,921,519号和第8,450,460号中,其公开内容以引用的方式并入本文中。

[1186] 表9中给出结构I-A的其它多肽域的氨基酸序列。Fc域优选地包含完整恒定域(SEQ ID NO:31的氨基酸17-230)、完整铰链域(SEQ ID NO:31的氨基酸1-16)或铰链域的一部分(例如,SEQ ID NO:31的氨基酸4-16)。连接C端Fc抗体的优选连接子可选自SEQ ID NO:32至SEQ ID NO:41中所给出的实施例,包括适合于融合其它多肽的连接子。

[1187] 表25:具有C端Fc抗体片段融合蛋白设计(结构I-A)的TNFRSF激动剂融合蛋白(包括4-1BB激动剂融合蛋白)的氨基酸序列。

[1188]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）
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 连接子	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
SEQ ID NO:33 连接子	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
SEQ ID NO:34 连接子	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
SEQ ID NO:35 连接子	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
SEQ ID NO:36 连接子	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
SEQ ID NO:37 连接子	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
SEQ ID NO:38 连接子	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE 24
SEQ ID NO:39 连接子	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE 23
SEQ ID NO:40 连接子	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E 21
SEQ ID NO:41 连接子	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE 25

[1189] 表10中给出结构I-B的其它多肽域的氨基酸序列。如果Fc抗体片段与如结构I-B中的 TNRFSF融合蛋白的N端融合，那么Fc模块的序列优选为示于SEQ ID NO:42中的序列，并且连接子序列优选地选自SED ID NO:43至SEQ ID NO:45中所阐述的那些实施例。

[1190] 表26：具有N端Fc抗体片段融合蛋白设计(结构I-B)的TNFRSF激动剂融合蛋白(包括4-1BB激动剂融合蛋白)的氨基酸序列。

[1191]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）
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 连接子	SGSGSGSGSG S 11
SEQ ID NO:44 连接子	SSSSSSGSGS GS 12
SEQ ID NO:45 连接子	SSSSSSGSGS GSGSGS 16

[1192] 在一实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一个或多个选自以下组成的组的4-1BB结合域：乌托米单抗的可变重链和可变轻链、乌瑞鲁单抗的可变重链和可变轻链、乌托米单抗的可变重链和可变轻链、选自表10中描述的可变重链和可变轻链的可变重链和可变轻链、前述可变重链和可变轻链的任何组合，以及其片段、衍生物、结合物、变体和生物类似物。

[1193] 在一实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一个或多个包含4-1BBL 序列的4-1BB结合域。在一实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一个或多个包含根据SEQ ID NO:46的序列的4-1BB结合域。在一实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一个或多个包含可溶性4-1BBL序列的4-1BB结合域。在一实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一个或多个包含根据SEQ ID NO:47的序列的4-1BB结合域。

[1194] 在一实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一个或多个4-1BB结合域，所述4-1BB结合域为包含各自分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中所示的序列至少95％一致的V_H和V_L区的scFv域，其中V_H和V_L域由连接子连接。在一实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一个或多个4-1BB结合域，所述4-1BB结合域为包含各自分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中所示的序列至少95％一致的V_H和V_L区的scFv域，其中V_H和V_L域由连接子连接。在一实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB 激动剂融合蛋白包含一个或多个4-1BB结合域，所述4-1BB结合域为包含各自与表11中给出的V_H和V_L序列至少95％一致的V_H和V_L区的scFv域，其中V_H和V_L域由连接子连接。

[1195] 表27:适用作融合蛋白中的4-1BB结合域或scFv 4-1BB激动剂抗体的其它多肽域。

标识符	序列（单字母氨基酸符号）
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 KAGVYYVFFQ 60 LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL 120 SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE 168
SEQ ID NO:48 4B4-1-1版本1的可变重链	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS 118
SEQ ID NO:49 4B4-1-1版本1的可变轻链	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:50 4B4-1-1版本2的可变重链	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA 119
SEQ ID NO:51 4B4-1-1版本2的可变轻链	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:52 H39E3-2的可变重链	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP 60 GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT 120
SEQ ID NO:53 H39E3-2的可变轻链	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL 60 WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA 110

[1196]

[1197] 在一实施例中,4-1BB激动剂为4-1BB激动性单链融合多肽,其包含(i)第一可溶性4-1BB 结合域、(ii)第一肽连接子、(iii)第二可溶性4-1BB结合域、(iv)第二肽连接子和(v)第三可溶性4-1BB结合域,进一步包含在N末端和/或C末端的额外域,且其中所述额外域为 Fab或Fc片段域。在一实施例中,4-1BB激动剂为4-1BB激动性单链融合多肽,其包含(i)第一可溶性4-1BB结合域、(ii)第一肽连接子、(iii)第二可溶性4-1BB结合域、(iv)第二肽连接子和(v)第三可溶性4-1BB结合域,进一步包含在N末端和/或C末端的额外域,其中所述额外域为Fab或Fc片段域,其中每一个可溶性4-1BB域缺乏茎区(其有助于三聚合并且提供到细胞膜的一定距离,但不是4-1BB结合域的一部分)并且第一和第二肽连接子独立地具有3-8个氨基酸的长度。

[1198] 在一实施例中,4-1BB激动剂为4-1BB激动性单链融合多肽,其包含(i)第一可溶性肿瘤坏死因子(TNF)超家族细胞因子域、(ii)第一肽连接子、(iii)第二可溶性TNF超家族细胞因子域、(iv)第二肽连接子和(v)第三可溶性TNF超家族细胞因子域,其中每一个可溶性TNF超家族细胞因子域缺乏茎区并且第一和第二肽连接子独立地具有3-8个氨基酸的长度,且其中每个TNF超家族细胞因子域为4-1BB结合域。

[1199] 在一实施例中,4-1BB激动剂为4-1BB激动性scFv抗体,其包含前述任一个V_H域与前述任一个V_L域连接。

[1200] 在一实施例中,4-1BB激动剂为BPS Bioscience 4-1BB激动剂抗体目录号79097-2,可商购自美国加利福尼亚州圣地亚哥的BPS Bioscience。在一实施例中,4-1BB激动剂为Creative Biolabs 4-1BB激动剂抗体目录号MOM-18179,可商购自美国纽约州希尔兰的Creative Biolabs。

[1201] 3.OX40(CD134)激动剂

[1202] 在一实施例中,TNFRSF激动剂为OX40(CD134)激动剂。OX40激动剂可以是所属领域中已知的任何OX40结合分子。OX40结合分子可以是能够结合至人类或哺乳动物OX40 的单克隆抗体或融合蛋白。OX40激动剂或OX40结合分子可以包含免疫球蛋白分子的任何同种型

(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、 IgA1和IgA2)或亚类别的免疫球蛋白重链。OX40激动剂或OX40结合分子可以同时具有重链和轻链。如本文中所使用,术语结合分子还包括结合至OX40的抗体(包括全长抗体),单克隆抗体(包括全长单克隆抗体),多克隆抗体,多特异性抗体(例如,双特异性抗体),人类、人类化或嵌合抗体,和抗体片段,例如Fab片段、F(ab′)片段、由Fab表达库产生的片段、以上任一种的表位结合片段,以及工程改造形式的抗体,例如scFv分子。在一实施例中,OX40 激动剂为抗原结合蛋白,即全人类抗体。在一实施例中,OX40激动剂是一种为人类化抗体的抗原结合蛋白。在一些实施例中,用于本公开方法和组合物的OX40激动剂包括抗OX40 抗体、人类抗OX40抗体、小鼠抗OX40抗体、哺乳动物抗OX40抗体、单克隆抗OX40抗体、多克隆抗OX40抗体、嵌合抗OX40抗体、抗OX40纤连蛋白、抗OX40域抗体、单链抗OX40片段、重链抗OX40片段、轻链抗OX40片段、抗OX40融合蛋白,以及其片段、衍生物、结合物、变体或生物类似物。在一优选实施例中,OX40激动剂为激动性抗OX40 人类化或完全人类单克隆抗体(即,来源于单细胞系的抗体)。

[1203] 在一优选实施例中,OX40激动剂或OX40结合分子还可以是融合蛋白。包含与OX40L融合的Fc域的OX40融合蛋白描述于例如Sadun等人,《免疫治疗杂志》,2009,182,1481-89中。在一优选实施例中,与通常具有两个配体结合域的激动性单克隆抗体相比,多聚体OX40激动剂,例如三聚体或六聚体OX40激动剂(具有三个或六个配体结合域)可以诱导优良的受体(OX40L)集群和内部细胞信号传导复合物形成。包含三个TNFRSF结合域和IgG1-Fc 并任选地进一步连接这些融合蛋白中的两个或更多个的三聚体(三价)或六聚体(或六价) 或更大融合蛋白描述于例如Gieffers等人,《分子癌症治疗》,2013,12,2735-47中。

[1204] 已知激动性OX40抗体和融合蛋白能诱导较强的免疫反应。Curti等人,《癌症研究》,2013, 73,7189-98。在一优选实施例中,OX40激动剂是以足以降低毒性的方式特异性结合于OX40 抗原的单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施例中,OX40激动剂是消除抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)(例如NK细胞的细胞毒性)的激动性OX40单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施例中,OX40激动剂是消除抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的激动性OX40单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施例中,OX40激动剂是消除补体依赖性细胞毒性(CDC)的激动性OX40单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施例中,OX40激动剂是消除Fc区功能性的激动性OX40 单克隆抗体或融合蛋白。

[1205] 在一些实施例中,OX40激动剂的特征在于以高亲和力和激动活性结合于人类OX40(SEQ ID NO:54)。在一实施例中,OX40激动剂是结合于人类OX40(SEQ ID NO:54)的结合分子。在一实施例中,OX40激动剂是结合于鼠类OX40(SEQ ID NO:55)的结合分子。表12中汇总了OX40激动剂或结合分子所结合的OX40抗原的氨基酸序列。

[1206] 表28:OX40抗原的氨基酸序列。

[1207]

标识符	序列(单字母氨基酸符号)	
SEQ ID NO:54 人类OX40(智人)	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL RRDQRLPPDA HKPPGGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI	60 120 180 240 277
SEQ ID NO:55 鼠类OX40(小家鼠)	MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI	60 120 180 240 272

[1208] 在一些实施例中，所描述的组合物、工艺和方法包括以约100pM或更低的K_D结合人类或鼠类OX40、以约90pM或更低的K_D结合人类或鼠类OX40、以约80pM或更低的K_D结合人类或鼠类OX40、以约70pM或更低的K_D结合人类或鼠类OX40、以约60pM或更低的 K_D结合人类或鼠类OX40、以约50pM或更低的K_D结合人类或鼠类OX40、以约40pM或更低的K_D结合人类或鼠类OX40或以约30pM或更低的K_D结合人类或鼠类OX40的OX40激动剂。

[1209] 在一些实施例中，所描述的组合物、工艺和方法包括以约$7.5\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类OX40、以约$7.5\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类OX40、以约 $8\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类OX40、以约$8.5\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类OX40、以约$9\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类OX40、以约9.5×10^5 1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类OX40或以约$1\times10^6$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类或鼠类OX40的OX40激动剂。

[1210] 在一些实施例中，所描述的组合物、工艺和方法包括以约2×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类OX40、以约2.1×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类OX40、以约2.2×10^{-5} 1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类OX40、以约2.3×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类OX40、以约2.4×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类OX40、以约2.5×10^{-5}1/s 或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类OX40、以约2.6×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类 OX40或以约2.7×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类OX40、以约2.8×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类OX40、以约2.9×10^{-5}或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类OX40或以约3×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类或鼠类OX40的OX40激动剂。

[1211] 在一些实施例中，所描述的组合物、工艺和方法包括以约10nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类OX40、以约9nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类OX40、以约8nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类OX40、以约7nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类OX40、以约6nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类OX40、以约5nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类OX40、以约4nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类OX40、以约3nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类 OX40、以约2nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类OX40或以约1nM或更低的IC_{50}结合于人类或鼠类OX40的OX40激动剂。

[1212] 在一些实施例中，OX40激动剂为他沃立珠单抗，又称为MEDI0562或MEDI-0562。他沃立珠单抗购自阿斯利康公司的MedImmune子公司。他沃立珠单抗为免疫球蛋白G1-κ、抗[智人TNFRSF4(肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员4，OX40，CD134)]、人类化和嵌合单克隆抗体。表13中阐述他沃立珠单抗的氨基酸序列。他沃立珠单抗包含在位置301和301″ 处的N-糖基化位点，具有岩藻糖基化复合双触角CHO型聚糖；在位置22-95(V_H-V_L)、148-204(C_H1-C_L)、265-325(C_H2)和371-429(C_H3)处(和在位置22″-95″、148″-204″、265″-325″ 和371″-429″处)的重链链内二硫桥；在位置23'-88'(V_H-V_L)和134'-194'(C_H1-C_L)处(和在位置23″'-88″'和134″'-194″'处)的轻链链内二硫桥；在位置230-230″和233-233″处的链间重链-重链二硫桥；以及在224-214'和224″-214″'处的链间重链-轻链二硫桥。他沃立珠单抗在多种实体肿瘤病症中的当前临床试验包括美国国家卫生研究院临床研究数据库标识符 NCT02318394和NCT02705482。

[1213] 在一实施例中，OX40激动剂包含由SEQ ID NO:56所载的重链和由SEQ ID NO:57所载的轻链。在一实施例中，OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57中所示的序列的重链和轻链，或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或结合物。

在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57中所示的序列至少99%一致的重链和轻链。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57中所示的序列至少98%一致的重链和轻链。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57中所示的序列至少97%一致的重链和轻链。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57中所示的序列至少96%一致的重链和轻链。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57中所示的序列至少95%一致的重链和轻链。

[1214] 在一实施例中,OX40激动剂包含他沃立珠单抗的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一实施例中,OX40激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:58中所示的序列,并且OX40 激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:59中所示的序列和其保守性氨基酸取代。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59中所示的序列至少99%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59中所示的序列至少98%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59中所示的序列至少97%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59中所示的序列至少96%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59 中所示的序列至少95%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含scFv抗体,所述scFv抗体包含各自与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59中所示的序列至少99%一致的V_H和 V_L区。

[1215] 在一实施例中,OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61和SEQ ID NO:62中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3域,以及分别具有SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64和SEQ ID NO:65中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3域。

[1216] 在一实施例中,OX40激动剂为由药物管理机构参考他沃立珠单抗批准的OX40激动剂生物类似单克隆抗体。在一实施例中,生物类似单克隆抗体包含OX40抗体,所述OX40抗体包含与参考药品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97%序列一致性(例如,97%、98%、99%或100%序列一致性)并且与参考药品或参考生物产品相比包含一个或多个转译后修饰的氨基酸序列,其中参考药品或参考生物产品为他沃立珠单抗。在一些实施例中,一个或多个转译后修饰是选自以下中的一个或多个:糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中,生物类似物为授权或提交授权的OX40激动剂抗体,其中以不同于参考药品或参考生物产品的配方的配方提供OX40激动剂抗体,其中参考药品或参考生物产品为他沃立珠单抗。OX40 激动剂抗体可由药物管理机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品为他沃立珠单抗。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品为他沃立珠单抗。

[1217] 表29:与他沃立珠单抗相关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列。

[1218]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）
SEQ ID NO:56 他沃立珠单抗的重链	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 他沃立珠单抗的轻链	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 他沃立珠单抗的重链可变区	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSKKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT 118
SEQ ID NO:59 他沃立珠单抗的轻链可变区	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR 108
SEQ ID NO:60 他沃立珠单抗的重链CDR1	GSFSSGYWN 9
SEQ ID NO:61 他沃立珠单抗的重链CDR2	YIGYISYNGI TYH 13
SEQ ID NO:62 他沃立珠单抗的重链CDR3	RYKYDYDGGH AMDY 14
SEQ ID NO:63 他沃立珠单抗的轻链CDR1	QDISNYLN 8
SEQ ID NO:64 他沃立珠单抗的轻链CDR2	LLIYYTSKLH S 11
SEQ ID NO:65 他沃立珠单抗的轻链CDR3	QQGSALPW 8

[1219] 在一些实施例中,OX40激动剂为11D4,其为购自辉瑞公司的全人类抗体。11D4的制备和性质描述于美国专利第7,960,515号;第8,236,930号;和第9,028,824号中,其公开内容以引用的方式并入本文中。表14中阐述11D4的氨基酸序列。

[1220] 在一实施例中,OX40激动剂包含由SEQ ID NO:66所载的重链和由SEQ ID NO:67所载的轻链。在一实施例中,OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67中所示的序列的重链和轻链,或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或结合物。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67中所示的序列至少99%一致的重链和轻链。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67中所示的序列至少98%一致的重链和轻链。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67中所示的序列至少97%一致的重链和轻链。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67中所示的序列至少96%一致的重链和轻链。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67中所示的序列至少95%一致的重链和轻链。

[1221] 在一实施例中,OX40激动剂包含11D4的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一实施例中,OX40激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:68中所示的序列,并且OX40激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:69中所示的序列和其保守性氨基酸取代。在一实施例中, OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69中所示的序列至少99%一致的 V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69 中所示的序列至少98%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69中所示的序列至少97%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40 激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69中所示的序列至少96%一致的V_H和 V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69中所示的序列至少95%一

致的V_H和V_L区。

[1222] 在一实施例中，OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3域，以及分别具有SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:75中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3域。

[1223] 在一实施例中，OX40激动剂为由药物管理机构参考11D4批准的OX40激动剂生物类似单克隆抗体。在一实施例中，生物类似单克隆抗体包含OX40抗体，所述OX40抗体包含与参考药品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97％序列一致性(例如，97％、98％、99％或100％序列一致性)并且与参考药品或参考生物产品相比包含一个或多个转译后修饰的氨基酸序列，其中参考药品或参考生物产品为11D4。在一些实施例中，一个或多个转译后修饰是选自以下中的一个或多个：糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中，生物类似物为授权或提交授权的OX40激动剂抗体，其中以不同于参考药品或参考生物产品的配方的配方提供OX40激动剂抗体，其中参考药品或参考生物产品为11D4。OX40激动剂抗体可由药物管理机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品为11D4。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品为11D4。

[1224] 表30：与11D4相关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列。

[1225]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）
SEQ ID NO:66 11D4的重链	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的轻链	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的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS 118
SEQ ID NO:69 11D4的轻链可变区	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK 107
SEQ ID NO:70 11D4的重链CDR1	SYSMN 5
SEQ ID NO:71 11D4的重链CDR2	YISSSSSTID YADSVKG 17
SEQ ID NO:72 11D4的重链CDR3	ESGWYLFDY 9
SEQ ID NO:73 11D4的轻链CDR1	RASQGISSWL A 11
SEQ ID NO:74 11D4的轻链CDR2	AASSLQS 7
SEQ ID NO:75 11D4的轻链CDR3	QQYNSYPPT 9

[1226] 在一些实施例中，OX40激动剂为18D8，其为购自辉瑞公司的全人类抗体。18D8的制备和性质描述于美国专利第7,960,515号；第8,236,930号；和第9,028,824号中，其公开内容以引用的方式并入本文中。表15中阐述18D8的氨基酸序列。

[1227] 在一实施例中,OX40激动剂包含由SEQ ID NO:76所载的重链和由SEQ ID NO:77所载的轻链。在一实施例中,OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77中所示的序列的重链和轻链,或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或结合物。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77中所示的序列至少99%一致的重链和轻链。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77中所示的序列至少98%一致的重链和轻链。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77中所示的序列至少97%一致的重链和轻链。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77中所示的序列至少96%一致的重链和轻链。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77中所示的序列至少95%一致的重链和轻链。

[1228] 在一实施例中,OX40激动剂包含18D8的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一实施例中,OX40激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:78中所示的序列,并且OX40激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:79中所示的序列和其保守性氨基酸取代。在一实施例中, OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79中所示的序列至少99%一致的 V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79 中所示的序列至少98%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79中所示的序列至少97%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40 激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79中所示的序列至少96%一致的V_H和 V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79中所示的序列至少95%一致的V_H和V_L区。

[1229] 在一实施例中,OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81和SEQ ID NO:82中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3域,以及分别具有SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84和SEQ ID NO:85中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3域。

[1230] 在一实施例中,OX40激动剂为由药物管理机构参考18D8批准的OX40激动剂生物类似单克隆抗体。在一实施例中,生物类似单克隆抗体包含OX40抗体,所述OX40抗体包含与参考药品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97%序列一致性(例如,97%、98%、99%或100%序列一致性)并且与参考药品或参考生物产品相比包含一个或多个转译后修饰的氨基酸序列,其中参考药品或参考生物产品为18D8。在一些实施例中,一个或多个转译后修饰是选自以下中的一个或多个:糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中,生物类似物为授权或提交授权的OX40激动剂抗体,其中以不同于参考药品或参考生物产品的配方的配方提供OX40激动剂抗体,其中参考药品或参考生物产品为18D8。OX40激动剂抗体可由药物管理机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品为18D8。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品为18D8。

[1231] 表31:与18D8相关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列。

[1232]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO:76 18D8的重链	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID NO:77 18D8的轻链	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	60 120 180 213
SEQ ID NO:78 18D8的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSS	60 120 124
SEQ ID NO:79 18D8的轻链可变区	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK	60 106
SEQ ID NO:80 18D8的重链 CDR1	DYAMH	5
SEQ ID NO:81 18D8的重链 CDR2	GISWNSGSIG YADSVKG	17
SEQ ID NO:82 18D8的重链 CDR3	DQSTADYYFY YGMDV	15
SEQ ID NO:83 18D8的轻链 CDR1	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID NO:84 18D8的轻链 CDR2	DASNRAT	7
SEQ ID NO:85 18D8的轻链 CDR3	QQRSNWPT	8

[1233] 在一些实施例中,OX40激动剂为Hu119-122,其为购自葛兰素史克公司的人类化抗体。Hu119-122的制备和性质描述于美国专利第9,006,399号和第9,163,085号,以及国际专利公开第WO 2012/027328号中,其公开内容以引用的方式并入本文中。表16中阐述Hu119-122 的氨基酸序列。

[1234] 在一实施例中,OX40激动剂包含Hu119-122的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一实施例中,OX40激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:86中所示的序列,并且OX40激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:87中所示的序列和其保守性氨基酸取代。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87中所示的序列至少99%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87中所示的序列至少98%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87中所示的序列至少97%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87中所示的序列至少96%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87 中所示的序列至少95%一致的V_H和V_L区。

[1235] 在一实施例中,OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3域,以及分别具有SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3域。

[1236] 在一实施例中,OX40激动剂为由药物管理机构参考Hu119-122批准的OX40激动剂生物类似单克隆抗体。在一实施例中,生物类似单克隆抗体包含OX40抗体,所述OX40抗体包含与参考药品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97%序列一致性(例如,97%、98%、99%或100%序列一致性)并且与参考药品或参考生物产品相比包含一个或多个转译后修饰的氨基酸序列,其中参考药品或参考生物产品为Hu119-122。在一些实施例中,一个或多

个转译后修饰是选自以下中的一个或多个:糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中,生物类似物为授权或提交授权的OX40激动剂抗体,其中以不同于参考药品或参考生物产品的配方的配方提供OX40激动剂抗体,其中参考药品或参考生物产品为Hu119-122。OX40激动剂抗体可由药物管理机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品为Hu119-122。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品为Hu119-122。

[1237] 表32:与Hu119-122相关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列。

[1238]

标识符	序列(单字母氨基酸符号)	
SEQ ID NO:86 Hu119-122 的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
SEQ ID NO:87 Hu119-122 的轻链可变区	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
SEQ ID NO:88 Hu119-122 的重链 CDR1	SHDMS	5
SEQ ID NO:89 Hu119-122 的重链 CDR2	AINSDGGSTY YPDTMER	17
SEQ ID NO:90 Hu119-122 的重链 CDR3	HYDDYYAWFA Y	11
SEQ ID NO:91 Hu119-122 的轻链 CDR1	RASKSVSTSG YSYMH	15
SEQ ID NO:92 Hu119-122 的轻链 CDR2	LASNLES	7
SEQ ID NO:93 Hu119-122 的轻链 CDR3	QHSRELPLT	9

[1239] 在一些实施例中,OX40激动剂为Hu106-222,其为购自葛兰素史克公司的人类化抗体。Hu106-222的制备和性质描述于美国专利第9,006,399号和第9,163,085号,以及国际专利公开第WO 2012/027328号中,其公开内容以引用的方式并入本文中。表17中阐述Hu106-222 的氨基酸序列。

[1240] 在一实施例中,OX40激动剂包含Hu106-222的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一实施例中,OX40激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:94中所示的序列,并且OX40激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:95中所示的序列和其保守性氨基酸取代。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95中所示的序列至少99%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95中所示的序列至少98%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95中所示的序列至少97%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95中所示的序列至少96%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,OX40激动剂包含各自分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95 中所示的序列至少95%一致的V_H和V_L区。

[1241] 在一实施例中,OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:97和SEQ ID

NO:98中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3域，以及分别具有SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:100和SEQ ID NO:101中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3域。

[1242] 在一实施例中，OX40激动剂为由药物管理机构参考Hu106-222批准的OX40激动剂生物类似单克隆抗体。在一实施例中，生物类似单克隆抗体包含OX40抗体，所述OX40抗体包含与参考药品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97％序列一致性(例如，97％、98％、99％或100％序列一致性)并且与参考药品或参考生物产品相比包含一个或多个转译后修饰的氨基酸序列，其中参考药品或参考生物产品为Hu106-222。在一些实施例中，一个或多个转译后修饰是选自以下中的一个或多个：糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中，生物类似物为授权或提交授权的OX40激动剂抗体，其中以不同于参考药品或参考生物产品的配方的配方提供OX40激动剂抗体，其中参考药品或参考生物产品为Hu106-222。OX40激动剂抗体可由药物管理机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品为Hu106-222。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品为Hu106-222。

[1243] 表33：与Hu106-222相关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列。

[1244]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO:94 Hu106-222 的重链可变区	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS 122	60 120
SEQ ID NO:95 Hu106-222 的轻链可变区	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO:96 Hu106-222 的重链 CDR1	DYSMH	5
SEQ ID NO:97 Hu106-222 的重链 CDR2	WINTETGEPT YADDFKG	17
SEQ ID NO:98 Hu106-222 的重链 CDR3	PYYDYVSYYA MDY	13
SEQ ID NO:99 Hu106-222 的轻链 CDR1	KASQDVSTAV A	11
SEQ ID NO:100 Hu106-222 的轻链 CDR2	SASYLYT	7
SEQ ID NO:101 Hu106-222 的轻链 CDR3	QQHYSTPRT	9

[1245] 在一些实施例中，OX40激动剂抗体为MEDI6469(也称为9B12)。MEDI6469为鼠类单克隆抗体。Weinberg等人，《免疫治疗学杂志》2006,29,575-585。在一些实施例中，OX40 激动剂为由9B12杂交瘤产生的抗体，所述9B12杂交瘤由Biovest公司(美国马萨诸塞州马尔文)寄存，如Weinberg等人，《免疫治疗学杂志》2006,29,575-585中所描述，其公开内容以全文引用的方式并入本文中。在一些实施例中，抗体包含MEDI6469的CDR序列。在一些实施例中，抗体包含MEDI6469的重链可变区序列和/或轻链可变区序列。

[1246] 在一实施例中，OX40激动剂为L106BD(Pharmingen产品号340420)。在一些实施例

中，OX40激动剂包含抗体L106(BD Pharmingen产品号340420)的CDR。在一些实施例中，OX40 激动剂包含抗体L106(BD Pharmingen产品号340420)的重链可变区序列和/或轻链可变区序列。在一实施例中，OX40激动剂为ACT35(圣克鲁斯生物技术，产品目录号20073)。在一些实施例中，OX40激动剂包含抗体ACT35(圣克鲁斯生物技术，产品目录号20073)的CDR。在一些实施例中，OX40激动剂包含抗体ACT35(圣克鲁斯生物技术，产品目录号20073) 的重链可变区序列和/或轻链可变区序列。在一实施例中，OX40激动剂为鼠类单克隆抗体抗mCD134/mOX40(克隆株OX86)，可商购自新罕布什尔州西黎巴嫩的BioXcell公司，InVivoMAb。

[1247] 在一实施例中，OX40激动剂是选自以下中描述的OX40激动剂：国际专利申请公开第 WO 95/12673号、第WO 95/21925号、第WO 2006/121810号、第WO 2012/027328号、第 WO 2013/028231号、第WO 2013/038191号和第WO 2014/148895号；欧洲专利申请EP 0672141；美国专利申请公开第US 2010/136030号、第US 2014/377284号、第US 2015/190506 号和第US 2015/132288号(包括克隆株20E5和12H3)；以及美国专利第7,504,101号、第 7,550,140号、第7,622,444号、第7,696,175号、第7,960,515号、第7,961,515号、第8,133,983 号、第9,006,399号和第9,163,085号，其公开内容以全文引用的方式并入本文中。

[1248] 在一实施例中，OX40激动剂为如结构I-A描绘的OX40激动性融合蛋白(C端Fc抗体片段融合蛋白)或如结构I-B描绘的OX40激动性融合蛋白(N端Fc抗体片段融合蛋白)，或其片段、衍生物、结合物、变体或生物类似物。结构I-A和I-B的性质描述于上文以及美国专利第9,359,420号、第9,340,599号、第8,921,519号和第8,450,460号中，其公开内容以引用的方式并入本文中。表9中给出结构I-A的多肽域的氨基酸序列。Fc域优选地包含完整恒定域(SEQ ID NO:31的氨基酸17-230)、完整铰链域(SEQ ID NO:31的氨基酸1-16)或铰链域的一部分(例如，SEQ ID NO:31的氨基酸4-16)。连接C端Fc抗体的优选连接子可选自SEQ ID NO:32至SEQ ID NO:41中所给出的实施例，包括适合于融合其它多肽的连接子。同样地，表10中给出结构I-B的多肽域的氨基酸序列。如果Fc抗体片段与如结构I-B中的 TNRFSF融合蛋白的N端融合，那么Fc模块的序列优选为示于SEQ ID NO:42中的序列，并且连接子序列优选地选自SED ID NO:43至SEQ ID NO:45中所阐述的那些实施例。

[1249] 在一实施例中，根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个或多个选自以下组成的组的OX40结合域：他沃立珠单抗的可变重链和可变轻链、11D4的可变重链和可变轻链、18D8的可变重链和可变轻链、Hu119-122的可变重链和可变轻链、Hu106-222的可变重链和可变轻链、选自表17中描述的可变重链和可变轻链的可变重链和可变轻链、前述可变重链和可变轻链的任何组合，以及其片段、衍生物、结合物、变体和生物类似物。

[1250] 在一实施例中，根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个或多个包含OX40L 序列的OX40结合域。在一实施例中，结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个或多个包含根据SEQ ID NO:102的序列的OX40结合域。在一实施例中，根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个或多个包含可溶性OX40L序列的OX40结合域。在一实施例中，根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个或多个包含根据SEQ ID NO:103 的序列的OX40结合域。在一实施例中，根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个或多个包含根据SEQ ID NO:104的序列的OX40结合域。

[1251] 在一实施例中，根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个或多个OX40结

合域,所述OX40结合域为包含各自分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59中所示的序列至少95%一致的V_H和V_L区的scFv域,其中V_H和V_L域由连接子连接。在一实施例中,根据结构 I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个或多个OX40结合域,所述OX40结合域为包含各自分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69中所示的序列至少95%一致的V_H和V_L区的scFv 域,其中V_H和V_L域由连接子连接。在一实施例中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个或多个OX40结合域,所述OX40结合域为包含各自分别与SEQ ID NO:78 和SEQ ID NO:79中所示的序列至少95%一致的V_H和V_L区的scFv域,其中V_H和V_L域由连接子连接。在一实施例中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个或多个OX40 结合域,所述OX40结合域为包含各自分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87中所示的序列至少95%一致的V_H和V_L区的scFv域,其中V_H和V_L域由连接子连接。在一实施例中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个或多个OX40结合域,所述OX40结合域为包含各自分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95中所示的序列至少95%一致的V_H和V_L区的scFv域,其中V_H和V_L域由连接子连接。在一实施例中,根据结构I-A或I-B的OX40 激动剂融合蛋白包含一个或多个OX40结合域,所述OX40结合域为包含各自与表14中给出的V_H和V_L序列至少95%一致的V_H和V_L区的scFv域,其中V_H和V_L域由连接子连接。

[1252] 表34:适用作融合蛋白中的OX40结合域(例如,结构I-A和I-B)或scFv OX40激动剂抗体的其它多肽域。

[1253]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）
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 可溶性域	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（替代域）	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI 60 SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ 120 NPGEFCVL 128
SEQ ID NO:105 008 的可变重链	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS 120
SEQ ID NO:106 008 的可变轻链	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO:107 011 的可变重链	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD 60 SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA 120
SEQ ID NO:108 011 的可变轻链	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO:109 021 的可变重链	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS 120
SEQ ID NO:110 021 的可变轻链	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK 108
SEQ ID NO:111 023 的可变重链	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA 60 DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS 120
SEQ ID NO:112 023 的可变轻链	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR 108
SEQ ID NO:113 重链可变区	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY 60 NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS 119
SEQ ID NO:114 轻链可变区	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:115 重链可变区	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY 60 NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS 120 P 121
SEQ ID NO:116 轻链可变区	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD 60 RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:117 人类化抗体的重链可变区	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV 120 SS 122
SEQ ID NO:118 人类化抗体的重链可变区	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV 120 SS 122
SEQ ID NO:119 人类化抗体的轻链可变区	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:120 人类化抗体的轻链可变区	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:121 人类化抗体的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA 120
SEQ ID NO:122 人类化抗体的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS 120

[1254]

SEQ ID NO:123 人类化抗体的轻链可变区	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K 111
SEQ ID NO:124 人类化抗体的轻链可变区	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO:125 重链可变区域	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP 60 EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG 120 EVFYFDYWGQ GTTLTVSS 138
SEQ ID NO:126 轻链可变区	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP 60 GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG 120 TKLELK 126

[1255] 在一实施例中，OX40激动剂为OX40激动性单链融合多肽，其包含(i)第一可溶性OX40 结合域、(ii)第一肽连接子、(iii)第二可溶性OX40结合域、(iv)第二肽连接子和(v)第三可溶性OX40结合域，进一步包含在N末端和/或C末端的额外域，且其中所述额外域为Fab或Fc片段域。在一实施例中，OX40激动剂为OX40激动性单链融合多肽，其包含(i) 第一可溶性OX40结合域、(ii)第一肽连接子、(iii)第二可溶性OX40结合域、(iv)第二肽连接子和(v)第三可溶性OX40结合域，进一步包含在N末端和/或C末端的额外域，其中所述额外域

为Fab或Fc片段域,其中每一个可溶性OX40域缺乏茎区(其有助于三聚合并且提供到细胞膜的一定距离,但不是OX40结合域的一部分)并且第一和第二肽连接子独立地具有3-8个氨基酸的长度。

[1256] 在一实施例中,OX40激动剂为OX40激动性单链融合多肽,其包含(i)第一可溶性肿瘤坏死因子(TNF)超家族细胞因子域、(ii)第一肽连接子、(iii)第二可溶性TNF超家族细胞因子域、(iv)第二肽连接子和(v)第三可溶性TNF超家族细胞因子域,其中每一个可溶性TNF超家族细胞因子域缺乏茎区并且第一和第二肽连接子独立地具有3-8个氨基酸的长度,且其中每个TNF超家族细胞因子域为OX40结合域。

[1257] 在一些实施例中,OX40激动剂为MEDI6383。MEDI6383为OX40激动性融合蛋白并且可如美国专利第6,312,700号中所描述来制备,其公开内容以引用的方式并入本文中。

[1258] 在一实施例中,OX40激动剂为OX40激动性scFv抗体,其包含前述任一个V_H域与前述任一个V_L域连接。

[1259] 在一实施例中,OX40激动剂为Creative Biolabs OX40激动剂单克隆抗体MOM-18455,可商购自美国纽约州希尔兰的Creative Biolabs公司。

[1260] 在一实施例中,OX40激动剂为可商购自美国加利福尼亚州圣地亚哥的BioLegend公司的 OX40激动抗体克隆株Ber-ACT35。

[1261] I.任选的细胞存活率分析

[1262] 任选地,可在引发第一次扩增(有时称为初始大量扩增)之后使用所属领域中已知的标准分析来进行细胞存活率分析。因此,在某些实施例中,方法包含在引发第一次扩增之后进行细胞存活率分析。举例来说,可对具有块状TIL的样品进行锥虫蓝排除分析,其选择性地标记死细胞且进行存活率评估。用于测试存活率的其它分析可以包括(但不限于)阿尔玛蓝分析;和MTT分析。

[1263] 1.细胞计数、存活率、流式细胞测量术

[1264] 在一些实施例中,测量细胞计数和/或存活率。例如但不限于CD3、CD4、CD8和CD56以及本文所公开或描述的任何其它的标记的表达可以通过用抗体(例如(但不限于)可商购自BD Bio-sciences(BD Biosciences,加利福尼亚州圣何塞)的那些抗体)使用FACSCanto™流式细胞仪(BD Biosciences)进行流式细胞测量术来测量。可以使用一次性c芯片血细胞计数器(VWR,伊利诺伊州巴达维亚)对细胞进行人工地计数,并且可以使用所属领域中已知的任何方法(包括(但不限于)锥虫蓝染色)来评估存活率。还可以基于USSN 15/863,634 来分析细胞存活率,其以全文引用的方式并入本文中。还可以基于美国专利公开第 2018/0280436号或国际专利公开第WO/2018/081473号来分析细胞存活率,其两者均出于所有目的而整体并入本文中。

[1265] 在一些情况下,可以使用下文论述的方案立即冷冻保存块状TIL群体。替代地,块状TIL 群体可以经受REP且接着如下文所论述进行冷冻保存。类似地,在基因修饰的TIL将用于疗法的情况下,可以使大量或REP TIL群体进行基因修饰以用于合适的治疗。

[1266] 2.细胞培养物

[1267] 在一实施例中,用于扩增TIL的方法,包括上文所论述以及图8(确切地说,例如图8B 和/或图8C)中示范的那些方法,可以包括使用约5,000mL至约25,000mL细胞培养基、约5,000mL至约10,000mL细胞培养基或约5,800mL至约8,700mL细胞培养基。在一些实施例中,

培养基为无血清培养基。在一些实施例中，引发第一次扩增中的培养基是无血清的。在一些实施例中，第二次扩增中的培养基是无血清的。在一些实施例中，引发第一次扩增和第二次扩增(也称为快速第二次扩增)中的培养基均是无血清的。在一实施例中，扩增TIL 的数量使用不超过一种类型的细胞培养基。可以使用任何合适的细胞培养基，例如AIM-V细胞培养基(L-谷氨酰胺、50μM硫酸链霉素和10μM硫酸庆大霉素)细胞培养基(英杰生命技术有限公司，加利福尼亚州卡尔斯巴德)。在这方面，本发明方法有利地减少扩增TIL数量所需的培养基量和培养基类型的数量。在一实施例中，扩增TIL的数量可以包含以不超过每三天或每四天的频率饲养细胞。在气体可渗透容器中扩增细胞的数量通过降低扩增细胞所必需的饲养频率简化了扩增细胞数量所必需的程序。

[1268] 在一实施例中，第一和/或第二气体可渗透容器中的细胞培养基并未过滤。使用未过滤的细胞培养基可以简化扩增细胞数量必需的程序。在一实施例中，第一和/或第二气体可渗透容器中的细胞培养基不含β-巯基乙醇(BME)。

[1269] 在一实施例中，方法的持续时间包含从哺乳动物获得肿瘤组织样品；将肿瘤组织样品在含有包括IL-2、1×抗原呈递饲养细胞和OKT-3的细胞培养基的第一气体可渗透容器中培养约 1至8天，例如对于引发第一次扩增约7天或对于引发第一次扩增约8天的持续时间；将TIL 转移到第二气体可渗透容器且在含有包括IL-2、2×抗原呈递饲养细胞和OKT-3的细胞培养基的第二气体可渗透容器中扩增TIL的数量，经约7至9天，例如约7天、约8天或约9天的持续时间。

[1270] 在一实施例中，方法的持续时间包含从哺乳动物获得肿瘤组织样品；将肿瘤组织样品在含有包括IL-2、1×抗原呈递饲养细胞和OKT-3的细胞培养基的第一气体可渗透容器中培养约 1至7天，例如对于引发第一次扩增约7天的持续时间；将TIL转移到第二气体可渗透容器且在含有包括IL-2、2×抗原呈递饲养细胞和OKT-3的细胞培养基的第二气体可渗透容器中扩增TIL的数量，经约7至9天，例如约7天、约8天或约9天的持续时间。

[1271] 在一实施例中，方法的持续时间包含从哺乳动物获得肿瘤组织样品；将肿瘤组织样品在含有包括IL-2、1×抗原呈递饲养细胞和OKT-3的细胞培养基的第一气体可渗透容器中培养约 1至7天，例如对于引发第一次扩增约7天的持续时间；将TIL转移到第二气体可渗透容器且在含有包括IL-2、2×抗原呈递饲养细胞和OKT-3的细胞培养基的第二气体可渗透容器中扩增TIL的数量，经约7至10天，例如约7天、约8天、约9天或约10天的持续时间。

[1272] 在一实施例中，在气体可渗透容器中扩增TIL。已将气体可渗透容器用于使用PBMC使用所属领域中已知的方法、组合物和装置，包括描述于美国专利申请公开第2005/0106717 A1 号中的那些来扩增TIL，其公开内容以引用的方式并入本文中。在一实施例中，在气体可渗透袋中扩增TIL。在一实施例中，使用在气体可渗透袋中扩增TIL的细胞扩增系统，例如Xuri 细胞扩增系统W25(通用电气医疗集团)来扩增TIL。在一实施例中，使用在气体可渗透袋中扩增TIL的细胞扩增系统，例如WAVE生物反应器系统，又称为Xuri细胞扩增系统W5(通用电气医疗集团)来扩增TIL。在一实施例中，细胞扩增系统包括体积为选自以下组成的组的气体可渗透细胞袋：约100mL、约200mL、约300mL、约400mL、约500mL、约600mL、约700mL、约800mL、约900mL、约1L、约2L、约3L、约4L、约5L、约6L、约7L、约8L、约9L和约10L。

[1273] 在一实施例中，可以在G-Rex烧瓶(可商购自威尔森沃尔夫制造公司)中扩增TIL。这类实施例允许细胞群体从约5×10^5个细胞/平方厘米扩增到10×10^6与30×10^6个细胞/平

方厘米之间。在一实施例中，这不需要进料。在一实施例中，这不需要进料，只要培养基驻留在G-Rex 烧瓶中的约10cm高度处即可。在一实施例中，这不需要进料但需要添加一种或多种细胞因子。在一实施例中，细胞因子可以大剂量添加而不需要将细胞因子与培养基混合。这类容器、装置和方法为所属领域中已知的且用以扩增TIL，并且包括以下中所描述的那些：美国专利申请公开第US 2014/0377739A1号、国际公开第WO 2014/210036 A1号、美国专利申请公开第us 2013/0115617 A1号、国际公开第WO 2013/188427 A1号、美国专利申请公开第US 2011/0136228 A1号、美国专利第US 8,809,050 B2号、国际公开第WO 2011/072088 A2号、美国专利申请公开第US 2016/0208216 A1号、美国专利申请公开第US 2012/0244133 A1号、国际公开第WO 2012/129201 A1号、美国专利申请公开第US 2013/0102075 A1号、美国专利第US 8,956,860 B2号、国际公开第WO 2013/173835 A1号、美国专利申请公开第US 2015/0175966 A1号，其公开内容以引用的方式并入本文中。这类工艺也描述于Jin等人，《免疫治疗杂志》，2012，35:283-292中。

[1274] J.TIL的任选基因工程改造

[1275] 在一些实施例中，在扩增步骤之前、期间或之后，包括在各自如本文中所提供的封闭无菌的制造工艺期间进一步操控本发明的扩增TIL，以便以瞬时方式改变蛋白质表达。在一些实施例中，瞬时改变的蛋白质表达归因于瞬时基因编辑。在一些实施例中，本发明的扩增TIL 用能够瞬时改变TIL中的蛋白质表达的转录因子(TF)和/或其它分子处理。在一些实施例中，能够瞬时改变蛋白质表达的TF和/或其它分子实现改变的肿瘤抗原表达和/或TIL群体中的肿瘤抗原特异性T细胞数量的改变。

[1276] 在某些实施例中，方法包含基因编辑TIL群体。在某些实施例中，方法包含基因编辑第一TIL群体、第二TIL群体和/或第三TIL群体。

[1277] 在一些实施例中，本发明包括通过核苷酸插入，例如通过核糖核酸(RNA)插入进行基因编辑，包括将信使RNA(mRNA)或小(或短)干扰RNA(siRNA)插入到TIL群体中以促进一种或多种蛋白质的表达或抑制一种或多种蛋白质的表达，以及促进一组蛋白质与抑制另一组蛋白质两者的同时组合。

[1278] 在一些实施例中，本发明的扩增TIL经历蛋白质表达的瞬时改变。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变发生在第一次扩增之前的块状TIL群体中，包括例如在获自例如图8(确切地说，图8B和/或图8C)中所指示的步骤A的TIL群体中。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变发生在第一次扩增期间，包括例如在例如图8(例如图8B和/或图8C)中所指示的步骤B中扩增的TIL群体中。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时变化发生在第一次扩增之后，包括例如第一次与第二次扩增之间的转变中的TIL群体(例如，如本文所描述的第二TIL群体)，获自例如步骤B且包括于如图8所指示的步骤C中的TIL群体。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变发生在第二次扩增之前的块状TIL群体中，包括例如在获自例如步骤C和在其于如图8中所指示的步骤D中的扩增之前的TIL群体中。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变发生在第二次扩增期间，包括例如在例如图8中所指示的步骤B中扩增的TIL群体(例如，第三TIL群体)中。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变发生在第二次扩增之后，包括例如在获自例如图8中所指示的步骤D中的扩增的TIL群体中。

[1279] 在一实施例中，瞬时改变TIL群体中的蛋白质表达的方法包括电穿孔的步骤。电穿孔方法为所属领域中已知的并且描述于例如Tsong，《生物物理杂志(Biophys.J.)》，1991，

60, 297-306和美国专利申请公开第2014/0227237 A1号中,其每一个的公开内容以引用的方式并入本文中。在一实施例中,瞬时改变TIL群体中的蛋白质表达的方法包括磷酸钙转染的步骤。磷酸钙转染方法(磷酸钙DNA沉淀、细胞表面涂布和内吞作用)为所属领域中已知的并且描述于Graham和van der Eb,《病毒学(Virology)》,1973,52,456-467;Wigler等人,《美国科学院院报(Proc.Natl.Acad.Sci.)》,1979,76,1373-1376;以及Chen和Okayarea,《分子细胞生物学(Mol.Cell.Biol.)》,1987,7,2745-2752;以及美国专利第5,593,875号中,其每一个的公开内容以引用的方式并入本文中。在一实施例中,瞬时改变TIL群体中的蛋白质表达的方法包括脂质体转染的步骤。脂质体转染方法,例如采用阳离子脂质N-[1-(2,3-二油基氧基) 丙基]-n,n,n-三甲基氯化铵(DOTMA)与二油酰基磷脂酰乙醇胺(dioleoyl phophotidylethanolamine)于过滤水中的1:1(w/w)脂质体调配物的方法,为所属领域中已知的并且描述于Rose等人,《生物技术(Biotechniques)》,1991,10,520-525和Felgner等人,《美国科学院院刊》,1987,84,7413-7417以及美国专利第5,279,833号;第5,908,635号;第6,056,938 号;第6,110,490号;第6,534,484号和第7,687,070号中,其每一个的公开内容以引用的方式并入本文中。在一实施例中,瞬时改变TIL群体中的蛋白质表达的方法包括使用美国专利第 5,766,902号;第6,025,337号;第6,410,517号;第6,475,994号和第7,189,705号中描述的方法进行转染的步骤,所述专利中的每一个的公开内容以引用的方式并入本文中。

[1280] 在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起干记忆T细胞(Stem Memory T cell;TSCM) 增加。TSCM为经历抗原的中央记忆T细胞的早期祖细胞。TSCM通常显示界定干细胞的长期存活、自我更新和多潜能性能力,且通常对产生有效TIL产物是合乎需要的。TSCM已显示与过继细胞转移的小鼠模型中的其它T细胞子集相比增强的抗肿瘤活性(Gattinoni等人,《自然·医学(Nat Med)》,2009,2011;Gattinoni,《自然癌症综述(Nature Rev.Cancer)》,2012; Cieri等人,《血液(Blood)》,2013)。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变产生具有包含高比例TSCM的组合物的TIL群体。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起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%。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起 TIL群体中的TSCM增加至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍或10倍。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变产生具有至少至少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的TIL群体。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变产生具有至少至少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 的治疗性TIL群体。

[1281] 在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起经历抗原的T细胞再生(rejuvenation)。在一些实施例中,再生包括例如增殖增加、T细胞活化增加和/或抗原识别增加。

[1282] 在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变改变大部分T细胞的表达,以便保存肿瘤衍生的TCR库。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变不改变肿瘤衍生的TCR库。在一些实

施例中,蛋白质表达的瞬时改变维持肿瘤衍生的TCR库。

[1283] 在一些实施例中,蛋白质的瞬时改变引起特定基因的改变表达。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向基因,包括(但不限于)PD-1(也称为PDCD1或CC279)、TGFBR2、CCR4/5、CBLB(CBL-B)、CISH、CCR(嵌合共刺激受体)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH1/2 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和/或cAMP蛋白激酶A (PKA)。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向选自由以下组成的组的基因:PD-1、TGFBR2、CCR4/5、CBLB(CBL-B)、CISH、CCR(嵌合共刺激受体)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH1/2 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和/或cAMP蛋白激酶A(PKA)。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向PD-1。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向TGFBR2。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCR4/5。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CBLB。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CISH。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCR(嵌合共刺激受体)。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向IL-2。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向IL-12。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向IL-15。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向IL-21。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向NOTCH 1/2 ICD。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向TIM3。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向LAG3。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向TIGIT。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向TGFβ。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向 CCR1。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCR2。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCR4。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCR5。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CXCR1。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向 CXCR2。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CSCR3。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCL2(MCP-1)。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCL3 (MIP-1α)。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCL4(MIP1-β)。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCL5(RANTES)。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CXCL1。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CXCL8。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCL22。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCL17。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向VHL。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CD44。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向PIK3CD。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变靶向SOCS1。在一些实施例中,蛋白表达的瞬时改变靶向cAMP蛋白激酶A (PKA)。

[1284] 在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起趋化因子受体的增加和/或过度表达。在一些实施例中,通过瞬时蛋白质表达而过度表达的趋化因子受体包括具有配体的受体,所述配体包括(但不限于)CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1α)、CCL4(MIP1-β)、CCL5(RANTES)、CXCL1、CXCL8、CCL22和/或CCL17。

[1285] 在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起PD-1、CTLA-4、TIM-3、LAG-3、TIGIT、TGFβR2和/或TGFβ的减少和/或表达降低(包括引起例如TGFβ路径阻塞)。在一些实施例中,

蛋白质表达的瞬时改变引起CBLB(CBL-B)的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起CISH的减少和/或表达降低。

[1286] 在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起趋化因子受体的增加和/或过度表达,以便例如改善TIL运输或向肿瘤部位的移动。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起CCR (嵌合共刺激受体)的增加和/或过度表达。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起选自由以下组成的组的趋化因子受体的增加和/或过度表达:CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2和/或CSCR3。

[1287] 在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起白细胞介素的增加和/或过度表达。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起选自由以下组成的组的白细胞介素的增加和/或过度表达:IL-2、IL-12、IL-15和/或IL-21。

[1288] 在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起NOTCH1/2 ICD的增加和/或过度表达。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起VHL的增加和/或过度表达。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起CD44的增加和/或过度表达。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起PIK3CD的增加和/或过度表达。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起 SOCS1的增加和/或过度表达。

[1289] 在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起cAMP蛋白激酶A(PKA)的减少和/或表达降低。

[1290] 在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起选自由以下组成的组的分子的减少和/或表达降低:PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3) 和其组合。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起两种选自由以下组成的组的分子的减少和/或表达降低:PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、 BAFF(BR3)和其组合。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起PD-1和一种选自由以下组成的组的分子的减少和/或表达降低:LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、 PKA、CBLB、BAFF(BR3)和其组合。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起PD-1、LAG-3、CISH、CBLB、TIM3和其组合的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起PD-1和LAG3、CISH、CBLB、TIM3和其组合中的一种的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起PD-1和LAG3的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起PD-1和CISH的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起PD-1和CBLB的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起LAG3和CISH的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起LAG3和CBLB的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起CISH和CBLB的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起TIM3和PD-1的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起 TIM3和LAG3的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起TIM3 和CISH的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起TIM3和CBLB 的减少和/或表达降低。

[1291] 在一些实施例中,将选自由以下组成的组的粘附性分子通过γ逆转录病毒或慢病毒方法插入到第一TIL群体、第二TIL群体或采集的TIL群体中(例如,增加了粘附性分子的表达): CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1和其组合。

[1292] 在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起选自由以下组成的组的分子的减少

和/或表达降低:PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3) 和其组合,以及CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1和其组合的增加和/或表达增强。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变引起选自由以下组成的组的分子的减少和/ 或表达降低:PD-1、LAG3、TIM3、CISH、CBLB和其组合,以及CCR2、CCR4、CCR5、 CXCR2、CXCR3、CX3CR1和其组合的增加和/或表达增强。

[1293] 在一些实施例中,表达降低约5%、约10%、约10%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施例中,表达降低至少约65%、约70%、约75%、约80%、约 85%、约90%或约95%。在一些实施例中,表达降低至少约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施例中,表达降低至少约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施例中,表达降低至少约85%、约90%或约95%。在一些实施例中,表达降低至少约80%。在一些实施例中,表达降低至少约85%,在一些实施例中,表达降低至少约90%。在一些实施例中,表达降低至少约95%。在一些实施例中,表达降低至少约99%。

[1294] 在一些实施例中,表达增加约5%、约10%、约10%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施例中,表达增加至少约65%、约70%、约75%、约80%、约 85%、约90%或约95%。在一些实施例中,表达增加至少约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施例中,表达增加至少约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施例中,表达增加至少约85%、约90%或约95%。在一些实施例中,表达增加至少约80%。在一些实施例中,表达增加至少约85%,在一些实施例中,表达增加至少约90%。在一些实施例中,表达增加至少约95%。在一些实施例中,表达增加至少约99%。

[1295] 在一些实施例中,通过用转录因子(TF)和/或能够瞬时改变TIL中的蛋白质表达的其它分子处理TIL来诱导蛋白质表达的瞬时改变。在一些实施例中,SQZ无载体微流体平台用于胞内递送转录因子(TF)和/或能够瞬时改变蛋白质表达的其它分子。已描述表明将蛋白质(包括转录因子)递送到各种初始人类细胞(包括T细胞)的能力的这类方法(Sharei等人《美国科学院院报(PNAS)》2013,以及Sharei等人《公共科学图书馆综合(PLOS ONE)》2015和Greisbeck等人《免疫学杂志(J.Immunology)》第195卷,2015);参见例如国际专利公开WO 2013/059343A1、WO 2017/008063A1和WO 2017/123663A1,其均以全文引用的方式并入本文中。如国际专利公开WO 2013/059343A1、WO 2017/008063A1和WO 2017/123663A1 中所描述的这类方法可以用于本发明以便将TIL群体暴露于转录因子(TF)和/或能够诱导瞬时蛋白质表达的其它分子,其中所述TF和/或能够诱导瞬时蛋白质表达的其它分子实现增加的肿瘤抗原表达和/或TIL群体中的肿瘤抗原特异性T细胞数量的增加,从而引起TIL群体的重新编程以及与非重新编程的TIL群体相比重新编程TIL群体的疗效增加。在一些实施例中,重新编程引起效应T细胞和/或中央记忆T细胞相对于TIL的起始或先前群体(即,在重新编程之前)群体的亚群增加,如本文所描述。

[1296] 在一些实施例中,转录因子(TF)包括(但不限于)TCF-1、NOTCH1/2 ICD和/或MYB。在一些实施例中,转录因子(TF)为TCF-1。在一些实施例中,转录因子(TF)为NOTCH1/2 ICD。在一些实施例中,转录因子(TF)为MYB。在一些实施例中,将转录因子(TF)与诱导性多能干细胞培养物(induced pluripotent stem cell culture;iPSC)(例如可商购的基因剔除血

清替代物(Gibco/赛默飞世尔)一起给予,以诱导额外TIL重新编程。在一些实施例中,将转录因子(TF)与iPSC混合液一起给予以诱导额外TIL重新编程。在一些实施例中,在无iPSC混合液的情况下给予转录因子(TF)。在一些实施例中,重新编程引起TSCM的百分比增加。在一些实施例中,重新编程使TSCM的百分比增加了约5%、约10%、约10%、约 20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约 70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%TSCM。

[1297] 在一些实施例中,如上文所描述,瞬时改变蛋白质表达的方法可与基因修饰TIL群体的方法组合,所述基因修饰TIL群体的方法包括稳定并入基因以用于产生一种或多种蛋白质的步骤。在某些实施例中,方法包含基因修饰TIL群体的步骤。在某些实施例中,方法包含基因修饰第一TIL群体、第二TIL群体和/或第三TIL群体。在一实施例中,基因修饰TIL群体的方法包括逆转录病毒转导的步骤。在一实施例中,基因修饰TIL群体的方法包括慢病毒转导的步骤。慢病毒转导系统为所属领域中已知的并且描述于例如Levine等人,《美国科学院院报(Proc.Nat'l Acad.Sci.)》,2006,103,17372-77;Zufferey等人,《自然·生物技术(Nat. Biotechnol.)》1997,15,871-75;Dull等人,《病毒学杂志(J.Virology)》,1998,72,8463-71 和美国专利第6,627,442号中,其每一个的公开内容以引用的方式并入本文中。在一实施例中,基因修饰TIL群体的方法包括γ-逆转录病毒转导的步骤。γ-逆转录病毒转导系统为所属领域中已知的并且描述于例如Cepko和Pear,《现代分子生物学实验指南(Cur.Prot.Mol.Biol.)》 1996,9.9.1-9.9.16中,其公开内容以引用的方式并入本文中。在一实施例中,基因修饰TIL 群体的方法包括转座子介导的基因转移的步骤。转座子介导的基因转移系统为所属领域中已知的并且包括以下系统:其中转座酶是以DNA表达载体形式或以可表达的RNA或蛋白质形式提供以使得转基因细胞中不发生转座酶的长期表达,例如,以mRNA(例如,包含帽和poly-A 尾部的mRNA)形式提供的转座酶。包括蛙鱼型Tel样转座酶(睡美人转座酶(SB/Sleeping Beauty transposase)),例如SB10、SB11和SB100x的适合转座子介导的基因转移系统,和具有增加酶促活性的工程改造酶描述于例如Hackett等人,《分子疗法(Mol.Therapy)》2010,18, 674-83和美国专利第6,489,458号中,其每一个的公开内容以引用的方式并入本文中。

[1298] 在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变为通过自递送RNA干扰(sdRNA)诱导的表达降低,所述RNA干扰为具有高百分比的2'-OH取代(典型地氟或-OCH_3)的化学合成的不对称siRNA双螺旋体,其包含20个核苷酸反义(引导)链和在其3'端使用四乙二醇(tetraethylenglycol,TEG)连接子结合到胆固醇的13至15个碱基有义(过客(passenger))链。在一些实施例中,方法包含瞬时改变TIL群体中的蛋白质表达,包含使用自递送RNA 干扰(sdRNA),所述RNA干扰为具有高百分比的2'-OH取代(典型地氟或-OCH_3)的化学合成的不对称siRNA双螺旋体,其包含20个核苷酸反义(引导)链和在其3'端使用四乙二醇(TEG)连接子结合到胆固醇的13至15个碱基有义(过客)链。使用sdRNA的方法已描述于Khvorova和Watts,《自然·生物技术》,2017,35,238-248;Byrne等人,《眼部药理学与治疗学杂志(J.Ocul.Pharmacol.Ther.)》2013,29,855-864;和Ligtenberg等人,《分子疗法》, 2018(出版中)中,其公开内容以引用的方式并入本文中。在一实施例中,在不使用电穿孔、SQZ或其它方法的情况下,替代地使用1至3天时段来完成将sdRNA递送到TIL群体,其中将TIL群体以1μM/10,000个TIL的浓度暴露于培养基中的sdRNA。在某些实施例中,方法包含将sdRNA递送

到TIL群体，包含将TIL群体以1μM/10,000个TIL的浓度暴露于培养基中的sdRNA，持续1至3天之间的时段。在一实施例中，将sdRNA递送到TIL群体是使用1至3天时段来完成，其中将TIL群体以10μM/10,000个TIL的浓度暴露于培养基中的 sdRNA。在一实施例中，将sdRNA递送到TIL群体是使用1至3天时段来完成，其中将TIL 群体以50μM/10,000个TIL的浓度暴露于培养基中的sdRNA。在一实施例中，将sdRNA递送到TIL群体是使用1至3天时段来完成，其中将TIL群体以0.1μM/10,000个TIL与50 μM/10,000个TIL之间的浓度暴露于培养基中的sdRNA。在一实施例中，将sdRNA递送到 TIL群体是使用1至3天时段来完成，其中将TIL群体以0.1μM/10,000个TIL与50μM/10,000 个TIL之间的浓度暴露于培养基中的sdRNA，其中通过向培养基中添加新鲜sdRNA来使暴露于sdRNA进行两次、三次、四次或五次。其它合适的工艺描述于例如美国专利申请公开第 US 2011/0039914 A1号、第US 2013/0131141 A1号和第US 2013/0131142 A1号以及美国专利第9,080,171号中，其公开内容以引用的方式并入本文中。

[1299] 在一些实施例中，在制造期间将sdRNA插入到TIL群体中。在一些实施例中，sdRNA编码干扰NOTCH1/2 ICD、PD-1、CTLA-4 TIM-3、LAG-3、TIGIT、TGFβ、TGFBR2、cAMP 蛋白激酶A(PKA)、BAFF BR3、CISH和/或CBLB的RNA。在一些实施例中，基于基因沉默的百分比，例如如由流式细胞测量术和/或qPCR所评估来确定表达的降低。在一些实施例中，表达降低约5％、约10％、约10％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％或约95％。在一些实施例中，表达降低至少约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％或约 95％。在一些实施例中，表达降低至少约75％、约80％、约85％、约90％或约95％。在一些实施例中，表达降低至少约80％、约85％、约90％或约95％。在一些实施例中，表达降低至少约85％、约90％或约95％。在一些实施例中，表达降低至少约80％。在一些实施例中，表达降低至少约85％，在一些实施例中，表达降低至少约90％。在一些实施例中，表达降低至少约95％。在一些实施例中，表达降低至少约99％。

[1300] 基于化学修饰的siRNA的可自递送RNAi技术可以用于本发明的方法，以成功地将sdRNA递送到如本文所描述的TIL。具有不对称siRNA结构的主链修饰和疏水性配体的组合(参见例如Ligtenberg等人，《分子疗法》，2018和US20160304873)允许sdRNA在无需额外调配物和方法的情况下通过简单添加到培养基中，利用sdRNA的核酸酶稳定性来渗透培养的哺乳动物细胞。这种稳定性允许仅通过维持sdRNA在培养基中的活性浓度来支持恒定水平的 RNAi介导的靶基因活性降低。尽管不受理论束缚，但sdRNA的主链稳定实现基因表达效应的降低延长，其可在非分裂细胞中持续数月。

[1301] 在一些实施例中，发生超过95％的TIL转染效率和各种特定sdRNA对靶标的表达降低。在一些实施例中，用完全修饰的序列替换含有若干未经修饰的核糖残基的sdRNA，以增加 RNAi效应的效力和/或长久性。在一些实施例中，表达效应的降低维持12小时、24小时、36小时、48小时、5天、6天、7天或8天或更久。在一些实施例中，表达效应的降低在TIL 的sdRNA处理后的10天或更长时间减小。在一些实施例中，维持靶标表达的表达降低超过70％。在一些实施例中，通过TIL维持靶标表达的表达降低超过70％。在一些实施例中， PD-1/PD-L1路径中的表达降低允许TIL展现更有效的体内效果，在一些实施例中，这在一些实施例中是由于避免了PD-1/PD-L1路径的抑制作用。在一些实施例中，通过sdRNA的PD-1 的

表达降低引起TIL增殖增加。

[1302] 小干扰RNA(siRNA)(有时称为短干扰RNA或沉默RNA)为双链RNA分子,长度通常为19-25个碱基对。siRNA用于RNA干扰(RNAi)中,其中其干扰具有互补核苷酸序列的特定基因的表达。

[1303] 双链DNA(dsRNA)可通常用于定义包含一对互补RNA链(通常为有义(过客)和反义(引导)链)的任何分子,并且可包括单链突出区。与siRNA相比,术语dsRNA通常是指包括siRNA分子的序列的前体分子,所述siRNA分子通过裂解酶系统(包括切丁酶(Dicer)) 的作用而从较大dsRNA分子释放。

[1304] sdRNA(可自递送的RNA)为新类别的经共价修饰的RNAi化合物,其与传统siRNA相比不需要递送媒剂进入细胞且具有改进的药理学。“可自递送的RNA”或“sdRNA”为疏水性修饰的RNA干扰-反义杂交体,证实其在活体外初始细胞中和活体内局部给药后均为高度有效的。已证实稳固吸收和/或沉默而无毒性。sdRNA通常为具有最小双链区域的不对称的化学修饰的核酸分子。sdRNA分子典型地含有单链区和双链区,且可在分子的单链区和双链区两者内含有各种化学修饰。另外,sdRNA分子可连接到疏水性结合物,例如如本文所描述的常规和高级固醇型分子。sdRNA和用于制造这类sdRNA的相关方法也广泛地描述于例如US20160304873、WO2010033246、WO2017070151、WO2009102427、WO2011119887、WO2010033247A2、WO2009045457、WO2011119852中,所述文献均出于所有目的而以全文引用的方式并入本文中。为了优化sdRNA结构、化学反应、靶向位置、序列偏好等,开发了专有算法且将其用于sdRNA效力预测(参见例如US 20160304873)。基于这些分析,通常将功能性sdRNA序列定义为在1μM浓度下表达降低超过70%,概率超过40%。

[1305] 在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列展现靶基因的表达降低70%。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列展现靶基因的表达降低75%。

[1306] 在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列展现靶基因的表达降低80%。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列展现靶基因的表达降低85%。在一些实施例中,用于本发明中的 sdRNA序列展现靶基因的表达降低90%。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列展现靶基因的表达降低95%。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列展现靶基因的表达降低99%。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约0.25μM至约4μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约0.25μM 的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约 0.5μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约0.75μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的 sdRNA序列在以约1.0μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约1.25μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约1.5μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约1.75μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约2.0μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约2.25μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约2.5μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约2.75μM的浓

度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中，用于本发明中的sdRNA序列在以约 3.0μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中，用于本发明中的sdRNA序列在以约3.25μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中，用于本发明中的sdRNA序列在以约3.5μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中，用于本发明中的sdRNA序列在以约3.75μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中，用于本发明中的sdRNA序列在以约4.0μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。

[1307] 在一些实施例中，寡核苷酸试剂包含一种或多种修饰以增加治疗剂的稳定性和/或有效性，并且实现将寡核苷酸有效递送到待治疗的细胞或组织。这类修饰可包括2'-O-甲基修饰、2'-O-氟修饰、二硫代磷酸酯修饰、2'F修饰的核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸和/或2'脱氧核苷酸。在一些实施例中，修饰寡核苷酸以包括一种或多种疏水性修饰，包括例如固醇、胆固醇、维生素D、萘基、异丁基、苯甲基、吲哚、色氨酸和/或苯基。在另一特定实施例中，化学修饰的核苷酸为硫代磷酸酯、2'-O-甲基、2'脱氧、疏水性修饰和硫代磷酸酯的组合。在一些实施例中，糖可以被修饰并且修饰的糖可包括(但不限于)D-核糖、2'-O-烷基(包括2'-O- 甲基和2'-O-乙基)(即，2'-烷氧基)、2'-氨基、2'-S-烷基、2'-卤基(包括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、丙烯基和氰基等。在一个实施例中，糖部分可为己糖且并入到如所描述的寡核苷酸中(Augustyns,K.等人，《核酸研究(Nucl.Acids.Res.)》，18:4711(1992))。

[1308] 在一些实施例中，本发明的双链寡核苷酸在其整个长度上是双链的，即，在分子的任一端不具有突出单链序列，即为平末端的。在一些实施例中，个别核酸分子可具有不同长度。换句话说，本发明的双链寡核苷酸在其整个长度上不是双链的。举例来说，当使用两个分开的核酸分子时，分子中的一个(例如，包含反义序列的第一分子)可以长于与其杂交的第二分子(留下单链分子的一部分)。在一些实施例中，当使用单个核酸分子时，在任一端处的分子的一部分可保持单链。

[1309] 在一些实施例中，本发明的双链寡核苷酸含有错配和/或环或凸出，但在寡核苷酸长度的至少约70％上是双链的。在一些实施例中，本发明的双链寡核苷酸在寡核苷酸长度的至少约 80％上是双链的。在另一实施例中，本发明的双链寡核苷酸在寡核苷酸长度的至少约90％-95％上是双链的。在一些实施例中，本发明的双链寡核苷酸在寡核苷酸长度的至少约96％-98％上是双链的。在一些实施例中，本发明的双链寡核苷酸含有至少或最多1、2、3、4、5、6、7、 8、9、10、11、12、13、14或15个错配。

[1310] 在一些实施例中，可以例如通过修饰3'或5'键联来基本上保护寡核苷酸免受核酸酶影响 (例如，美国专利第5,849,902号和WO 98/13526)。举例来说，可以通过掺合“封端基团”而使寡核苷酸具有抗性。如本文中所使用的术语“封端基团”是指可以作为用于合成的保护基或偶合基团(例如，FITC、丙基(CH_2-CH_2-CH_3)、乙二醇(-O-CH_2-CH_2-O-)磷酸酯(PO_3^{2-})、氢膦酸酯或氨基亚磷酸酯)连接至寡核苷酸或核单体的取代基(例如，除OH基团以外)。“封端基团”还可包括“末端封端基团”或“核酸外切酶封端基团”，其保护寡核苷酸的5'和3'端，包括修饰的核苷酸和非核苷酸核酸外切酶抗性结构。

[1311] 在一些实施例中，sdRNA内的连续多核苷酸的至少一部分是通过取代键，例如硫代磷酸酯键连接。

[1312] 在一些实施例中，化学修饰可导致细胞吸收增强至少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。在一些实施例中，C或U残基中的至少一个包括疏水性修饰。在一些实施例中，多个C和U含有疏水性修饰。在一些实施例中，至少10％、15％、20％、30％、40％、50％、55％、60％、65％、70％、 75％、80％、85％、90％或至少95％的C和U可含有疏水性修饰。在一些实施例中，所有C 和U均含有疏水性修饰。

[1313] 在一些实施例中，sdRNA或sd-rxRNA通过并入可质子化胺而展现增强的sd-rxRNA分子的核内体释放。在一些实施例中，将可质子化胺并入于有义链中(在RISC加载之后丢弃的分子的一部分中)。在一些实施例中，本发明的sdRNA化合物包含不对称化合物，所述不对称化合物包含(具有10-15个碱基长的有效RISC进入所需的)双螺旋体区和4-12个核苷酸长的单链区；具有13个核苷酸双螺旋体。在一些实施例中，采用6个核苷酸单链区。在一些实施例中，sdRNA的单链区包含2-12个硫代磷酸酯核苷酸间键(称为硫代磷酸酯修饰)。在一些实施例中，采用6-8个硫代磷酸酯核苷酸间键。在一些实施例中，本发明的sdRNA化合物还包括独特的化学修饰模式，其提供稳定性并且与RISC进入相容。

[1314] 举例来说，引导链还可以通过任何化学修饰进行修饰，所述化学修饰在不干扰RISC进入的情况下确认稳定性。在一些实施例中，引导链中的化学修饰模式包括大部分的C和U核苷酸被2'F修饰并且5'端被磷酸化。

[1315] 在一些实施例中，sdRNA或sd-rxRNA中至少30％的核苷酸被修饰。在一些实施例中，在sdRNA或sd-rxRNA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％的核苷酸被修饰。在一些实施例中，sdRNA或sd-rxRNA中100％的核苷酸被修饰。

[1316] 在一些实施例中，sdRNA分子具有最小双链区。在一些实施例中，双链的分子的区域在 8-15个核苷酸长的范围内。在一些实施例中，双链的分子的区域为8、9、10、11、12、13、14或15个核苷酸长。在一些实施例中，双链区为13个核苷酸长。在引导链与过客链之间可能存在100％互补，或在引导链与过客链之间可能存在一个或多个错配。在一些实施例中，在双链分子的一端，分子为平末端的或具有一个核苷酸突出物。在一些实施例中，分子的单链区介于4-12个核苷酸长之间。在一些实施例中，单链区可以为4、5、6、7、8、9、10、11 或12个核苷酸长。在一些实施例中，单链区还可以小于4个或大于12个核苷酸长。在某些实施例中，单链区为6或7个核苷酸长。

[1317] 在一些实施例中，sdRNA分子具有增加的稳定性。在一些情况下，化学修饰的sdRNA或sd-rxRNA分子在培养基中的半衰期比1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或超过24小时(包括任何中间值)更长。在一些实施例中，sd-rxRNA在培养基中的半衰期比12小时更长。

[1318] 在一些实施例中，针对增加的效力和/或降低的毒性优化sdRNA。在一些实施例中，引导链和/或过客链的核苷酸长度和/或引导链和/或过客链中硫代磷酸酯修饰的数量可在一些方面影响RNA分子的效力，而用2'-O-甲基(2'OMe)修饰替换2'-氟(2'F)修饰可在一些

方面影响分子的毒性。在一些实施例中，预测分子的2'F含量降低以降低分子的毒性。在一些实施例中，RNA分子中硫代磷酸酯修饰的数量可影响分子到细胞中的吸收，例如将分子被动吸收到细胞中的效率。在一些实施例中，sdRNA不具有2'F修饰，但其特征在于在细胞吸收和组织渗透方面的功效相同。

[1319] 在一些实施例中，引导链的长度为大致18-19个核苷酸并且具有大致2-14个磷酸酯修饰。举例来说，引导链可含有2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或超过14个磷酸酯修饰的核苷酸。引导链可含有一种或多种修饰，其赋予增加的稳定性而不干扰RISC进入。磷酸酯修饰的核苷酸(例如硫代磷酸酯修饰的核苷酸)可以位于3'端、5'端或分散在整个引导链中。在一些实施例中，引导链的3'末端10个核苷酸含有1、2、3、4、5、6、7、8、9或 10个硫代磷酸酯修饰的核苷酸。引导链还可含有2'F和/或2'OMe修饰，其可位于整个分子中。在一些实施例中，在引导链中的一个位置的核苷酸(在引导链的最接近5'位置的核苷酸)被 2'OMe修饰和/或磷酸化。引导链内的C和U核苷酸可以被2'F修饰。举例来说，在19nt引导链的位置2-10(或不同长度的引导链中的对应位置)的C和U核苷酸可以被2'F修饰。引导链内的C和U核苷酸还可以被2'OMe修饰。举例来说，在19nt引导链的位置11-18(或不同长度的引导链中的对应位置)的C和U核苷酸可以被2'OMe修饰。在一些实施例中，在引导链的最接近3'端的核苷酸未经修饰。在某些实施例中，引导链内的大部分C和U被2'F 修饰且引导链的5'端被磷酸化。在其它实施例中，位置1和在位置11-18的C或U被2'OMe 修饰，并且引导链的5'端被磷酸化。在其它实施例中，位置1和在位置11-18的C或U被2'OMe 修饰，引导链的5'端被磷酸化，并且在位置2-10的C或U被2'F修饰。

[1320] 可自递送的RNAi技术提供一种用RNAi试剂直接转染细胞而不需要额外调配物或技术的方法。转染难以转染的细胞系的能力、高活体内活性和简单使用为相对于传统的基于siRNA 的技术呈现显著功能优势的组合物和方法的特征，且因此在与本发明的TIL中的靶基因的表达降低的方法有关的若干实施例中采用sdRNA方法。sdRNAi方法允许将化学合成的化合物直接递送到广泛范围的初始细胞和组织(离体和活体内)。本文在本发明的一些实施例中描述的sdRNA可商购自美国马萨诸塞州伍斯特市(Worcester,MA,USA)的Advirna LLC。

[1321] sdRNA形成为疏水性修饰的siRNA-反义寡核苷酸杂交结构，并且公开于例如Byrne等人， 2013年12月，《眼部药理学与治疗学杂志(J.Ocular Pharmacology and Therapeutics)》,29(10): 855-864中，其以全文引用的方式并入本文中。

[1322] 在一些实施例中，可以使用无菌电穿孔将sdRNA寡核苷酸递送到本文所描述的TIL。在某些实施例中，方法包含对TIL群体进行无菌电穿孔以递送sdRNA寡核苷酸。

[1323] 在一些实施例中，可以将寡核苷酸与跨膜递送系统组合递送到细胞。在一些实施例中，这种跨膜递送系统包含脂质、病毒载体等。在一些实施例中，寡核苷酸试剂为不需要任何递送剂的自递送RNAi试剂。在某些实施例中，方法包含使用跨膜递送系统将sdRNA寡核苷酸递送到TIL群体。

[1324] 将寡核苷酸和寡核苷酸组合物与本文所描述的TIL接触(例如使与其接触，在本文中也称为向其给予或递送)并且由TIL吸收，包括通过TIL的被动吸收。可以在第一次扩增(例如步骤B)期间、在第一次扩增之后(例如，在步骤C期间)、在第二次扩增之前或期间(例如，在步骤D之前或期间)、在步骤D之后和在步骤E中的采集之前、在步骤F中的采集期间或

之后、在步骤F中最终调配和/或转移到输注袋之前或期间以及在步骤F中的任何任选的冷冻保存步骤之前将sdRNA添加到如本文所描述的TIL中。此外，可以在从步骤F中的任何冷冻保存步骤解冻之后添加sdRNA。在一实施例中，可以将一种或多种靶向如本文所描述的基因(包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH和CBLB)的sdRNA以选自由以下组成的组的浓度添加到包含TIL和其它试剂的细胞培养基中：100nM至20mM、200nM至10mM、500nm 至1mM、1μM至100μM和1μM至100μM。在一实施例中，可以将一种或多种靶向如本文所描述的基因(包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH和CBLB)的sdRNA以选自由以下组成的组的量添加到包含TIL和其它试剂的细胞培养基中：0.1μM sdRNA/10,000个TIL/100μL 培养基、0.5μM sdRNA/10,000个TIL/100μL培养基、0.75μM sdRNA/10,000个TIL/100μL 培养基、1μM sdRNA/10,000个TIL/100μL培养基、1.25μM sdRNA/10,000个TIL/100μL培养基、1.5μM sdRNA/10,000个TIL/100μL培养基、2μM sdRNA/10,000个TIL/100μL培养基、 5μM sdRNA/10,000个TIL/100μL培养基或10μM sdRNA/10,000个TIL/100μL培养基。在一实施例中，可以在pre-REP或REP阶段期间一天两次、一天一次、每两天、每三天、每四天、每五天、每六天或每七天将一种或多种靶向如本文所描述的基因(包括PD-1、LAG-3、TIM-3、 CISH和CBLB)的sdRNA添加到TIL培养物中。

[1325] 本发明的寡核苷酸组合物(包括sdRNA)可以在扩增工艺期间，例如通过将高浓度的 sdRNA溶解于细胞培养基中且允许足够的时间进行被动吸收来与如本文所描述的TIL接触。在某些实施例中，本发明方法包含使TIL群体与如本文所描述的寡核苷酸组合物接触。在某些实施例中，方法包含将寡核苷酸(例如sdRNA)溶解于细胞培养基中且使细胞培养基与TIL 群体接触。TIL可以是如本文所描述的第一群体、第二群体和/或第三群体。

[1326] 在一些实施例中，可以通过适合的技术识别方法(包括磷酸钙、DMSO、甘油或葡聚糖)、电穿孔法或通过使用所属领域中已知的方法转染(例如使用阳离子、阴离子或中性脂质组合物或脂质体)来增强寡核苷酸至细胞中的递送(参见例如，WO 90/14074;WO 91/16024; WO 91/17424;美国专利第4,897,355号;Bergan等人，1993，《核酸研究(Nucleic acids research.)》21:3567)。

[1327] 在一些实施例中，使用超过一个sdRNA来减少靶基因的表达。在一些实施例中，将靶向 PD-1、TIM-3、CBLB、LAG3和/或CISH的sdRNA中的一个或多个一起使用。在一些实施例中，PD-1sdRNA与TIM-3、CBLB、LAG3和/或CISH中的一个或多个一起使用以减少超过一种基因靶标的表达。在一些实施例中，LAG3sdRNA与靶向CISH的sdRNA组合使用以减少两种靶标的基因表达。在一些实施例中，本文中的靶向PD-1、TIM-3、CBLB、LAG3和/或CISH中的一个或多个的sdRNA可商购自美国马萨诸塞州伍斯特(Worcester,MA,USA) 的Advirna LLC。

[1328] 在一些实施例中，sdRNA靶向选自以下组成的组的基因：PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其组合。在一些实施例中，sdRNA 靶向选自以下组成的组的基因：PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、 PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其组合。在一些实施例中，一个sdRNA靶向PD-1且另一个 sdRNA靶向选自以下组成的组的基因：LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、 PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其组合。在一些实施例中，sdRNA靶向选自以下的基因：PD-1、 LAG-3、CISH、CBLB、TIM3及其组合。在一些实施例中，sdRNA靶向选自PD-1以及LAG3、 CISH、CBLB、TIM3及其组合中的一个的基因。在一些实施例中，一个sdRNA靶向PD-1 且一个sdRNA靶向LAG3。在一些实施例中，一个sdRNA靶向PD-1且一个sdRNA靶向CISH。在一些实施例中，一个sdRNA靶向PD-1且一个sdRNA靶向CBLB。在一

些实施例中，一个 sdRNA靶向LAG3且一个sdRNA靶向CISH。在一些实施例中，一个sdRNA靶向LAG3且一个sdRNA靶向CBLB。在一些实施例中，一个sdRNA靶向CISH且一个sdRNA靶向CBLB。在一些实施例中，一个sdRNA靶向TIM3且一个sdRNA靶向PD-1。在一些实施例中，一个 sdRNA靶向TIM3且一个sdRNA靶向LAG3。在一些实施例中，一个sdRNA靶向TIM3且一个sdRNA靶向CISH。在一些实施例中，一个sdRNA靶向TIM3且一个sdRNA靶向CBLB。

[1329] 如上文所论述，本发明的实施例提供已经通过基因编辑进行基因修饰以增强其治疗作用的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。本发明的实施例包含通过核苷酸插入(RNA或DNA)到TIL群体中的基因编辑，以促进一种或多种蛋白质的表达并且抑制一种或多种蛋白质的表达，以及其组合。本发明的实施例还提供将TIL扩增成治疗群体的方法，其中所述方法包含对TIL 进行基因编辑。存在可用于基因修饰TIL群体的多种基因编辑技术，其适合于根据本发明使用。

[1330] 在一些实施例中，所述方法包含基因修饰TIL群体的方法，其包括稳定并入用于产生一种或多种蛋白质的基因的步骤。在一实施例中，基因修饰TIL群体的方法包括逆转录病毒转导的步骤。在一实施例中，基因修饰TIL群体的方法包括慢病毒转导的步骤。慢病毒转导系统为所属领域中已知的并且描述于例如Levine等人，《美国科学院院报》，2006,103,17372-77; Zufferey等人，《自然·生物技术》1997,15,871-75;Dull等人，《病毒学杂志》，1998,72,8463-71 和美国专利第6,627,442号中，其每一个的公开内容以引用的方式并入本文中。在一实施例中，基因修饰TIL群体的方法包括γ-逆转录病毒转导的步骤。γ-逆转录病毒转导系统为所属领域中已知的并且描述于例如Cepko和Pear,《现代分子生物学实验指南》1996,9.9.1-9.9.16中，其公开内容以引用的方式并入本文中。在一实施例中，基因修饰TIL群体的方法包括转座子介导的基因转移的步骤。转座子介导的基因转移系统为所属领域中已知的并且包括以下系统：其中转座酶是以DNA表达载体形式或以可表达的RNA或蛋白质形式提供以使得转基因细胞中不发生转座酶的长期表达，例如，以mRNA(例如，包含帽和poly-A尾部的mRNA)形式提供的转座酶。包括蛙鱼型Tel样转座酶(睡美人转座酶(SB/Sleeping Beauty transposase))，例如SB10、SB11和SB100x的适合转座子介导的基因转移系统，和具有增加酶促活性的工程改造酶描述于例如Hackett等人，《分子疗法(Mol.Therapy)》2010,18,674-83和美国专利第 6,489,458号中，其每一个的公开内容以引用的方式并入本文中。

[1331] 在一实施例中，方法包含基因修饰TIL群体(例如，如本文所描述的第一群体、第二群体和/或第三群体)的方法。在一些实施例中，基因修饰TIL群体的方法包括稳定并入用于产生或抑制(例如，沉默)一种或多种蛋白质的基因的步骤。在一实施例中，基因修饰TIL群体的方法包括电穿孔的步骤。电穿孔方法为所属领域中已知的并且描述于例如Tsong,《生物物理杂志》,1991,60,297-306和美国专利申请公开第2014/0227237 A1号中，其每一个的公开内容以引用的方式并入本文中。可以使用所属领域中已知的其它电穿孔方法，例如美国专利第5,019,034号;第5,128,257号;第5,137,817号;第5,173,158号;第5,232,856号;第 5,273,525号;第5,304,120号;第5,318,514号;第6,010,613号和第6,078,490号中描述的那些，其公开内容以引用的方式并入本文中。在一实施例中，电穿孔方法为无菌电穿孔方法。在一实施例中，电穿孔方法为脉冲式电穿孔方法。在一实施例中，电穿孔方法为包含以下步骤的脉冲式电穿孔方法：用脉冲式电场处理TIL以改变、操控或引起限定且控制的、永

久性或暂时性的TIL变化，包含向TIL施加至少三个单一的由操作员控制的独立编程的场强度等于或大于100V/cm的DC电脉冲序列的步骤，其中至少三个DC电脉冲序列具有以下特征中的一个、两个或三个：(1)至少三个脉冲中的至少两个的脉冲幅度彼此不同；(2)至少三个脉冲中的至少两个的脉冲宽度彼此不同；以及(3)至少三个脉冲中的第一组两个脉冲的第一脉冲间隔不同于至少三个脉冲中的第二组两个脉冲的第二脉冲间隔。在一实施例中，电穿孔方法为包含以下步骤的脉冲式电穿孔方法：用脉冲式电场处理TIL以改变、操控或引起限定且控制的、永久性或暂时性的TIL变化，包含向TIL施加至少三个单一的由操作员控制的独立编程的场强度等于或大于100V/cm的DC电脉冲序列的步骤，其中至少三个脉冲中的至少两个的脉冲幅度彼此不同。在一实施例中，电穿孔方法为包含以下步骤的脉冲式电穿孔方法：用脉冲式电场处理TIL以改变、操控或引起限定且控制的、永久性或暂时性的TIL变化，包含向TIL施加至少三个单一的由操作员控制的独立编程的场强度等于或大于100V/cm的DC 电脉冲序列的步骤，其中至少三个脉冲中的至少两个的脉冲宽度彼此不同。在一实施例中，电穿孔方法为包含以下步骤的脉冲式电穿孔方法：用脉冲式电场处理TIL以改变、操控或引起限定且控制的、永久性或暂时性的TIL变化，包含向TIL施加至少三个单一的由操作员控制的独立编程的场强度等于或大于100V/cm的DC电脉冲序列的步骤，其中至少三个脉冲中的第一组两个脉冲的第一脉冲间隔不同于至少三个脉冲中的第二组两个脉冲的第二脉冲间隔。在一实施例中，电穿孔方法为包含以下步骤的脉冲式电穿孔方法：用脉冲式电场处理TIL 以诱导TIL中的孔形成，包含向TIL施加至少三个场强度等于或大于100V/cm的DC电脉冲序列的步骤，其中至少三个DC电脉冲序列具有以下特征中的一个、两个或三个：(1)至少三个脉冲中的至少两个的脉冲幅度彼此不同；(2)至少三个脉冲中的至少两个的脉冲宽度彼此不同；以及(3)至少三个脉冲中的第一组两个脉冲的第一脉冲间隔不同于至少三个脉冲中的第二组两个脉冲的第二脉冲间隔，以使得诱导孔持续相对较长的时间段，并且使得TIL的存活率得以保持。在一实施例中，基因修饰TIL群体的方法包括磷酸钙转染的步骤。磷酸钙转染方法(磷酸钙DNA沉淀、细胞表面涂布和内吞作用)为所属领域中已知的并且描述于 Graham和van der Eb，《病毒学》，1973,52,456-467；Wigler等人，《美国科学院院报》，1979, 76,1373-1376；以及Chen和Okayarea，《分子细胞生物学》，1987,7,2745-2752；以及美国专利第5,593,875号中，其每一个的公开内容以引用的方式并入本文中。在一实施例中，基因修饰TIL群体的方法包括脂质体转染的步骤。脂质体转染方法，例如采用阳离子脂质N-[1-(2,3- 二油基氧基)丙基]-n,n,n-三甲基氯化铵(DOTMA)与二油酰基磷脂酰乙醇胺于过滤水中的1:1 (w/w)脂质体调配物的方法，为所属领域中已知的并且描述于Rose等人，《生物技术》，1991, 10,520-525和Felgner等人，《美国科学院院刊》，1987,84,7413-7417以及美国专利第5,279,833 号；第5,908,635号；第6,056,938号；第6,110,490号；第6,534,484号和第7,687,070号中，其每一个的公开内容以引用的方式并入本文中。在一实施例中，基因修饰TIL群体的方法包括使用美国专利第5,766,902号；第6,025,337号；第6,410,517号；第6,475,994号和第7,189,705 号中描述的方法进行转染的步骤，所述专利中的每一个的公开内容以引用的方式并入本文中。TIL可以是如本文所描述的TIL的第一群体、第二群体和/或第三群体。

[1332] 根据一实施例，基因编辑过程可以包含使用介导在一个或多个免疫检查点基因处产生双链或单链断裂的可编程核酸酶。这类可编程核酸酶通过在特定基因组位点引入断裂

来实现精确的基因组编辑,即,其依赖于识别基因组内的将核酸酶域靶向此位置并且介导在靶序列处产生双链断裂的特定DNA序列。DNA中的双链断裂随后将内源性修复机构募集带断裂位点以通过非同源末端连接(non-homologous end-joining;NHEJ)或同源性定向修复(homology-directed repair;HDR)介导基因组编辑。因此,断裂的修复可导致引入破坏(例如,沉默、抑制或增强)靶基因产物的插入/缺失突变。

[1333] 已开发实现特定位点基因组编辑的主要类别的核酸酶,包括锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样核酸酶(TALEN)和CRISPR相关核酸酶(例如,CRISPR/Cas9)。这些核酸酶系统可以基于其DNA识别模式而广泛地分为两个类别:ZFN和TALEN通过蛋白质-DNA相互作用实现特定DNA结合,而CRISPR系统(例如Cas9)通过与靶DNA直接碱基配对的短RNA 向导分子且通过蛋白质-DNA相互作用而靶向特定DNA序列。参见例如Cox等人,《自然医学(Nature Medicine)》,2015,第21卷,第2期。

[1334] 可根据本发明的TIL扩增方法使用的基因编辑方法的非限制性实例包括CRISPR方法、TALE方法和ZFN方法,其更详细地描述于下文中。根据一实施例,将TIL扩增成治疗性群体的方法可根据本文所描述的方法(例如,GEN 3工艺)的任何实施例或如 PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所描述来进行,其中所述方法进一步包含通过CRISPR方法、TALE方法或ZFN方法中的一种或多种对TIL的至少一部分进行基因编辑,以便产生可提供增强的治疗作用的TIL。根据一实施例,可以通过将基因编辑的TIL与未修饰的TIL进行活体外比较(例如,通过评估与未修饰TIL相比的活体外效应功能、细胞因子分布等)来评估基因编辑的TIL的改进的治疗作用。在某些实施例中,方法包含使用CRISPR、TALE和/或ZFN方法对TIL群体进行基因编辑。

[1335] 在本发明的一些实施例中,电穿孔用于递送基因编辑系统,例如CRISPR、TALEN和ZFN 系统。在本发明的一些实施例中,电穿孔系统为流式电穿孔系统。适合于本发明的一些实施例的适合流式电穿孔系统的实例为可商购的MaxCyte STX系统。存在可适用于本发明的若干替代的可商购电穿孔仪器,例如购自BTX-哈佛仪器公司(BTX-Harvard Apparatus)的 AgilePulse系统或ECM 830、Cellaxess Elektra(Cellectricon)、核转染仪(Lonza/Amaxa)、 GenePulser MXcell(伯乐(BIORAD))、iPorator-96(致伸科技股份有限公司(Primax))或 siPORTer96(Ambion)。在本发明的一些实施例中,电穿孔系统与TIL扩增方法的其余部分形成封闭式无菌系统。在本发明的一些实施例中,电穿孔系统为如本文所描述的脉冲式电穿孔系统,并且与TIL扩增方法的其余部分形成封闭式无菌系统。

[1336] 将TIL扩增成治疗性群体的方法可以根据本文所描述的方法(例如,工艺GEN 3)的任何实施例或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所描述来进行,其中所述方法进一步包含通过CRISPR方法(例如,CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1) 对TIL的至少一部分进行基因编辑。根据特定实施例,在TIL扩增工艺期间使用CRISPR方法使得一个或多个免疫检查点基因的表达在治疗性TIL群体的至少一部分中沉默或减少。或者,在TIL扩增工艺期间使用CRISPR方法使得一个或多个免疫检查点基因的表达在治疗性 TIL群体的至少一部分中增强。

[1337] CRISPR表示“成簇的规律间隔的短回文重复序列”。使用CRISPR系统进行基因编辑的方法在本文中又称为CRISPR方法。存在三种类型的并入RNA和Cas蛋白质并且可根据本发明使用的CRISPR系统:I型、II型和III型。II型CRISPR(以Cas9为例)为最充分表征系统之

一。

[1338] 根据细菌和古细菌的天然防御机制(单细胞微生物的域)调适CRISPR技术。这些生物体使用CRISPR衍生的RNA和各种Cas蛋白质(包括Cas9)以通过切碎并破坏外来侵入物的DNA来阻止病毒和其它外来物体的攻击。CRISPR为具有两种不同特征的DNA特化区:存在核苷酸重复序列和间隔子。核苷酸的重复序列分布于整个CRISPR区中,其中外来DNA (间隔子)的短片段穿插于重复序列当中。在II型CRISPR/Cas系统中,间隔子整合于CRISPR 基因组位点内并转录且加工到短CRISPR RNA(crRNA)中。这些crRNA粘接到反式激活 crRNA(tracrRNA)并通过Cas蛋白引导致病性DNA的序列特异性裂解和沉默。由Cas9蛋白进行的靶识别需要crRNA内的“种子”序列和crRNA结合区的含有保守性二核苷酸的前间区序列邻近基序(protospacer adjacent motif;PAM)序列上游。通过重新设计crRNA,CRISPR/Cas系统进而可以进行重新靶向以裂解几乎任何DNA序列。天然系统中的crRNA和 tracrRNA可以简化成具有大致100个核苷酸的单向导RNA(sgRNA)以用于基因工程改造。CRISPR/Cas系统通过共递送表达Cas9内核酸酶和必要crRNA组分的质粒来直接便携到人类细胞。Cas蛋白的不同变体可用于降低靶向局限性(例如,Cas9的直系同源物,例如Cpf1)。

[1339] 可以通过CRISPR方法对TIL进行永久性地基因编辑而沉默或抑制的基因的非限制性实例包括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和GUCY1B3。

[1340] 可以通过CRISPR方法对TIL进行永久性地基因编辑而增强的基因的非限制性实例包括 CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15和IL-21。

[1341] 通过CRISPR方法改变靶基因序列的表达并且可根据本发明的实施例使用的系统、方法和组合物的实例描述于美国专利第8,697,359;第8,993,233号;第8,795,965号;第8,771,945 号;第8,889,356号;第8,865,406号;第8,999,641号;第8,945,839号;第8,932,814号;第 8,871,445号;第8,906,616号和第8,895,308号中,其以引用的方式并入本文中。实施CRISPR 方法的资源,例如表达CRISPR/Cas9和CRISPR/Cpf1的质粒,可商购自例如金斯瑞(GenScript) 的公司。

[1342] 在一实施例中,如本文所描述,可以使用如美国专利第US 9790490号中所描述的CRISPR/Cpf1系统进行TIL群体的基因修饰,所述专利的公开内容以引用的方式并入本文中。

[1343] 将TIL扩增成治疗性群体的方法可以根据本文所描述的方法(例如,工艺2A)的任何实施例或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所描述来进行,其中所述方法进一步包含通过TALE方法对TIL的至少一部分进行基因编辑。根据特定实施例,在TIL扩增工艺期间使用TALE方法使得一个或多个免疫检查点基因的表达在治疗性TIL 群体的至少一部分中沉默或减少。或者,在TIL扩增工艺期间使用TALE方法使得一个或多个免疫检查点基因的表达在治疗性TIL群体中的至少一部分中增强。

[1344] TALE表示“转录激活因子样效应子”蛋白,其包括TALEN(“转录激活因子样效应子核酸酶”)。使用TALE系统进行基因编辑的方法在本文中还可以称作TALE方法。TALE为来自

植物病原菌属黄单胞菌(Xanthomonas)的天然存在的蛋白质,并且含有由一系列33-35 个氨基酸重复域构成的DNA结合域,每个结合域都识别一个碱基对。通过称为重复可变二残基(RVD)的两个高变氨基酸来确定TALE特异性。模块化TALE重复序列连接在一起以识别相邻DNA序列。DNA结合域中的特定RVD识别靶基因座中的碱基,从而提供组装可预测DNA-结合域的结构性特征。TALE的DNA结合域与IIS型FokI核酸内切酶的催化域融合以形成可靶向的TALE核酸酶。为诱导位点特异性突变,由14-20个碱基对间隔区间隔开的两个单独TALEN臂使得FokI单体非常接近以二聚合并产生靶向的双链断裂。

[1345] 利用各种组装方法的若干大型系统性研究已表明,TALE重复序列可组合以识别几乎任何的自定义序列。也可以通过Cellectis Bioresearch(法国巴黎(Paris,France))、Transposagen Biopharmaceuticals(美国肯塔基州列克星敦(Lexington,KY,USA))和Life Technologies(美国纽约格兰德岛(Grand Island,NY,USA))商购专门设计的TALE阵列。适用于本发明的TALE 和TALEN方法描述于美国专利申请公开第US 2011/0201118 A1号;第US 2013/0117869 A1 号;第US 2013/0315884 A1号;第US 2015/0203871 A1号和第US 2016/0120906 A1号中,其公开内容以引用的方式并入本文中。

[1346] 可以通过TALE方法对TIL进行永久性地基因编辑而沉默或抑制的基因的非限制性实例包括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和GUCY1B3。

[1347] 可以通过TALE方法对TIL进行永久性地基因编辑而增强的基因的非限制性实例包括 CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15和IL-21。

[1348] 通过TALE方法改变靶基因序列的表达并且可根据本发明的实施例使用的系统、方法和组合物的实例描述于美国专利第8,586,526号中,其以引用方式并入本文中。

[1349] 将TIL扩增成治疗性群体的方法可以根据本文所描述的方法(例如,工艺GEN 3)的任何实施例或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所描述来进行,其中所述方法进一步包含通过锌指或锌指核酸酶方法对TIL的至少一部分进行基因编辑。根据特定实施例,在TIL扩增工艺期间使用锌指方法使得一个或多个免疫检查点基因的表达在治疗性TIL群体的至少一部分中沉默或减少。或者,在TIL扩增工艺期间使用锌指方法使得一个或多个免疫检查点基因的表达在治疗性TIL群体的至少一部分中增强。

[1350] 单个锌指在保守性ββα构型中含有大致30个氨基酸。在α螺旋的表面上的数个氨基酸通常在DNA主沟中接触3bp,具有不同水平的选择性。锌指具有两个蛋白质域。第一域为DNA 结合域,其包括真核转录因子并且含有锌指。第二域为核酸酶域,其包括FokI限制酶并且负责催化裂解DNA。

[1351] 个别ZFN的DNA结合域通常含有三个至六个个别锌指重复序列并且各自能够识别9至 18个碱基对。如果锌指域对其预期靶位点具有特异性,那么识别总共18个碱基对的一对3- 指ZFN在理论上能够靶向哺乳动物基因组中的单个基因座。一种产生新的锌指阵列的方法应组合具有已知特异性的较小锌指“模块”。最常见的模块组装工艺包括组合三个单独的锌指,所述锌指各自能够识别3个碱基对DNA序列以产生可识别9个碱基对靶位点的3-指阵

列。或者，基于选择的途径，例如寡聚库工程(oligomerized pool engineering;OPEN)可用于从考虑邻近指之间的内容相关交互的随机库中选择新的锌指阵列。工程改造的锌指为可商购的；Sangamo Biosciences(美国加利福尼亚州里奇蒙)与西格玛-奥德里奇公司(美国密苏里州圣路易斯)合作开发了用于锌指构造的专用平台(CompoZr®)。

[1352] 可以通过锌指方法对TIL进行永久性地基因编辑而沉默或抑制的基因的非限制性实例包括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和GUCY1B3。

[1353] 可以通过锌指方法对TIL进行永久性地基因编辑而增强的基因的非限制性实例包括 CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15和IL-21。

[1354] 通过可以根据本发明的实施例使用的锌指方法改变靶基因序列的表达的系统、方法和组合物的实例描述于美国专利第6,534,261号；第6,607,882号；第6,746,838号；第6,794,136 号；第6,824,978号；第6,866,997号；第6,933,113号；第6,979,539号；第7,013,219号；第 7,030,215号；第7,220,719号；第7,241,573号；第7,241,574号；第7,585,849号；第7,595,376 号；第6,903,185号和第6,479,626号中，其以引用的方式并入本文中。

[1355] 用于通过可以根据本发明的实施例使用的锌指方法改变靶基因序列的表达的系统、方法和组合物的其它实例描述于Beane等人，《分子疗法》，2015,23 1380-1390，其公开内容以引用的方式并入本文中。

[1356] 在一些实施例中，对TIL进行任选地基因工程改造以包括额外功能，包括(但不限于) 高亲和力T细胞受体(TCR)，例如靶向肿瘤相关抗原的TCR(例如MAGE-1、HER2或 NY-ESO-1)，或结合于肿瘤相关细胞表面分子(例如，间皮素)或谱系限制的细胞表面分子 (例如，CD19)的嵌合抗原受体(CAR)。在某些实施例中，所述方法包含对TIL群体进行基因工程改造以包括高亲和力T细胞受体(TCR)，例如靶向肿瘤相关抗原的TCR(例如MAGE-1、HER2或NY-ESO-1)，或结合于肿瘤相关细胞表面分子(例如，间皮素)或谱系限制的细胞表面分子(例如，CD19)的嵌合抗原受体(CAR)。适当地，TIL群体可以是如本文所描述的第一群体、第二群体和/或第三群体。

[1357] K.用于TIL制造的封闭系统

[1358] 本发明提供封闭系统在TIL培养工艺期间的用途。这类封闭系统允许避免和/或减少微生物污染，允许使用较少的烧瓶，并且允许成本降低。在一些实施例中，封闭系统使用两个容器。

[1359] 这类封闭系统为所属领域中众所周知的并且可见于例如 http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm和https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/ GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm中。

[1360] 无菌连接装置(STCD)在两段相容的导管之间产生无菌焊缝。此程序准许各种容器和导管直径的无菌连接。在一些实施例中，封闭系统包括鲁尔锁和如例如实例G中所描述的热密封系统。在一些实施例中，通过注射器在无菌条件下进入封闭系统以维持系统的无菌性质和封闭性质。在一些实施例中，采用如实例G中所描述的封闭系统。在一些实施例中，根

据实例G,“最终调配和填充”部分中描述的方法将TIL调配到最终产物调配物容器中。

[1361] 在一些实施例中,从获得肿瘤碎片时起,封闭系统使用一个容器直到准备将TIL用于向患者给药或冷冻保存。在一些实施例中,当使用两个容器时,第一容器为封闭的G-容器并且在不打开第一封闭G-容器的情况下将TIL群体离心并转移到输注袋中。在一些实施例中,当使用两个容器时,输注袋为含有HypoThermosol的输注袋。封闭系统或封闭的TIL细胞培养系统的特征在于一旦已添加肿瘤样品和/或肿瘤碎片后,就将系统从外部紧密地密封,以形成不含细菌、真菌侵入和/或任何其它微生物污染的封闭环境。

[1362] 在一些实施例中,微生物污染的减少介于约5%与约100%之间。在一些实施例中,微生物污染的减少介于约5%与约95%之间。在一些实施例中,微生物污染的减少介于约5%与约 90%之间。在一些实施例中,微生物污染的减少介于约10%与约90%之间。在一些实施例中,微生物污染的减少介于约15%与约85%之间。在一些实施例中,微生物污染的减少为约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约97%、约98%、约99%或约100%。

[1363] 封闭系统允许在不存在微生物污染和/或微生物污染明显减少的情况下的TIL生长。

[1364] 此外,TIL细胞培养环境的pH、二氧化碳分压和氧气分压各自随着培养细胞而变化。因此,即使循环适合于细胞培养的培养基,但封闭环境仍需要恒定地保持为用于TIL增殖的最优环境。为此目的,需要借助于传感器监测封闭环境的培养液体内的pH、二氧化碳分压和氧气分压的物理因素,其信号用以控制安装在培养环境入口的气体交换器,并根据培养液体中的变化实时调节封闭环境的气体分压以便优化细胞培养环境。在一些实施例中,本发明提供一种封闭细胞培养系统,其在封闭环境的入口处并入配备有监测装置的气体交换器,所述监测装置测量封闭环境的pH、二氧化碳分压和氧气分压,并通过基于来自监测装置的信号自动地调节气体浓度来优化细胞培养环境。

[1365] 在一些实施例中,连续地或间歇地控制封闭环境内的压力。也就是说,可以借助例如压力维持装置来改变封闭环境中的压力,由此确保所述空间适合于正压状态下的TIL生长,或促进负压状态下的流体渗出,且因此促进细胞增殖。此外,通过间歇地施加负压,有可能借助于封闭环境体积的暂时收缩而均匀地且有效地替换封闭环境中的循环液体。

[1366] 在一些实施例中,可以取代或添加用于TIL增殖的最优培养组分,并且可以添加包括例如IL-2和/或OKT3以及组合的因子。

[1367] L.任选的TIL冷冻保存

[1368] 块状TIL群体(例如第二TIL群体)或扩增的TIL群体(例如第三群体TIL群体)可以任选地进行冷冻保存。在一些实施例中,对治疗性TIL群体进行冷冻保存。在一些实施例中,对第二次扩增之后采集的TIL进行冷冻保存。在一些实施例中,在图8(具体地说,例如图 8B和/或图8C)的示范性步骤F中对TIL进行冷冻保存。在一些实施例中,将TIL冷冻保存在输注袋中。在一些实施例中,将TIL放入输注袋之前进行冷冻保存。在一些实施例中,将 TIL冷冻保存且不放入输注袋中。在一些实施例中,使用冷冻保存培养基进行冷冻保存。在一些实施例中,冷冻保存培养基含有二甲亚砜(DMSO)。这通常通过将TIL群体放入冷冻溶液(例如85%补体灭活的AB血清和15%二甲亚砜(DMSO))中来实现。将含细胞的溶液放入极低温瓶

中且在-80℃下存储24小时，任选的转移到气态氮冷冻柜中用于冷冻保存。参见 Sadeghi等人，《肿瘤学学报》，2013,52,978-986。

[1369] 适当时，从冷冻柜中移出细胞且将其在37℃水浴中解冻直到大致4/5的溶液被解冻。通常将细胞再悬浮于完全培养基中并任选地洗涤一次或多次。在一些实施例中，如所属领域中已知，可以对解冻的TIL进行计数并评估存活率。

[1370] 在一优选实施例中，使用CS10冷冻保存培养基(CryoStor 10，BioLife Solutions)对TIL 群体进行冷冻保存。在一优选实施例中，使用含有二甲亚砜(DMSO)的冷冻保存培养基对 TIL群体进行冷冻保存。在一优选实施例中，使用1:1(体积:体积)比率的CS10和细胞培养基对TIL群体进行冷冻保存。在一优选实施例中，使用进一步包含额外IL-2的约1:1(体积: 体积)比率的CS10和细胞培养基对TIL群体进行冷冻保存。

[1371] 如上文所论述，且如图8(具体地说，例如图8B和/或图8C)中提供的步骤A至E中所示范，可以在整个TIL扩增工艺中的多个点处进行冷冻保存。在一些实施例中，可以冷冻保存第二次扩增(如例如根据图8(具体地说，例如图8B和/或图8C)的步骤D所提供)之后的已扩增TIL群体。通常可以通过将TIL群体放入冷冻溶液(例如85％补体灭活的AB血清和15％二甲亚砜(DMSO))中来实现冷冻保存。将含细胞的溶液放入极低温瓶中且在-80℃下存储24小时，任选的转移到气态氮冷冻柜中用于冷冻保存。参见Sadeghi等人，《肿瘤学学报》，2013,52,978-986。在一些实施例中，将TIL冷冻保存在5％DMSO中。在一些实施例中，将TIL冷冻保存在细胞培养基加5％DMSO中。在一些实施例中，根据实例D中提供的方法冷冻保存TIL。

[1372] 适当时，从冷冻柜中移出细胞且将其在37℃水浴中解冻直到大致4/5的溶液被解冻。通常将细胞再悬浮于完全培养基中并任选地洗涤一次或多次。在一些实施例中，如所属领域中已知，可以对解冻的TIL进行计数并评估存活率。

[1373] 在一些情况下，可以使用下文论述的方案立即冷冻保存步骤B TIL群体。替代地，可以对块状TIL群体进行步骤C和步骤D并接着在步骤D之后进行冷冻保存。类似地，在基因修饰的TIL将用于疗法的情况下，可以对步骤B或步骤D TIL群体进行基因修饰以用于合适的治疗。

[1374] M.已扩增TIL的表型特征

[1375] 在一些实施例中，分析TIL在扩增之后的多种表型标记的表达，包括本文中和实例中所描述的那些。在一实施例中，检测一种或多种表型标记的表达。在一些实施例中，在步骤B 中第一次扩增后，分析TIL的表型特征。在一些实施例中，在步骤C中的过渡期间分析TIL 的表型特征。在一些实施例中，在根据步骤C的过渡期间和在冷冻保存之后分析TIL的表型特征。在一些实施例中，在根据步骤D的第二次扩增之后，分析TIL的表型特征。在一些实施例中，在根据步骤D的两次或更多次扩增之后，分析TIL的表型特征。

[1376] 在一些实施例中，标记是选自CD8和CD28组成的组。在一些实施例中，检测CD8的表达。在一些实施例中，检测CD28的表达。在一些实施例中，与其它工艺相比，根据本发明工艺产生的TIL上的CD8和/或CD28表达更高(例如，如例如图8(具体地说，例如图8B 和/或图8C)中提供的Gen 3工艺，与如例如图8(具体地说，例如图8B和/或图8C)中提供的2A工艺相比)。在一些实施例中，与其它工艺相比，根据本发明工艺产生的TIL上的 CD8表达更高(例如，如例如图8(具体地说，例如图8B)中提供的Gen 3工艺，与如例如图8(具体地说，例如图8B和/

或图8C)中提供的2A工艺相比)。在一些实施例中,与其它工艺相比,根据本发明工艺产生的TIL上的CD28表达更高(例如,如例如图8(具体地说,例如图8B和/或图8C)中提供的Gen 3工艺,与如例如图8(具体地说,例如图8A)中提供的2A工艺相比)。在一些实施例中,高CD28表达表示更年轻更持久的TIL表型。在一实施例中,测量一种或多种调节标记的表达。

[1377] 在一实施例中,在本文中所描述的扩增肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的方法的任一个步骤期间没有进行基于CD8和/或CD28表达来选择第一TIL群体、第二TIL群体、第三TIL群体或采集的TIL群体。

[1378] 在一些实施例中,与其它工艺相比,根据本发明工艺产生的TIL上的中央记忆细胞百分比更高(例如,如例如图8(具体地说,例如图8B和/或图8C)中提供的Gen 3工艺,与如例如图8(具体地说,例如图8A)中提供的2A工艺相比)。在一些实施例中,中央记忆细胞的记忆标记是选自CCR7和CD62L组成的组。

[1379] 在一些实施例中,CD4+和/或CD8+TIL记忆亚群可划分成不同的记忆亚群。在一些实施例中,CD4+和/或CD8+TIL包含幼稚(CD45RA+CD62L+)TIL。在一些实施例中,CD4+和 /或CD8+TIL包含中央记忆(CM;CD45RA-CD62L+)TIL。在一些实施例中,CD4+和/或 CD8+TIL包含效应子记忆(EM;CD45RA-CD62L-)TIL。在一些实施例中,CD4+和/或CD8+ TIL包含RA+效应子记忆/效应子(TEMRA/TEFF;CD45RA+CD62L+)TIL。

[1380] 在一些实施例中,TIL表达多于一种选自以下组成的组的标记:颗粒酶B、穿孔素和粒溶素。在一些实施例中,TIL表达颗粒酶B。在一些实施例中,TIL表达穿孔素。在一些实施例中,TIL表达粒溶素。

[1381] 在一实施例中,使用细胞因子释放分析还可以评估再刺激TIL的细胞因子释放。在一些实施例中,可以评估TIL的干扰素-γ(IFN-γ)分泌。在一些实施例中,通过ELISA分析测量 IFN-γ分泌。在一些实施例中,在快速的第二次扩增步骤之后,在如例如图8(具体地说,例如图8B和/或图8C)中提供的步骤D之后,通过ELISA分析测量IFN-γ分泌。在一些实施例中,通过IFN-γ(IFN-gamma)分泌测量TIL健康状况。在一些实施例中,IFN-γ分泌指示活性TIL。在一些实施例中,采用了IFN-γ产生的效力分析。IFN-γ产生为细胞毒性潜力的另一种量度。可以通过测定用针对CD3、CD28和CD137/4-1BB的抗体刺激的TIL培养基中的细胞因子IFN-γ含量来测量IFN-γ产生。可以通过测量IFN-γ释放来测定这些受刺激TIL的培养基中的IFN-γ含量。在一些实施例中,与如图8(具体地说,例如图8A)中提供的2A 工艺中的例如步骤D相比,如图8(具体地说,例如图8B和/或图8C)中提供的Gen 3工艺中的例如步骤D TIL中的IFN-γ产生增加指示步骤D TIL的细胞毒性潜力增加。在一些实施例中,IFN-γ分泌增加一倍、两倍、三倍、四倍或五倍或更多。在一些实施例中,IFN-γ分泌增加一倍。在一些实施例中,IFN-γ分泌增加两倍。在一些实施例中,IFN-γ分泌增加三倍。

[1382] 在一些实施例中,IFN-γ分泌增加四倍。在一些实施例中,IFN-γ分泌增加五倍。在一些实施例中,使用Quantikine ELISA试剂盒测量IFN-γ。在一些实施例中,在离体TIL中测量IFN-γ。在一些实施例中,在离体TIL(包括通过本发明的方法(包括例如图8B方法)产生的TIL) 中测量IFN-γ。

[1383] 在一些实施例中,能够分泌至少一倍、两倍、三倍、四倍或五倍或更多倍IFN-γ的TIL 为通过本发明的扩增方法(包括例如图8B和/或图8C方法)产生的TIL。在一些实施例中,能够分泌至少多一倍IFN-γ的TIL为通过本发明的扩增方法(包括例如图8B和/或图8C

方法) 产生的TIL。在一些实施例中,能够分泌至少多两倍IFN-γ的TIL为通过本发明的扩增方法 (包括例如图8B和/或图8C方法)产生的TIL。在一些实施例中,能够分泌至少多三倍IFN-γ的TIL为通过本发明的扩增方法(包括例如图8B和/或图8C方法)产生的TIL。在一些实施例中,能够分泌至少多四倍IFN-γ的TIL为通过本发明的扩增方法(包括例如图8B和/或图 8C方法)产生的TIL。在一些实施例中,能够分泌至少多五倍IFN-γ的TIL为通过本发明的扩增方法(包括例如图8B和/或图8C方法)产生的TIL。

[1384] T淋巴细胞和B淋巴细胞的多种抗原受体是通过有限但大量的基因片段的体细胞重组产生的。这些基因片段:V(可变)、D(多样性)、J(连接)和C(恒定)确定免疫球蛋白与T细胞受体(TCR)的结合特异性和下游应用。本发明提供一种用于产生TIL的方法,所述TIL展现并且增加T细胞库多样性。在一些实施例中,通过本发明方法获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中,与新采集的TIL和/或使用除本文提供的那些方法之外的其它方法(包括例如除图8(具体地说,例如图8B和/或图8C)中实施的那些方法之外的方法)制备的TIL相比,通过本发明方法获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中,与新采集的TIL和/或使用称为工艺2A的方法(如图8(具体地说,例如图8A)中所示)制备的TIL相比,通过本发明方法获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中,第一次扩增中获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中,多样性的增加是免疫球蛋白多样性和/或T细胞受体多样性的增加。在一些实施例中,免疫球蛋白的多样性是在免疫球蛋白重链中。在一些实施例中,免疫球蛋白的多样性是在免疫球蛋白轻链中。在一些实施例中,多样性是在T细胞受体中。在一些实施例中,多样性是在选自以下组成的组的一种T细胞受体中:α、β、γ 和δ受体。在一些实施例中,T细胞受体(TCR)α和/或β的表达增加。在一些实施例中,T细胞受体(TCR)α的表达增加。在一些实施例中,T细胞受体 (TCR)β的表达增加。在一些实施例中,TCRab(即,TCRα/β)的表达增加。在一些实施例中,基于样品内独特肽CDR的数量,与其它工艺(例如称为Gen 2的工艺)相比,如本文所描述的工艺(例如,Gen 3工艺)示出更高的克隆多样性(参见,例如图12-14)。

[1385] 在一些实施例中,可以通过检查一种或多种标记来确定TIL的活化和耗尽。在一些实施例中,可以使用多色流式细胞测量术确定活化和耗尽。在一些实施例中,标记的活化和耗尽包括但不限于一种或多种选自以下组成的组的标记:CD3、PD-1、2B4/CD244、CD8、CD25、BTLA、KLRG、TIM-3、CD194/CCR4、CD4、TIGIT、CD183、CD69、CD95、CD127、CD103、和/或LAG-3。在一些实施例中,标记的活化和耗尽包括但不限于一种或多种选自以下组成的组的标记:BTLA、CTLA-4、ICOS、Ki67、LAG-3、PD-1、TIGIT和/或TIM-3。在一些实施例中,标记的活化和耗尽包括但不限于一种或多种选自以下组成的组的标记:BTLA、CTLA-4、 ICOS、Ki67、LAG-3、CD103+/CD69+、CD103+/CD69-、PD-1、TIGIT和/或TIM-3。在一些实施例中,可以确定和/或分析T细胞标记(包括活化和耗尽标记)以检查T细胞活化、抑制或功能。在一些实施例中,T细胞标记可以包括但不限于一种或多种选自以下组成的组的标记:TIGIT、CD3、FoxP3、Tim-3、PD-1、CD103、CTLA-4、LAG-3、BTLA-4、ICOS、Ki67、 CD8、CD25、CD45、CD4和/或CD59。

[1386] 在一些实施例中,在冷冻保存之后检测表型表征。

[1387] M.其它工艺实施例

[1388] 在一些实施例中,本发明提供一种将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群体的方法,其包含:(a)通过将获自个体的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片而从个体切除的肿

瘤中获得第一TIL群体;(b)通过将第一TIL群体培养在包含IL-2和OKT-3的细胞培养基中来进行引发第一次扩增,其中引发第一次扩增进行约1至7天或约约1至8天以获得第二TIL 群体,其中第二TIL群体的数量大于第一TIL群体;(c)通过使第二TIL群体与包含IL-2、OKT-3和外源性抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基接触来进行快速第二次扩增,以产生第三TIL群体,其中快速第二次扩增进行约1至11天或约1至10天,以获得第三TIL群体,其中第三TIL群体为治疗性TIL群体;以及(d)采集从步骤(c)获得的治疗性TIL群体。在一些实施例中,将快速第二次扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现规模扩大的培养:(1)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第二TIL群体来进行快速第二次扩增,持续约3至4天或约2至4天的时段,且接着(2)实现第二TIL 群体从小规模培养转移到大于第一容器的第二容器(例如,G-REX 500MCS容器)中,其中在第二容器中,在较大规模培养中培养来自小规模培养的第二TIL群体,持续约4至7天或约4至8天的时段。在一些实施例中,将快速扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现向外扩展的培养:(1)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的第一小规模培养中培养第二TIL群体来进行快速第二次扩增,持续约3至4天的时段,且接着(2)实现第二 TIL群体从第一小规模培养转移并分配到至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、 14、15、16、17、18、19或20个大小与第一容器相等的第二容器中,其中在每个第二容器中,在第二小规模培养中培养从第一小规模培养转移到这个第二容器的第二TIL群体部分,持续约4至7天或约约4至8天的时段。在一些实施例中,将快速扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现向外扩展并且规模扩大的培养:(1)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第二TIL群体来进行快速第二次扩增,持续约3至4 天或约2至4天的时段,且接着(2)实现第二TIL群体从第一小规模培养转移并分配到至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个大小比第一容器更大的第二容器(例如,G-REX 500MCS容器)中,其中在每个第二容器中,在较大规模培养中培养从小规模培养转移到这个第二容器中的第二TIL群体部分,持续约4至7天或约4至8天的时段。在一些实施例中,将快速扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现向外扩展并且规模扩大的培养:(1)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第二TIL群体来进行快速第二次扩增,持续约3至4天的时段,且接着(2) 实现第二TIL群体从第一小规模培养转移并分配到2、3或4个大小比第一容器更大的第二容器(例如G-REX 500MCS容器)中,其中在每个第二容器中,在较大规模培养中培养从小规模培养转移到这个第二容器的第二TIL群体部分,持续约5至7天的时段。

[1389] 在一些实施例中,本发明提供一种将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群体的方法,其包含:(a)通过将获自个体的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片而从个体切除的肿瘤中获得第一TIL群体;(b)通过将第一TIL群体培养在包含IL-2和OKT-3的细胞培养基中来进行引发第一次扩增,其中引发第一次扩增进行约1至8天以获得第二TIL群体,其中第二TIL群体的数量大于第一TIL群体;(c)通过使第二TIL群体与包含IL-2、OKT-3和外源性抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基接触来进行快速第二次扩增,以产生第三TIL群体,其中快速第二次扩增进行约1至8天,以获得第三TIL群体,其中第三TIL群体为治疗性TIL 群体;以及(d)采集从步骤(c)获得的治疗性TIL群体。在一些实施例中,将快速第二次扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现规模扩大的培养:(1)通过在第一容器(例如, G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第二TIL群体来进行快速第二次扩增,持续约 2至4天的时段,

且接着(2)实现第二TIL群体从小规模培养转移到大于第一容器的第二容器(例如,G-REX 500MCS容器)中,其中在第二容器中,在较大规模培养中培养来自小规模培养的第二TIL群体,持续约4至8天的时段。在一些实施例中,将快速扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现向外扩展的培养:(1)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS 容器)中的第一小规模培养中培养第二TIL群体来进行快速第二次扩增,持续约2至4天的时间段,且接着(2)实现第二TIL群体从第一小规模培养转移并分配到至少2、3、4、5、6、 7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个大小与第一容器相等的第二容器中,其中在每个第二容器中,在第二小规模培养中培养从第一小规模培养转移到这个第二容器的第二TIL群体部分,持续约4至6天的时段。在一些实施例中,将快速扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现向外扩展并且规模扩大的培养:(1)通过在第一容器(例如, G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第二TIL群体来进行快速第二次扩增,持续约 2至4天的时段,且接着(2)实现第二TIL群体从第一小规模培养转移并分配到至少2、3、 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个大小比第一容器更大的第二容器(例如,G-REX 500MCS容器)中,其中在每个第二容器中,在较大规模培养中培养从小规模培养转移到这个第二容器中的第二TIL群体部分,持续约4至6天的时段。在一些实施例中,将快速扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现向外扩展并且规模扩大的培养:(1)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第二 TIL群体来进行快速第二次扩增,持续约3至4天的时段,且接着(2)实现第二TIL群体从第一小规模培养转移并分配到2、3或4个大小比第一容器更大的第二容器(例如G-REX 500MCS容器)中,其中在每个第二容器中,在较大规模培养中培养从小规模培养转移到这个第二容器的第二TIL群体部分,持续约4至5天的时段。

[1390] 在一些实施例中,本发明提供一种将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群体的方法,其包含:(a)通过将获自个体的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片而从个体切除的肿瘤中获得第一TIL群体;(b)通过将第一TIL群体培养在包含IL-2和OKT-3的细胞培养基中来进行引发第一次扩增,其中引发第一次扩增进行约1至7天以获得第二TIL群体,其中第二TIL群体的数量大于第一TIL群体;(c)通过使第二TIL群体与包含IL-2、OKT-3和外源性抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基接触来进行快速第二次扩增,以产生第三TIL群体,其中快速第二次扩增进行约1至11天,以获得第三TIL群体,其中第三TIL群体为治疗性TIL 群体;以及(d)采集从步骤(c)获得的治疗性TIL群体。在一些实施例中,将快速第二次扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现规模扩大的培养:(1)通过在第一容器(例如, G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第二TIL群体来进行快速第二次扩增,持续约 3至4天的时段,且接着(2)实现第二TIL群体从小规模培养转移到大于第一容器的第二容器(例如,G-REX 500MCS容器)中,其中在第二容器中,在较大规模培养中培养来自小规模培养的第二TIL群体,持续约4至7天的时段。在一些实施例中,将快速扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现向外扩展的培养:(1)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS 容器)中的第一小规模培养中培养第二TIL群体来进行快速第二次扩增,持续约3至4天的时段,且接着(2)实现第二TIL群体从第一小规模培养转移并分配到至少2、3、4、5、6、 7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个大小与第一容器相等的第二容器中,其中在每个第二容器中,在第二小规模培养中培养从第一小规模培养转移到这个第二容器的第二TIL群体部分,持续约4至7天的时段。在一些实施例中,将快速扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现

向外扩展并且规模扩大的培养：(1)通过在第一容器(例如，G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第二TIL群体来进行快速第二次扩增，持续约 3至4天的时段，且接着(2)实现第二TIL群体从第一小规模培养转移并分配到至少2、3、 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个大小比第一容器更大的第二容器(例如，G-REX 500MCS容器)中，其中在每个第二容器中，在较大规模培养中培养从小规模培养转移到这个第二容器中的第二TIL群体部分，持续约4至7天的时段。在一些实施例中，将快速扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现向外扩展并且规模扩大的培养：(1)通过在第一容器(例如，G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第二 TIL群体来进行快速第二次扩增，持续约4天的时段，且接着(2)实现第二TIL群体从第一小规模培养转移并分配到2、3或4个大小比第一容器更大的第二容器(例如G-REX 500MCS 容器)中，其中在每个第二容器中，在较大规模培养中培养从小规模培养转移到这个第二容器中的第二TIL群体部分，持续约5天的时段。

[1391] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过使第一TIL群体与进一步包含外源性抗原呈递细胞(APC)的培养基接触来进行初始第一次扩增，其中步骤(c)中的培养基中的APC数量大于步骤(b) 中的培养基中的APC数量。

[1392] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段中所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(c)中向培养基中补充额外的外源性APC。

[1393] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为20:1的范围。

[1394] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为10:1的范围。

[1395] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为9:1的范围。

[1396] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为8:1的范围。

[1397] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为7:1的范围。

[1398] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为6:1的范围。

[1399] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为5:1的范围。

[1400] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述

方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为4:1的范围。

[1401] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为3:1的范围。

[1402] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.9:1的范围。

[1403] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.8:1的范围。

[1404] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.7:1的范围。

[1405] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.6:1的范围。

[1406] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.5:1的范围。

[1407] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.4:1的范围。

[1408] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.3:1的范围。

[1409] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.2:1的范围。

[1410] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2.1:1的范围。

[1411] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为2:1的范围。

[1412] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为10:1的范围。

[1413] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述

方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为5:1的范围。

[1414] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为4:1的范围。

[1415] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为3:1的范围。

[1416] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.9:1的范围。

[1417] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.8:1的范围。

[1418] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.7:1的范围。

[1419] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.6:1的范围。

[1420] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.5:1的范围。

[1421] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.4:1的范围。

[1422] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.3:1的范围。

[1423] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.2:1的范围。

[1424] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率是选自为或约为2:1至为或约为2.1:1的范围。

[1425] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率为或约为2:1。

[1426] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述

方法被修改以使得快速第二次扩增中添加的APC数量与步骤(b)中添加的APC数量的比率为或约为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。

[1427] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得初始第一次扩增中添加的APC数量为或约为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个APC,并且使得快速第二次扩增中添加的APC数量为或约为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个APC。

[1428] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得初始第一次扩增中添加的APC数量是选自为或约为1×10^8个APC至为或约为 3.5×10^8个APC的范围,并且其中快速第二次扩增中添加的APC数量是选自为或约为3.5×10^8个APC至为或约为1×10^9个APC的范围。

[1429] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得初始第一次扩增中添加的APC数量是选自为或约为1.5×10^8个APC至为或约为 3×10^8个APC的范围,并且其中快速第二次扩增中添加的APC数量是选自为或约为4×10^8个 APC至为或约为7.5×10^8个APC的范围。

[1430] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得初始第一次扩增中添加的APC数量是选自为或约为2×10^8个APC至为或约为 2.5×10^8个APC的范围,并且其中快速第二次扩增中添加的APC数量是选自为或约为4.5×10^8个APC至为或约为5.5×10^8个APC的范围。

[1431] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得向初始第一次扩增中添加为或约为2.5×10^8个APC且向快速第二次扩增中添加为或约为5×10^8个APC。

[1432] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得抗原呈递细胞为外周血单核细胞(PBMC)。

[1433] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得多个肿瘤碎片被分配到多个单独容器中,在每一个单独容器中,在步骤(a)中获得第一TIL群体,在步骤(b)中获得第二TIL群体,并且在步骤(c)中获得第三TIL群体,且将来自步骤(c)中的多个容器的治疗性TIL群体组合以得到从步骤(d)采集的TIL群

体。

[1434] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得多个肿瘤被均匀地分配到多个单独容器中。

[1435] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得多个单独容器包含至少两个单独容器。

[1436] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得多个单独容器包含两个至二十个单独容器。

[1437] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得多个单独容器包含两个至十五个单独容器。

[1438] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得多个单独容器包含两个至十个单独容器。

[1439] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得多个单独容器包含两个至五个单独容器。

[1440] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得多个单独容器包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、 18、19或20个单独容器。

[1441] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得对于其中在步骤(b)中对第一TIL群体进行引发第一次扩增的每个容器,在步骤 (c)中在相同容器中对由这类第一TIL群体产生的第二TIL群体进行快速第二次扩增。

[1442] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得每个单独容器包含第一气体可渗透表面区域。

[1443] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得多个肿瘤碎片被均匀地分配到单个容器中。

[1444] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得单个容器包含第一气体可渗透表面区域。

[1445] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增,其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC数量,且其中在步骤(b)中,将APC以为或约为一个细胞层至为或约为三个细胞层的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面区域上。

[1446] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得在步骤(b)中将APC以为或约为1.5个细胞层至为或约为2.5个细胞层的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面区域上。

[1447] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得在步骤(b)中将APC以为或约为2个细胞层的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面区域上。

[1448] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得在步骤(b)中将APC以为或约为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个细胞层的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面区域上。

[1449] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(c)中将APC以为或约为3个细胞层至为或约为10个细胞层的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面区域上。

[1450] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(c)中将APC以为或约为4个细胞层至为或约为8个细胞层的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面区域上。

[1451] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(c)中将APC以为或约为3、4、5、6、7、8、9或10个细胞层的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面区域上。

[1452] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(c)中将APC以为或约为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个细胞层的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面区域上。

[1453] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中在包含第一气体可渗透表面区域的第一容器中进行引发第一次扩增，且在步骤(c)中在包含第二气体可渗透表面区域的第二容器中进行快速第二次扩增。

[1454] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得第二容器大于第一容器。

[1455] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增，其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC数量，且其中在步骤(b)中，将APC以为或约为一个细胞层至为或约为三个细胞层的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面区域上。

[1456] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中将APC以为或约为1.5个细胞层至为或约为2.5个细胞层的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面区域上。

[1457] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中将APC以为或约为2个细胞层的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面区域上。

[1458] 在另一实施例中，本发明提供如适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中将APC以为或约为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个细胞层的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面区域上。

[1459] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(c)中将APC以为或约为3个细胞层至为或约为10个细胞层的平均

厚度层叠于第二气体可渗透表面区域上。

[1460] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(c)中将APC以为或约为4个细胞层至为或约为8个细胞层的平均厚度层叠于第二气体可渗透表面区域上。

[1461] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(c)中将APC以为或约为3、4、5、6、7、8、9或10个细胞层的平均厚度层叠于第二气体可渗透表面区域上。

[1462] 在另一实施例中，本发明提供如适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(c)中将APC以为或约为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个细胞层的平均厚度层叠于第二气体可渗透表面区域上。

[1463] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中在包含第一气体可渗透表面区域的第一容器中进行引发第一次扩增，且在步骤(c)中在第一容器中进行快速第二次扩增。

[1464] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增，其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC数量，且其中在步骤(b)中，将APC以为或约为一个细胞层至为或约为三个细胞层的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面区域上。

[1465] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中将APC以为或约为1.5个细胞层至为或约为2.5个细胞层的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面区域上。

[1466] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中将APC以为或约为2个细胞层的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面区域上。

[1467] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中将APC以为或约为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个细胞层的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面区域上。

[1468] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(c)中将APC以为或约为3个细胞层至为或约为10个细胞层的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面区域上。

[1469] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(c)中将APC以为或约为4个细胞层至为或约为8个细胞层的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面区域上。

[1470] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(c)中将APC以为或约为3、4、5、6、7、8、9或10个细胞层的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面区域上。

[1471] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(c)中将APC以为或约为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个细胞层的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面区域上。

[1472] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增，其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC数量，且其中步骤(b)中层叠的APC平均层数与步骤(c)中层叠的平均APC层数的比率是选自为或约为1:1.1至为或约为1:10的范围。

[1473] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增，其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC数量，且其中步骤(b)中层叠的平均APC层数与步骤(c)中层叠的平均APC层数的比率是选自为或约为1:1.1至为或约为1:9的范围。

[1474] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增，其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC数量，且其中步骤(b)中层叠的APC平均层数与步骤(c)中层叠的平均APC层数的比率是选自在或约在1:1.1至在或约在1:8的范围。

[1475] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增，其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC数量，且其中步骤(b)中层叠的APC平均层数与步骤(c)中层叠的平均APC层数的比率是选自在或约在1:1.1至在或约在1:7的范围。

[1476] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增，其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC数量，且其中步骤(b)中层叠的平均APC层数与步骤(c)中层叠的平均APC层数的比率是选自为或约为1:1.1至为或约为1:6的范围。

[1477] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增，其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC数量，且其中步骤(b)中层叠的平均APC层数与步骤(c)中层叠的平均APC层数的比率是选自为或约为1:1.1至为或约为1:5的范围。

[1478] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增，其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC数量，且其中步骤(b)中层叠的平均APC层数与步骤(c)中层叠的平均APC层数的比率是选自

为或约为1:1.1至为或约为1:4的范围。

[1479] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增，其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC数量，且其中步骤(b)中层叠的平均APC层数与步骤(c)中层叠的平均APC层数的比率是选自为或约为1:1.1至为或约为1:3的范围。

[1480] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增，其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC数量，且其中步骤(b)中层叠的平均APC层数与步骤(c)中层叠的平均APC层数的比率是选自为或约为1:1.1至为或约为1:2的范围。

[1481] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增，其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC数量，且其中步骤(b)中层叠的APC平均层数与步骤(c)中层叠的平均APC层数的比率是选自在或约在1:1.2至在或约在1:8的范围。

[1482] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增，其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC数量，且其中步骤(b)中层叠的APC平均层数与步骤(c)中层叠的平均APC层数的比率是选自在或约在1:1.3至在或约在1:7的范围。

[1483] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增，其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC数量，且其中步骤(b)中层叠的平均APC层数与步骤(c)中层叠的平均APC层数的比率是选自为或约为1:1.4至为或约为1:6的范围。

[1484] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增，其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC数量，且其中步骤(b)中层叠的平均APC层数与步骤(c)中层叠的平均APC层数的比率是选自为或约为1:1.5至为或约为1:5的范围。

[1485] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增，其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC数量，且其中步骤(b)中层叠的平均APC层数与步骤(c)中层叠的平均APC层数的比率是选自为或约为1:1.6至为或约为1:4的范围。

[1486] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增，其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC

数量,且其中步骤(b)中层叠的平均APC层数与步骤(c)中层叠的平均APC层数的比率是选自为或约为1:1.7至为或约为1:3.5的范围。

[1487] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增,其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC数量,且其中步骤(b)中层叠的平均APC层数与步骤(c)中层叠的平均APC层数的比率是选自为或约为1:1.8至为或约为1:3的范围。

[1488] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增,其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC数量,且其中步骤(b)中层叠的平均APC层数与步骤(c)中层叠的平均APC层数的比率是选自为或约为1:1.9至为或约为1:2.5的范围。

[1489] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增,其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC数量,且其中步骤(b)中层叠的平均APC层数与步骤(c)中层叠的平均APC层数的比率是选自为或约为1:2的范围。

[1490] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得在步骤(b)中通过用额外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行初始第一次扩增,其中步骤(c)中添加的APC数量大于步骤(b)中添加的APC数量,且其中步骤(b)中层叠的平均APC层数与步骤(c)中层叠的平均APC层数的比率是选自为或约为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。

[1491] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得第二TIL群体中的TIL数量与第一TIL群体中的TIL数量的比率为或约为1.5:1 至为或约为100:1。

[1492] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得第二TIL群体中的TIL数量与第一TIL群体中的TIL数量的比率为或约为50:1。

[1493] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得第二TIL群体中的TIL数量与第一TIL群体中的TIL数量的比率为或约为25:1。

[1494] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述

方法被修改以使得第二TIL群体中的TIL数量与第一TIL群体中的TIL数量的比率为或约为20:1。

[1495] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得第二TIL群体中的TIL数量与第一TIL群体中的TIL数量的比率为或约为10:1。

[1496] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得第二TIL群体的数量比第一TIL群体的数量大至少或至少约50倍。

[1497] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得第二TIL群体的数量比第一TIL群体的数量大至少或至少约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。

[1498] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在开始步骤(c)的第二阶段之后为或约为2天或为或约为3天，用额外的IL-2 补充细胞培养基。

[1499] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以进一步包含以下步骤：使用冷冻保存工艺冷冻保存步骤(d)中采集的TIL群体。

[1500] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以包含在步骤(d)之后进行附加步骤(e)：将从步骤(d)采集的TIL群体转移到任选地含有HypoThermosol的输注袋中。

[1501] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以包含以下步骤：使用冷冻保存工艺冷冻保存步骤(e)中包含采集的TIL群体的输注袋。

[1502] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得使用采集的TIL群体与冷冻保存培养基的1:1比率进行冷冻保存工艺。

[1503] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得抗原呈递细胞为外周血单核细胞(PBMC)。

[1504] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得PBMC为辐照且同种异体的。

[1505] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中添加到细胞培养中APC总数为2.5×10^8。

[1506] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(c)中添加到细胞培养中的APC总数为5×10^8。

[1507] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得APC为PBMC。

[1508] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得PBMC为辐照且同种异体的。

[1509] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得抗原呈递细胞为人造抗原呈递细胞。

[1510] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段中所述的方法，所述方法被修改以使得使用基于膜的细胞处理系统进行在步骤(d)中的采集。

[1511] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段中所述的方法，所述方法被修改以使得使用LOVO细胞处理系统进行在步骤(d)中的采集。

[1512] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得多个碎片包含步骤(b)中的每个容器为或约为5至为或约为60个碎片。

[1513] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得多个碎片包含步骤(b)中的每个容器为或约为10至为或约为60个碎片。

[1514] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得多个碎片包含步骤(b)中的每个容器为或约为15至为或约为60个碎片。

[1515] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得多个碎片包含步骤(b)中的每个容器为或约为20至为或约为60个碎片。

[1516] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得多个碎片包含步骤(b)中的每个容器为或约为25至为或约为60个碎片。

[1517] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得多个碎片包含步骤(b)中的每个容器为或约为30至为或约为60个碎片。

[1518] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得多个碎片包含步骤(b)中的每个容器为或约为35至为或约为60个碎片。

[1519] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得多个碎片包含步骤(b)中的每个容器为或约为40至为或约为60个碎片。

[1520] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得多个碎片包含步骤(b)中的每个容器为或约为45至为或约为60个碎片。

[1521] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得多个碎片包含步骤(b)中的每个容器为或约为50至为或约为60个碎片。

[1522] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得多个碎片包含步骤(b)中的每个容器为或约为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个碎片。

[1523] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得每个碎片的体积为或约为27mm^3。

[1524] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得每个碎片的体积为或约为20mm^3至为或约为50mm^3。

[1525] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得每个碎片的体积为或约为21mm^3至为或约为30mm^3。

[1526] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得每个碎片的体积为或约为22mm^3至为或约为29.5mm^3。

[1527] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得每个碎片的体积为或约为23mm^3至为或约为29mm^3。

[1528] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得每个碎片的体积为或约为24mm^{3}至为或约为28.5mm^3。

[1529] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得每个碎片的体积为或约为25mm^{3}至为或约为28mm^3。

[1530] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得每个碎片的体积为或约为26.5mm^{3}至为或约为27.5mm^3。

[1531] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得每个碎片的体积为或约为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50mm^3。

[1532] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得多个碎片包含总体积为或约为1300mm^{3}至为约为1500mm^{3}的为或约为30至为或约为60个碎片。

[1533] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得多个碎片包含总体积为或约为1350mm^{3}的为或约为50个碎片。

[1534] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得多个碎片包含总质量为或约为1克至为约为1.5克的为或约为50个碎片。

[1535] 在另一实施例中，本发明提供前述段落中任一段中所述的方法，所述方法在适当时被修改以使得细胞培养基提供于容器，即G-容器或Xuri cellbag中。

[1536] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得细胞培养基中的IL-2浓度为约10,000IU/mL至约5,000IU/mL。

[1537] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得细胞培养基中的IL-2浓度为约6,000IU/mL。

[1538] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得冷冻保存培养基包含二甲基亚砜(DMSO)。

[1539] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得冷冻保存培养基包含7％至10％DMSO。

[1540] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得步骤(b)中的第一阶段是在为或约为1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天的时段内进行。

[1541] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得步骤(c)中的第二阶段是在为或约为1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、 8天、9天、10天或11天的时段内进行。

[1542] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得步骤(b)中的第一阶段和步骤(c)中的第二阶段各自分别在为或约为1天、2 天、3天、4天、5天、6天或7天的时段内进行。

[1543] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得步骤(b)中的第一阶段和步骤(c)中的第二阶段各自分别在为或约为5天、6 天或7天的时段内进行。

[1544] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述

方法被修改以使得步骤(b)中的第一阶段和步骤(c)中的第二阶段各自分别在为或约为7天的时段内进行。

[1545] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得步骤(a)至(d)进行总共为或约为14天至为或约为18天。

[1546] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得步骤(a)至(d)进行总共为或约为15天至为或约为18天。

[1547] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得步骤(a)至(d)进行总共为或约为16天至为或约为18天。

[1548] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得步骤(a)至(d)进行总共为或约为17天至为或约为18天。

[1549] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得步骤(a)至(d)进行总共为或约为14天至为或约为17天。

[1550] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得步骤(a)至(d)进行总共为或约为15天至为或约为17天。

[1551] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得步骤(a)至(d)进行总共为或约为16天至为或约为17天。

[1552] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得步骤(a)至(d)进行总共为或约为14天至为或约为16天。

[1553] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得步骤(a)至(d)进行总共为或约为15天至为或约为16天。

[1554] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得步骤(a)至(d)进行总共为或约为14天。

[1555] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得步骤(a)至(d)进行总共为或约为15天。

[1556] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得步骤(a)至(d)进行总共为或约为16天。

[1557] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得步骤(a)至(d)进行总共为或约为17天。

[1558] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得步骤(a)至(d)进行总共为或约为18天。

[1559] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得步骤(a)至(d)进行总共为或约为14天或更短时间。

[1560] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得步骤(a)至(d)进行总共为或约为15天或更短时间。

[1561] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得步骤(a)至(d)进行总共为或约为16天或更短时间。

[1562] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得步骤(a)至(d)进行总共为或约为18天或更短时间。

[1563] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述

方法被修改以使得步骤(d)中采集的治疗性TIL群体包含对于治疗有效剂量的TIL来说足够的TIL。

[1564] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得对于治疗有效剂量来说足够的TIL数量为或约为2.3×10^{10}至为或约为13.7×10^{10}。

[1565] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得步骤(c)中的第三TIL群体提供增加的疗效、增加的干扰素-γ产生和/或增加的多克隆性。

[1566] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得步骤(c)中的第三TIL群体提供与通过长于16天的工艺制备的TIL相比至少一倍至五倍或更多的干扰素-γ产生。

[1567] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得步骤(c)中的第三TIL群体提供与通过长于17天的工艺制备的TIL相比至少一倍至五倍或更多的干扰素-γ产生。

[1568] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得步骤(c)中的第三TIL群体提供与通过长于18天的工艺制备的TIL相比至少一倍至五倍或更多的干扰素-γ产生。

[1569] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得相对于获自步骤(b)中的第二细胞群体的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞，获自步骤(c)中的第三TIL群体的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞展现出增加的CD8和CD28 表达。

[1570] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得所述方法中列举的每个容器为封闭式容器。

[1571] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得所述方法中列举的每个容器为G-容器。

[1572] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得所述方法中列举的每个容器为GREX-10。

[1573] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得所述方法中列举的每个容器为GREX-100。

[1574] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得所述方法中列举的每个容器为GREX-500。

[1575] 在另一实施例中，本发明提供通过如上文适用的前述段落中任一段所述的方法制得的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体。

[1576] 在另一实施例中，本发明提供由患者的肿瘤组织制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL) 群体，其中与通过在不添加任何抗原呈递细胞(APC)或OKT3的情况下进行TIL的第一次扩增的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体提供增加的疗效、增加的干扰素-γ产生和/ 或增加的多克隆性。

[1577] 在另一实施例中，本发明提供由患者的肿瘤组织制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL) 群体，其中与通过在不添加任何抗原呈递细胞(APC)的情况下进行TIL的第一次扩增

的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体提供增加的疗效、增加的干扰素-γ产生和/或增加的多克隆性。

[1578] 在另一实施例中，本发明提供由患者的肿瘤组织制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体，其中与通过在不添加任何的OKT3的情况下进行TIL的第一次扩增的工艺所制备的TIL 相比，治疗性TIL群体提供增加的疗效、增加的干扰素-γ产生和/或增加的多克隆性。

[1579] 在另一实施例中，本发明提供由患者的肿瘤组织制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体，其中与通过在不添加抗原呈递细胞(APC)或不添加OKT3的情况下进行TIL的第一次扩增的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体提供增加的疗效、增加的干扰素-γ产生和/ 或增加的多克隆性。

[1580] 在另一实施例中，本发明提供由患者的肿瘤组织制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体，其中与通过长于16天的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体提供增加的疗效、增加的干扰素-γ产生和/或增加的多克隆性。

[1581] 在另一实施例中，本发明提供由患者的肿瘤组织制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体，其中与通过长于17天的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体提供增加的疗效、增加的干扰素-γ产生和/或增加的多克隆性。

[1582] 在另一实施例中，本发明提供由患者的肿瘤组织制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体，其中与通过长于18天的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体提供增加的疗效、增加的干扰素-γ产生和/或增加的多克隆性。

[1583] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其提供增加的干扰素-γ产生。

[1584] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其提供增加的多克隆性。

[1585] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其提供增加的疗效。

[1586] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其被修改以使得与通过长于16天的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体能够产生至少一倍多的干扰素-γ。在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其被修改以使得与通过长于17天的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体能够产生至少一倍多的干扰素-γ。在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其被修改以使得与通过长于18天的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体能够产生至少一倍多的干扰素-γ。在一些实施例中，由于本文中所描述的扩增工艺，例如如上文步骤A至F中所描述或根据上文步骤A至F(另外，如例如图8(具体地说，例如图8B和/或图8C)中所示)，使TIL能够产生至少一倍多的干扰素-γ。

[1587] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其被修改以使得与通过长于16天的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体能够产生多至少两倍的干扰素-γ。在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其被修改以使得与通过长于17天的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体能够产生至少两倍多的干扰素-γ。在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段

落中任一段所述的治疗性TIL群体，其被修改以使得与通过长于18天的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体能够产生至少两倍多的干扰素-γ。在一些实施例中，由于本文中所描述的扩增工艺，例如如上文步骤A至F中所描述或根据上文步骤A至F(另外，如例如图8(具体地说，例如图8B和/或图8C)中所示)，使TIL能够产生至少两倍多的干扰素-γ。

[1588] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其被修改以使得与通过长于16天的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体能够产生至少三倍多的干扰素-γ。在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其被修改以使得与通过长于17天的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体能够产生至少三倍多的干扰素-γ。在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其被修改以使得与通过长于18天的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体能够产生至少三倍多的干扰素-γ。在一些实施例中，由于本文中所描述的扩增工艺，例如如上文步骤A至F中所描述或根据上文步骤A至F(另外，如例如图8(具体地说，例如图8B和/或图8C)中所示)，使TIL能够产生至少三倍多的干扰素-γ。

[1589] 在另一实施例中，本发明提供治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体，其与通过在不添加任何抗原呈递细胞(APC)的情况下进行TIL的第一次扩增的工艺所制备的TIL相比，能够产生至少一倍多的干扰素-γ。在一些实施例中，由于本文中所描述的扩增工艺，例如如上文步骤A至F中所描述或根据上文步骤A至F(另外，如例如图8(具体地说，例如图8B和/ 或图8C)中所示)，使TIL能够产生至少一倍多的干扰素-γ。

[1590] 在另一实施例中，本发明提供治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体，其与通过在不添加任何OKT3的情况下进行TIL的第一次扩增的工艺所制备的TIL相比，能够产生至少一倍多的干扰素-γ。在一些实施例中，由于本文中所描述的扩增工艺，例如如上文步骤A至F中所描述或根据上文步骤A至F(另外，如例如图8(具体地说，例如图8B和/或图8C)中所示)，使TIL能够产生至少一倍多的干扰素-γ。

[1591] 在另一实施例中，本发明提供治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体，其与通过在不添加任何APC的情况下进行TIL的第一次扩增的工艺所制备的TIL相比，能够产生至少两倍多的干扰素-γ。在一些实施例中，由于本文中所描述的扩增工艺，例如如上文步骤A至F中所描述或根据上文步骤A至F(另外，如例如图8(具体地说，例如图8B和/或图8C)中所示)，使TIL能够产生至少两倍多的干扰素-γ。

[1592] 在另一实施例中，本发明提供治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体，其与通过在不添加任何OKT3的情况下进行TIL的第一次扩增的工艺所制备的TIL相比，能够产生至少两倍多的干扰素-γ。在一些实施例中，由于本文中所描述的扩增工艺，例如如上文步骤A至F中所描述或根据上文步骤A至F(另外，如例如图8(具体地说，例如图8B和/或图8C)中所示)，使TIL能够产生至少两倍多的干扰素-γ。

[1593] 在另一实施例中，本发明提供治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体，其与通过在不添加任何APC的情况下进行TIL的第一次扩增的工艺所制备的TIL相比，能够产生至少三倍多的干扰素-γ。在一些实施例中，由于本文中所描述的扩增工艺，例如如上文步骤A至F中所描述或根据上文步骤A至F(另外，如例如图8(具体地说，例如图8B和/或图8C)中所示)，使TIL能够产生至少一倍多的干扰素-γ。

[1594] 在另一实施例中，本发明提供治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体，其与通过在不

添加任何OKT3的情况下进行TIL的第一次扩增的工艺所制备的TIL相比，能够产生至少三倍多的干扰素-γ。在一些实施例中，由于本文中所描述的扩增工艺，例如如上文步骤A至F中所描述或根据上文步骤A至F(另外，如例如图8(具体地说，例如图8B和/或图8C)中所示)，使TIL能够产生至少三倍多的干扰素-γ。

[1595] 在另一实施例中，本发明提供一种扩增T细胞的方法，其包含：(a)通过培养第一T细胞群体来进行获自供体的第一T细胞群体的引发第一次扩增以实现生长并且引发第一T细胞群体的活化；(b)在步骤(a)中引发的第一T细胞群体的活化开始衰减之后，通过培养第一 T细胞群体引发第一T细胞群体的快速第二次扩增以实现生长并且增强第一T细胞群体的活化，以获得第二T细胞群体；以及(c)采集第二T细胞群体。在另一实施例中，将快速第二次扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现规模扩大的培养：(a)通过在第一容器(例如，G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二次扩增，持续约3至4天的时段，且接着(b)实现第一T细胞群体从小规模培养转移到大于第一容器的第二容器(例如，G-REX 500MCS容器)中，并且在第二容器中的较大规模培养中培养来自小规模培养的第一T细胞群体，持续约4至7天的时段。在另一实施例中，将快速扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现向外扩展的培养：(a)通过在第一容器(例如，G-REX 100MCS容器)中的第一小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二次扩增，持续约 3至4天的时段，且接着(b)实现第一T细胞群体从第一小规模培养转移并分配到至少2、3、 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个大小与第一容器相等的第二容器中，其中在每个第二容器中，在第二小规模培养中培养从第一小规模培养转移到这个第二容器的第一T细胞群体部分，持续约4至7天的时段。在另一实施例中，将快速扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现向外扩展并且规模扩大的培养：(a)通过在第一容器(例如，G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二次扩增，持续约3至4天的时段，且接着(b)实现第一T细胞群体从小规模培养转移并分配到至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个大小比第一容器更大的第二容器(例如，G-REX 500MCS容器)中，其中在每个第二容器中，在较大规模培养中培养从小规模培养转移到这个第二容器中的第一T细胞群体部分，持续约 4至7天的时段。在另一实施例中，将快速扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现向外扩展并且规模扩大的培养：(a)通过在第一容器(例如，G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二次扩增，持续约4天的时段，且接着(b)实现第一T细胞群体从小规模培养转移并分配到2、3或4个大小比第一容器更大的第二容器(例如G-REX 500MCS容器)中，其中在每个第二容器中，在较大规模培养中培养从小规模培养转移到这个第二容器中的第一T细胞群体部分，持续约5天的时段。

[1596] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得快速第二次扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现规模扩大的培养：(a) 通过在第一容器(例如，G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二次扩增，持续约2至4天的时段，且接着(b)实现第一T细胞群体从小规模培养转移到比第一容器更大的第二容器(例如G-REX 500MCS容器)中，并且在第二容器中的较大规模培养中培养来自小规模培养第一T细胞群体，持续约5至7天的时段。

[1597] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述

方法被修改以使得快速扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现向外扩展的培养：(a)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的第一小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二次扩增,持续约2至4天的时段,且接着(b)实现第一T细胞群体从第一小规模培养转移并分配到至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或20个大小与第一容器相等的第二容器中,其中在每个第二容器中,在第二小规模培养中培养从第一小规模培养转移到这个第二容器中的第一T细胞群体部分,持续约5至7天的时段。

[1598] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得快速扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现向外扩展并且规模扩大的培养:(a)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二次扩增,持续约2至4天的时段,且接着(b)实现第一T细胞群体从小规模培养转移并分配到至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、 18、19或20个大小比第一容器更大的第二容器(例如,G-REX 500MCS容器)中,其中在每个第二容器中,在较大规模培养中培养从小规模培养转移到这个第二容器中的第一T细胞群体部分,持续约5至7天的时段。

[1599] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得快速扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现向外扩展并且规模扩大的培养:(a)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二次扩增,持续约3至4天的时段,且接着(b)实现第一T细胞群体从小规模培养转移并分配到2、3或4个大小比第一容器更大的第二容器(例如,G-REX 500MCS容器)中,其中在每个第二容器中,在较大规模培养中培养从小规模培养转移到这个第二容器中的第一T细胞群体部分,持续约5至6天的时段。

[1600] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得快速扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现向外扩展并且规模扩大的培养:(a)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二次扩增,持续约3至4天的时段,且接着(b)实现第一T细胞群体从小规模培养转移并分配到2、3或4个大小比第一容器更大的第二容器(例如,G-REX 500MCS容器)中,其中在每个第二容器中,在较大规模培养中培养从小规模培养转移到这个第二容器中的第一T细胞群体部分,持续约5天的时段。

[1601] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得快速扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现向外扩展并且规模扩大的培养:(a)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二次扩增,持续约3至4天的时段,且接着(b)实现第一T细胞群体从小规模培养转移并分配到2、3或4个大小比第一容器更大的第二容器(例如,G-REX 500MCS容器)中,其中在每个第二容器中,在较大规模培养中培养从小规模培养转移到这个第二容器中的第一T细胞群体部分,持续约6天的时段。

[1602] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得快速扩增的步骤拆分成多个步骤以通过以下来实现向外扩展并且规模扩大的培养:(a)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二次扩增,持续约3至4天的时段,且接着(b)实现第一T细胞群体从

小规模培养转移并分配到2、3或4个大小比第一容器更大的第二容器(例如,G-REX 500MCS容器)中,其中在每个第二容器中,在较大规模培养中培养从小规模培养转移到这个第二容器中的第一T细胞群体部分,持续约7天的时段。

[1603] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段中所述的方法,所述方法被修改以使得在长达7天的时段期间进行步骤(a)的引发第一次扩增。

[1604] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段中所述的方法,所述方法被修改以使得在长达8天的时段期间进行步骤(b)的快速第二次扩增。

[1605] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段中所述的方法,所述方法被修改以使得在长达9天的时段期间进行步骤(b)的快速第二次扩增。

[1606] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段中所述的方法,所述方法被修改以使得在长达10天的时段期间进行步骤(b)的快速第二次扩增。

[1607] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段中所述的方法,所述方法被修改以使得在长达11天的时段期间进行步骤(b)的快速第二次扩增。

[1608] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得在7天的时段期间进行步骤(a)中的引发第一次扩增并且在长达9天的时段期间进行步骤(b)的快速第二次扩增。

[1609] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得在7天的时段期间进行步骤(a)中的引发第一次扩增并且在长达10天的时段期间进行步骤(b)的快速第二次扩增。

[1610] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得在7天或8天的时段期间进行步骤(a)中的引发第一次扩增并且在长达9天的时段期间进行步骤(b)的快速第二次扩增。

[1611] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得在7天或8天的时段期间进行步骤(a)中的引发第一次扩增并且在长达10天的时段期间进行步骤(b)的快速第二次扩增。

[1612] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得在8天的时段期间进行步骤(a)中的引发第一次扩增并且在长达9天的时段期间进行步骤(b)的快速第二次扩增。

[1613] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得在8天的时段期间进行步骤(a)中的引发第一次扩增并且在长达8天的时段期间进行步骤(b)的快速第二次扩增。

[1614] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段中所述的方法,所述方法被修改以使得在步骤(a)中,在包含OKT-3和IL-2的第一培养基中培养第一T细胞群体。

[1615] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得第一培养基包含4-1BB激动剂、OKT-3和IL-2。

[1616] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改以使得第一培养基包含OKT-3、IL-2和抗原呈递细胞(APC)。

[1617] 在另一实施例中,本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法,所述

方法被修改以使得第一培养基包含4-1BB激动剂、OKT-3、IL-2和抗原呈递细胞(APC)。

[1618] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段中所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中，在包含OKT-3、IL-2和抗原呈递细胞(APC)的第二培养基中培养第一T细胞群体。

[1619] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得第二培养基包含4-1BB激动剂、OKT-3、IL-2和抗原呈递细胞(APC)。

[1620] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(a)中，在包含第一气体可渗透表面的容器中的第一培养基中培养第一T 细胞群体，其中第一培养基包含OKT-3、IL-2和第一抗原呈递细胞(APC)群体，其中第一 APC群体对于第一T细胞群体的供体来说是外源性的并且将第一APC群体层叠于第一气体可渗透表面上，其中在步骤(b)中，在所述容器中的第二培养基中培养第一T细胞群体，其中第二培养基包含OKT-3、IL-2和第二APC群体，其中第二APC群体对于第一T细胞群体的供体来说是外源性的并且将第二APC群体层叠于第一气体可渗透表面上，且其中第二APC群体多于第一APC群体。

[1621] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(a)中，在包含第一气体可渗透表面的容器中的第一培养基中培养第一T 细胞群体，其中第一培养基包含4-1BB激动剂、OKT-3、IL-2和第一抗原呈递细胞(APC) 群体，其中第一APC群体对于第一T细胞群体的供体来说是外源性的并且将第一APC群体层叠于第一气体可渗透表面上，其中在步骤(b)中，在所述容器中的第二培养基中培养第一 T细胞群体，其中第二培养基包含OKT-3、IL-2和第二APC群体，其中第二APC群体对于第一T细胞群体的供体来说是外源性的并且将第二APC群体层叠于第一气体可渗透表面上，且其中第二APC群体多于第一APC群体。

[1622] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(a)中，在包含第一气体可渗透表面的容器中的第一培养基中培养第一T 细胞群体，其中第一培养基包含OKT-3、IL-2和第一抗原呈递细胞(APC)群体，其中第一 APC群体对于第一T细胞群体的供体来说是外源性的并且将第一APC群体层叠于第一气体可渗透表面上，其中在步骤(b)中，在所述容器中的第二培养基中培养第一T细胞群体，其中第二培养基包含4-1BB激动剂、OKT-3、IL-2和第二APC群体，其中第二APC群体对于第一T细胞群体的供体来说是外源性的并且将第二APC群体层叠于第一气体可渗透表面上，且其中第二APC群体多于第一APC群体。

[1623] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(a)中，在包含第一气体可渗透表面的容器中的第一培养基中培养第一T 细胞群体，其中第一培养基包含4-1BB激动剂、OKT-3、IL-2和第一抗原呈递细胞(APC) 群体，其中第一APC群体对于第一T细胞群体的供体来说是外源性的并且将第一APC群体层叠于第一气体可渗透表面上，其中在步骤(b)中，在所述容器中的第二培养基中培养第一 T细胞群体，其中第二培养基包含4-1BB激动剂、OKT-3、IL-2和第二APC群体，其中第二APC群体对于第一T细胞群体的供体来说是外源性的并且将第二APC群体层叠于第一气体可渗透表面上，且其中第二APC群体多于第一APC群体。

[1624] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述

方法被修改以使得第二APC群体中的APC数量与第一APC群体中的APC数量的比率为约2:1。

[1625] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得第一APC群体中的APC数量为约2.5×10^8并且第二APC群体中的APC数量为约 5×10^8。

[1626] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(a)中将第一APC群体以2层APC的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面上。

[1627] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中将第二APC群体以选自4至8层APC范围的平均厚度层叠于第一气体可渗透表面上。

[1628] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得步骤(b)中层叠于第一气体可渗透表面上的平均APC层数与步骤(a)中层叠于第一气体可渗透表面上的平均APC层数的比率为2:1。

[1629] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(a)中将第一APC群体以选自为或约为1.0×10^6个APC/cm^2至为或约为 4.5×10^6个APC/cm^2范围的密度接种于第一气体可渗透表面上。

[1630] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(a)中将第一APC群体以选自为或约为1.5×10^6个APC/cm^2至为或约为 3.5×10^6个APC/cm^2范围的密度接种于第一气体可渗透表面上。

[1631] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(a)中将第一APC群体以选自为或约为2.0×10^6个APC/cm^2至为或约为 3.0×10^6个APC/cm^2范围的密度接种于第一气体可渗透表面上。

[1632] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(a)中将第一APC群体以为或约为2.0×10^6个APC/cm^2的密度接种于第一气体可渗透表面上。

[1633] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中将第二APC群体以选自为或约为2.5×10^6个APC/cm^2至为或约为 7.5×10^6个APC/cm^2范围的密度接种于第一气体可渗透表面上。

[1634] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中将第二APC群体以选自为或约为3.5×10^6个APC/cm^2至为或约为 6.0×10^6个APC/cm^2范围的密度接种于第一气体可渗透表面上。

[1635] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中将第二APC群体以选自为或约为4.0×10^6个APC/cm^2至为或约为 5.5×10^6个APC/cm^2范围的密度接种于第一气体可渗透表面上。

[1636] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(b)中将第二APC群体以为或约为4.0×10^6个APC/cm^2的密度接种于第一气体可渗透表面上。

[1637] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(a)中将第一APC群体以选自为或约为1.0×10^6个APC/cm^2至为或

约为 4.5×10^6个APC/cm^2范围的密度接种于第一气体可渗透表面上，并且在步骤(b)中将第二APC 群体以选自为或约为2.5×10^6个APC/cm^2至为或约为7.5×10^6个APC/cm^2范围的密度接种于第一气体可渗透表面上。

[1638] 在另一实施例中，本发明提供如适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(a)中将第一APC群体以选自为或约为1.5×10^6个APC/cm^2至为或约为3.5×10^6个APC/cm^2范围的密度接种于第一气体可渗透表面上，并且在步骤(b)中将第二APC群体以选自为或约为3.5×10^6个APC/cm^2至为或约为6.0×10^6个APC/cm^2范围的密度接种于第一气体可渗透表面上。

[1639] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(a)中将第一APC群体以选自为或约为2.0×10^6个APC/cm^2至为或约为 3.0×10^6个APC/cm^2范围的密度接种于第一气体可渗透表面上，并且在步骤(b)中将第二APC 群体以选自为或约为4.0×10^6个APC/cm^2至为或约为5.5×10^6个APC/cm^2范围的密度接种于第一气体可渗透表面上。

[1640] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在步骤(a)中将第一APC群体以为或约为2.0×10^6个APC/cm^2的密度接种于第一气体可渗透表面上，并且在步骤(b)中将第二APC群体以选自为或约为4.0×10^6个APC/cm^2的密度接种于第一气体可渗透表面上。

[1641] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得APC为外周血单核细胞(PBMC)。

[1642] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得PBMC为辐照的并且对于第一T细胞群体的供体来说是外源性的。

[1643] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得T细胞为肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

[1644] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得T细胞为骨髓浸润淋巴细胞(MIL)。

[1645] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得T细胞为外周血淋巴细胞(PBL)。

[1646] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得第一T细胞群体是通过从供体的全血中分离而获得的。

[1647] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得第一T细胞群体是通过从供体的单采术产物中分离而获得的。

[1648] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得第一T细胞群体是通过阳性或阴性选择T细胞表型从供体的全血或单采术产物中分离的。

[1649] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得T细胞表型为CD3+和CD45+。

[1650] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得在进行第一T细胞群体的引发第一次扩增之前，将T细胞与NK细胞分离。在另一实施例中，通过从第一T细胞群体中去除CD3-CD56+细胞而将T细胞与第一T细胞群体

中的NK细胞分离。在另一实施例中，通过使用去除CD3-CD56+细胞级分并且恢复阴性级分的门控策略对第一T细胞群体进行细胞分选来从第一T细胞群体中去除CD3-CD56+细胞。在另一实施例中，前述方法用于以高百分比NK细胞为特征的第一T细胞群体中的T细胞扩增。在另一实施例中，前述方法用于以高百分比CD3-CD56+细胞为特征的第一T细胞群体中的T 细胞扩增。在另一实施例中，前述方法用于以存在大量NK细胞为特征的肿瘤组织中的T细胞扩增。在另一实施例中，前述方法用于以大量CD3-CD56+细胞为特征的肿瘤组织中的T细胞扩增。在另一实施例中，前述方法用于从患有肿瘤的患者获得的肿瘤组织中的T细胞扩增，所述肿瘤组织的特征为存在大量NK细胞。在另一实施例中，前述方法用于从患有肿瘤的患者获得的肿瘤组织中的T细胞扩增，所述肿瘤组织的特征为存在大量CD3-CD56+细胞。在另一实施例中，前述方法用于从患有卵巢癌的患者获得的肿瘤组织中的T细胞扩增。

[1651] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得将来自第一T细胞群体的为或约为1×10^7个T细胞接种于容器中以在这个容器中开始初始第一次扩增培养。

[1652] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改以使得将第一T细胞群体分配到多个容器中，并且在每个容器中接种来自第一T细胞群体的为或约为1×10^7个T细胞以在这个容器中开始初始第一次扩增培养。

[1653] 在另一实施例中，本发明提供如上文适用的前述段落中任一段中所述的方法，所述方法被修改以使得步骤(c)中采集的第二T细胞群体为治疗性TIL群体。

[1654] V.医药组合物、剂量和给药方案

[1655] 在一实施例中，使用本公开的方法扩增的TIL是以医药组合物形式给予患者。在一实施例中，医药组合物为TIL于无菌缓冲液中的悬浮液。可以通过如所属领域中已知的任何合适途径给予使用本公开的PBMC扩增的TIL。在一些实施例中，T细胞是以单次动脉内或静脉内输注形式给药，优选地持续大致30至60分钟。其它合适的给药途径包括腹膜内、鞘内和淋巴管内给药。

[1656] 可以给予任何适合剂量的TIL。在一些实施例中，给予约2.3×10^{10}至约13.7×10^{10}个TIL，平均为约7.8×10^{10}个TIL，尤其是在癌症为黑素瘤的情况下。在一实施例中，给予约1.2×10^{10}至约4.3×10^{10}个TIL。在一些实施例中，给予约3×10^{10}至约12×10^{10}个TIL。在一些实施例中，给予约4×10^{10}至约10×10^{10}个TIL。在一些实施例中，给予约5×10^{10}至约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中，给予约6×10^{10}至约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中，给予约7×10^{10}至约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约2.3×10^{10}至约13.7×10^{10}。在一些实施例中，治疗有效剂量为约7.8×10^{10}个TIL，尤其是在癌症为黑素瘤的情况下。在一些实施例中，治疗有效剂量为约1.2×10^{10}至约4.3×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约3×10^{10}至约12×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约4×10^{10}至约10×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约5×10^{10}至约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约6×10^{10}至约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约7×10^{10}至约8×10^{10}个TIL。

[1657] 在一些实施例中，本发明的医药组合物中提供的TIL数量为约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、$7\times$

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}和9×10^{13}。在一实施例中，本发明的医药组合物中提供的TIL数量是在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}和5×10^{12}至1×10^{13}范围内。

[1658] 在一些实施例中，本发明的医药组合物中提供的TIL的浓度小于例如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的医药组合物。

[1659] 在一些实施例中，本发明的医药组合物中提供的TIL的浓度大于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的医药组合物。

[1660] 在一些实施例中，本发明的医药组合物中提供的TIL的浓度是在约0.0001%至约50%、约0.001%至约40%、约0.01%至约30%、约0.02%至约29%、约0.03%至约28%、约0.04%至约27%、约0.05%至约26%、约0.06%至约25%、约0.07%至约24%、约0.08%至约23%、约0.09%至约22%、约0.1%至约21%、约0.2%至约20%、约0.3%至约19%、约0.4%至约 18%、约0.5%至约17%、约0.6%至约16%、约0.7%至约15%、约0.8%至约14%、约0.9%至约12%或约1%至约10%w/w、w/v或v/v的医药组合物的范围内。

[1661] 在一些实施例中，本发明的医药组合物中提供的TIL的浓度是在约0.001%至约10%、约 0.01%至约5%、约0.02%至约4.5%、约0.03%至约4%、约0.04%至约3.5%、约0.05%至约 3%、约0.06%至约2.5%、约0.07%至约2%、约0.08%至约1.5%、约0.09%至约1%、约0.1%至约0.9%w/w、w/v或v/v的医药组合物的范围内。

[1662] 在一些实施例中，本发明的医药组合物中提供的TIL的量等于或小于10g、9.5g、

9.0g、8.5g、8.0g、7.5g、7.0g、6.5g、6.0g、5.5g、5.0g、4.5g、4.0g、3.5g、3.0g、2.5g、2.0g、1.5g、1.0g、0.95g、0.9g、0.85g、0.8g、0.75g、0.7g、0.65g、0.6g、0.55g、0.5g、0.45 g、0.4g、0.35g、0.3g、0.25g、0.2g、0.15g、0.1g、0.09g、0.08g、0.07g、0.06g、0.05 g、0.04g、0.03g、0.02g、0.01g、0.009g、0.008g、0.007g、0.006g、0.005g、0.004g、0.003 g、0.002g、0.001g、0.0009g、0.0008g、0.0007g、0.0006g、0.0005g、0.0004g、0.0003g、0.0002g或0.0001g。

[1663] 在一些实施例中，本发明的医药组合物中提供的TIL的量大于0.0001g、0.0002g、0.0003 g、0.0004g、0.0005g、0.0006g、0.0007g、0.0008g、0.0009g、0.001g、0.0015g、0.002g、0.0025g、0.003g、0.0035g、0.004g、0.0045g、0.005g、0.0055g、0.006g、0.0065g、0.007 g、0.0075g、0.008g、0.0085g、0.009g、0.0095g、0.01g、0.015g、0.02g、0.025g、0.03g、0.035g、0.04g、0.045g、0.05g、0.055g、0.06g、0.065g、0.07g、0.075g、0.08g、0.085g、0.09g、0.095g、0.1g、0.15g、0.2g、0.25g、0.3g、0.35g、0.4g、0.45g、0.5g、0.55g、0.6g、0.65g、0.7g、0.75g、0.8g、0.85g、0.9g、0.95g、1g、1.5g、2g、2.5、3g、3.5、4g、4.5g、5g、5.5g、6g、6.5g、7g、7.5g、8g、8.5g、9g、9.5g或10g。

[1664] 本发明的医药组合物中提供的TIL在广泛剂量范围内有效。确切的剂量将取决于给药途径、化合物的给予形式、待治疗个体的性别和年龄、待治疗个体的体重以及主治医师的偏好和经验。适当时还可使用临床上确定的TIL剂量。使用本文中的方法给予的医药组合物的量（例如，TIL的剂量）将取决于所治疗的人类或哺乳动物、病症或病状的严重程度、给药速率、活性医药成分的配置和处方医师的判断。

[1665] 在一些实施例中，可以单剂量形式给予TIL。可以通过注射，例如静脉内注射进行这类给药。在一些实施例中，可以多个剂量形式给予TIL。给药可以是每年一次、两次、三次、四次、五次、六次或多于六次。给药可以是每月一次、每两周一次、一周一次或每隔一天一次。只要必要，可以继续TIL的给药。

[1666] 在一些实施例中，TIL的有效剂量为约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}和9×10^{13}。在一些实施例中，TIL的有效剂量是在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}和5×10^{12}至1×10^{13}范围内。

[1667] 在一些实施例中，TIL的有效剂量是在约0.01mg/kg至约4.3mg/kg、约0.15mg/kg至约3.6mg/kg、约0.3mg/kg至约3.2mg/kg、约0.35mg/kg至约2.85mg/kg、、约0.15mg/kg至约2.85mg/kg、约0.3mg/kg至约2.15mg/kg、约0.45mg/kg至约1.7mg/kg、约0.15mg/kg至约1.3mg/kg、约0.3mg/kg至约1.15mg/kg、约0.45mg/kg至约1mg/kg、约0.55mg/kg至约0.85mg/kg、约0.65mg/kg至约0.8mg/kg、约0.7mg/kg至约0.75mg/kg、约0.7mg/kg至约2.15 mg/kg、约0.85mg/kg至约2mg/kg、约1mg/kg至约1.85mg/kg、约1.15mg/kg至约1.7mg/kg、约

1.3mg/kg至约1.6mg/kg、约1.35mg/kg至约1.5mg/kg、约2.15mg/kg至约3.6mg/kg、约2.3mg/kg至约3.4mg/kg、约2.4mg/kg至约3.3mg/kg、约2.6mg/kg至约3.15mg/kg、约2.7 mg/kg至约3mg/kg、约2.8mg/kg至约3mg/kg或约2.85mg/kg至约2.95mg/kg范围内。

[1668] 在一些实施例中，TIL的有效剂量是在约1mg至约500mg、约10mg至约300mg、约20mg至约250mg、约25mg至约200mg、约1mg至约50mg、约5mg至约45mg、约10 mg至约40mg、约15mg至约35mg、约20mg至约30mg、约23mg至约28mg、约50mg 至约150mg、约60mg至约140mg、约70mg至约130mg、约80mg至约120mg、约90mg 至约110mg、或约95mg至约105mg、约98mg至约102mg、约150mg至约250mg、约 160mg至约240mg、约170mg至约230mg、约180mg至约220mg、约190mg至约210mg、约195mg至约205mg、或约198至约207mg范围内。

[1669] 可以通过具有类似实用程序的公认药剂给药模式中的任一种，包括鼻内和经皮途径、通过动脉内注射、静脉内、腹膜内、肠胃外、肌内、皮下、体表、通过移植或通过吸入以单剂量或多个剂量形式给予有效量的TIL。

[1670] 在另一实施例中，本发明提供一种输注袋，其包含上文前述段落中任一段所述的治疗性 TIL群体。

[1671] 在另一实施例中，本发明提供一种肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)组合物，其包含前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体和药学上可接受的载剂。

[1672] 在另一实施例中，本发明提供一种输注袋，其包含上文前述段落中任一段所述的TIL组合物。

[1673] 在另一实施例中，本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体的冷冻保存制剂。

[1674] 在另一实施例中，本发明提供一种肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)组合物，其包含上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体和冷冻保存培养基。

[1675] 在另一实施例中，本发明提供上文前述段落中任一段所述的TIL组合物，其被修改以使得冷冻保存培养基含有DMSO。

[1676] 在另一实施例中，本发明提供上文前述段落中任一段所述的TIL组合物，其被修改以使得冷冻保存培养基含有7-10％DMSO。

[1677] 在另一实施例中，本发明提供上文前述段落中任一段所述的TIL组合物的冷冻保存制剂。

[1678] VI.医药组合物、剂量和给药方案

[1679] 在一实施例中，使用本公开的方法扩增的TIL是以医药组合物形式给予患者。在一实施例中，医药组合物为TIL于无菌缓冲液中的悬浮液。可以通过如所属领域中已知的任何合适途径给予使用本公开的PBMC扩增的TIL。在一些实施例中，T细胞是以单次动脉内或静脉内输注形式给药，优选地持续大致30至60分钟。其它合适的给药途径包括腹膜内、鞘内和淋巴管内给药。

[1680] 可以给予任何适合剂量的TIL。在一些实施例中，给予约2.3×10^{10}至约13.7×10^{10}个TIL，平均为约7.8×10^{10}个TIL，尤其是在癌症为NSCLC的情况下。在一实施例中，给予约1.2×10^{10}至约4.3×10^{10}个TIL。在一些实施例中，给予约3×10^{10}至约12×10^{10}个TIL。在一些实施例中，给予约4×10^{10}至约10×10^{10}个TIL。在一些实施例中，给予约5×10^{10}至约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中，给予约6×10^{10}至约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中，给予约7×10^{10}

至约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约2.3×10^{10}至约13.7×10^{10}。在一些实施例中，治疗有效剂量为约7.8×10^{10}个TIL，尤其是在癌症为NSCLC的情况下。在一些实施例中，治疗有效剂量为约1.2×10^{10}至约4.3×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约3×10^{10}至约12×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约4×10^{10}至约10×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约5×10^{10}至约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约6×10^{10}至约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约7×10^{10}至约8×10^{10}个TIL。

[1681] 在一些实施例中，本发明的医药组合物中提供的TIL数量为约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}和9×10^{13}。在一实施例中，本发明的医药组合物中提供的TIL数量是在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}和5×10^{12}至1×10^{13}范围内。

[1682] 在一些实施例中，本发明的医药组合物中提供的TIL的浓度小于例如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的医药组合物。

[1683] 在一些实施例中，本发明的医药组合物中提供的TIL的浓度大于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的医药组合物。

[1684] 在一些实施例中，本发明的医药组合物中提供的TIL的浓度是在约0.0001%至约

50%、约0.001%至约40%、约0.01%至约30%、约0.02%至约29%、约0.03%至约28%、约0.04%至约27%、约0.05%至约26%、约0.06%至约25%、约0.07%至约24%、约0.08%至约23%、约0.09%至约22%、约0.1%至约21%、约0.2%至约20%、约0.3%至约19%、约0.4%至约 18%、约0.5%至约17%、约0.6%至约16%、约0.7%至约15%、约0.8%至约14%、约0.9%至约12%或约1%至约10%w/w、w/v或v/v的医药组合物的范围内。

[1685] 在一些实施例中，本发明的医药组合物中提供的TIL的浓度是在约0.001%至约10%、约 0.01%至约5%、约0.02%至约4.5%、约0.03%至约4%、约0.04%至约3.5%、约0.05%至约 3%、约0.06%至约2.5%、约0.07%至约2%、约0.08%至约1.5%、约0.09%至约1%、约0.1%至约0.9%w/w、w/v或v/v的医药组合物的范围内。

[1686] 在一些实施例中，本发明的医药组合物中提供的TIL的量等于或小于10g、9.5g、9.0g、 8.5g、8.0g、7.5g、7.0g、6.5g、6.0g、5.5g、5.0g、4.5g、4.0g、3.5g、3.0g、2.5g、2.0g、1.5g、1.0g、0.95g、0.9g、0.85g、0.8g、0.75g、0.7g、0.65g、0.6g、0.55g、0.5g、0.45 g、0.4g、0.35g、0.3g、0.25g、0.2g、0.15g、0.1g、0.09g、0.08g、0.07g、0.06g、0.05 g、0.04g、0.03g、0.02g、0.01g、0.009g、0.008g、0.007g、0.006g、0.005g、0.004g、0.003 g、0.002g、0.001g、0.0009g、0.0008g、0.0007g、0.0006g、0.0005g、0.0004g、0.0003g、 0.0002g或0.0001g。

[1687] 在一些实施例中，本发明的医药组合物中提供的TIL的量大于0.0001g、0.0002g、0.0003 g、0.0004g、0.0005g、0.0006g、0.0007g、0.0008g、0.0009g、0.001g、0.0015g、0.002g、 0.0025g、0.003g、0.0035g、0.004g、0.0045g、0.005g、0.0055g、0.006g、0.0065g、0.007 g、0.0075g、0.008g、0.0085g、0.009g、0.0095g、0.01g、0.015g、0.02g、0.025g、0.03g、 0.035g、0.04g、0.045g、0.05g、0.055g、0.06g、0.065g、0.07g、0.075g、0.08g、0.085g、 0.09g、0.095g、0.1g、0.15g、0.2g、0.25g、0.3g、0.35g、0.4g、0.45g、0.5g、0.55g、0.6g、0.65g、0.7g、0.75g、0.8g、0.85g、0.9g、0.95g、1g、1.5g、2g、2.5、3g、3.5、 4g、4.5g、5g、5.5g、6g、6.5g、7g、7.5g、8g、8.5g、9g、9.5g或10g。

[1688] 本发明的医药组合物中提供的TIL在广泛剂量范围内有效。确切的剂量将取决于给药途径、化合物的给予形式、待治疗个体的性别和年龄、待治疗个体的体重以及主治医师的偏好和经验。适当时还可使用临床上确定的TIL剂量。使用本文中的方法给予的医药组合物的量 (例如，TIL的剂量)将取决于所治疗的人类或哺乳动物、病症或病状的严重程度、给药速率、活性医药成分的配置和处方医师的判断。

[1689] 在一些实施例中，可以单剂量形式给予TIL。可以通过注射，例如静脉内注射进行这类给药。在一些实施例中，可以多个剂量形式给予TIL。给药可以是每年一次、两次、三次、四次、五次、六次或多于六次。给药可以是每月一次、每两周一次、一周一次或每隔一天一次。只要必要，可以继续TIL的给药。

[1690] 在一些实施例中，TIL的有效剂量为约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}、$6\times$

10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}和9×10^{13}。在一些实施例中，TIL的有效剂量是在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}和5×10^{12}至1×10^{13}范围内。

[1691] 在一些实施例中，TIL的有效剂量是在约0.01mg/kg至约4.3mg/kg、约0.15mg/kg至约 3.6mg/kg、约0.3mg/kg至约3.2mg/kg、约0.35mg/kg至约2.85mg/kg、、约0.15mg/kg至约2.85mg/kg、约0.3mg/kg至约2.15mg/kg、约0.45mg/kg至约1.7mg/kg、约0.15mg/kg至约1.3mg/kg、约0.3mg/kg至约1.15mg/kg、约0.45mg/kg至约1mg/kg、约0.55mg/kg至约0.85mg/kg、约0.65mg/kg至约0.8mg/kg、约0.7mg/kg至约0.75mg/kg、约0.7mg/kg至约2.15 mg/kg、约0.85mg/kg至约2mg/kg、约1mg/kg至约1.85mg/kg、约1.15mg/kg至约1.7mg/kg、约1.3mg/kg至约1.6mg/kg、约1.35mg/kg至约1.5mg/kg、约2.15mg/kg至约3.6mg/kg、约2.3mg/kg至约3.4mg/kg、约2.4mg/kg至约3.3mg/kg、约2.6mg/kg至约3.15mg/kg、约2.7 mg/kg至约3mg/kg、约2.8mg/kg至约3mg/kg或约2.85mg/kg至约2.95mg/kg范围内。

[1692] 在一些实施例中，TIL的有效剂量是在约1mg至约500mg、约10mg至约300mg、约20mg至约250mg、约25mg至约200mg、约1mg至约50mg、约5mg至约45mg、约10 mg至约40mg、约15mg至约35mg、约20mg至约30mg、约23mg至约28mg、约50mg 至约150mg、约60mg至约140mg、约70mg至约130mg、约80mg至约120mg、约90mg 至约110mg、或约95mg至约105mg、约98mg至约102mg、约150mg至约250mg、约 160mg至约240mg、约170mg至约230mg、约180mg至约220mg、约190mg至约210mg、约195mg至约205mg、或约198至约207mg范围内。

[1693] 可以通过具有类似实用程序的公认药剂给药模式中的任一种，包括鼻内和经皮途径、通过动脉内注射、静脉内、腹膜内、肠胃外、肌内、皮下、体表、通过移植或通过吸入以单剂量或多个剂量形式给予有效量的TIL。

[1694] VII.治疗患者的方法

[1695] 以最初的TIL收集和TIL培养开始治疗方法。这类方法均由例如Jin等人，《免疫治疗杂志》，2012，35(3):283-292描述于所属领域中，其以全文引用的方式并入本文中。在下文的整个章节(包括实例)中描述治疗方法的实施例。

[1696] 根据本文所描述的方法(包括例如上文步骤A至F或根据以上步骤A至F所描述(另外，如例如图1中所示))产生的扩增TIL在治疗癌症患者中具有特定用途(例如，如Goff等人，《临床肿瘤学杂志(J.Clinical Oncology)》，2016，34(20):2389-239，以及补充内容中所描述；其以全文引用的方式并入本文中)。在一些实施例中，如先前所描述从切除的转移性黑素瘤沉积物中生长TIL(参见Dudley等人，《免疫治疗杂志》，2003，26:332-342；以全文引用的方式并入本文中)可以在无菌条件下解剖新鲜肿瘤。可以收集代表性样品以用于正式病理性分析。可以使用$2mm^{3}$至$3mm^{3}$的单一片段。在一些实施例中，获得每名患者的5、10、15、 20、25或30个样品。在一些实施例中，获得每名患者的20、25或30个样品。在一些实施例中，获得每名患者的20、22、24、26或28个样品。在一些实施例中，获得每名患者的24 个样品。可以将样品放入24孔板的单独孔中，保持在具有高剂量IL-2(6,000IU/mL)的生长培养基中，并监测肿瘤的破坏和/或TIL的增殖。如本文所描述，可以将处理之后剩余有活细胞的任何肿瘤酶促消化成单一细胞悬浮液并冷冻保存。

[1697] 在一些实施例中，可以对成功生长的TIL进行采样以用于表型分析(CD3、CD4、CD8

和CD56)，并在可用时针对自体肿瘤进行测试。如果过夜共培养产生＞200pg/mL和两倍背景的干扰素-γ(IFN-γ)含量，那么可以认为TIL具有反应性。(Goff等人，《免疫治疗杂志》，2010，33:840-847；以全文引用的方式并入本文中)。在一些实施例中，可以选择具有自体反应性或足够生长模式的证据的培养物用于第二次扩增(例如，如根据图1的步骤D所提供的第二次扩增)，包括有时称为快速扩增(REP)的第二次扩增。在一些实施例中，选择具有较高自体反应性(例如，在第二次扩增期间的高增殖)的扩增TIL用于额外的第二次扩增。在一些实施例中，选择具有较高自体反应性(例如，在如图1的步骤D中提供的第二次扩增期间的高增殖)的TIL用于根据图1的步骤D的额外第二次扩增。

[1698] 可以通过针对表面标记CD3、CD4、CD8、CCR7和CD45RA(BD BioSciences)进行流式细胞测量术(例如，FlowJo)，以及通过本文所描述的任何方法来分析输注袋TIL的冷冻保存样品的细胞表型。通过使用标准的酶联免疫吸附分析技术测量血清细胞因子。血清IFN-g升高限定为＞100pg/mL并且大于4 3个基线水平。

[1699] 在一些实施例中，通过本文所提供的方法(例如，图1中示范的那些)产生的TIL提供了出人意料的TIL临床疗效的提高。在一些实施例中，通过本文所提供的方法(例如，图1中示范的那些)产生的TIL与通过除本文中所描述的那些以外的方法(包括例如除图1中示范的那些以外的方法)产生的TIL相比，展现出增加的临床疗效。在一些实施例中，除本文中所描述的那些以外的方法包括称为工艺1C和/或Generation 1(Gen 1)的方法。在一些实施例中，通过DCR、ORR和/或其它临床反应测量增加的疗效。在一些实施例中，通过本文所提供的方法(例如，图1中示范的那些)产生的TIL与通过除本文中所描述的那些以外的方法(包括例如除图1中示范的那些以外的方法，例如Gen 1工艺)产生的TIL相比，展现出类似的反应时间和安全特性。

[1700] 在一些实施例中，IFN-γ指示治疗疗效和/或增加的临床疗效。在一些实施例中，用TIL 治疗的个体血液中的IFN-γ指示活性TIL。在一些实施例中，采用了IFN-γ产生的效力分析。IFN-γ产生为细胞毒性潜力的另一种量度。可以通过测定用由本发明方法(包括例如图1中所描述的那些)制备的TIL治疗的个体的血液、血清或离体TIL中的细胞因子IFN-γ的含量来测量IFN-γ产生。在一些实施例中，IFN-γ的增加指示用由本发明方法产生的TIL治疗的患者的治疗疗效。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除本文中提供的那些以外的其它方法(包括例如，除图1中实施的那些以外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，IFN-γ增加一倍、两倍、三倍、四倍或五倍或更多倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除本文中提供的那些以外的其它方法(包括例如，除图1中实施的那些以外的方法) 制备的TIL治疗的患者相比，IFN-γ分泌增加一倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除本文中提供的那些以外的其它方法(包括例如，除图1中实施的那些以外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，IFN-γ分泌增加两倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除本文中提供的那些以外的其它方法(包括例如，除图1中实施的那些以外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，IFN-γ分泌增加三倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除本文中提供的那些以外的其它方法(包括例如除图1中实施的那些以外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，IFN-γ分泌增加四倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除本文中提供的那些以外的其它方法(包括例如除图1中实施的那些以外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，IFN-γ分泌

增加五倍。在一些实施例中，使用Quantikine ELISA试剂盒测量IFN-γ。在一些实施例中，在用由本发明方法(包括例如，图1中所描述的那些)制备的TIL治疗的个体的离体TIL中测量IFN-γ。在一些实施例中，在用由本发明方法(包括例如，图1中所描述的那些)制备的TIL治疗的个体的血液中测量 IFN-γ。在一些实施例中，在用由本发明方法(包括例如，图1中所描述的那些)制备的TIL 治疗的个体的TIL血清中测量IFN-γ。

[1701] 在一些实施例中，通过本发明方法(包括例如，图1中所描述的那些)制备的TIL与由其它方法(包括未在图1中示范的那些，例如称为工艺1C方法的方法)产生的TIL相比，展现出增加的多克隆性。在一些实施例中，显著提高的多克隆性和/或增加的多克隆性指示治疗疗效和/或增加的临床疗效。在一些实施例中，多克隆性是指T细胞库多样性。在一些实施例中，多克隆性的增加可以指示关于给药由本发明方法产生的TIL的治疗疗效。在一些实施例中，与使用除本文提供的那些以外的方法(包括例如，除图1中实施的那些以外的方法)制备的TIL相比，多克隆性增加一倍、两倍、十倍、100倍、500倍或1000倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除本文中提供的那些以外的其它方法(包括例如，除图1中实施的那些以外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，多克隆性增加一倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除本文中提供的那些以外的其它方法(包括例如，除图1中实施的那些以外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，多克隆性增加两倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除本文中提供的那些以外的其它方法(包括例如，除图1中实施的那些以外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，多克隆性增加十倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除本文中提供的那些以外的其它方法(包括例如，除图1中实施的那些以外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，多克隆性增加100倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除本文中提供的那些以外的其它方法(包括例如，除图1中实施的那些以外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，多克隆性增加500倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除本文中提供的那些以外的其它方法(包括例如，除图1中实施的那些以外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，多克隆性增加1000倍。

[1702] 疗效的度量可以包括疾病控制速率(DCR)以及总体反应率(ORR)，如所属领域中已知以及本文中所描述。

[1703] 1.治疗NSCLC的方法

[1704] 本文中所描述的组合物和方法可用于治疗非小细胞肺癌(NSCLC)的方法中，其中NSCLC 难以用抗PD-1抗体治疗。在一些实施例中，抗PD-1抗体包括例如(但不限于)纳武单抗 (BMS-936558；百时美施贵宝公司；Opdivo®)、派立珠单抗(拉立珠单抗(lambrolizumab)、MK03475或MK-3475，默克(Merck)；Keytruda®)、伊匹单抗(Yervoy®)、人类化抗PD-1 抗体JS001(上海君实(ShangHai JunShi))、单克隆抗PD-1抗体TSR-042(Tesaro公司))、匹立珠单抗(抗PD-1mAb CT-011，麦迪韦逊(Medivation))、抗PD-1单克隆抗体BGB-A317 (百济神州(BeiGene))和/或抗PD-1抗体SHR-1210(上海恒瑞(ShangHai HengRui))、人类单克隆抗体REGN2810(再生元(Regeneron))、人类单克隆抗体MDX-1106(百时美施贵宝公司)和/或人类化抗PD-1IgG4抗体PDR001(诺华(Novartis))。在一些实施例中，PD-1 抗体来自克隆株:RMP1-14(大鼠IgG)-BioXcell目录号BP0146。适用于与根据如本

文所描述的步骤A至F产生的TIL共同给药方法的其它合适的抗体为美国专利第8,008,449号中公开的抗PD-1抗体,其以引用的方式并入本文中。在一些实施例中,抗体或其抗原结合部分与PD-L1特异性结合并抑制其与PD-1的相互作用,从而增加免疫活性。包括所属领域中已知的结合至PD-L1并破坏PD-1与PD-L1之间的相互作用,且刺激抗肿瘤免疫反应的任何抗体。举例来说,靶向PD-L1并在临床试验中的抗体包括BMS-936559(百时美施贵宝公司) 和MPDL3280A(基因泰克公司)。靶向PD-L1的其它合适的抗体公开于以引用的方式并入本文中的美国专利第7,943,743号中。普通技术人员应理解,包括结合于PD-1或PD-L1、干扰 PD-1/PD-L1相互作用且刺激抗肿瘤免疫反应的任何抗体。

[1705] 在一些实施例中,NSCLC难以用抗CTLA-4和/或抗PD-1和化学治疗剂治疗。在一些实施例中,NSCLC难以用抗CTLA-4和/或抗PD-1和化学疗法治疗,其中化学治疗剂为卡铂、紫杉醇、培美曲塞、顺铂。在一些实施例中,抗CLTA-4抗体,例如伊匹单抗(Yervoy®)。

[1706] 在一些实施例中,NSCLC难以用组合的PD-1(包括例如派立珠单抗)和化学治疗剂治疗。在一些实施例中,化学治疗剂为含铂双药化学治疗剂。在一些实施例中,含铂双药疗法包含选自顺铂和卡铂组成的组的第一化学治疗剂和选自以下组成的组的第二化学治疗剂:长春瑞滨、吉西他滨和紫杉烷(包括例如紫杉醇、多西他赛或白蛋白结合型紫杉醇)。在一些实施例中,含铂双药化学治疗剂与培美曲塞组合。

[1707] 在一些实施例中,NSCLC难以用包含抗PD-1和化学治疗剂的组合治疗或组合疗法治疗。在一些实施例中,抗PD-1或抗PD-L1抗体是选自以下组成的组:纳武单抗、派立珠单抗、 JS001、TSR-042、匹立珠单抗、BGB-A317、SHR-1210、REGN2810、MDX-1106、PDR001、来自克隆株RMP1-14的抗PD-1、美国专利第8,008,449号中公开的抗PD-1抗体、度伐单抗、阿特珠单抗、阿维鲁单抗及其片段、衍生物、变体以及生物类似物。在一些实施例中,抗PD-1 为派立珠单抗。在一些实施例中,化学治疗剂为含铂双药化学治疗剂。在一些实施例中,化学治疗剂与培美曲塞组合。在一些实施例中,NSCLC难以用包含卡铂、紫杉醇、培美曲塞和顺铂的组合疗法治疗。在一些实施例中,NSCLC难以用包含卡铂、紫杉醇、培美曲塞、顺铂、纳武单抗和伊匹单抗的组合疗法治疗。

[1708] 在一些实施例中,NSCLC难以用包含抗PD-1或抗PD-L1和含铂双药疗法的组合疗法治疗,其中含铂双药疗法包含:

[1709] i)第一化学治疗剂,其选自顺铂和卡铂组成的组,

[1710] ii)和第二化学治疗剂,其选自以下组成的组:长春瑞滨、吉西他滨和紫杉烷(包括例如紫杉醇、多西他赛或白蛋白结合型紫杉醇)。

[1711] 在一些实施例中,NSCLC难以用包含抗PD-1或抗PD-L1、培美曲塞和含铂双药疗法的组合疗法治疗,其中含铂双药疗法包含:

[1712] i)第一化学治疗剂,其选自顺铂和卡铂组成的组,

[1713] ii)和第二化学治疗剂,其选自以下组成的组:长春瑞滨、吉西他滨和紫杉烷(包括例如紫杉醇、多西他赛或白蛋白结合型紫杉醇)。

[1714] 在一些实施例中,NSCLC已用抗PD-1抗体治疗。在一些实施例中,NSCLC已用抗PD-L1 抗体治疗。在一些实施例中,NSCLC个体是未经治疗的。在一些实施例中,NSCLC未用抗PD-1抗体治疗。在一些实施例中,NSCLC未用抗PD-L1抗体治疗。在一些实施例中,NSCLC 先前已用化学治疗剂治疗。在一些实施例中,NSCLC先前已用化学治疗剂治疗,但不再用化学

治疗剂治疗。在一些实施例中,NSCLC患者未进行抗PD-1/PD-L1治疗。在一些实施例中,NSCLC个体具有低PD-L1表达。在一些实施例中,NSCLC个体未进行NSCLC治疗或化疗后未进行抗PD-1/PD-L1治疗。在一些实施例中,NSCLC个体未进行NSCLC治疗或化疗后未进行抗PD-1/PD-L1治疗,并且具有低PD-L1表达。在一些实施例中,NSCLC个体在基线处具有巨块病变。在一些实施例中,个体在基线处具有巨块病变且具有低PD-L1表达。在一些实施例中,NSCLC个体未进行NSCLC治疗或化疗后(例如,化学治疗剂后)未进行抗 PD-1/PD-L1治疗,其具有低PD-L1表达和/或在基线处具有巨块病变。在一些实施例中,巨块病变表示横断面或冠状面中测量的最大肿瘤直径大于7cm。在一些实施例中,巨块病变表示存在短轴直径为20mm或更大的肿胀淋巴结。在一些实施例中,化学治疗包括用于NSCLC 的标准护理治疗。

[1715] 在一些实施例中,通过本发明方法(包括例如,图1中所描述的那些)制备的TIL与由其它方法(包括未在图1中示范的那些,例如称为工艺1C方法的方法)产生的TIL相比,展现出增加的多克隆性。在一些实施例中,显著提高的多克隆性和/或增加的多克隆性指示癌症治疗的治疗疗效和/或增加的临床疗效。在一些实施例中,多克隆性是指T细胞库多样性。在一些实施例中,多克隆性的增加可以指示关于给药由本发明方法产生的TIL的治疗疗效。在一些实施例中,与使用除本文提供的那些以外的方法(包括例如,除图1中实施的那些以外的方法)制备的TIL相比,多克隆性增加一倍、两倍、十倍、100倍、500倍或1000倍。在一些实施例中,与未治疗的患者相比和/或与用使用除本文中提供的那些以外的其它方法 (包括例如,除图1中实施的那些以外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加一倍。在一些实施例中,与未治疗的患者相比和/或与用使用除本文中提供的那些以外的其它方法(包括例如,除图1中实施的那些以外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加两倍。在一些实施例中,与未治疗的患者相比和/或与用使用除本文中提供的那些以外的其它方法(包括例如,除图1中实施的那些以外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加十倍。在一些实施例中,与未治疗的患者相比和/或与用使用除本文中提供的那些以外的其它方法(包括例如,除图1中实施的那些以外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加100倍。在一些实施例中,与未治疗的患者相比和/或与用使用除本文中提供的那些以外的其它方法(包括例如,除图1中实施的那些以外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加500倍。在一些实施例中,与未治疗的患者相比和/或与用使用除本文中提供的那些以外的其它方法(包括例如,除图1中实施的那些以外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加1000倍。

[1716] a.PD-1和PD-L1抑制剂

[1717] 程序性死亡1(PD-1)为T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)T细胞、活化单核细胞和树突状细胞表达的288个氨基酸跨膜免疫检查点受体蛋白。又称为CD279的PD-1属于CD28 家族,且在人类中由染色体2上的Pdcd1基因编码。PD-1由一个免疫球蛋白(Ig)超家族域、跨膜区和含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)及基于免疫受体酪氨酸的切换基序 (ITSM)的胞内域组成。已知PD-1和其配体(PD-L1和PD-L2)在免疫耐受中起关键作用,如Keir等人,《免疫学年鉴》2008,26,677-704中所描述。PD-1提供负面调节T细胞免疫反应的抑制信号。PD-L1(又称为B7-H1或CD274)和PD-L2(又称为B7-DC或CD273)表达于肿瘤细胞和基质细胞上,所述肿瘤细胞和基质细胞可能遇到表达PD-1的活化T细胞,从而导致T细胞的免疫抑止。PD-L1为由人类染色体9上的Cd274基因编码的290个氨基酸跨膜蛋白。通过使用PD-1抑制

剂、PD-L1抑制剂和/或PD-L2抑制剂阻断PD-1与其配体PD-L1 和PD-L2之间的相互作用可以克服免疫抗性，如最新临床研究中所展现，例如Topalian等人，《新英格兰医学杂志》，2012，366,2443-54中所描述。PD-L1在许多肿瘤细胞系上表达，而PD-L2 主要在树突状细胞和几种肿瘤系上表达。除T细胞(其在活化之后诱导性地表达PD-1)之外， PD-1也在B细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、活化单核细胞和树突状细胞上表达。

[1718] 在一实施例中，PD-1抑制剂可以是所属领域中已知的任何PD-1抑制剂或PD-1阻断剂。确切地说，其为在以下段落中更详细描述的PD-1抑制剂或阻断剂中的一种。关于PD-1抑制剂的术语“抑制剂”、“拮抗剂”和“阻断剂”在本文中可互换地使用。为避免疑问，本文中提及作为抗体的PD-1抑制剂可以指化合物或其抗原结合片段、变体、结合物或生物类似物。为避免疑问，本文中提及的PD-1抑制剂也可以指小分子化合物或其药学上可接受的盐、酯、溶剂合物、水合物、共晶体或前药。

[1719] 在一优选实施例中，PD-1抑制剂为抗体(即，抗PD-1抗体)、其片段(包括Fab片段)或其单链可变片段(scFv)。在一些实施例中，PD-1抑制剂是多克隆抗体。在一优选实施例中，PD-1抑制剂是单克隆抗体。在一些实施例中，PD-1抑制剂与PD-1竞争结合，和/或结合于PD-1上的表位。在一实施例中，抗体与PD-1竞争结合，和/或结合于PD-1上的表位。

[1720] 在一些实施例中，PD-1抑制剂是以约100pM或更低的K_D结合人类PD-1、以约90pM或更低的K_D结合人类PD-1、以约80pM或更低的K_D结合人类PD-1、以约70pM或更低的 K_D结合人类PD-1、以约60pM或更低的K_D结合人类PD-1、以约50pM或更低的K_D结合人类PD-1、以约40pM或更低的K_D结合人类PD-1、以约30pM或更低的K_D结合人类PD-1、以约20pM或更低的K_D结合人类PD-1、以约10pM或更低的K_D结合人类PD-1或以约1pM 或更低的K_D结合人类PD-1的PD-1抑制剂。

[1721] 在一些实施例中，PD-1抑制剂是以约$7.5\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类PD-1、以约$7.5\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类PD-1、以约$8\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类PD-1、以约$8.5\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类PD-1、以约$9\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类PD-1、以约$9.5\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类PD-1或以约$1\times10^6$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类PD-1的PD-1抑制剂。

[1722] 在一些实施例中，PD-1抑制剂是以约2×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类PD-1、以约 2.1×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类PD-1、以约2.2×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类 PD-1、以约2.3×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类PD-1、以约2.4×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类PD-1、以约2.5×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类PD-1、以约2.6×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类PD-1或以约2.7×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类PD-1、以约2.8×10^{-5}1/s 或更慢的k_{dissoc}结合于人类PD-1、以约2.9×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类PD-1或以约 3×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类PD-1的PD-1抑制剂。

[1723] 在一些实施例中，PD-1抑制剂是以约10nM或更低的IC_{50}阻断或抑制人类PD-L1或人类PD-L2与人类PD-1的结合、以约9nM或更低的IC_{50}阻断或抑制人类PD-L1或人类PD-L2 与人类PD-1的结合、以约8nM或更低的IC_{50}阻断或抑制人类PD-L1或人类PD-L2与人类 PD-1的结合、以约7nM或更低的IC_{50}阻断或抑制人类PD-L1或人类PD-L2与人类PD-1的结合、以约6nM或更低的IC_{50}阻断或抑制人类PD-L1或人类PD-L2与人类PD-1的结合、以约5nM或更低的IC_{50}阻断或抑制人类PD-L1或人类PD-L2与人类PD-1的结合、以约4nM 或更低的IC_{50}阻断或抑制人

类PD-L1或人类PD-L2与人类PD-1的结合、以约3nM或更低的IC_{50}阻断或抑制人类PD-L1或人类PD-L2与人类PD-1的结合、以约2nM或更低的IC_{50}阻断或抑制人类PD-L1或人类PD-L2与人类PD-1的结合，或以约1nM或更低的IC_{50}阻断或抑制人类PD-L1或人类PD-L2与人类PD-1的结合的PD-1抑制剂。

[1724] 在一实施例中，PD-1抑制剂为纳武单抗(可以OPDIVO购自百时美施贵宝公司)，或其生物类似物、抗原结合片段、结合物或变体。纳武单抗为阻断PD-1受体的完全人类IgG4抗体。在一实施例中，抗PD-1抗体为免疫球蛋白G4κ，抗(人类CD274)抗体。指定纳武单抗的化学文摘社(Chemical Abstracts Service;CAS)注册号946414-94-4并且又称为5C4、BMS-936558、MDX-1106和ONO-4538。纳武单抗的制备和性质描述于美国专利第8,008,449 号和国际专利公开第WO 2006/121168号中，其公开内容以引用的方式并入本文中。纳武单抗在各种形式的癌症中的临床安全性和疗效已描述于Wang等人，《癌症免疫学研究》，2014,2,846-56;Page等人，《医学年鉴(Ann.Rev.Med.)》，2014,65,185-202;和Weber等人，《临床肿瘤学杂志(J.Clin.Oncology)》，2013,31,4311-4318中，其公开内容以引用的方式并入本文中。表48中阐述纳武单抗的氨基酸序列。纳武单抗具有在22-96、140-196、254-314、360-418、22″-96″、140″-196″、254″-314″和360″-418″处的重链内二硫键;在23’-88’、134’-194’、23″’-88″’ 和134″’-194″’处的轻链内二硫键;在127-214’、127″-214″’处的重链-轻链间二硫键、在219-219″ 和222-222″处的重链-重链间二硫键;以及在290、290″处的N-糖基化位点(H CH_2 84.4)。

[1725] 在一实施例中，PD-1抑制剂包含由SEQ ID NO:463所载的重链和由SEQ ID NO:464所载的轻链。在一实施例中，PD-1抑制剂包含分别具有SEQ ID NO:463和SEQ ID NO:464中所示的序列的重链和轻链，或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或结合物。在一实施例中，PD-1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:463和SEQ ID NO:464中所示的序列至少99％一致的重链和轻链。在一实施例中，PD-1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:463和SEQ ID NO:464中所示的序列至少98％一致的重链和轻链。在一实施例中，PD-1 抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:463和SEQ ID NO:464中所示的序列至少97％一致的重链和轻链。在一实施例中，PD-1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:463和SEQ ID NO:464中所示的序列至少96％一致的重链和轻链。在一实施例中，PD-1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:463和SEQ ID NO:464中所示的序列至少95％一致的重链和轻链。

[1726] 在一实施例中，PD-1抑制剂包含纳武单抗的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一实施例中，PD-1抑制剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:465中所示的序列，并且PD-1抑制剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:466中所示的序列和其保守性氨基酸取代。在一实施例中，PD-1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:465和SEQ ID NO:466中所示的序列至少99％一致的V_H和V_L区。在一实施例中，PD-1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:465和SEQ ID NO:466中所示的序列至少98％一致的V_H和V_L区。在一实施例中，PD-1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:465和SEQ ID NO:466中所示的序列至少97％一致的V_H和V_L区。在一实施例中，PD-1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:465和SEQ ID NO:466中所示的序列至少96％一致的V_H和V_L区。在一实施例中，PD-1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:465和SEQ ID NO:466中所示的序列至少95％一致的V_H和V_L区。

[1727] 在一实施例中，PD-1抑制剂包含分别具有SEQ ID NO:467、SEQ ID NO:468和SEQ

ID NO:469中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3域，以及分别具有SEQ ID NO:470、SEQ ID NO:471和SEQ ID NO:472中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3域。在一实施例中，抗体与PD-1竞争结合，和/或结合于 PD-1上的与前述抗体中的任一个相同的表位。

[1728] 在一实施例中，PD-1抑制剂为由药物管理机构参考纳武单抗批准的抗PD-1生物类似单克隆抗体。在一实施例中，生物类似物包含抗PD-1抗体，所述抗PD-1抗体包含与参考药品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97％序列一致性(例如，97％、98％、99％或100％序列一致性)并且与参考药品或参考生物产品相比包含一个或多个转译后修饰的氨基酸序列，其中参考药品或参考生物产品为纳武单抗。在一些实施例中，一个或多个转译后修饰是选自以下中的一个或多个：糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中，生物类似物为授权或提交授权的抗PD-1抗体，其中以不同于参考药品或参考生物产品的配方的配方提供抗 PD-1抗体，其中参考药品或参考生物产品为纳武单抗。抗PD-1抗体可由药物管理机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品为纳武单抗。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品为纳武单抗。

[1729] 表35.与纳武单抗相关的PD-1抑制剂的氨基酸序列。

[1730]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO:463 纳武单抗重链	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 440
SEQ ID NO:464 纳武单抗轻链	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
SEQ ID NO:465 纳武单抗可变重链	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSS	60 113
SEQ ID NO:466 纳武单抗可变轻链	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIK	60 107
SEQ ID NO:467 纳武单抗重链 CDR1	NSGMH	5
SEQ ID NO:468 纳武单抗重链 CDR2	VIWYDGSKRY YADSVKG	17
SEQ ID NO:469 纳武单抗重链 CDR3	NDDY	4
SEQ ID NO:470 纳武单抗轻链 CDR1	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID NO:471 纳武单抗轻链 CDR2	DASNRAT	7
SEQ ID NO:472 纳武单抗轻链 CDR3	QQSSNWPRT	9

[1731] 在另一实施例中，PD-1抑制剂包含派立珠单抗(可以KEYTRUDA购自美国新泽西州肯纳尔沃斯堡(Kenilworth,NJ,USA)的默克公司)，或其抗原结合片段、结合物或变体。指定派立珠单抗的CAS注册号1374853-91-4并且又称为拉立珠单抗、MK-3475和SCH-900475。派立珠单抗具有免疫球蛋白G4，抗(人类蛋白质PDCD1(程序性细胞死亡1))(人类-小家鼠单克

隆重链)二硫键及人类小家鼠单克隆轻链二聚体结构。派立珠单抗的结构还可以描述为免疫球蛋白G4,抗(人类程序性细胞死亡1);人类化小鼠单克隆[228-L-脯氨酸(H10-S>P)]γ4重链(134-218')-二硫键及人类化小鼠单克隆κ轻链二聚体(226-226″:229-229″)-双二硫键。派立珠单抗的性质、用途和制备描述于国际专利公开第WO 2008/156712 A1号、美国专利第 8,354,509号和美国专利申请公开第US 2010/0266617 A1号、第US 2013/0108651 A1号和第 US 2013/0109843A2号中,其公开内容以引用的方式并入本文中。派立珠单抗在各种形式的癌症中的临床安全性和疗效描述于Fuerst,《肿瘤学时报(Oncology Times)》,2014,36,35-36; Robert等人,《柳叶刀(Lancet)》,2014,384,1109-17;以及Thomas等人,《生物学治疗专家意见(Exp.Opin.Biol.Ther.,2014,14,1061-1064中。表49中阐述派立珠单抗的氨基酸序列。派立珠单抗包括以下二硫桥: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和367″-425″,和以下糖基化位点(N):Asn-297和Asn-297″。派立珠单抗为Fc区中具有稳定S228P突变的 IgG4/κ同种型;在IgG4铰链区中插入此突变防止形成通常针对IgG4抗体所观察到的半分子。派立珠单抗在每条重链的Fc域内的Asn297处不均匀糖基化,得到完整抗体的分子量为大致 149kDa。派立珠单抗的主要糖型为岩藻糖基化半乳糖双触角聚糖形式(GOF)。

[1732] 在一实施例中,PD-1抑制剂包含由SEQ ID NO:473所载的重链和由SEQ ID NO:474所载的轻链。在一实施例中,PD-1抑制剂包含分别具有SEQ ID NO:473和SEQ ID NO:474中所示的序列的重链和轻链,或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或结合物。在一实施例中,PD-1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:473和SEQ ID NO:474中所示的序列至少99%一致的重链和轻链。在一实施例中,PD-1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:473和SEQ ID NO:474中所示的序列至少98%一致的重链和轻链。在一实施例中,PD-1 抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:473和SEQ ID NO:474中所示的序列至少97%一致的重链和轻链。在一实施例中,PD-1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:473和SEQ ID NO:474中所示的序列至少96%一致的重链和轻链。在一实施例中,PD-1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:473和SEQ ID NO:474中所示的序列至少95%一致的重链和轻链。

[1733] 在一实施例中,PD-1抑制剂包含派立珠单抗的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一实施例中,PD-1抑制剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:475中所示的序列,并且PD-1抑制剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:476中所示的序列和其保守性氨基酸取代。在一实施例中,PD-1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:475和SEQ ID NO:476中所示的序列至少99%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,PD-1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:475和SEQ ID NO:476中所示的序列至少98%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,PD-1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:475和SEQ ID NO:476中所示的序列至少97%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,PD-1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:475和SEQ ID NO:476中所示的序列至少96%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,PD-1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:475和SEQ ID NO:476中所示的序列至少95%一致的V_H和V_L区。

[1734] 在一实施例中,PD-1抑制剂包含分别具有SEQ ID NO:477、SEQ ID NO:478和SEQ ID NO:479中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3域,以及分别具有SEQ ID NO:480、SEQ ID NO:481和SEQ ID NO:482中所阐述的序列和其保守性氨基酸取

代的轻链CDR1、CDR2和CDR3域。在一实施例中，抗体与PD-1竞争结合，和/或结合于PD-1上的与前述抗体中的任一个相同的表位。

[1735] 在一实施例中，PD-1抑制剂为由药物管理机构参考派立珠单抗批准的抗PD-1生物类似单克隆抗体。在一实施例中，生物类似物包含抗PD-1抗体，所述抗PD-1抗体包含与参考药品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97％序列一致性(例如，97％、98％、99％或100％序列一致性)并且与参考药品或参考生物产品相比包含一个或多个转译后修饰的氨基酸序列，其中参考药品或参考生物产品为派立珠单抗。在一些实施例中，一个或多个转译后修饰是选自以下中的一个或多个：糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中，生物类似物为授权或提交授权的抗PD-1抗体，其中以不同于参考药品或参考生物产品的配方的配方提供抗 PD-1抗体，其中参考药品或参考生物产品为派立珠单抗。抗PD-1抗体可由药物管理机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品为派立珠单抗。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品为派立珠单抗。

[1736] 表36.与派立珠单抗相关的PD-1抑制剂的氨基酸序列。

[1737]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）
SEQ ID NO:473 派立珠单抗重链	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 派立珠单抗轻链	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 派立珠单抗可变重链	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF 60 NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS 120
SEQ ID NO:476 派立珠单抗可变轻链	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO:477 派立珠单抗重链 CDR1	NYYMY 5
SEQ ID NO:478 派立珠单抗重链 CDR2	GINPSNGGTN FNEKFK 16
SEQ ID NO:479 派立珠单抗重链 CDR3	RDYRFDMGFD Y 11
SEQ ID NO:480 派立珠单抗轻链 CDR1	RASKGVSTSG YSYLH 15
SEQ ID NO:481 派立珠单抗轻链 CDR2	LASYLES 7
SEQ ID NO:482 派立珠单抗轻链 CDR3	QHSRDLPLT 9

[1738] 在一实施例中，PD-1抑制剂为可商购的抗PD-1单克隆抗体，例如抗m-PD-1克隆株J43 (目录号BE0033-2)和RMP1-14(目录号BE0146)(Bio X Cell公司，美国新罕布什尔州西黎巴嫩)。多种可商购的抗PD-1抗体为所属领域的普通技术人员所已知。

[1739] 在一实施例中，PD-1抑制剂为美国专利第8,354,509号或美国专利申请公开第2010/0266617 A1号、第2013/0108651 A1号、第2013/0109843A2号中公开的抗体，其公开内容以引用的方式并入本文中。在一实施例中，PD-1抑制剂为美国专利第8,287,856号、第 8,

580,247号和第8,168,757号及美国专利申请公开第2009/0028857 A1号、第2010/0285013 A1 号、第2013/0022600 A1号和第2011/0008369 A1号中描述的抗PD-1抗体，其教导以引用的方式并入本文中。在另一实施例中，PD-1抑制剂为美国专利第8,735,553B1号中公开的抗PD-1 抗体，其公开内容以引用的方式并入本文中。在一实施例中，PD-1抑制剂为匹立珠单抗，又称为CT-011，其描述于美国专利第8,686,119号中，其公开内容以引用的方式并入本文中。

[1740] 在一实施例中，PD-1抑制剂可以是小分子或肽或肽衍生物，例如美国专利第8,907,053 号；第9,096,642号和第9,044,442号及美国专利申请公开第US 2015/0087581号中描述的那些；1,2,4-恶二唑化合物和衍生物，例如美国专利申请公开第2015/0073024号中描述的那些；环状肽模拟物化合物和衍生物，例如美国专利申请公开第US 2015/0073042号中描述的那些；环状化合物和衍生物，例如美国专利申请公开第US 2015/0125491号中描述的那些；1,3,4-恶二唑和1,3,4-噻二唑化合物和衍生物，例如国际专利申请公开第WO 2015/033301号中描述的那些；肽类化合物和衍生物，例如国际专利申请公开第WO 2015/036927号和第WO 2015/04490号中描述的那些，或大环肽类化合物和衍生物，例如美国专利申请公开第US 2014/0294898号中描述的那些；其每一个的公开内容均以全文引用的方式并入本文中。

[1741] 在一实施例中，PD-L1或PD-L2抑制剂可以是所属领域中已知的任何PD-L1或PD-L2抑制剂、拮抗剂或阻断剂。确切地说，其为在以下段落中更详细描述的PD-L1或PD-L2抑制剂、拮抗剂或阻断剂中的一种。关于PD-L1和PD-L2抑制剂的术语“抑制剂”、“拮抗剂”和“阻断剂”在本文中可互换地使用。为避免疑问，本文中提及作为抗体的PD-L1或PD-L2抑制剂可以指化合物或其抗原结合片段、变体、结合物或生物类似物。为避免疑问，本文中提及的PD-L1或PD-L2抑制剂可以指化合物或其药学上可接受的盐、酯、溶剂合物、水合物、共晶体或前药。

[1742] 在一些实施例中，本文中所描述的组合物、工艺和方法包括PD-L1或PD-L2抑制剂。在一些实施例中，PD-L1或PD-L2抑制剂是小分子。在一优选实施例中，PD-L1或PD-L2抑制剂为抗体(即，抗PD-1抗体)、其片段(包括Fab片段)或其单链可变片段(scFv)。在一些实施例中，PD-L1或PD-L2抑制剂是多克隆抗体。在一优选实施例中，PD-L1或PD-L2抑制剂是单克隆抗体。在一些实施例中，PD-L1或PD-L2抑制剂与PD-L1或PD-L2竞争结合，和 /或结合于PD-L1或PD-L2上的表位。在一实施例中，抗体与PD-L1或PD-L2竞争结合，和 /或结合于PD-L1或PD-L2上的表位。

[1743] 在一些实施例中，本文提供的PD-L1抑制剂针对PD-L1具有选择性，原因在于化合物以比其与其它受体(包括PD-L2受体)结合或相互作用显著更低的浓度与PD-L1结合或相互作用。在某些实施例中，化合物以结合常数与PD-L1受体结合，所述结合常数为与PD-L2受体结合相比至少约2倍高的浓度、约3倍高的浓度、约5倍高的浓度、约10倍高的浓度、约 20倍高的浓度、约30倍高的浓度、约50倍高的浓度、约100倍高的浓度、约200倍高的浓度、约300倍高的浓度或约500倍高的浓度。

[1744] 在一些实施例中，本文提供的PD-L2抑制剂针对PD-L2具有选择性，原因在于化合物以比其与其它受体(包括PD-L1受体)结合或相互作用显著更低的浓度与PD-L2结合或相互作用。在某些实施例中，化合物以结合常数与PD-L2受体结合，所述结合常数为与PD-L1受

体结合相比至少约2倍高的浓度、约3倍高的浓度、约5倍高的浓度、约10倍高的浓度、约 20倍高的浓度、约30倍高的浓度、约50倍高的浓度、约100倍高的浓度、约200倍高的浓度、约300倍高的浓度或约500倍高的浓度。

[1745] 不受任何理论限制，认为肿瘤细胞表达PD-L1，并且T细胞表达PD-1。然而，肿瘤细胞的PD-L1表达对于PD-1或PD-L1抑制剂或阻断剂的疗效来说并非需要的。在一实施例中，肿瘤细胞表达PD-L1。在另一实施例中，肿瘤细胞并不表达PD-L1。在一些实施例中，方法可以包括PD-1和PD-L1抗体(例如本文中所描述的那些)以及TIL的组合。可以同时或依序给药PD-1和PD-L1抗体与TIL的组合。

[1746] 在一些实施例中，PD-L1和/或PD-L2抑制剂为以约100pM或更低的K_D结合人类PD-L1 和/或PD-L2、以约90pM或更低的K_D结合人类PD-L1和/或PD-L2、以约80pM或更低的 K_D结合人类PD-L1和/或PD-L2、以约70pM或更低的K_D结合人类PD-L1和/或PD-L2、以约60pM或更低的K_D、约50pM或更低的K_D结合人类PD-L1和/或PD-L2、以约40pM或更低的K_D结合人类PD-L1和/或PD-L2，或以约30pM或更低的K_D结合人类PD-L1和/或 PD-L2的PD-L1和/或PD-L2抑制剂。

[1747] 在一些实施例中，PD-L1和/或PD-L2抑制剂是以约$7.5\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类PD-L1和/或PD-L2、以约$8\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类PD-L1和/或PD-L2、以约$8.5\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类PD-L1和/或PD-L2、以约$9\times10^5$1/M·s或更快的 k_{assoc}结合于人类PD-L1和/或PD-L2、以约$9.5\times10^5$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类PD-L1和 /或PD-L2，或以约$1\times10^6$1/M·s或更快的k_{assoc}结合于人类PD-L1和/或PD-L2的PD-L1和/ 或PD-L2抑制剂。

[1748] 在一些实施例中，PD-L1和/或PD-L2抑制剂为以约2×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类 PD-L1或PD-L2、以约2.1×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类PD-1、以约2.2×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类PD-1、以约2.3×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类PD-1、以约2.4×10^{-5}1/s 或更慢的k_{dissoc}结合于人类PD-1、以约2.5×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类PD-1、以约 2.6×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类PD-1、以约2.7×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类 PD-L1或PD-L2，或以约3×10^{-5}1/s或更慢的k_{dissoc}结合于人类PD-L1或PD-L2的PD-L1和/ 或PD-L2抑制剂。

[1749] 在一些实施例中，PD-L1和/或PD-L2抑制剂为以约10nM或更低的IC_{50}阻断或抑制人类PD-L1或人类PD-L2与人类PD-1的结合；以约9nM或更低的IC_{50}阻断或抑制人类PD-L1 或人类PD-L2与人类PD-1的结合；以约8nM或更低的IC_{50}阻断或抑制人类PD-L1或人类 PD-L2与人类PD-1的结合；以约7nM或更低的IC_{50}阻断或抑制人类PD-L1或人类PD-L2 与人类PD-1的结合；以约6nM或更低的IC_{50}阻断或抑制人类PD-L1或人类PD-L2与人类 PD-1的结合；以约5nM或更低的IC_{50}阻断或抑制人类PD-L1或人类PD-L2与人类PD-1的结合；以约4nM或更低的IC_{50}阻断或抑制人类PD-L1或人类PD-L2与人类PD-1的结合；以约3nM或更低的IC_{50}阻断或抑制人类PD-L1或人类PD-L2与人类PD-1的结合；以约2nM 或更低的IC_{50}阻断或抑制人类PD-L1或人类PD-L2与人类PD-1的结合；或以约1nM或更低的IC_{50}阻断人类PD-1，或阻断人类PD-L1或人类PD-L2与人类PD-1的结合的PD-L1和/ 或PD-L2抑制剂。

[1750] 在一实施例中，PD-L1抑制剂为度伐单抗，又称为MEDI4736(其可购自马里兰州盖瑟斯堡(Gaithersburg,Maryland)的Medimmune,LLC,阿斯利康公司(AstraZeneca plc.)的

子公司),或其抗原结合片段、结合物或变体。在一实施例中,PD-L1抑制剂为美国专利第 8,779,108号或美国专利申请公开第2013/0034559号中公开的抗体,其公开内容以引用的方式并入本文中。度伐单抗的临床疗效已描述于Page等人,《医学年鉴(Ann.Rev.Med.)》,2014, 65,185-202;Brahmer等人,《临床肿瘤学杂志》2014,32,5s(增刊,摘文8021);及McDermott 等人,《癌症治疗评论(Cancer Treatment Rev.)》,2014,40,1056-64中。度伐单抗的制备和性质描述于美国专利第8,779,108号中,其公开内容以引用的方式并入本文中。表50中阐述度伐单抗的氨基酸序列。度伐单抗单克隆抗体包括在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和371″-429'处的二硫键;及在Asn-301和Asn-301″处的N-糖基化位点。

[1751] 在一实施例中,PD-L1抑制剂包含由SEQ ID NO:483所载的重链和由SEQ ID NO:484所载的轻链。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含分别具有SEQ ID NO:483和SEQ ID NO:484中所示的序列的重链和轻链,或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或结合物。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:483和SEQ ID NO:484中所示的序列至少99%一致的重链和轻链。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:483和SEQ ID NO:484中所示的序列至少98%一致的重链和轻链。在一实施例中,PD-L1 抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:483和SEQ ID NO:484中所示的序列至少97%一致的重链和轻链。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:483和SEQ ID NO:484中所示的序列至少96%一致的重链和轻链。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:483和SEQ ID NO:484中所示的序列至少95%一致的重链和轻链。

[1752] 在一实施例中,PD-L1抑制剂包含度伐单抗的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一实施例中,PD-L1抑制剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:485中所示的序列,并且PD-L1 抑制剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:486中所示的序列和其保守性氨基酸取代。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:485和SEQ ID NO:486中所示的序列至少99%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:485和SEQ ID NO:486中所示的序列至少98%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:485和SEQ ID NO:486中所示的序列至少97%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:485和SEQ ID NO:486中所示的序列至少96%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:485和 SEQ ID NO:486中所示的序列至少95%一致的V_H和V_L区。

[1753] 在一实施例中,PD-L1抑制剂包含分别具有SEQ ID NO:487、SEQ ID NO:488和SEQ ID NO:489中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3域,以及分别具有SEQ ID NO:490、SEQ ID NO:491和SEQ ID NO:492中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3域。在一实施例中,抗体与PD-L1竞争结合,和/或结合于PD-L1上的与前述抗体中的任一个相同的表位。

[1754] 在一实施例中,PD-L1抑制剂为由药物管理机构参考度伐单抗批准的抗PD-L1生物类似单克隆抗体。在一实施例中,生物类似物包含抗PD-L1抗体,所述抗PD-L1抗体包含与参考药品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97%序列一致性(例如,97%、98%、99%或100%序列一致性)并且与参考药品或参考生物产品相比包含一个或多个转译后修饰的氨

基酸序列,其中参考药品或参考生物产品为度伐单抗。在一些实施例中,一个或多个转译后修饰是选自以下中的一个或多个:糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中,生物类似物为授权或提交授权的抗PD-L1抗体,其中以不同于参考药品或参考生物产品的配方的配方提供抗 PD-L1抗体,其中参考药品或参考生物产品为度伐单抗。抗PD-L1抗体可由药物管理机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品为度伐单抗。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品为度伐单抗。

[1755] 表37.与度伐单抗相关的PD-L1抑制剂的氨基酸序列。

[1756]

标识符	序列(单字母氨基酸符号)	
SEQ ID NO:483 度伐单抗重链	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEFEG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPASIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	60 120 180 240 300 360 420 451
SEQ ID NO:484 度伐单抗 轻链	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC	60 120 180 240 265
SEQ ID NO:485 度伐单抗 可变重链	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS S	60 120 121
SEQ ID NO:486 度伐单抗 可变轻链	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIK	60 108
SEQ ID NO:487 度伐单抗 重链CDR1	RYWMS	5
SEQ ID NO:488 度伐单抗 重链CDR2	NIKQDGSEKY YVDSVKG	17
SEQ ID NO:489 度伐单抗 重链CDR3	EGGWFGELAF DY	12
SEQ ID NO:490 度伐单抗 轻链CDR1	RASQRVSSSY LA	12
SEQ ID NO:491 度伐单抗 轻链CDR2	DASSRAT	7
SEQ ID NO:492 度伐单抗 轻链CDR3	QQYGSLPWT	9

[1757] 在一实施例中,PD-L1抑制剂为阿维鲁单抗,又称为MSB0010718C(可购自默克集团(Merck KGaA/EMD Serono)),或其抗原结合片段、结合物或变体。阿维鲁单抗的制备和性质描述于美国专利申请公开第US 2014/0341917 A1号中,其公开内容以引用的方式特定地并入本文中。表51中阐述阿维鲁单抗的氨基酸序列。阿维鲁单抗具有在22-96、147-203、264-324、 370-428、22″-96″、147″-203″、264″-324″和370″-428″处的重链内二硫键(C23-C104);在22'-90'、 138'-197'、22″'-90″'和138″'-197″'处的轻链内二硫键(C23-C104);在223-215'和223″-215″'处的重链-轻链内二硫键(h 5-CL 126);在229-229″和232-232″

处的重链-重链内二硫键(h 11、h 14);在300、300″处的N-糖基化位点(H CH_2N84.4);岩藻糖基化复合双触角CHO型聚糖;以及在450和450'处的H CHS K2C端赖氨酸剪截。

[1758] 在一实施例中,PD-L1抑制剂包含由SEQ ID NO:493所载的重链和由SEQ ID NO:494所载的轻链。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含分别具有SEQ ID NO:493和SEQ ID NO:494中所示的序列的重链和轻链,或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或结合物。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:493和SEQ ID NO:494中所示的序列至少99%一致的重链和轻链。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:493和SEQ ID NO:494中所示的序列至少98%一致的重链和轻链。在一实施例中,PD-L1 抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:493和SEQ ID NO:494中所示的序列至少97%一致的重链和轻链。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:493和SEQ ID NO:494中所示的序列至少96%一致的重链和轻链。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:493和SEQ ID NO:494中所示的序列至少95%一致的重链和轻链。

[1759] 在一实施例中,PD-L1抑制剂包含阿维鲁单抗的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一实施例中,PD-L1抑制剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:495中所示的序列,并且PD-L1抑制剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:496中所示的序列和其保守性氨基酸取代。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:495和SEQ ID NO:496中所示的序列至少99%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:496和SEQ ID NO:496中所示的序列至少98%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:495和SEQ ID NO:496中所示的序列至少97%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:495和SEQ ID NO:496中所示的序列至少96%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:495和 SEQ ID NO:496中所示的序列至少95%一致的V_H和V_L区。

[1760] 在一实施例中,PD-L1抑制剂包含分别具有SEQ ID NO:497、SEQ ID NO:498和SEQ ID NO:499中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3域,以及分别具有SEQ ID NO:500、SEQ ID NO:501和SEQ ID NO:502中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3域。在一实施例中,抗体与PD-L1竞争结合,和/或结合于PD-L1上的与前述抗体中的任一个相同的表位。

[1761] 在一实施例中,PD-L1抑制剂为由药物管理机构参考阿维鲁单抗批准的抗PD-L1生物类似单克隆抗体。在一实施例中,生物类似物包含抗PD-L1抗体,所述抗PD-L1抗体包含与参考药品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97%序列一致性(例如,97%、98%、99%或 100%序列一致性)并且与参考药品或参考生物产品相比包含一个或多个转译后修饰的氨基酸序列,其中参考药品或参考生物产品为阿维鲁单抗。在一些实施例中,一个或多个转译后修饰是选自以下中的一个或多个:糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中,生物类似物为授权或提交授权的抗PD-L1抗体,其中以不同于参考药品或参考生物产品的配方的配方提供抗PD-L1抗体,其中参考药品或参考生物产品为阿维鲁单抗。抗PD-L1抗体可由药物管理机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品为阿维鲁单抗。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中一种

或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品为阿维鲁单抗。

[1762] 表38.与阿维鲁单抗相关的PD-L1抑制剂的氨基酸序列。

[1763]

标识符	序列(单字母氨基酸符号)	
SEQ ID NO:493 阿维鲁单抗 重链	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID NO:494 阿维鲁单抗 轻链	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL GQPKANPTVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS	60 120 180 216
SEQ ID NO:495 阿维鲁单抗 可变重链	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS	60 120
SEQ ID NO:496 阿维鲁单抗 可变轻链	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL	60 110
SEQ ID NO:497 阿维鲁单抗 重链CDR1	SYIMM	5
SEQ ID NO:498 阿维鲁单抗 重链CDR2	SIYPSGGITF YADTVKG	17
SEQ ID NO:499 阿维鲁单抗 重链CDR3	IKLGTVTTVD Y	11
SEQ ID NO:500 阿维鲁单抗 轻链CDR1	TGTSSDVGGY NYVS	14
SEQ ID NO:501 阿维鲁单抗 轻链CDR2	DVSNRPS	7
SEQ ID NO:502 阿维鲁单抗 轻链CDR3	SSYTSSSTRV	10

[1764] 在一实施例中,PD-L1抑制剂为阿特珠单抗,又称为MPDL3280A或RG7446(可以TECENTRIQ购自基因泰克公司),瑞士巴塞尔罗氏控股(Roche Holding AG,Basel,Switzerland)的子公司),或其抗原结合片段、结合物或变体。在一实施例中,PD-L1抑制剂为美国专利第8,217,149号中公开的抗体,其公开内容以引用的方式特定地并入本文中。在一实施例中,PD-L1抑制剂为美国专利申请公开第2010/0203056 A1号、第2013/0045200 A1号、第2013/0045201 A1号、第2013/0045202 A1号或第2014/0065135 A1号中公开的抗体,其公开内容以引用的方式特定地并入本文中。阿特珠单抗的制备和性质描述于美国专利第8,217,149号中,其公开内容以引用的方式并入本文中。表52中阐述阿特珠单抗的氨基酸序列。阿特珠单抗具有在22-96、145-201、262-322、368-426、22″-96″、145″-201″、262″-322″和368″-426″处的重链内二硫键(C23-C104);在23'-88'、134'-194'、23″'-88″'和134″'-194″'处的轻链内二硫键(C23-C104);在221-214'和221″-214″'处的重链-轻链内二硫键(h 5-CL 126);在227-227″和230-230″处的重链-重链内二硫键(h 11、h 14);以及在298和298'处的N-糖基化位点(H CH_2N84.4>A)。

[1765] 在一实施例中,PD-L1抑制剂包含由SEQ ID NO:503所载的重链和由SEQ ID NO:504所载的轻链。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含分别具有SEQ ID NO:503和SEQ ID NO:504中所示的序列的重链和轻链,或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体

或结合物。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:503和SEQ ID NO:504中所示的序列至少99%一致的重链和轻链。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:503和SEQ ID NO:504中所示的序列至少98%一致的重链和轻链。在一实施例中,PD-L1 抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:503和SEQ ID NO:504中所示的序列至少97%一致的重链和轻链。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:503和SEQ ID NO:504中所示的序列至少96%一致的重链和轻链。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:503和SEQ ID NO:504中所示的序列至少95%一致的重链和轻链。

[1766] 在一实施例中,PD-L1抑制剂包含阿特珠单抗的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一实施例中,PD-L1抑制剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:505中所示的序列,并且PD-L1抑制剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:506中所示的序列和其保守性氨基酸取代。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:505和SEQ ID NO:506中所示的序列至少99%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:505和SEQ ID NO:506中所示的序列至少98%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:505和SEQ ID NO:506中所示的序列至少97%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:505和SEQ ID NO:506中所示的序列至少96%一致的V_H和V_L区。在一实施例中,PD-L1抑制剂包含各自分别与SEQ ID NO:505和 SEQ ID NO:506中所示的序列至少95%一致的V_H和V_L区。

[1767] 在一实施例中,PD-L1抑制剂包含分别具有SEQ ID NO:507、SEQ ID NO:508和SEQ ID NO:509中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3域,以及分别具有SEQ ID NO:510、SEQ ID NO:511和SEQ ID NO:512中所阐述的序列和其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3域。在一实施例中,抗体与PD-L1竞争结合,和/或结合于PD-L1上的与前述抗体中的任一个相同的表位。

[1768] 在一实施例中,PD-L1抗体为由药物管理机构参考阿特珠单抗批准的抗PD-L1生物类似单克隆抗体。在一实施例中,生物类似物包含抗PD-L1抗体,所述抗PD-L1抗体包含与参考药品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97%序列一致性(例如,97%、98%、99%或100%序列一致性)并且与参考药品或参考生物产品相比包含一个或多个转译后修饰的氨基酸序列,其中参考药品或参考生物产品为阿特珠单抗。在一些实施例中,一个或多个转译后修饰是选自以下中的一个或多个:糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中,生物类似物为授权或提交授权的抗PD-L1抗体,其中以不同于参考药品或参考生物产品的配方的配方提供抗PD-L1抗体,其中参考药品或参考生物产品为阿特珠单抗。抗PD-L1抗体可由药物管理机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品为阿特珠单抗。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包含一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品为阿特珠单抗。

[1769] 表39.与阿特珠单抗相关的PD-L1抑制剂的氨基酸序列。

[1770]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）
SEQ ID NO:503 阿特珠单抗 重链	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYAST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
SEQ ID NO:504 阿特珠单抗 轻链	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:505 阿特珠单抗 可变重链	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSA 118
SEQ ID NO:506 阿特珠单抗 可变轻链	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKR 108
SEQ ID NO:507 阿特珠单抗 重链 CDR1	GFTFSDSWIH 10
SEQ ID NO:508 阿特珠单抗 重链 CDR2	AWISPYGGST YYADSVKG 18
SEQ ID NO:509 阿特珠单抗 重链 CDR3	RHWPGGFDY 9
SEQ ID NO:510 阿特珠单抗 轻链 CDR1	RASQDVSTAV A 11
SEQ ID NO:511 阿特珠单抗 轻链 CDR2	SASFLYS 7
SEQ ID NO:512 阿特珠单抗 轻链 CDR3	QQYLYHPAT 9

[1771] 在一实施例中,PD-L1抑制剂包括美国专利申请公开第US 2014/0341917 A1号中描述的那些抗体,其公开内容以引用的方式并入本文中。在另一实施例中,还包括与这些抗体中的任一种竞争与PD-L1结合的抗体。在一实施例中,抗PD-L1抗体为MDX-1105,又称为BMS-935559,其公开于美国专利第US 7,943,743号中,其公开内容以引用的方式并入本文中。在一实施例中,抗PD-L1抗体是选自美国专利第US 7,943,743号中公开的抗PD-L1抗体,其以引用的方式并入本文中。

[1772] 在一实施例中,PD-L1抑制剂为可商购的单克隆抗体,例如INVIVOMAB抗m-PD-L1克隆株10F.9G2(目录号BE0101,Bio X Cell公司,美国新罕布什尔州西黎巴嫩)。在一实施例中,抗PD-L1抗体为可商购的单克隆抗体,例如昂飞电子生物科学(AFFYMETRIX EBIOSCIENCE)(MIH1)。多种可商购的抗PD-L1抗体为所属领域的普通技术人员所已知。

[1773] 在一实施例中,PD-L2抑制剂可商购的单克隆抗体,例如BIOLEGEND 24F.10C12小鼠 IgG2a,κ同种型(目录号329602,Biolegend公司,加利福尼亚州圣地亚哥)、SIGMA抗PD-L2 抗体(目录号SAB3500395,西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich Co.),密苏里州圣路易斯 (St.Louis,MO))或所属领域的普通技术人员已知的其它可商购的抗PD-L2抗体。

[1774] 2.任选的对患者的淋巴细胞耗减预处理

[1775] 在一实施例中,本发明包括用TIL群体治疗癌症的方法,其中在输注根据本公开的TIL 之前,用非清髓性化学疗法对患者进行预处理。在一实施例中,本发明包括用于治疗患者的癌症的TIL群体,所述患者已用非清髓性化学疗法进行预处理。在一实施例中,通过输注给予TIL群体。在一实施例中,非清髓性化学疗法为环磷酰胺60mg/kg/d持续2天(在TIL输

注之前的第27天和第26天)和氟达拉宾25mg/m^2/d持续5天(TIL输注之前的第27天至第 23天)。在一实施例中,在根据本公开的非清髓性化学疗法和TIL输注之后(第0天),患者每8小时经静脉内接受720,000IU/kg IL-2(阿地白介素,可以PROLEUKIN购得)的静脉内输注达至生理耐受。在某些实施例中,TIL群体与IL-2组合用于治疗癌症,其中IL-2是在 TIL群体之后给予。

[1776] 实验结果表明,在过继转移肿瘤特异性T淋巴细胞之前,淋巴细胞耗减通过消除调节T 细胞及免疫系统的竞争要素('细胞因子库')在增强治疗效果中发挥关键作用。因此,在引入本发明的TIL之前,本发明的一些实施例对患者使用了淋巴细胞耗减步骤(有时也称为"免疫抑制调节")。

[1777] 一般来说,使用给予氟达拉宾或环磷酰胺(称为马磷酰胺(mafosfamide)的活性形式) 及其组合来实现淋巴细胞耗减。这类方法描述于Gassner等人,《癌症免疫学与免疫治疗 (Cancer Immunol.Immunother.)》2011,60,75-85;Muranski等人,《自然临床实践肿瘤学(Nat. Clin.Pract.Oncol.)》,2006,3,668-681;Dudley等人,《临床肿瘤学杂志》2008,26,5233-5239;和Dudley等人,《临床肿瘤学杂志》,2005,23,2346-2357中,其全部均以全文引用的方式并入本文中。

[1778] 在一些实施例中,以0.5μg/mL-10μg/mL氟达拉宾的浓度给予氟达拉宾。在一些实施例中,以1μg/mL氟达拉宾的浓度给予氟达拉宾。在一些实施例中,给予氟达拉宾治疗1天、2 天、3天、4天、5天、6天或7天或更多天。在一些实施例中,以每天10mg/kg、每天15mg/kg、每天20mg/kg、每天25mg/kg、每天30mg/kg、每天35mg/kg、每天40mg/kg或每天45mg/kg 的剂量给予氟达拉宾。在一些实施例中,以每天35mg/kg给予氟达拉宾治疗2-7天。在一些实施例中,以每天35mg/kg给予氟达拉宾治疗4-5天。在一些实施例中,以每天25mg/kg给予氟达拉宾治疗4-5天。

[1779] 在一些实施例中,通过给予环磷酰胺获得浓度为0.5μg/mL-10μg/mL的马磷酰胺(环磷酰胺的活性形式)。在一些实施例中,通过给予环磷酰胺获得浓度为1μg/mL的马磷酰胺(环磷酰胺的活性形式)。在一些实施例中,给予环磷酰胺治疗1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天或更多天。在一些实施例中,以每天100mg/m^2、每天150mg/m^2、每天175mg/m^2、每天200mg/m^2、每天225mg/m^2、每天250mg/m^2、每天275mg/m^2或每天300mg/m^2的剂量给予环磷酰胺。在一些实施例中,静脉内(即,i.v.)给予环磷酰胺。在一些实施例中,以每天35mg/kg给予环磷酰胺治疗2-7天。在一些实施例中,以每天250mg/m^2静脉内给予环磷酰胺治疗4-5天。在一些实施例中,以每天250mg/m^2静脉内给予环磷酰胺治疗4天。

[1780] 在一些实施例中,通过将氟达拉宾和环磷酰胺一起给予患者进行淋巴细胞耗减。在一些实施例中,在4天内以每天25mg/m^2静脉内给予氟达拉宾并且以每天250mg/m^2静脉内给予环磷酰胺。

[1781] 在一实施例中,通过以每天60mg/m^2的剂量给予环磷酰胺两天,接着以每天25mg/m^2的剂量给予氟达拉宾五天来进行淋巴细胞耗减。

[1782] 3.IL-2方案

[1783] 在一实施例中,IL-2方案包含高剂量IL-2方案,其中高剂量IL-2方案包含在给予治疗有效部分的治疗性TIL群体后的当天开始静脉内给予阿地白介素或其生物类似物或变体,其中使用每八小时15分钟大剂量静脉内输注以0.037mg/kg或0.044mg/kg IU/kg(患者

体重)的剂量给予阿地白介素或其生物类似物或变体直到耐受,持续最多14个剂量。休息9天后,可以重复进行另外14个剂量的计划表,总共最多28个剂量。在一些实施例中,以1、2、3、4、5或6个剂量给予IL-2。在一些实施例中,以最多6个剂量的最大服用量给予IL-2。

[1784] 在一实施例中,IL-2方案包含递减型IL-2方案。递减型IL-2方案描述于O'Day等人,《临床肿瘤学杂志》,1999,17,2752-61和Eton等人,《癌症(Cancer)》2000,88,1703-9中,其公开内容以引用的方式并入本文中。在一实施例中,递减型IL-2方案包含在6小时内静脉内给予18×10^6IU/m^2、接着在12小时内静脉内给予18×10^6IU/m^2、接着在24小时内静脉内给予18×10^6IU/m^2、接着在72小时内静脉内给予4.5×10^6IU/m^2。每28天可以重复进行这个治疗周期,持续最多四个周期。在一实施例中,递减型IL-2方案包含在第1天的18,000,000IU/m^2、在第2天的9,000,000IU/m^2,以及在第3天和第4天的4,500,000IU/m^2。

[1785] 在一实施例中,IL-2方案包含每1天、每2天、每4天、每6天、每7天、每14天或每 21天以0.10毫克/天至50毫克/天的剂量给予聚乙二醇化IL-2。

[1786] 4.其它治疗方法

[1787] 在另一实施例中,本发明提供一种治疗患有癌症的个体的方法,其包含向所述个体给予治疗有效剂量的上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体。

[1788] 在另一实施例中,本发明提供一种治疗患有癌症的个体的方法,其包含向所述个体给予治疗有效剂量的上文前述段落中任一段所述的TIL组合物。

[1789] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗患有癌症的个体的方法,其被修改以使得在分别给予治疗有效剂量的上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体和 TIL组合物之前,已向所述个体给予非清髓性淋巴细胞耗减方案。

[1790] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗患有癌症的个体的方法,其被修改以使得非清髓性淋巴细胞耗减方案包含以每天60mg/m^2的剂量给予环磷酰胺两天,接着以每天25mg/m^2的剂量给予氟达拉宾五天的步骤。

[1791] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗患有癌症的个体的方法,其被修改以进一步包含在向所述个体给予TIL细胞后的当天开始用高剂量IL-2方案治疗个体的步骤。

[1792] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗患有癌症的个体的方法,其被修改以高剂量IL-2方案包含每八小时以15分钟大剂量静脉内输注形式给予600,000或 720,000IU/kg直至耐受。

[1793] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗患有癌症的个体的方法,其被修改以使得癌症为实体肿瘤。

[1794] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗患有癌症的个体的方法,其被修改以使得癌症为黑素瘤、卵巢癌、子宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人类乳头瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包括头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、成胶质细胞瘤(包括GBM)、胃肠癌、肾癌和肾细胞癌。

[1795] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗患有癌症的个体的方法,其被修改以使得癌症为黑素瘤、HNSCC、子宫颈癌、NSCLC、成胶质细胞瘤(包括GBM)和胃肠癌。

[1796] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗患有癌症的个体

的方法,其被修改以使得癌症为黑素瘤。

[1797] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗患有癌症的个体的方法,其被修改以使得癌症为HNSCC。

[1798] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗患有癌症的个体的方法,其被修改以使得癌症为子宫颈癌。

[1799] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗患有癌症的个体的方法,其被修改以使得癌症为NSCLC。

[1800] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗患有癌症的个体的方法,其被修改以使得癌症为成胶质细胞瘤(包括GBM)。

[1801] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗患有癌症的个体的方法,其被修改以使得癌症为胃肠癌。

[1802] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗患有癌症的个体的方法,其被修改以使得癌症为超突变癌症。

[1803] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗患有癌症的个体的方法,其被修改以使得癌症为小儿超突变癌症。

[1804] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体,其用于治疗患有癌症的个体的方法中,所述方法包含向所述个体给予治疗有效剂量的治疗性TIL群体。

[1805] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的TIL组合物,其用于治疗患有癌症的个体的方法中,所述方法包含向所述个体给予治疗有效剂量的TIL组合物。

[1806] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或上文前述段落中任一段所述的TIL组合物,其被修改以使得在向所述个体给予治疗有效剂量的上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或上文前述段落中任一段所述的TIL组合物之前,已向所述个体给予非清髓性淋巴细胞耗减方案。

[1807] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物,其被修改以使得非清髓性淋巴细胞耗减方案包含以每天60mg/m^2的剂量给予环磷酰胺两天,接着以每天25mg/m^2的剂量给予氟达拉宾五天的步骤。

[1808] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物,其被修改以进一步包含在向所述患者给予TIL细胞后的当天开始用高剂量IL-2方案治疗患者的步骤。

[1809] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物,其被修改以高剂量IL-2方案包含每八小时以15分钟大剂量静脉内输注形式给予600,000 或720,000IU/kg直至耐受。

[1810] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物,其被修改以使得癌症为实体肿瘤。

[1811] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物,其被修改以使得癌症为黑素瘤、卵巢癌、子宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人类乳头瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包括头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、成胶质细胞瘤(包括GBM)、胃肠癌、肾癌和肾细胞癌。

[1812] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物,其被修改以使得癌症为黑素瘤、HNSCC、子宫颈癌、NSCLC、成胶质细胞瘤(包括GBM)和胃肠癌。

[1813] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物,其被修改以使得癌症为黑素瘤。

[1814] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物,其被修改以使得癌症为HNSCC。

[1815] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物,其被修改以使得癌症为子宫颈癌。

[1816] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物,其被修改以使得癌症为NSCLC。

[1817] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物,其被修改以使得癌症为成胶质细胞瘤(包括GBM)。

[1818] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物,其被修改以使得癌症为胃肠癌。

[1819] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物,其被修改以使得癌症为超突变癌症。

[1820] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物,其被修改以使得癌症为小儿超突变癌症。

[1821] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体在治疗个体癌症的方法中的用途,所述方法包含向所述个体给予治疗有效剂量的治疗性TIL群体。

[1822] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的TIL组合物在治疗个体癌症的方法中的用途,所述方法包含向所述个体给予治疗有效剂量的TIL组合物。

[1823] 在另一实施例中,本发明提供上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或上文前述段落中任一段所述的TIL组合物在治疗个体癌症的方法中的用途,所述方法包含向所述个体给予非清髓性淋巴细胞耗减方案且接着向所述个体给予治疗有效剂量的上文前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或治疗有效剂量的上文前述段落中任一段所述的TIL组合物。

[1824] 实例

[1825] 现在参考以下实例描述本文所涵盖的实施例。提供这些实例仅是为了说明目的,并且本文中涵盖的公开内容绝不应理解为限制于这些实例,而应理解为涵盖由于在此提供的教导而变得明显的任何和所有变化。

[1826] 实例1:制备用于PRE-REP和REP工艺的培养基

[1827] 这个实例描述用于制备组织培养基的程序,所述组织培养基用于涉及培养来源于各种肿瘤类型(包括非小细胞肺癌(NSCLC))的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的方案中。此培养基可用于制备在本申请和实例中描述的任一种TIL。

[1828] CM1的制备

[1829] 从冷的存储装置中移出以下反应剂并将其在37℃水浴:(RPMI1640,人类AB血清,

200 mM L-谷氨酰胺)中温热。根据下表18通过将每一种成分添加到适合于将过滤的体积的0.2μm 过滤器单元的顶部部分来制备CM1培养基。存储在4℃下。

[1830] 表40:CM1的制备

[1831]

成分	最终浓度	最终体积500ml	最终体积1L
RPMI1640	NA	450ml	900ml
人类AB血清,热灭活10%	50ml	100ml	
200mM L-谷氨酰胺	2mM	5ml	10ml
55mM BME	55μM	0.5ml	1ml
50mg/ml硫酸庆大霉素	50μg/ml	0.5ml	1ml

[1832] 在使用当天,在37℃水浴中预热所需量的CM1并且添加6000IU/ml IL-2。

[1833] 按需要根据表41进行额外补充。

[1834] 表41:视需要对CM1的额外补充。

[1835]

补充物	储备浓度	稀释	最终浓度
GlutaMAX™	200mM	1:100	2mM
青霉素/链霉素	10,000 U/ml 青霉素 10,000 μg/ml 链霉素	1:100	100 U/ml 青霉素 100 μg/ml 链霉素
两性霉素 B	250 μg/ml	1:100	2.5 μg/ml

[1836] CM2的制备

[1837] 从冷藏箱中移出制备好的CM1或根据以上章节7.3制备新鲜的CM1。从冷藏箱中移出AIM-V®并且通过将制备好的CM1与等体积的AIM-V®混合在无菌培养基瓶子中来制备所需量的CM2。在使用当天将3000IU/ml IL-2添加到CM2培养基中。在使用当天,制得足够量的具有3000IU/ml IL-2的CM2。用其名称、制备人的姓名缩写、过滤/制备的日期、两周有效期标记CM2培养基瓶子,并存储在4℃下直到组织培养需要。

[1838] CM3的制备

[1839] 在需要使用的当天制备CM3。CM3与AIM-V®培养基相同,在使用当天补充有3000IU/ml IL-2。通过将IL-2储备溶液直接添加到AIM-V瓶子或袋子中来制备足以满足实验需要的一定量CM3。通过轻微振荡进行充分混合。在添加到AIM-V中之后立即用“3000IU/ml IL-2”标记瓶子。如果存在过量CM3,那么将其存储在4℃的瓶子中,所述瓶子用培养基名称、制备人的姓名缩写、制备培养基的日期和其有效期(制备之后7天)进行标记。在4℃下存储7 天之后,丢弃补充有IL-2的培养基。

[1840] CM4的制备

[1841] CM4与CM3相同,但额外补充有2mM GlutaMAX™(最终浓度)。对于每1L CM3,添加10ml 200mM GlutaMAX™。通过将IL-2储备溶液和GlutaMAX™储备溶液直接添加到 AIM-V的瓶子或袋子中来制备足以满足实验需要的一定量CM4。通过轻微振荡进行充分混合。在添加到AIM-V中之后立即用“3000IL/nil IL-2和GlutaMAX”标记瓶子。如果存在过量CM4,那么将其存储在4℃的瓶子中,所述瓶子用培养基名称、“GlutaMAX”和其有效期 (制备之后7天)标记。在4℃下存储7天之后,丢弃补充有IL-2的培养基。

[1842] 实例2:IL-2、IL-15和IL-21细胞因子混合物的用途

[1843] 这个实例描述与实例A至G的TIL工艺组合使用IL-2、IL-15和IL-21细胞因子,其充

当额外T细胞生长因子。

[1844] 使用本文所描述的工艺,可以在实验的一个组中在存在IL-2的情况下并且在另一组中在开始培养时用IL-2、IL-15和IL-21的组合代替IL-2,从非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤中生长 TIL。在完成pre-REP时,评估培养物的扩增、表型、功能(CD107a+和IFN-γ)和TCR Vβ库。IIL-15和IL-21描述于本文中的其它地方和Gruijl等人,IL-21有助于具有高细胞毒性潜力的CD27+CD28+肿瘤浸润淋巴细胞的扩增和调节T细胞的低附带扩增;Santegoets,S.J.,《转化医学杂志(J Transl Med.)》,2013,11:37(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/ PMC3626797/)中。

[1845] 结果可以显示,相对于仅IL-2的条件,可以观察到在IL-2、IL-15和IL-21处理的条件下 $CD4^+$和$CD8^+$细胞中的TIL扩增均增强(>20%)。相对于仅IL-2的培养,在从IL-2、IL-15和IL-21处理的培养中获得的TIL中,偏向存在具有偏向TCR Vβ库的主要$CD8^+$群体。相比仅IL-2处理的TIL,在IL-2、IL-15和IL-21处理的TIL中,IFN-γ和CD107a升高。

[1846] 实例3:使个别批次的γ-辐照的外周单核细胞合格

[1847] 本实例描述一种使个别批次的γ-辐照的外周单核细胞(PBMC,又称为MNC)具备资格在本文中所描述的示范性方法中用作同种异体饲养细胞的新颖简化程序。

[1848] 每个辐照的MNC饲养批次是由个别供体制备。单独地筛选每个批次或供体在存在纯化抗CD3(克隆株OKT3)抗体和白细胞介素-2(IL-2)的情况下的REP中扩增TIL的能力。另外,在不添加TIL的情况下测试每个批次的饲养细胞以验证所接受剂量的γ辐射足以使其复制不胜任。

[1849] 背景技术

[1850] 对于TIL的REP,需要γ-辐照的生长停滞的MNC饲养细胞。在REP烧瓶中,饲养MNC上的膜受体与抗CD3(克隆株OKT3)抗体结合并与TIL交联,从而刺激TIL扩增。由对取自个别供体的全血进行白细胞去除术来制备饲养批次。将白细胞去除产物在Ficoll-Hypaque 上进行离心,洗涤、辐照并冷冻保存在GMP条件下。

[1851] 至关重要的是接受TIL疗法的患者不输注活的饲养细胞,因为这可以导致移植物抗宿主病(GVHD)。因此,通过向细胞给予γ-辐照来使饲养细胞生长停滞,从而使得双链DNA断裂并且在重新培养后丧失MNC细胞的细胞活力。

[1852] 评估标准和实验设置

[1853] 以两个标准评估饲养批次:1)共培养中扩增TIL>100倍的能力和2)复制不胜任。

[1854] 利用在直立T25组织培养烧瓶中生长的两种初始pre-REP TIL系以mini-REP格式测试饲养批次。针对两种不同的TIL系测试饲养批次,因为每种TIL系在响应于REP中的活化而增殖的能力方面是独特的。作为对照,历史上已表明符合以上标准的辐照的MNC饲养细胞批次与测试批次一起运行。

[1855] 为确保在单个实验中测试的所有批次接受等效测试,相同的pre-REP TIL系的足够储备液可用于测试所有条件和所有饲养批次。

[1856] 针对测试的每个饲养细胞批次,总共有六个T25烧瓶:Pre-REP TIL系#1(2个烧瓶); Pre-REP TIL系#2(2个烧瓶);和饲养对照(2个烧瓶)。含有TIL系#1和#2的烧瓶评估了饲养批次扩增TIL的能力。饲养对照烧瓶评估了饲养批次的复制不胜任。

[1857] 实验方案

[1858] 第-2/3天,解冻TIL系

[1859] 制备CM2培养基。将CM2在37℃水浴中温热。制备40ml补充有3000IU/ml IL-2的CM2。保持温热直到使用。将20ml不含IL-2的预温热CM2放入两个用所使用的TIL系名称标记的50ml锥形管中的每一个中。从LN2存储装置中移出两种指定的pre-REP TIL系并将小瓶转移到组织培养室。通过在37℃水浴中将其放入密封拉链存储袋内来解冻小瓶直到残留少量冰。

[1860] 使用无菌移液管,立即将小瓶的内容物转移到制备好的标记的50ml锥形管中的20ml CM2中。使用不含IL-2的CM2洗涤细胞,QS至40ml。在400×CF下离心5分钟。抽吸上清液并再悬浮于5ml补充有3000IU/ml IL-2的温热CM2中。

[1861] 取出一式两份的小等分试样(20μl)以使用自动化细胞计数器进行细胞计数。记录所述计数。在计数时,将具有TIL细胞的50ml锥形管放入潮湿的37℃、5%CO_2培育箱中,松开盖子以进行气体交换。测定细胞浓度并将TIL在补充有3000IU/ml IL-2的CM2中稀释到1×10^6个细胞/毫升。

[1862] 在潮湿的37℃培育箱中以尽可能多的24孔组织培养板的每孔2ml培养,直到mini-REP 的第0天。在单独的24孔组织培养板中培养不同的TIL系以避免混乱和潜在的交叉污染。

[1863] 第0天,开始Mini-REP

[1864] 针对待测试的饲养批次的数量,制备足够的CM2培养基。(例如,为了同时测试4个饲养批次,制备800ml CM2培养基)。将以上制备的CM2的一部分等分并补充有3000IU/ml IL-2 用于培养细胞。(例如,为了同时测试4个饲养批次,制备500ml含3000IU ml IL-2的CM2 培养基)。

[1865] 每个TIL系单独地工作以防止交叉污染,从培育箱中移出具有TIL培养物的24孔板并将其转移到BSC。

[1866] 使用无菌移液管或100-1000μl移液器和吸头,从使用的每个TIL孔中取出约1ml培养基并放入24孔组织培养板的未使用孔中。

[1867] 使用新制无菌移液管或100-1000μl移液器和吸头,将剩余培养基与TIL混合于各孔中以再悬浮细胞且接着将细胞悬浮液转移到50ml用TIL名称标记的锥形管中并记录体积。

[1868] 用保留的培养基洗涤各孔并将所述体积转移到同一50ml锥形管中。以400×CF旋转细胞以收集细胞沉淀。吸出培养基上清液并将细胞沉淀再悬浮于2-5ml含有3000IU/ml IL-2的 CM2培养基中,基于采集的孔数量和沉淀大小使用体积-体积应足以确保浓度>1.3×10^6个细胞 /毫升。

[1869] 使用血清移液管,将细胞悬浮液充分地混合并记录体积。取出200μl以使用自动化细胞计数器进行细胞计数。在计数时,将具有TIL细胞的50ml锥形管放入潮湿的5%CO_2、37℃培育箱中,松开盖子以进行气体交换。记录所述计数。

[1870] 从培育箱中移出含有TIL细胞的50ml锥形管并将其细胞以1.3×10^6个细胞/毫升的浓度再悬浮于补充有3000IU/ml IL-2的温热CM2中。将50ml锥形管返回到培育箱中,其中盖子是松开的。

[1871] 针对第二TIL系重复以上步骤。

[1872] 刚好在将TIL接种到用于实验的T25烧瓶中之前，以1:10稀释TIL，最终浓度为1.3×10^5个细胞/毫升，如下所示。

[1873] 制备MACS GMP CD3纯(OKT3)工作溶液

[1874] 从4℃冷藏箱中取出OKT3的储备溶液(1mg/ml)并放入BSC中。在mini-REP的培养基中使用最终浓度30ng/ml的OKT3。

[1875] 对于实验的每个T25烧瓶，每20ml需要600ng OKT3；这等同于每20ml中有60μl的10μg/ml溶液，或对于每个饲养批次测试的所有6个烧瓶需要360μl。

[1876] 对于测试的每个饲养批次，制得400μl的1:100稀释的1mg/ml OKT3，工作浓度为10μg/ml (例如，为了同时测试4个饲养批次，制得1600μl的1:100稀释的1mg/ml OKT3：16μl的1mg/ml OKT3+1.584ml的含3000IU/ml IL-2的CM2培养基)。

[1877] 制备T25烧瓶

[1878] 在制备饲养细胞之前，标记每个烧瓶并用CM2培养基填充烧瓶。将烧瓶放入37℃潮湿的5％CO_2培育箱中以保持培养基温热，同时等待添加剩余组分。制备饲养细胞后，将组分添加到每个烧瓶中的CM2中。

[1879] 表42：溶液

[1880]

组分	共培养烧瓶中的体积	对照（仅饲养细胞）烧瓶中的体积
CM2 + 3000 IU / ml IL-2	18ml	19ml
MNC：1.3 × 10^7/ml 于 CM2 + 3000IU IL-2 中（最终浓度为 1.3 × 10^7/烧瓶）	1ml	1ml
OKT3：10 μl/ml 于 CM2 = 3000IU IL-2 中	60μl	60μl
TIL：1.3 × 10^5 IU/ml 于 CM2 + 3000IU IL-2 中（最终浓度为 1.3 × 10^5/烧瓶）	1ml	0

[1881] 制备饲养细胞

[1882] 对于此方案测试的每个批次，需要最少78×10^6个饲养细胞。由SDBB冷冻的每1ml小瓶在冷冻后具有100×10^6个活细胞。假设在从LN2存储装置中解冻后恢复50％，建议每批次解冻至少两个1ml小瓶的饲养细胞，得到每个REP估计有100×10^6个活细胞。替代地，如果以 1.8ml小瓶提供，那么仅一个小瓶提供足够的饲养细胞。

[1883] 解冻饲养细胞之前，对于待测试的每个饲养批次，预温热大致50ml不含IL-2的CM2。从LN2存储装置中移出指定的饲养批次小瓶，放入拉链存储袋中，并放在冰上。通过浸没于 37℃水浴中解冻封闭拉链存储袋内的小瓶。从拉链袋中移出小瓶，用70％EtOH喷雾或擦拭并将小瓶转移到BSC中。

[1884] 使用移液管立即将饲养小瓶的内容物转移到50ml锥形管中的30ml温热CM2中。用小体积的CM2洗涤小瓶以去除小瓶中的任何残余细胞。在400×CF下离心5分钟。抽吸上清液并再悬浮于4ml温热CM2加3000IU/ml IL-2中。取出200μl以使用自动化细胞计数器进行细胞计数。记录所述计数。

[1885] 将细胞以1.3×10^7个细胞/毫升再悬浮于温热CM2加3000IU/ml IL-2中。将TIL细胞从 1.3×10^6个细胞/毫升稀释到1.3×10^5个细胞/毫升。

[1886] 设置共培养

[1887] 将TIL细胞从1.3×10^6个细胞/毫升稀释到1.3×10^5个细胞/毫升。将4.5ml CM2培养基添加到15ml锥形管中。从培育箱中移出TIL细胞并使用10ml血清移液管进行充分再悬

浮。从 1.3×10^6个细胞/毫升TIL悬浮液中移出0.5ml细胞并将其添加到15ml锥形管中的4.5ml培养基中。将TIL储备液小瓶返回培育箱中。充分混合。针对第二TIL系重复操作。

[1888] 将用于单个饲养批次的具有温热培养基的烧瓶从培育箱转移到BSC中。通过用1ml移液管吸头上下移液若干次来混合饲养细胞并将1ml(1.3×10^7个细胞)转移到每个用于所述饲养批次的烧瓶中。将60μl OKT3工作储备液(10μg/ml)添加到每个烧瓶中。将两个对照烧瓶返回到培育箱中。

[1889] 将每个TIL批次的1ml(1.3×10^5)转移到对应标记的T25烧瓶中。将烧瓶返回培育箱中并直立培育。直到第5天才干扰。

[1890] 针对测试的所有饲养批次重复操作。

[1891] 第5天,培养基变化

[1892] 制备含3000IU/ml IL-2的CM2。每个烧瓶需要10ml。用10ml移液管,将10ml含3000IU/ml IL-2的温热CM2转移到每个烧瓶中。将烧瓶返回培育箱中并直立培育直到第7天。针对测试的所有饲养批次重复操作。

[1893] 第7天,采集

[1894] 从培育箱中移出烧瓶并转移到BSC中,注意不要干扰烧瓶底部上的细胞层。在不干扰烧瓶底部上的细胞生长的情况下,从每个测试烧瓶中移出10ml培养基且从每个对照烧瓶中移出 15ml培养基。

[1895] 使用10ml血清移液管,将细胞再悬浮于剩余培养基中并进行充分混合以分解任何细胞凝集块。通过移液充分地混合细胞悬浮液之后,取出200μl以用于细胞计数。使用适当的标准操作程序结合自动细胞计数器设备对TIL计数。记录第7天的计数。

[1896] 针对测试的所有饲养批次重复操作。

[1897] 根据下表TT,评估饲养对照烧瓶的复制不胜任并且评估含有TIL的烧瓶的相对于第0天的倍数扩增。

[1898] 第7天,饲养对照烧瓶持续到第14天

[1899] 完成对饲养对照烧瓶的第7天计数后,将15ml含有3000IU/ml IL-2的新鲜CM2培养基添加到每个对照烧瓶中。将对照烧瓶返回培育箱中并以直立位置培育直到第14天。

[1900] 第14天,饲养对照烧瓶的非增殖延长

[1901] 从培育箱中移出烧瓶并转移到BSC中,注意不要干扰烧瓶底部上的细胞层。在不干扰烧瓶底部上的细胞生长的情况下,从每个对照烧瓶中移出大致17ml培养基。使用5ml血清移液管,将细胞再悬浮于剩余培养基中并进行充分混合以分解任何细胞凝集块。记录每个烧瓶的体积。

[1902] 通过移液充分地混合细胞悬浮液之后,取出200μl以用于细胞计数。使用适当的标准操作程序结合自动细胞计数器设备对TIL计数。记录计数。

[1903] 针对测试的所有饲养批次重复操作。

[1904] 结果和验收标准

[1905] 结果

[1906] γ辐照的剂量足以使饲养细胞复制不胜任。期望所有批次符合评估标准,并且还证实与第0天相比,在REP培养的第7天剩余的活饲养细胞总数减少。

[1907] 期望所有饲养批次符合到达REP培养的第7天TIL生长扩增100倍的评估标准。

[1908] 期望饲养对照烧瓶的第14天计数延续了在第7天可见的非增殖趋势。

[1909] 验收标准

[1910] 对于每个批次的饲养细胞测试的每个复制TIL系，符合以下验收标准。

[1911] 验收值为两倍，如下(下表27中概述)。

[1912] 表43:验收标准

[1913]

测试	验收标准
辐照MNC/复制不胜任	在第7天和第14天观测到无生长
TIL扩增	每个TIL扩增至少100倍(最少1.3×10^{7}个活细胞)

[1914] 评估辐射剂量是否足以使MNC饲养细胞在存在30ng/ml OKT3抗体和3000IU/ml IL-2 的情况下培养时复制不胜任。通过如在REP的第7天和第14天进行自动化细胞计数测定的总活细胞计数(TVC)评估复制不胜任。

[1915] 验收标准为“无生长”，意指相对于在REP的第0天放入培养中的初始活细胞数，第7天和第14天的总活细胞数并未增加。

[1916] 评估饲养细胞支持TIL扩增的能力。根据从REP的第0天开始培养到REP的第7天的活细胞倍数扩增，测量TIL生长。在第7天，TIL培养达到最少100倍扩增(即，超过在REP 第0天放入培养中的总活TIL细胞数的100倍)，如通过自动化细胞计数评估。

[1917] 对不符合验收标准的MNC饲养批次的应变测试

[1918] 在MNC饲养批次不符合上述验收标准中的任一个的情况下，将采用以下步骤以重新测试所述批次，进而排除作为其原因的简单实验者错误。

[1919] 如果批次中存在两个或更多个剩余的星形(satellite)测试瓶，那么重新测试所述批次。如果批次中存在一个或没有剩余的星形测试瓶，那么根据上文所列的验收标准，所述批次不合格。

[1920] 为了合格，所讨论的批次和对照批次必须达到以上验收标准。在符合这些标准后，所述批次就可以进行使用。

[1921] 实例4:使个别批次的γ-辐照的外周单核细胞合格

[1922] 本实例描述一种使个别批次的γ-辐照的外周血单核细胞(PBMC)具备资格在本文中所描述的示范性方法中用作同种异体饲养细胞的新颖简化程序。本实例提供一种评估辐照的 PBMC细胞批次用于产生临床TIL批次的方案。每个辐照的PBMC批次是由个别供体制备。在超过100个资格方案的过程中，已表明在所有情况下，来自圣地亚哥血库(San Diego Blood Bank;SDBB)的辐照PBMC批次在REP的第7天使TIL扩增>100倍。这个修改的资格方案旨在应用来自SDBB的辐照的供体PBMC批次，随后对其进行进一步测试以验证所接受剂量的γ辐射足以使其复制不胜任。一旦证实其在14天的过程中保持复制不胜任，那么认为供体PBMC批次“合格”，以用于产生临床TIL批次。

[1923] 背景技术

[1924] 对于当前TIL的标准REP，需要γ-辐照的生长停滞的PBMC。在培养中，PBMC上的膜受体与抗CD3(克隆株OKT3)抗体结合并与TIL交联，从而刺激TIL扩增。由对取自个别供体的全血进行白细胞去除术来制备PBMC批次。将白细胞去除产物在Ficoll-Hypaque上进行离心，洗涤、辐照并冷冻保存在GMP条件下。

[1925] 至关重要的是接受TIL疗法的患者不输注活的PBMC，因为这可以导致移植物抗宿

主病 (GVHD)。因此,通过向细胞给予γ-辐照来使供体PBMC生长停滞,从而使得双链DNA断裂并且在重新培养后丧失PBMC的细胞活力。

[1926] 评估标准

[1927] 7.2.1辐照的PBMC批次的评估标准为其复制不胜任。

[1928] 实验设置

[1929] 使用直立T25组织培养烧瓶以mini-REP格式测试饲养批次,如同其与TIL共培养一般。对照批次:在历史上已表明符合7.2.1标准的一个辐照的PBMC批次作为对照与实验批次一起运行。对于所测试的每个辐照的供体PBMC批次,运行两个重复的烧瓶。

[1930] 实验方案

[1931] 第0天

[1932] 对于待测试的每个供体PBMC批次,制备约90ml CM2培养基。使CM2在37℃水浴中保持温热。解冻6×10^6IU/ml IL-2的等分试样。将CM2培养基返回到BSC中,在放入防护罩之前用70%EtOH进行擦拭。对于测试的每个PBMC批次,将约60ml CM2移到单独的无菌瓶中。将解冻的6×10^6IU/ml储备溶液中的IL-2添加到此培养基中,最终浓度为3000IU/ml。将所述瓶子标记为"CM2/IL2"(或类似名称)以将其与未补充的CM2进行区分。

[1933] 制备OKT3

[1934] 从4℃冷藏箱中取出抗CD3(OKT3)的储备溶液并放入BSC中。在mini-REP的培养基中使用最终浓度30ng/ml的OKT3。由1mg/ml储备溶液制备10μg/ml的抗CD3(OKT3) 工作溶液。放入冷藏箱直到需要。

[1935] 对于测试的每个PBMC批次,制备150μl的1:100稀释的抗CD3(OKT3)储备液。举例来说,为了同时测试4个PBMC批次,通过将6μl的1mg/ml储备溶液添加到594μl的补充有3000IU/ml IL-2的CM2中来制备600μl的10μg/ml抗CD3(OKT3)。

[1936] 制备烧瓶

[1937] 向标记的T25烧瓶中添加每烧瓶19ml的CM2/IL-2并将烧瓶放入37℃潮湿的5%CO_2培育箱中,同时制备细胞。

[1938] 制备辐照的PBMC

[1939] 从LN2存储装置中取出待测试的PBMC批次小瓶。将这些小瓶放置在-80℃下或在解冻之前保持在干冰上。将30ml的CM2(不含IL-2补充物)放入待解冻的每个批次的50ml锥形管中。用待解冻的不同批号的PBMC标记每个试管。在使用前,将试管盖紧并放置于37℃水浴中。视需要,将50ml锥形管返回到BSC中,在放入防护罩之前用70%EtOH擦拭。

[1940] 从冷藏装置中移出小瓶PBMC并放置于37℃水浴中的浮动试管架中以解冻。进行解冻直到小瓶中剩余少量冰为止。使用无菌移液管,立即将小瓶的内容物转移到50ml锥形管中的 30ml CM2中。从所述试管中移出约1ml培养基以冲洗小瓶;将冲洗液返回到50ml锥形管中。盖紧并进行轻缓地涡旋以洗涤细胞。

[1941] 在室温下以400×g离心5分钟。抽吸上清液并使用1000μl移液管吸头将细胞沉淀再悬浮于1ml温热的CM2/IL-2中。替代地,在添加培养基之前,通过沿空试管架拖动封盖试管使细胞沉淀再悬浮。在再悬浮细胞沉淀之后,使用CM2/IL-2培养基使体积达到4ml。记录体积。

[1942] 取出一小等分试样(例如,100μl)以使用自动化细胞计数器进行细胞计数。根据特

定自动化细胞计数器SOP进行重复地计数。最可能的是在进行细胞计数之前需要进行PBMC的稀释。推荐的起始稀释度为1:10,但这会根据所使用的细胞计数器的类型而改变。记录所述计数。

[1943] 使用CM2/IL-2培养基将PBMC的浓度调节到1.3×10^7个细胞/毫升。通过平缓地涡旋或通过使用血清移液管平缓地上下抽吸来进行充分混合。

[1944] 设置培养烧瓶

[1945] 将两个标记的T25烧瓶从组织培养恒温箱返回到BSC中。将10μg/ml小瓶的抗CD3/OKT3 返回到BSC中。将1ml的1.3×10^7PBMC细胞悬浮液添加到每个烧瓶中。将60μl的10μg/ml 抗CD3/OKT3添加到每个烧瓶中。在不干扰的情况下,将封盖烧瓶返回到组织培养恒温箱中生长14天。将抗CD3/OKT3小瓶放回到冷藏箱中直到需要用于下一批次。针对待评估的每个PBMC批次进行重复操作。

[1946] 第14天,测量PBMC的非增殖

[1947] 将两个重复的T25烧瓶返回到BSC中。针对每个烧瓶使用新制的10ml血清移液管,从每个烧瓶中取出约17ml,接着小心地向上抽取剩余培养基以测量烧瓶中剩余的体积。记录体积。

[1948] 通过同一血清移液管上下移液将样品充分混合。

[1949] 从每个烧瓶中取出200μl样品进行计数。使用自动化细胞计数器对细胞计数。针对待评估的每个PBMC批次,重复步骤7.4.26-7.4.31。

[1950] 结果和验收标准

[1951] 结果

[1952] 期望γ辐照的剂量足以使饲养细胞复制不胜任。期望所有批次符合评估标准,从而证实与第0天相比,在REP培养的第14天剩余的活饲养细胞总数减少。

[1953] 验收标准

[1954] 测试的每个辐照的供体PBMC批次符合以下验收标准:“无生长”意谓第14天的活细胞总数小于在REP第0天放入培养中的初始活细胞数。

[1955] 对不符合验收标准的PBMC批次的应变测试。

[1956] 在辐照的供体PBMC批次不符合上述验收标准中的情况下,将采用以下步骤以重新测试所述批次,进而排除作为其失败原因的简单实验者错误。如果批次中存在两个或更多个剩余的星形瓶,那么重新测试所述批次。如果批次中存在一个或没有剩余的星形瓶,那么根据以上验收标准,所述批次不合格。

[1957] 为了合格,通过应变测试的PBMC批次具有两个对照批次,并且所讨论批次的两个复本均达到验收标准。在符合此标准后,所述批次就可以进行使用。

[1958] 实例5:制备IL-2储备溶液(CELLGENIX)

[1959] 本实例描述将纯化冻干的重组人类白细胞介素-2溶解到适用于进一步组织培养方案中的储备液样品中的工艺,包括本申请和实例中描述的所有那些,包括涉及使用rhIL-2的那些。

[1960] 程序

[1961] 制备0.2%乙酸溶液(HAc)。将29mL无菌水转移到50mL锥形管中。将1mL 1N乙酸添加到50mL锥形管中。通过倒置试管2-3次进行充分混合。通过使用Steriflip过滤器过滤来

对 HAc溶液进行灭菌。

[1962] 制备含1%HSA的PBS。将4mL的25%HSA储备溶液添加到150mL无菌过滤器单元中的96mL PBS中。过滤溶液。存储于4℃下。对于制备的rhIL-2的每个小瓶，填写表格。

[1963] 制备rhIL-2储备溶液(6×10^6IU/mL最终浓度)每个rhIL-2批次均不同，且需要在制造商的分析证书(COA)中找到的信息，例如:1)每瓶rhIL-2的质量(mg)、2)rhIL-2的比活性(IU/mg)和3)建议的0.2%HAc重构体积(mL)。

[1964] 通过使用以下等式计算rhIL-2批次所需的1%HSA的体积：

[1965] $$\left(\frac{小瓶质量\ (mg)\ x\ 生物活性\ (\frac{IU}{mg})}{6x10^6\ \frac{IU}{mL}}\right) - HAc体积(mL) = 1\%\ HSA体积(mL)$$

[1966] 举例来说，根据CellGenix的rhIL-2批次10200121COA，1mg小瓶的比活性为25×10^6 IU/mg。建议在2mL 0.2%HAc中重构rhIL-2。

[1967] $$\left(\frac{1mg\ x\ 25x10^6\ \frac{IU}{mg}}{6x10^6\ \frac{IU}{mL}}\right) - 2mL = 2.167mL\ HSA$$

[1968] 用乙醇擦拭物擦拭IL-2小瓶的橡胶塞。使用连接到3mL注射器的16G针，将建议的0.2% HAc体积注射到小瓶中。注意不要在抽出针头时移走塞子。倒置小瓶3次并涡旋直到所有粉末溶解。小心地去除塞子并搁置在乙醇擦拭物上。将所计算的1%HSA体积添加到小瓶中。

[1969] 存储rhIL-2溶液。对于短期存储(<72小时)，将小瓶存储在4℃下。对于长期存储(>72 小时)，将小瓶等分成较小体积并存储于-20℃下的低温瓶中直到准备使用。避免冷冻/解冻循环。在制备日期之后6个月到期。Rh-IL-2标签包括供应商和目录号、批号、到期日期、操作员姓名缩写、等分试样的浓度和体积。

[1970] 实例6:冷冻保存工艺

[1971] 本实例描述使用CryoMed控制速率冷冻柜，型号7454(赛默科技公司)对用实例G中描述的简化封闭程序制备的TIL的冷冻保存工艺方法。

[1972] 所使用的设备如下:铝盒支架(与CS750冷冻袋兼容)、用于750mL袋的冷冻保存盒、低压(22psi)液氮罐、冷藏箱、热电偶传感器(袋子的带材类型)和CryoStore CS750冷冻袋(OriGen Scientific)。

[1973] 冷冻工艺提供从成核到-20℃的0.5℃速率和达到-80℃终点温度的每分钟1℃冷却速率。程序参数如下:步骤1-在4℃下等待;步骤2:1.0℃/min(样品温度)，达到-4℃;步骤3: 20.0℃/min(腔室温度)，达到-45℃;步骤4:10.0℃/min(腔室温度)，达到-10.0℃;步骤5:0.5℃/min(腔室温度)，达到-20℃;以及步骤6:1.0℃/min(样品温度)，达到-80℃。

[1974] 实例7:用抗PD-1抗体进行NSCLC治疗

[1975] 患者群体：

[1976] 未进行NSCLC治疗或化疗后未进行抗PD-1/PD-L1治疗

[1977] 治疗时间表：

[1978] 肿瘤碎片,用至多4个剂量的抗PD-1/PD-L1治疗,用TIL产品治疗初始难治性患者,所述TIL产品经冷冻保存并在进展时立即准备使用。初始难治性患者可以在2个剂量后具有进展。

[1979] 复发性患者也可以根据进展进行治疗(时间可介于数月到数年后范围内)。

[1980] 完全强度的IL-2,至多6个剂量。

[1981] 患者群体进一步考虑与先前提及相同的制造排列:

[1982] • 未进行NSCLC治疗或化疗后未进行抗PD-1/PD-L1治疗

[1983] • 未进行NSCLC治疗或化疗后未进行抗PD-1/PD-L1治疗,具有低PD-L1表达。

[1984] • 未进行NSCLC治疗或化疗后未进行抗PD-1/PD-L1治疗,具有低PD-L1表达和/或在基线时具有巨块病变。(例如巨块病变表示CT上界定为巨块的在横断面或冠状面中测量的最大肿瘤直径大于7cm,或短轴直径为20mm或更大的肿胀淋巴结;参见例如,Samejima,J.,《日本临床肿瘤学杂志(Japanese Journal of Clinical Oncology)》,45(11):1050-10541 2015,以引用的方式并入本文中)。

[1985] 实例8:GEN 3示范性工艺

[1986] 所述实例提供Gen 2与Gen 3工艺之间的比较。本实例描述稳固的TIL扩增平台的开发。对Gen 2工艺的修改通过减少操作员干预的次数降低了风险并简化了制造工艺、减少了制造的全部时间、优化了反应剂的使用,并且促使灵活的半封闭和半自动化细胞生产工艺适合于商业规模的高产量制造。

[1987] 工艺Gen 2和Gen 3TIL是由通过手术切除肿瘤从个别患者中得到且接着进行离体扩增的自体TIL构成。Gen 3工艺的引发第一次扩增步骤是在存在白细胞介素-2(IL-2)和单克隆抗体OKT3的情况下的细胞培养,所述单克隆抗体OKT3靶向辐照的外周血单核细胞(PBMC) 的骨架上的T细胞共受体CD3。

[1988] Gen 2TIL产物的制造由两个阶段组成:1)预快速扩增(Pre-REP)和2)快速扩增方案 (REP)。在Pre-REP期间,将切除的肿瘤切成各尺寸为2-3mm的≤50个碎片,将所述碎片用含血清的培养基(含有补充的10%HuSAB的RPMI 1640培养基)和6,000IU/mL的白细胞介素-2(IL-2)培养11天的时段。在第11天,采集TIL并将其引入大规模的二级REP扩增中。REP由以下组成:在负载有150μg单克隆抗CD3抗体(OKT3)的5×10^9个辐照的同种异体PBMC饲养细胞于5L体积的补充有3000IU/mL rhIL-2的CM2中的共培养中,活化来自pre-REP的$\leq200\times10^6$个活细胞,持续5天。在第16天,培养的体积减少90%并将细胞级分以每个烧瓶$\geq1\times10^9$个活淋巴细胞分割到多个G-REX-500烧瓶中,且用CM4QS至5L。将 TIL再培育6天。REP是在第22天采集,洗涤、调配并且冷冻保存,之后在-150℃下运送到临床现场进行输注。

[1989] Gen 3TIL产物的制造由三个阶段组成:1)引发第一次扩增方案、2)快速第二次扩增方案(也称为快速扩增阶段或REP)和3)传代培养分割。为实现引发第一次扩增TIL增殖,将切除的肿瘤切成各尺寸为2-3mm的≤120个碎片。在引发第一次扩增的第0天,在3个100 MCS容器的每一个中的大致100cm^2的表面区域上形成大致2.5×10^8个负载有OKT-3的同种异体的辐照PBMC饲养细胞的饲养层。将肿瘤碎片分布并且培养在3个100 MCS容器中持续 7天的时段,每个容器具有500mL含血清的CM1培养基和6,000IU/mL的白细胞介素-2(IL-2) 和15μg OKT-3。在第7天,通过将大致$5x10^8$个负载有OKT-3的同种异体的辐照PBMC饲养细胞的额外饲养细胞层并入3个100 MCS容器中每一个的肿瘤碎片培养阶段中并用500mL CM2培养

基和6,000IU/mL IL-2和30μg OKT-3进行培养来起始REP。通过使用负载有OKT3 的饲养细胞到100MCS容器中的封闭系统流体转移而活化同一容器中的整个引发第一次扩增培养来增强REP起始。对于Gen 3,TIL扩大或分割涉及以下工艺步骤,其中通过封闭系统流体转移将整个细胞培养规模扩大到较大容器中并进行转移(从100M烧瓶到500M烧瓶) 且添加额外4L的CM4培养基。REP细胞是在第16天采集,洗涤、调配并且冷冻保存,之后在-150℃下运送到临床现场进行输注。

[1990] 总的来说,Gen 3工艺为一种较短的更可扩大的并且易于修改的扩增平台,其将适应稳固的制造和工艺可比较性。

[1991] 表44:示范性Gen 2和示范性Gen 3制造工艺的比较。

[1992]

步骤	工艺(Gen 2)	工艺(Gen 3)
Pre REP- 第 0 天	最多 50 个碎片/1-G-Rex 100MCS-11 天 于 1 L 的 CM1 培养基 + IL-2(6000 IU/mL)中	整个肿瘤,最多 120 个碎片均匀地分配到最多 3 个烧瓶中。第 1 个烧瓶:第 1-60 个碎片 第 2 个烧瓶:第 61-89 个碎片 第 3 个烧瓶:第 90-120 个碎片 于 500 mL 的 CM1 培养基 + IL-2(6000 IU/mL)中 7 天 2.5×10^8 个饲养细胞/烧瓶 15 ug OKT-3/烧瓶
REP 起始	直接进入 REP-第 11 天- <200e^6 个 TIL (1) G-Rex 500MCS, 5L CM2 培养基 IL-2(3000 IU/mL) 5×10^9 个饲养细胞 150ug OKT-3	直接进入 REP-第 7 天-所有细胞 TIL-相同的 G-Rex 100MCS 添加 500 CM2 培养基 IL-2(6000 IU/mL) 5×10^8 个饲养细胞/烧瓶 30ug OKT-3/烧瓶
TIL 增殖或规模扩大	体积减少且将细胞级分分割到至多 5 个 G-REX 500MCS 中 4.5L CM4 培养基+ IL-2(3000 IU/mL) $\geq 1 \times 10^9$ 个 TVC/烧瓶 第 16 天分割	每个 G-REX 100MCS(1L)转移到 1 个 G-REX 500MCS 中 添加 4L CM4 培养基+ IL-2(3000 IU/mL) 第 9 天到第 11 天,规模扩大
采集	第 22 天采集 LOVO 自动化细胞洗涤器	第 16 天采集 LOVO-自动化细胞洗涤器
最终调配	冷冻保存产物 300IU/ml IL2- CS10 于 LN_2 中,多个等分试样	冷冻保存产物 300IU/ml IL-2-CS10 于 LN_2 中, 多个等分试样
工艺时间	**22 天**	**16 天**

[1993] 在第0天,对于两种工艺,洗涤肿瘤3次并将碎片随机且分成两个池;每种工艺一个池。对于Gen 2工艺,将碎片转移到一个GREX 100MCS烧瓶中,所述烧瓶具有1L含6,000IU/mL rhIL-2的CM1培养基。对于Gen 3工艺,将碎片转移到一个GREX100MCS烧瓶中,所述烧瓶具有500mL含6,000IU/mL rhIL-2、15μg OKT-3和2.5×10^8个饲养细胞的CM1。根据每种工艺,在不同的日子进行Rep起始日的TIL接种。对于Gen 2工艺,其中G-REX 100MCS烧瓶减少90%体积,将收集的细胞悬浮液转移到新的G-REX 500MCS中以在第11天在含有IL-2 (3000IU/mL)加5e9个饲养细胞和OKT-3(30ng/mL)的CM2培养基中开始REP起始。将细胞扩增并且根据方

案在第16天分割到多个GREX 500 MCS烧瓶中，所述烧瓶具有含IL-2 (3000IU/mL)的CM4培养基。接着根据方案在第22天采集培养物并进行冷冻保存。对于 Gen 3工艺，在第7天出现REP起始，其中使用相同的G-REX 100MCS进行REP起始。简单来说，将500mL含有IL-2 (6000IU/mL)和5×10^8个饲养细胞及30μg OKT-3的CM2培养基添加到每个烧瓶中。在第9-11天，规模扩大培养。将G-Rex100M的整个体积(1L)转移到G-REX 500MCS中并添加4L含有IL-2 (3000IU/mL)的CM4。将烧瓶培育5天。在第 16天采集培养物并进行冷冻保存。

[1994] 比较中包括三种不同的肿瘤，两种肺部肿瘤(L4054和L4055)和一种黑素瘤肿瘤(M1085T)。

[1995] 针对L4054和L4055，预先制备CM1(培养基1)、CM2(培养基2)和CM4(培养基4) 培养基，并且将其保持在4℃下。在不过滤的情况下制备CM1和CM2培养基以比较在过滤与不过滤培养基的情况下的细胞生长。

[1996] 在REP起始和规模扩大时，预先将L4055肿瘤的培养基在37℃下温热长达24小时。

[1997] 结果汇总

[1998] 对于获得的总活细胞，Gen 3下降到Gen 2的30％以内。Gen 3最终产物在再刺激之后展现出更高的INF-γ产生。Gen 3最终产物展现出增加的克隆多样性，如通过存在的总独特CDR3 序列所测量。Gen 3最终产物展现出较长的平均端粒长度。

[1999] 获得的结果

[2000] 细胞计数和存活率％：

[2001] 关于Gen 2和Gen 3工艺的Pre REP和REP扩增遵循上文所描述的细节。

[2002] 表45:Pre-REP细胞计数。对于每种肿瘤，两个池含有相等数量的碎片。由于小尺寸的肿瘤，未能达到每个烧瓶的最大碎片数量。对于Gen 2工艺在第11天，对于Gen 3工艺在第7天，采集总的pre-REP细胞(TVC)并进行计数。为比较两个pre-REP组，将细胞计数除以培养中提供的碎片数量，以便计算每个碎片的活细胞平均值。如下表所指示，与Gen 3工艺相比，Gen 2工艺的每个碎片始终生长更多的细胞。针对Gen 3工艺第11天预测的TVC数量的外推计算值是通过将pre-REP TVC除以7且接着乘以11来计算。

[2003] 表45:pre-REP细胞计数。

[2004]

肿瘤 ID	**L4054**		**L4055***		**M1085T**	
工艺	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
pre-REP TVC	1.42E + 08	4.32E + 07	2.68E + 07	1.38E + 07	1.23E + 07	3.50E + 06
碎片的数量	21	21	24	24	16	16
在 pre-REP 时，每个碎片的平均 TVC	6.65E + 06	2.06E + 06	1.12E + 06	5.75E + 05	7.66E + 05	2.18E + 05
在 pre REP 第 11 天的 Gen 3 外推值	不适用	6.79E + 07	不适用	2.17E + 07	不适用	5.49E + 06

[2005] *L4055，未过滤的培养基。

[2006] 表46:关于TIL最终产物的总活细胞计数和倍数扩增:对于Gen 2和Gen 3工艺，根据工艺条件对TVC进行计数并且产生所述工艺的每一天的活细胞百分比。在采集时，收集第22天(Gen 2)和第16天(Gen 3)的细胞并且确定TVC计数。接着将TVC除以第0天提供的碎片数量，以计算每个碎片的活细胞平均值。通过将采集的TVC除以REP起始TVC来计算倍数扩增。如表中所示，将Gen 2与Gen 3进行比较，L4054的倍数扩增类似;在L4055 的情况下，Gen 2工艺的倍数扩增更高。具体来说，在这种情况下，在REP起始日之前，使培养基升温24。针对

M1085T，另外观测到Gen 3中的倍数扩增更高。针对Gen 3工艺第22 天预测的TVC数量的外推计算值是通过将REP TVC除以16且接着乘以22来计算。

[2007] 表46:关于TIL最终产物的总活细胞计数和倍数扩增

[2008]

肿瘤 ID	L4054		L4055		M1085T	
工艺	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
#碎片	21	21	24	24	16	16
TVC/碎片（采集时）	3.18E + 09	8.77E + 08	2.30E + 09	3.65E + 08	7.09E + 08	4.80E + 08
REP 起始	1.42E + 08	4.32E + 07	2.68E + 07	1.38E + 07	1.23E + 07	3.50E + 06
规模扩大	3.36E + 09	9.35E + 08	3.49E + 09	8.44E + 08	1.99E + 09	3.25E + 08
采集	6.67E + 10	1.84E + 10	5.52E + 10	8.76E + 09	1.13E + 10	7.68E + 09
采集/REP 起始的倍数扩增	**468.4**	**425.9**	**2056.8**	**634.6**	**925.0**	**2197.2**
REP 采集第 22 天的 Gen 3 外推值	**不适用**	**2.53E + 10**	**不适用**	**1.20E + 10**	**不适用**	**1.06E + 10**

[2009] *L4055，未过滤的培养基。

[2010] 表47:TIL最终产物的存活率%:在采集后，将最终TIL REP产物与释放标准进行比较，得到存活率%。Gen 2和Gen 3工艺的所有条件超过70%的存活率标准并且在工艺和肿瘤之间都是相当的。

[2011] 表47:REP的存活率%

[2012]

肿瘤 ID	L4054		L4055		M1085T	
工艺	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
REP 起始	98.23%	97.97%	97.43%	92.03%	81.85%	68.27%
规模扩大	94.00%	93.57%	90.50%	95.93%	78.55%	71.15%
采集	87.95%	89.85%	87.50%	86.70%	86.10%	87.45%

[2013] 表48:Gen 3工艺的每个额外烧瓶的估算细胞计数。由于每个烧瓶的碎片数量低于最大所需数量，所以针对每种肿瘤计算在采集日的估算细胞计数。估算是基于临床肿瘤足够大以在第0天接种第2个或第3个烧瓶的期望。

[2014] 表49:对于Gen 3工艺中的全尺寸(full scale)第2个和第3个烧瓶的外推估算细胞计数计算

[2015]

肿瘤 ID	L4054		L4055		M1085T	
Gen 3 工艺	第 2 个烧瓶	第 3 个烧瓶	第 2 个烧瓶	第 3 个烧瓶	第 2 个烧瓶	第 3 个烧瓶
估算采集	3.68E + 10	5.52E + 10	1.75E + 10	2.63E + 10	1.54E + 10	2.30E + 10

[2016] 免疫表型：

[2017] 对TIL最终产物的表型标记比较：

[2018] 在Gen 2和Gen 3工艺中，三个肿瘤L4054、L4055和M1085T均经历了TIL扩增。在采集后，对REP TIL最终产物进行流式细胞测量分析以测试纯度、分化和记忆标记。对于所有条件，TCR a/b+细胞的百分比超过90%。

[2019] 与从Gen 2工艺采集的TIL相比，从Gen 3工艺采集的TIL展示更高的CD8和CD28表达。Gen 2工艺展示更高的CD4+百分比。参见图3(A、B、C)。

[2020] 对TIL最终产物的记忆标记比较：

[2021] 与从Gen 2工艺采集的TIL相比，从Gen 3工艺采集的TIL在中央记忆区室上展示更高的表达。参见图4(A、B、C)。

[2022] 对TIL最终产物的活化和耗尽标记比较：

[2023] 在来自两种肿瘤L4054和L4055的TIL中分析活化和耗尽标记，以比较Gen 2和Gen 3TIL 扩增工艺的最终TIL产物。Gen 2和Gen 3工艺之间的活化和耗尽标记是相当的。参见图5(A、B)；图6(A、B)。

[2024] 再刺激后的干扰素γ分泌：

[2025] 在采集日，对于Gen 2的第22天和对于Gen 3的第16天，针对L4054和L4055，TIL 经历了用涂布抗CD3的培养板再刺激整夜。使用抗CD3、CD28和CD137珠粒对M1085T进行再刺激。在所有条件下再刺激24小时后收集上清液并将上清液冷冻。使用相同的ELISA 培养板，同时对来自两种工艺的上清液进行评估，通过ELISA分析IFNγ。在分析的三种肿瘤中观测到Gen 3工艺的IFNγ产生更高。参见图7(A、B、C)。

[2026] 测量培养基中的IL-2含量：

[2027] 为比较Gen 2与Gen 3工艺之间的IL-2消耗，在REP起始、规模扩大和采集日，收集关于肿瘤L4054和L4055的细胞上清液。通过来自R&D的Quantitate ELISA试剂盒测量细胞培养上清液中的IL-2的量。总体趋势指示，当与Gen 2工艺相比时，Gen 3工艺中的IL-2浓度仍更高。这可能是因为Gen 3的REP起始时的更高IL-2浓度(6000IU/mL)结合整个工艺过程中的培养基残留。参见图8(A、B)。

[2028] 代谢底物和代谢物分析

[2029] 将例如D-葡萄糖和L-谷氨酰胺的代谢底物的含量测量为总培养基消耗的替代量。测量其互逆代谢物，如乳酸和氨。葡萄糖为培养基中的一种单糖，线粒体利用其来产生呈ATP形式的能量。当葡萄糖氧化时，产生乳酸(乳酸(lactate)为乳酸(lactic acid)的酯)。乳酸在很大程度上是在细胞指数生长阶段期间产生的。高含量的乳酸对细胞培养过程具有负面影响。参见图9(A、B)。

[2030] 针对工艺Gen 2和Gen 3，在REP起始、规模扩大和采集日，收集L4054和L4055的废培养基。对于Gen 2，废培养基收集是在第11天、第16天和第22天；对于Gen 3，是在第7 天、第11天和第16天。在CEDEX生物分析器上分析上清液，得到葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺、glutamax和氨的浓度。

[2031] L-谷氨酰胺是细胞培养基配方中需要的不稳定必需氨基酸。谷氨酰胺含有一种胺，并且这种酰胺结构基团可以将氮转运且递送至细胞。当L-谷氨酰胺氧化时，细胞会产生有毒的氨副产物。为抵消L-谷氨酰胺降解，Gen 2和Gen 3工艺的培养基补充有Glutamax，其在水溶液中更稳定并且不会自发地降解。在两种肿瘤株中，Gen 3组展示L-谷氨酰胺和Glutamax在所述工艺期间减少并且氨在整个REP中增加。在Gen 2组中，观测到L-谷氨酰胺和Glutamax 的浓度不变，且氨产生略有增加。Gen 2和Gen 3工艺的氨在采集日是相当的，并且展示在 L-谷氨酰胺降解方面略有差异。参见图10(A、B、C)。

[2032] 通过流式-荧光原位杂交(FLOW-FISH)测量的端粒重复序列：

[2033] 流式-荧光原位杂交技术用以测量L4054和L4055上的端粒重复序列在Gen 2和Gen 3工艺下的平均长度。相对端粒长度(RTL)的测定是使用来自DAKO的端粒PNA试剂盒/FITC进行流式细胞测量分析来计算。Gen 3展示与Gen 2相当的端粒长度。

[2034] CD3分析

[2035] 为测定每个工艺中产生的细胞产物的克隆多样性，对针对L4054和L4055采集的

TIL最终产物进行采样并且通过对T细胞受体的CDR3部分进行测序来检验克隆多样性分析。

[2036] 表50:采集的TIL细胞产物上关于L4054的共享独特CDR3序列百分比的Gen 2与Gen3 比较。Gen 3最终产物与Gen 2最终产物之间共有199个序列,对应于Gen 2与Gen 3最终产物共享的前80%独特CDR3序列的97.07%。

[2037] 表50:关于L4054的Gen 2与Gen 3工艺之间的共享uCDR3序列的比较。

[2038]

#uCDR3（重叠%）	所有 uCDR3		前 80% uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4054	8915	4355 **(48.85%)**	205	199 **(97.07%)**
Gen 3-L4054	-	18130	-	223

[2039] 表51:采集的TIL细胞产物上关于L4055的共享独特CDR3序列百分比的Gen 2与Gen3 比较。Gen 3最终产物与Gen 2最终产物之间共享1833个序列,对应于Gen 2与Gen 3最终产物共享的前80%独特CDR3序列的99.45%。

[2040] 表51:关于L4055的Gen 2与Gen 3工艺之间的共享uCDR3序列的比较。

[2041]

#uCDR3（重叠%）	所有 uCDR3		前 80% uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4055	12996	6599 **(50.77%)**	1843	1833 **(99.45%)**
Gen 3-L4055	-	27246	-	2616

[2042] CM1和CM2培养基在无需过滤的情况下提前制备并且保持在4℃下直到用于肿瘤L4055,进而在Gen 2和Gen 3工艺上使用。

[2043] 在Gen 2和Gen 3工艺的REP起始日,提前将肿瘤L4055的培养基在37℃下升温24小时。

[2044] 在所述工艺收集的上清液中,未测量到LDH。

[2045] 用K2cellometer细胞计数器进行M1085T TIL细胞计数。

[2046] 关于肿瘤M1085T,样品不可用,例如用于代谢分析的上清液,用于活化和耗尽标记分析、端粒长度和CD3-TCR分析的TIL产物。

[2047] 结论

[2048] 本实例比较3个单独的供体肿瘤组织的功能性质量属性,以及在Gen 2和Gen 3工艺当中的扩展表型表征和培养基消耗。

[2049] 关于产生的总活细胞和总有核细胞群体的存活率,对Gen 2与Gen 3pre-REP和REP扩增比较进行评估。采集日的TVC细胞剂量在Gen 2(第22天)与Gen 3(第16天)之间是不相当的。Gen 3细胞剂量低于Gen 2,约为采集时收集的总活细胞的40%。

[2050] 针对Gen 3工艺,假设在第11天而非第7天进行pre-REP采集并且在第22天而非第16 天进行REP采集,计算外推细胞数量。在两种情况下展示与Gen 2工艺相比,TVC的数量更接近,从而表明早期活化可允许TIL生长的总体更好表现。表4和5的底部行。

[2051] 就Gen 3工艺的附加烧瓶(2或3)的外推值来说,假设处理了更大尺寸的肿瘤,并且达到如所描述每个工艺所需的最大碎片数量。观测到,对于Gen 3工艺,在第16天采集时,TVC 可达到与Gen 2工艺的第22天相比类似的剂量。此观测非常重要并且只是培养的早期活化可允许TIL在较少处理时间中的更好表现。

[2052] 关于产生的总活细胞和总有核细胞群体的存活率,对Gen 2与Gen 3pre-REP和REP扩增比较进行评估。采集日的TVC细胞剂量在Gen 2(第22天)与Gen 3(第16天)之间是不相

当的。Gen 3细胞剂量低于Gen 2,约为采集时收集的总活细胞的40％。

[2053] 就表型表征来说,与Gen 2工艺相比,在Gen 3工艺中观测到三个肿瘤上的更高CD8+ 和CD28+表达。此数据指示,与Gen 2相比,Gen 3工艺具有改进的最终TIL产物属性。

[2054] 与Gen 2工艺相比,Gen 3工艺展示略微更高的中央记忆区室。

[2055] 尽管Gen 3工艺的持续时间较短,但Gen 2和Gen 3工艺展示相当的活化和耗尽标记。

[2056] 在分析的三个肿瘤中,与Gen 2相比,Gen 3最终产物上的IFNγ(IFN gamma)产生高3 倍。此数据指示,与Gen 2工艺相比,Gen 3工艺产生高度功能性且更有效的TIL产物,可能是由于Gen 3中的CD8和CD28表达更高。表型表征表明,与Gen 2工艺相比,Gen 3积极倾向于三个肿瘤上的CD8+、CD28+表达。

[2057] TIL最终产物上的端粒长度在Gen 2与Gen 3之间是相当的。

[2058] 葡萄糖和乳酸含量在Gen 2与Gen 3最终产物之间是相当的,从而表明Gen 3工艺的培养基中的营养物含量不受影响,这是因为与Gen 2相比,所述工艺的每一天未执行体积减少去除并且所述工艺中总体培养基体积较小。

[2059] 总的来说,与Gen 2工艺相比,Gen 3工艺展示处理时间减少几乎两倍,这将明显的降低通过Gen 3工艺扩增的TIL产物的商品成本(COG)。

[2060] IL-2消耗指示Gen 2工艺中的IL-2消耗总体趋势,且在Gen 3工艺中,由于未去除旧的培养基而导致IL-2更高。

[2061] Gen 3工艺展示通过CDR3TCRab序列分析测量的克隆多样性更高。

[2062] 在pre-REP的第0天,添加饲养细胞和OKT-3允许使用Gen 3工艺进行TIL的早期活化,并且总体上具有更好的TIL生长表现。

[2063] 表52描述Gen 3工艺与当前Gen 2工艺相比的各种实施例和结果:

[2064] 表52:示范性Gen 3工艺。

[2065]

步骤	工艺 Gen 2	工艺 Gen 3-优化
Pre REP-第 0 天	≤50 个碎片 1 个 G-Rex 100MCS 1L 培养基 IL-2（6000IU/mL） 11 天	≤240 个碎片 ≤60 个碎片/烧瓶 ≤4 个烧瓶 ≤2L 培养基（500 毫升/烧瓶） IL-2（6000IU/mL） 2.5×10^8 个饲养细胞/烧瓶 15ug OKT3/烧瓶
REP 起始	新鲜 TIL 直接进入 REP 第 11 天 ≤200e^6 个活细胞 5×10^9 个饲养细胞 G-Rex 500MCS 5L CM2 培养基+ IL-2（3000 IU/mL） 150ug OKT3	新鲜 TIL 直接进入 REP 第 7 天 活化整个培养 5×10^8 个饲养细胞 30 ug OKT3/烧瓶 G-Rex 100MCS 500mL 培养基+ IL-2（6000IU/mL）
TIL 传代培养或规模扩大	≤5 个 G-REX 500MCS ≤1 × 10 个活细胞/烧瓶 5 升/烧瓶 第 16 天	≤4 个 G-REX 500MCS 规模扩大整个培养 4 升/烧瓶 第 10-11 天
采集	第 22 天采集 LOVO 自动化细胞洗涤器 2 个洗涤周期	第 16 天采集 LOVO-自动化细胞洗涤器 5 个洗涤周期
最终调配	冷冻保存产物 300IU/ml IL2- CS10 于 LN_2 中， 多个等分试样	冷冻保存产物 300IU/ml IL-2-CS10 于 LN_2 中， 多个等分试样
工艺时间	**22 天**	**16 天**

[2066] 实例9:从CLL患者中的PBMC中选择并且扩增PBLS的示范性实施例

[2067] 从患者中收集PBMC并进行冷冻以便后续使用,或使用新鲜的。收集足够体积的外周血,以产生至少约400,000,000(400×10^6)个PBMC用于本发明方法中的起始材料。在所述方法的第0天,新制备或解冻6×10^6IU/mL的IL-2,并存储于4℃下或冰上直到准备使用。通过合并100mL的CM1培养基(含有GlutaMAX®),接着用100mL(1:1)AIM-V将其稀释以制造CM2,来制备200mL的CM2培养基。使CM2避光,并且在不使用时进行紧密地密封。

[2068] 所有以下步骤均在无菌细胞培养条件下进行。将一等份的CM2在用于解冻和/或洗涤冷冻PBMC样品的37℃水浴中的50mL锥形管中温热。如果使用冷冻PBMC样品,那么从冷冻柜存储装置中移出样品并将其保持于干冰上直到准备解冻。当准备解冻PBMC低温瓶时,将5mL的CM2培养基放置在无菌的50mL锥形管中。将PBMC样品低温瓶放置在37℃水浴中直到剩余很少冰晶为止。将温热的CM2培养基以1:1体积比的样品:培养基(约1mL) 逐滴添加到样品瓶中。从低温瓶中去除全部内容物并将其转移到50mL锥形管中的剩余CM2 培养基中。使用额外的1-2mL CM2培养基冲洗低温瓶且去除低温瓶的全部内容物并将其转移到50mL锥形管中。接着用额外的CM2培养基将锥形管的体积调节到15mL,并且平缓地涡旋以冲洗细胞。接着将锥形管在室温下在400g下离心5分钟,以便收集细胞沉淀。

[2069] 从沉淀中去除上清液,将锥形管封盖,且接着通过例如沿粗糙表面刮擦试管来破

坏细胞沉淀。将约1mL CM2培养基添加到细胞沉淀中，并用移液管上下抽吸沉淀和培养基5-10次以分解细胞沉淀。将额外的3-5mL CM2培养基添加到试管中并且通过移液管混合以悬浮细胞。此时，记录细胞悬浮液的体积。从试管中取出100μL细胞悬浮液，以用自动细胞计数器 (例如Nexcelom Cellometer K2)进行细胞计数。测定样品针对活细胞数量并记录。

[2070] 存留最少5×10^6个细胞用于表型和其它表征实验。将存留细胞在室温下在400g下自旋5 分钟以收集细胞沉淀。将细胞沉淀再悬浮于冷冻培养基(含有20％DMSO的无菌的热灭活 FBS)中。将一个或两个等份的存留细胞冷冻于冷冻培养基中，并且将所述等分试样在-80℃的冷冻柜中的细胞冷冻器(Mr.Frosty)中进行缓慢冷冻。在-80℃下最短24小时之后，将其转移到液氮存储装置中。

[2071] 对于以下步骤，使用预冷却的溶液，快速地工作，并且使细胞保持低温。下一步骤为纯化PBMC样品的T细胞级分。使用Pan T细胞分离试剂盒(美天旎，目录号130-096-535)来完成这个步骤。通过用pH 7.2的含有PBS、0.5％BSA和2mM EDTA的无菌过滤洗涤缓冲液洗涤细胞来制备用于纯化的细胞。将PBMC样品在400g下离心5分钟以收集细胞沉淀。抽吸出上清液并将细胞沉淀以每10^7个细胞再悬浮于40μL洗涤缓冲液中。对于每10^7个细胞，添加10μL的Pan T细胞生物素-抗体混合物。充分混合并在冷藏箱中或冰上培育5分钟。对于每10^7个细胞，添加30μL的洗涤缓冲液。对于每10^7个细胞，添加20μL的Pan T细胞微珠混合物。充分混合并在冷藏箱中或冰上培育10分钟。制备LS管柱并且以磁性方式从微珠中分离细胞。将LS管柱放置在QuadroMACS磁场中。LS管柱用3mL的冷洗涤缓冲液洗涤，并收集且丢弃洗涤液。将细胞悬浮液施加于管柱并且收集流过物(未标记的细胞)。此流过物为富集的T细胞级分(PBL)。用3mL洗涤缓冲液洗涤管柱并且将流过物收集在同一试管中作为起始流过物。将试管封盖并放置于冰上。这是T细胞级分或PBL。从磁场中移出LS管柱，用5mL洗涤缓冲液洗涤管柱，并且将非T-细胞级分(以磁性方式标记的细胞)收集到另一试管中。将两种级分在400g下离心5分钟以收集细胞沉淀。从两种样品中抽吸上清液，破坏沉淀，并且对于每个沉淀，将细胞再悬浮于1mL的补充有3000IU/mL IL-2的CM2培养基中，并且上下移液5-10次以分解沉淀。将1-2mL CM2添加到每个样品中，并充分混合每个样品，且存储在组织培养恒温箱中用于下一步骤。从每个样品中取出约50μL等分试样，对细胞进行计数，并且记录计数和存活率。

[2072] 接着用Dunabeads™Human T-Expander CD3/CD28培养T细胞(PBL)。将Dynabeads的储备小瓶以中等速度涡旋30秒。将所需等分试样的珠粒从储备小瓶中移出到1.5mL无菌微管中。通过将1mL珠粒洗涤液添加到1.5毫升含有珠粒的微管中来用珠粒洗涤溶液洗涤珠粒。平缓地进行混合。将所述试管放置于DynaMag™-2磁体上并静置30分钟，同时使珠粒朝向磁体汲取。从珠粒中抽吸出洗涤溶液并从磁体移出试管。将1mL补充有3000IU/mL IL-2的CM2培养基添加到珠粒中。将微管的全部内容物转移到15或50mL锥形管中。使用具有IL-2的CM2培养基使珠粒达到最终浓度约500,000/mL。

[2073] 如下一起培养T细胞(PBL)和珠粒。在第0天：在G-Rex 24孔板中，总共7mL/孔，添加500,000个T细胞、500,000个CD3/CD28Dynabeads和补充有IL-2的CM2。将G-Rex 培养板放置于潮湿的37℃、5％CO_2培育箱中，直到所述工艺中的下一步骤(在第4天)。使用Mr.Frosty细胞冷冻器将剩余细胞冷冻在CS10冷冻保存培养基中。使用Mr.Frosty细胞冷冻器将细胞的非T-细胞级分冷冻在CS10冷冻保存培养基中。在第4天，更换培养基。从G-rex 培养板的每

个孔中去除一半培养基(约3.5mL)。添加温热至37℃的足够量(约3.5mL)的补充有3000IU/mL IL-2的CM4培养基以替代从每个样品孔去除的培养基。将G-rex培养板返回到培育箱中。

[2074] 在第7天,通过REP扩增来制备细胞。从培育箱中移出G-rex培养板,且从每个孔中去除一半培养基并丢弃。将细胞再悬浮于剩余培养基中并转移到15mL锥形管中。用1mL温热至37℃的补充有3000IU/mL IL-2的CM4洗涤每个孔并将洗涤培养基转移到相同的具有细胞的15mL试管中。取出细胞的代表性样品并使用自动化细胞计数器进行计数。如果存在少于1×10^6个活细胞,那么重复第0天的Dynabead扩增工艺。将细胞的其余部分进行冷冻以备用扩增或用于表型和其它表征研究。如果存在1×10^6个活细胞或更多,那么根据第0天的方案重复设置REP扩增。或者,在具有充足细胞的情况下,可以在G-rex 10M培养烧瓶中使用10-15×10^6个PBL/烧瓶和1:1比率的Dynabeads:PBL于最终体积100毫升/孔的补充有3000 IU/mL IL-2的CM4培养基中设置扩增。将培养板和/或烧瓶返回到培育箱中。可以将过量的 PBL等分并在-80℃冷冻柜中的Mr.Frosty细胞冷冻器中进行缓慢冷冻,且在-80℃下最短24 小时之后,将其转移到液氮存储装置中。这些PBL可用作用于扩增或用于表型或其它表征研究的备用样品。

[2075] 在第11天,更换培养基。从G rex培养板的每个孔中或从烧瓶中去除一半培养基,并在 37℃下用相同量的补充有3000IU/mL IL-2的新鲜CM4培养基替代。

[2076] 在第14天,采集PBL。在使用G-rex培养板时,从培养板的每个孔中去除约一半培养基并丢弃。将PBL和珠粒悬浮于剩余培养基中并将其转移到15mL无菌锥形管(试管1)中。用1-2mL温热至37℃的新鲜AIM-V培养基洗涤孔,并将洗涤液转移到试管1中。将试管1 封盖并放置在DynaMag™-15磁体中1分钟以允许珠粒被汲取到磁体。将细胞悬浮液转移到新的15mL试管(试管2)中,并且用2mL的37℃的新鲜AIM-V洗涤珠粒。将试管1放回磁体中再保持1分钟,且接着将洗涤培养基转移到试管2中。在最终洗涤步骤之后,必要时可以合并所述孔。取出细胞的代表性样品并进行计数,记录计数和存活率。可以将试管放置在培育箱中,同时计数。如果细胞看起来非常密集,那么可以将额外的AIM-V培养基添加到试管2中。在使用烧瓶时,应将烧瓶中的体积减少到约10mL。将烧瓶的内容物混合并转移到15mL锥形管(试管A)中。如上文所描述用2mL AIM-V培养基洗涤烧瓶并将洗涤培养基也转移到试管A中。将试管A封盖并放置在DynaMag™-15磁体中1分钟以允许珠粒被汲取到磁体。将细胞悬浮液转移到新的15mL试管(试管B)中,并且用2mL的37℃的新鲜AIM-V 洗涤珠粒。将试管A放回磁体中再保持1分钟,且接着将洗涤培养基转移到试管B中。在最终洗涤步骤之后,必要时可以合并所述孔。取出细胞的代表性样品并进行计数,记录计数和存活率。可以将试管放置在培育箱中,同时计数。如果细胞看起来非常密集,那么可以将额外的AIM-V培养基添加到试管B中。细胞可以所需浓度新鲜使用或冷冻在CS10保护培养基中。

[2077] 实例10:对患有实体肿瘤的患者的自体肿瘤浸润淋巴细胞的第2阶段多中心研究

[2078] 研究设计

[2079] 概述

[2080] 本实例描述使用TIL与派立珠单抗的组合或TIL作为单一疗法、使用如本申请以及本实例中所描述制备的TIL评估ACT的前瞻性开放标签的多群组的非随机化的多中心第2阶段研究。

[2081] 目标:

[2082] 主要目标：

[2083] 为评估自体TIL与派立珠单抗的组合在MM、HNSCC或NSCLC患者中的疗效或TIL作为单一疗法在复发性或难治性(r/r)NSCLC患者中的疗效，所述复发性或难治性患者先前在用CPI治疗中或之后具有进展，如使用实体肿瘤的反应评估标准(RECIST 1.1)由客观反应率(ORR)判定，如由研究者评估。

[2084] 为表征TIL与派立珠单抗的组合在MM、HNSCC和NSCLC患者中的安全特性或TIL作为单一疗法在r/r NSCLC患者中的安全特性，如由治疗期间出现的不良事件(TEAE)等级≥3的发生率所测量。

[2085] 次要目标：

[2086] 使用完全反应(CR)速率、反应持续时间(DOR)、疾病控制速率(DCR)、如由研究者使用RECIST 1.1评估的无进展存活期(PFS)和总存活率(OS)进一步评估自体TIL与派立珠单抗的组合在MM、HNSCC或NSCLC患者中的疗效或TIL作为单一疗法在r/r NSCLC患者中的疗效。

[2087] 群组：

[2088] 群组1A：在患有IIIC期或IV期不可切除性或MM并接受过≤3种先前全身性疗法线(不包括免疫疗法)的患者中进行TIL与派立珠单抗的组合疗法。如果先前接受过治疗，那么患者必须在最近疗法中或之后具有以放射照相方式记录的进展。

[2089] 群组2A：在患有晚期、复发性或转移性HNSCC(例如，T1N1-N2B期、T2-4N0-N2b期)并接受过≤3种先前全身性疗法线(不包括免疫疗法)的患者中进行TIL与派立珠单抗的组合疗法。如果先前接受过治疗，那么患者必须在最近疗法中或之后具有以放射照相方式记录的进展。

[2090] 群组3A：在患有局部晚期或转移性(III-IV期)NSCLC并接受过≤3种先前全身性疗法线(不包括免疫疗法)的患者中进行TIL与派立珠单抗的组合疗法。如果先前接受过治疗，那么患者必须在最近疗法中或之后具有以放射照相方式记录的进展。

[2091] 群组3B：在先前接受过用CPI(例如，抗PD-1/抗PD-L1)的全身性疗法(作为≤3种先前全身性疗法线的一部分)的III期或IV期NSCLC患者中进行作为单一药剂的TIL疗法。如果先前接受过治疗，那么患者必须在最近疗法中或之后具有以放射照相方式记录的进展。

[2092] 群组3A和3B(NSCLC)中的患有癌基因驱动肿瘤的患者在可用有效靶向疗法的情况下必须接受至少一种靶向疗法线。

[2093] 所有患者均接受自体冷冻保存的TIL疗法(根据群组指定，具有或不具有派立珠单抗)，之后是由环磷酰胺和氟达拉宾组成的非清髓性淋巴细胞耗减(NMA-LD)预处理方案。在TIL 输注后，给予最多6个静脉内白细胞介素-2(IL-2)剂量。

[2094] 除非另外规定，否则在所有4个群组中进行以下一般研究阶段。

[2095] 筛选和肿瘤切除：进入研究后长达4周(28天)；制造TIL产物：肿瘤切除后大致≤22天；以及治疗阶段，如下文所论述。

[2096] 治疗阶段(群组1A、2A和3A)：长达2年，包括NMA-LD(7天)、TIL输注(1天) 接着IL-2给药(1到4天)。患者在完成其肿瘤切除以用于TIL产生和基线扫描之后但在开始 NMA-LD方案之前接受派立珠单抗的单一输注。在完成IL-2之后才是下一剂量的派立珠单抗，并且之后继续Q3W±3天，持续≤2年(24个月)或直到疾病进展或不可接受的毒性(以先发生的为

准)为止。在最后一剂派立珠单抗之后的30天内进行治疗终点(EOT)访视。如果适用,可以将所述访视与评估终点(EOA)访视合并进行(例如,在疾病进展时或在开始新抗癌疗法时停用派立珠单抗)。

[2097] 治疗阶段(群组3B):长达12天,包括NMA-LD(7天)、TIL输注(1天)接着IL-2 给药(1到4天)。一旦患者接受最后一剂IL-2,就进行EOT访视。在停止治疗后30天内进行EOT访视并将其与评估阶段期间将在此间隔内进行的任何计划访视合并进行。

[2098] 评估阶段:在第0天TIL输注之后开始,并且在疾病进展后、开始新抗癌疗法时、部分撤消同意研究评估或5年(第60个月)(以先发生的为准)结束。一旦患者达到疾病进展或开始新抗癌疗法,就进行评估终点(EOA)访视。

[2099] 用如本文所描述制备的TIL进行TIL自体疗法是由以下步骤构成:

[2100] 1.肿瘤切除以提供充当TIL细胞产物的来源的自体组织;

[2101] 2.在中心药品良好生产规范(Good Manufacturing Practice;GMP)设施中生产TIL产物;

[2102] 3. 7-天NMA-LD预处理方案;

[2103] 4.群组1A、2A及3A:患者将在完成其肿瘤切除以用于TIL制造和基线扫描之后但在开始NMA-LD方案之前接受派立珠单抗的单一输注。在完成IL-2之后才是下一剂量的派立珠单抗,并且之后继续Q3W±3天。

[2104] 5.输注自体TIL产物(第0天);以及

[2105] 6.IL-2静脉内给药,持续最多6个剂量。

[2106] 在群组1A、2A和3A中,在完成IL-2之后才是下一剂量的派立珠单抗,并且之后继续Q3W±3天,持续≤2年(24个月)或直到疾病进展或不可接受的毒性(以先发生的为准)为止。

[2107] 群组1A、2A和3A的流程图可见于图7中。群组3B的流程图可见于图8中。根据肿瘤适应症将患者分配到适当的群组。

[2108] TIL疗法+派立珠单抗(群组1A、2A和3A)

[2109] 筛选患者并安排肿瘤切除手术。接着切除患者的一个或多个肿瘤病灶,将其送到用于TIL 生产的中心制造设施中。

[2110] 接着,模拟NMA-LD方案,且其由以下组成:在第-7天和第-6天静脉内给予环磷酰胺(60mg/kg)及美司钠(mesna)(根据现场标准护理,或USPI/SmPC)2天,接着静脉内给予氟达拉宾5天(25mg/m2:第-5天至第-1天)。

[2111] 群组1A、2A及3A中的患者将在完成其肿瘤切除以用于TIL制造和基线扫描之后并且在开始NMA-LD方案之前接受派立珠单抗的单一输注。在第0天完成TIL输注之后3小时但不迟于之后24小时开始以600,000IU/kg剂量进行静脉内IL-2给药。大致每8至12小时将进行额外IL-2给药,持续最多6个剂量。在完成IL-2之后才是第二剂量的派立珠单抗。患者应在第二次派立珠单抗给药之前已从所有IL-2相关毒性(等级≤2)中恢复。派立珠单抗之后将继续Q3W±3天,持续≤2年(24个月)或直到疾病进展或不可接受的毒性(以先发生的为准) 为止。

[2112] TIL疗法作为单一药剂(群组3B)

[2113] 筛选患者并安排肿瘤切除手术。接着切除患者的一个或多个肿瘤病灶,将其送到用于TIL 生产的中心制造设施中。

[2114] 接着,NMA-LD方案由以下组成:在第-7天和第-6天静脉内给予环磷酰胺(60mg/kg)及美司钠(根据现场标准护理,或USPI/SmPC)2天,接着静脉内给予氟达拉宾5天(25mg/m2:第-5天至第-1天)。

[2115] 在最后一剂氟达拉宾之后24小时,才进行来源于肿瘤的自体TIL产物的输注。可以在完成TIL输注之后3小时但不迟于之后24小时开始600,000IU/kg剂量的静脉内IL-2给药。

[2116] 大致每8至12小时进行额外IL-2给药,持续最多6个剂量。

[2117] 肿瘤浸润淋巴细胞的产生和扩增

[2118] TIL自体细胞产物是由来源于患者肿瘤/病灶的活细胞毒性T淋巴细胞构成,所述活的细胞毒性T淋巴细胞是在中心GMP设施中离体制造的。描绘TIL生产工艺的示范性流程图提供于例如图9中。

[2119] 在手术切除每个患者中直径≥1.5cm的一个或多个原发性或继发性转移肿瘤病灶之后,在临床现场开始TIL制造工艺。可以切除各个解剖位置的多个肿瘤病灶以编译肿瘤组织的总聚集物;然而,由于运输瓶中存在有限量的生物保存培养基,所以聚集物不应超出直径4.0cm 或重量10g。

[2120] 将所述肿瘤病灶放入生物保存运输瓶中后,使用快递将其在2℃至8℃下运送到中心GMP 制造设施。到达后,将肿瘤试样解剖成碎片,接着将其与人类重组型IL-2一起在预快速扩增方案(Pre-REP)中培养约11天。

[2121] 接着使用快速扩增方案(REP)在存在IL-2、OKT3(针对人类CD3的鼠类单克隆抗体,又称为[莫罗单抗-CD3])和辐照的同种异体外周血单核细胞(PBMC)作为饲养细胞的情况下进一步扩增这些pre-REP细胞11天。

[2122] 接着采集扩增的细胞、洗涤、配置、冷冻保存并通过快递运送到临床现场。TIL细胞产物的剂型为冷冻保存的准备输注到获得TIL的患者体内的自体“活细胞悬浮液”。患者将接受所制造且释放的完全剂量的产品,根据产品规格其含有1×10^{9}与150×10^{9}之间的活细胞。临床经验指示在此剂量范围内实现客观肿瘤反应,其也显示为安全的(Radvanyi L.G.等人,《临床癌症研究》2012;18(24):6758-70)。将完全剂量的产品提供于至多四个输注袋中。

[2123] 制备接受TIL细胞产品的患者

[2124] 本研究中使用的NMA-LD预处理方案(即,2天环磷酰胺加美司钠,接着5天氟达拉宾) 是基于国家癌症研究所(National Cancer Institute)研发并测试的方法(Rosenberg S.A.等人,《临床癌症研究》2011;17(13):4550-7;Radvanyi L.G.等人,《临床癌症研究》2012;18(24):6758-70;Dudley M.E.等人,《临床肿瘤学杂志》2008;26(32):5233-9;Pilon-Thomas S等人,《免疫疗法杂志》2012;35(8):615-20;Dudley M.E.等人,《临床肿瘤学杂志》2005;23(10):2346-57;以及Dudley M.E.等人,《科学(Science.)》2002;298(5594):850-4)。7天预处理方案之后,向患者输注TIL细胞产品。

[2125] TIL输注之后每8至12小时静脉内给药IL-2(600,000IU/kg),在完成TIL输注之后的3 小时与24小时之间给予第一剂量并且继续最多6个剂量。根据机构标准,可以基于实际重量来计算IL-2的剂量。

[2126] 患者群体的选择

[2127] 群组1A:

[2128] 患者具有确诊的不可切除性MM(IIIC期或IV期,按照美国癌症联合委员会[AJCC]分期系统在组织学上确认)。排除眼部黑素瘤患者。患者必须未接受过先前的免疫肿瘤学靶向剂。如果BRAF突变为阳性,那么患者可以接受先前BRAF/MEK靶向疗法。

[2129] 群组2A:

[2130] 患者患有晚期、复发性和/或转移性HNSCC并且未进行治疗;需要通过病变报告对原发性肿瘤进行组织学诊断。患者必须未接受过先前免疫疗法方案。

[2131] 群组3A:

[2132] 患者具有确诊的III期或IV期NSCLC(鳞状癌、腺癌、大细胞癌)。患有癌基因驱动肿瘤的患者在可用有效靶向疗法的情况下必须接受至少一种靶向疗法线。

[2133] 群组3B:

[2134] 患者具有确诊的III期或IV期NSCLC(鳞状癌、腺癌、大细胞癌)并且先前已接受CPI(例如,抗PD-1/抗PD-L1)的全身性疗法。患有癌基因驱动肿瘤的患者在可用有效靶向疗法的情况下必须接受至少一种靶向疗法线。

[2135] 所有患者均已接受多达3种先前全身性抗癌疗法(参见,以下纳入标准),不包括群组 1A、2A和3A的免疫疗法。如果先前接受过治疗,那么患者在最近疗法中或之后具有以放射照相方式确认的进展。

[2136] 纳入标准

[2137] 患者必须符合所有以下参与研究的纳入标准:

[2138] 1.所有患者具有组织学上或病理学上确诊的具有其各别组织结构的恶性肿瘤:

[2139] o不可切除性或转移性黑素瘤(群组1A)

[2140] o头颈部的晚期、复发性或转移性鳞状细胞癌(群组2A)

[2141] oIII期或IV期NSCLC(鳞状癌、非鳞状癌、腺癌、大细胞癌)(群组3A和3B)。

[2142] 2.仅群组1A、2A和3A:患者未接受过免疫疗法。如果先前接受过治疗,那么患者在最近疗法中或之后具有进展。群组1A、2A和3A可以接受多达3种先前全身性抗癌疗法,具体地说:

[2143] o在群组1A中:患有不可切除性或转移性黑素瘤(IIIC期或IV期)的患者;如果BRAF突变为阳性,那么患者可以接受BRAF抑制剂。

[2144] o在群组2A中:患有不可切除性或转移性HNSCC的患者。允许已接受过初始化学放射疗法的那些患者。

[2145] o在群组3A中:患有III期或IV期NSCLC(鳞状癌、非鳞状癌、腺癌或大细胞癌) 并且在局部晚期或转移性设定中,未接受过免疫疗法并在≤3种先前全身性疗法线之后有进展的患者。在辅助或新辅助设定中接受过全身性疗法或作为确定性化学放射疗法的一部分的患者符合条件,并且如果疾病在完成先前全身性疗法的12个月内进展,则考虑接受一种疗法线。具有对靶向疗法敏感的突变的具有已知癌基因驱动因子(例如,EGFR、ALK、ROS)的患者必须在至少1种靶向疗法线之后有进展。

[2146] 3.仅群组3B:患有III期或IV期NSCLC(鳞状癌、非鳞状癌、腺癌或大细胞癌),先前接受过用CPI(例如,抗PD-1/抗PD-L1)的全身性疗法(作为≤3种先前全身性疗法线的一部分)的患者。

[2147] o患者在最近疗法中或之后具有以放射照相方式确认的进展。

[2148] o在辅助或新辅助设定中接受过全身性疗法或作为确定性化学放射疗法的一部分的患者符合条件,并且如果疾病在完成先前全身性疗法的12个月内进展,则考虑接受1种疗法线。

[2149] o具有对靶向疗法敏感的突变的具有已知癌基因驱动因子(例如,EGFR、ALK、ROS)的患者必须在至少1种靶向疗法线之后有进展。

[2150] 4.患者具有至少1个可切除的直径最小1.5cm的病灶(或聚集病灶),所述病灶切除后用于TIL研究产品产生。鼓励从多个且不同的转移性病灶中获得肿瘤组织,只要手术切除不会给患者造成额外风险即可。

[2151] o如果考虑切除用于TIL产生的病灶是在先前辐照范围内,那么病灶在切除之前必须已显示放射性进展。

[2152] o患者必须具有足够的组织病理学试样以进行方案要求的测试。

[2153] 5.在肿瘤切除用于TIL制造之后,患者仍具有可测量的疾病,如由标准且众所周知的 RECIST 1.1指南(参见例如Eisenhauer,《欧洲癌症期刊(European Journal of Cancer)》45:228-247(2009),也可以在万维网(World Wide Web) project.eortc.org/recist/wp-content/uploads/sites/4/2015/03/RECISTGuidelines.pdf获得)所界定。

[2154] o不选择先前辐照区域中的病灶作为目标病灶,除非那些病灶中的疾病已显示有进展。

[2155] o可以选择部分切除用于TIL产生并根据RECIST仍可测量的病灶作为非目标病灶,但不能充当用于反应评估的目标病灶。

[2156] 6.患者在同意时≥18岁。

[2157] 7.患者的东部肿瘤协作组(Eastern Cooperative Oncology Group;ECOG)表现状态为0 或1,且估算的预期寿命≥3个月。

[2158] 8.具有生育能力的患者或伴侣有生育能力的那些患者必须愿意在治疗期间实践一种批准的高效节育方法且在接受所有方案相关疗法之后继续12个月(注意:具有生殖潜力的女性将在治疗期间并在其最后一剂IL-2之后的12个月内,或在其最后一剂派立珠单抗之后的4 个月内(以较晚发生的为准)使用有效避孕)。男性在研究期间或停止治疗之后的12个月内 (以较晚发生的为准)不能供给精子。

[2159] 9.患者具有以下血液学参数:

[2160] o嗜中性白细胞绝对计数(ANC)≥1000个细胞/mm3;

[2161] o血红蛋白≥9.0g/dL;

[2162] o血小板计数≥100,000个细胞/mm3。

[2163] 10.患者具有充足的器官功能:

[2164] o血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)/血清谷氨酸-丙酮酸转氨酶(SGPT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)/SGOT≤3倍正常值上限(ULN),具有肝脏癌转移的患者≤5倍ULN。

[2165] o在筛查时使用Cockcroft Gault公式估算的肌酐清除率≥40mL/min。

[2166] o总胆红素≤2mg/dL。

[2167] o患有吉尔伯特氏综合症(Gilbert's Syndrome)的患者必须具有≤3mg/dL的总胆红素。

[2168] 11.患者针对人免疫缺陷病毒(HIV1和HIV2)呈血清反应阴性。根据基于聚合酶链

反应 (PCR)的病毒负荷和某些病毒暴露的局部发病率,征选针对代表急性或慢性传染的B型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、B型肝炎核心抗体(抗HBc)或C型肝炎病毒(抗HCV)呈血清阳性的患者。

[2169] 12.患者的一种或多种先前抗癌疗法的清除期为最短持续时间,如下文详述,在第一研究治疗之前(即,开始NMA-LD或派立珠单抗);

[2170] o靶向疗法:允许进行用表皮生长因子受体(EGFR)、MEK、BRAF、ALK、ROS1或其它靶向剂(例如,埃罗替尼、阿法替尼、达可替尼、奥希替尼、克卓替尼、色瑞替尼、劳拉替尼)的先前靶向疗法,限制条件为开始治疗之前,清除期为最短14天。

[2171] o化学疗法:允许辅助、新辅助或确定的化学疗法/化学放射治疗,限制条件为开始治疗之前,清除期为最短21天。

[2172] o针对仅群组3B的免疫疗法,在开始NMA-LD之前清除期≥21天的情况下,允许用抗PD-1、其它mAb或疫苗的先前检查点靶向疗法。

[2173] o姑息性放射线疗法:允许先前的外射束辐射,限制条件为所有辐射相关的毒性解析为 1级或基线,不包括脱发、皮肤色素沉着变化或其它临床上不明显的事件,例如小面积辐射性皮炎或直肠或泌尿紧迫

[2174] o通过RECIST 1.1评估为反应目标的肿瘤病灶是在辐射门(radiation portal)外部;然而,如果在所述门内,那么其必须已显示进展(参见以上纳入标准)。

[2175] o手术/预计划程序:准许先前的手术程序,限制条件为在肿瘤切除之前,已出现伤口愈合、已解决所有并发症并且已经过至少14天(针对主要操作性程序)。

[2176] 13.在群组分配之前,患者已从所有先前抗癌治疗相关的不良事件(TRAE)恢复到≤1级 (根据不良事件的通用术语标准[CTCAE]),除脱发或白癜风之外。

[2177] 14.在与医学监护人协商之后,逐个情况考虑接受先前抗癌疗法且稳定毒性≥2级的患者。

[2178] 15.仅在与医学监护人协商之后,才纳入合理地期望通过用派立珠单抗治疗不会加重不可逆毒性的群组1A、2A和3A患者。对于仅群组3B中的患者,由于用一种或多种免疫检查点抑制剂CPI进行先前治疗而具有记录的≥2级或更大程度的腹泻或结肠炎的患者必须在肿瘤切除之前的至少6个月内无症状或在肿瘤切除之前通过视觉评估治疗后结肠镜检查正常。

[2179] 16.患者必须提供使用和公开受保护健康信息的书面授权。

[2180] 排除标准

[2181] 将符合以下任一标准的患者排除在研究之外:

[2182] 1.具有葡萄膜/眼源性黑素瘤的患者

[2183] 2.在过去20年内接受过器官同种移植或包括非清髓性或清髓性化学疗法方案的先前细胞转移疗法的患者(注意:此标准适用于经历用TIL再治疗的患者,除了其在TIL治疗之前

[2184] 接受过先前NMA-LD方案)。

[2185] 3.具有症状和/或未治疗脑转移的患者。

[2186] o•具有明确治疗的脑转移患者将考虑入选

[2187] 在与医学监护人讨论之后;如果在开始治疗之前,患者

[2188] 在临床上稳定≥2周,通过治疗后磁共振

[2189] 成像(MRI)不存在新的脑病灶,则患者不需要继续进行

[2190] 皮质类固醇治疗。

[2191] 4.在入选的21天内进行全身性类固醇疗法的患者。

[2192] 5.怀孕或哺乳的患者。

[2193] 6.患有一种或多种活跃医学疾病(研究者认为,其使得参与研究的风险增加);例如全身性感染(例如,梅毒或任何其它感染需要的抗生素)、凝血障碍或心脏血管、呼吸道或免疫系统的其它活跃的主要医学疾病的患者。

[2194] 7.患者可不具有活跃或先前记录的自体免疫性或发炎性病症(包括肺炎、发炎性肠病[例如结肠炎或克罗恩氏病(Crohn's disease)]、憩室炎[除憩室病之外]、全身性红斑性狼疮症、结节病综合症或韦格纳综合症(Wegener syndrome)[肉芽肿性多血管炎、格雷夫斯病(Graves' disease)、类风湿性关节炎、垂体炎、葡萄膜炎等])。以下是此标准的例外:

[2195] o具有白癜风或脱发的患者。

[2196] o甲状腺功能减退(例如,以下桥本综合症(Hashimoto syndrome))的患者稳定

[2197] o激素替换。

[2198] o不需要全身性疗法的任何慢性皮肤病状。

[2199] o仅控制饮食的脂泻病患者。

[2200] 8.在开始治疗之前的28天内接受过活疫苗接种或减毒疫苗接种的患者。

[2201] 9.患有任何形式的原发性免疫缺陷(例如重度联合免疫缺陷疾病[SCID]和获得性免疫缺陷综合症[AIDS])的患者。

[2202] 10.对于研究药物的任何组分具有超敏反应病史的患者。不向对TIL产品调配物的任何组分具有已知超敏反应的患者给予TIL,所述组分包括(但不限于)以下任一种:

[2203] o·NMA-LD(环磷酰胺、美司钠和氟达拉宾)

[2204] o·Proleukin®、阿地白介素、IL-2

[2205] o·具有氨基糖苷类基团的抗生素(即,链霉素、庆大霉素[不包括对于庆大霉素超敏反应呈皮肤测试阴性的那些])

[2206] o·TIL产品调配物的任何组分,包括二甲亚砜

[2207] o[DMSO]、HAS、IL-2和右旋糖酐-40

[2208] ○·派立珠单抗

[2209] 11.左心室射血分数(LVEF)<45%或为纽约心脏协会(New York Heart Association)分类II或更高的患者心脏应力测试显示≥60岁的任何患者或具有缺血性心脏病、胸痛或临床上显著心房和/或心室性心律失常病史的患者均存在任何不可逆的壁面运动异常。

[2210] o经申办者的医学监测仪批准,如果心脏应力测试异常的患者具有足够的射血分数和心脏病消除率,则可以入选所述患者。

[2211] 12.患有阻塞性或限制性肺部疾病并且记录的FEV1(1秒内的用力呼气量)≤预测正常值的60%的患者。

[2212] o·如果患者由于异常的上气道解剖结构(即,气管切开)不能进行可靠的肺活量测量,则使用6分钟步行测试评估肺功能。排除不能步行针对年龄和性别预测的至少80%距

离或在测试期间的任一时间点表现出缺氧迹象(SpO2<90％)的患者。

[2213] 13.在先前3内具有另一原发性恶性肿瘤的患者(除了不需要治疗或超过1年前已接受过有疗效地治疗,并且根据研究人员判断,未造成明显的复发风险(包括(但不限于)非黑素瘤皮肤癌、DCIS、LCIS、Gleason评分≤6的前列腺癌或膀胱癌)的那些患者之外)。

[2214] 14.在开始治疗的21天内,参与研究产品的另一临床研究。

[2215] 研究指标和计划分析

[2216] 根据群组单独地分析主要指标和次要指标。

[2217] 主要指标:

[2218] ORR定义为达到确认为最佳反应的PR或CR的患者比例,如在疗效分析设置中由研究人员根据RECIST 1.1评估。

[2219] 根据每个疾病测评来评估客观反应,并且ORR表示为二项式比例,具有对应2-侧90％CI。当每个群组的所有经治疗患者有机会随访12个月时,进行每个群组的主要分析,除非评估阶段有进展/到期或提前停止。

[2220] 根据每个群组内的任何3级或更高TEAE的发病率来测量安全性主要指标,所述发病率表示为二项式比例,具有对应的2-侧90％CI。

[2221] 次要指标:

[2222] 疗效:

[2223] 次级疗效指标定义如下:

[2224] 基于如由研究人员评估达到确认CR的反应者得到CR率。根据达到确认PR/CR或持续 SD(至少6周)的患者数量总和除以疗效分析组中的患者数量×100％,得到DCR。使用点估计和其2-侧90％CI汇总CR率和DCR。

[2225] 在达到客观反应的患者中确定DOR。从符合第一次反应(PR/CR)标准开始测量到客观地记录复发性或进展性疾病,或接受后续抗癌疗法或患者死亡(以先记录的为准)的第一日期。未经历PD或在数据切断或最终数据库锁定之前未死亡的患者将在对肿瘤状态进行充分评估的最后日期对其事件时间进行审查。

[2226] PFS定义为从淋巴细胞耗减的时刻到PD或因任何原因而死亡(以较早事件为准)的时间(以月为单位)。未经历PD或在数据切断或最终数据库锁定时未过期的患者将在对肿瘤状态进行充分评估的最后日期对其事件时间进行审查。

[2227] OS定义为从淋巴细胞耗减的时刻到因任何原因而死亡的时间(以月为单位)。到数据切断或最终数据库锁定时未过期的患者在其已知存活状态的最后日期对其事件时间进行审查。

[2228] 对DOR、PFS和OS进行正确的审查。Kaplan-Meier方法将用以汇总事件发生时间的疗效指标。肿瘤评估的基线数据是所有群组在淋巴细胞耗减之前的最后扫描。

[2229] 将针对由基线疾病特征限定的适用亚群群组(BRAF状态(仅群组1A)、HPV状态(仅群组2A)、鳞状或非鳞状肺病(仅群组3A和3B)和抗PD-L1状态)估算以上疗效参数。

[2230] 实例11:第0天的GEN 3扩增平台的示范性实施例

[2231] 制备肿瘤洗涤介质。在开始之前,将介质温热。将5mL庆大霉素(50mg/mL)添加到500mL的HBSS瓶子中。将5mL肿瘤洗涤介质添加到待用于OKT3稀释的15mL锥形瓶中。存储在室温(RT)下。

[2232] 制备饲养细胞袋。将饲养细胞无菌转移到饲养细胞袋中并存储于37℃下直到使用或冷冻。如果在37℃下，就对饲养细胞进行计数。如果已冷冻，则解冻后并接着对饲养细胞进行计数。

[2233] 饲养细胞浓度的最优范围是在5×10^4与5×10^6个细胞/毫升之间。制备四个具有4.5mL AIM-V的锥形管。添加0.5mL细胞级分用于每次细胞计数。

[2234] 如果总的活饲养细胞数≥1×10^9个细胞，则进行到下一步骤来调节饲养细胞浓度。计算从第一饲养细胞袋中取出的饲养细胞体积，以便将1×10^9个细胞添加到第二饲养细胞袋中。

[2235] 使用p1000微量移液管，将900μl肿瘤洗涤介质转移到OKT3等分试样(100μL)中。使用注射器和无菌技术，吸取0.6mL OKT3并添加到第二饲养细胞袋中。将介质体积调节到2L的总体积。将第二饲养细胞袋转移到培育箱中。

[2236] OKT3调配细节：可以将OKT3等分并且以小瓶的原始储备浓度(1mg/mL)以100μl等分试样进行冷冻。每1mL小瓶有约10个等分试样。存储于-80℃下。第0天：15μg/烧瓶，即30ng/mL于500mL中-最大60μl约为1个等分试样.

[2237] 制备肿瘤样品。获得6孔板和100mm皮氏培养皿(总共4个)。用‘过量肿瘤块’标记 6孔板。将四个100mm皮氏培养皿中的每一个标记为‘洗涤_01’、‘洗涤_02’、‘洗涤_03’、‘洗涤_04’和‘保存’。

[2238] 向过量肿瘤块标记的6孔板的所有孔中添加5mL肿瘤洗涤介质。保留肿瘤洗涤介质可用于在解剖期间使肿瘤保持水分。

[2239] 向洗涤_01、洗涤_02、洗涤_03和保存标记的每个100mm皮氏培养皿中添加50mL肿瘤洗涤介质。使用标记物，将每个皮氏培养皿标记为解剖1到解剖4。将肿瘤在环境温度下在洗涤_01中培育≥3分钟。将肿瘤在环境温度下在洗涤_02中培育≥3分钟。将肿瘤在环境温度下在洗涤_03中培育≥3分钟。在完成洗涤之后，将肿瘤移入‘保存’培养皿中以确保组织保持水分。

[2240] 在进行肿瘤培育时，将10mL肿瘤运送介质转移到肿瘤运送介质标记的试管中。将10mL 肿瘤运送介质吸取至注射器中，并向一个无氧和一个有氧无菌瓶中接种5mL肿瘤运送介质。

[2241] 在整个解剖过程中将直尺放置在皮氏培养皿盖下。测量且记录肿瘤长度和碎片数量。将肿瘤解剖四个中等块或分成四个相等体积的团块，并保存每个中等块的肿瘤结构。使肿瘤块保持水分。

[2242] 将没有被主动解剖的任何中等肿瘤块转移到保存培养皿中以使组织保持水分。

[2243] 在解剖培养皿盖下使用直尺作为参考，将肿瘤解剖成27mm^3的碎片(3×3×3mm)。解剖中等碎片直到达到60个碎片。计数最终碎片的总数，并且根据产生的最终碎片数制备G-Rex 100MCS烧瓶(通常每个烧瓶60个碎片)。

[2244] 将有利的组织碎片保留在标记为碎片试管1到碎片试管4的锥形管中。计算G-Rex 100MCS烧瓶的数量以根据原始的碎片试管数量接种饲养细胞悬浮液。

[2245] 从培育箱中移出饲养细胞袋并接种G-Rex 100MCS。标记为D0(第0天)。

[2246] G-REX100MCS中的肿瘤碎片添加培养

[2247] 在无菌条件下，拧开肿瘤碎片培养(D0)1标记的G-Rex 100MCS和碎片试管标记的

50 mL锥形管的盖子。涡旋打开的碎片试管1并同时略微提起G-Rex100MCS的盖子。在涡旋的同时将带有碎片的培养基添加到G-Rex100MCS中。记录转移到G-Rex100MCS中的碎片数量。

[2248] 一旦碎片位于GREX烧瓶的底部,吸取7mL介质并制作七个1mL等分试样-5mL用于扩展表征且2mL用于无菌样品。将用于扩展表征的5个等分试样(最终碎片培养上清液)存储于-20℃下直到需要。

[2249] 向一个无氧BacT/Alert瓶子和一个有氧BacT/Alert瓶子中各自接种1mL最终碎片培养上清液。针对每个采样的烧瓶重复操作。

[2250] 实例12:第7-8天的GEN 3扩增平台的示范性实施例

[2251] 制备饲养细胞袋。当冷冻时,在37℃水浴中解冻饲养袋3-5分钟。在冷冻时对饲养细胞进行计数。

[2252] 饲养细胞浓度的最优范围是在5×10^4与5×10^6个细胞/毫升之间。制备四个具有4.5mL AIM-V的锥形管。将用于每次细胞计数的0.5mL细胞级分添加到新的低温瓶管中。充分混合样品并进行细胞计数。

[2253] 如果总的活饲养细胞数≥2×10^9个细胞,则进行到下一步骤来调节饲养细胞浓度。计算从第一饲养细胞袋中取出的饲养细胞体积,以便将2×10^9个细胞添加到第二饲养细胞袋中。

[2254] 使用p1000微量移液管,将900μl HBSS转移到100μL OKT3等分试样中。通过上下移液混合3次。制备两个等分试样。

[2255] OKT3调配细节:可以将OKT3等分并且以小瓶的原始储备浓度(1mg/mL)以100μl等分试样进行冷冻。每1mL小瓶有约10个等分试样。存储于-80℃下。第7/8天:30μg/烧瓶,即60ng/mL于500mL中-最大120μl约为2个等分试样。

[2256] 使用注射器和无菌技术,吸取0.6mL OKT3并添加到饲养细胞袋中,确保全部添加。将介质体积调节到2L的总体积。用第二OKT3等分试样进行重复并添加到饲养细胞袋中。将第二饲养细胞袋转移到培育箱中。

[2257] 制备带有饲养细胞悬浮液的G-REX100MCS烧瓶

[2258] 根据第0天产生的G-Rex烧瓶数量,记录待处理的G-Rex 100MCS烧瓶数量。从培育箱中移出G-Rex烧瓶并从培育箱中移出第二饲养细胞袋。

[2259] 在添加饲养细胞悬浮液之前,去除上清液:

[2260] 将一个10mL注射器连接到G-Rex100烧瓶并吸取5mL培养基。制作五个1mL等分试样-5mL用于扩展表征,并且将用于扩展表征的5个等分试样(最终碎片培养上清液)保存于-20℃下直到申办者要求。标记每个G-Rex100烧瓶并重复操作。

[2261] 取决于烧瓶数量,将5-20个1mL样品用于表征:

[2262] • 5mL=1个烧瓶

[2263] • 10mL=2个烧瓶

[2264] • 15mL=3个烧瓶

[2265] • 20mL=4个烧瓶

[2266] 将饲养细胞继续接种到G-Rex100 MCS中,且针对每个G-Rex100 MCS烧瓶重复操作。使用无菌转移方法,将500mL第二饲养细胞袋(按重量计)(假设1g=1mL)重力转移到每个G-Rex 100MCS烧瓶中并记录所述量。标记为第7天培养并且针对每个G-Rex100烧瓶重复

操作。将G-Rex 100MCS烧瓶转移到培育箱中。

[2267] 实例13:在第10-11天的GEN 3扩增平台的示范性实施例

[2268] 取出第一个G-Rex 100MCS烧瓶并且使用无菌条件使用10mL注射器去除7mL预处理培养上清液。制作七个1mL等分试样-5mL用于扩展表征且2mL用于无菌样品。

[2269] 小心地混合烧瓶并且使用新的10mL注射器取出10mL上清液并转移到标记为D10/11 支原体上清液的15mL试管中。

[2270] 小心地混合烧瓶并且使用新的注射器根据待处理的烧瓶数量取出以下体积:

[2271] #1个烧瓶=40mL

[2272] •2个烧瓶=20mL/烧瓶

[2273] •3个烧瓶=13.3mL/烧瓶

[2274] •4个烧瓶=10mL/烧瓶

[2275] 应从所有烧瓶中取出总共40mL并且合并于'第10/11天QC样品'标记的50mL锥形管中,且存储在培育箱中直到需要。进行细胞计数且分配细胞。

[2276] 将用于扩展表征的5个等分试样(预处理培养上清液)存储于≤-20℃下直到需要。向一个无氧BacT/Alert瓶子和一个有氧BacT/Alert瓶子中各自接种1mL预处理培养上清液。

[2277] 继续将细胞悬浮液转移到G-Rex 500MCS中,且针对每个G-Rex 100MCS重复操作。使用无菌条件,将每个G-Rex 100MCS的内容物转移到G-Rex 500MCS中,同时监测约100mL的流体转移。当G-Rex 100MCS的体积减少到500mL时,停止转移。

[2278] 在转移步骤期间,使用10mL注射器并从G-Rex 100MCS中吸取10mL细胞悬浮液到注射器中。根据培养中的烧瓶数量,遵循以下说明。如果仅1个烧瓶:则使用两个注射器取出总共20mL。如果2个烧瓶:则每个烧瓶取出10mL。如果3个烧瓶:则每个烧瓶取出7mL。如果4个烧瓶:则每个烧瓶取出5mL。将细胞悬浮液转移到一个共用的50mL锥形管中。保持在培育箱中直到细胞计数步骤和QC样品。QC需要的总细胞数为约20e6个细胞:4×0.5mL 细胞计数(细胞计数最初未进行稀释)。

[2279] 分析所需的细胞:

[2280] •对于IFN-G分析,最少10e6个细胞

[2281] •对于支原体分析,1e6个细胞

[2282] •5e6个细胞用于对CD3+/CD45+进行流式细胞测量

[2283] 将G-Rex 500MCS烧瓶转移到培育箱中。

[2284] 制备QC样品

[2285] 需要至少15×10^8个细胞。分析包括:细胞计数和存活率;支原体(1×10^6个细胞/平均或细胞浓度);流式细胞测量(5×10^6个细胞/平均活细胞浓度);和IFN-g分析(5×10^6个细胞-1×10^6个细胞);IFN-γ分析需要$8-10\times10^6$个细胞。

[2286] 计算以10×10^6个细胞/毫升进行冷冻保存的细胞级分体积且计算待制备的小瓶数量。

[2287] 实例14:第16-17天的GEN 3扩增平台的示范性实施例

[2288] 洗涤缓冲液制备(1%HAS PLASMALYTE A)

[2289] 将HAS和PLasmalyte转移到5L袋中以制成LOVO洗涤缓冲液。使用无菌条件,将总体

积125mL的25％HSA转移到5L袋中。存储在室温下。

[2290] 取出10mL或40mL的洗涤缓冲液并转移到‘IL-2 6×10^4IU/mL’试管中(如果提前制备 IL-2,则为10mL,或如果新鲜制备IL-2,则为40mL)。

[2291] 计算重构IL-2的体积以添加到Plasmalyte+1％HSA中:重构IL-2的体积＝(IL-2的最终浓度×最终体积)/IL-2的比活性(基于标准分析)。IL-2的最终浓度为6×10^4IU/mL。最终体积为 40mL。

[2292] 取出重构IL-2所需的初始计算的IL-2体积并且转移到‘IL-2 6×10^4IU/mL’试管中。将提前制备的等分试样的100μL IL-2 6×10^6IU/mL添加到含有10mL LOVO洗涤缓冲液的‘IL-2 6×10^4IU/mL’标记的试管中。

[2293] 从G-Rex 500MCS烧瓶中取出约4500mL上清液。涡旋剩余上清液并且将细胞转移到细胞收集池袋中。对全部G-Rex 500MCS烧瓶重复操作。

[2294] 取出60mL上清液并添加到用于质量控制分析(包括支原体检测)的上清液试管中。存储于+2-8℃下。

[2295] 细胞收集

[2296] 对细胞进行计数。制备四个具有4.5mL AIM-V的15mL锥形管。这些都可以提前制备。最优范围＝5×10^4与5×10^6个细胞/毫升之间。(建议1:10稀释)。对于1:10稀释,向先前制备的4500μL AIM V中添加500μL CF。记录稀释因子。

[2297] 计算LOVO前的总细胞(TC;Total Cell)(活的+死亡的)＝总细胞平均值浓度(LOVO前的TC浓度) (活的+死亡的) ×来源袋的体积

[2298] 计算LOVO前的总活细胞(TVC;Total Viable Cell)(活的)＝总活细胞平均值浓度(LOVO前的TVC) (活的) × LOVO来源袋的体积

[2299] 当总细胞(TC)数>5×10^9时,取出5×10^8个细胞作为MDA保留样品进行冷冻保存。5×10^8÷平均TC浓度(步骤14.44)＝待取出的体积

[2300] 当总细胞(TC)数≤5×10^9时,取出4×10^6个细胞作为MDA保留样品进行冷冻保存。4×10^6÷平均TC浓度＝待取出的体积。

[2301] 使用适当大小的注射器以从LOVO来源袋中取出所需体积。保留在培育箱中直到冷冻保存步骤。

[2302] 当确定总细胞数时,待取出的细胞数应允许保留150×10^9个活细胞。确认LOVO前的 TVC为5×10^8或4×10^6或不适用。计算待取出的细胞体积。

[2303] 计算袋中剩余的剩余总细胞。计算LOVO前的总细胞(TC)。[平均总细胞浓度×剩余体积＝剩余的LOVO前TC]

[2304] 根据剩余的总细胞数,在下表中选择相应的过程:

[2305]

总细胞:	截留物(mL)
0<总细胞≤31×10^9	115
31×10^9<总细胞≤71×10^9	165
71×10^9<总细胞≤110×10^9	215
110×10^9<总细胞≤115×10^9	265

[2306] 选择IL-2的体积以相应的添加到所使用的过程中。体积计算如下:截留体积×2×300 IU/mL＝所需的IL-2IU。需要IL-2IU/6×10^4IU/mL＝要添加到LOVO后袋的IL-2体积。记

录所有已添加的体积。在冷冻瓶中获得样品以进行进一步分析。

[2307] 充分混合细胞产物。密封所有袋以便进一步处理，包括冷冻保存(如适用)。

[2308] 对获得的冷冻瓶样品进行Enodxoton、IFN-γ、无菌和其它必要的分析。

[2309] 实例15:示范性GEN 3工艺(也称为GEN 3.1)

[2310] 目的

[2311] 本实例描述关于“用于TIL扩增的Gen 2与Gen 3工艺之间的可比性”的进一步研究。Gen 3工艺被修改以在所述工艺中包括早期活化步骤，其目的是将最终的总活细胞(TVC) 输出增加到与Gen 2中的总活细胞相当(或更好)，同时保持如先前可见的表型和功能特征。

[2312] 范围

[2313] 通过在第0天针对培养的肿瘤碎片引入活化步骤来评估TVC输出。

[2314] 在两个独立的患者肿瘤之间，Gen 3标准以及对照组展现出关于功能性和扩展表型表征的可比性。

[2315] 分析培养基消耗和代谢物产生以确认处理参数维持在生理条件下。

[2316] 本实例的所有轮次均使用商业供体肿瘤组织作为起始物质在全尺寸平台上进行。

[2317] 信息

[2318] 工艺Gen 3实施例被修改为另一实施例且在本文中的此实施例中称为Gen 3.1。

[2319] Gen 3.1TIL制造概念具有四个操作员干预措施：

[2320] 1.肿瘤碎片分离和活化:在所述工艺的第0天，解剖肿瘤并且产生的最终碎片各自为约 3×3mm(总共最多240个碎片)且在1-4个G-Rex100MCS烧瓶中进行培养。每个烧瓶含有最多60个碎片，500mL的CM1或DM1培养基，且补充有6,000IU rhIL-2、15μg OKT3和 2.5×10^8个辐照的同种异体单核细胞。将培养物在37℃下培育6-8天。

[2321] 2.TIL培养再活化:在第7-8天，通过缓慢添加CM2或DM1培养基(在两种情况下均补充有6,000IU rhIL-2、30μg OKT3和5×10^8个辐照的同种异体单核细胞)来补充培养物。注意不要干扰烧瓶底部的现有细胞。将培养物在37℃下培育3-4天。

[2322] 3.培养规模扩大:在第10-11天进行。在培养规模扩大期间，将G-Rex100MCS的全部内容物转移到含有4L的CM4或DM2(在两种情况下均补充有3,000IU/mL IL-2)的G-Rex500MCS烧瓶中。将烧瓶在37℃下培育5-6天直到采集。

[2323] 4.采集/洗涤/调配:在第16-17天，烧瓶的体积减少并且进行合并。将细胞浓缩并且用含有1%HSA的PlasmaLyte A pH 7.4洗涤。将洗涤后的细胞悬浮液与CryoStor10以1:1的比率调配并且补充rhIL-2，达到最终浓度300IU/mL。

[2324] 将DP以控制速率的冷冻进行冷冻保存并且存储在气相液氮中。*完全标准TIL培养基1、2或4(CM1、CM2、CM4)可以取代为CTS™ OpTmizer™ T细胞无血清扩增培养基，如上文所提及，称为确定成分培养基(DM1或DM2)。关于过程概述，参见例如图78和79。

[2325] 过程说明

[2326] 在第0天，将肿瘤洗涤3次，接着碎裂成3×3×3的最终碎片。在将整个肿瘤碎裂后，接着将最终碎片进行均等地随机并分成三个池。每个组引入一个随机的碎片池，每三个实验矩阵添加相同的碎片数量。

[2327] 对于整个TIL扩增工艺，用标准培养基进行肿瘤L4063扩增并且用确定成分培养基

(CTS OpTmizer)进行肿瘤L4064扩增。本文中描述了培养基的组分。

[2328] CM1完全培养基1:补充有2mM Glutamax、10％人类AB血清、庆大霉素(50μg/mL)、2-巯基乙醇(55μM)的RPMI+谷氨酰胺。补充有6000IU/mL IL-2的最终培养基调配物

[2329] CM2完全培养基2:50％CM1培养基+50％AIM-V培养基。补充有6000IU/mL IL-2的最终培养基调配物

[2330] CM4完全培养基4:补充有Glutamax(2mM)的AIM-V。补充有3000IU/mL IL-2的最终培养基调配物

[2331] 补充有CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增补充剂(26mL/L)的CTS OpTmizer CTS™OpTmizer™ T细胞扩增基础培养基。

[2332] DM1:补充有CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增补充剂(26mL/L)和CTS™免疫细胞SR(3％) 和Glutamax(2mM)的CTS™OpTmizer™ T细胞扩增基础培养基。补充有6,000IU/mL IL-2 的最终调配物。

[2333] DM2:补充有CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增补充剂(26mL/L)和CTS™免疫细胞SR(3％) 和Glutamax(2mM)的CTS™OpTmizer™ T细胞扩增基础培养基。补充有3,000IU/mL IL-2 的最终调配物。

[2334] 提前制备所使用的所有类型培养基,即,完全培养基(CM)和确定成分培养基(DM),将其保持在4℃下直到使用前的当天,并且在处理日之前,提前将其在培育箱中在37℃下温热长达24小时。

[2335] 对两种肿瘤,在第7天发生培养再活化。对于L4063在第10天,且对于L4064在第11天,发生规模扩大。在第16天收集两种培养物并进行冷冻保存。

[2336] 预期结果

[2337] 与Gen 3.0相比,Gen 3.1在第16-17天采集时可达到更高的总活细胞数。

[2338] 在再刺激之后,Gen 3.1可以产生相对于Gen 3.0类似的IFNγ含量。

[2339] 通过最终TIL产物中存在的总独特CDR3序列测量,Gen 3.1和Gen 3.0可以具有类似的克隆多样性。

[2340] Gen 3.1工艺中的表型特征可类似于Gen 3.0。

[2341] 获得的结果

[2342] 测定Gen 3.0和Gen 3.1工艺的细胞计数和存活率％。所有条件下的扩增遵循本实例中描述的细节。

[2343] 总活细胞计数和倍数扩增

[2344] 对于每一种肿瘤,将碎片分成三个相等数量的池。由于小尺寸的肿瘤,未能达到每个烧瓶的最大碎片数量。对于三个不同的工艺,评估每一种条件下的总活细胞和细胞存活率。将细胞计数测定为第7天用于再活化的TVC、第10天(L4064)或第11天(L4063)用于规模扩大的TVC,和第16/17天采集时的TVC。

[2345] FIO取得第7天和第10/11天的细胞计数。通过第16/17天采集的TVC除以第7天再活化的TVC来计算倍数扩增。为比较三个组,将采集日的TVC除以第0天培养中添加的碎片数量,以便计算每个碎片的活细胞平均值。

[2346] 对L4063和L4064进行细胞计数和存活率分析。如图89中所指示,关于两种肿瘤,Gen 3.1测试工艺产生比Gen 3.0工艺更多的细胞/碎片。

[2347] 图90:总活细胞计数和倍数扩增

[2348] 所述工艺期间的存活率%

[2349] 在再活化、规模扩大和采集时,在所有条件下进行存活率百分比分析。在第16/17天采集时,将最终TVC与存活率%的释放标准进行比较。评估的所有条件均超过70%存活率标准,且在工艺和肿瘤之间是相当的,如图82中所示。

[2350] 免疫表型

[2351] 关于TIL最终产物的表型表征。

[2352] 对最终产物进行流式细胞测量分析以测试纯度、分化和记忆标记。对于所有条件,TCRα/β、CD4+和CD8+细胞的群体百分比是一致的。

[2353] 进行REP TIL的扩展表型分析。关于两种肿瘤,与Gen 3.0相比,Gen 3.1条件下的TIL 产物展示更高百分比的CD4+细胞,且在两种条件下,与Gen 3.1条件相比,在Gen 3.0下的 TIL产物展示更高百分比的来自CD8+群体的CD28+细胞。

[2354] 从Gen 3.0和Gen 3.1工艺采集的TIL展示相当的表型标记,如CD4+和CD8+细胞上的 CD27和CD56表达,和CD4+门控细胞群体上相当的CD28表达。图83展示Gen 3.0和Gen 3.1工艺的最终TIL产物的表型标记。图83:L4063和L4064的最终TIL产物的表型表征。

[2355] 对TIL最终产物的记忆标记比较:

[2356] 图84展示了通过多色流式细胞测量术测定的TIL最终产物的记忆标记。对第16天采集的TIL的冷冻样品进行染色以用于分析。TIL记忆状态在Gen 3.0与Gen 3.1工艺之间是相当的。图84:L4063和L4064的TIL产物的记忆标记分析。

[2357] 对TIL最终产物的活化和耗尽标记比较:

[2358] 图85和86展示了通过多色流式细胞测量术测定的TIL最终产物的活化和耗尽。在CD4+ (图85)和CD8+(图86)细胞上进行门控的活化和耗尽标记在Gen 3.0与Gen 3.1工艺之间是相当的。图85:L4063和L4064的在CD4+细胞上进行门控的活化和耗尽标记。图86:L4063和L4064的在CD8+细胞上进行门控的活化和耗尽标记。

[2359] 再刺激后的干扰素γ分泌:

[2360] 对于L4063和L4064,对采集的TIL进行用涂布抗CD3的培养板再刺激整夜。与Gen 3.0 工艺相比,在分析的两个肿瘤中观测到Gen 3.1工艺中产生更高的IFNγ。每种条件下的IFNγ产生展示于图87中。图87:工艺Gen 3.0和Gen 3.1中的最终产物的IFN-γ产生(pg/mL)。

[2361] 测量培养基中的IL-2含量

[2362] 为比较所有条件和工艺之间的IL-2消耗含量,在第7天再活化起始、第10天(L4064) /第11天(L4063)规模扩大和第16/17天采集以及冷冻时收集细胞上清液。随后将上清液解冻且接着进行分析。通过制造商方案测量细胞培养上清液中的IL-2的量。数据展示于图88 中。

[2363] 总的来说,就相同培养基条件下评估的完全工艺期间的IL-2消耗来说,Gen 3和Gen 3.1 工艺是相当的。图88:针对L4063和L4064收集的废培养基的IL-2浓度(pg/mL)分析。

[2364] 代谢物分析

[2365] 在每种条件下,针对L4063和L4064,在第7天再活化起始、第10天(L4064)或第11

天(L4063)规模扩大,且在L4063和L4064的第16天/第17天采集时收集废培养基上清液。在CEDEX生物分析器上分析上清液,得到葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺、glutamax和氨的浓度。图89展示针对L4063和L4064肿瘤,Gen 3.0和Gen 3.1工艺收集的废培养基中的葡萄糖浓度。

[2366] 与完全培养基(2g/L)相比,确定成分培养基具有更高的葡萄糖浓度4.5g/L。总的来说,在每种培养基类型中,Gen 3.0和Gen 3.1工艺的葡萄糖浓度和消耗是相当的。图89:L4063 和L4064的废培养基中的葡萄糖浓度(g/L)。

[2367] 针对两种肿瘤L4063和L4064,在所有测试条件下观测到乳酸的增加。乳酸的增加在Gen 3.0与Gen 3.1条件之间并且在用于再活化扩增的两种培养基(用于L4063的完全培养基和用于L4064的确定成分培养基)之间是相当的。

[2368] 图90展示针对两种肿瘤L4063和L4064,Gen 3.0和Gen 3.1工艺条件下收集的废培养基中的乳酸浓度。图90:L4063和L4064的废培养基中的乳酸浓度(g/L)。

[2369] 在L4063的情况下,标准基础培养基含有2mML-谷氨酰胺并且补充有2mM glutamax以补偿L-谷氨酰胺在培养条件下天然降解成L-谷氨酸和氨。

[2370] 对于L4064肿瘤,使用的确定成分(无血清)培养基在基础培养基中不含有L-谷氨酰胺,且仅补充glutamax以达到最终浓度2mM。Glutamax为L-丙氨酸和L-谷氨酰胺的二肽,在水溶液中比L-谷氨酰胺更稳定,且不会自发地降解成谷氨酸和氨。实际上,二肽逐渐解离成单独的氨基酸,进而保持较低但足够浓度的L-谷氨酰胺以维持稳固的细胞生长。图91和图92 分别展示了针对两种肿瘤L4063和L4064,在Gen 3.0和Gen 3.1工艺条件下收集的废培养基中的谷氨酰胺和glutamax的浓度。

[2371] 对于L4063,谷氨酰胺和glutamax的浓度在规模扩大日略微减小,但在采集日展示增加到与再活化日相比类似或接近的含量。对于L4064,在整个工艺期间,谷氨酰胺和glutamax 浓度展示在不同条件之间以类似的速率略微降解。图91:L4063和L4064的废培养基中的谷氨酰胺浓度(mmol/L)。图92:L4063和L4064的废培养基中的glutamax浓度(mmol/L)。

[2372] 图93展示针对两种肿瘤L4063和L4064,Gen 3.0和Gen 3.1工艺收集的废培养基中的氨浓度。正如预期,与L4064(在含有2mM glutamax的确定成分培养基中生长)相比,L4063(在含有2mM谷氨酰胺+2mM glutamax的标准培养基中生长)的氨浓度更高。另外,如预期,在培养过程中,氨逐渐增加或累积。三个不同测试条件之间的氨浓度没有差异。图93:L4063和L4064的废培养基中的氨浓度(mmol/L)。

[2373] 通过流式-荧光原位杂交测量的端粒重复序列:

[2374] 流式-荧光原位杂交技术用以测量L4063和L4064上的端粒重复序列在Gen 3和Gen 3.1 工艺下的平均长度。相对端粒长度(RTL)的测定是使用来自DAKO的端粒PNA试剂盒/FITC 进行流式细胞测量分析来计算。进行端粒分析。

[2375] 将L4063和L4064样品中的端粒长度与对照细胞系(1301白血病)进行比较。对照细胞系为具有长稳定端粒的四倍体细胞系,其允许计算相对端粒长度。两种肿瘤中评估的Gen 3 和Gen 3.1工艺展示如图94所示的相当的端粒长度。图94:与对照(1301)细胞系相比的相对端粒长度(RTL)的汇总。

[2376] TCR Vβ库分析

[2377] 为测定每种工艺中产生的细胞产物的克隆多样性,通过对T细胞受体的CDR3部分

进行测序来分析TIL最终产物的克隆多样性分析。

[2378] 比较在三个条件之间的三个参数：

[2379] @独特CDR3(uCDR3)的多样性指数

[2380] @共享uCDR3％

[2381] @对于前80％的uCDR3：

[2382] o比较共享uCDR3复本％

[2383] o比较独特克隆型的频率

[2384] 图95:L4063和L4064的TCR Vβ库汇总。描述了在Gen 3和Gen 3.1条件下,肿瘤L4063 和L4064上的最终TIL产物的TIL克隆性,如通过TCR Vβ库所测量。

[2385] 图97:在Gen 3与Gen3.1对照与Gen 3.1测试之间比较采集的TIL细胞产物上的关于 L4063的共享独特CDR3序列百分比:Gen 3与Gen 3.1测试最终产物之间共享975个序列,等效于Gen 3与Gen 3.1测试最终产物共享的前80％独特CDR3序列的88％。

[2386] 图96:Gen 3.0与Gen 3.1工艺之间采集的TIL最终细胞产物上的独特CDR3序列的L4063 频率比较。

[2387] 图98:在Gen 3与Gen3.1对照与Gen 3.1测试之间比较采集的TIL细胞产物上的关于 L4064的共享独特CDR3序列百分比:Gen 3与Gen 3.1测试最终产物之间共享2163个序列,等效于Gen 3与Gen 3.1测试最终产物共享的前80％独特CDR3序列的87％。

[2388] 图99:Gen 3.0与Gen 3.1工艺之间采集的TIL最终细胞产物上的独特CDR3序列的L4064 频率比较。

[2389] 针对不同工艺,从第16天采集时收集的1×10^{6}个细胞中鉴别出独特CD3序列的数量。基于样品内的独特肽CDR数量,Gen 3.1测试条件展示比Gen 3.0略微更高的克隆多样性。

[2390] 香农熵多样性指数为用于比较的更可靠且通用的度量,两种肿瘤上的Gen 3.1条件展示比Gen 3工艺略微更高的多样性,从而表明Gen 3.1测试条件的TCR Vβ库比Gen 3.0工艺更具多克隆性。

[2391] 另外,在肿瘤L4063和L4064上,Gen 3.1测试条件的TCR Vβ库展示与Gen 3.0工艺的相应库超过87％的重叠。

[2392] 其它信息

[2393] 再活化日的Gen 3.1测试L4064的废培养基中的IL-2浓度值低于期望值(与Gen 3.1对照和Gen 3.0条件类似)。

[2394] 低值可能归因于移液误差,但由于采用的样品极小,不可能重复分析。

[2395] 未收集样品L4064上的第10/11天规模扩大的废培养基,并且不包括在对上清液的IL-2 浓度分析和代谢物分析中。

[2396] 结论

[2397] 与Gen 3.0和Gen 3.1对照相比,在第0天包括饲养细胞和OKT-3的Gen 3.1测试条件展示在第16天采集时的更高TVC细胞剂量。Gen 3.1测试条件的最终产物上的TVC比Gen 3.0 高约2.5倍。

[2398] 对于两种肿瘤L4063和L4064,第0天添加OKT-3和饲养细胞的Gen 3.1测试条件在采集时达到最大的烧瓶容量。在这些条件下,如果在第0天启用最多4个烧瓶,那么最终细胞

剂量可在80-100E+09个TIL之间。

[2399] 最终TIL产物的所有质量属性(例如表型表征,包括纯度、耗尽、活化和记忆标记)在 Gen 3.1测试与Gen 3.0工艺之间均得以保持并且是相当的。TIL最终产物上的端粒长度和废培养基上的IL-2消耗在Gen 3.0与Gen 3.1工艺之间是相当的。

[2400] 在分析的两种肿瘤中,与Gen 3.0相比,最终TIL产物上的IFNγ产生在第0天添加饲养细胞和OKT-3的Gen 3.1中高3倍,从而表明Gen 3.1工艺产生了有效的TIL产物。

[2401] 在整个测试条件下没有观测到葡萄糖或乳酸含量的差异。在整个培养基条件下,没有观测到Gen 3.0与Gen 3.1工艺之间的关于谷氨酰胺和氨的差异。培养基上的低谷氨酰胺含量并不限制细胞生长并且表明在培养基中仅添加glutamax也足以提供所需的营养物以使得细胞增殖。

[2402] L4063和L4064的规模扩大日分别在第11天和第10天,并且显示在所述工艺的采集日并未达到关于细胞数量的较大差异,且代谢物消耗在整个过程中在两种情况下是相当的。此观测结果表明Gen 3.0优化工艺在处理日可具有灵活性,进而有助于制造计划的灵活性。

[2403] 与Gen 3.0相比,通过CDR3TCRab序列分析测量,第0天添加饲养细胞和OKT-3的Gen 3.1工艺展示更高的克隆多样性。

[2404] 图100描述Gen 3工艺的一实施例(Gen 3优化工艺)。标准培养基和CTS Optimizer无血清培养基可用于Gen 3优化工艺TIL扩增。在推荐使用CTS Optimizer无血清培养基的情况下,将培养基上的glutamax增加到最终浓度4mM。

[2405] 可行性和可比性:

[2406] 可行性:

[2407] 确定所有实验中的所有研究条件的可行性。在所有实验和条件下且在供体肿瘤组织之间,所有实验均利用相同批量的关键原料(例如IL-2、人类血清-AB、同种异体饲养细胞、OKT-3) 来进行。

[2408] 可比性:

[2409] 通过任一研究组符合我们临床产物(如第22天冷冻保存的LFP-002自体肿瘤浸润淋巴细胞(TIL))的释放标准的能力来测定可比性,如图101中所概述。

[2410] 实例16:使用确定成分培养基的肿瘤扩增工艺。

[2411] 实例7至15中公开的工艺是用根据本发明的确定成分培养基(例如,CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM,赛默飞世尔,包括例如DM1和DM2)取代CM1和CM2培养基来进行。

[2412] 实例17:对患有实体肿瘤的患者的自体肿瘤浸润淋巴细胞的第2阶段多中心研究

[2413] 研究设计

[2414] 概述

[2415] 本实例描述使用TIL与派立珠单抗的组合或TIL作为单一疗法、使用如本申请以及本实例中所描述制备的TIL评估ACT的前瞻性开放标签的多群组的非随机化的多中心第2阶段研究。

[2416] 目标:

[2417] 主要目标:

[2418] 为评估自体TIL与派立珠单抗的组合在MM、HNSCC或NSCLC患者中的疗效或TIL作为

单一疗法在复发性或难治性(r/r)NSCLC患者中的疗效,所述复发性或难治性患者先前在用CPI治疗中或之后具有进展,如使用实体肿瘤的反应评估标准(RECIST 1.1)由客观反应率(ORR)判定,如由研究者评估。

[2419] 为表征TIL与派立珠单抗的组合在MM、HNSCC和NSCLC患者中的安全特性或TIL作为单一疗法在r/r NSCLC患者中的安全特性,如由治疗期间出现的不良事件(TEAE)等级≥3的发生率所测量。

[2420] 次要目标:

[2421] 使用完全反应(CR)速率、反应持续时间(DOR)、疾病控制速率(DCR)、如由研究者使用RECIST 1.1评估的无进展存活期(PFS)和总存活率(OS)进一步评估自体TIL与派立珠单抗的组合在MM、HNSCC或NSCLC患者中的疗效或TIL作为单一疗法在r/r NSCLC患者中的疗效。

[2422] 群组:

[2423] 群组1A:在患有IIIC期或IV期不可切除性或MM并接受过≤3种先前全身性疗法线(不包括免疫疗法)的患者中进行TIL与派立珠单抗的组合疗法。如果先前接受过治疗,那么患者必须在最近疗法中或之后具有以放射照相方式记录的进展。

[2424] 群组2A:在患有晚期、复发性或转移性HNSCC(例如,T1N1-N2B期、T2-4N0-N2b期)并接受过≤3种先前全身性疗法线(不包括免疫疗法)的患者中进行TIL与派立珠单抗的组合疗法。如果先前接受过治疗,那么患者必须在最近疗法中或之后具有以放射照相方式记录的进展。

[2425] 群组3A:在患有局部晚期或转移性(III-IV期)NSCLC并接受过≤3种先前全身性疗法线(不包括免疫疗法)的患者中进行TIL与派立珠单抗的组合疗法。如果先前接受过治疗,那么患者必须在最近疗法中或之后具有以放射照相方式记录的进展。

[2426] 群组3B:在先前接受过用CPI(例如,抗PD-1/抗PD-L1)的全身性疗法(作为≤3种先前全身性疗法线的一部分)的III期或IV期NSCLC患者中进行作为单一药剂的TIL疗法。如果先前接受过治疗,那么患者必须在最近疗法中或之后具有以放射照相方式记录的进展。

[2427] 群组3A和3B(NSCLC)中的患有癌基因驱动肿瘤的患者在可用有效靶向疗法的情况下必须接受至少一种靶向疗法线。

[2428] 所有患者均接受自体冷冻保存的TIL疗法(根据群组指定,具有或不具有派立珠单抗),之后是由环磷酰胺和氟达拉宾组成的非清髓性淋巴细胞耗减(NMA-LD)预处理方案。在TIL 输注后,给予最多6个静脉内白细胞介素-2(IL-2)剂量。

[2429] 除非另外规定,否则在所有4个群组中进行以下一般研究阶段。

[2430] 筛选和肿瘤切除:进入研究后长达4周(28天);制造TIL产物:肿瘤切除后大致≤22天;以及治疗阶段,如下文所论述。

[2431] 治疗阶段(群组1A、2A和3A):长达2年,包括NMA-LD(7天)、TIL输注(1天) 接着IL-2给药(1到4天)。患者在完成其肿瘤切除以用于TIL产生和基线扫描之后但在开始 NMA-LD方案之前接受派立珠单抗的单一输注。在完成IL-2之后才是下一剂量的派立珠单抗,并且之后继续Q3W±3天,持续≤2年(24个月)或直到疾病进展或不可接受的毒性(以先发生的为准)为止。在最后一剂派立珠单抗之后的30天内进行治疗终点(EOT)访视。如果适用,可以将所述访视与评估终点(EOA)访视合并进行(例如,在疾病进展时或在开始新抗癌疗法时停用

派立珠单抗)。

[2432] 治疗阶段(群组3B):长达12天,包括NMA-LD(7天)、TIL输注(1天)接着IL-2 给药(1到4天)。一旦患者接受最后一剂IL-2,就进行EOT访视。在停止治疗后30天内进行EOT访视并将其与评估阶段期间将在此间隔内进行的任何计划访视合并进行。

[2433] 评估阶段:在第0天TIL输注之后开始,并且在疾病进展后、开始新抗癌疗法时、部分撤消同意研究评估或5年(第60个月)(以先发生的为准)结束。一旦患者达到疾病进展或开始新抗癌疗法,就进行评估终点(EOA)访视。

[2434] 用如本文所描述制备的TIL进行TIL自体疗法是由以下步骤构成:

[2435] 1.肿瘤切除以提供充当TIL细胞产物的来源的自体组织;

[2436] 2.在中心药品良好生产规范(GMP)设施中生产TIL产物;

[2437] 3.7-天NMA-LD预处理方案;

[2438] 4.群组1A、2A及3A:患者将在完成其肿瘤切除以用于TIL制造和基线扫描之后但在开始NMA-LD方案之前接受派立珠单抗的单一输注。在完成IL-2之后才是下一剂量的派立珠单抗,并且之后继续Q3W±3天。

[2439] 5.输注自体TIL产物(第0天);以及

[2440] 6.IL-2静脉内给药,持续最多6个剂量。

[2441] 在群组1A、2A和3A中,在完成IL-2之后才是下一剂量的派立珠单抗,并且之后继续Q3W±3天,持续≤2年(24个月)或直到疾病进展或不可接受的毒性(以先发生的为准)为止。

[2442] 群组1A、2A和3A的流程图可见于图7中。群组3B的流程图可见于图8中。根据肿瘤适应症将患者分配到适当的群组。

[2443] TIL疗法+派立珠单抗(群组1A、2A和3A)

[2444] 筛选患者并安排肿瘤切除手术。接着切除患者的一个或多个肿瘤病灶,将其送到用于TIL 生产的中心制造设施中。

[2445] 接着,模拟NMA-LD方案,且其由以下组成:在第-7天和第-6天静脉内给予环磷酰胺(60mg/kg)及美司钠(根据现场标准护理,或USPI/SmPC)2天,接着静脉内给予氟达拉宾 5天(25mg/m2:第-5天至第-1天)。

[2446] 群组1A、2A及3A中的患者将在完成其肿瘤切除以用于TIL制造和基线扫描之后并且在开始NMA-LD方案之前接受派立珠单抗的单一输注。在第0天完成TIL输注之后3小时但不迟于之后24小时开始以600,000IU/kg剂量进行静脉内IL-2给药。大致每8至12小时将进行额外IL-2给药,持续最多6个剂量。在完成IL-2之后才是第二剂量的派立珠单抗。患者应在第二次派立珠单抗给药之前已从所有IL-2相关毒性(等级≤2)中恢复。派立珠单抗之后将继续Q3W±3天,持续≤2年(24个月)或直到疾病进展或不可接受的毒性(以先发生的为准) 为止。

[2447] TIL疗法作为单一药剂(群组3B)

[2448] 筛选患者并安排肿瘤切除手术。接着切除患者的一个或多个肿瘤病灶,将其送到用于TIL 生产的中心制造设施中。

[2449] 接着,NMA-LD方案由以下组成:在第-7天和第-6天静脉内给予环磷酰胺(60mg/kg)及美司钠(根据现场标准护理,或USPI/SmPC)2天,接着静脉内给予氟达拉宾5天(25mg/m2:第-5天至第-1天)。

[2450] 在最后一剂氟达拉宾之后24小时，才进行来源于肿瘤的自体TIL产物的输注。可以在完成TIL输注之后3小时但不迟于之后24小时开始600,000IU/kg剂量的静脉内IL-2给药。

[2451] 大致每8至12小时进行额外IL-2给药，持续最多6个剂量。

[2452] 肿瘤浸润淋巴细胞的产生和扩增

[2453] TIL自体细胞产物是由来源于患者肿瘤/病灶的活细胞毒性T淋巴细胞构成，所述活的细胞毒性T淋巴细胞是在中心GMP设施中离体制造的。描绘TIL生产工艺的示范性流程图提供于例如图9中。

[2454] 在手术切除每个患者中直径≥1.5cm的一个或多个原发性或继发性转移肿瘤病灶之后，在临床现场开始TIL制造工艺。可以切除各个解剖位置的多个肿瘤病灶以编译肿瘤组织的总聚集物；然而，由于运输瓶中存在有限量的生物保存培养基，所以聚集物不应超出直径4.0cm 或重量10g。

[2455] 将所述肿瘤病灶放入生物保存运输瓶中后，使用快递将其在2℃至8℃下运送到中心GMP 制造设施。到达后，将肿瘤试样解剖成碎片，接着将其与人类重组型IL-2一起在预快速扩增方案(Pre-REP)中培养约11天。

[2456] 接着使用快速扩增方案(REP)在存在IL-2、OKT3(针对人类CD3的鼠类单克隆抗体，又称为[莫罗单抗-CD3])和辐照的同种异体外周血单核细胞(PBMC)作为饲养细胞的情况下进一步扩增这些pre-REP细胞11天。

[2457] 接着采集扩增的细胞、洗涤、配置、冷冻保存并通过快递运送到临床现场。TIL细胞产物的剂型为冷冻保存的准备输注到获得TIL的患者体内的自体“活细胞悬浮液”。患者将接受所制造且释放的完全剂量的产品，根据产品规格其含有1×10^{9}与150×10^{9}之间的活细胞。临床经验指示在此剂量范围内实现客观肿瘤反应，其也显示为安全的(Radvanyi L.G.等人,《临床癌症研究》2012;18(24):6758-70)。将完全剂量的产品提供于至多四个输注袋中。

[2458] 制备接受TIL细胞产品的患者

[2459] 本研究中使用的NMA-LD预处理方案(即，2天环磷酰胺加美司钠，接着5天氟达拉宾) 是基于国家癌症研究所(National Cancer Institute)研发并测试的方法(Rosenberg S.A.等人,《临床癌症研究》2011;17(13):4550-7;Radvanyi L.G.等人,《临床癌症研究》2012;18(24):6758-70; Dudley M.E.等人,《临床肿瘤学杂志》2008;26(32):5233-9; Pilon-Thomas S等人,《免疫疗法杂志》2012;35(8):615-20;Dudley M.E.等人,《临床肿瘤学杂志》2005;23(10):2346-57;以及Dudley M.E.等人,《科学》2002;298(5594):850-4)。7天预处理方案之后，向患者输注 TIL细胞产品。

[2460] TIL输注之后每8至12小时静脉内给药IL-2(600,000IU/kg)，在完成TIL输注之后的3 小时与24小时之间给予第一剂量并且继续最多6个剂量。根据机构标准，可以基于实际重量来计算IL-2的剂量。

[2461] 患者群体的选择

[2462] 群组1A：

[2463] 患者具有确诊的不可切除性MM(IIIC期或IV期，按照美国癌症联合委员会[AJCC]分期系统在组织学上确认)。排除眼部黑素瘤患者。患者必须未接受过先前的免疫肿瘤学靶向剂。如果BRAF突变为阳性，那么患者可以接受先前BRAF/MEK靶向疗法。

[2464] 群组2A：

[2465] 患者患有晚期、复发性和/或转移性HNSCC并且未进行治疗；需要通过病变报告对原发性肿瘤进行组织学诊断。患者必须未接受过先前免疫疗法方案。

[2466] 群组3A：

[2467] 患者具有确诊的III期或IV期NSCLC(鳞状癌、腺癌、大细胞癌)。患有癌基因驱动肿瘤的患者在可用有效靶向疗法的情况下必须接受至少一种靶向疗法线。

[2468] 群组3B：

[2469] 患者具有确诊的III期或IV期NSCLC(鳞状癌、腺癌、大细胞癌)并且先前已接受CPI(例如，抗PD-1/抗PD-L1)的全身性疗法。患有癌基因驱动肿瘤的患者在可用有效靶向疗法的情况下必须接受至少一种靶向疗法线。

[2470] 所有患者均已接受多达3种先前全身性抗癌疗法(参见，以下纳入标准)，不包括群组 1A、2A和3A的免疫疗法。如果先前接受过治疗，那么患者在最近疗法中或之后具有以放射照相方式确认的进展。

[2471] 纳入标准

[2472] 患者必须符合所有以下参与研究的纳入标准：

[2473] 1.所有患者具有组织学上或病理学上确诊的具有其各别组织结构的恶性肿瘤：

[2474] o不可切除性或转移性黑素瘤(群组1A)

[2475] o头颈部的晚期、复发性或转移性鳞状细胞癌(群组2A)

[2476] oIII期或IV期NSCLC(鳞状癌、非鳞状癌、腺癌、大细胞癌)(群组3A和3B)。

[2477] 2.仅群组1A、2A和3A：患者未接受过免疫疗法。如果先前接受过治疗，那么患者在最近疗法中或之后具有进展。群组1A、2A和3A可以接受多达3种先前全身性抗癌疗法，具体地说：

[2478] o在群组1A中：患有不可切除性或转移性黑素瘤(IIIC期或IV期)的患者；如果BRAF突变为阳性，那么患者可以接受BRAF抑制剂。

[2479] o在群组2A中：患有不可切除性或转移性HNSCC的患者。允许已接受过初始化学放射疗法的那些患者。

[2480] o在群组3A中：患有III期或IV期NSCLC(鳞状癌、非鳞状癌、腺癌或大细胞癌) 并且在局部晚期或转移性设定中，未接受过免疫疗法并在≤3种先前全身性疗法线之后有进展的患者。在辅助或新辅助设定中接受过全身性疗法或作为确定性化学放射疗法的一部分的患者符合条件，并且如果疾病在完成先前全身性疗法的12个月内进展，则考虑接受一种疗法线。具有对靶向疗法敏感的突变的具有已知癌基因驱动因子(例如，EGFR、ALK、ROS)的患者必须在至少1种靶向疗法线之后有进展。

[2481] 3.仅群组3B：患有III期或IV期NSCLC(鳞状癌、非鳞状癌、腺癌或大细胞癌)，先前接受过用CPI(例如，抗PD-1/抗PD-L1)的全身性疗法(作为≤3种先前全身性疗法线的一部分)的患者。

[2482] o患者在最近疗法中或之后具有以放射照相方式确认的进展。

[2483] o在辅助或新辅助设定中接受过全身性疗法或作为确定性化学放射疗法的一部分的患者符合条件，并且如果疾病在完成先前全身性疗法的12个月内进展，则考虑接受1种疗法线。

[2484] o具有对靶向疗法敏感的突变的具有已知癌基因驱动因子(例如,EGFR、ALK、ROS)的患者必须在至少1种靶向疗法线之后有进展。

[2485] 4.患者具有至少1个可切除的直径最小1.5cm的病灶(或聚集病灶),所述病灶切除后用于TIL研究产品产生。鼓励从多个且不同的转移性病灶中获得肿瘤组织,只要手术切除不会给患者造成额外风险即可。

[2486] o如果考虑切除用于TIL产生的病灶是在先前辐照范围内,那么病灶在切除之前必须已显示放射性进展。

[2487] o患者必须具有足够的组织病理学试样以进行方案要求的测试。

[2488] 5.在肿瘤切除用于TIL制造之后,患者仍具有可测量的疾病,如由标准且众所周知的 RECIST 1.1指南(参见例如Eisenhauer,《欧洲癌症期刊(European Journal of Cancer)》 45:228-247(2009),也可以在万维网project.eortc.org/recist/wp-content/uploads/sites/4/2015/03/ RECISTGuidelines.pdf获得)所界定。

[2489] o不选择先前辐照区域中的病灶作为目标病灶,除非那些病灶中的疾病已显示有进展。

[2490] o可以选择部分切除用于TIL产生并根据RECIST仍可测量的病灶作为非目标病灶,但不能充当用于反应评估的目标病灶。

[2491] 6.患者在同意时≥18岁。

[2492] 7.患者的东部肿瘤协作组(Eastern Cooperative Oncology Group;ECOG)表现状态为0 或1,且估算的预期寿命≥3个月。

[2493] 8.具有生育能力的患者或伴侣有生育能力的那些患者必须愿意在治疗期间实践一种批准的高效节育方法且在接受所有方案相关疗法之后继续12个月(注意:具有生殖潜力的女性将在治疗期间并在其最后一剂IL-2之后的12个月内,或在其最后一剂派立珠单抗之后的4 个月内(以较晚发生的为准)使用有效避孕)。男性在研究期间或停止治疗之后的12个月内 (以较晚发生的为准)不能供给精子。

[2494] 9.患者具有以下血液学参数:

[2495] o嗜中性白细胞绝对计数(ANC)≥1000个细胞/mm3;

[2496] o血红蛋白≥9.0g/dL;

[2497] o血小板计数≥100,000个细胞/mm3。

[2498] 10.患者具有充足的器官功能:

[2499] o血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)/血清谷氨酸-丙酮酸转氨酶(SGPT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)/SGOT≤3倍正常值上限(ULN),具有肝脏癌转移的患者≤5倍ULN。

[2500] o在筛查时使用Cockcroft Gault公式估算的肌酐清除率≥40mL/min。

[2501] o总胆红素≤2mg/dL。

[2502] o患有吉尔伯特氏综合症的患者必须具有≤3mg/dL的总胆红素。

[2503] 11.患者针对人免疫缺陷病毒(HIV1和HIV2)呈血清反应阴性。根据基于聚合酶链反应 (PCR)的病毒负荷和某些病毒暴露的局部发病率,征选针对代表急性或慢性传染的B型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、B型肝炎核心抗体(抗HBc)或C型肝炎病毒(抗HCV)呈血清阳性的患者。

[2504] 12.患者的一种或多种先前抗癌疗法的清除期为最短持续时间,如下文详述,在第

一研究治疗之前(即,开始NMA-LD或派立珠单抗);

[2505] o靶向疗法:允许进行用表皮生长因子受体(EGFR)、MEK、BRAF、ALK、ROS1或其它靶向剂(例如,埃罗替尼、阿法替尼、达可替尼、奥希替尼、克卓替尼、色瑞替尼、劳拉替尼)的先前靶向疗法,限制条件为开始治疗之前,清除期为最短14天。

[2506] o化学疗法:允许辅助、新辅助或确定的化学疗法/化学放射治疗,限制条件为开始治疗之前,清除期为最短21天。

[2507] o针对仅群组3B的免疫疗法,在开始NMA-LD之前清除期≥21天的情况下,允许用抗PD-1、其它mAb或疫苗的先前检查点靶向疗法。

[2508] o姑息性放射线疗法:允许先前的外射束辐射,限制条件为所有辐射相关的毒性解析为 1级或基线,不包括脱发、皮肤色素沉着变化或其它临床上不明显的事件,例如小面积辐射性皮炎或直肠或泌尿紧迫

[2509] o通过RECIST 1.1评估为反应目标的肿瘤病灶是在辐射门(radiation portal)外部;然而,如果在所述门内,那么其必须已显示进展(参见以上纳入标准)。

[2510] o手术/预计划程序:准许先前的手术程序,限制条件为在肿瘤切除之前,已出现伤口愈合、已解决所有并发症并且已经过至少14天(针对主要操作性程序)。

[2511] 13.在群组分配之前,患者已从所有先前抗癌治疗相关的不良事件(TRAE)恢复到≤1级 (根据不良事件的通用术语标准[CTCAE]),除脱发或白癜风之外。

[2512] 14.在与医学监护人协商之后,逐个情况考虑接受先前抗癌疗法且稳定毒性≥2级的患者。

[2513] 15.仅在与医学监护人协商之后,才纳入合理地期望通过用派立珠单抗治疗不会加重不可逆毒性的群组1A、2A和3A患者。对于仅群组3B中的患者,由于用一种或多种免疫检查点抑制剂CPI进行先前治疗而具有记录的≥2级或更大程度的腹泻或结肠炎的患者必须在肿瘤切除之前的至少6个月内无症状或在肿瘤切除之前通过视觉评估治疗后结肠镜检查正常。

[2514] 16.患者必须提供使用和公开受保护健康信息的书面授权。

[2515] 排除标准

[2516] 将符合以下任一标准的患者排除在研究之外:

[2517] 1.具有葡萄膜/眼源性黑素瘤的患者

[2518] 2.在过去20年内接受过器官同种移植或包括非清髓性或清髓性化学疗法方案的先前细胞转移疗法的患者(注意:此标准适用于经历用TIL再治疗的患者,除了其在TIL治疗之前

[2519] 接受过先前NMA-LD方案)。

[2520] 3.具有症状和/或未治疗脑转移的患者。

[2521] o • 具有明确治疗的脑转移患者将考虑入选

[2522] 在与医学监护人讨论之后;如果在开始治疗之前,患者

[2523] 在临床上稳定≥2周,通过治疗后磁共振

[2524] 成像(MRI)不存在新的脑病灶,则患者不需要继续进行

[2525] 皮质类固醇治疗。

[2526] 4.在入选的21天内进行全身性类固醇疗法的患者。

[2527] 5.怀孕或哺乳的患者。

[2528] 6.患有一种或多种活跃医学疾病(研究者认为,其使得参与研究的风险增加);例如全身性感染(例如,梅毒或任何其它感染需要的抗生素)、凝血障碍或心脏血管、呼吸道或免疫系统的其它活跃的主要医学疾病的患者。

[2529] 7.患者可不具有活跃或先前记录的自体免疫性或发炎性病症(包括肺炎、发炎性肠病[例如结肠炎或克罗恩氏病(Crohn's disease)]、葸室炎[除葸室病之外]、全身性红斑性狼疮症、结节病综合症或韦格纳综合症(Wegener syndrome)[肉芽肿性多血管炎、格雷夫斯病(Graves' disease)、类风湿性关节炎、垂体炎、葡萄膜炎等])。以下是此标准的例外:

[2530] o具有白癜风或脱发的患者。

[2531] o甲状腺功能减退(例如,以下桥本综合症)的患者稳定

[2532] o激素替换。

[2533] o不需要全身性疗法的任何慢性皮肤病状。

[2534] o仅控制饮食的脂泻病患者。

[2535] 8.在开始治疗之前的28天内接受过活疫苗接种或减毒疫苗接种的患者。

[2536] 9.患有任何形式的原发性免疫缺陷(例如重度联合免疫缺陷疾病[SCID]和获得性免疫缺陷综合症[AIDS])的患者。

[2537] 10.对于研究药物的任何组分具有超敏反应病史的患者。不向对TIL产品调配物的任何组分具有已知超敏反应的患者给予TIL,所述组分包括(但不限于)以下任一种:

[2538] o·NMA-LD(环磷酰胺、美司钠和氟达拉宾)

[2539] o·Proleukin®、阿地白介素、IL-2

[2540] o·具有氨基糖苷类基团的抗生素(即,链霉素、庆大霉素[不包括对于庆大霉素超敏反应呈皮肤测试阴性的那些])

[2541] o·TIL产品调配物的任何组分,包括二甲亚砜

[2542] o[DMSO]、HAS、IL-2和右旋糖酐-40

[2543] o·派立珠单抗

[2544] 11.左心室射血分数(LVEF)<45%或为纽约心脏协会分类II或更高的患者心脏应力测试显示≥60岁的任何患者或具有缺血性心脏病、胸痛或临床上显著心房和/或心室性心律失常病史的患者均存在任何不可逆的壁面运动异常。

[2545] o经申办者的医学监测仪批准,如果心脏应力测试异常的患者具有足够的射血分数和心脏病消除率,则可以入选所述患者。

[2546] 12.患有阻塞性或限制性肺部疾病并且记录的FEV1(1秒内的用力呼气量)≤预测正常值的60%的患者。

[2547] o·如果患者由于异常的上气道解剖结构(即,气管切开)不能进行可靠的肺活量测量,则使用6分钟步行测试评估肺功能。排除不能步行针对年龄和性别预测的至少80%距离或在测试期间的任一时间点表现出缺氧迹象(SpO2<90%)的患者。

[2548] 13.在先前3内具有另一原发性恶性肿瘤的患者(除了不需要治疗或超过1年前已接受过有疗效地治疗,并且根据研究人员判断,未造成明显的复发风险(包括(但不限于)非黑素瘤皮肤癌、DCIS、LCIS、Gleason评分≤6的前列腺癌或膀胱癌)的那些患者之外)。

[2549] 14.在开始治疗的21天内,参与研究产品的另一临床研究。

[2550] 研究指标和计划分析

[2551] 根据群组单独地分析主要指标和次要指标。

[2552] 主要指标：

[2553] ORR定义为达到确认为最佳反应的PR或CR的患者比例，如在疗效分析设置中由研究人员根据RECIST 1.1评估。

[2554] 根据每个疾病测评来评估客观反应，并且ORR表示为二项式比例，具有对应2-侧90％CI。当每个群组的所有经治疗患者有机会随访12个月时，进行每个群组的主要分析，除非评估阶段有进展/到期或提前停止。

[2555] 根据每个群组内的任何3级或更高TEAE的发病率来测量安全性主要指标，所述发病率表示为二项式比例，具有对应的2-侧90％CI。

[2556] 次要指标：

[2557] 疗效：

[2558] 次级疗效指标定义如下：

[2559] 基于如由研究人员评估达到确认CR的反应者得到CR率。根据达到确认PR/CR或持续 SD(至少6周)的患者数量总和除以疗效分析组中的患者数量×100％，得到DCR。使用点估计和其2-侧90％CI汇总CR率和DCR。

[2560] 在达到客观反应的患者中确定DOR。从符合第一次反应(PR/CR)标准开始测量到客观地记录复发性或进展性疾病，或接受后续抗癌疗法或患者死亡(以先记录的为准)的第一日期。未经历PD或在数据切断或最终数据库锁定之前未死亡的患者将在对肿瘤状态进行充分评估的最后日期对其事件时间进行审查。

[2561] PFS定义为从淋巴细胞耗减的时刻到PD或因任何原因而死亡(以较早事件为准)的时间(以月为单位)。未经历PD或在数据切断或最终数据库锁定时未过期的患者将在对肿瘤状态进行充分评估的最后日期对其事件时间进行审查。

[2562] OS定义为从淋巴细胞耗减的时刻到因任何原因而死亡的时间(以月为单位)。到数据切断或最终数据库锁定时未过期的患者在其已知存活状态的最后日期对其事件时间进行审查。

[2563] 对DOR、PFS和OS进行正确的审查。Kaplan-Meier方法将用以汇总事件发生时间的疗效指标。肿瘤评估的基线数据是所有群组在淋巴细胞耗减之前的最后扫描。

[2564] 将针对由基线疾病特征限定的适用亚群群组(BRAF状态(仅群组1A)、HPV状态(仅群组2A)、鳞状或非鳞状肺病(仅群组3A和3B)和抗PD-L1状态)估算以上疗效参数。

[2565] 实例18:对患有实体肿瘤的患者的自体肿瘤浸润淋巴细胞的第2阶段多中心研究

[2566] 本实例中的研究为对患有选定实体肿瘤(转移性黑素瘤、头颈部鳞状细胞癌和非小细胞肺癌(NSCLC))的患者中的自体肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的第2阶段多中心的全球开放标签研究。本实例使用根据本文实例(包括实例10-17)制造以及贯穿本申请描述的TIL产物，所述TIL产物已冷冻保存并且具有22天的制造工艺。在患者已完成用环磷酰胺(60mg/kg×2 天)和氟达拉滨(25mg^2/m×5天)的非清髓性淋巴细胞耗减预备方案之后，给予TIL产物的单一输注。如下所述，存在4个患者群组：

[2567] • 群组1A(组合群组)：IIIC期或IV期不可切除或转移性黑素瘤患者，其未接受过用≤3种先前全身性疗法线的免疫疗法。这些患者将接受TIL产物与派立珠单抗的组合。

[2568] • 群组2A(组合群组):晚期、复发性或转移性头颈部鳞状细胞癌患者,其未接受过用≤3种先前全身性疗法线的免疫疗法。这些患者将接受TIL产物与派立珠单抗的组合。

[2569] • 群组3A(组合群组):局部晚期或转移性(III-IV期)NSCLC患者,其未接受过用≤3种先前全身性疗法线的免疫疗法。这些患者将接受TIL产物与派立珠单抗的组合。

[2570] • 群组3B(单一药剂群组):III-IV期NSCLC患者,其先前已接受过用检查点抑制剂(抗PD-1/抗PD-L1)的全身性疗法,作为≤3种先前全身性疗法线的一部分。这些患者将接受呈单一药剂形式的TIL产物。

[2571] 下文描述了已入选群组3B(免疫检查点抑制剂后,仅TIL)中的两个NSCLC患者,所述患者在第42天已完成其第一反应评估访视。

[2572] 患者A为诊断患有IVA期肺腺癌的63岁女性。她已接受过3种先前全身性疗法线,其包括派立珠单抗、卡铂/贝伐单抗和长春瑞滨。她对先前派立珠单抗疗法的最佳反应为进展性疾病;对卡铂/贝伐单抗的反应为部分反应,且她的长春瑞滨反应不可评估(她在反应评估之前已停药)。她进行了左肺下叶切除术以产生TIL且输注了3.75×10^{9}个TIL产物细胞。患者进行了她的第一反应评估(第42天)访视,此时的计算机化断层显像(CT)扫描展示与基线扫描相比,肿瘤负荷减少4%,其为根据RECIST 1.1的稳定疾病反应。

[2573] 患者B为诊断患有IVB期基底鳞状细胞癌的70岁女性。她已接受过3种先前疗法线,其包括卡铂/白蛋白结合型紫杉醇、纳武单抗和顺铂/吉西他滨。她对先前卡铂/白蛋白结合型紫杉醇的最佳反应不可评估(由于毒性而停止疗法):对纳武单抗的最佳反应为进展性疾病,且对顺铂/吉西他滨的最佳反应为部分反应。她进行了脾病灶切除术以产生TIL且输注了 39×10^{9}个TIL产物细胞。患者进行了她的第一反应评估(第42天)访视,此时的CT扫描展示与基线扫描相比,肿瘤负荷减少44%,其为根据RECIST 1.1的部分反应。

[2574] 提供上文所阐述的实例以向所属领域的普通技术人员提供如何制造和使用本发明的组合物、系统和方法的实施例的完整公开和描述,并且不旨在限制诸位发明人视为其发明的范围。对用于实施本发明的以上描述的模式进行的对于所属领域的技术人员来说是显而易见的修改旨在处于所附权利要求的范围内。本说明书中所提及的所有专利和出版物指示本发明所属领域的技术人员的技能水平。

[2575] 使用所有标题和章节命名仅仅是出于清楚和参考的目的,并且不应被视为以任何方式进行限制。举例来说,所属领域的技术人员将认识到根据本文所描述的本发明的精神和范围,适当地组合来自不同标题和章节的各个方面的有用性。

[2576] 本文中所引用的所有参考文献以全文引用的方式并入本文中并且出于所有目的,其程度如同每个单独的出版物或专利或专利申请具体地或单独地被指示出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[2577] 在不脱离本技术的精神和范围的情况下,可以对本申请进行许多修改和变化,这对所属领域技术人员来说是显而易见的。本文描述的具体实施例和实例仅通过举例的方式提供,并且本申请仅受所附权利要求的条款以及权利要求有权获得的等效物的全部范围的限制。

序列表

<110> 艾欧凡斯生物治疗公司(Iovance Biotherapeutics, Inc.)

<120> 抗PD-1抗体难治性NSCLC患者的治疗

<130> 116983-5060

<150> US 62/756,025

<151> 2018-11-05

<150> US 62/903,627

<151> 2019-09-20

<160> 176

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 莫罗单抗(Muromonab)重链

<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 莫罗单抗轻链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 重组人类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(Artificial Sequence)

<220>

<223> 阿地白介素(Aldesleukin)

<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 重组人类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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 重组人类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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 重组人类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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 重组人类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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人类4-1BB,肿瘤坏死因子受体超家族成员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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 鼠类4-1BB,肿瘤坏死因子受体超家族成员9(小家鼠(Mus musculus))
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 乌托米单抗(utomilumab)的重链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 乌托米单抗的轻链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 乌托米单抗的重链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 乌托米单抗的轻链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 乌托米单抗的重链CDR1
<400> 15
Ser Thr Tyr Trp Ile Ser
1 5

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 乌托米单抗的重链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 乌托米单抗的重链CDR3
<400> 17

Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr
1 5
<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 乌托米单抗的轻链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 乌托米单抗的轻链CDR2
<400> 19
Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser
1 5
<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 乌托米单抗的轻链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 乌瑞鲁单抗(urelumab)的重链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 乌瑞鲁单抗的轻链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 乌瑞鲁单抗的可变重链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 乌瑞鲁单抗的可变轻链

<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(Artificial Sequence)

<220>

<223> 乌瑞鲁单抗的重链CDR1

<400> 25

Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 乌瑞鲁单抗的重链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(Artificial Sequence)

<220>

<223> 乌瑞鲁单抗的重链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 乌瑞鲁单抗的轻链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 乌瑞鲁单抗的轻链CDR2
<400> 29
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5
<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 乌瑞鲁单抗的轻链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接子
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接子
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接子
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接子
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接子

<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接子
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接子
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接子
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接子
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接子
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接子
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接子
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接子
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 4-1BBL可溶性域
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 4B4-1-1版本1的可变重链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 4B4-1-1版本1的可变轻链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 4B4-1-1版本2的可变重链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 4B4-1-1版本2的可变轻链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> H39E3-2的可变重链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> H39E3-2的可变轻链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人类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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 鼠类OX40(小家鼠)
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 他沃立珠单抗(tavolixizumab)的重链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 他沃立珠单抗的轻链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 他沃立珠单抗的重链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 他沃立珠单抗的轻链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 他沃立珠单抗的重链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 他沃立珠单抗的重链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 他沃立珠单抗的重链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(Artificial Sequence)

<220>
<223> 他沃立珠单抗的轻链CDR1
<400> 63
Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5
<210> 64
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 他沃立珠单抗的轻链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 他沃立珠单抗的轻链CDR3
<400> 65
Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
1 5
<210> 66
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 11D4的重链
<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 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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 11D4的轻链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 11D4的重链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 11D4的轻链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 11D4的重链CDR1
<400> 70

Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 71
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 11D4的重链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 11D4的重链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 11D4的轻链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 11D4的轻链CDR2
<400> 74
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5
<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 11D4的轻链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 18D8的重链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 18D8的轻链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 18D8的重链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 18D8的轻链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 18D8的重链CDR1
<400> 80
Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 81
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 18D8的重链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 18D8的重链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 18D8的轻链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 18D8的轻链CDR2
<400> 84
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 85
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 18D8的轻链CDR3
<400> 85
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
1 5

<210> 86
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Hu119-122的重链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> Hu119-122的轻链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>

<223> Hu119-122的重链CDR1
<400> 88
Ser His Asp Met Ser
1 5
<210> 89
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Hu119-122的重链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> Hu119-122的重链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> Hu119-122的轻链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> Hu119-122的轻链CDR2
<400> 92

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Hu119-122的轻链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> Hu106-222的重链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>

<223> Hu106-222的轻链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> Hu106-222的重链CDR1
<400> 96
Asp Tyr Ser Met His
1 5
<210> 97
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Hu106-222的重链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(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hu106-222的重链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> Hu106-222的轻链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> Hu106-222的轻链CDR2
<400> 100
Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr
1 5
<210> 101
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Hu106-222的轻链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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 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(Artificial Sequence)
<220>
<223> OX40L可溶性域
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> OX40L可溶性域(替代域)
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 008的可变重链

<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(Artificial Sequence)

<220>

<223> 008的可变轻链

<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 011的可变重链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 011的可变轻链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 021的可变重链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 021的可变轻链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 023的可变重链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 023的可变轻链
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 重链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 轻链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 重链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 轻链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人类化抗体的重链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人类化抗体的重链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人类化抗体的轻链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人类化抗体的轻链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>

<223> 人类化抗体的重链可变区

<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(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人类化抗体的重链可变区

<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人类化抗体的轻链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人类化抗体的轻链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 重链可变区
<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(Artificial Sequence)
<220>
<223> 轻链可变区
<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
<211> 440
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 纳武单抗(nivolumab)重链
<400> 127

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> 128

<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 纳武单抗轻链
<400> 128

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> 129
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 纳武单抗可变重链
<400> 129
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> 130
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 纳武单抗可变轻链
<400> 130
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> 131

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 纳武单抗重链CDR1
<400> 131
Asn Ser Gly Met His
1 5
<210> 132
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 纳武单抗重链CDR2
<400> 132
Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 133
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 纳武单抗重链CDR3
<400> 133
Asn Asp Asp Tyr
1
<210> 134
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 纳武单抗轻链CDR1
<400> 134
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10
<210> 135
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 纳武单抗轻链CDR2
<400> 135
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5
<210> 136
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 纳武单抗轻链CDR3
<400> 136
Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg Thr
1 5
<210> 137
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 派立珠单抗(pembrolizumab)重链
<400> 137
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> 138
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 派立珠单抗轻链
<400> 138

```
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> 139
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 派立珠单抗可变重链
<400> 139

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> 140
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 派立珠单抗可变轻链
<400> 140

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> 141
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 派立珠单抗重链CDR1
<400> 141
Asn Tyr Tyr Met Tyr
1 5
<210> 142
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 派立珠单抗重链CDR2
<400> 142
Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
<210> 143
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 派立珠单抗重链CDR3
<400> 143
Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 144
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 派立珠单抗轻链CDR1
<400> 144
Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His
1 5 10 15
<210> 145
<211> 7

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 派立珠单抗轻链CDR2
<400> 145
Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
1 5
<210> 146
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 派立珠单抗轻链CDR3
<400> 146
Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr
1 5
<210> 147
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 度伐单抗(durvalumab)重链
<400> 147
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> 148
<211> 265
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 度伐单抗轻链
<400> 148

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> 149
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 度伐单抗可变重链
<400> 149
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> 150
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 度伐单抗可变轻链
<400> 150
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> 151
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 度伐单抗重链CDR1
<400> 151
Arg Tyr Trp Met Ser
1 5

<210> 152
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 度伐单抗重链CDR2
<400> 152
Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 153
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 度伐单抗重链CDR3
<400> 153
Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 154

<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 度伐单抗轻链CDR1
<400> 154
Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10
<210> 155
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 度伐单抗轻链CDR2
<400> 155
Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5
<210> 156
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 度伐单抗轻链CDR3
<400> 156
Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro Trp Thr
1 5
<210> 157
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 阿维鲁单抗(avelumab)重链
<400> 157
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> 158
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 阿维鲁单抗轻链
<400> 158

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> 159
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 阿维鲁单抗可变重链
<400> 159
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> 160
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 阿维鲁单抗可变轻链
<400> 160

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> 161
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 阿维鲁单抗重链CDR1
<400> 161
Ser Tyr Ile Met Met
1 5

<210> 162
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 阿维鲁单抗重链CDR2
<400> 162
Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 163
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 阿维鲁单抗重链CDR3

<400> 163
Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr
1 5 10
<210> 164
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 阿维鲁单抗轻链CDR1
<400> 164
Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10
<210> 165
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 阿维鲁单抗轻链CDR2
<400> 165
Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser
1 5
<210> 166
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 阿维鲁单抗轻链CDR3
<400> 166
Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Arg Val
1 5 10
<210> 167
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 阿特珠单抗(atezolizumab)重链
<400> 167
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> 168
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 阿特珠单抗轻链
<400> 168

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> 169
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 阿特珠单抗可变重链
<400> 169
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> 170
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 阿特珠单抗可变轻链
<400> 170
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> 171
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 阿特珠单抗重链CDR1
<400> 171
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
1 5 10
<210> 172
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 阿特珠单抗重链CDR2
<400> 172
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15
Lys Gly
<210> 173
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 阿特珠单抗重链CDR3
<400> 173
Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5
<210> 174
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 阿特珠单抗轻链CDR1
<400> 174
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10
<210> 175
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 阿特珠单抗轻链CDR2
<400> 175
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5
<210> 176
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 阿特珠单抗轻链CDR3
<400> 176
Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr
1 5

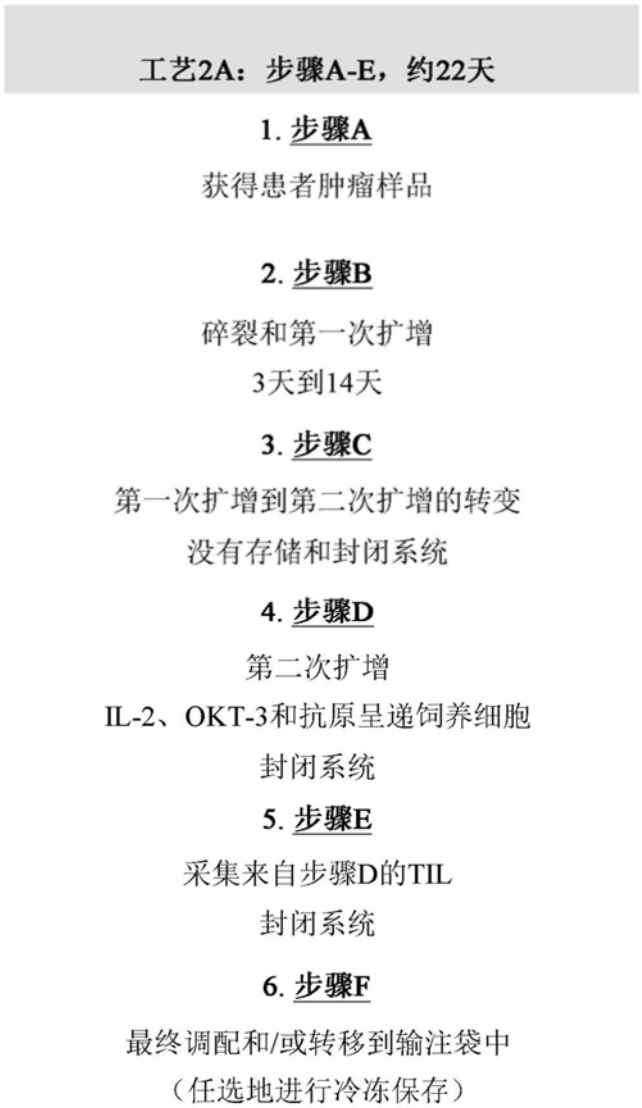

工艺2A：步骤A-E，约22天
1. 步骤A
获得患者肿瘤样品
2. 步骤B
碎裂和第一次扩增
3天到14天
3. 步骤C
第一次扩增到第二次扩增的转变
没有存储和封闭系统
4. 步骤D
第二次扩增
IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞
封闭系统
5. 步骤E
采集来自步骤D的TIL
封闭系统
6. 步骤F
最终调配和/或转移到输注袋中
（任选地进行冷冻保存）

图1

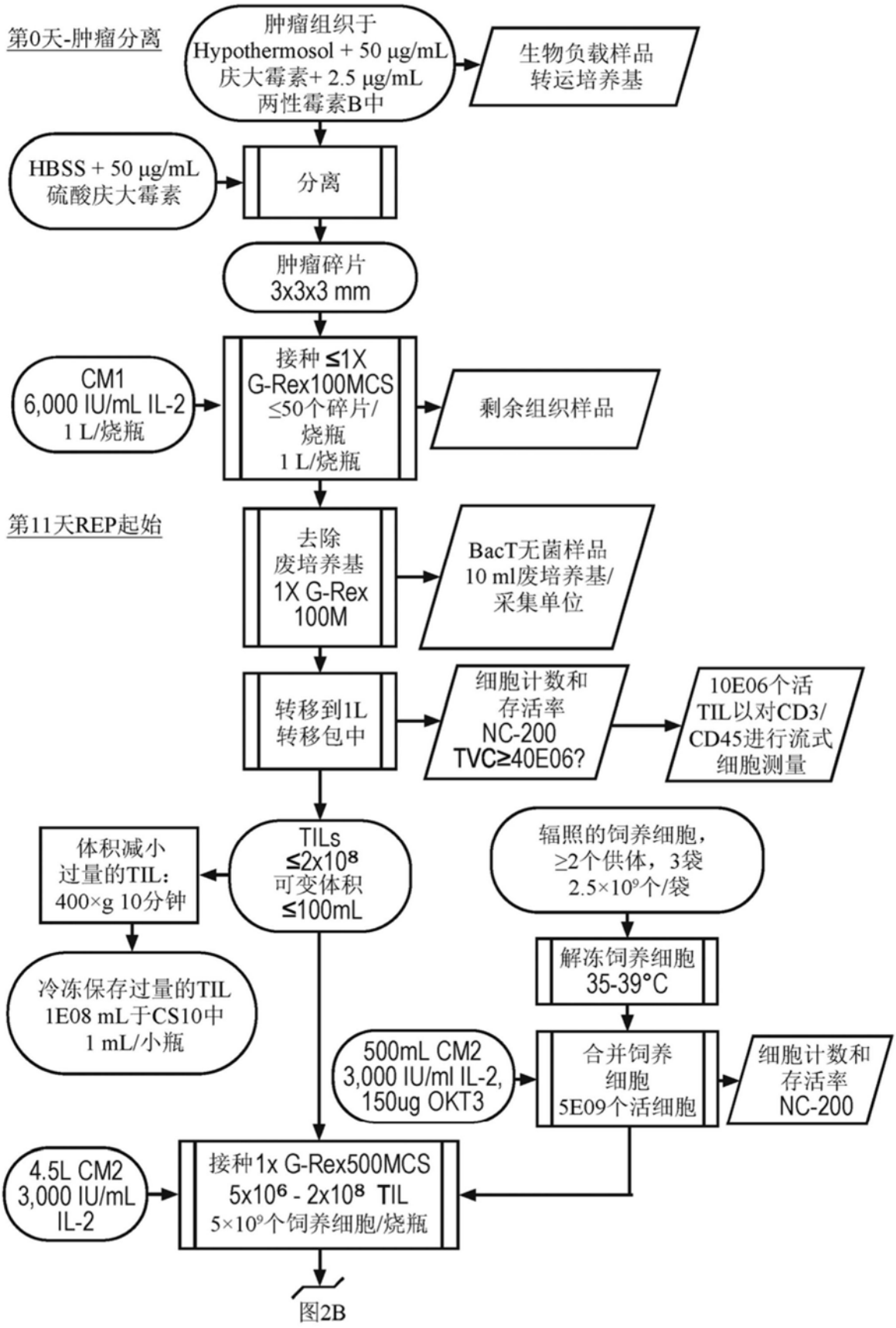

第0天-肿瘤分离
肿瘤组织于
Hypothermosol + 50 μg/mL
庆大霉素+ 2.5 μg/mL
两性霉素B中
生物负载样品
转运培养基
HBSS + 50 μg/mL
硫酸庆大霉素
分离
肿瘤碎片
3x3x3 mm
CM1
6,000 IU/mL IL-2
1 L/烧瓶
接种 ≤1X
G-Rex100MCS
≤50个碎片/
烧瓶
1 L/烧瓶
剩余组织样品
第11天REP起始
去除
废培养基
1X G-Rex
100M
BacT无菌样品
10 ml废培养基/
采集单位
转移到1L
转移包中
细胞计数和
存活率
NC-200
TVC≥40E06?
10E06个活
TIL以对CD3/
CD45进行流式
细胞测量
体积减小
过量的TIL:
400×g 10分钟
TILs
≤2x10⁸
可变体积
≤100mL
辐照的饲养细胞，
≥2个供体，3袋
2.5×10⁹个/袋
冷冻保存过量的TIL
1E08 mL于CS10中
1 mL/小瓶
解冻饲养细胞
35-39°C
500mL CM2
3,000 IU/ml IL-2,
150ug OKT3
合并饲养
细胞
5E09个活细胞
细胞计数和
存活率
NC-200
4.5L CM2
3,000 IU/mL
IL-2
接种1x G-Rex500MCS
5x10⁶ - 2x10⁸ TIL
5×10⁹个饲养细胞/烧瓶
图2B

图2A

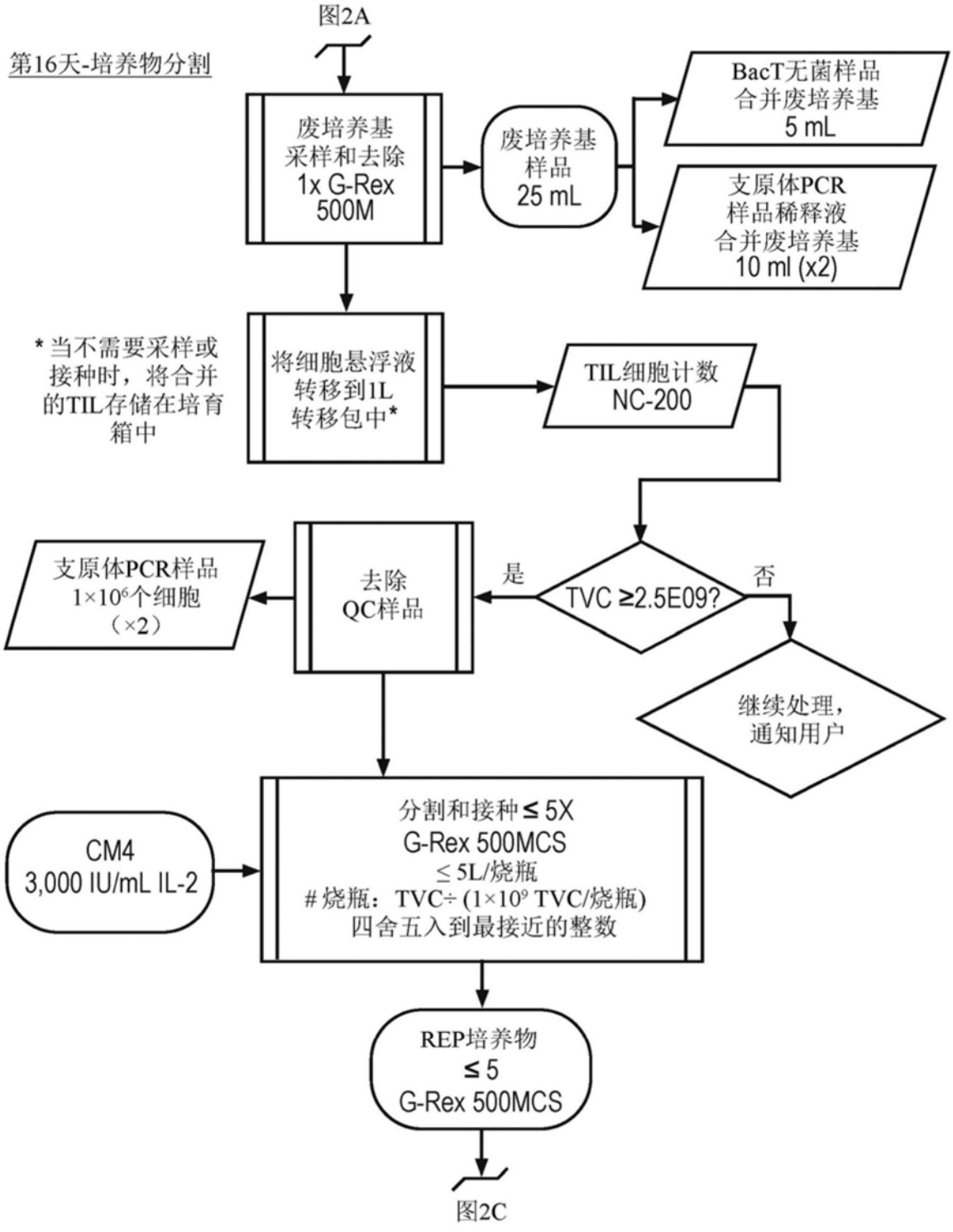

图2A
第16天-培养物分割
废培养基
采样和去除
1x G-Rex
500M
废培养基
样品
25 mL
BacT无菌样品
合并废培养基
5 mL
支原体PCR
样品稀释液
合并废培养基
10 ml (x2)
* 当不需要采样或接种时，将合并的TIL存储在培育箱中
将细胞悬浮液
转移到1L
转移包中*
TIL细胞计数
NC-200
支原体PCR样品
1×10⁶个细胞
（×2）
去除
QC样品
是
TVC ≥2.5E09?
否
继续处理，
通知用户
CM4
3,000 IU/mL IL-2
分割和接种≤ 5X
G-Rex 500MCS
≤ 5L/烧瓶
烧瓶：TVC÷ (1×10⁹ TVC/烧瓶)
四舍五入到最接近的整数
REP培养物
≤ 5
G-Rex 500MCS
图2C

图2B

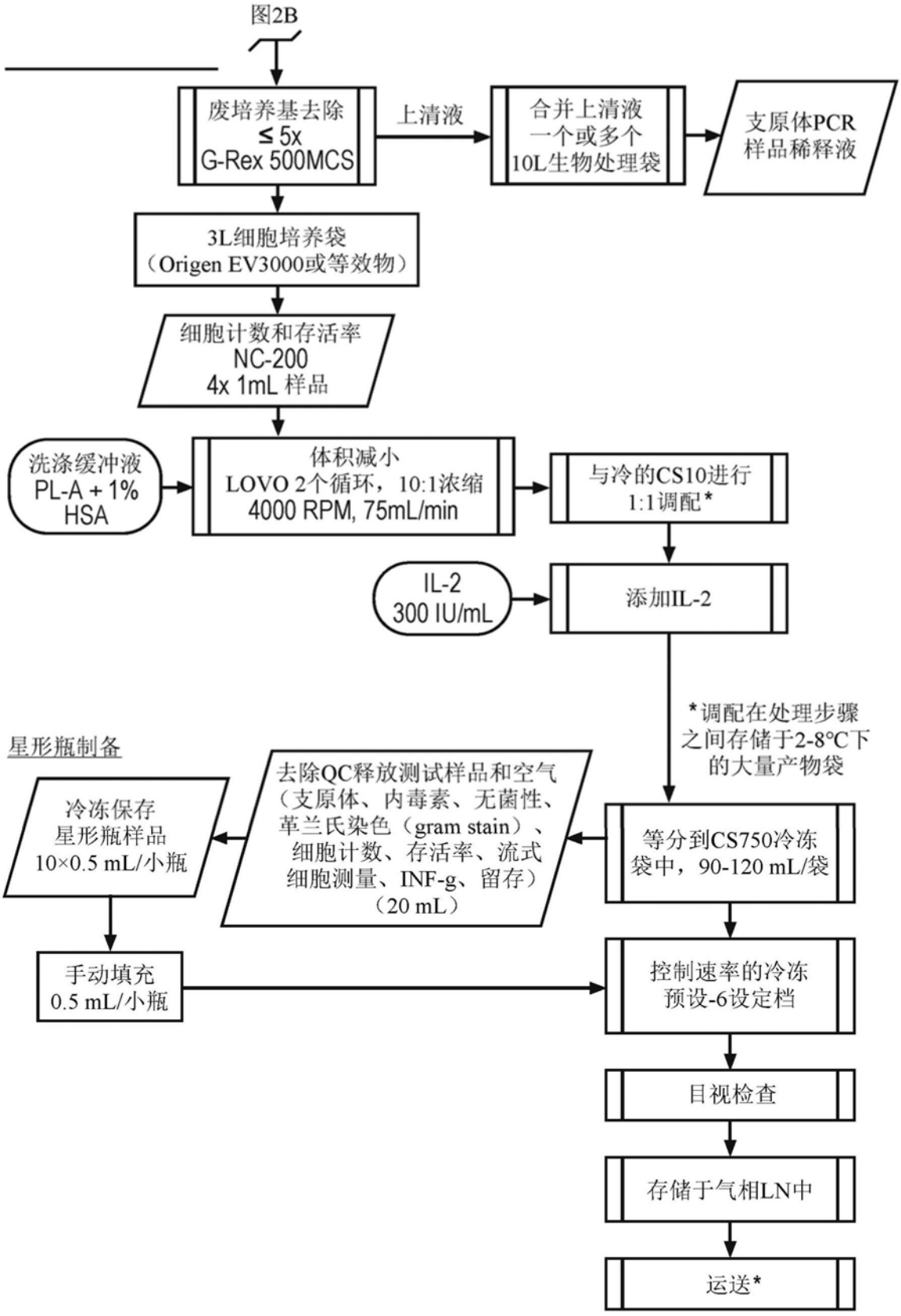

图2B
废培养基去除
≤ 5x
G-Rex 500MCS
上清液
合并上清液
一个或多个
10L生物处理袋
支原体PCR
样品稀释液
3L细胞培养袋
（Origen EV3000或等效物）
细胞计数和存活率
NC-200
4x 1mL 样品
洗涤缓冲液
PL-A + 1%
HSA
体积减小
LOVO 2个循环，10:1浓缩
4000 RPM, 75mL/min
与冷的CS10进行
1:1调配*
IL-2
300 IU/mL
添加IL-2
*调配在处理步骤
之间存储于2-8°C下
的大量产物袋
星形瓶制备
冷冻保存
星形瓶样品
10×0.5 mL/小瓶
去除QC释放测试样品和空气
（支原体、内毒素、无菌性、
革兰氏染色（gram stain）、
细胞计数、存活率、流式
细胞测量、INF-g、留存）
（20 mL）
等分到CS750冷冻
袋中，90-120 mL/袋
手动填充
0.5 mL/小瓶
控制速率的冷冻
预设-6设定档
目视检查
存储于气相LN中
运送*

图2C

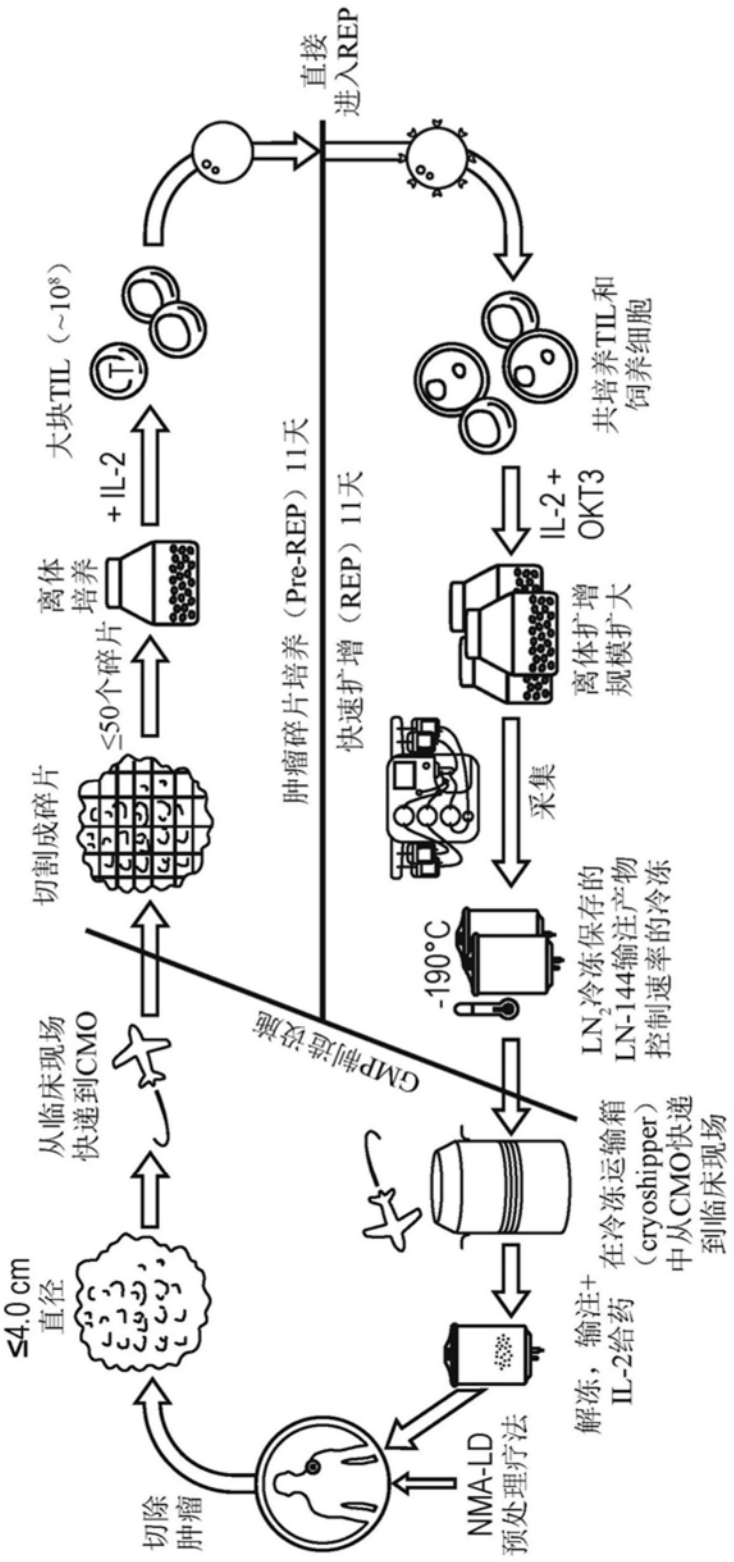

≤4.0 cm
直径
切除
肿瘤
从临床现场
快速到CMO
切割成碎片
≤50个碎片
离体
培养
+ IL-2
大块TIL（~10⁸）
肿瘤碎片培养（Pre-REP）11天
快速扩增（REP）11天
直接
进入REP
共培养TIL和
饲养细胞
IL-2 +
OKT3
离体扩增
规模扩大
采集
-190°C
LN2冷冻保存的
LN-144输注产物
控制速率的冷冻
GMP制造设施
在冷冻运输箱
（cryoshipper）
中从CMO快速
到临床现场
解冻，输注+
IL-2给药
NMA-LD
预处理疗法

图3

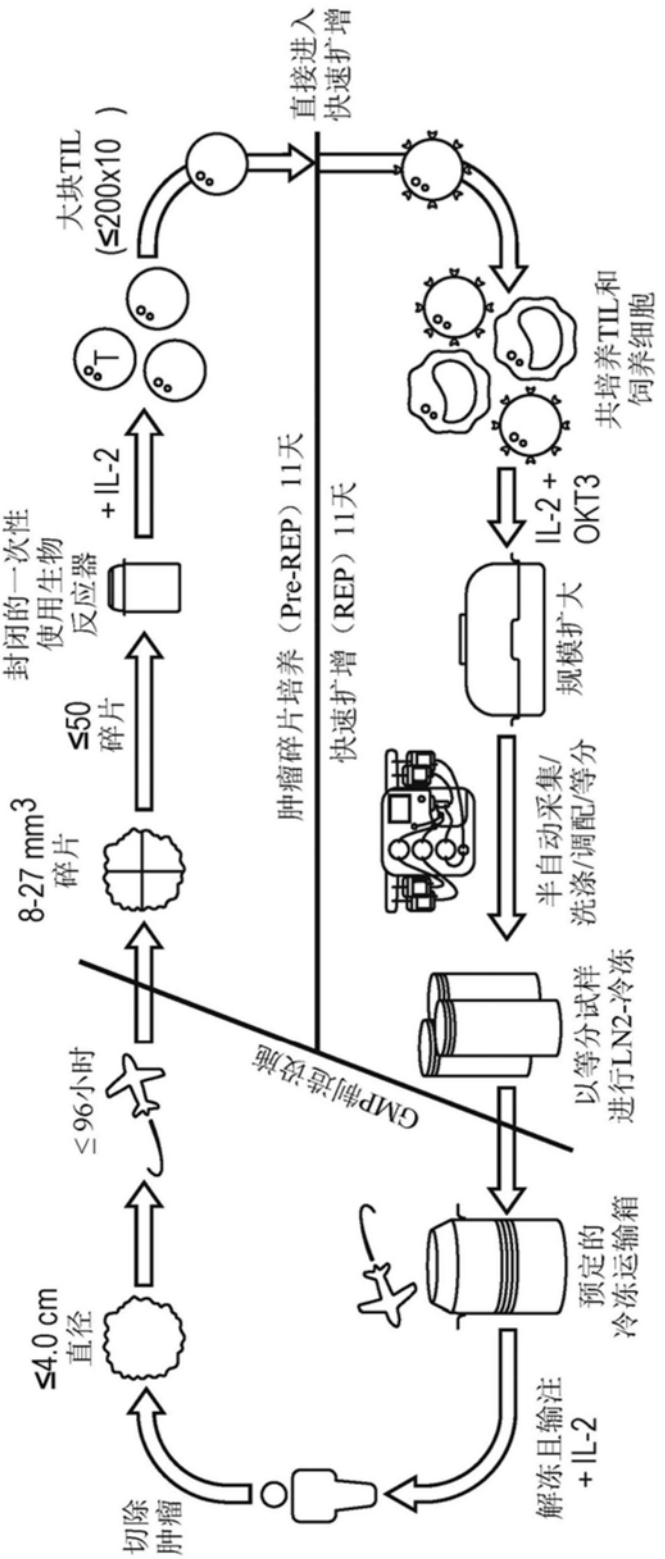

切除肿瘤
≤4.0 cm 直径
解冻且输注 + IL-2
≤96小时
预定的冷冻运输箱
GMP制造设施
以等分试样进行LN2-冷冻
半自动采集/洗涤/调配/等分
8-27 mm3 碎片
≤50 碎片
肿瘤碎片培养（Pre-REP）11天
快速扩增（REP）11天
封闭的一次性使用生物反应器
+ IL-2
规模扩大
IL-2 + OKT3
大块TIL (≤200x10)
直接进入快速扩增
共培养TIL和饲养细胞

图4

工艺1C：步骤A-E，43-55天	工艺2A：步骤A-E，约22天
1. 步骤A 获得患者肿瘤样品	1. 步骤A 获得患者肿瘤样品
2. 步骤B 碎裂和第一次扩增 11天到21天	2. 步骤B 碎裂和第一次扩增 3天到14天
3. 步骤C 第一次扩增到第二次扩增的转变 任选的存储直到进行选择	3. 步骤C 第一次扩增到第二次扩增的转变 没有存储和封闭系统
4. 步骤D 第二次扩增 IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞 任选地重复一次或多次	4. 步骤D 第二次扩增 IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞 封闭系统
5. 步骤E 采集来自步骤D的TIL	5. 步骤E 采集来自步骤D的TIL 封闭系统
6. 步骤F 最终调配和/或转移到输注袋中	6. 步骤F 最终调配和/或转移到输注袋中 （任选地进行冷冻保存）

图5

工艺步骤	工艺1C实施例	工艺2A实施例	优势
Pre-REP	• 4个碎片/10个GREX-10烧瓶 • 11-21天持续时间	• 40个碎片/1个GREX-100M烧瓶 • 11天持续时间	• 每个烧瓶的肿瘤碎片增加 • 缩短培养时间 • 减少步骤个数 • 适用于封闭系统
Pre-REP到REP的转变	• 冷冻Pre-REP TIL直到表型选择，接着解冻以进行到REP（~第30天） • REP需要> 40 $\times 10^6$个TIL	• 在第11天，Pre-REP TIL直接进入REP • REP需要25-200 $\times 10^6$个TIL	• 缩短pre-REP到REP的过程 • 减少步骤个数 • 消除表型选择 • 适用于封闭系统
REP	• 在REP第0天，6个GREX-100M烧瓶 • 在REP第0天，5 $\times 10^6$个TIL和5 $\times 10^8$个PBMC饲养细胞 • 在REP第7天，分割到18-36个烧瓶中 • 14天持续时间	• 在第11天，1个GREX-500M烧瓶 • 在第11天，25-200 $\times 10^6$个TIL和5 $\times 10^9$个PBMC饲养细胞 • 在第16天，分割到≤6个GREX-500M烧瓶中 • 11天持续时间	• 减少步骤个数 • 缩短REP持续时间 • TIL在烧瓶之间的封闭系统转移 • 封闭系统培养基更换
采集	• 通过离心采集TIL	• 通过LOVO自动化细胞洗涤系统采集TIL'	• 减少步骤个数 • 自动化细胞洗涤 • 封闭系统 • 在洗涤期间减少产物损失
最终调配	• 新鲜产物于Hypothermosol中 • 单输注袋 • 有限的运送稳定性	• 含冷冻保存产物的plasmalyte-A + 1% HAS和CS10存储于LN_2中 • 多个等分试样 • 长时间运送稳定性	• 运送灵活性 • 灵活的患者安排 • 更及时的释放测试
估算的总体工艺时间	• 43-55天	• 22天	• 对患者更快的周转

图6

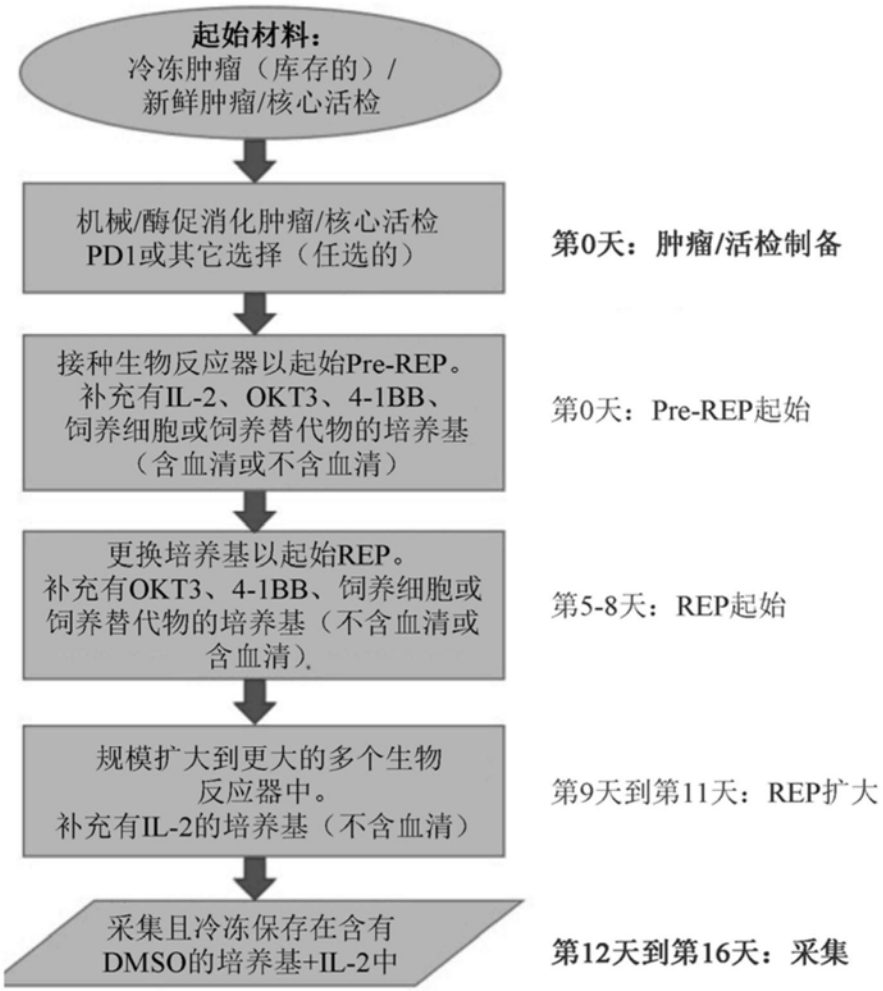

起始材料：
冷冻肿瘤（库存的）/
新鲜肿瘤/核心活检
机械/酶促消化肿瘤/核心活检
PD1或其它选择（任选的）
第0天：肿瘤/活检制备
接种生物反应器以起始Pre-REP。
补充有IL-2、OKT3、4-1BB、
饲养细胞或饲养替代物的培养基
（含血清或不含血清）
第0天：Pre-REP起始
更换培养基以起始REP。
补充有OKT3、4-1BB、饲养细胞或
饲养替代物的培养基（不含血清或
含血清）
第5-8天：REP起始
规模扩大到更大的多个生物
反应器中。
补充有IL-2的培养基（不含血清）
第9天到第11天：REP扩大
采集且冷冻保存在含有
DMSO的培养基+IL-2中
第12天到第16天：采集

图7

工艺2A：步骤A-E，约22天	工艺GEN 3：步骤A-E，约14-18天
步骤A 获得患者肿瘤样品 （在步骤B之前，可以任选地进行冷冻）	**步骤A** 获得患者肿瘤样品 （在步骤B之前，可以任选地进行冷冻）
步骤B 第一次扩增 （进行物理碎裂，达到每个容器至少40个碎片，用包含IL-2的培养基生长约3天到14天）	**步骤B** 引发第一次扩增 （进行物理碎裂，每个容器最多60个碎片，用包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞的培养基生长约1天到7天）
步骤C 第一次扩增至第二次扩增的转变 （任选地在步骤B第11天，步骤B TIL直接进入步骤D）	**步骤C** 引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变 （在第7天，步骤B TIL直接进入步骤D）
步骤D 第二次扩增 （在封闭容器中的包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞的生长培养基中生长TIL）	**步骤D** 快速第二次扩增 （在包含IL-2、OKT-3和2×抗原呈递饲养细胞的生长培养基中生长TIL；第10-11天规模扩大且添加额外IL-2）
步骤E 采集来自步骤D的TIL （通过封闭系统采集TIL）	**步骤E** 采集来自步骤D的TIL
步骤F 最终调配和/或转移到输注袋中 （任选地进行冷冻保存）	**步骤F** 最终调配和/或转移到输注袋中 （任选地进行冷冻保存）

图8A

工艺GEN 3：步骤A-E，约14-18天

步骤A
获得患者肿瘤样品
（在步骤B之前，可以任选地进行冷冻）

步骤B
引发第一次扩增
（进行物理碎裂，每个容器最多60个碎片，
用包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞的
培养基生长约1天到7天）

步骤C
引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变
（在第7天，步骤B TIL直接进入步骤D）

步骤D
快速第二次扩增
（在包含IL-2、OKT-3和2×抗原呈递饲养
细胞的生长培养基中生长TIL；第10-11天规模扩大
且添加额外IL-2）

步骤E
采集来自步骤D的TIL

步骤F
最终调配和/或转移到输注袋中
（任选地进行冷冻保存）

图8B

实施例GEN 3.0： 步骤A-E，约14-18天	实施例GEN 3.1对照： 步骤A-E，约14-18天	实施例GEN 3.1测试/F： 步骤A-E，约14-18天
步骤A 获得患者肿瘤样品 （在步骤B之前，可以任选地进行冷冻）	**步骤A** 获得患者肿瘤样品 （在步骤B之前，可以任选地进行冷冻）	**步骤A** 获得患者肿瘤样品 （在步骤B之前，可以任选地进行冷冻）
步骤B 引发第一次扩增 （进行物理碎裂，每个容器最多60个碎片，用包含IL-2的培养基生长约1天到7天）	**步骤B** 引发第一次扩增 （进行物理碎裂，每个容器最多60个碎片，用包含IL-2和OKT-3的培养基生长约1天到7/8天）	**步骤B** 引发第一次扩增 （进行物理碎裂，每个容器最多60个碎片，用包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞的培养基生长约1天到7/8天）
步骤C 引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变 （在第7/8天，步骤B TIL直接进入步骤D）	**步骤C** 引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变 （在第7/8天，步骤B TIL直接进入步骤D）	**步骤C** 引发第一次扩增到快速第二次扩增的转变 （在第7/8天，步骤B TIL直接进入步骤D）
步骤D 快速第二次扩增 （在包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞的生长培养基中生长TIL；第10-11天规模扩大且添加额外IL-2）	**步骤D** 快速第二次扩增 （在包含IL-2、OKT-3和2×抗原呈递饲养细胞的生长培养基中生长TIL；第10-11天规模扩大且添加额外IL-2）	**步骤D** 快速第二次扩增 （在包含IL-2、OKT-3和2×抗原呈递饲养细胞的生长培养基中生长TIL；第10-11天规模扩大且添加额外IL-2）
步骤E 采集来自步骤D的TIL	**步骤E** 采集来自步骤D的TIL	**步骤E** 采集来自步骤D的TIL
步骤F 最终调配和/或转移到输注袋中 （任选地进行冷冻保存）	**步骤F** 最终调配和/或转移到输注袋中 （任选地进行冷冻保存）	**步骤F** 最终调配和/或转移到输注袋中 （任选地进行冷冻保存）

图8C

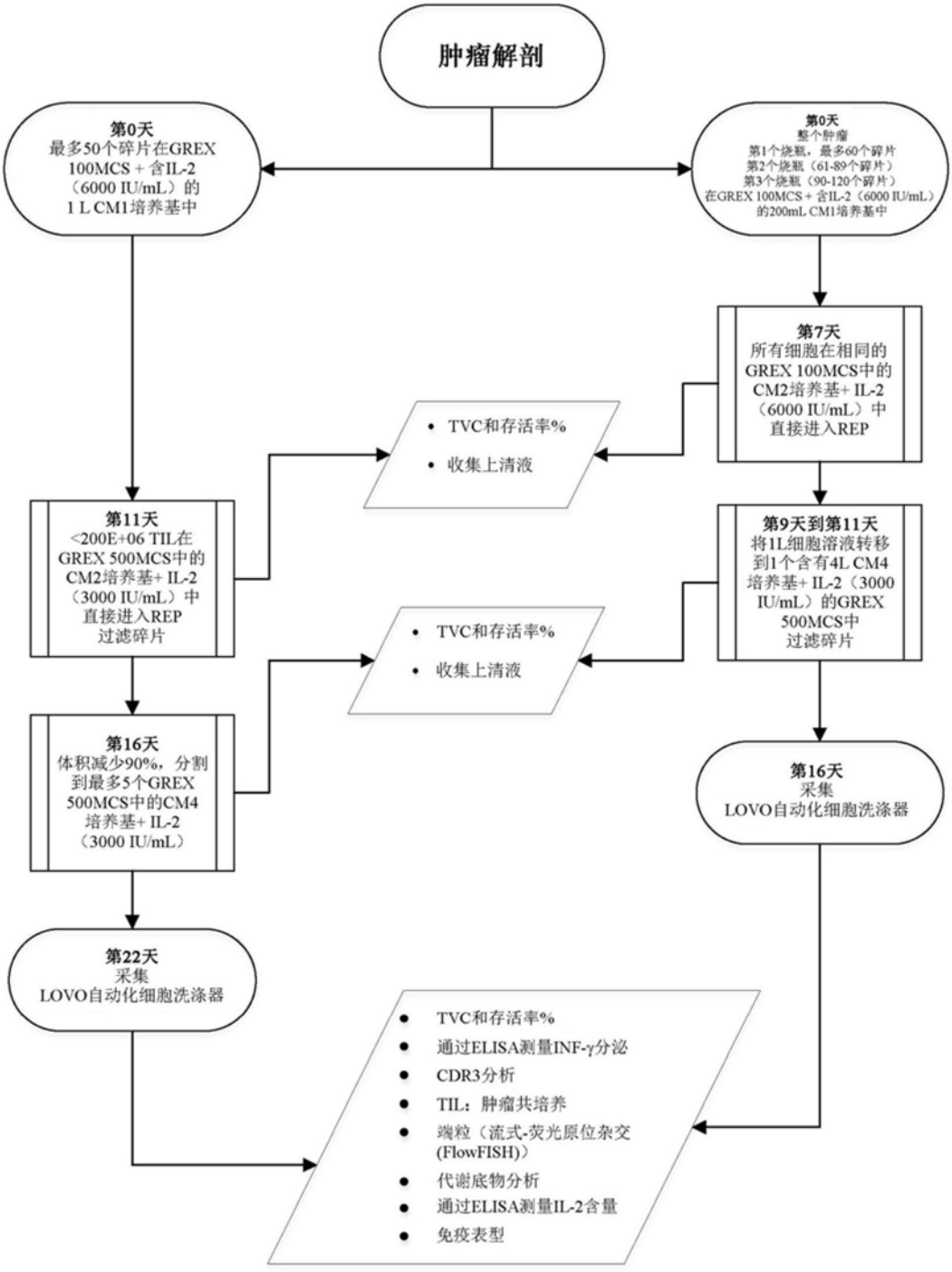
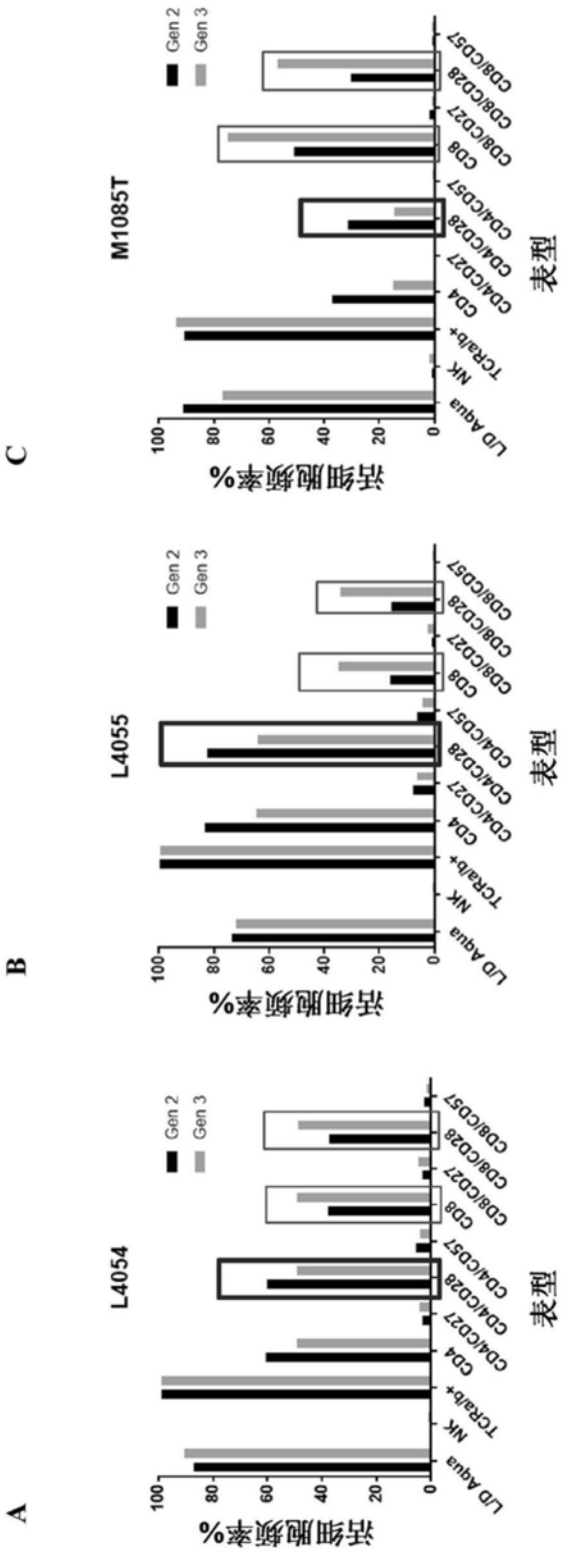
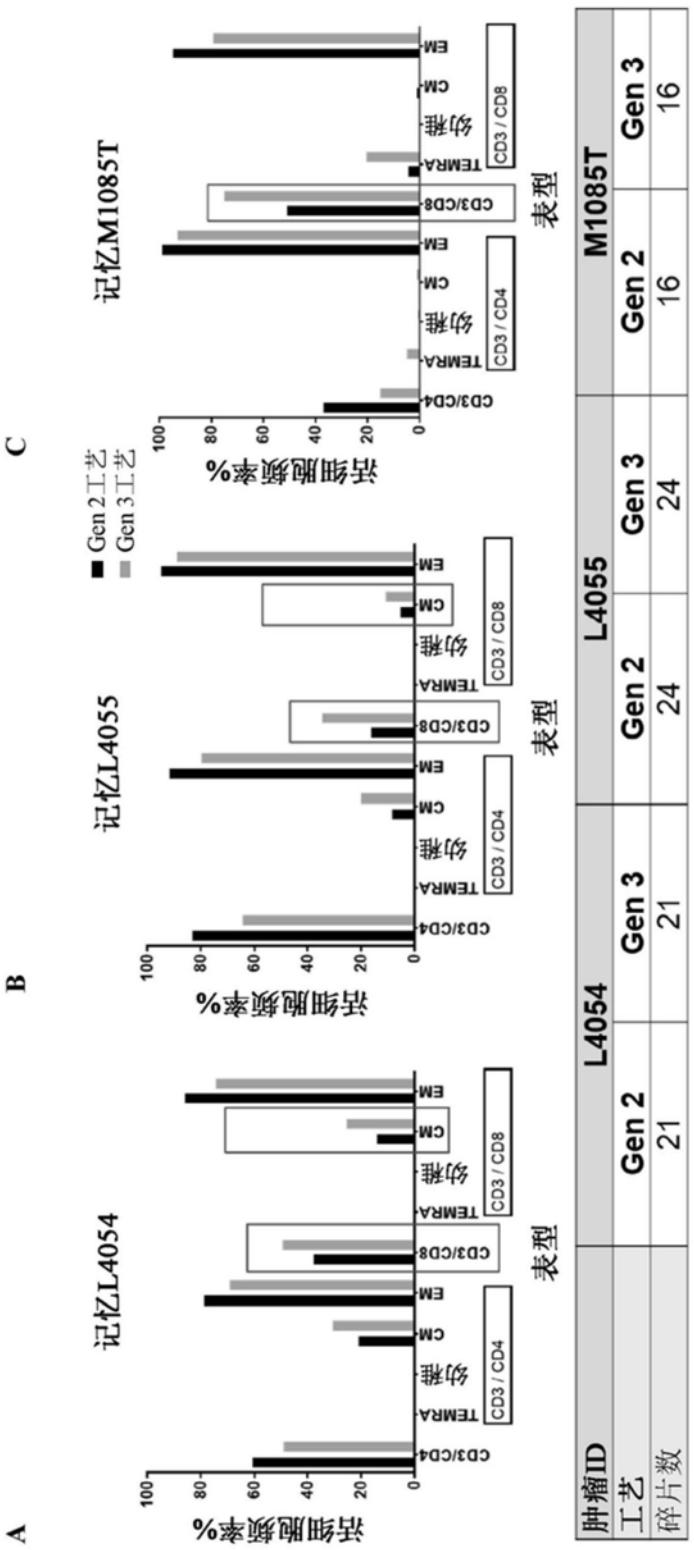

肿瘤解剖
第0天
最多50个碎片在GREX 100MCS + 含IL-2（6000 IU/mL）的1 L CM1培养基中
第0天
整个肿瘤
第1个烧瓶，最多60个碎片
第2个烧瓶（61-89个碎片）
第3个烧瓶（90-120个碎片）
在GREX 100MCS + 含IL-2（6000 IU/mL）的200mL CM1培养基中
第7天
所有细胞在相同的GREX 100MCS中的CM2培养基+ IL-2（6000 IU/mL）中直接进入REP
• TVC和存活率%
• 收集上清液
第11天
<200E+06 TIL在GREX 500MCS中的CM2培养基+ IL-2（3000 IU/mL）中直接进入REP过滤碎片
第9天到第11天
将1L细胞溶液转移到1个含有4L CM4培养基+ IL-2（3000 IU/mL）的GREX 500MCS中过滤碎片
• TVC和存活率%
• 收集上清液
第16天
体积减少90%，分割到最多5个GREX 500MCS中的CM4培养基+ IL-2（3000 IU/mL）
第16天
采集
LOVO自动化细胞洗涤器
第22天
采集
LOVO自动化细胞洗涤器
• TVC和存活率%
• 通过ELISA测量INF-γ分泌
• CDR3分析
• TIL：肿瘤共培养
• 端粒（流式-荧光原位杂交(FlowFISH)）
• 代谢底物分析
• 通过ELISA测量IL-2含量
• 免疫表型

图9



肿瘤ID	L4054		L4055		M1085T	
工艺	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
碎片数	21	21	24	24	16	16

图10



肿瘤ID	L4054		L4055		M1085T	
工艺	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
碎片数	21	21	24	24	16	16

图11

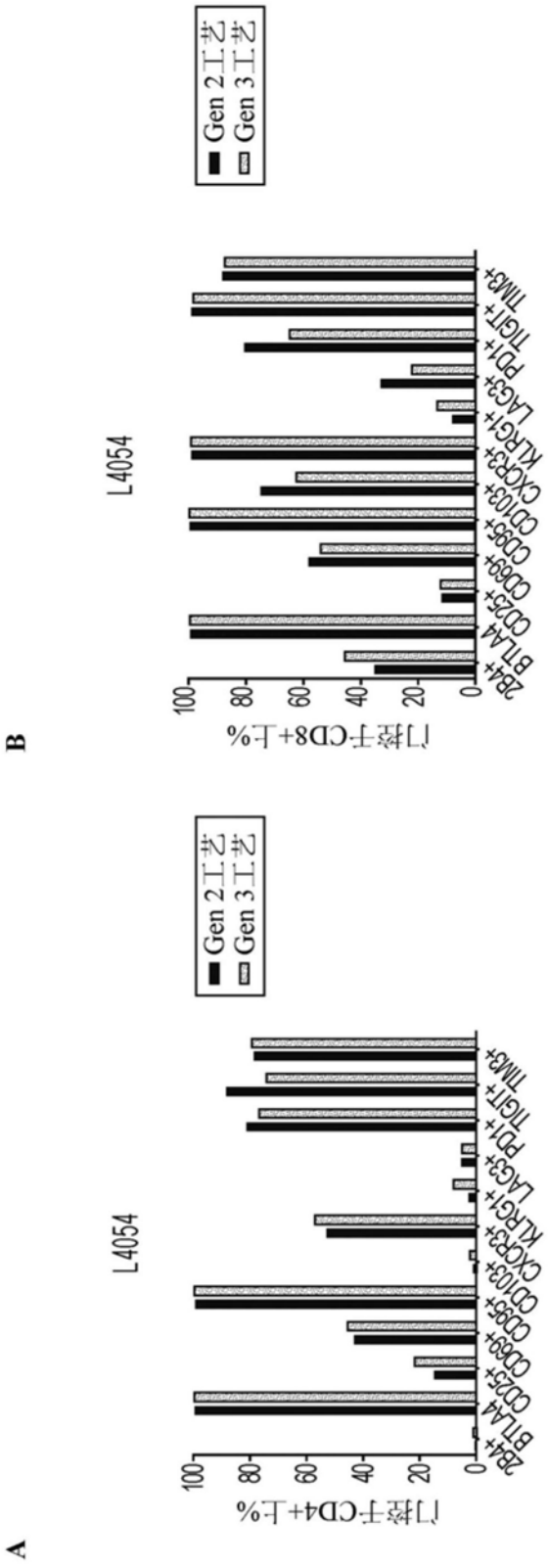

A
B
L4054
门控于CD4+上%
门控于CD8+上%
Gen 2工艺
Gen 3工艺
2B4+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
CXCR3+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+
0
20
40
60
80
100

图12

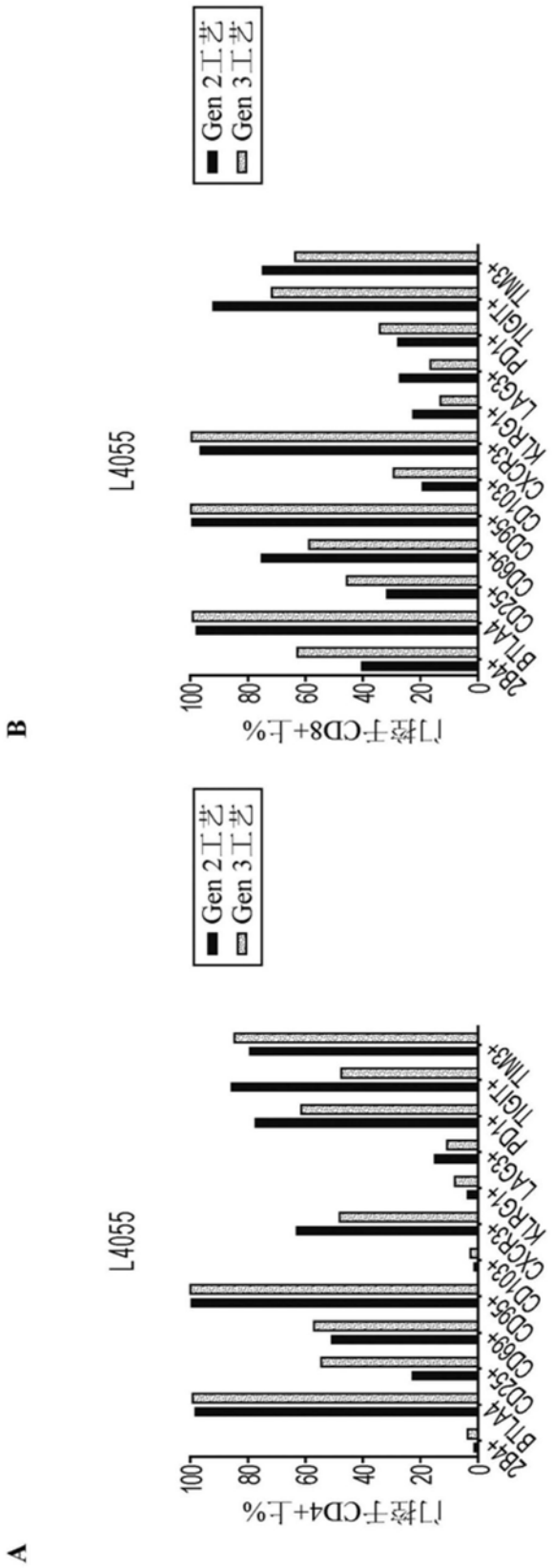

A
L4055
门控于CD4+上%
100
80
60
40
20
0
2B4+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD96+
CD103+
CXCR3+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+
Gen 2工艺
Gen 3工艺
B
L4055
门控于CD8+上%
100
80
60
40
20
0
2B4+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD96+
CD103+
CXCR3+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+
Gen 2工艺
Gen 3工艺

图13

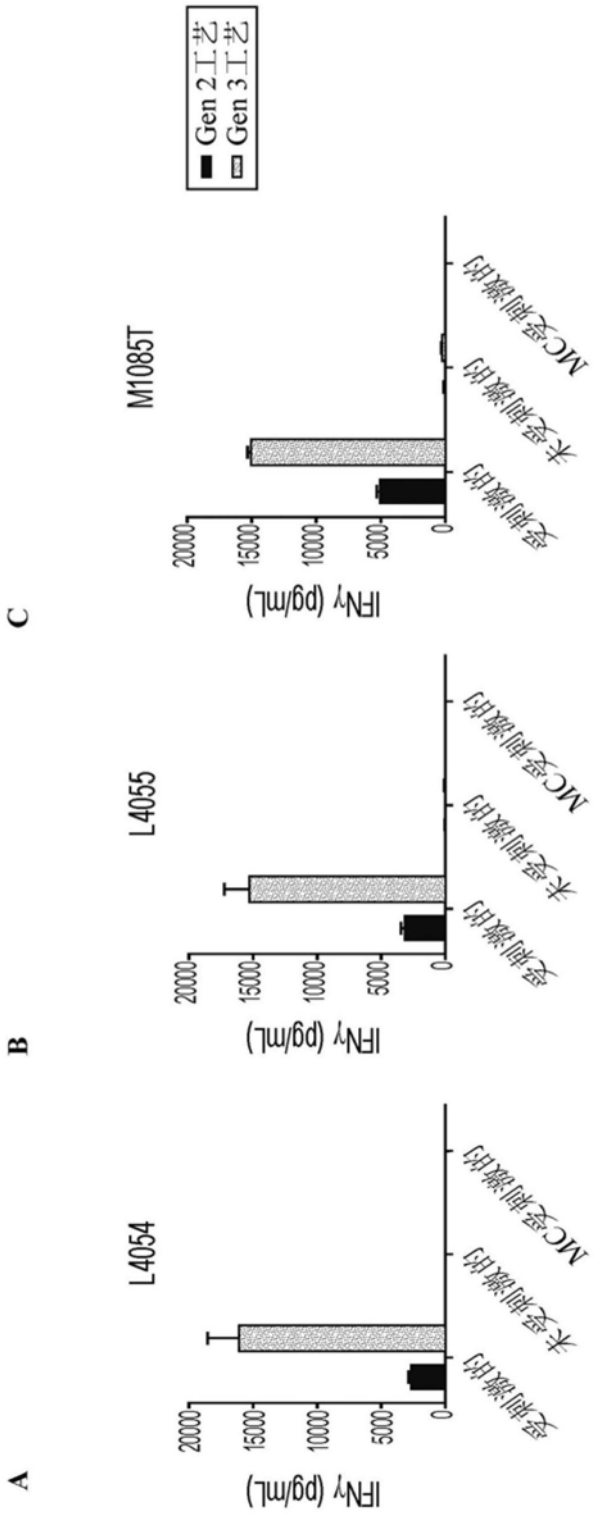

A
B
C
L4054
L4055
M1085T
IFNγ (pg/mL)
20000
15000
10000
5000
0
Gen 2工艺
Gen 3工艺
经期激活
未经期激活
MC经期激活

图14

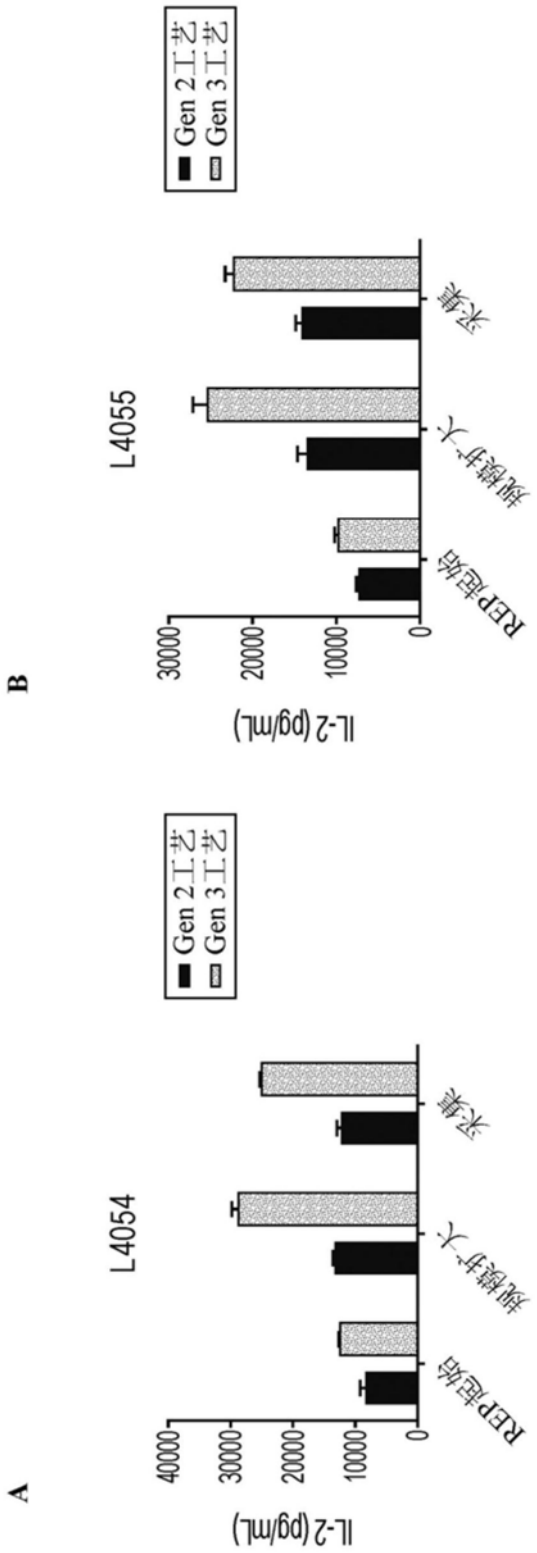

A
L4054
IL-2 (pg/mL)
40000
30000
20000
10000
0
REP起始
规模扩大
采集
Gen 2工艺
Gen 3工艺
B
L4055
IL-2 (pg/mL)
30000
20000
10000
0
REP起始
规模扩大
采集
Gen 2工艺
Gen 3工艺

图15

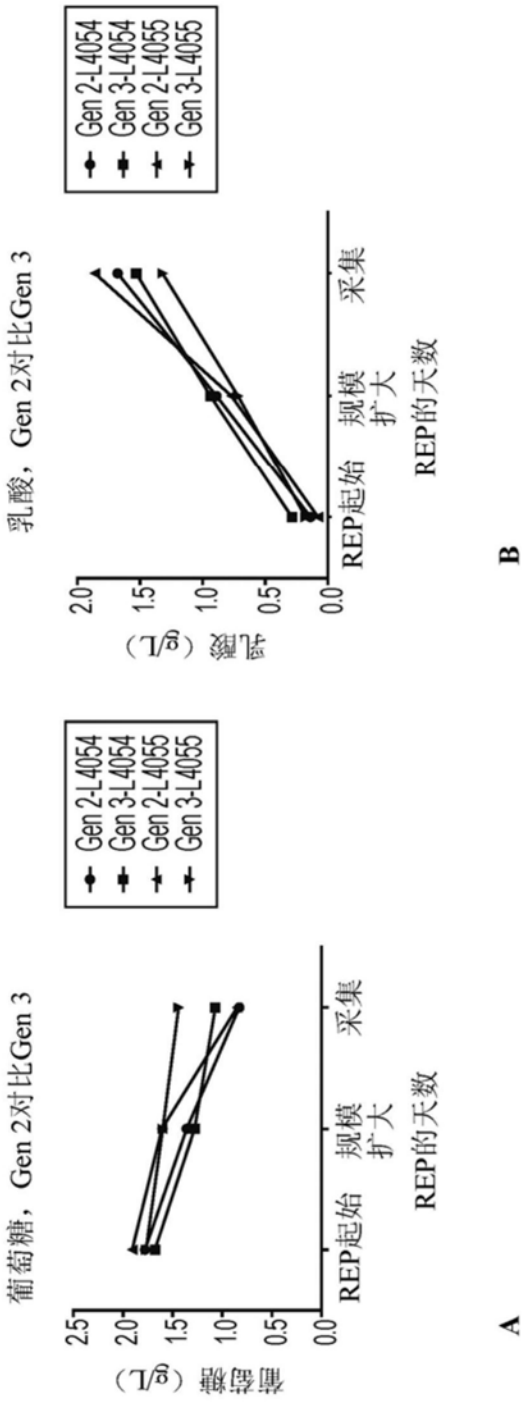

葡萄糖，Gen 2对比Gen 3
葡萄糖（g/L）
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
REP起始
规模扩大
采集
REP的天数
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055
A
乳酸，Gen 2对比Gen 3
乳酸（g/L）
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
REP起始
规模扩大
采集
REP的天数
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055
B

图16

A

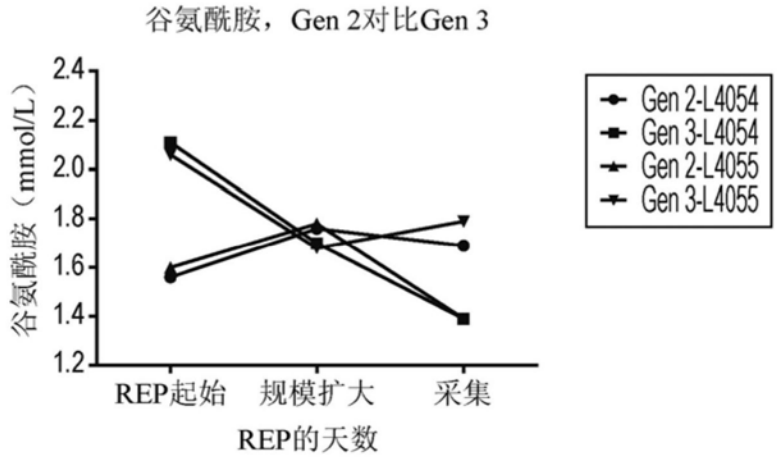

谷氨酰胺，Gen 2对比Gen 3
谷氨酰胺（mmol/L）
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
REP起始
规模扩大
采集
REP的天数
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

图17A

B

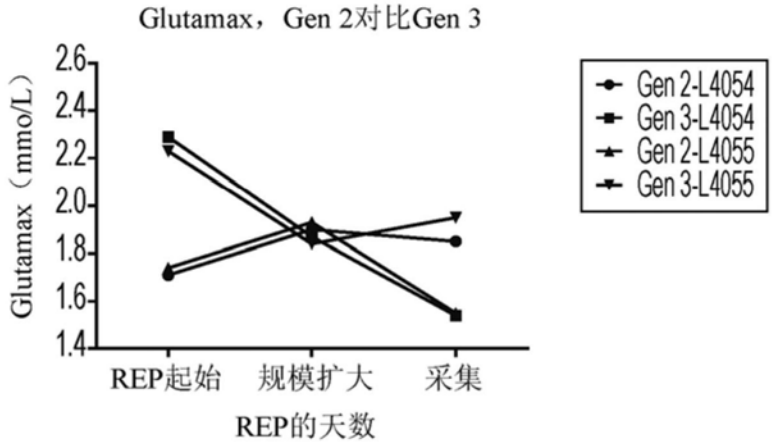

Glutamax，Gen 2对比Gen 3
Glutamax（mmo/L）
2.6
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
REP起始
规模扩大
采集
REP的天数
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

图17B

C

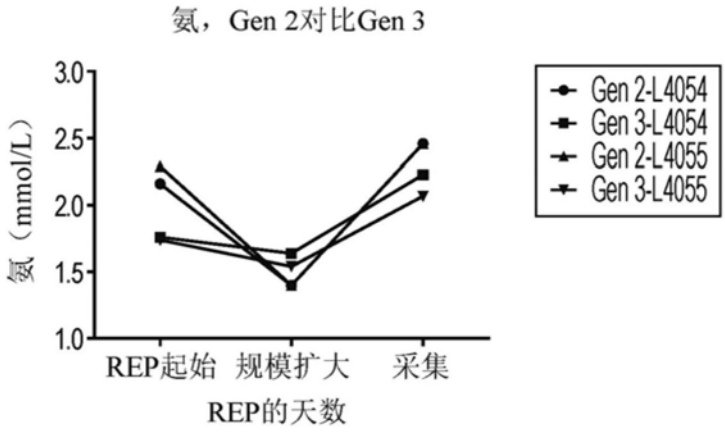

氨，Gen 2对比Gen 3
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
氨（mmol/L）
REP起始
规模扩大
采集
REP的天数
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

图17C

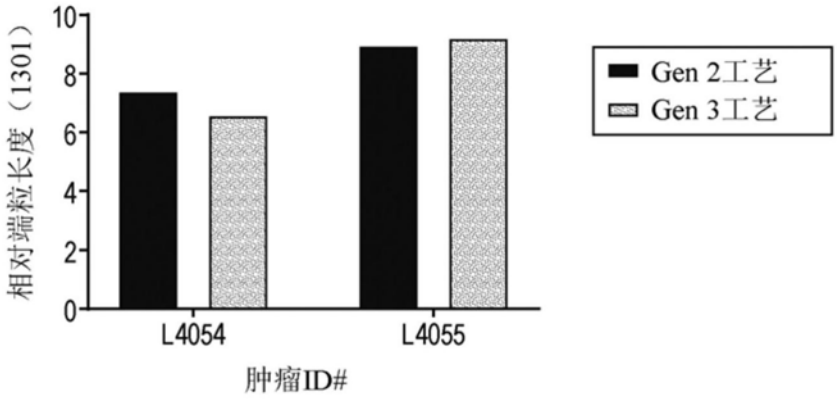

10
8
6
4
2
0
相对端粒长度（1301）
L4054
L4055
肿瘤ID#
Gen 2工艺
Gen 3工艺

图18

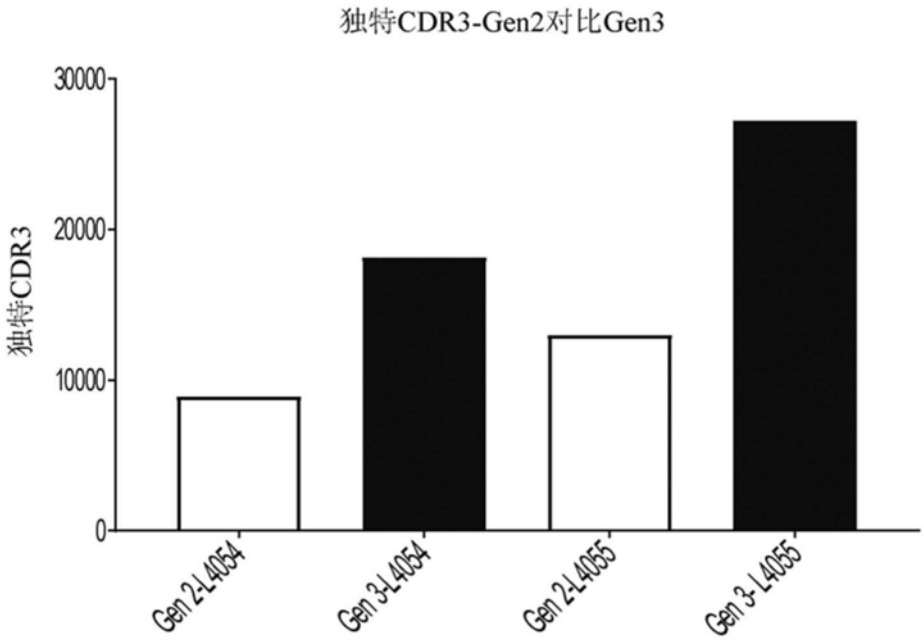
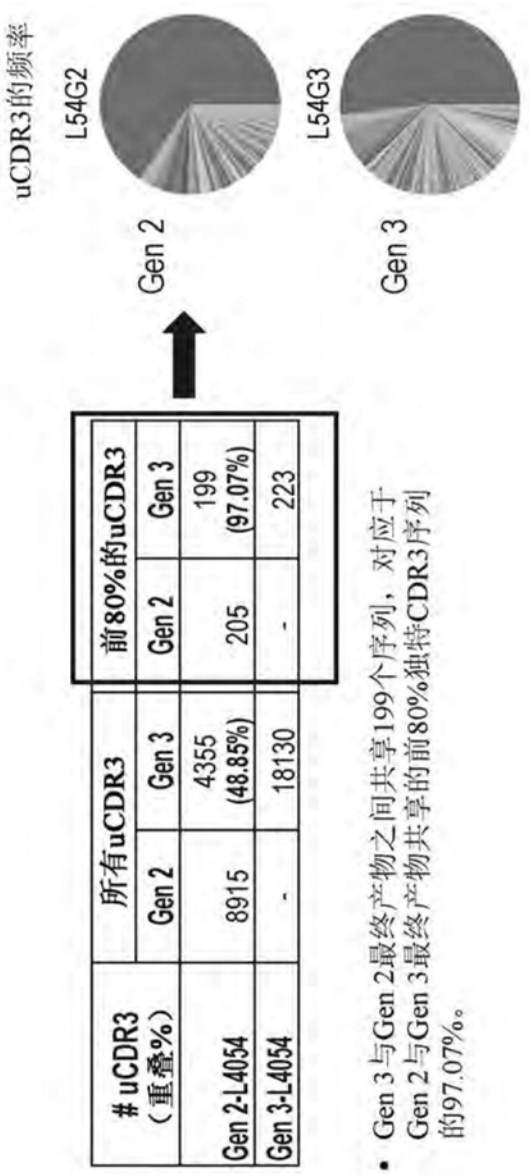

独特CDR3-Gen2对比Gen3
独特CDR3
30000
20000
10000
0
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

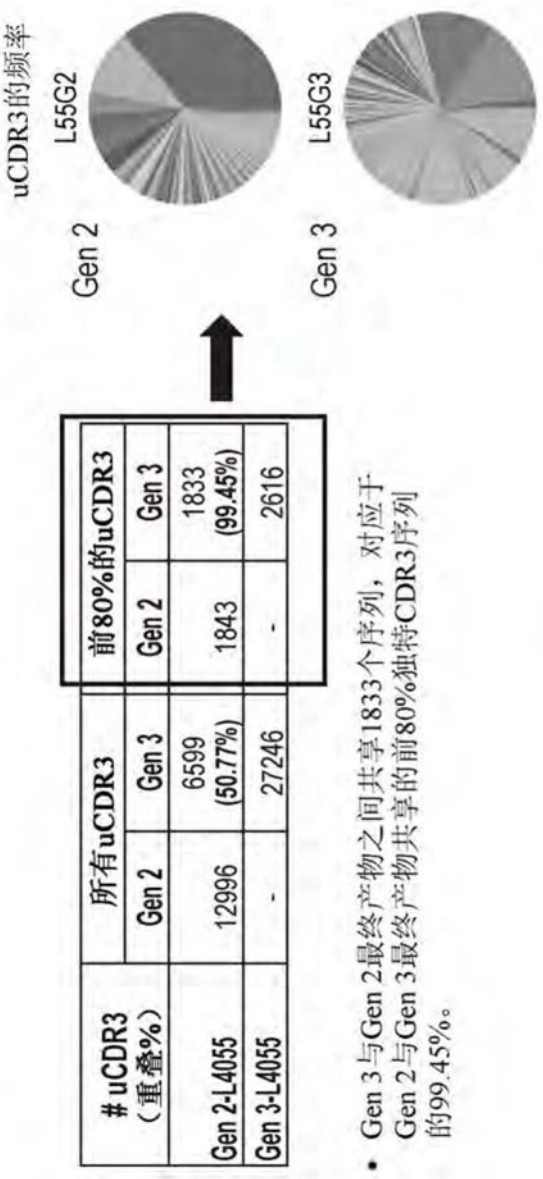
图19



# uCDR3（重叠%）	所有uCDR3		前80%的uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4054	8915	4355 (48.85%)	205	199 (97.07%)
Gen 3-L4054	-	18130	-	223

- Gen 3与Gen 2最终产物之间共享199个序列，对应于Gen 2与Gen 3最终产物共享的前80%独特CDR3序列的97.07%。

图20



# uCDR3（重叠%）	所有uCDR3		前80%的uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4055	12996	6599 (50.77%)	1843	1833 (99.45%)
Gen 3-L4055	-	27246	-	2616

- Gen 3与Gen 2最终产物之间共享1833个序列，对应于Gen 2与Gen 3最终产物共享的前80%独特CDR3序列的99.45%。

图21

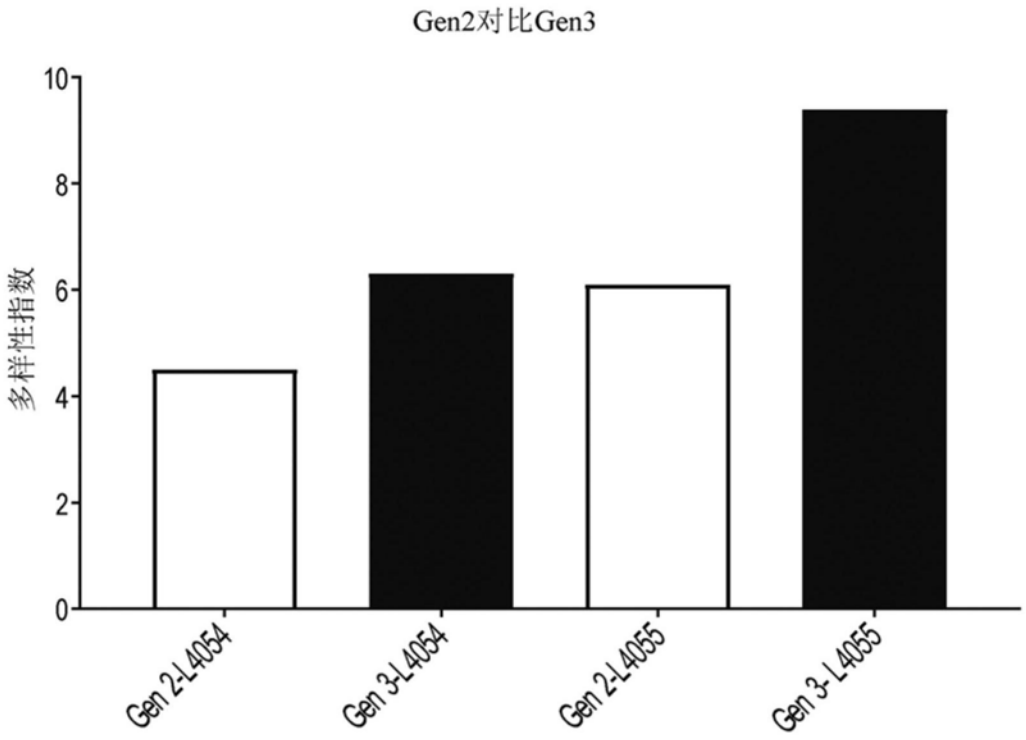

Gen2对比Gen3
多样性指数
10
8
6
4
2
0
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3- L4055

图22

第7天-Gen 3 REP起始时的细胞计数

体积（mL）		计数1（个细胞/毫升）	计数2（个细胞/毫升）	计数3（个细胞/毫升）	平均值（个细胞/毫升）	总细胞平均值*体积
188	总数	2.46E+05	2.28E+05	2.31E+05	2.35E+05	4.42E+07
	活的	2.37E+05	2.27E+05	2.26E+05	2.30E+05	4.32E+07
	死亡的	9.26E+03	7.03E+02	4.63E+03	4.86E+03	9.14E+05
	存活率%	96.20%	99.70%	98.00%	97.97%	
188	总数	8.26E+04	8.00E+04	7.66E+04	7.97E+04	1.50E+07
	活的	7.60E+04	7.54E+04	6.89E+04	7.34E+04	1.38E+07
	死亡的	6.61E+03	4.63E+03	7.73E+03	6.32E+03	1.19E+06
	存活率%	92.00%	94.20%	89.90%	92.03%	
200	总数	2.44E+04	4.20E+04	1.05E+04	2.56E+04	5.13E+06
	活的	1.74E+04	2.80E+04	7.03E+03	1.75E+04	3.50E+06
	死亡的	7.03E+03	1.40E+04	3.48E+03	8.17E+03	1.63E+06
	存活率%	71.20%	66.70%	66.90%	68.27%	

图23

[0001]第11天-Gen 2 REP起始和Gen 3规模扩大时的细胞计数

ID	体积（mL）		计数1（个细胞/毫升）	计数3（个细胞/毫升）	计数2（个细胞/毫升）	平均值（个细胞/毫升）	总细胞平均值*体积
Gen 3 #L4054 第一轮	1000	总数	9.11E+05	1.01E+06	1.08E+06	1.00E+06	1.00E+09
		活的	8.60E+05	9.34E+05	1.01E+06	9.35E+05	9.35E+08
		死亡的	5.09E+04	7.49E+04	6.74E+04	6.44E+04	6.44E+07
		存活率%	94.40%	92.60%	93.70%	93.57%	
Gen 3 #L4055 第二轮	1000	总数	8.56E+05	9.04E+05	8.81E+05	8.80E+05	8.80E+08
		活的	8.24E+05	8.67E+05	8.42E+05	8.44E+05	8.44E+08
		死亡的	3.17E+04	3.70E+04	3.87E+04	3.58E+04	3.58E+07
		存活率%	96.30%	95.90%	95.60%	95.93%	
Gen 3 #M1085T	200	总数	2.32E+06	2.25E+06		2.29E+06	4.57E+08
		活的	1.68E+06	1.57E+06		1.63E+06	3.25E+08
		死亡的	6.41E+05	6.79E+05		6.60E+05	1.32E+08
		存活率%	72.40%	69.90%		71.15%	
Gen 2 #L4054 第一轮	142	总数	1.08E+06	9.84E+05	1.00E+06	1.02E+06	1.45E+08
		活的	1.06E+06	9.71E+05	9.79E+05	1.00E+06	1.42E+08
		死亡的	2.05E+04	1.26E+04	2.12E+04	1.81E+04	2.57E+06
		存活率%	98.10%	98.70%	97.90%	98.23%	
Gen 2 #L4055 第二轮	96	总数	2.93E+05	3.05E+05	2.64E+05	2.87E+05	2.76E+07
		活的	2.88E+05	2.96E+05	2.55E+05	2.80E+05	2.68E+07
		死亡的	4.72E+03	9.14E+03	8.26E+03	7.37E+03	7.08E+05
		存活率%	98.40%	97.00%	96.90%	97.43%	
Gen 2 #M1085T	200	总数	9.10E+04	5.60E+04		7.35E+04	1.47E+07
		活的	8.05E+04	4.21E+04		6.13E+04	1.23E+07
		死亡的	1.04E+04	1.39E+04		1.22E+04	2.43E+06
		存活率%	88.50%	75.20%		81.85%	

图24

[0002]第16天-Gen 2规模扩大和Gen 3采集时的细胞计数

ID	体积（mL）		计数1（个细胞/毫升）	计数2（个细胞/毫升）	计数3（个细胞/毫升）	平均值（个细胞/毫升）	总细胞平均值*体积
Gen 3 #L4054 第一轮-LOVO前	1243.1	总数	1.40E+07	1.46E+07		1.43E+07	1.78E+10
		活的	1.32E+07	1.35E+07		1.34E+07	1.66E+10
		死亡的	8.47E+05	1.12E+06		9.84E+05	1.22E+09
		存活率%	94.00%	92.40%		93.20%	
Gen 3 #L4054 第一轮-LOVO后	330	总数	6.35E+07	6.07E+07		6.21E+07	2.05E+10
		活的	5.72E+07	5.44E+07		5.58E+07	1.84E+10
		死亡的	6.35E+06	6.27E+06		6.31E+06	2.08E+09
		存活率%	90.00%	89.70%		89.85%	

ID	体积（mL）		计数1（个细胞/毫升）	计数2（个细胞/毫升）	计数3（个细胞/毫升）	平均值（个细胞/毫升）	总细胞平均值*体积
Gen 3 #L4055 第二轮-LOVO前	1032.6	总数	9.49E+06	1.05E+07		1.00E+07	1.03E+10
		活的	8.90E+06	9.79E+06		9.35E+06	9.65E+09
		死亡的	5.85E+05	6.75E+05		6.30E+05	6.51E+08
		存活率%	93.80%	93.60%		93.70%	
Gen 3 #L4055 第二轮-LOVO后	330	总数	3.31E+07	2.82E+07	3.18E+07	3.07E+07	1.01E+10
		活的	2.85E+07	2.46E+07	2.77E+07	2.66E+07	8.76E+09
		死亡的	4.56E+06	3.61E+06	4.12E+06	4.09E+06	1.35E+09
		存活率%	86.20%	87.20%	87.10%	86.70%	

ID	体积（mL）		计数1（个细胞/毫升）	计数2（个细胞/毫升）	计数3（个细胞/毫升）	平均值（个细胞/毫升）	总细胞平均值*体积
Gen 3 #M1085T LOVO前	5000	总数	2.26E+06	2.64E+06		2.45E+06	1.23E+10
		活的	1.97E+06	2.31E+06		2.14E+06	1.07E+10
		死亡的	2.85E+05	3.30E+05		3.08E+05	1.54E+09
		存活率%	87.40%	87.50%		87.45%	
Gen 3 #M1085T - LOVO后且在添加CS10前	150	总数	6.27E+07	5.44E+07		5.86E+07	8.78E+09
		活的	5.50E+07	4.74E+07		5.12E+07	7.68E+09
		死亡的	7.70E+06	6.96E+06		7.33E+06	1.10E+09
		存活率%	87.70%	87.20%		87.45%	

ID	体积（mL）		计数1（个细胞/毫升）	计数2（个细胞/毫升）	计数3（个细胞/毫升）	平均值（个细胞/毫升）	总细胞平均值*体积
Gen 2 #L4054 第一轮	913	总数	3.53E+06	4.30E+06		3.92E+06	3.57E+09
		活的	3.35E+06	4.00E+06		3.68E+06	3.36E+09
		死亡的	1.75E+05	3.03E+05		2.39E+05	2.18E+08
		存活率%	95.00%	93.00%		94.00%	
Gen 2 #L4055 第二轮	292	总数	1.29E+07	1.36E+07		1.33E+07	3.87E+09
		活的	1.16E+07	1.23E+07		1.20E+07	3.49E+09
		死亡的	1.27E+06	1.23E+06		1.25E+06	3.65E+08
		存活率%	90.10%	90.90%		90.50%	
Gen 2 #M1085T	369	总数	6.75E+06	6.98E+06		6.87E+06	2.53E+09
		活的	5.22E+06	5.58E+06		5.40E+06	1.99E+09
		死亡的	1.54E+06	1.40E+06		1.47E+06	5.42E+08
		存活率%	77.20%	79.90%		78.55%	

图25

[0003]第22天-Gen 2采集时的细胞计数

ID	体积（mL）		计数1（个细胞/毫升）	计数2（个细胞/毫升）	计数3（个细胞/毫升）	平均值（个细胞/毫升）	总细胞平均值*体积
Gen 2 #L4054 第一轮- LOVO前	1385.7	总数	3.55E+07	4.12E+07	4.03E+07	3.90E+07	5.40E+10
		活的	3.26E+07	3.73E+07	3.67E+07	3.55E+07	4.92E+10
		死亡的	2.93E+06	3.87E+06	3.59E+06	3.46E+06	4.80E+09
		存活率%	91.70%	90.60%	91.10%	91.13%	
Gen 2 #L4054 第一轮-LOVO后	330	总数	1.70E+08	1.79E+08	1.68E+08	1.72E+08	5.69E+10
		活的	1.49E+08	1.58E+08	1.48E+08	1.52E+08	5.01E+10
		死亡的	2.16E+07	2.04E+07	2.00E+07	2.07E+07	6.82E+09
		存活率%	87.30%	88.60%	88.10%	87.95%	

ID	体积（mL）		计数1（个细胞/毫升）	计数2（个细胞/毫升）	计数3（个细胞/毫升）	平均值（个细胞/毫升）	总细胞平均值*体积
Gen 2 #L4055 第一轮- LOVO前	1968.2	总数	3.15E+07	2.51E+07	2.97E+07	2.88E+07	5.66E+10
		活的	2.89E+07	2.25E+07	2.72E+07	2.62E+07	5.16E+10
		死亡的	2.57E+06	2.61E+06	2.52E+06	2.57E+06	5.05E+09
		存活率%	91.80%	89.60%	91.50%	90.97%	
Gen 2 #L4055 第一轮-LOVO后	330	总数	2.33E+08	1.89E+08	1.53E+08	1.92E+08	6.33E+10
		活的	2.03E+08	1.66E+08	1.33E+08	1.67E+08	5.52E+10
		死亡的	3.00E+07	2.24E+07	1.94E+07	2.39E+07	7.90E+09
		存活率%	87.10%	88.10%	87.30%	87.50%	

ID	体积（mL）		计数1（个细胞/毫升）	计数2（个细胞/毫升）	计数3（个细胞/毫升）	平均值（个细胞/毫升）	总细胞平均值*体积
Gen 2 #M1085T- LOVO前	N/A	总数				#DIV/0!	#DIV/0!
		活的				#DIV/0!	#DIV/0!
		死亡的				#DIV/0!	#DIV/0!
		存活率%				#DIV/0!	
Gen 2 #M1085T - LOVO后且在添加CS10前	150	总数	8.51E+07	9.05E+07		8.78E+07	1.32E+10
		活的	7.33E+07	7.79E+07		7.56E+07	1.13E+10
		死亡的	1.18E+07	1.26E+07		1.22E+07	1.83E+09
		存活率%	86.10%	86.10%		86.10%	

对于L4054 Gen 2，因为研究的总数，将LOVO后计数外推至4个烧瓶。1个烧瓶被污染，并且进行外推，得到总数= 6.67E+10

图26

包括d区域以制作图表
TCRab+为CD3+
A1 gen12 1st.fcs
A2 gen12 2nd.fcs
A3 gen3 1st.fcs
A4 gen3 2nd.fcs
A5 PBMC.fcs
S1/S2总数/活的/CD14+/TCRab/CD8|裸细胞频率(Freq. of null)(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/CD27|裸细胞频率(Freq. of null)(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/CD28|裸细胞频率(Freq. of null)(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/CD56|裸细胞频率(Freq. of null)(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/CD57|裸细胞频率(Freq. of null)(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/CD3-/NK|裸细胞频率(Freq. of null)(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/CD19|裸细胞频率(Freq. of null)(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab|裸细胞频率(Freq. of null)(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab/CD4|裸细胞频率(Freq. of null)(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/CD27|裸细胞频率(Freq. of null)(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/CD28|裸细胞频率(Freq. of null)(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/CD56|裸细胞频率(Freq. of null)(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/CD57|裸细胞频率(Freq. of null)(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/Q1: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+|亲本频率(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/Q2: CCR7-PE-A+, CD45RA-AF700-A+|亲本频率(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/Q3: CCR7-PE-A+, CD45RA-AF700-A-|亲本频率(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/Q4: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A-|亲本频率(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/Q5: CD62L-BV421-A-, CD45RA-AF700-A+|亲本频率(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/Q6: CD62L-BV421-A+, CD45RA-AF700-A+|亲本频率(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/Q7: CD62L-BV421-A+, CD45RA-AF700-A-|亲本频率(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/Q8: CD62L-BV421-A-, CD45RA-AF700-A-|亲本频率(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRgd|亲本频率(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab/CD4/CD62L-Q5: CD62L-B421-A-CD45RA-AF700-A+|亲本频率(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab/CD4/CD62L-Q6: CD62L-B421-A+CD45RA-AF700-A+|亲本频率(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab/CD4/CD62L-Q7: CD62L-B421-A+CD45RA-AF700-A-|亲本频率(%)
S1/S2总数/活的/CD14-/TCRab/CD4/CD62L-Q8: CD62L-B421-A-CD45RA-AF700-A-|亲本频率(%)
TEMRA 0.25 0.16 0.12 0.91
幼稚 0.073 0.047 0.059 0.18
CM 3.37 2.39 2.28 7.12
EM 96.3 97.4 97.5 92.5
TEMRA 0.066 0.036 0.059 0.12
幼稚 0.032 0.014 0.049 0.072
CM 21.1 8.3 30.7 20.1
EM 78.8 91.6 69.2 79.7
11.4 16.4
23.1 49.1
1.77E-03 0.66 98.9 60.6 3.35 60.1 0.06 5.34
0 0.12 99.7 83.1 7.94 82.6 0.14 6.18
0 0.197 1.72e-03 98.8 49.1 4.5 48.9 0.18 4.02
2.66E-03 0.44 0.018 99.3 64.4 6.27 64 0.26 4.3
6.07 11.6 6.12 70.9 41.1 35.6 40.4 0.041 0.31
87.2 73.5 90.4 72.1 93.7
TEMRA 0.028 0.042 0.056 0.18 8.05
幼稚 0 0.014 6.97E-03 0.13 40.9
CM 4.24 4.76 3.11 10.2 3.02
EM 95.7 95.2 96.8 89.5 48
TEMRA 0.033 0.071 0.077 0.29 22.3
幼稚 9.37E-03 0.014 0.017 0.044 27.1
CM 14.1 5.24 25.5 10.6 6.23
EM 85.9 94.7 74.4 89.1 44.3
0 0 0 0 0
37.9 16.1 49.2 34.6 29.6
3.25 1.08 4.83 2.46 25.8
37.3 15.8 48.5 34 27.4
0.41 0.67 0.71 1.57 0.75
2.31 0.17 1.53 0.5 2.81

图27

CD3/CD4								
	CD38	HLA-DR	CCR7-CD45RA+	CCR7+CD45RA+	CCR7+ CD45RA-	CCR7-CD45RA-		
GEN 3-第16天-采集	42.4	95.2	4.96	0.7	1.22	93.1		
GEN 2-第22天-采集	50.4	98	0.61	0.13	0.3	99		

CD3	CD3/CD8							
CD8	CD38	HLA-DR	CCR7-CD45RA+	CCR7+CD45RA+	CCR7+CD45RA-	CCR7-CD45RA-		
	77.6	83.2	90.3	20.5	0.013	0.06	79.5	
	54.3	88	83.2	4.24	0.026	1.05	94.7	

图28

				CD4										
	CD3+		CD4+	2B4+	BTLA+	CD103+	CD25+	CD69+	CD95+	CXCR3+	KLRG1+	LAG3+	PD1+	TIGIT+	TIM3+
Gen 2-L4054				0.61	99.50	1.05	14.80	43.20	99.40	52.90	2.65	5.36	81.20	88.40	78.60
Gen 3-L4054				1.11	99.50	2.28	21.70	45.40	99.70	56.90	8.06	5.07	76.70	74.10	79.30
Gen 2-L4055				1.61	98.60	1.56	23.10	51.10	99.80	63.30	3.86	15.30	77.60	86.00	79.50
Gen 3-L4055				3.57	99.30	2.61	54.40	57.00	99.90	48.00	8.02	10.80	61.40	47.50	84.60
				CD8											
Gen 2-L4054			CD8+	2B4+	BTLA4+	CD103+	CD25+	CD95+	CD69+	CXCR3+	KLRG1+	LAG3+	PD1+	TIGIT+	TIM3+
Gen 3-L4054				35.20	99.50	74.90	11.80	99.80	58.30	99.10	8.03	33.10	80.60	99.10	88.30
Gen 2-L4055				45.50	99.60	62.40	12.10	99.90	54.00	99.30	13.40	22.10	64.90	98.50	87.50
Gen 3-L4055				40.60	98.20	19.50	32.00	99.70	75.50	96.80	22.80	27.40	28.10	92.30	75.10
				62.80	99.20	29.20	45.50	99.70	58.80	99.60	13.10	16.60	34.10	71.70	63.60

图29

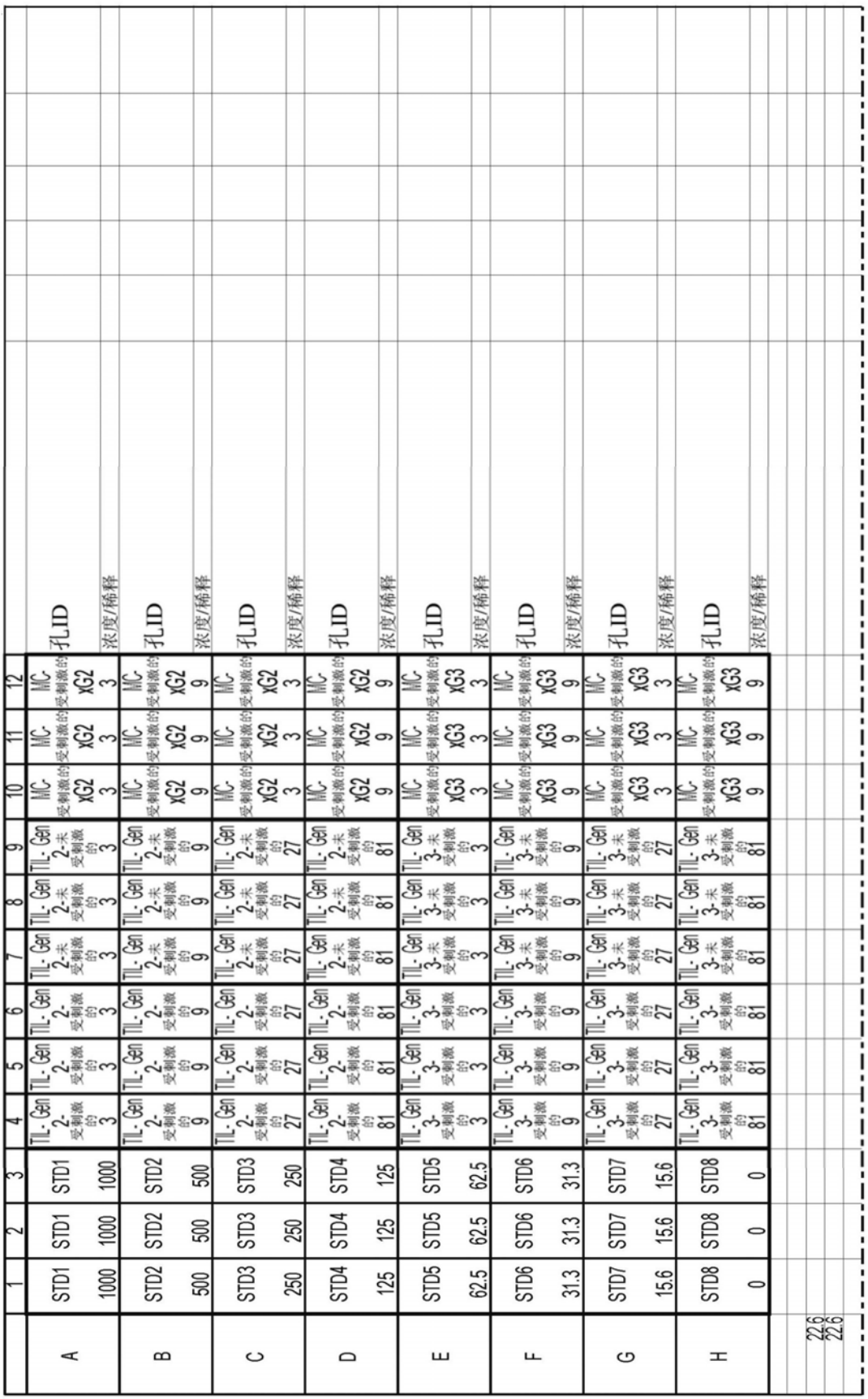
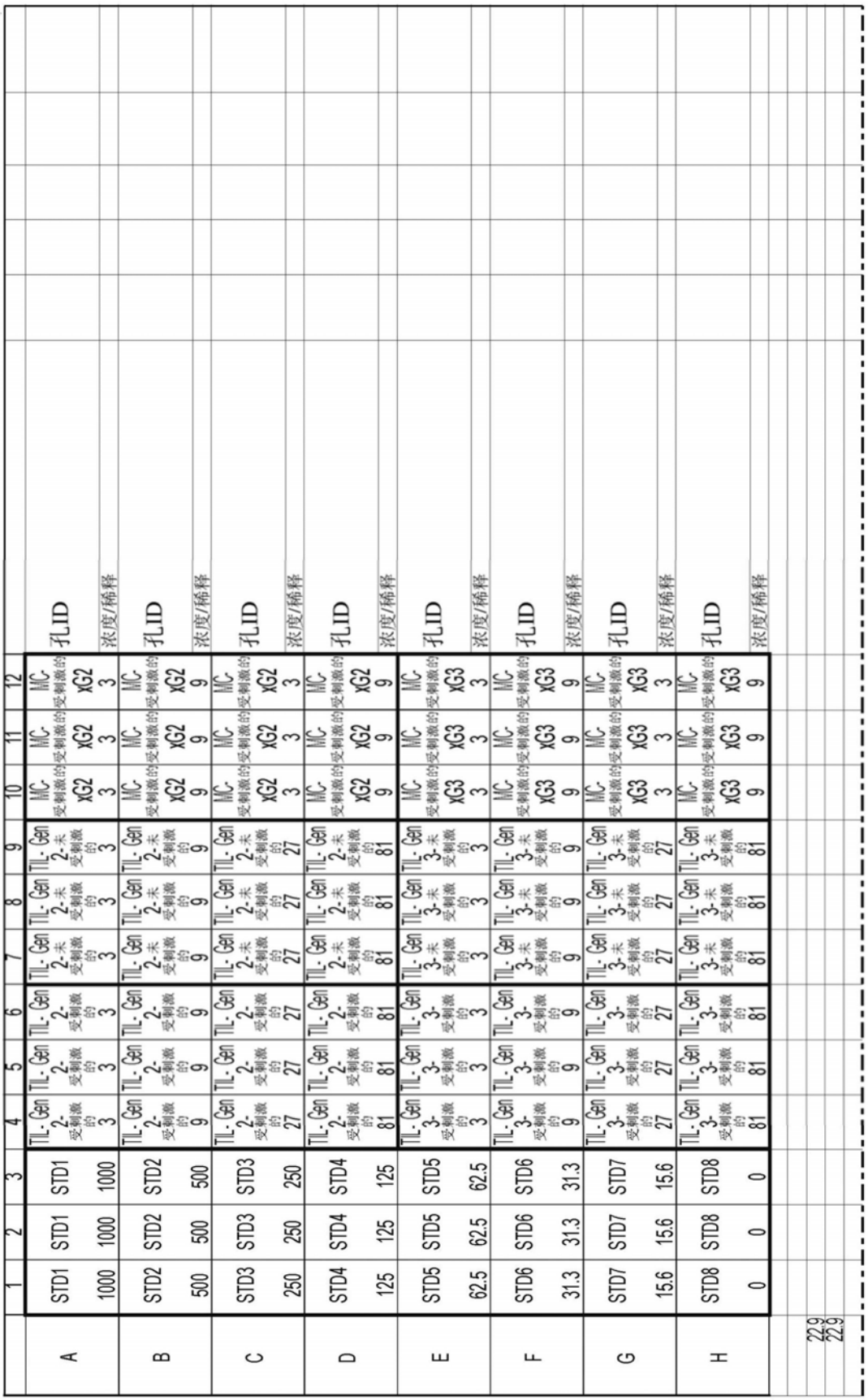

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A STD1 STD1 STD1 TIL-Gen 2-受刺激的3 TIL-Gen 2-受刺激的9 TIL-Gen 2-受刺激的27 TIL-Gen 2-未受刺激的3 TIL-Gen 2-未受刺激的9 TIL-Gen 2-未受刺激的27 TIL-Gen 2-未受刺激的3 TIL-Gen 2-未受刺激的9 TIL-Gen 2-未受刺激的27 MC-受刺激的xG2 3 MC-受刺激的xG2 9 MC-受刺激的xG2 3 MC-受刺激的xG2 9 孔LID
1000 1000 1000 STD2 STD2 STD2 TIL-Gen 2-受刺激的3 TIL-Gen 2-受刺激的9 TIL-Gen 2-受刺激的27 TIL-Gen 2-未受刺激的3 TIL-Gen 2-未受刺激的9 TIL-Gen 2-未受刺激的27 TIL-Gen 2-未受刺激的3 TIL-Gen 2-未受刺激的9 TIL-Gen 2-未受刺激的27 MC-受刺激的xG2 3 MC-受刺激的xG2 9 MC-受刺激的xG2 3 MC-受刺激的xG2 9 浓度/稀释
B STD2 STD2 STD2 TIL-Gen 2-受刺激的3 TIL-Gen 2-受刺激的9 TIL-Gen 2-受刺激的27 TIL-Gen 2-未受刺激的3 TIL-Gen 2-未受刺激的9 TIL-Gen 2-未受刺激的27 TIL-Gen 2-未受刺激的3 TIL-Gen 2-未受刺激的9 TIL-Gen 2-未受刺激的27 MC-受刺激的xG2 3 MC-受刺激的xG2 9 MC-受刺激的xG2 3 MC-受刺激的xG2 9 孔LID
500 500 500 STD3 STD3 STD3 TIL-Gen 2-受刺激的3 TIL-Gen 2-受刺激的9 TIL-Gen 2-受刺激的27 TIL-Gen 2-未受刺激的3 TIL-Gen 2-未受刺激的9 TIL-Gen 2-未受刺激的27 TIL-Gen 2-未受刺激的3 TIL-Gen 2-未受刺激的9 TIL-Gen 2-未受刺激的27 MC-受刺激的xG2 3 MC-受刺激的xG2 9 MC-受刺激的xG2 3 MC-受刺激的xG2 9 浓度/稀释
C STD3 STD3 STD3 TIL-Gen 2-受刺激的3 TIL-Gen 2-受刺激的9 TIL-Gen 2-受刺激的27 TIL-Gen 2-未受刺激的3 TIL-Gen 2-未受刺激的9 TIL-Gen 2-未受刺激的27 TIL-Gen 2-未受刺激的3 TIL-Gen 2-未受刺激的9 TIL-Gen 2-未受刺激的27 MC-受刺激的xG2 3 MC-受刺激的xG2 9 MC-受刺激的xG2 3 MC-受刺激的xG2 9 孔LID
250 250 250 STD4 STD4 STD4 TIL-Gen 2-受刺激的3 TIL-Gen 2-受刺激的9 TIL-Gen 2-受刺激的27 TIL-Gen 2-未受刺激的3 TIL-Gen 2-未受刺激的9 TIL-Gen 2-未受刺激的27 TIL-Gen 2-未受刺激的3 TIL-Gen 2-未受刺激的9 TIL-Gen 2-未受刺激的27 MC-受刺激的xG2 3 MC-受刺激的xG2 9 MC-受刺激的xG2 3 MC-受刺激的xG2 9 浓度/稀释
D STD4 STD4 STD4 TIL-Gen 2-受刺激的3 TIL-Gen 2-受刺激的9 TIL-Gen 2-受刺激的27 TIL-Gen 2-未受刺激的3 TIL-Gen 2-未受刺激的9 TIL-Gen 2-未受刺激的27 TIL-Gen 2-未受刺激的3 TIL-Gen 2-未受刺激的9 TIL-Gen 2-未受刺激的27 MC-受刺激的xG2 3 MC-受刺激的xG2 9 MC-受刺激的xG2 3 MC-受刺激的xG2 9 孔LID
125 125 125 STD5 STD5 STD5 TIL-Gen 3-受刺激的3 TIL-Gen 3-受刺激的9 TIL-Gen 3-受刺激的27 TIL-Gen 3-未受刺激的3 TIL-Gen 3-未受刺激的9 TIL-Gen 3-未受刺激的27 TIL-Gen 3-未受刺激的3 TIL-Gen 3-未受刺激的9 TIL-Gen 3-未受刺激的27 MC-受刺激的xG3 3 MC-受刺激的xG3 9 MC-受刺激的xG3 3 MC-受刺激的xG3 9 浓度/稀释
E STD5 STD5 STD5 TIL-Gen 3-受刺激的3 TIL-Gen 3-受刺激的9 TIL-Gen 3-受刺激的27 TIL-Gen 3-未受刺激的3 TIL-Gen 3-未受刺激的9 TIL-Gen 3-未受刺激的27 TIL-Gen 3-未受刺激的3 TIL-Gen 3-未受刺激的9 TIL-Gen 3-未受刺激的27 MC-受刺激的xG3 3 MC-受刺激的xG3 9 MC-受刺激的xG3 3 MC-受刺激的xG3 9 孔LID
62.5 62.5 62.5 STD6 STD6 STD6 TIL-Gen 3-受刺激的3 TIL-Gen 3-受刺激的9 TIL-Gen 3-受刺激的27 TIL-Gen 3-未受刺激的3 TIL-Gen 3-未受刺激的9 TIL-Gen 3-未受刺激的27 TIL-Gen 3-未受刺激的3 TIL-Gen 3-未受刺激的9 TIL-Gen 3-未受刺激的27 MC-受刺激的xG3 3 MC-受刺激的xG3 9 MC-受刺激的xG3 3 MC-受刺激的xG3 9 浓度/稀释
F STD6 STD6 STD6 TIL-Gen 3-受刺激的3 TIL-Gen 3-受刺激的9 TIL-Gen 3-受刺激的27 TIL-Gen 3-未受刺激的3 TIL-Gen 3-未受刺激的9 TIL-Gen 3-未受刺激的27 TIL-Gen 3-未受刺激的3 TIL-Gen 3-未受刺激的9 TIL-Gen 3-未受刺激的27 MC-受刺激的xG3 3 MC-受刺激的xG3 9 MC-受刺激的xG3 3 MC-受刺激的xG3 9 孔LID
31.3 31.3 31.3 STD7 STD7 STD7 TIL-Gen 3-受刺激的3 TIL-Gen 3-受刺激的9 TIL-Gen 3-受刺激的27 TIL-Gen 3-未受刺激的3 TIL-Gen 3-未受刺激的9 TIL-Gen 3-未受刺激的27 TIL-Gen 3-未受刺激的3 TIL-Gen 3-未受刺激的9 TIL-Gen 3-未受刺激的27 MC-受刺激的xG3 3 MC-受刺激的xG3 9 MC-受刺激的xG3 3 MC-受刺激的xG3 9 浓度/稀释
G STD7 STD7 STD7 TIL-Gen 3-受刺激的3 TIL-Gen 3-受刺激的9 TIL-Gen 3-受刺激的27 TIL-Gen 3-未受刺激的3 TIL-Gen 3-未受刺激的9 TIL-Gen 3-未受刺激的27 TIL-Gen 3-未受刺激的3 TIL-Gen 3-未受刺激的9 TIL-Gen 3-未受刺激的27 MC-受刺激的xG3 3 MC-受刺激的xG3 9 MC-受刺激的xG3 3 MC-受刺激的xG3 9 孔LID
15.6 15.6 15.6 STD8 STD8 STD8 TIL-Gen 3-受刺激的3 TIL-Gen 3-受刺激的9 TIL-Gen 3-受刺激的27 TIL-Gen 3-未受刺激的3 TIL-Gen 3-未受刺激的9 TIL-Gen 3-未受刺激的27 TIL-Gen 3-未受刺激的3 TIL-Gen 3-未受刺激的9 TIL-Gen 3-未受刺激的27 MC-受刺激的xG3 3 MC-受刺激的xG3 9 MC-受刺激的xG3 3 MC-受刺激的xG3 9 浓度/稀释
H STD8 STD8 STD8 TIL-Gen 3-受刺激的3 TIL-Gen 3-受刺激的9 TIL-Gen 3-受刺激的27 TIL-Gen 3-未受刺激的3 TIL-Gen 3-未受刺激的9 TIL-Gen 3-未受刺激的27 TIL-Gen 3-未受刺激的3 TIL-Gen 3-未受刺激的9 TIL-Gen 3-未受刺激的27 MC-受刺激的xG3 3 MC-受刺激的xG3 9 MC-受刺激的xG3 3 MC-受刺激的xG3 9 孔LID
0 0 0 浓度/稀释
22.6
22.6

图30A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			平均值	平均值
A	2.866	2.882	2.886	2.797	2.164	2.918	0.117	0.116	0.117	0.105	0.108	0.102	450	Gen 2-受刺激的+TIL 1:3	2890.216	2757.81
	0.05	0.05	0.05	0.05	0.048	0.051	0.041	0.043	0.041	0.041	0.043	0.041	570	Gen 2-受刺激的+TIL 1:9	2257.887	
	2.816	2.832	2.836	2.746	2.117	2.867	0.076	0.074	0.076	0.064	0.065	0.06	增量	Gen 2-受刺激的+TIL 1:27	2952.028	
	994.773	1002.343	1004.079	963.405	894.982	1018.375	1.825	1.421	1.952	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]	Gen 2-受刺激的+TIL 1:81	3261.251	2929.867
				2890.216	2084.946	3055.126	5.474	4.262	5.855	<0.000	<0.000	<0.000	X稀释因子			
B	1.659	1.654	1.65	1.181	0.9	1.215	0.107	0.107	0.108	0.106	0.105	0.102	450	Gen 3-受刺激的+TIL 1:3	??????	#DIV/0!
	0.046	0.046	0.046	0.045	0.047	0.045	0.042	0.041	0.042	0.043	0.042	0.042	570	Gen 3-受刺激的+TIL 1:9	>13273.546	16089.32
	1.613	1.608	1.604	1.136	0.853	1.17	0.066	0.066	0.067	0.062	0.063	0.061	增量	Gen 3-受刺激的+TIL 1:27	16947.994	17024.1
	499.866	497.826	496.528	329.765	235.273	341.438	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]	Gen 3-受刺激的+TIL 1:81	17571.427	17936.8973
				2967.887	2117.46	3072.942	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	X稀释因子			
C	0.952	0.966	0.94	0.494	0.391	0.505	0.106	0.107	0.107	0.107	0.105	0.103	450	Gen 2-未受刺激的+TIL 1:3	5.474	4.262	5.855	5.197	5.20
	0.044	0.048	0.043	0.042	0.042	0.043	0.041	0.042	0.042	0.043	0.042	0.042	570	Gen 2-未受刺激的+TIL 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	
	0.908	0.919	0.896	0.452	0.349	0.462	0.066	0.066	0.065	0.063	0.063	0.062	增量	Gen 2-未受刺激的+TIL 1:27	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	
	253.244	256.8	249.399	109.334	78.83	112.411	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]	Gen 2-未受刺激的+TIL 1:81	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	
				2952.028	2128.412	3035.11	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	X稀释因子			
D	0.549	0.541	0.542	0.258	0.218	0.259	0.102	0.101	0.103	0.111	0.102	0.101	450	Gen 3-未受刺激的+TIL 1:3	3.435	0.854	2.465	2.253333333	19.74
	0.044	0.044	0.043	0.042	0.041	0.047	0.041	0.042	0.042	0.05	0.042	0.043	570	Gen 3-未受刺激的+TIL 1:9	10.304	<0.000	<0.000	10.304	
	0.505	0.498	0.499	0.216	0.176	0.212	0.06	0.059	0.061	0.061	0.06	0.057	增量	Gen 3-未受刺激的+TIL 1:27	30.239	<0.000	31.588	30.9135	
	125.458	123.174	123.508	40.262	29.15	39.101	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]	Gen 3-未受刺激的+TIL 1:81	9.644	4.039	92.74	35.4743333	
				3261.251	2361.138	3167.212	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	X稀释因子			
E	0.334	0.332	0.332	OVRFLW	OVRFLW	OVRFLW	0.114	0.11	0.113	0.103	0.102	0.104	450	Gen 2-受刺激的培养基对照+TIL 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	0.00
	0.043	0.042	0.042	0.07	0.068	0.069	0.041	0.041	0.042	0.042	0.042	0.043	570	Gen 2-受刺激的培养基对照+TIL 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	
	0.291	0.29	0.29	??????	??????	??????	0.073	0.069	0.072	0.062	0.061	0.061	增量						
	61.826	61.537	61.594	??????	??????	??????	1.145	0.285	0.822	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]						
				??????	??????	??????	3.435	0.854	2.465	<0.000	<0.000	<0.000	X稀释因子			
F	0.222	0.222	0.224	3.84	3.895	3.853	0.114	0.104	0.107	0.101	0.103	0.101	450	Gen 2-受刺激的培养基对照+TIL 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	0.00
	0.042	0.043	0.042	0.058	0.066	0.057	0.041	0.041	0.042	0.042	0.041	0.042	570	Gen 2-受刺激的培养基对照+TIL 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	
	0.18	0.179	0.181	3.782	3.839	3.796	0.073	0.063	0.066	0.059	0.062	0.059	增量						
	30.212	29.82	30.519	1474.838	>1500.000	1482.263	1.145	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]						
				13273.55	>13500.000	13340.37	10.304	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	X稀释因子			
G	0.174	0.17	0.172	1.996	1.997	2.017	0.114	0.109	0.114	0.106	0.107	0.104	450	Gen2-未受刺激的培养基对照+TIL 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	0.00
	0.041	0.041	0.041	0.048	0.047	0.049	0.042	0.042	0.041	0.042	0.041	0.042	570	Gen2-未受刺激的培养基对照+TIL 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	
	0.132	0.128	0.131	1.948	1.949	1.998	0.073	0.067	0.073	0.063	0.065	0.062	增量						
	16.911	15.874	16.447	627.703	628.253	635.61	1.12	<0.000	1.17	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]						
				16947.99	16962.84	17161.47	30.239	<0.000	31.588	<0.000	<0.000	<0.000	X稀释因子			
H	0.117	0.111	0.114	0.84	0.867	0.857	0.11	0.11	0.115	0.109	0.11	0.113	450	Gen3-未受刺激的培养基对照+TIL 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	0	30.28
	0.045	0.043	0.044	0.044	0.044	0.044	0.041	0.042	0.043	0.042	0.043	0.042	570	Gen3-未受刺激的培养基对照+TIL 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	60.557	
	0.072	0.068	0.07	0.797	0.822	0.813	0.069	0.068	0.073	0.067	0.067	0.071	增量						
	0.822	0.073	0.405	216.931	225.269	222.13	0.119	0.05	1.145	<0.000	<0.000	0.748	[浓度]						
				17571.43	18246.77	17992.49	9.644	4.039	92.74	<0.000	<0.000	60.557	X稀释因子			

图30B



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	STD1	STD1	STD1	TIL-Gen 2-受刺激的 3	TIL-Gen 2-受刺激的 3	TIL-Gen 2-受刺激的 3	TIL-Gen 2-未受刺激的 3	TIL-Gen 2-未受刺激的 3	TIL-Gen 2-未受刺激的 3	MC受刺激的xG2 3	MC受刺激的xG2 3	MC受刺激的xG2 3	孔LID
	1000	1000	1000										浓度/稀释
B	STD2	STD2	STD2	TIL-Gen 2-受刺激的 9	TIL-Gen 2-受刺激的 9	TIL-Gen 2-受刺激的 9	TIL-Gen 2-未受刺激的 9	TIL-Gen 2-未受刺激的 9	TIL-Gen 2-未受刺激的 9	MC受刺激的xG2 9	MC受刺激的xG2 9	MC受刺激的xG2 9	孔LID
	500	500	500										浓度/稀释
C	STD3	STD3	STD3	TIL-Gen 2-受刺激的 27	TIL-Gen 2-受刺激的 27	TIL-Gen 2-受刺激的 27	TIL-Gen 2-未受刺激的 27	TIL-Gen 2-未受刺激的 27	TIL-Gen 2-未受刺激的 27	MC受刺激的xG2 3	MC受刺激的xG2 3	MC受刺激的xG2 3	孔LID
	250	250	250										浓度/稀释
D	STD4	STD4	STD4	TIL-Gen 2-受刺激的 81	TIL-Gen 2-受刺激的 81	TIL-Gen 2-受刺激的 81	TIL-Gen 2-未受刺激的 81	TIL-Gen 2-未受刺激的 81	TIL-Gen 2-未受刺激的 81	MC受刺激的xG2 9	MC受刺激的xG2 9	MC受刺激的xG2 9	孔LID
	125	125	125										浓度/稀释
E	STD5	STD5	STD5	TIL-Gen 3-受刺激的 3	TIL-Gen 3-受刺激的 3	TIL-Gen 3-受刺激的 3	TIL-Gen 3-未受刺激的 3	TIL-Gen 3-未受刺激的 3	TIL-Gen 3-未受刺激的 3	MC受刺激的xG3 3	MC受刺激的xG3 3	MC受刺激的xG3 3	孔LID
	62.5	62.5	62.5										浓度/稀释
F	STD6	STD6	STD6	TIL-Gen 3-受刺激的 9	TIL-Gen 3-受刺激的 9	TIL-Gen 3-受刺激的 9	TIL-Gen 3-未受刺激的 9	TIL-Gen 3-未受刺激的 9	TIL-Gen 3-未受刺激的 9	MC受刺激的xG3 9	MC受刺激的xG3 9	MC受刺激的xG3 9	孔LID
	31.3	31.3	31.3										浓度/稀释
G	STD7	STD7	STD7	TIL-Gen 3-受刺激的 27	TIL-Gen 3-受刺激的 27	TIL-Gen 3-受刺激的 27	TIL-Gen 3-未受刺激的 27	TIL-Gen 3-未受刺激的 27	TIL-Gen 3-未受刺激的 27	MC受刺激的xG3 3	MC受刺激的xG3 3	MC受刺激的xG3 3	孔LID
	15.6	15.6	15.6										浓度/稀释
H	STD8	STD8	STD8	TIL-Gen 3-受刺激的 81	TIL-Gen 3-受刺激的 81	TIL-Gen 3-受刺激的 81	TIL-Gen 3-未受刺激的 81	TIL-Gen 3-未受刺激的 81	TIL-Gen 3-未受刺激的 81	MC受刺激的xG3 9	MC受刺激的xG3 9	MC受刺激的xG3 9	孔LID
	0	0	0										浓度/稀释

22.9
22.9

图31A



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12							平均值	
A	2.875	2.859	2.877	3.185	2.823	2.8	0.128	0.126	0.132	0.11	0.111	0.107	450	Gen2-受刺激的+TIL1:3	3435.858	2933.14	2915.979	3091.659	3261.65
	0.064	0.053	0.052	0.055	0.055	0.052	0.041	0.041	0.042	0.042	0.041	0.042	570	Gen2-受刺激的+TIL1:9	3516.262	3001.429	2926.474	3201.388333		
	2.821	2.807	2.825	3.129	2.768	2.748	0.087	0.085	0.09	0.069	0.069	0.065	增量	Gen2-受刺激的+TIL1:27	3471.282	3097.07	2994.844	3187.732		
	1001.719	995.223	1003.493	1145.286	977.713	968.66	2.922	2.418	3.712	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]	Gen2-受刺激的+TIL1:81	3910.387	3552.941	3234.126	3565.818		
				3435.858	2933.14	2905.979	8.766	7.254	11.136	<0.000	<0.000	<0.000	X稀释因子							
B	1.669	1.635	1.668	1.411	1.199	1.177	0.119	0.118	0.126	0.112	0.112	0.114	450	Gen3-受刺激的+TIL1:3	??????	??????	??????	#DIV/0!	#DIV/0!	
	0.047	0.046	0.047	0.046	0.045	0.047	0.041	0.042	0.044	0.042	0.041	0.042	570	Gen3-受刺激的+TIL1:9	13183.826	13421.925	12822.143	13142.63133	15303.54	
	1.622	1.589	1.621	1.365	1.154	1.13	0.078	0.076	0.082	0.07	0.07	0.072	增量	Gen3-受刺激的+TIL1:27	16231.22	16700.175	14586.268	15839.221		
	503.563	491.203	503.336	408.474	333.492	325.164	0.931	0.531	1.786	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]	Gen3-受刺激的+TIL1:81	17140.679	17638.195	16007.402	16928.75867		
				3676.262	3001.429	2926.474	8.383	4.779	16.076	<0.000	<0.000	<0.000	X稀释因子							
C	0.974	0.957	0.939	0.576	0.528	0.518	0.115	0.116	0.125	0.111	0.114	0.115	450	Gen2-未受刺激的+TIL1:3	8.769	7.254	11.136	9.052	27.10	
	0.045	0.043	0.045	0.045	0.043	0.045	0.041	0.044	0.042	0.041	0.043	0.043	570	Gen2-未受刺激的+TIL1:9	8.383	4.779	16.076	9.746		
	0.929	0.914	0.894	0.531	0.486	0.473	0.074	0.072	0.083	0.07	0.071	0.071	增量	Gen2-未受刺激的+TIL1:27	5.632	<0.000	53.672	29.652		
	256.406	251.388	244.654	128.566	114.706	110.92	0.209	<0.000	1.988	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]	Gen2-未受刺激的+TIL1:81	<0.000	<0.000	59.939	59.939		
				3471.282	3097.07	2994.844	5.632	<0.000	53.672	<0.000	<0.000	<0.000	X稀释因子							
D	0.577	0.551	0.56	0.301	0.266	0.27	0.115	0.11	0.119	0.111	0.112	0.11	450	Gen3-未受刺激的+TIL1:3	19.738	13.255	20.614	17.869	43.28	
	0.044	0.042	0.044	0.042	0.043	0.041	0.042	0.043	0.042	0.042	0.041	0.042	570	Gen3-未受刺激的+TIL1:9	13.875	31.096	19.718	21.563		
	0.533	0.509	0.516	0.259	0.243	0.229	0.073	0.067	0.077	0.069	0.07	0.068	增量	Gen3-未受刺激的+TIL1:27	0.172	<0.000	33.321	16.7465		
	129.057	121.737	123.877	48.276	43.863	39.927	<0.000	<0.000	0.74	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]	Gen3-未受刺激的+TIL1:81	77.18	171.968	92.74	35.4743333		
				3910.387	3552.941	3234.126	<0.000	<0.000	59.939	<0.000	<0.000	<0.000	X稀释因子							
E	0.361	0.35	0.346	OVRFLW	OVRFLW	OVRFLW	0.143	0.135	0.145	0.115	0.112	0.11	450	Gen2-受刺激的培养基对照+TIL1:3	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	0.00	
	0.042	0.042	0.042	0.072	0.07	0.072	0.041	0.042	0.042	0.041	0.043	0.041	570	Gen2-受刺激的培养基对照+TIL1:9	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!		
	0.319	0.309	0.304	?????	?????	?????	0.102	0.093	0.103	0.074	0.069	0.068	增量							
	65.323	62.395	61.049	?????	?????	?????	6.579	4.418	6.871	0.076	<0.000	<0.000	[浓度]							
				?????	?????	?????	19.738	13.255	20.614	0.228	<0.000	<0.000	X稀释因子							
F	0.237	0.233	0.239	3.825	3.876	3.746	0.122	0.144	0.125	0.114	0.112	0.111	450	Gen2-受刺激的培养基对照+TIL1:3	0.228	<0.000	<0.000	0.228	0.11	
	0.042	0.043	0.042	0.057	0.057	0.055	0.041	0.055	0.042	0.041	0.041	0.042	570	Gen2-受刺激的培养基对照+TIL1:9	<0.000	<0.000	<0.000	0		
	0.195	0.19	0.197	3.768	3.818	3.691	0.081	0.089	0.084	0.073	0.071	0.069	增量							
	30.739	29.388	31.253	1464.87	1491.325	1424.683	1.542	3.455	2.191	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]							
				13183.83	13421.93	12822.14	13.875	31.096	19.718	<0.000	<0.000	<0.000	X稀释因子							
G	0.182	0.173	0.183	1.922	1.967	1.765	0.115	0.115	0.121	0.114	0.111	0.114	450	Gen2-未受刺激的培养基对照+TIL1:3	<0.000	<0.000	<0.000	0	0.00	
	0.044	0.041	0.042	**0.047**	**0.048**	**0.047**	0.042	0.041	0.042	0.041	0.041	0.043	570	Gen2-未受刺激的培养基对照+TIL1:9	<0.000	<0.000	<0.000	0		
	0.138	0.132	0.141	1.875	1.919	1.718	0.073	0.073	0.079	0.073	0.07	0.07	增量							
	15.598	14.006	16.321	601.156	618.525	540.232	0.006	<0.000	1.234	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]							
				16231.22	16700.18	14586.27	0.172	<0.000	33.321	<0.000	<0.000	<0.000	X稀释因子							
H	0.121	0.117	0.122	0.837	0.857	0.794	0.119	0.125	0.123	0.119	0.12	0.112	450	Gen3-未受刺激的培养基对照+TIL1:3	<0.000	<0.000	<0.000	0	1.53	
	0.045	0.042	0.047	0.043	0.045	0.043	0.041	0.041	0.043	0.045	0.044	0.042	570	Gen3-未受刺激的培养基对照+TIL1:9	1.357	4.779	<0.000	3.068		
	0.076	0.075	0.074	0.793	0.812	0.75	0.078	0.083	0.079	0.074	0.076	0.071	增量							
	0.635	0.408	0.17	211.613	217.755	197.622	0.953	2.123	1.256	0.151	0.531	<0.000	[浓度]							
				17140.68	17638.2	16007.4	77.18	171.968	101.73	1.357	4.779	<0.000	X稀释因子							

图31B

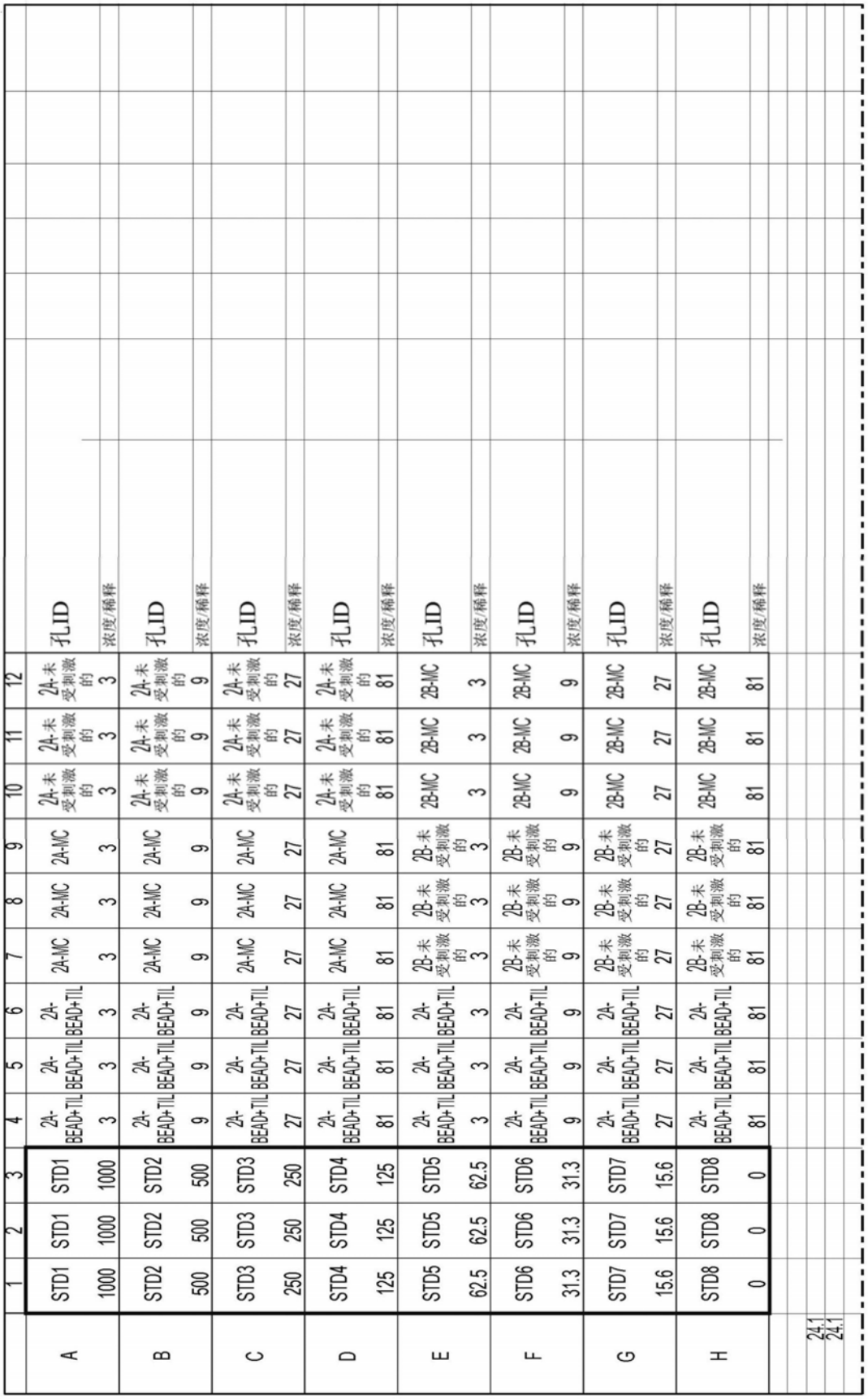

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A
STD1 STD1 STD1 2A-BEAD+TIL 2A-BEAD+TIL 2A-BEAD+TIL 2A-MC 2A-MC 2A-MC 2A-未受刺激的 2A-未受刺激的 2A-未受刺激的 孔LID
1000 1000 1000 3 3 3 3 3 3 3 3 3 浓度/稀释
B
STD2 STD2 STD2 2A-BEAD+TIL 2A-BEAD+TIL 2A-BEAD+TIL 2A-MC 2A-MC 2A-MC 2A-未受刺激的 2A-未受刺激的 2A-未受刺激的 孔LID
500 500 500 9 9 9 9 9 9 9 9 9 浓度/稀释
C
STD3 STD3 STD3 2A-BEAD+TIL 2A-BEAD+TIL 2A-BEAD+TIL 2A-MC 2A-MC 2A-MC 2A-未受刺激的 2A-未受刺激的 2A-未受刺激的 孔LID
250 250 250 27 27 27 27 27 27 27 27 27 浓度/稀释
D
STD4 STD4 STD4 2A-BEAD+TIL 2A-BEAD+TIL 2A-BEAD+TIL 2A-MC 2A-MC 2A-MC 2A-未受刺激的 2A-未受刺激的 2A-未受刺激的 孔LID
125 125 125 81 81 81 81 81 81 81 81 81 浓度/稀释
E
STD5 STD5 STD5 2A-BEAD+TIL 2A-BEAD+TIL 2A-BEAD+TIL 2B-未受刺激的 2B-未受刺激的 2B-未受刺激的 2B-MC 2B-MC 2B-MC 孔LID
62.5 62.5 62.5 3 3 3 3 3 3 3 3 3 浓度/稀释
F
STD6 STD6 STD6 2A-BEAD+TIL 2A-BEAD+TIL 2A-BEAD+TIL 2B-未受刺激的 2B-未受刺激的 2B-未受刺激的 2B-MC 2B-MC 2B-MC 孔LID
31.3 31.3 31.3 9 9 9 9 9 9 9 9 9 浓度/稀释
G
STD7 STD7 STD7 2A-BEAD+TIL 2A-BEAD+TIL 2A-BEAD+TIL 2B-未受刺激的 2B-未受刺激的 2B-未受刺激的 2B-MC 2B-MC 2B-MC 孔LID
15.6 15.6 15.6 27 27 27 27 27 27 27 27 27 浓度/稀释
H
STD8 STD8 STD8 2A-BEAD+TIL 2A-BEAD+TIL 2A-BEAD+TIL 2B-未受刺激的 2B-未受刺激的 2B-未受刺激的 2B-MC 2B-MC 2B-MC 孔LID
0 0 0 81 81 81 81 81 81 81 81 81 浓度/稀释
24.1
24.1

图32A

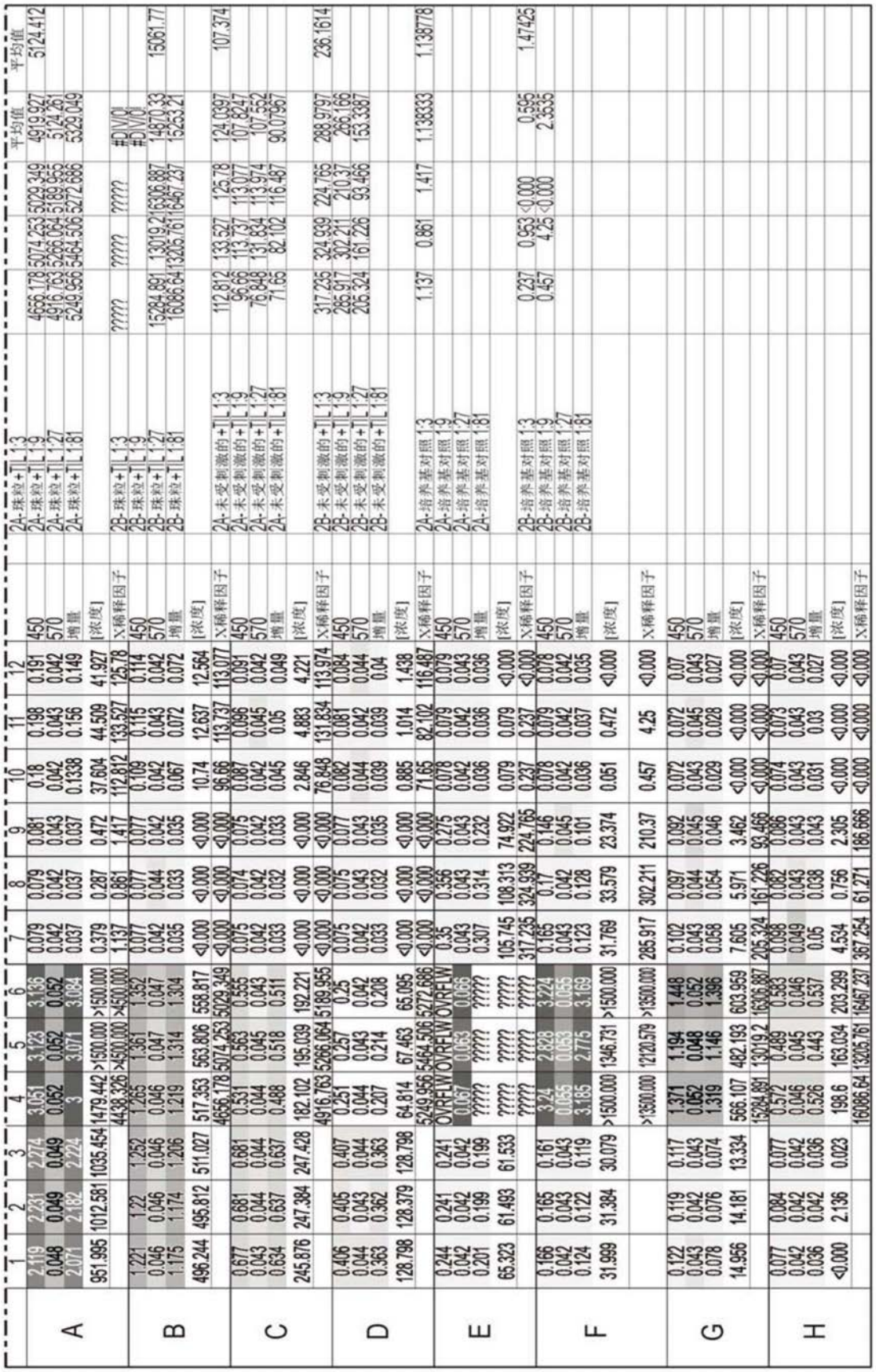


图32B

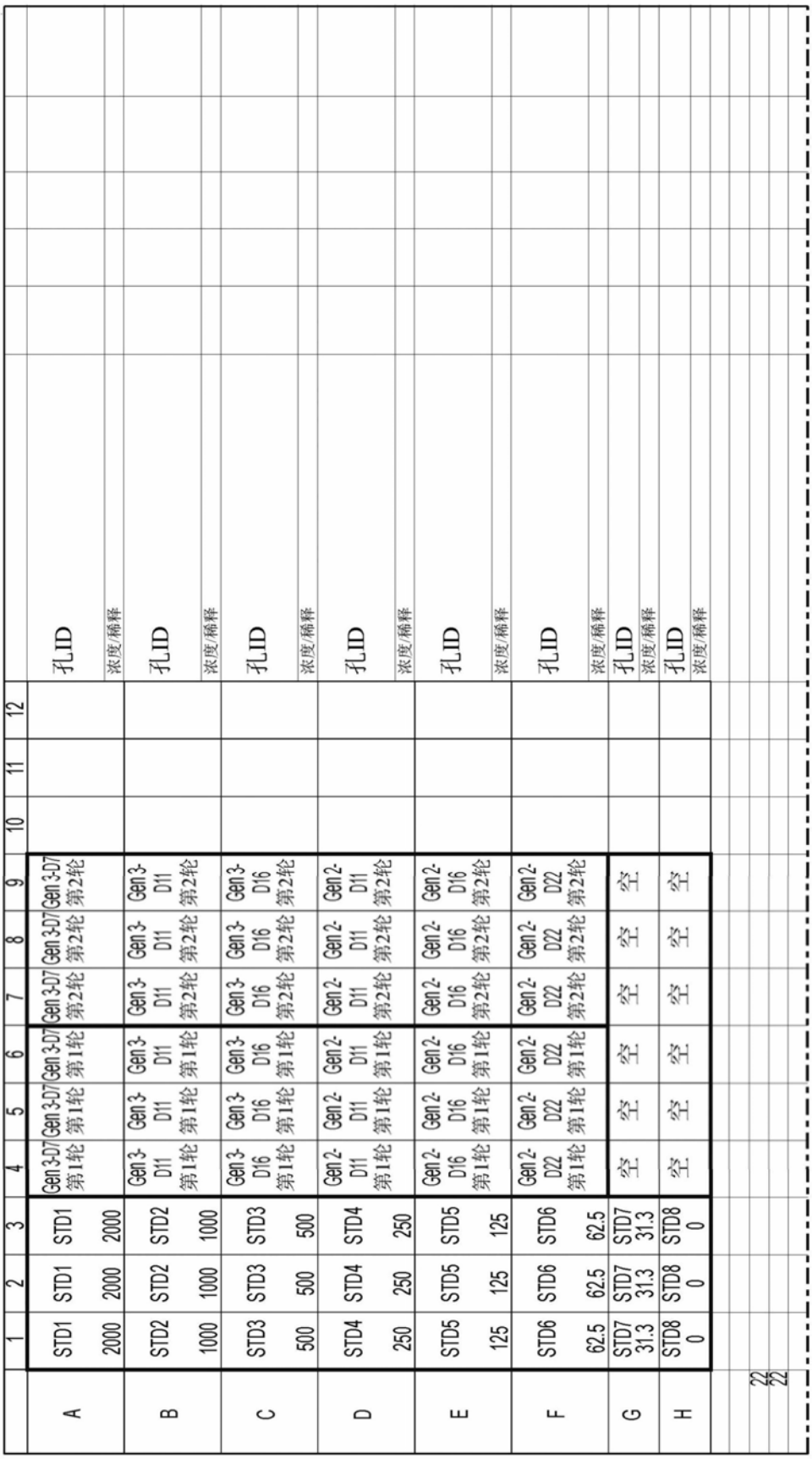
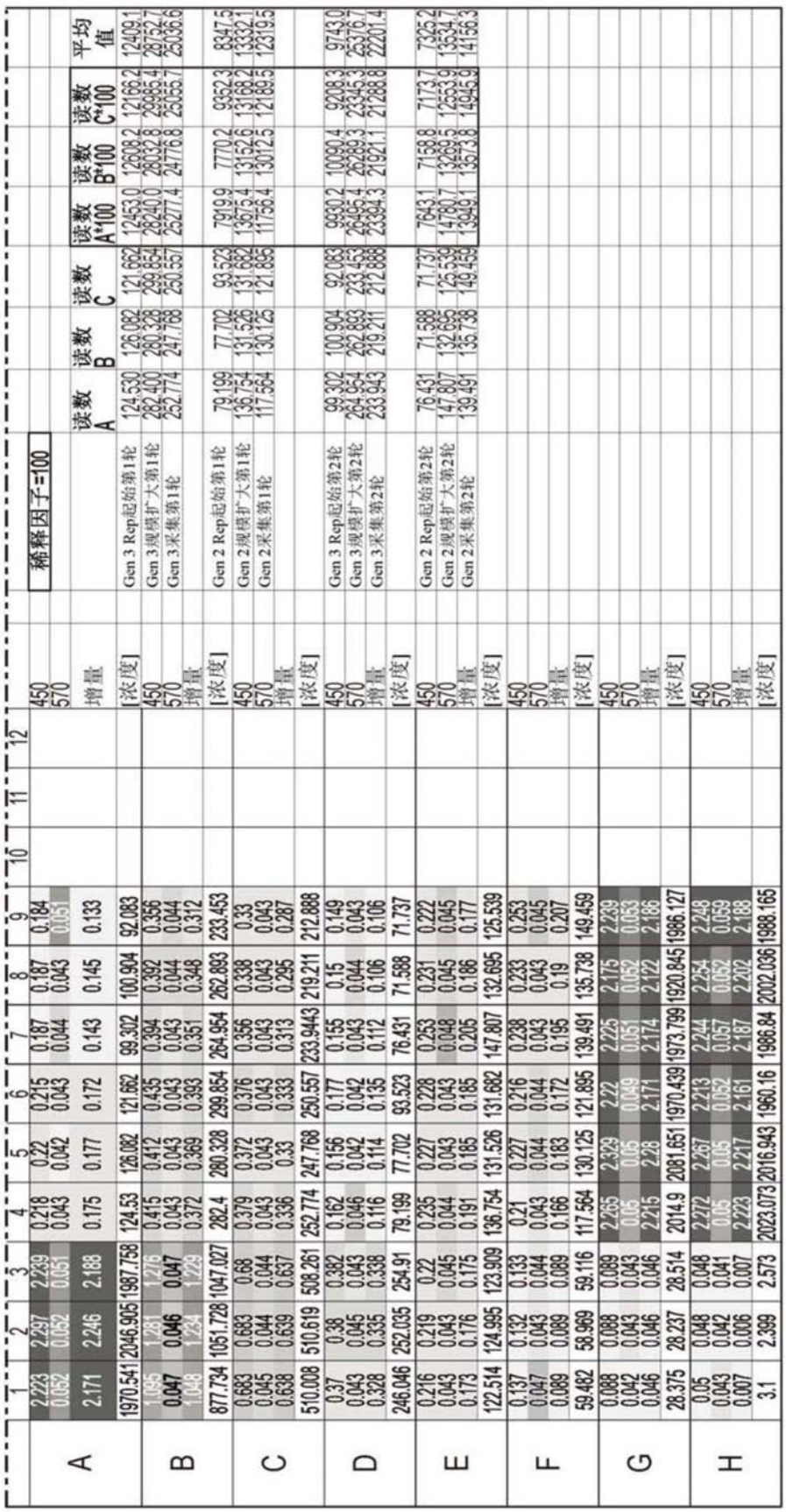

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A
B
C
D
E
F
G
H
STD1 STD1 STD1 Gen 3-D7 第1轮 Gen 3-D7 第1轮 Gen 3-D7 第1轮 Gen 3-D7 第2轮 Gen 3-D7 第2轮 Gen 3-D7 第2轮
2000 2000 2000
STD2 STD2 STD2 Gen 3-D11 第1轮 Gen 3-D11 第1轮 Gen 3-D11 第1轮 Gen 3-D11 第2轮 Gen 3-D11 第2轮 Gen 3-D11 第2轮
1000 1000 1000
STD3 STD3 STD3 Gen 3-D16 第1轮 Gen 3-D16 第1轮 Gen 3-D16 第1轮 Gen 3-D16 第2轮 Gen 3-D16 第2轮 Gen 3-D16 第2轮
500 500 500
STD4 STD4 STD4 Gen 2-D11 第1轮 Gen 2-D11 第1轮 Gen 2-D11 第1轮 Gen 2-D11 第2轮 Gen 2-D11 第2轮 Gen 2-D11 第2轮
250 250 250
STD5 STD5 STD5 Gen 2-D16 第1轮 Gen 2-D16 第1轮 Gen 2-D16 第1轮 Gen 2-D16 第2轮 Gen 2-D16 第2轮 Gen 2-D16 第2轮
125 125 125
STD6 STD6 STD6 Gen 2-D22 第1轮 Gen 2-D22 第1轮 Gen 2-D22 第1轮 Gen 2-D22 第2轮 Gen 2-D22 第2轮 Gen 2-D22 第2轮
62.5 62.5 62.5
STD7 STD7 STD7 空 空 空 空 空 空
31.3 31.3 31.3
STD8 STD8 STD8 空 空 空 空 空 空
0 0 0
孔LID
浓度/稀释
22
22

图33A



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	稀释因子=100							
A	2223	2.297	2.239	0.218	0.22	0.215	0.187	0.187	0.184					读数 A	读数 B	读数 C	读数 A*100	读数 B*100	读数 C*100	平均值
	0.052	0.052	0.051	0.043	0.042	0.043	0.044	0.043	0.051											
	2.171	2.246	2.188	0.175	0.177	0.172	0.143	0.145	0.133											
	1970.541	2046.905	1987.758	124.53	126.082	121.662	99.302	100.904	92.083				Gen 3 Rep起始第1轮	124.530	126.082	121.662	12453.0	12608.2	12166.2	12409.1
B	1.045	1.281	1.276	0.415	0.412	0.435	0.394	0.392	0.356				Gen 3规模扩大第1轮	282.400	280.328	269.854	28240.0	28032.8	26985.4	28734.7
	0.047	0.046	0.047	0.043	0.043	0.043	0.043	0.044	0.044				Gen 3采集第1轮	252.774	247.768	250.557	25277.4	24776.8	25055.7	25036.6
	1.048	1.234	1.229	0.372	0.369	0.393	0.351	0.348	0.312				增量							
	877.734	1051.728	1047.027	282.4	280.328	299.854	264.954	262.893	233.453				[浓度]	79.199	77.702	93.523	7919.9	7770.2	9352.3	8347.5
C	0.683	0.68	0.68	0.379	0.372	0.376	0.356	0.338	0.33				450	136.754	131.526	131.662	13675.4	13152.6	13166.2	13331.1
	0.045	0.044	0.044	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043				570	117.564	130.125	121.895	11756.4	13012.5	12189.5	12319.5
	0.638	0.639	0.637	0.336	0.33	0.333	0.313	0.295	0.287				增量							
	510.008	510.619	508.261	252.774	247.768	250.557	233.9443	219.211	212.888				[浓度]							
D	0.37	0.38	0.382	0.162	0.166	0.177	0.155	0.15	0.149				450	99.302	100.904	92.083	9930.2	10090.4	9208.3	9743.0
	0.043	0.045	0.043	0.046	0.042	0.042	0.043	0.044	0.043				570	264.954	262.893	233.453	26495.4	26289.3	23345.3	25376.7
	0.328	0.335	0.338	0.116	0.114	0.135	0.112	0.106	0.106				增量	233.943	219.211	212.888	23394.3	21921.1	21288.8	22201.4
	246.046	252.035	254.91	79.199	77.702	93.523	76.431	71.588	71.737				[浓度]							
E	0.216	0.219	0.22	0.235	0.227	0.228	0.253	0.231	0.222				450	76.431	71.588	71.737	7643.1	7158.8	7173.7	7325.2
	0.043	0.043	0.045	0.044	0.043	0.043	0.048	0.045	0.045				570	147.807	132.695	125.539	14780.7	13269.5	12553.9	13534.7
	0.173	0.176	0.175	0.191	0.185	0.185	0.205	0.186	0.177				增量	139.491	135.738	149.459	13949.1	13573.8	14945.9	14156.3
	122.514	124.995	123.909	136.754	131.526	131.682	147.807	132.695	125.539				[浓度]							
F	0.137	0.132	0.133	0.21	0.227	0.216	0.238	0.233	0.253				450							
	0.047	0.043	0.044	0.043	0.044	0.044	0.043	0.043	0.045				570							
	0.089	0.089	0.089	0.166	0.183	0.172	0.195	0.19	0.207				增量							
	59.482	58.969	59.116	117.564	130.125	121.895	139.491	135.738	149.459				[浓度]							
G	0.088	0.088	0.089	2.265	2.329	2.22	2.225	2.175	2.239				450							
	0.042	0.043	0.043	0.05	0.05	0.049	0.051	0.052	0.053				570							
	0.046	0.046	0.046	2.215	2.28	2.171	2.174	2.122	2.186				增量							
	28.375	28.237	28.514	2014.9	2081.651	1970.439	1973.799	1920.845	1986.127				[浓度]							
H	0.05	0.048	0.048	2.272	2.267	2.213	2.244	2.254	2.248				450							
	0.043	0.042	0.041	0.05	0.05	0.052	0.057	0.052	0.059				570							
	0.007	0.006	0.007	2.223	2.217	2.161	2.187	2.202	2.188				增量							
	3.1	2.399	2.573	2023.073	2016.943	1960.16	1986.84	2002.036	1988.165				[浓度]							

图33B

样品号	说明	葡萄糖（g/L）	乳酸（g/L）	氨（mmol/L）	谷氨酰胺（mmol/L）	Glutamax（mmol/L）	Glutamax-谷氨酰胺（mmol/L）
1	Gen 2-Rep起始第一轮#L4054	1.78	0.14	2.16	1.56	1.71	0.16
2	Gen 2-规模扩大第一轮#L4054	1.36	0.89	1.40	1.76	1.90	0.15
3	Gen 2-采集第一轮 #L4054	0.83	1.68	2.46	1.69	1.85	0.17
4	Gen 3-REP起始第一轮#L4054	1.68	0.29	1.76	2.11	2.29	0.18
5	Gen 3-规模扩大第一轮#L4054	1.28	0.94	1.64	1.70	1.87	0.16
6	Gen 3-采集第一轮 #L4054	1.07	1.53	2.23	1.39	1.54	0.14
7	Gen 2-Rep起始第二轮 #L4055	1.91	0.08	2.29	1.60	1.74	0.14
8	Gen 2-规模扩大第二轮 #L4055	1.61	0.77	1.40	1.78	1.93	0.15
9	Gen 2-采集第二轮 #L4055	0.85	1.86	2.46	1.39	1.55	0.16
10	Gen 3-REP起始第二轮 #L4055	1.77	0.18	1.74	2.06	2.23	0.17
11	Gen 3-规模扩大第二轮 #L4055	1.60	0.72	1.54	1.68	1.84	0.15
12	Gen 3-采集第二轮 #L4055	1.44	1.32	2.07	1.79	1.95	0.16

图34

	$FIL	S/L/1301	几何	S/L/Pt	几何均值（FL03-A）
A1 gen2L4054 ne	A1 gen2L4054 neg.fcs		34.5		3.24
A2 gen2L4054 ne	A2 gen2L4054 neg.fcs		34		3.19
A3 gen2L4054 po	A3 gen2L4054 pos.fcs		1834		70.6
A4 gen2L4054 po	A4 gen2L4054 pos.fcs		1872		70.3
A5 gen2L4055 ne	A5 gen2L4055 neg.fcs		31.9		4.23
A6 gen2L4055 ne	A6 gen2L4055 neg.fcs		32.4		4.87
A7 gen2L4055 po	A7 gen2L4055 pos.fcs		1941		88.7
A8 gen2L4055 po	A8 gen2L4055 pos.fcs		1933		91.1
B1 gen3L4054 ne	B1 gen3L4054 neg.fcs		31.2		3.45
B2 gen3L4054 ne	B2 gen3L4054 neg.fcs		31.9		3.39
B3 gen3L4054 po	B3 gen3L4054 pos.fcs		2016		61.3
B4 gen3L4054 po	B4 gen3L4054 pos.fcs		2014		76.2
B5 gen3L4055 ne	B5 gen3L4055 neg.fcs		33.7		6.76
B6 gen3L4055 ne	B6 gen3L4055 neg.fcs		35.4		6.7
B7 gen3L4055 po	B7 gen3L4055 pos.fcs		2158		99.4
B8 gen3L4055 po	B8 gen3L4055 pos.fcs		1938		99.5
均值	-		998		43.3
SD	-		999		41.3

图35

研究	样品	样品id	物种	链	读段	CDR3	独特CDR3	D50
20180511_研究1_FCA	Gen2-L4054	59990	TRB	h	1181732	1181732	8915	0
20180511_研究1_FCA	Gen3-L4054	59991	TRB	h	1145697	1145697	18130	0
20180511_研究1_FCA	Gen2-L4055	59987	TRB	h	1166465	1166465	12996	0.1
20180511_研究1_FCA	Gen3-L4055	59982	TRB	h	1059985	1059985	27246	0.9

图36

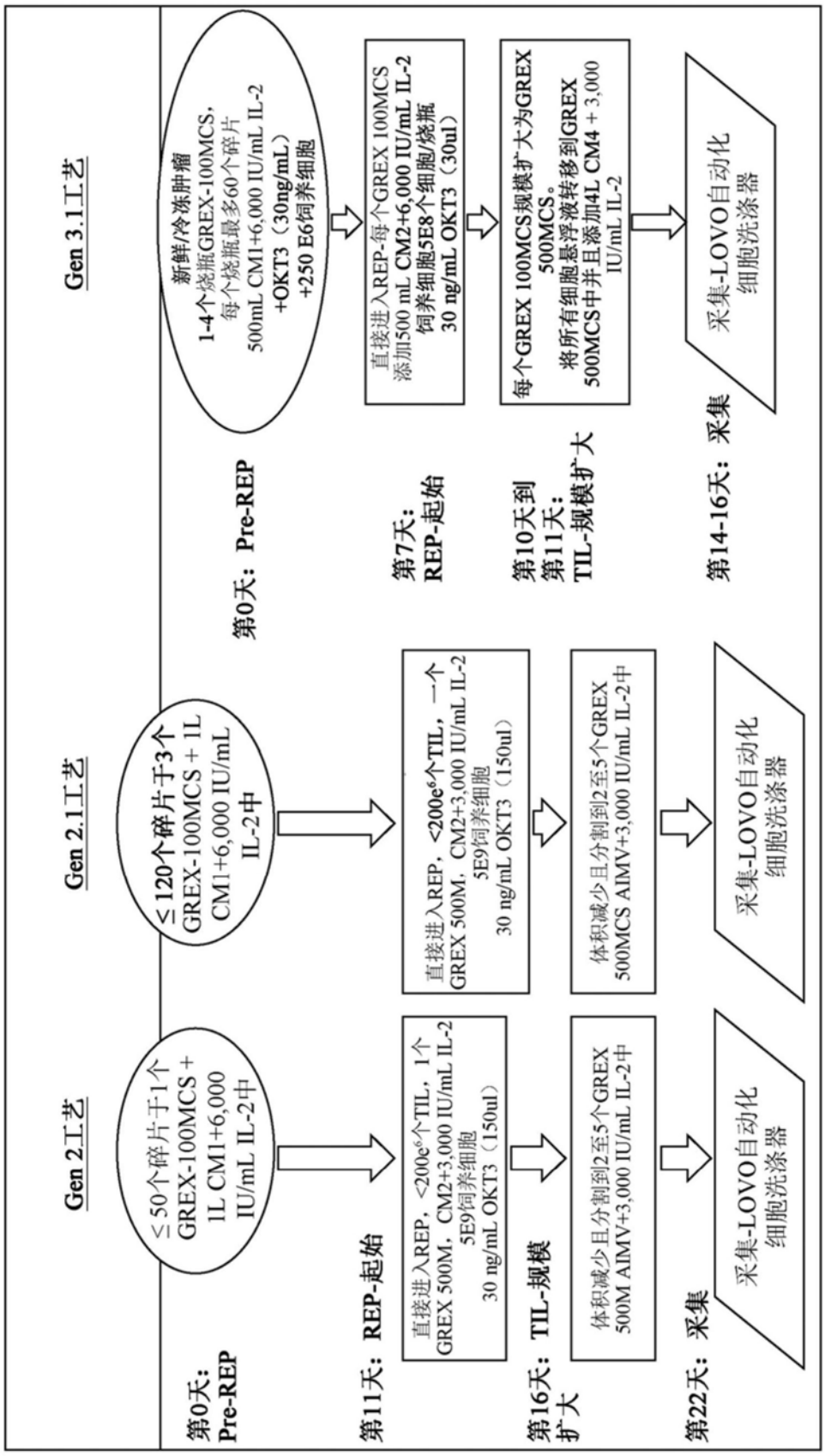
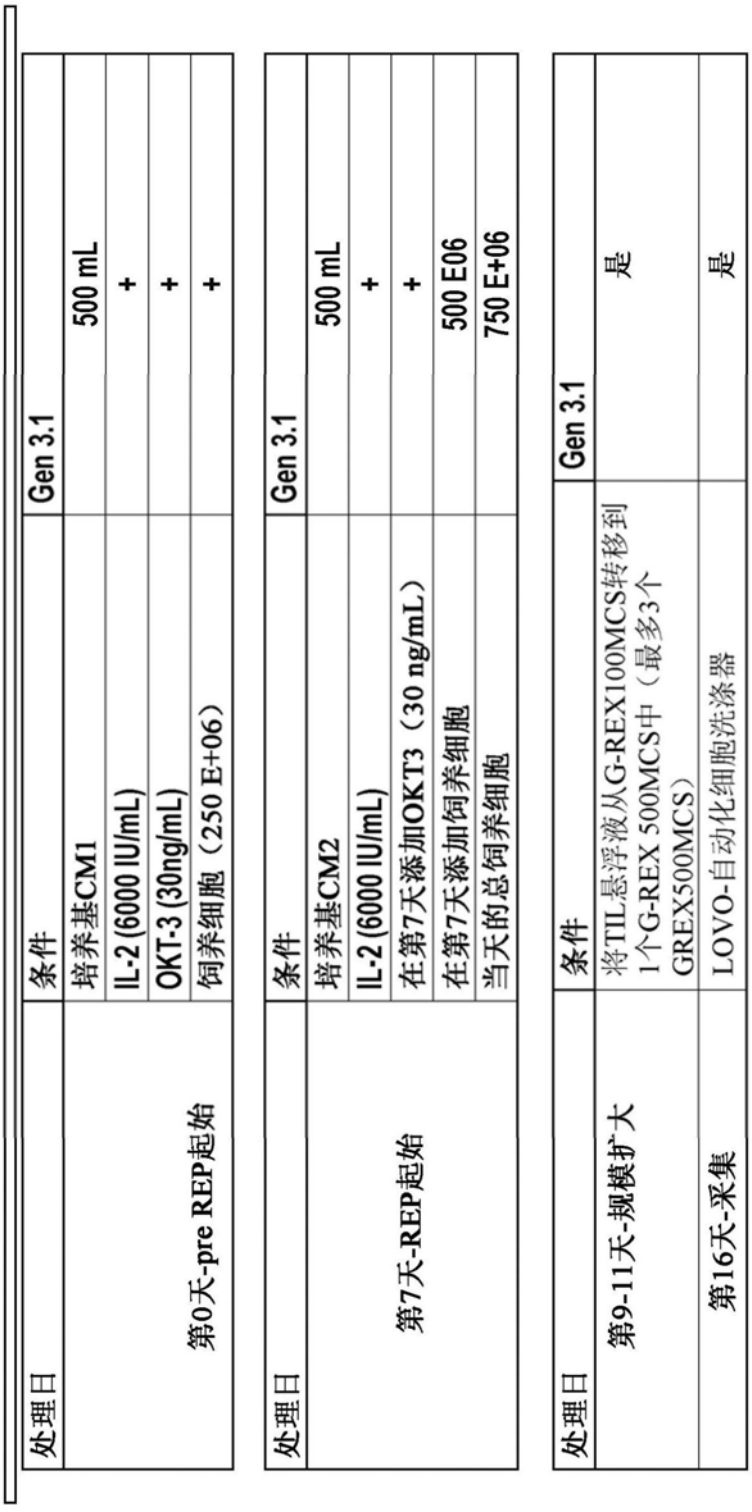

Gen 2工艺
Gen 2.1工艺
Gen 3.1工艺
第0天：
Pre-REP
≤ 50个碎片于1个
GREX-100MCS +
1L CM1+6,000
IU/mL IL-2中
≤ 120个碎片于3个
GREX-100MCS + 1L
CM1+6,000 IU/mL
IL-2中
第0天：Pre-REP
新鲜/冷冻肿瘤
1-4个烧瓶GREX-100MCS，
每个烧瓶最多60个碎片
500mL CM1+6,000 IU/mL IL-2
+OKT3（30ng/mL）
+250 E6饲养细胞
第11天：REP-起始
直接进入REP，<200e6个TIL，1个
GREX 500M，CM2+3,000 IU/mL IL-2
5E9饲养细胞
30 ng/mL OKT3（150ul）
直接进入REP，<200e6个TIL，一个
GREX 500M，CM2+3,000 IU/mL IL-2
5E9饲养细胞
30 ng/mL OKT3（150ul）
第7天：
REP-起始
直接进入REP-每个GREX 100MCS
添加500 mL CM2+6,000 IU/mL IL-2
饲养细胞5E8个细胞/烧瓶
30 ng/mL OKT3（30ul）
第16天：
扩大
TIL-规模
体积减少且分割到2至5个GREX
500M AIMV+3,000 IU/mL IL-2中
体积减少且分割到2至5个GREX
500MCS AIMV+3,000 IU/mL IL-2中
第10天到
第11天：
TIL-规模扩大
每个GREX 100MCS规模扩大为GREX
500MCS。
将所有细胞悬浮液转移到GREX
500MCS中并且添加4L CM4 + 3,000
IU/mL IL-2
第22天：采集
采集-LOVO自动化
细胞洗涤器
采集-LOVO自动化
细胞洗涤器
第14-16天：采集
采集-LOVO自动化
细胞洗涤器

图37

步骤	Gen 2	Gen 2.1	Gen 3.0优化
Pre REP-第0天	≤50个碎片/1个G-Rex 100MCS-11天	≤180个碎片/3个G-Rex 100MCS，提前调配的CM1 温热培养基-11天	***新鲜或冷冻肿瘤*** 整个肿瘤具有≤30个碎片，每1个G-Rex.100MCS 最多60个碎片（最多4个G-Rex）， 提前调配的温热培养基-7天。**Pre REP，** **2.5 E8个饲养细胞+ OKT-3（30ng/mL）**
REP-起始	直接进入REP-第11天- **<200 E6个TIL** 1 G-Rex 500MCS	直接进入REP-第11天- **<200 E6个TIL** 在一个G-Rex 500MCS中 提前调配CM2温热培养基	直接进入REP-第7天-**所有细胞TIL-相同的** **G-Rex 100MCS（100MCS，最多4个GREX），** **标准培养基或确定成分培养基（无血清）。** **添加5 E8个饲养细胞+OKT-3（30ng/mL）**
TIL增殖或规模扩大	1至5个G-REX 500MCS **第16天分割**	2至5个G-REX 500MCS 提前调配的CM4温热培养基 **第16天分割**	将TIL悬浮液从G-REX 100MCS转移到G-REX 500MCS中，最多4个REX 500MCS-标准培养基 或确定成分培养基（无血清） **在第10天或第11天规模扩大**
采集	**第22天采集，** LOVO自动化细胞洗涤器	**第22天采集，** LOVO自动化细胞洗涤器 （5个洗涤循环）	**第14天或第16天采集** LOVO自动化细胞洗涤器（5个洗涤循环）
最终调配	冷冻保存产物 300IU/ml IL2-CS10于LN_2中， 多个等分试样	冷冻保存产物 300IU/ml IL2-CS10于LN_2中， 多个等分试样	冷冻保存产物 300IU/ml IL2-CS10于LN_2中， 多个等分试样
工艺时间	**22天**	**22天**	**16天**

图38



处理日	条件	Gen 3.1
第0天-pre REP起始	培养基CM1	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	OKT-3 (30ng/mL)	+
	饲养细胞（250 E+06）	+

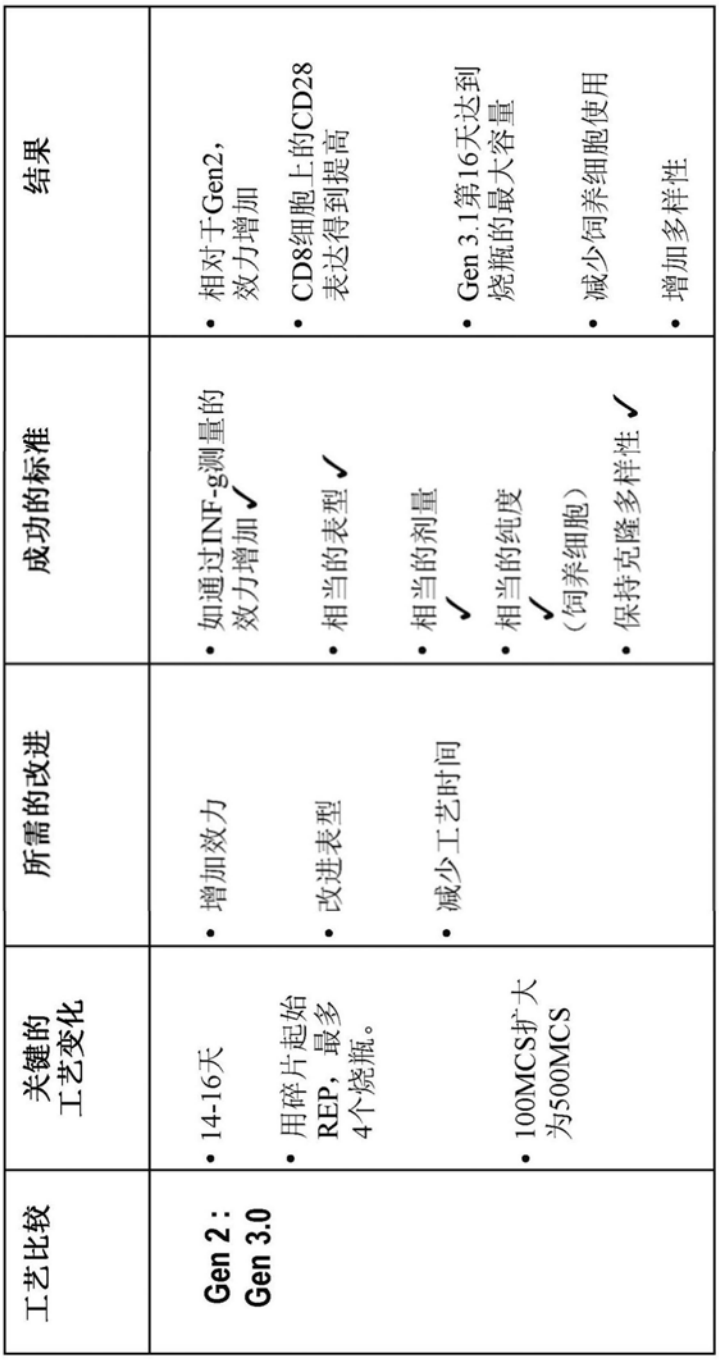
处理日	条件	Gen 3.1
第7天-REP起始	培养基CM2	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	在第7天添加OKT3（30 ng/mL）	+
	在第7天添加饲养细胞	500 E06
	当天的总饲养细胞	750 E+06

处理日	条件	Gen 3.1
第9-11天-规模扩大	将TIL悬浮液从G-REX100MCS转移到1个G-REX 500MCS中（最多3个GREX500MCS）	是
第16天-采集	LOVO-自动化细胞洗涤器	是

图39

工艺比较	关键的工艺变化	优势
Gen 2 : Gen 2.1	• 用两个烧瓶而非一个烧瓶来起始工艺 • 将REP起始饲养层分配在2个G-Rex500MCS烧瓶中 • 提前调配培养基并且在使用之前进行温热	• 最终细胞计数（剂量）可能随着TIL库的增加而加倍。 • 整个工艺中存在过程冗余
Gen 2.1 : Gen 3.1	• 新鲜或冷冻肿瘤 • 14-16天的工艺（从第22天开始） • 工艺中的总饲养层减少 • 第0天存在饲养层和OKT3 • 用碎片起始REP • 100MCS扩大为500MCS • 规模扩大为多个pre-REP烧瓶 • 标准培养基和确定成分培养基（无血清）	• 增加效力 • 改进表型 • 减少工艺时间 • 减少试剂测试 • 降低工艺可变性 • 确定成分试剂 • 增加库 • 减少杂质（饲养细胞） • 相当或更高的剂量。

图40



工艺比较	关键的工艺变化	所需的改进	成功的标准	结果
Gen 2：Gen 3.0	• 14-16天 • 用碎片起始REP，最多4个烧瓶。 • 100MCS扩大为500MCS	• 增加效力 • 改进表型 • 减少工艺时间	• 如通过INF-g测量的效力增加✓ • 相当的表型✓ • 相当的剂量✓ • 相当的纯度✓（饲养细胞） • 保持克隆多样性✓	• 相对于Gen2，效力增加 • CD8细胞上的CD28表达得到提高 • Gen 3.1第16天达到烧瓶的最大容量 • 减少饲养细胞使用 • 增加多样性

图41

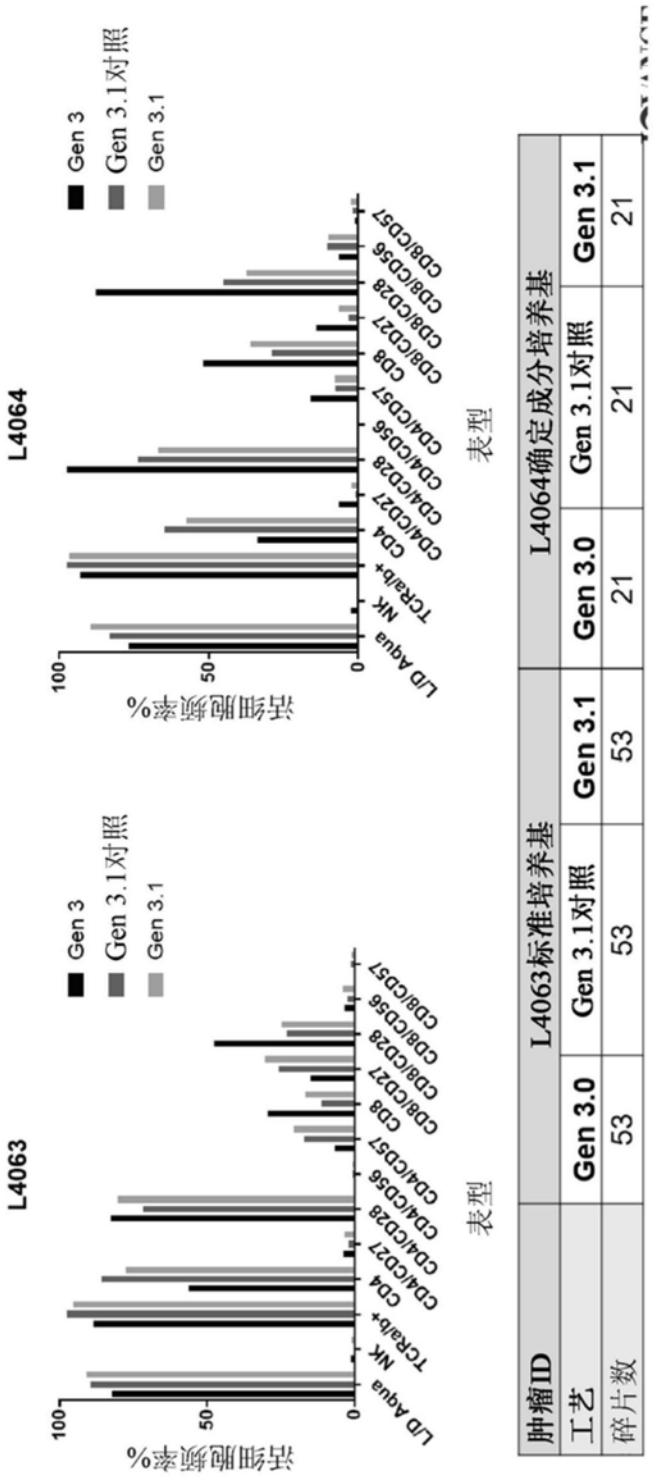
工艺	Gen 2	Gen 3
L4054	标准培养基	标准培养基
L4055	标准培养基	标准培养基
M1085T	标准培养基	标准培养基

标准培养基：
Pre REP: CM1
REP起始：CM2
分割或规模扩大：CM4

工艺	Gen 3	Gen 3.1对照	Gen 3.1
L4063	标准培养基	标准培养基	标准培养基
L4064	确定成分培养基	确定成分培养基	确定成分培养基

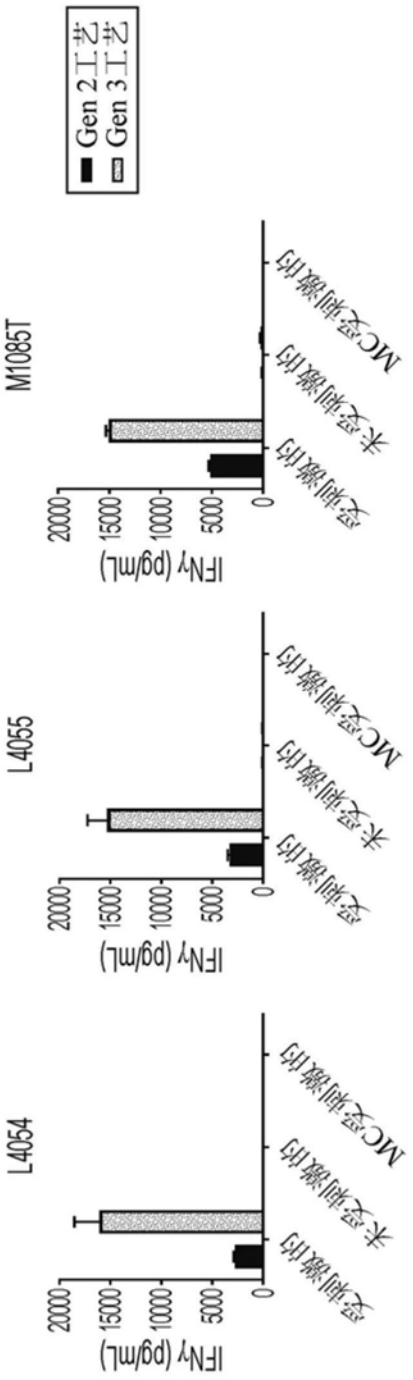
确定成分培养基：
在工艺中的每一天使用CTS Optimizer（无血清培养基）

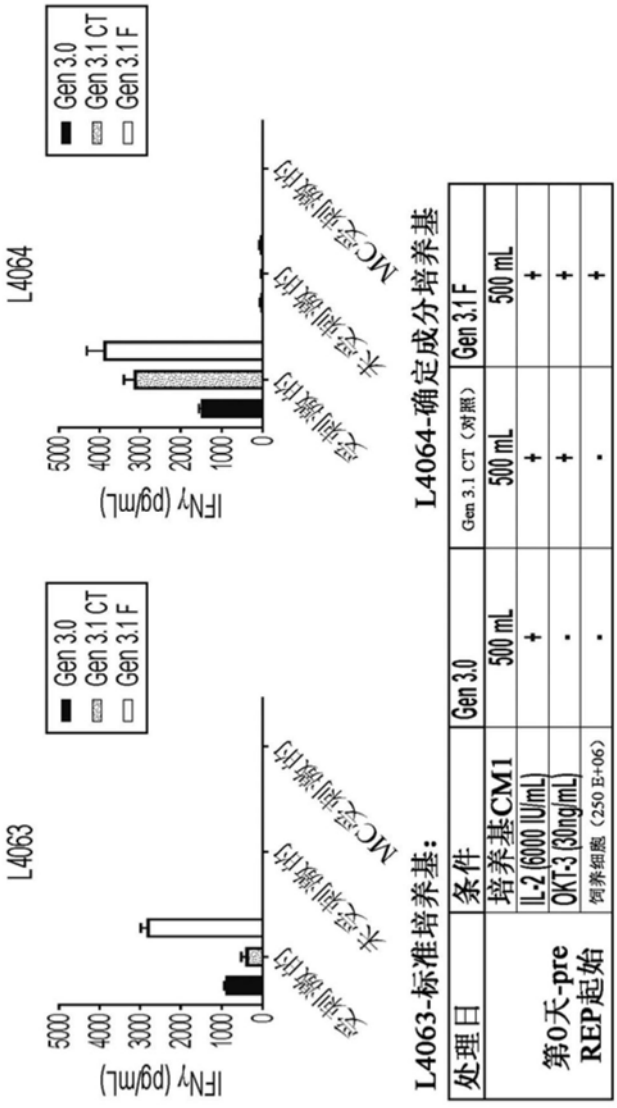
图42



肿瘤ID	L4063标准培养基			L4064确定成分培养基		
工艺	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1
碎片数	53	53	53	21	21	21

图43





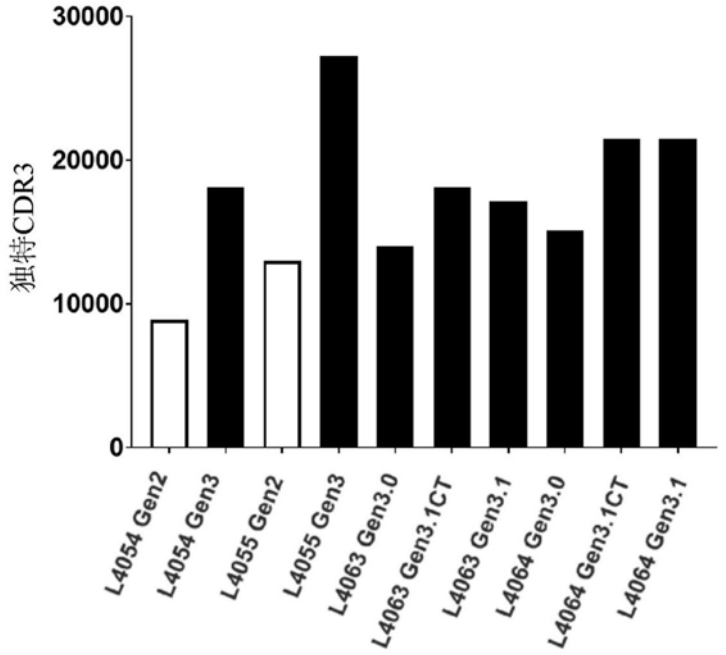
L4063-标准培养基：

处理日	条件	Gen 3.0
第0天-pre REP起始	培养基CM1	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	OKT-3 (30ng/mL)	-
	饲养细胞（250 E+06）	-

L4064-确定成分培养基

处理日	条件	Gen 3.1 CT（对照）	Gen 3.1F
第0天-pre REP起始	培养基CM1	500 mL	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+	+
	OKT-3 (30ng/mL)	+	+
	饲养细胞（250 E+06）	-	+

图44


30000
20000
10000
0
独特CDR3
L4054 Gen2
L4054 Gen3
L4055 Gen2
L4055 Gen3
L4063 Gen3.0
L4063 Gen3.1CT
L4063 Gen3.1
L4064 Gen3.0
L4064 Gen3.1CT
L4064 Gen3.1

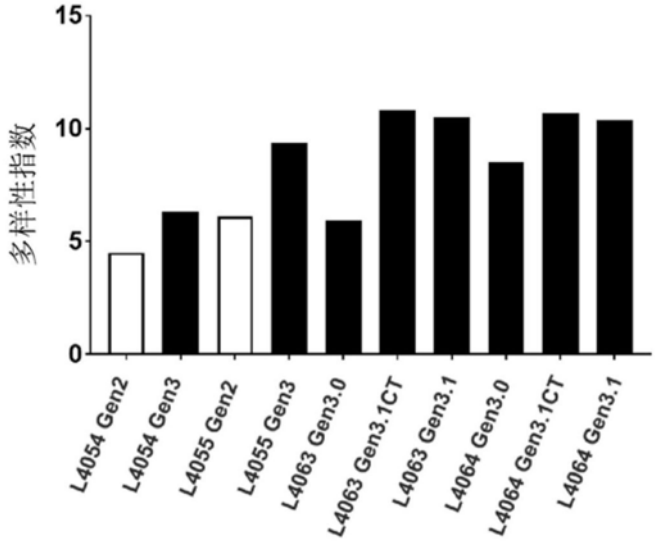
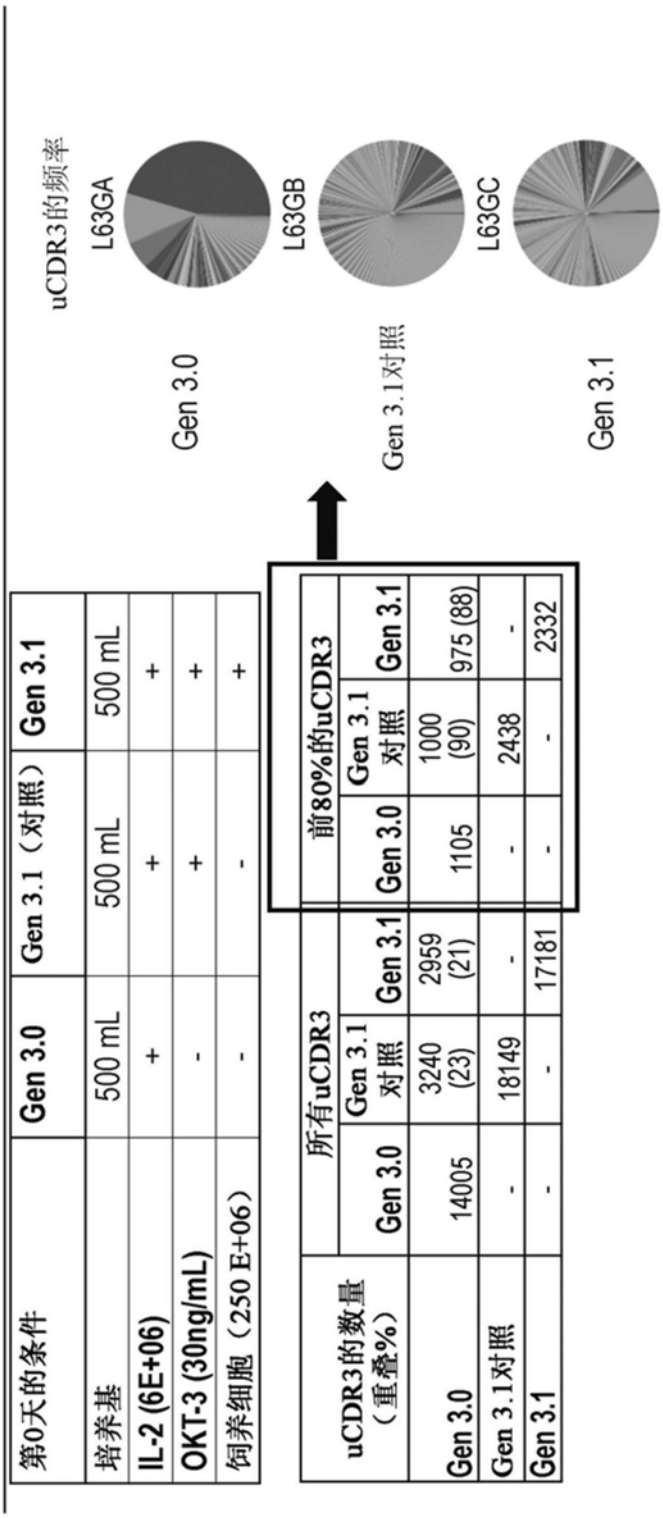

15
10
5
0
多样性指数
L4054 Gen2
L4054 Gen3
L4055 Gen2
L4055 Gen3
L4063 Gen3.0
L4063 Gen3.1CT
L4063 Gen3.1
L4064 Gen3.0
L4064 Gen3.1CT
L4064 Gen3.1

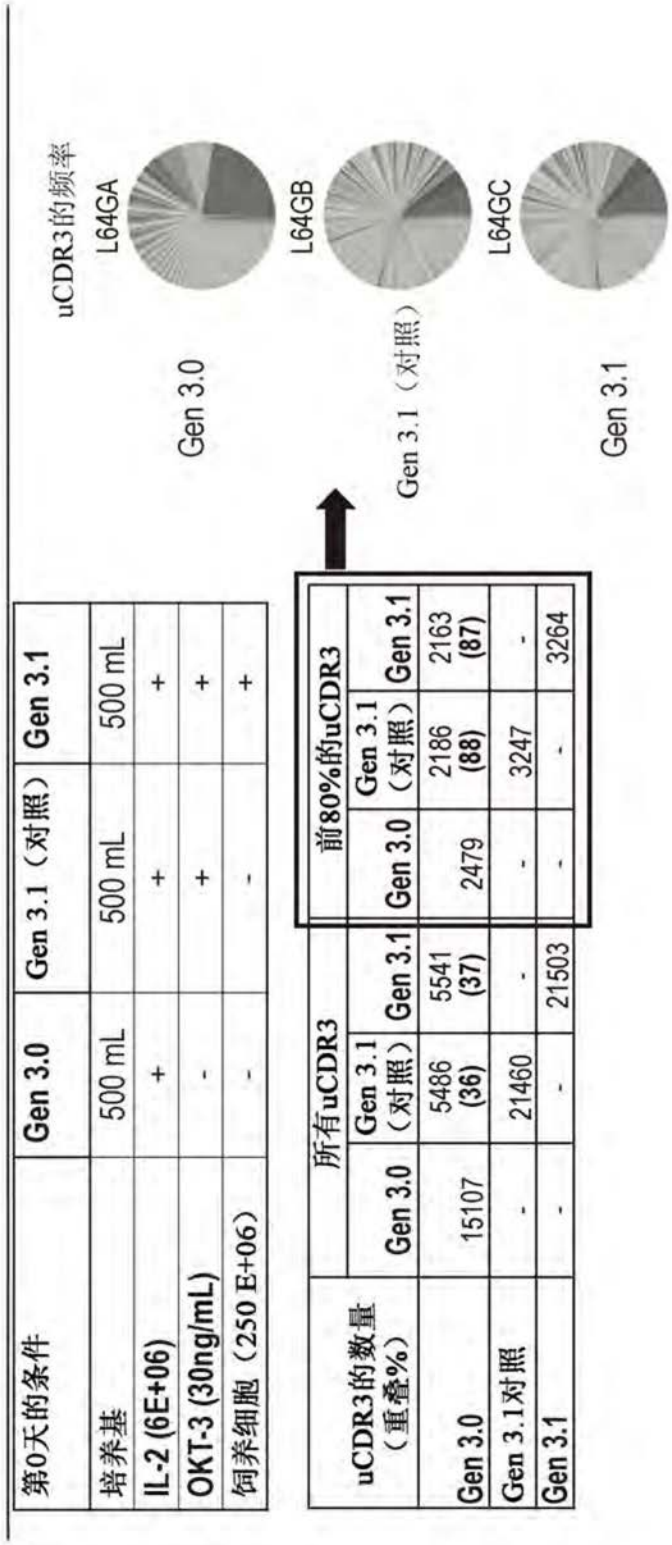
图45



第0天的条件	Gen 3.0	Gen 3.1（对照）	Gen 3.1
培养基	500 mL	500 mL	500 mL
IL-2 (6E+06)	+	+	+
OKT-3 (30ng/mL)	-	+	+
饲养细胞（250 E+06）	-	-	+

uCDR3的数量（重叠%）	所有uCDR3			前80%的uCDR3		
	Gen 3.0	Gen 3.1 对照	Gen 3.1	Gen 3.0	Gen 3.1 对照	Gen 3.1
Gen 3.0	14005	3240 (23)	2959 (21)	1105	1000 (90)	975 (88)
Gen 3.1对照	-	18149	-	-	2438	-
Gen 3.1	-	-	17181	-	-	2332

图46



第0天的条件	Gen 3.0	Gen 3.1（对照）	Gen 3.1
培养基	500 mL	500 mL	500 mL
IL-2 (6E+06)	+	+	+
OKT-3 (30ng/mL)	-	+	+
饲养细胞（250 E+06）	-	-	+

uCDR3的数量（重叠%）	所有uCDR3			前80%的uCDR3		
	Gen 3.0	Gen 3.1（对照）	Gen 3.1	Gen 3.0	Gen 3.1（对照）	Gen 3.1
Gen 3.0	15107	5486 (36)	5541 (37)	2479	2186 (88)	2163 (87)
Gen 3.1对照	-	21460	-	-	3247	-
Gen 3.1	-	-	21503	-	-	3264

图47

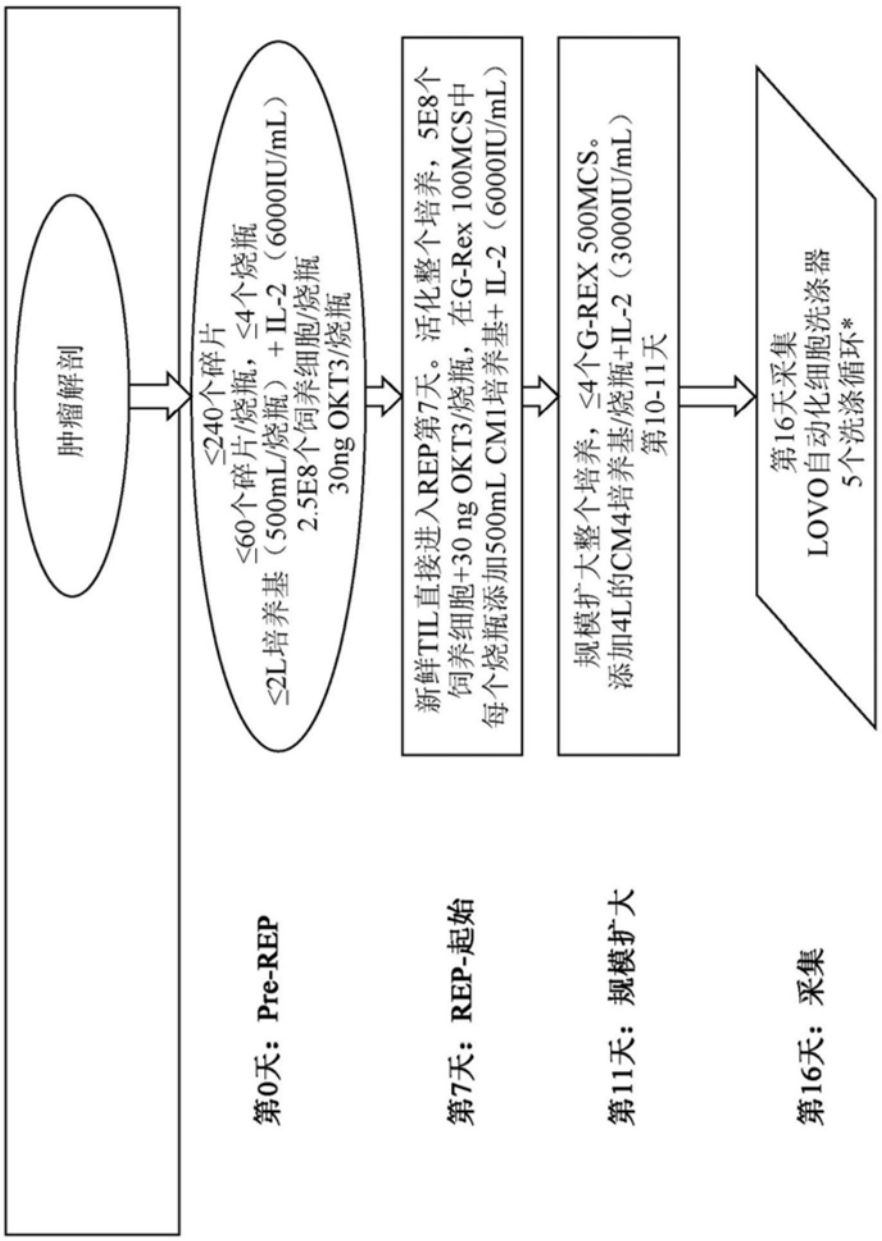

肿瘤解剖
≤240个碎片
≤60个碎片/烧瓶，≤4个烧瓶
≤2L培养基（500mL/烧瓶）+IL-2（6000IU/mL）
2.5E8个饲养细胞/烧瓶
30ng OKT3/烧瓶
新鲜TIL直接进入REP第7天。活化整个培养，5E8个
饲养细胞+30 ng OKT3/烧瓶，在G-Rex 100MCS中
每个烧瓶添加500mL CM1培养基+ IL-2（6000IU/mL）
规模扩大整个培养，≤4个G-REX 500MCS。
添加4L的CM4培养基/烧瓶+IL-2（3000IU/mL）
第10-11天
第16天采集
LOVO自动化细胞洗涤器
5个洗涤循环*
第0天：Pre-REP
第7天：REP-起始
第11天：规模扩大
第16天：采集

图48

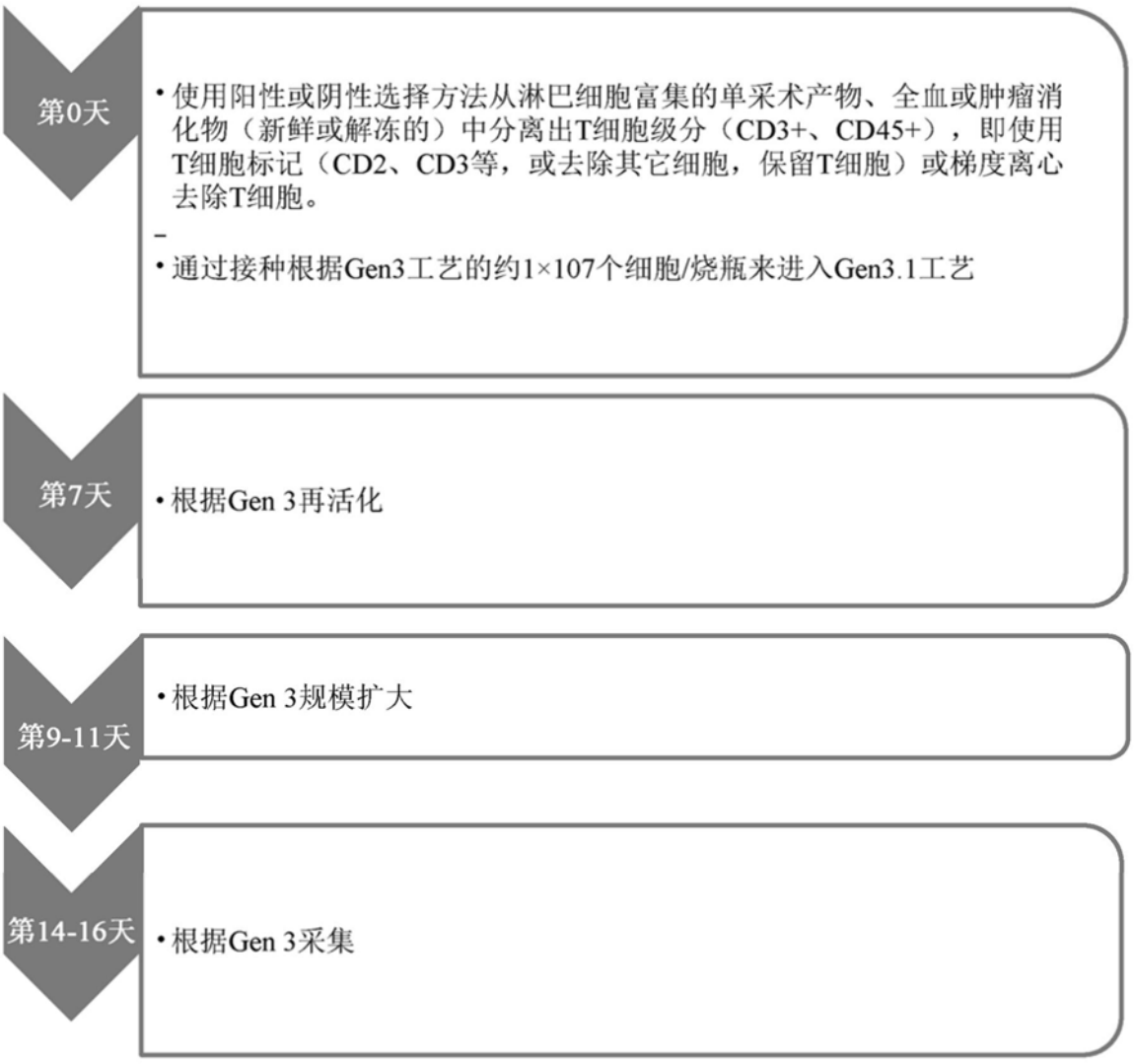

第0天
• 使用阳性或阴性选择方法从淋巴细胞富集的单采术产物、全血或肿瘤消化物（新鲜或解冻的）中分离出T细胞级分（CD3+、CD45+），即使用T细胞标记（CD2、CD3等，或去除其它细胞，保留T细胞）或梯度离心去除T细胞。
–
• 通过接种根据Gen3工艺的约1×107个细胞/烧瓶来进入Gen3.1工艺
第7天
• 根据Gen 3再活化
第9-11天
• 根据Gen 3规模扩大
第14-16天
• 根据Gen 3采集

图49

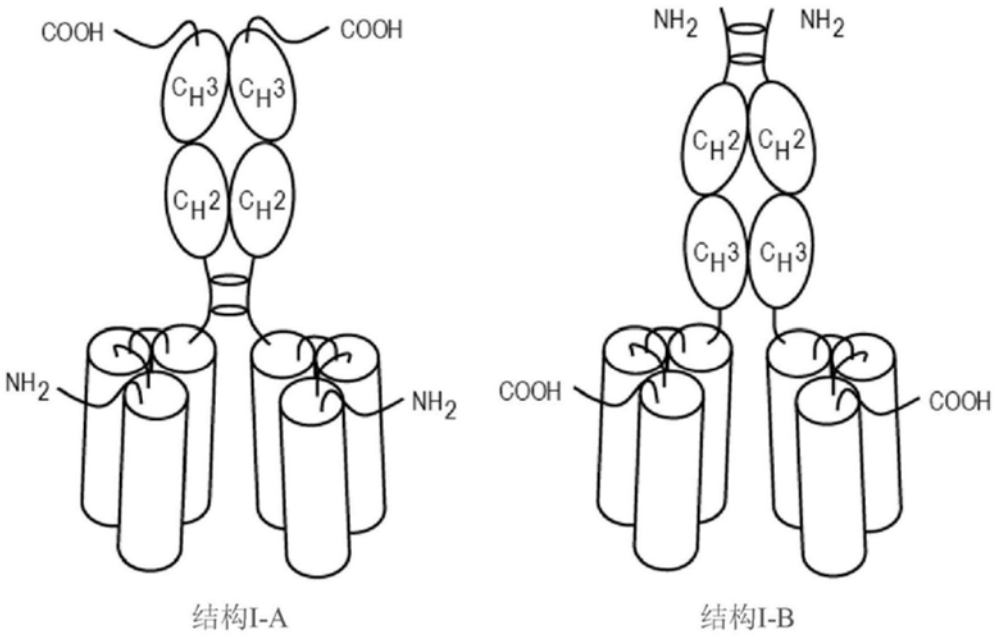

COOH
COOH
C_H3
C_H3
C_H2
C_H2
NH_2
NH_2
结构I-A
NH_2
NH_2
C_H2
C_H2
C_H3
C_H3
COOH
COOH
结构I-B

图50

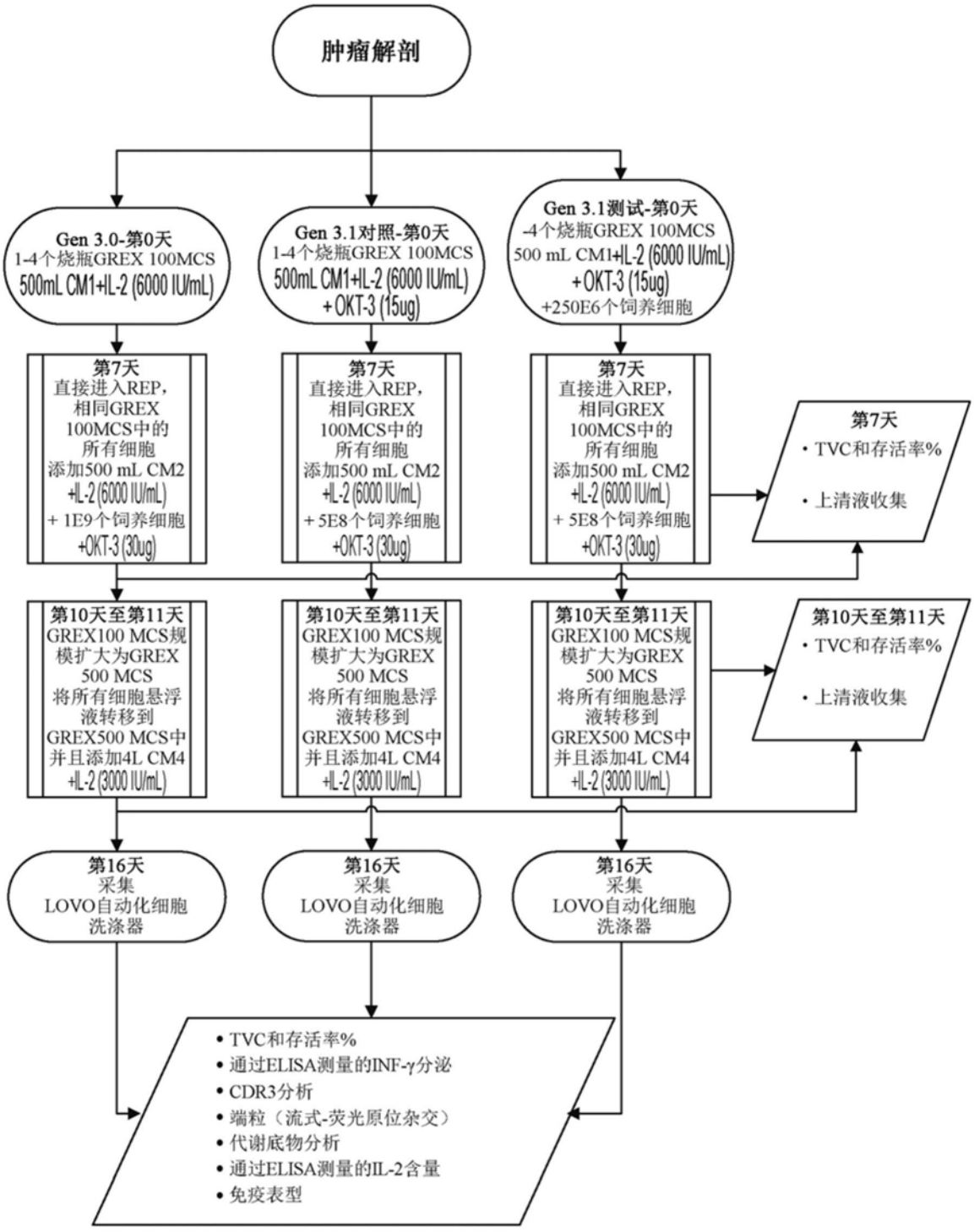
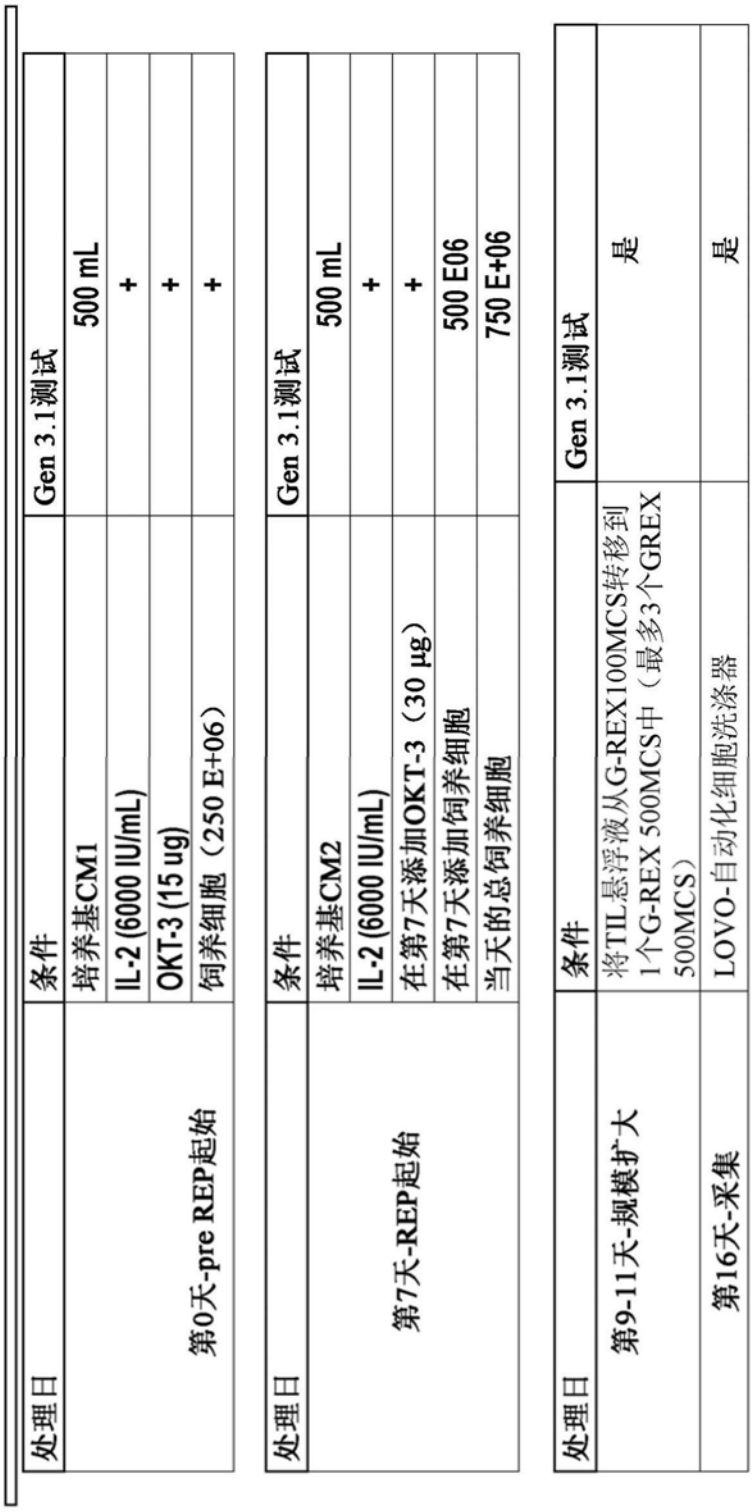

肿瘤解剖
Gen 3.0-第0天
1-4个烧瓶GREX 100MCS
500mL CM1+IL-2 (6000 IU/mL)
Gen 3.1对照-第0天
1-4个烧瓶GREX 100MCS
500mL CM1+IL-2 (6000 IU/mL)
+OKT-3 (15ug)
Gen 3.1测试-第0天
-4个烧瓶GREX 100MCS
500 mL CM1+IL-2 (6000 IU/mL)
+OKT-3 (15ug)
+250E6个饲养细胞
第7天
直接进入REP，
相同GREX
100MCS中的
所有细胞
添加500 mL CM2
+IL-2 (6000 IU/mL)
+ 1E9个饲养细胞
+OKT-3 (30ug)
第7天
直接进入REP，
相同GREX
100MCS中的
所有细胞
添加500 mL CM2
+IL-2 (6000 IU/mL)
+ 5E8个饲养细胞
+OKT-3 (30ug)
第7天
直接进入REP，
相同GREX
100MCS中的
所有细胞
添加500 mL CM2
+IL-2 (6000 IU/mL)
+ 5E8个饲养细胞
+OKT-3 (30ug)
第7天
• TVC和存活率%
• 上清液收集
第10天至第11天
GREX100 MCS规
模扩大为GREX
500 MCS
将所有细胞悬浮
液转移到
GREX500 MCS中
并且添加4L CM4
+IL-2 (3000 IU/mL)
第10天至第11天
GREX100 MCS规
模扩大为GREX
500 MCS
将所有细胞悬浮
液转移到
GREX500 MCS中
并且添加4L CM4
+IL-2 (3000 IU/mL)
第10天至第11天
GREX100 MCS规
模扩大为GREX
500 MCS
将所有细胞悬浮
液转移到
GREX500 MCS中
并且添加4L CM4
+IL-2 (3000 IU/mL)
第10天至第11天
• TVC和存活率%
• 上清液收集
第16天
采集
LOVO自动化细胞
洗涤器
第16天
采集
LOVO自动化细胞
洗涤器
第16天
采集
LOVO自动化细胞
洗涤器
• TVC和存活率%
• 通过ELISA测量的INF-γ分泌
• CDR3分析
• 端粒（流式-荧光原位杂交）
• 代谢底物分析
• 通过ELISA测量的IL-2含量
• 免疫表型

图51

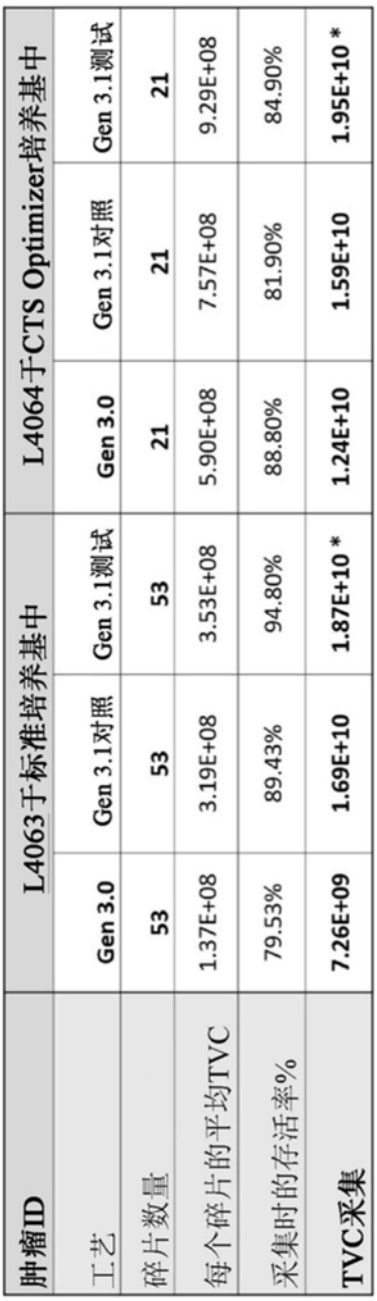


处理日	条件	Gen 3.1测试
第0天-pre REP起始	培养基CM1	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	OKT-3 (15 ug)	+
	饲养细胞（250 E+06）	+

处理日	条件	Gen 3.1测试
第7天-REP起始	培养基CM2	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	在第7天添加OKT-3（30 μg）	+
	在第7天添加饲养细胞	500 E06
	当天的总饲养细胞	750 E+06

处理日	条件	Gen 3.1测试
第9-11天-规模扩大	将TIL悬浮液从G-REX100MCS转移到1个G-REX 500MCS中（最多3个GREX 500MCS）	是
第16天-采集	LOVO-自动化细胞洗涤器	是

图52



肿瘤ID	L4063于标准培养基中			L4064于CTS Optimizer培养基中		
工艺	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试
碎片数量	53	53	53	21	21	21
每个碎片的平均TVC	1.37E+08	3.19E+08	3.53E+08	5.90E+08	7.57E+08	9.29E+08
采集时的存活率%	79.53%	89.43%	94.80%	88.80%	81.90%	84.90%
TVC采集	7.26E+09	1.69E+10	1.87E+10 *	1.24E+10	1.59E+10	1.95E+10 *

图53

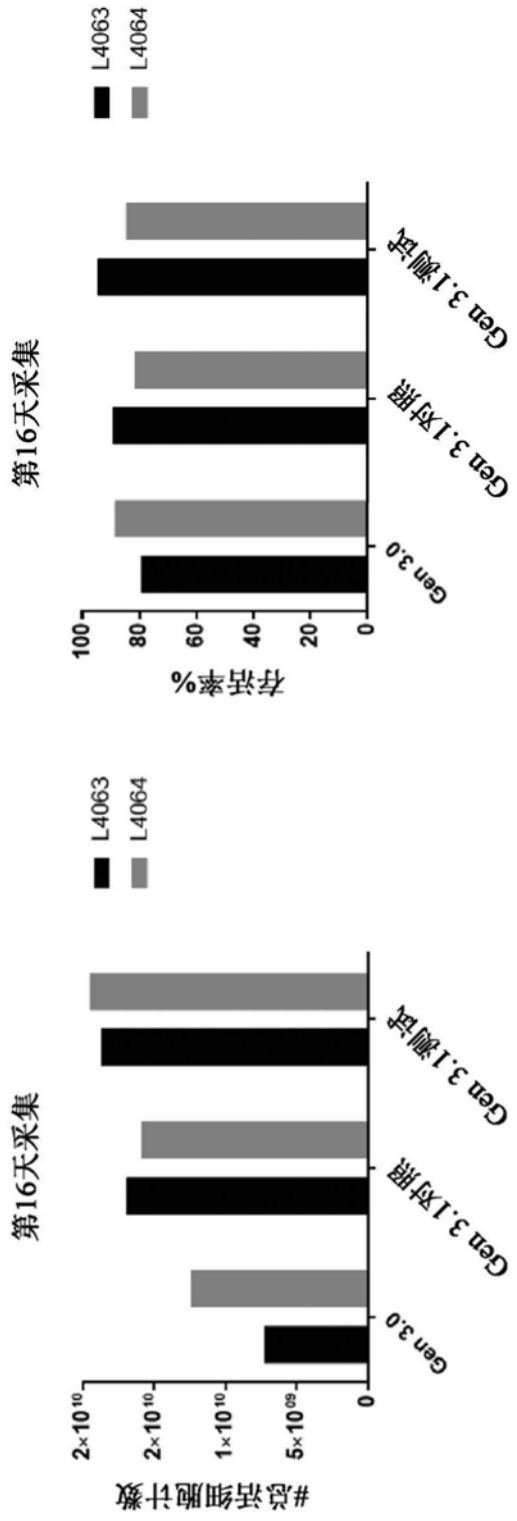
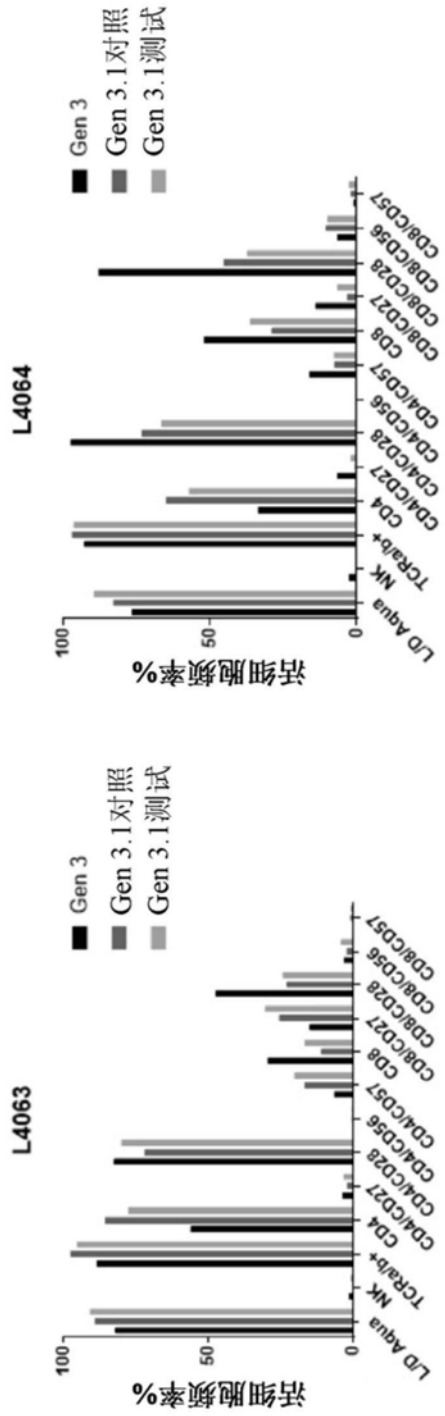

L4063
L4064
存活率%
0
20
40
60
80
100
Gen 3.0
Gen 3.1 对照
Gen 3.1 测试
第16天采集
L4063
L4064
#总活细胞计数
0
5×10^09
1×10^10
2×10^10
2×10^10
Gen 3.0
Gen 3.1 对照
Gen 3.1 测试
第16天采集

图54



肿瘤ID	L4063标准培养基			L4064确定成分培养基		
工艺	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试
#碎片	53	53	53	21	21	21

图55

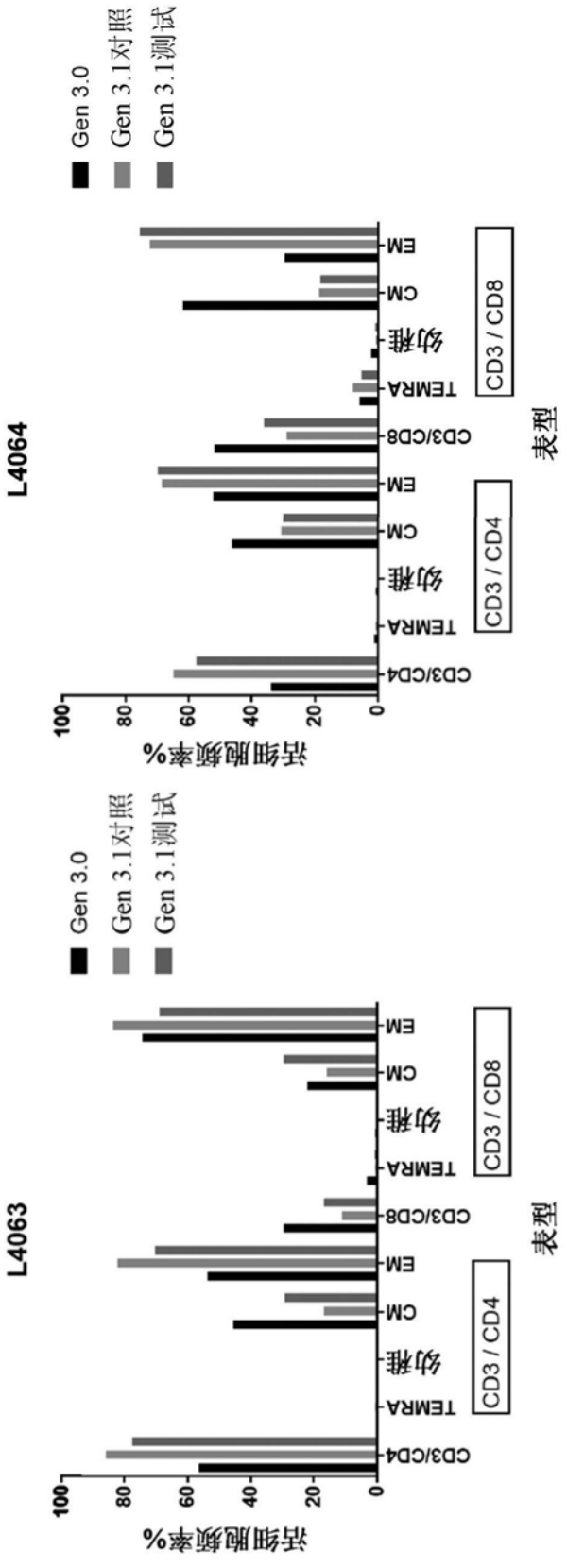

Gen 3.0
Gen 3.1对照
Gen 3.1测试
L4064
活细胞频率%
100
80
60
40
20
0
CD3/CD4
TEMRA
幼稚
CM
EM
CD3/CD8
CD3 / CD4
CD3 / CD8
表型
Gen 3.0
Gen 3.1对照
Gen 3.1测试
L4063
活细胞频率%
表型

图56

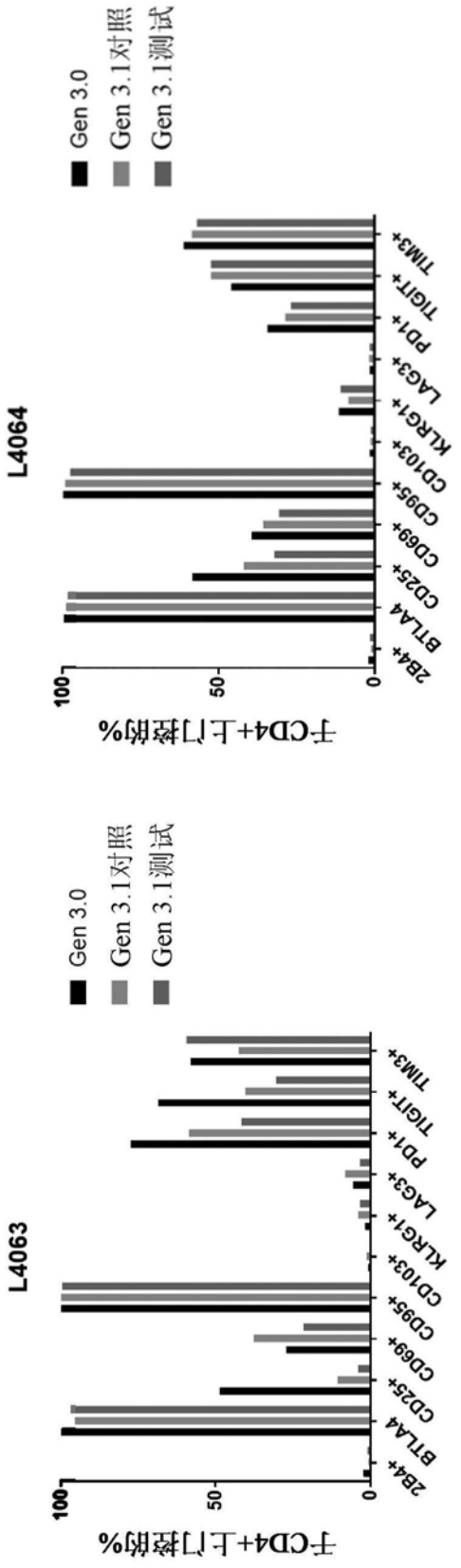

L4064
Gen 3.0
Gen 3.1对照
Gen 3.1测试
子CD4+上门控的%
100
50
0
2B4+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+
L4063
Gen 3.0
Gen 3.1对照
Gen 3.1测试
子CD4+上门控的%
100
50
0
2B4+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+

图57

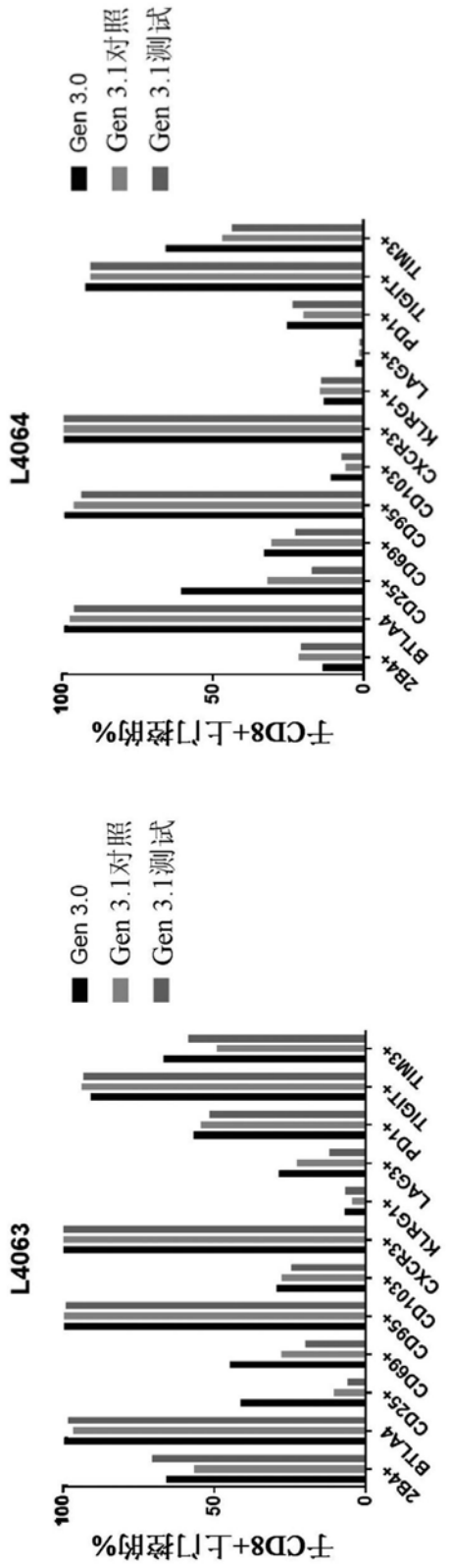
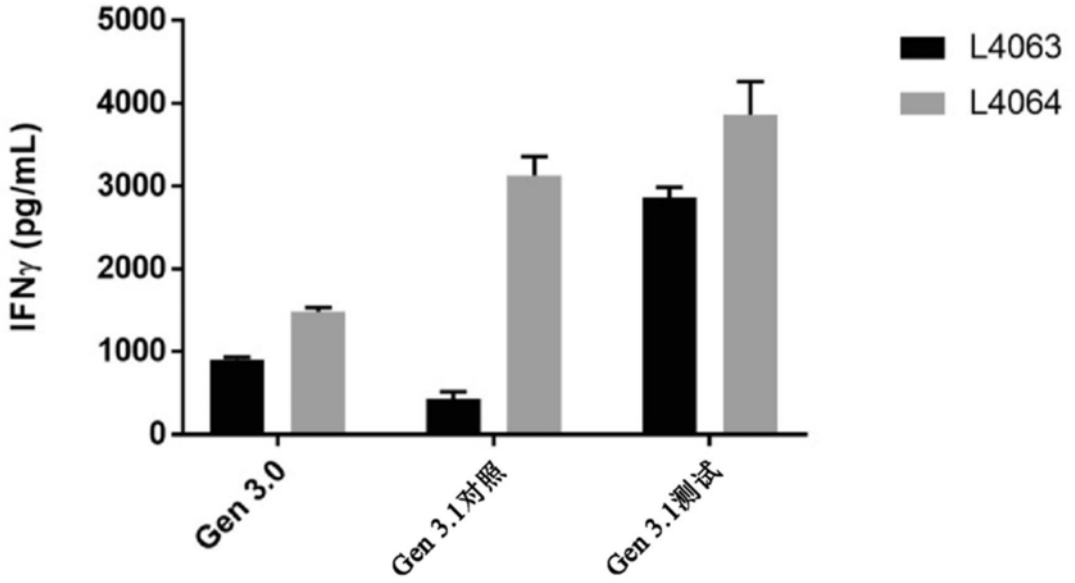

Gen 3.0
Gen 3.1对照
Gen 3.1测试
L4064
L4063
子CD8+上门控的%
100
50
0
2B4+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
CXCR3+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+

图58



处理日	条件	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试
第0天-pre REP起始	培养基CM1	500 mL	500 mL	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+	+	+
	OKT-3 (30ng/mL)	-	+	+
	饲养细胞（250 E+06）	-	-	+

© 2016, Iovance Biotherapeutics

图59

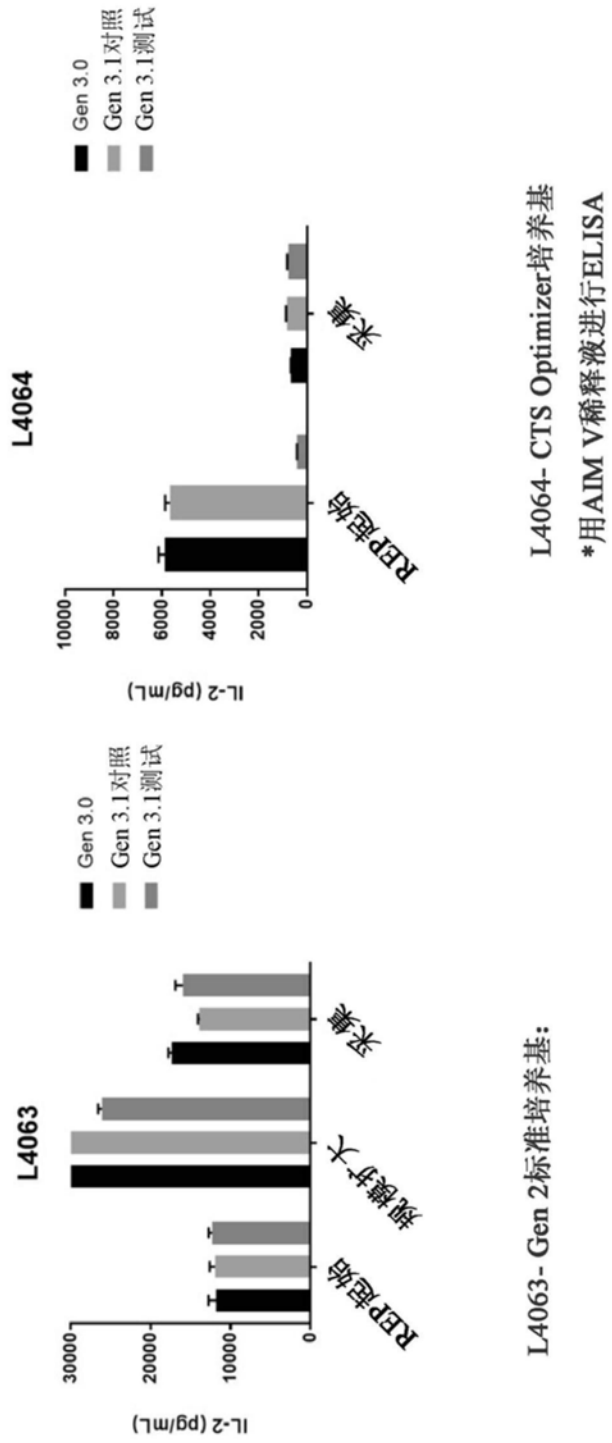

L4064
Gen 3.0
Gen 3.1对照
Gen 3.1测试
IL-2 (pg/mL)
10000
8000
6000
4000
2000
0
REP底物
未暴
L4064- CTS Optimizer培养基
*用AIM V稀释液进行ELISA
L4063
Gen 3.0
Gen 3.1对照
Gen 3.1测试
IL-2 (pg/mL)
30000
20000
10000
0
REP底物
抑制扩大
未暴
L4063- Gen 2标准培养基:

图60

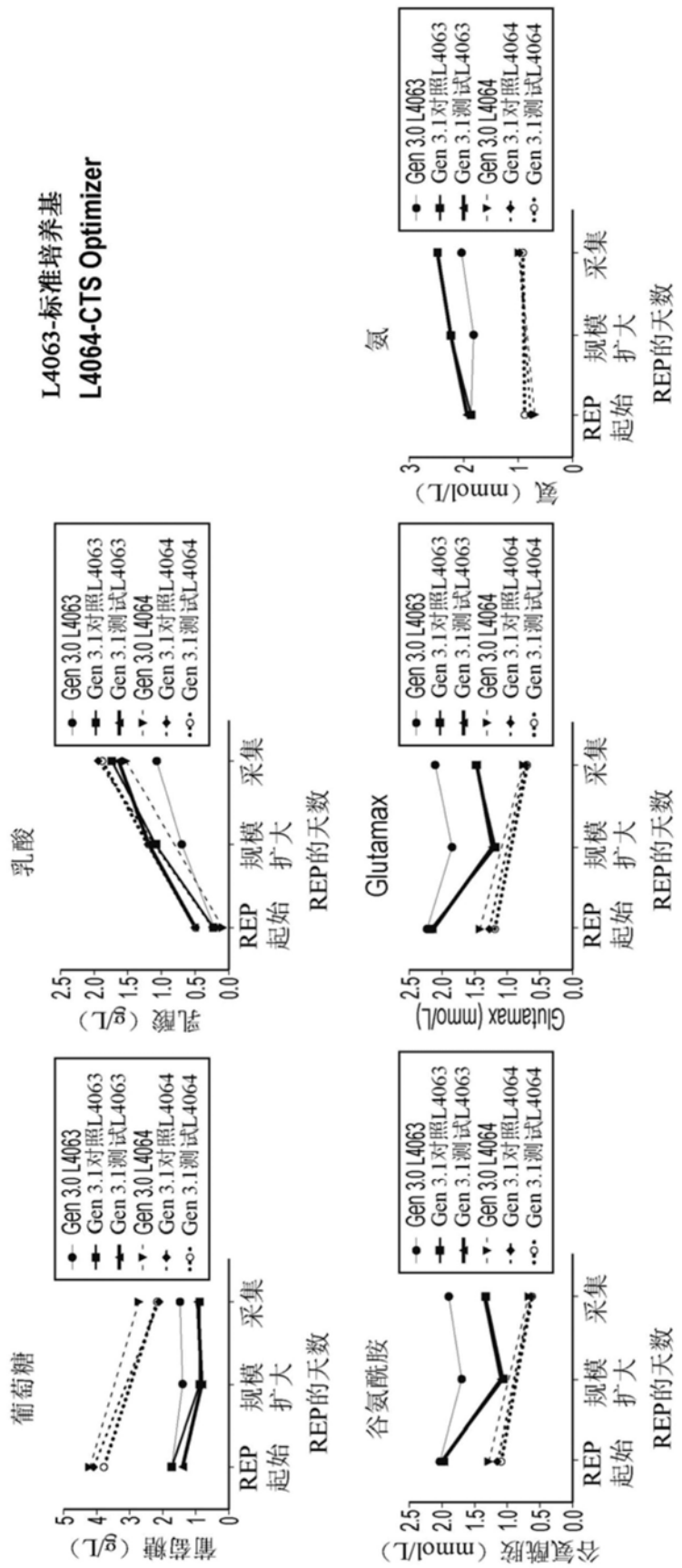

L4063-标准培养基
L4064-CTS Optimizer
葡萄糖
乳酸
谷氨酰胺
Glutamax
氨
Gen 3.0 L4063
Gen 3.1对照L4063
Gen 3.1测试L4063
Gen 3.0 L4064
Gen 3.1对照L4064
Gen 3.1测试L4064
REP 起始
规模 扩大
采集
REP的天数

图61

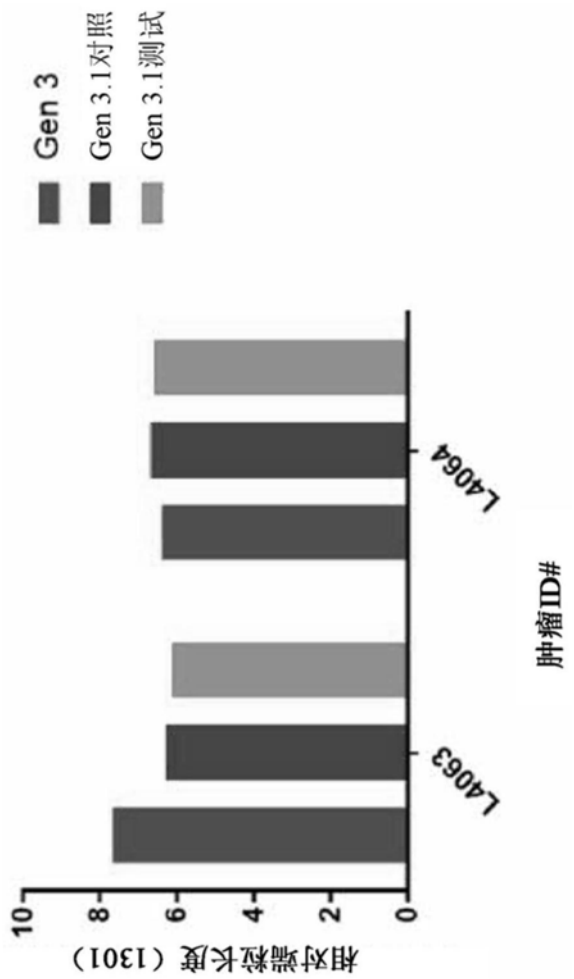


图62

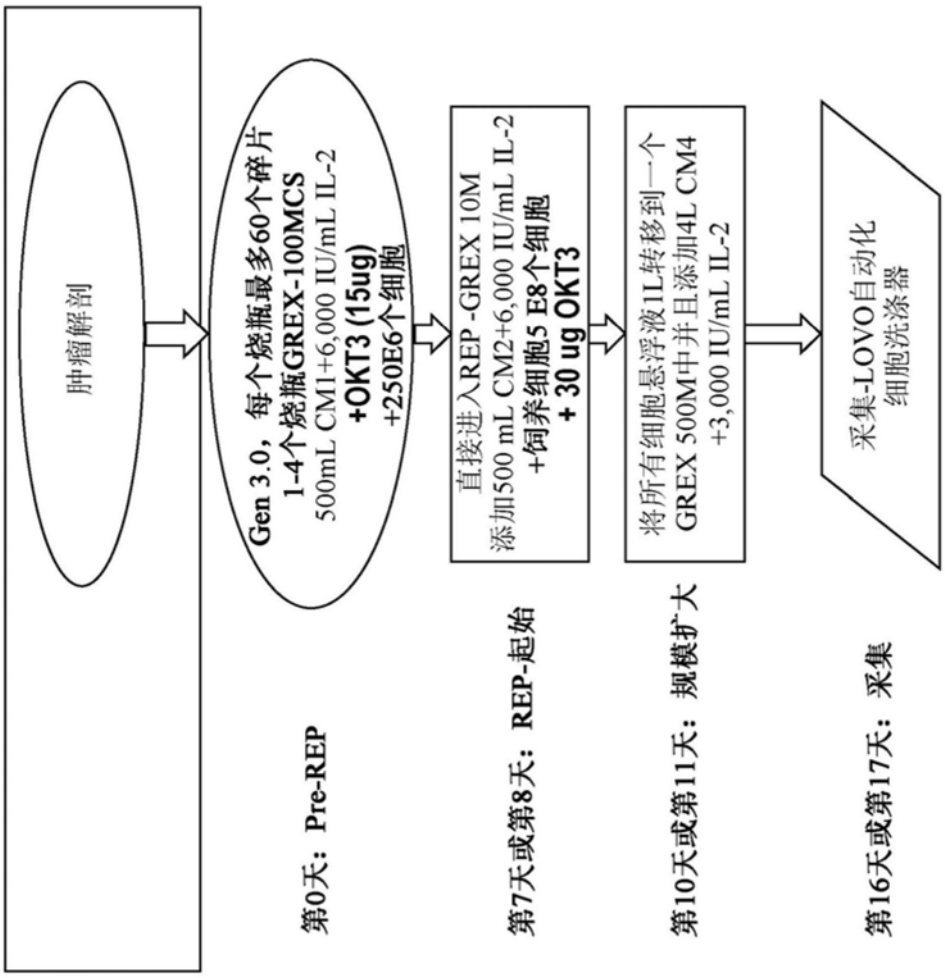

肿瘤解剖
第0天：Pre-REP
Gen 3.0，每个烧瓶最多60个碎片
1-4个烧瓶GREX-100MCS
500mL CM1+6,000 IU/mL IL-2
+OKT3 (15ug)
+250E6个细胞
第7天或第8天：REP-起始
直接进入REP -GREX 10M
添加500 mL CM2+6,000 IU/mL IL-2
+饲养细胞5 E8个细胞
+ 30 ug OKT3
第10天或第11天：规模扩大
将所有细胞悬浮液1L转移到一个
GREX 500M中并且添加4L CM4
+3,000 IU/mL IL-2
第16天或第17天：采集
采集-LOVO自动化
细胞洗涤器

图63

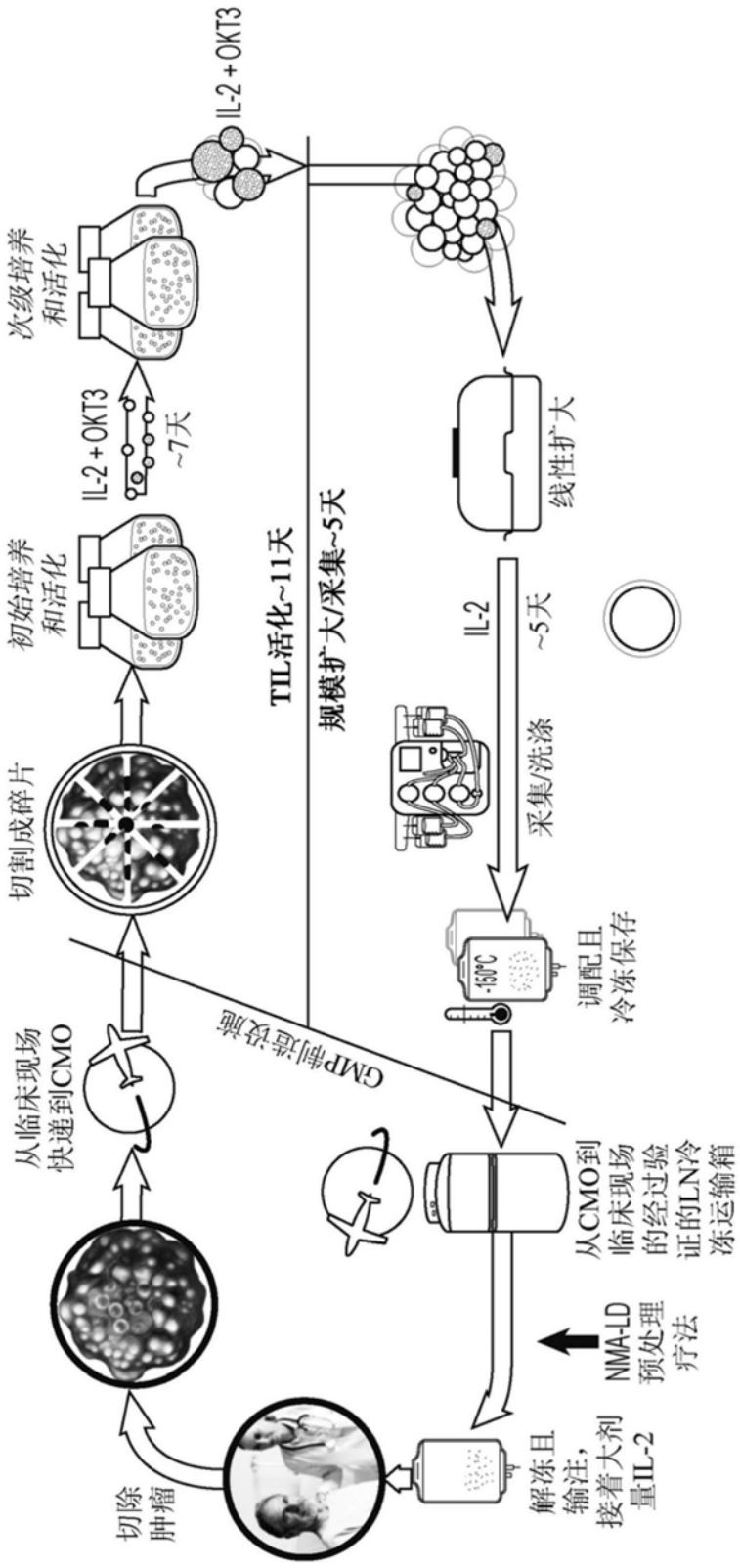
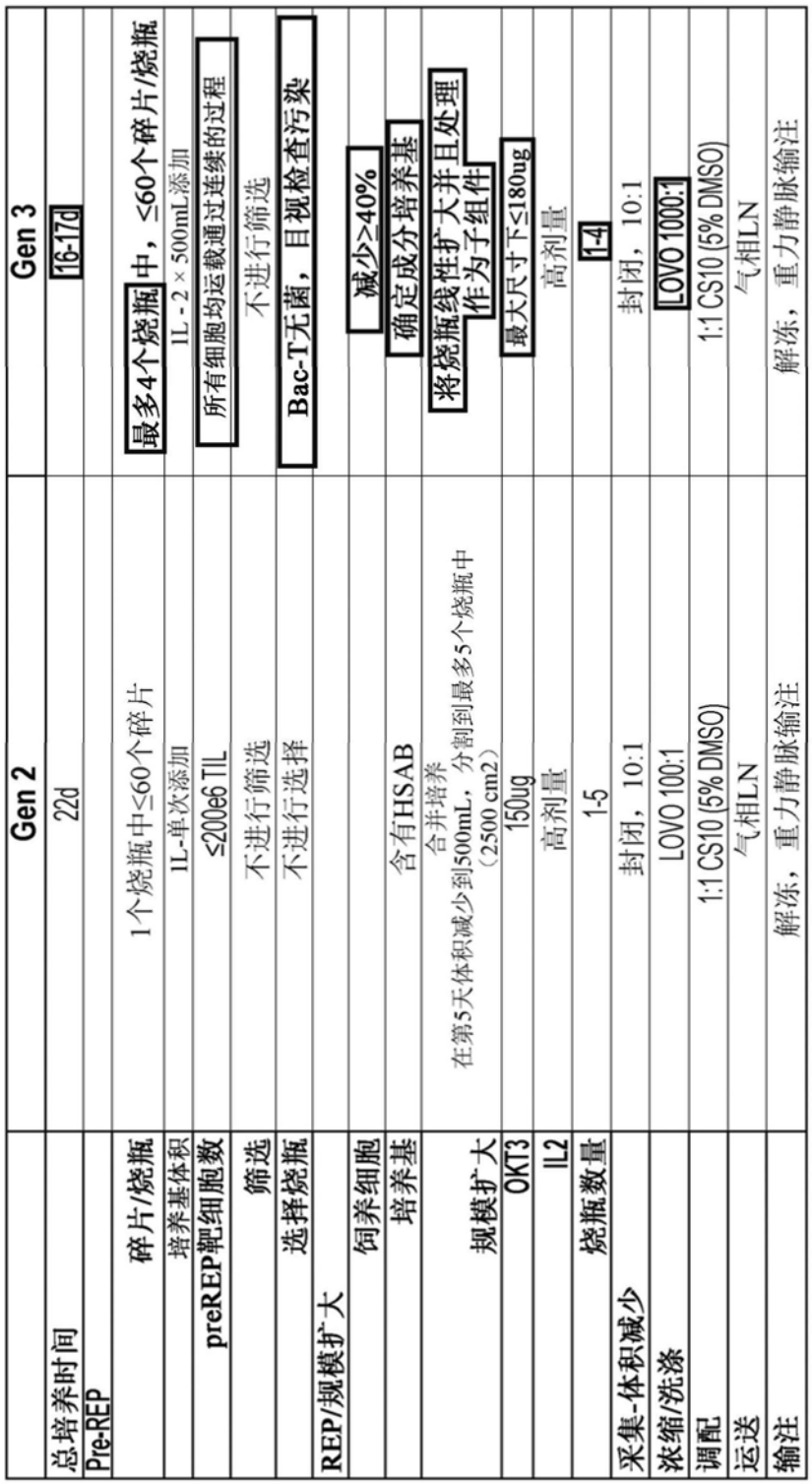

切除肿瘤
从临床现场快递到CMO
GMP制造设施
切割成碎片
初始培养和活化
IL-2 + OKT3
~7天
次级培养和活化
IL-2 + OKT3
TIL活化~11天
规模扩大/采集~5天
线性扩大
IL-2
~5天
采集/洗涤
-150℃
调配且冷冻保存
从CMO到临床现场的经过验证的LN冷冻运输箱
NMA-LD预处理疗法
解冻且输注，接着大剂量IL-2

图64



	Gen 2	Gen 3
总培养时间	22d	16-17d
Pre-REP		
碎片/烧瓶	1个烧瓶中≤60个碎片	最多4个烧瓶中，≤60个碎片/烧瓶
培养基体积	1L-单次添加	1L - 2 × 500mL添加
preREP靶细胞数	≤200e6 TIL	所有细胞均运载通过连续的过程
筛选	不进行筛选	不进行筛选
选择烧瓶	不进行选择	Bac-T无菌，目视检查污染
REP/规模扩大		
饲养细胞		减少≥40%
培养基	含有HSAB	确定成分培养基
规模扩大	合并培养 在第5天体积减少到500mL，分割到最多5个烧瓶中 （2500 cm2）	将烧瓶线性扩大并且处理作为子组件
OKT3	150ug	最大尺寸下≤180ug
IL2	高剂量	高剂量
烧瓶数量	1-5	1-4
采集-体积减少	封闭，10:1	封闭，10:1
浓缩/洗涤	LOVO 100:1	LOVO 1000:1
调配	1:1 CS10 (5% DMSO)	1:1 CS10 (5% DMSO)
运送	气相LN	气相LN
输注	解冻，重力静脉输注	解冻，重力静脉输注

图65A

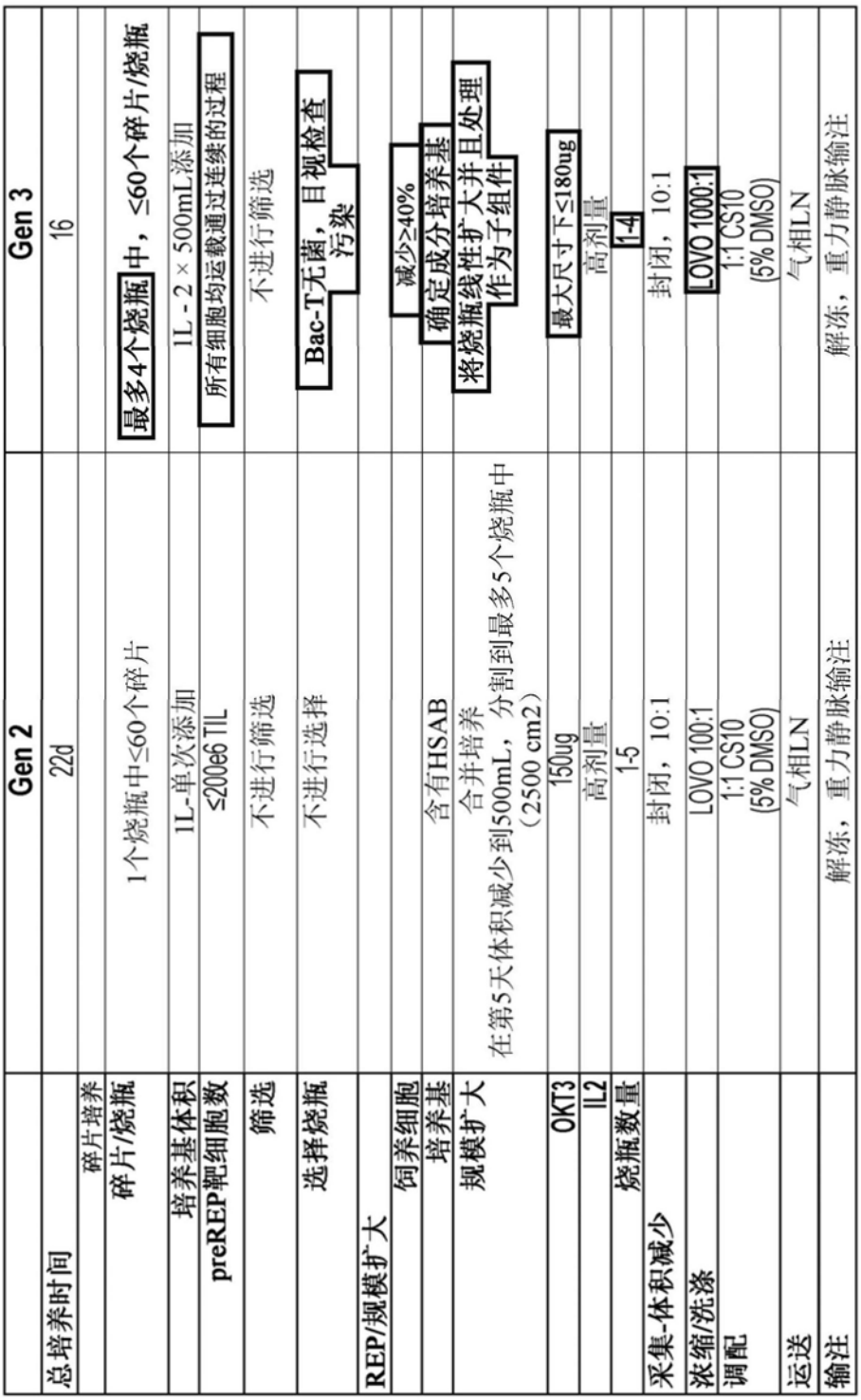

Gen 2
Gen 3
总培养时间
22d
16
碎片培养
碎片/烧瓶
1个烧瓶中≤60个碎片
最多4个烧瓶中，≤60个碎片/烧瓶
培养基体积
1L-单次添加
1L - 2 × 500mL添加
preREP靶细胞数
≤200e6 TIL
所有细胞均运载通过连续的过程
筛选
不进行筛选
不进行筛选
选择烧瓶
不进行选择
Bac-T无菌，目视检查
污染
REP/规模扩大
饲养细胞
减少≥40%
培养基
含有HSAB
确定成分培养基
规模扩大
合并培养
在第5天体积减少到500mL，分割到最多5个烧瓶中
（2500 cm2）
将烧瓶线性扩大并且处理
作为子组件
OKT3
150ug
最大尺寸下≤180ug
IL2
高剂量
高剂量
烧瓶数量
1-5
1-4
采集-体积减少
封闭，10:1
封闭，10:1
浓缩/洗涤
LOVO 100:1
LOVO 1000:1
调配
1:1 CS10
(5% DMSO)
1:1 CS10
(5% DMSO)
运送
气相LN
气相LN
输注
解冻，重力静脉输注
解冻，重力静脉输注

图65B

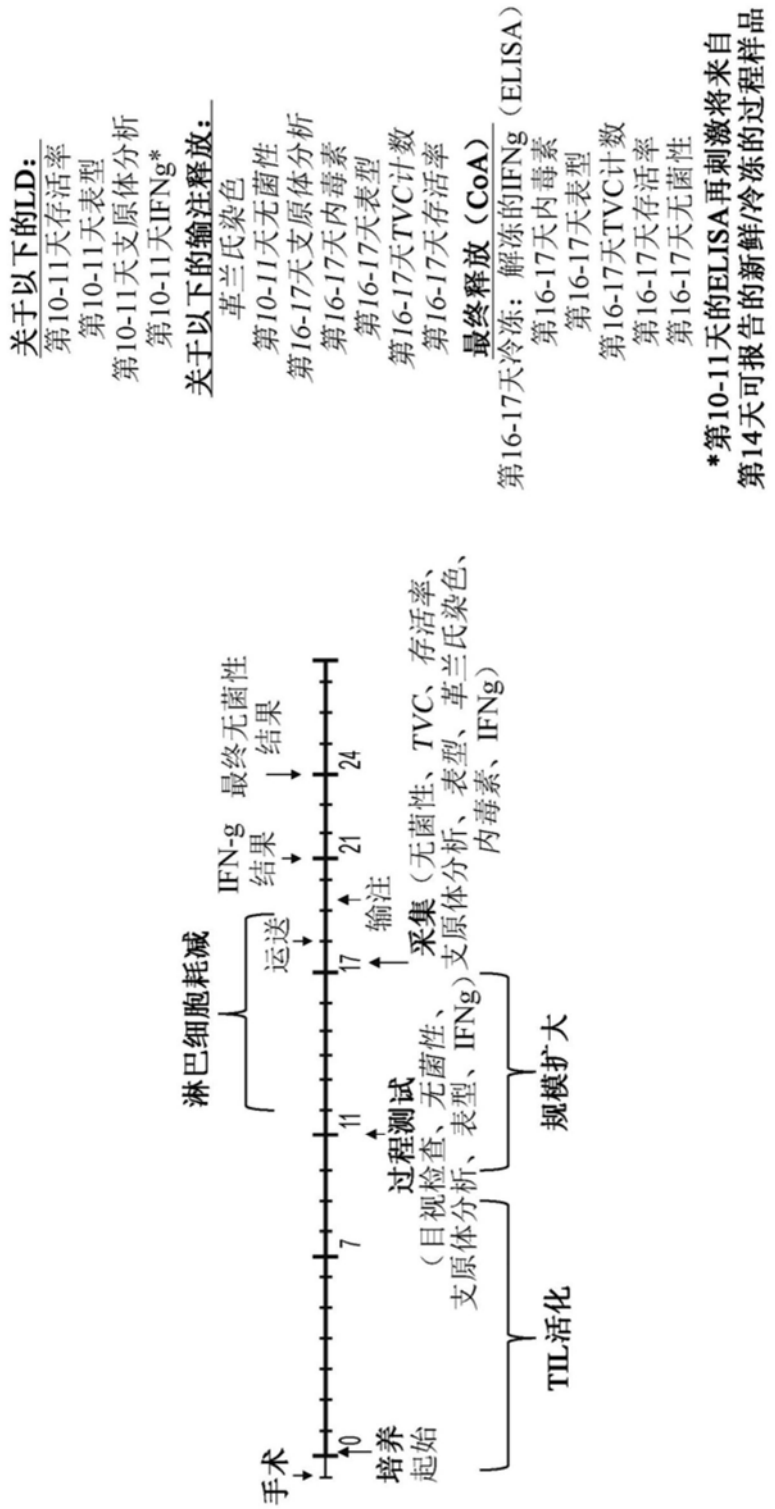

关于以下的LD:
第10-11天存活率
第10-11天表型
第10-11天支原体分析
第10-11天IFNg*
关于以下的输注释放:
革兰氏染色
第10-11天无菌性
第16-17天支原体分析
第16-17天内毒素
第16-17天表型
第16-17天TVC计数
第16-17天存活率
最终释放（CoA）
第16-17天冷冻：解冻的IFNg（ELISA）
第16-17天内毒素
第16-17天表型
第16-17天TVC计数
第16-17天存活率
第16-17天无菌性
*第10-11天的ELISA再刺激将来自
第14天可报告的新鲜/冷冻的过程样品
淋巴细胞耗减
IFN-g 最终无菌性
运送 结果 结果
输注
采集（无菌性、TVC、存活率、
支原体分析、表型、革兰氏染色、
内毒素、IFNg）
过程测试
（目视检查、无菌性、
支原体分析、表型、IFNg）
TIL活化
规模扩大
手术
培养
起始
0
7
11
17
21
24

图66

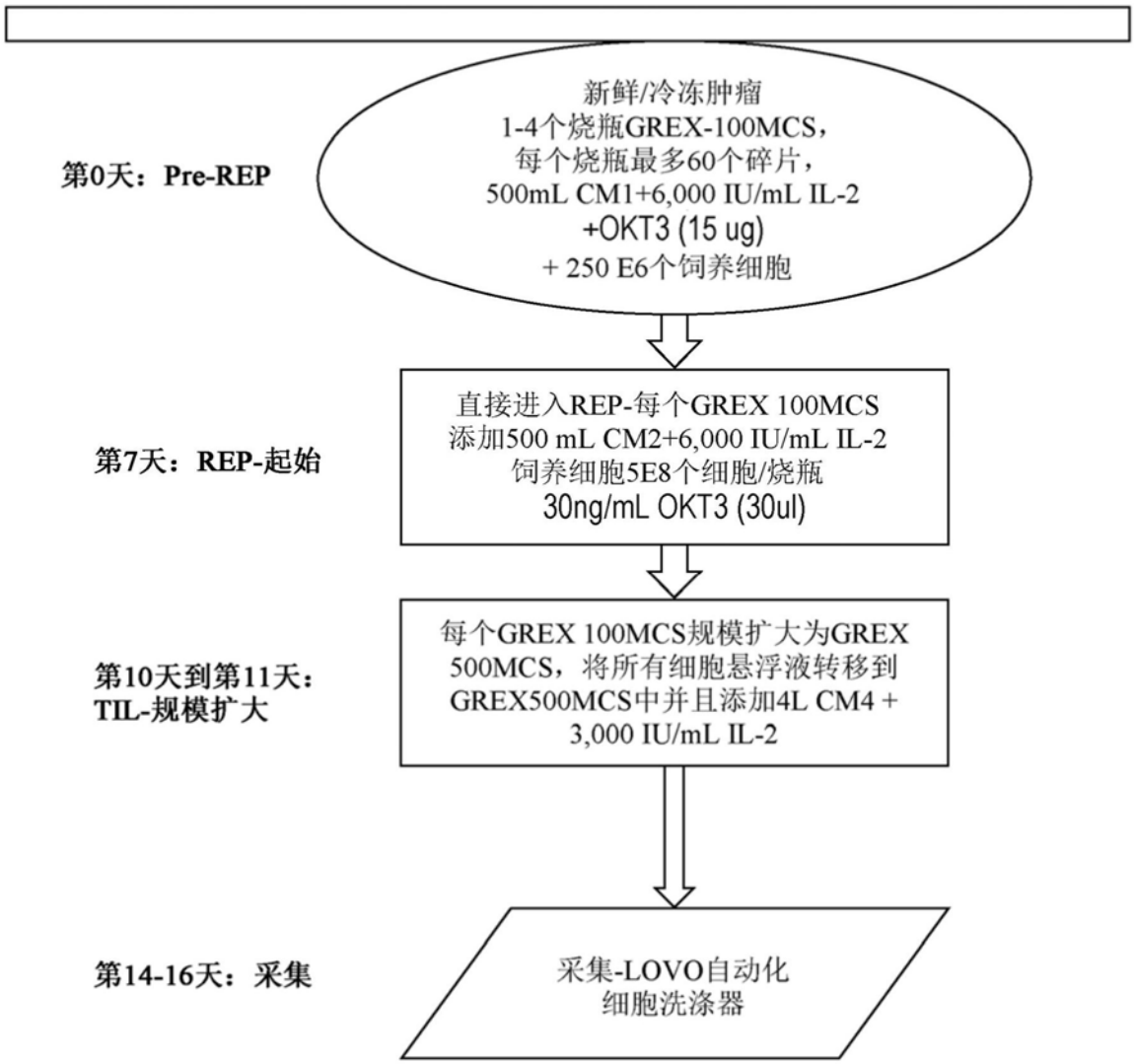

第0天：Pre-REP
新鲜/冷冻肿瘤
1-4个烧瓶GREX-100MCS，
每个烧瓶最多60个碎片，
500mL CM1+6,000 IU/mL IL-2
+OKT3 (15 ug)
+ 250 E6个饲养细胞
第7天：REP-起始
直接进入REP-每个GREX 100MCS
添加500 mL CM2+6,000 IU/mL IL-2
饲养细胞5E8个细胞/烧瓶
30ng/mL OKT3 (30ul)
第10天到第11天：
TIL-规模扩大
每个GREX 100MCS规模扩大为GREX
500MCS，将所有细胞悬浮液转移到
GREX500MCS中并且添加4L CM4 +
3,000 IU/mL IL-2
第14-16天：采集
采集-LOVO自动化
细胞洗涤器

图67

第16/17天测试的数据汇总

测试参数	第1个工程改造轮次 第17天 2019年3月10日	第2个工程改造轮次 第17天 2019年3月11日	第3个工程改造轮次 第17天 2019年3月25日	Gen 2 (n=47)		
				均值	中值	标准差
LOVO前的TVC	17.3E+09	46.1E+09				
LOVO前的存活率%	90.5%	94.3%				
LOVO后的TVC	17.9E+09	59.4E+09	48.2E+09			
LOVO后的存活率%	85.3%	90.7%	89%			
LOVO后的TVC恢复%	103.5%	128.9%				
%CD45+/CD3+	88.0%	98.3%				
IFNγ (pg/mL)	11,618	19,235		10,005	9,637	5,128
GrzB (pg/mL)	11,326	27,441		19,929	16,040	
无菌性	待定（*）	待定（*）				
内毒素（总EU单位）	154.2 EU	195.9 EU				
支原体分析	阴性	阴性				
革兰氏染色	未检测到生物体	未检测到生物体				

图68

*添加最多整个TIL样品（100%活的CD14-，除了单核细胞以外）

特征	工程改造轮次#1	工程改造轮次#2
NK细胞 (CD3-CD56+) (%)	10.9	1.5
B细胞 (CD3-CD19+) (%)	0.2	0.2
单核细胞 (CD14+) (%)	0.0	0.0
TCRαβ (%)	87.1	96.3
TCRγδ (%)	1.2	1.6
总和	99.4	99.6

*添加最多100% TCRab

特征	工程改造轮次#1	工程改造轮次#2
幼稚：CCR7+CD45RA+ (%)	0.0	0.1
T-EM: CCR7-CD45RA-(%)	92.2	84.4
T-CM: CCR7+CD45RA-(%)	7.7	15.5
T-EFF/TEMRA: CCR7-CD45RA+(%)	0.1	0.1
总和	100.0	100.0

*添加最多100%活的CD14-

特征	工程改造轮次#1	工程改造轮次#2
TCRαβ+CD4+ (%)	89.6	71.8
TCRαβ+CD8+ (%)	10.0	27.8
总和	99.6	99.6

图69

*添加最多整个TIL样品（100%活的CD14-，除了单核细胞以外）

特征	PD轮次#1 L4063	PD轮次#2 L4064
NK细胞(CD3-CD56+)(%)	1.04	0.52
B细胞(CD3-CD19+)(%)	0.0076	0.013
单核细胞(CD14+)(%)	0.032	0.043
TCRαβ(%)	95.5	96.7
TCRγδ(%)	2	1.86
总和	98.6	99.14

*添加最多100% TCRab

特征	PD轮次#1 L4063	PD轮次#2 L4064
幼稚: CCR7+CD45RA+(%)	0.35	0.07
T-EM: CCR7-CD45RA-(%)	97.4	96.7
T-CM: CCR7+CD45RA-(%)	1.39	2.78
T-EFF/TEMRA: CCR7-CD45RA+(%)	0.88	0.44
Sum	100.0	100.0

特征	PD轮次#1 L4063	PD轮次#2 L4064
TCRαβ+CD4+(%)	77.5	57.4
TCRαβ+CD8+(%)	16.8	36.1
总和	94.3	93.5

图70

特征	OV-8025			OV-8026			OV-8028			OV-8022		
	FRER*	Gen 2$^{\gamma}$	Gen 3.1	FRER$^{\gamma}$	Gen 2	Gen 3.1	FRER	Gen 2$^{\gamma}$	Gen 3.1	FRER	Gen 2$^{\gamma}$	Gen 3.1*
纯度												
T-细胞 (CD45^{+}CD3^{+}) (%)	-	-	99.2	-	75.1	97.5	97	-	97.6	53.6	16.4	-
NK-细胞 (CD3^{-}CD56^{+}) (%)	-	-	0.2	-	8.4	1.1	0.4	-	0.1	44.6	81.1	-
B-细胞 (CD3^{-}CD19^{+}) (%)	-	-	0	-	2.1	0	0	-	0	1.3	3.3	-
单-核细胞 (CD14^{+}) (%)	-	-	0	-	0.2	0	0	-	0	2	0.1	-
T-细胞-身份												
TCR αβ (%)	-	-	98.8	-	71.9	96.4	98.7	-	99.4	52.2	12.4	-
TCR γδ (%)	-	-	0.3	-	0.8	0.6	0	-	0.1	0.1	0	-
CD3^{+} CD4^{+} (%)	-	-	85.7	-	63.1	81.5	81.8	-	92.3	77.3	48.6	-
CD3^{+} CD8^{+} (%)	-	-	12	-	23	14.4	15.5	-	5.2	16.6	26.1	-
记忆-表型-TCRαβ+												
幼稚: CCR7^{+}CD45RA^{+} (%)	-	-	0	-	0.4	0	2.1	-	0	0	0.1	-
T-EM: CCR7^{-}CD45RA^{-}(%)	-	-	98.5	-	88.7	97.5	93.6	-	97.1	89.1	93.8	-
T-CM: CCR7^{+}CD45RA^{-}(%)	-	-	1	-	7.5	0.6	1.9	-	2.5	0.1	0	-
T-EFF/TEMRA: CCR7^{-}CD45RA^{+}(%)	-	-	0.4	-	3.4	1.8	2.4	-	0.3	10.8	6.1	-

冷冻肿瘤，早期REP

*未测试的情况

$^{\gamma}$采样问题，低TVC计数或解冻时的非活细胞

图71

特征	层次结构	工程改造轮次#1	工程改造轮次#2
NK细胞(CD3-CD56+)(%)	S1/S2/总数/活的/CD14-/CD3-/NK|裸细胞频率（%）	10.9	1.5
B细胞(CD3-CD19+)(%)	S1/S2/总数/活的/CD14-/CD19|裸细胞频率（%）	0.2	0.2
单核细胞(CD14+)(%)	S1/S2/总数/活的/CD14+|亲本频率（%）	0.0	0.0
TCRαβ(%)	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab|裸细胞频率（%）	87.1	96.3
TCRγδ(%)	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRgd|裸细胞频率（%）	1.2	1.6
TCRαβ+CD4+(%)	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD4|亲本频率（%）	89.6	71.8
TCRαβ+CD8+(%)	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD8|亲本频率（%）	10.0	27.8
幼稚: CCR7+CD45RA+(%)	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/Q2: CCR7+, CD45RA+|亲本频率（%）	0.0	0.1
T-EM: CCR7-CD45RA-(%)	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/Q4: CCR7-, CD45RA-|亲本频率（%）	92.2	84.4
T-CM: CCR7+CD45RA-(%)	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/Q3: CCR7+, CD45RA-|亲本频率（%）	7.7	15.5
T-EFF/TEMRA: CCR7-CD45RA+(%)	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/Q1: CCR7-, CD45RA+|亲本频率（%）	0.1	0.1
幼稚: CD62L+CD45RA+(%)	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/Q6: CD62L+, CD45RA+|亲本频率（%）	0.2	0.1
T-EM: CD62L-CD45RA-(%)	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/Q8: CD62L-, CD45RA-|亲本频率（%）	47.7	49.5
T-CM: CD62L+CD45RA-(%)	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/Q7: CD62L+, CD45RA-|亲本频率（%）	52.1	50.4
T-EFF/TEMRA: CD62L-CD45RA+(%)	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/Q5: CD62L-, CD45RA+|亲本频率（%）	0.1	0.0

*添加最多CD3+CD45+ %

特征	工程改造轮次#1	工程改造轮次#2
TCRαβ(%)	87.1	96.3
TCRγδ(%)	1.2	1.6
总和	88.3	97.9

图72

特征	层次结构	CD4+		CD8+	
		工程改造轮次#1	工程改造轮次#2	工程改造轮次#1	工程改造轮次#2
CD27+ (%)	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD4或CD8/CD4+/8+CD27+|亲本频率（%）	0.7	2.0	2.1	12.7
CD28+ (%)	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD4或CD8/CD4+/8+CD28+|亲本频率（%）	41.2	50.1	3.6	13.9
CD57+ (%)	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD4+/8+CD57+|亲本频率（%）	1.0	6.9	0.1	3.7
2B4+ (%)	S/S/活的/CD3/CD4或CD8/btla|亲本频率（%）	4.5	5.5	69.1	55.7
BTLA4+ (%)	S/S/活的/CD3/CD4或CD8/2b4|亲本频率（%）	67.5	86.1	79.6	89.1
CCR4+ (%)	S/S/活的/CD3/CD4或CD8/CCR4+|亲本频率（%）	94.1	93.6	84.2	96.6
CD25+ (%)	S/S/活的/CD3/CD4或CD8/CD25|亲本频率（%）	63.1	61.0	47.5	51.8
CD69+ (%)	S/S/活的/CD3/CD4或CD8/CD69|亲本频率（%）	47.0	22.8	45.4	25.8
CD95+ (%)	S/S/活的/CD3/CD4或CD8/CD95|亲本频率（%）	99.2	98.1	99.1	97.6
CD103+ (%)	S/S/活的/CD3/CD4或CD8/CD103|亲本频率（%）	4.2	10.7	25.0	36.9
CXCR3+ (%)	S/S/活的/CD3/CD4或CD8/CXCR3|亲本频率（%）	58.1	76.7	89.3	88.3
KLRG1+ (%)	S/S/活的/CD3/CD4或CD8/KLRG1|亲本频率（%）	0.3	8.9	3.1	35.8
LAG3+ (%)	S/S/活的/CD3/CD4或CD8/Lag3|亲本频率（%）	5.0	3.3	19.4	21.2
PD1+ (%)	S/S/活的/CD3/CD4或CD8/PD1|亲本频率（%）	29.3	22.1	11.2	7.2
TIGIT+ (%)	S/S/活的/CD3/CD4或CD8/Tigit|亲本频率（%）	68.1	53.2	74.9	65.8
TIM3+ (%)	S/S/活的/CD3/CD4或CD8/TIM3|亲本频率（%）	93.6	81.8	91.2	84.4

图73

样品	1:100受刺激/1:50未受刺激			1:200受刺激/1:100未受刺激			1:400受刺激/1:200未受刺激			Avg	受刺激-未受刺激	双重诱导
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
工程改造1，受刺激的	13001.49	16033.00	14083.24	11008.85	15254.59	12534.24	9985.83	14237.22	11669.82	13089.81	11325.97	7.42
工程改造1，未受刺激的	2155.31	2445.64	2108.37	1727.43	1982.96	1566.52	1119.057	1611.132	1158.179	1763.84		
工程改造1，受刺激的对照	26491.92	31766.20	31601.13	26385.05	30852.42	29752.34	26175.43	33462.43	29728.52	29579.49	13486.52	1.84
工程改造1，未受刺激的对照	16209.90	16478.69	16936.51	15659.69	16385.60	17083.36	15419.07	15683.49	14980.40	16092.97		

样品	1:100受刺激/1:50未受刺激			1:200受刺激/1:100未受刺激			1:400受刺激/1:200未受刺激			Avg	受刺激-未受刺激	双重诱导
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
工程改造2，受刺激的	31509.54	30435.33	33822.81	27299.28	29091.87	29432.13	29027.45	30685.94	31138.70	30271.45	27441.29	10.70
工程改造2，未受刺激的	3236.50	3442.58	3630.97	2764.12	2839.66	2892.96	2047.795	2291.994	2324.838	2830.16		
工程改造2，受刺激的对照	21515.93	20346.31	19425.54	18299.25	17398.91	18131.38	18825.27	18412.15	18278.94	18959.30	6189.32	1.48
工程改造2，未受刺激的对照	13716.23	13445.80	13563.89	12782.28	12678.37	13122.65	11898.75	11675.48	12046.29	12769.97		

图74

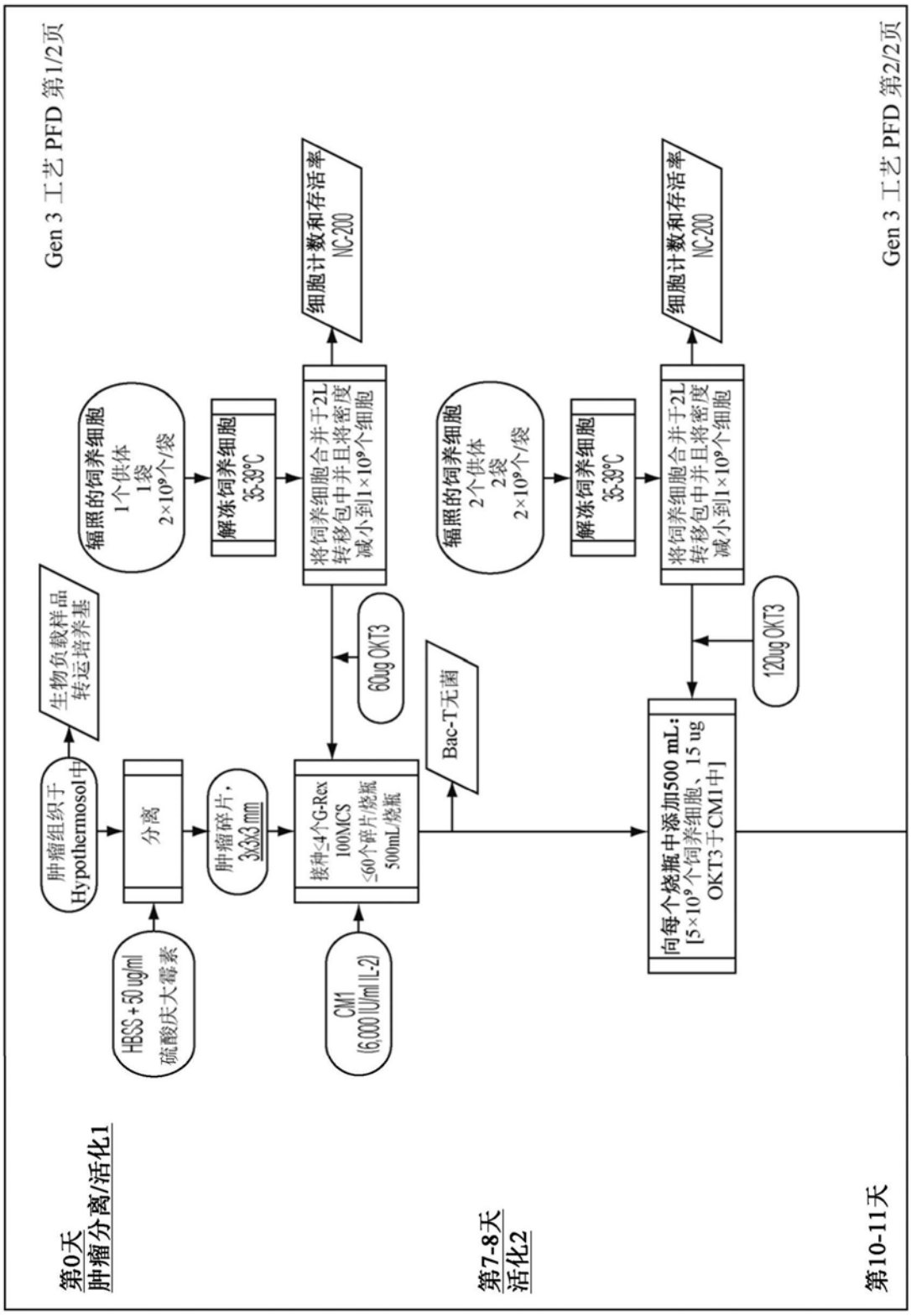

Gen 3 工艺 PFD 第1/2页
第0天
肿瘤分离/活化1
肿瘤组织于Hypothermosol中
生物负载样品转运培养基
HBSS+50 ug/ml硫酸庆大霉素
分离
肿瘤碎片，3x3x3 mm
CM1 (6,000 IU/ml IL-2)
接种≤4个G-Rex 100MCS ≤60个碎片/烧瓶 500mL/烧瓶
60ug OKT3
Bac-T无菌
第7-8天
活化2
向每个烧瓶中添加500 mL:
[5×10⁹个饲养细胞、15 ug OKT3于CM1中]
120ug OKT3
第10-11天
辐照的饲养细胞 1个供体 1袋 2×10⁹个/袋
解冻饲养细胞 35-39°C
将饲养细胞合并于2L转移包中并且将密度减小到1×10⁹个细胞
细胞计数和存活率 NC-200
辐照的饲养细胞 2个供体 2袋 2×10⁹个/袋
解冻饲养细胞 35-39°C
将饲养细胞合并于2L转移包中并且将密度减小到1×10⁹个细胞
细胞计数和存活率 NC-200
Gen 3 工艺 PFD 第2/2页

图75A

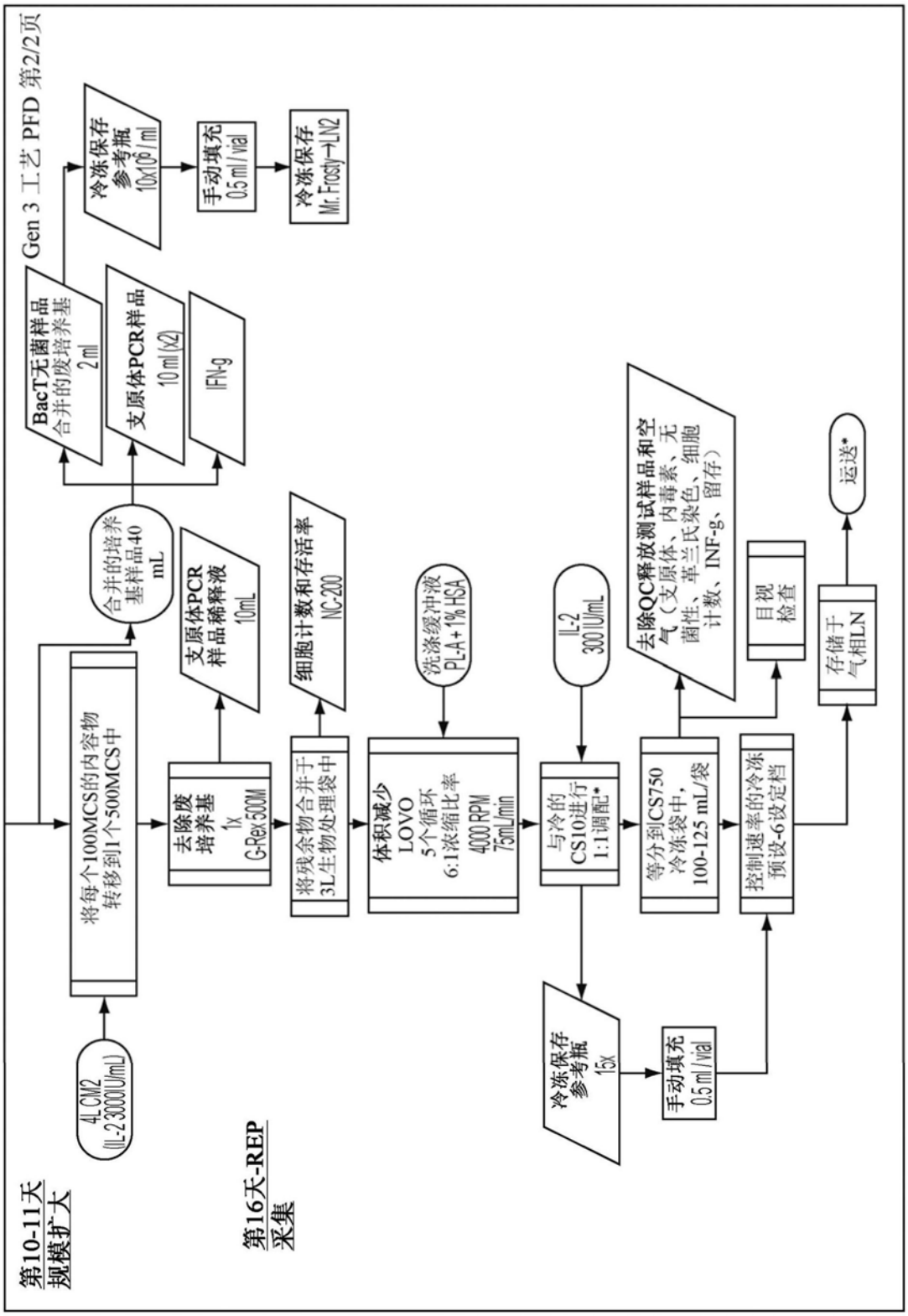

Gen 3 工艺 PFD 第2/2页
第10-11天
规模扩大
第16天-REP
采集
4L CM2
(IL-2 3000U/mL)
将每个100MCS的内容物
转移到1个500MCS中
去除废
培养基
1X
G-Rex 500M
将残余物合并于
3L生物处理袋中
体积减少
LOVO
5个循环
6:1浓缩比率
4000 RPM
75mL/min
与冷的
CS10进行
1:1调配*
等分到CS750
冷冻袋中,
100-125 mL/袋
控制速率的冷冻
预设-6设定档
存储于
气相LN
运送*
合并的培养
基样品40
mL
支原体PCR
样品稀释液
10mL
细胞计数和存活率
NC-200
洗涤缓冲液
PL-A+1% HSA
IL-2
3000U/mL
去除QC释放测试样品和空
气（支原体、内毒素、无
菌性、革兰氏染色、细胞
计数、INF-g、留存）
目视
检查
BacT无菌样品
合并的废培养基
2 ml
支原体PCR样品
10 ml (x2)
IFN-g
冷冻保存
参考瓶
10x10^6 / ml
手动填充
0.5 ml / vial
冷冻保存
Mr. Frosty→LN2
冷冻保存
参考瓶
15x
手动填充
0.5 ml / vial

图75B

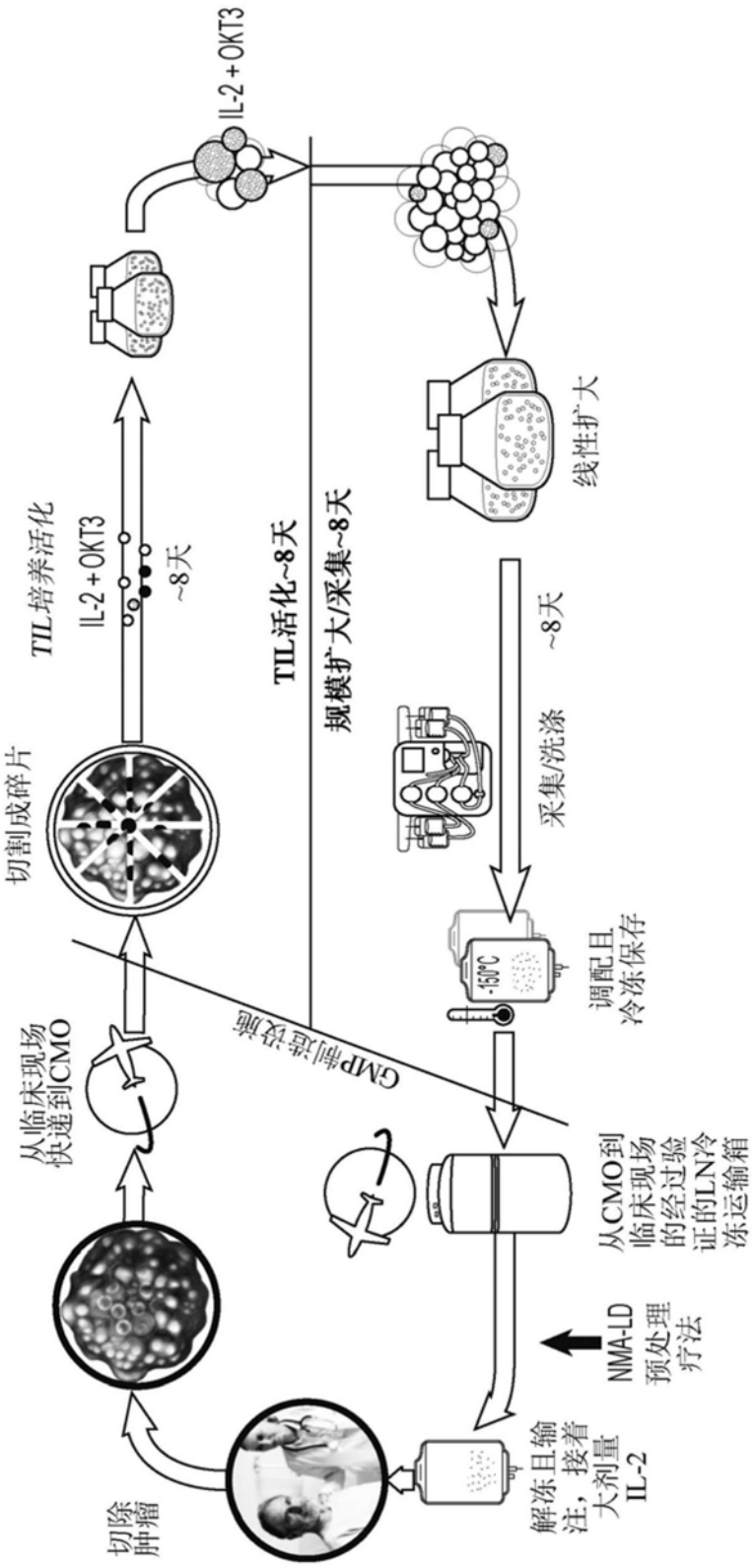

IL-2 + OKT3
TIL培养活化
IL-2 + OKT3
~8天
切割成碎片
TIL活化~8天
规模扩大/采集~8天
线性扩大
采集/洗涤
~8天
-150°C
调配且
冷冻保存
从临床现场
快速到CMO
GMP制造设施
从CMO到
临床现场
的经过验
证的LN冷
冻运输箱
NMA-LD
预处理
疗法
解冻且输
注，接着
大剂量
IL-2
切除
肿瘤

图76

步骤	Gen 2	Gen 2.1	Gen 3.0
Pre REP-第0天	≤50个碎片/1个G-Rex 100MCS-11天	≤180个碎片/3个G-Rex 100MCS，提前调配的CM1温热培养基-11天	***新鲜或冷冻肿瘤*** 整个肿瘤具有≤30个碎片，每1个G-Rex.100MCS最多60个碎片（最多4个G-Rex），提前调配的温热培养基-7天。 **Pre REP，250e6个饲养细胞+ OKT-3（15μg）**
REP起始	直接进入REP-第11天-<200 E^6个TIL 1 G-Rex 500MCS	直接进入REP-第11天-<200 E^6个TIL 在一个G-Rex 500MCS中提前调配CM2温热培养基	直接进入**REP-第7天-所有细胞TIL-相同的G-Rex 100MCS（100MCS，最多4个GREX），标准培养基或确定成分培养基（无血清）。添加500e6个饲养细胞+OKT-3（30μg）**
TIL增殖或规模扩大	1至5个G-REX 500MCS **第16天分割**	2至5个G-REX 500MCS 提前调配的CM4温热培养基 **第16天分割**	将TIL悬浮液从G-REX 100MCS转移到G-REX 500MCS中，最多4个REX 500MCS-标准培养基或确定成分培养基（无血清） **在第10天或第11天规模扩大**
采集	**第22天采集，** LOVO自动化细胞洗涤器	**第22天采集，** LOVO自动化细胞洗涤器（5个洗涤循环）	**第14天或第16天采集** LOVO自动化细胞洗涤器（5个洗涤循环）
最终调配	冷冻保存产物 300IU/ml IL2- CS10于LN_2中多个等分试样	冷冻保存产物 300IU/ml IL2- CS10于LN_2中多个等分试样	冷冻保存产物 300IU/ml IL2- CS10于LN_2中多个等分试样
工艺时间	**22天**	**22天**	**16天**

图77

工艺比较	工艺变化	差异
Gen 2：Gen 2.1	• 用两个烧瓶而非一个烧瓶来起始工艺 • 将REP起始饲养层分配在2个G-Rex500MCS烧瓶中 • 提前调配培养基并且在使用之前进行温热	• 最终细胞计数（剂量）可能随着TIL库的增加而加倍。 • 整个工艺中存在过程冗余
Gen 2.1：Gen 3.1	• 新鲜或冷冻肿瘤 • 14-16天的工艺（从第22天开始） • 工艺中的总饲养层减少 • 第0天存在饲养层和OKT3 • 用碎片起始REP • 100MCS扩大为500MCS • 规模扩大为多个pre-REP烧瓶 • 标准培养基和确定成分培养基（无血清）	• 增加效力 • 改进表型 • 减少工艺时间 • 减少试剂测试 • 降低工艺可变性 • 确定成分试剂 • 增加库 • 减少杂质（饲养细胞） • 相当或更高的剂量。

图78

表2：Gen 3优化条件的说明

处理目	条件	Gen 3.1	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试
第0天： 肿瘤碎片分离和活化	培养基（*）	500 mL	500 mL	500 mL
	IL-2	6000 IU/mL	6000 IU/mL	6000 IU/mL
	OKT-3	-	15 ug	15 ug
	饲养细胞	-	-	2.5E+06
处理目	**条件**	**Gen 3.1**	**Gen 3.1对照**	**Gen 3.1测试**
第7-8天： TIL培养再活化	培养基（*）	500 mL	500 mL	500 mL
	IL-2	6000 IU/mL	6000 IU/mL	6000 IU/mL
	OKT-3	30 ug	30 ug	30 ug
	饲养细胞	1 E+09	500 E+06	500E+06
	第7天添加的总饲养细胞	1 E+09	500 E+06	750E+06
处理目	**条件**	**Gen 3.1**	**Gen 3.1对照**	**Gen 3.1测试**
第10-11天： **培养规模扩大**	将整个TIL悬浮液从GREX 100中转移到1个含有4L培养基+ IL-2（3000 IU/mL）的GREX 500中			
处理目	**条件**	**Gen 3.1**	**Gen 3.1对照**	**Gen 3.1测试**
第16-17天： **采集/洗涤/调配**	LOVO自动化细胞洗涤器且用CS10进行冷冻保存。			

（*）培养基可为标准培养基或CTS无血清培养基。

图79

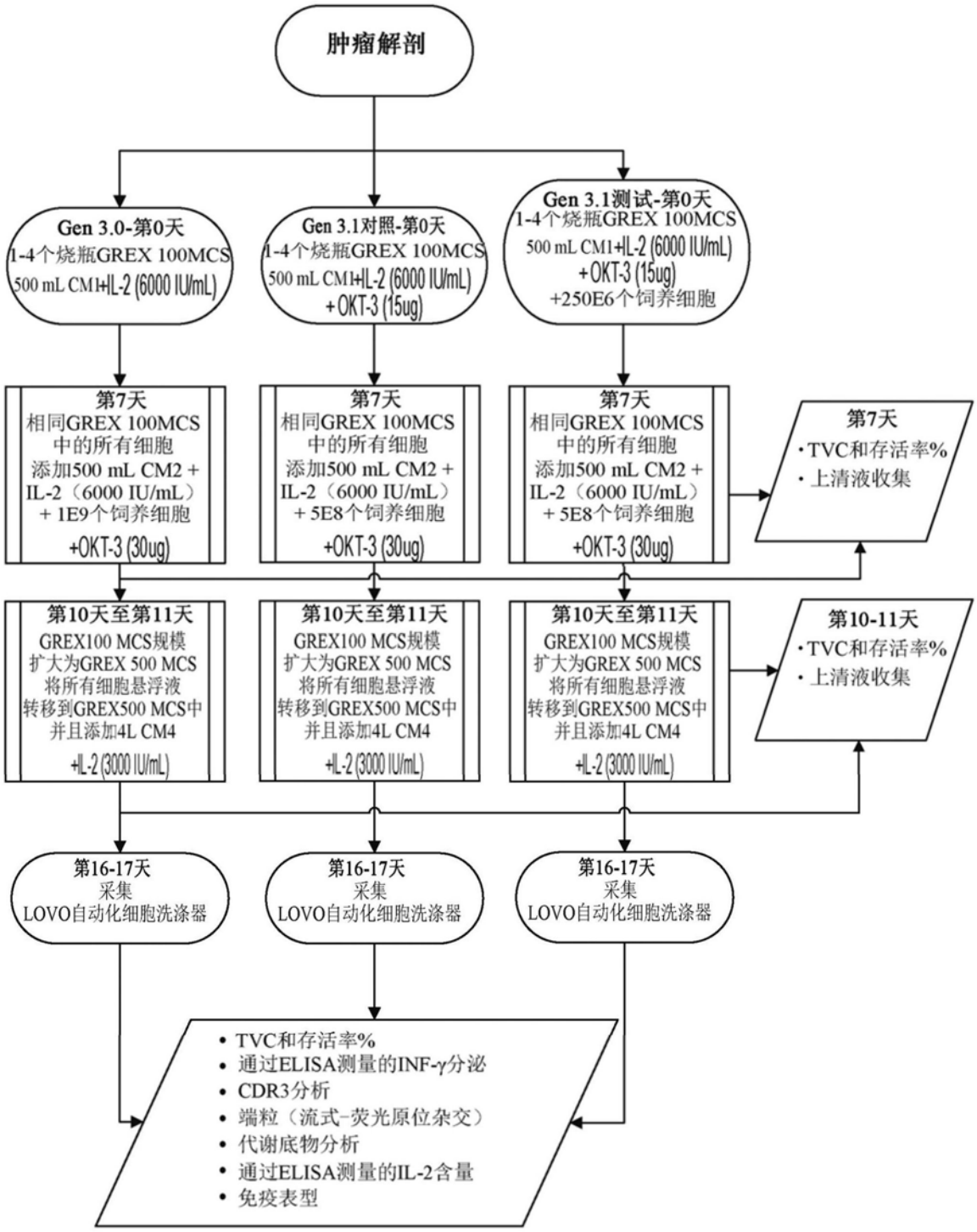

肿瘤解剖
Gen 3.0-第0天
1-4个烧瓶GREX 100MCS
500 mL CM1+IL-2 (6000 IU/mL)
Gen 3.1对照-第0天
1-4个烧瓶GREX 100MCS
500 mL CM1+IL-2 (6000 IU/mL)
+OKT-3 (15ug)
Gen 3.1测试-第0天
1-4个烧瓶GREX 100MCS
500 mL CM1+IL-2 (6000 IU/mL)
+OKT-3 (15ug)
+250E6个饲养细胞
第7天
相同GREX 100MCS
中的所有细胞
添加500 mL CM2 +
IL-2（6000 IU/mL）
+ 1E9个饲养细胞
+OKT-3 (30ug)
第7天
相同GREX 100MCS
中的所有细胞
添加500 mL CM2 +
IL-2（6000 IU/mL）
+ 5E8个饲养细胞
+OKT-3 (30ug)
第7天
相同GREX 100MCS
中的所有细胞
添加500 mL CM2 +
IL-2（6000 IU/mL）
+ 5E8个饲养细胞
+OKT-3 (30ug)
第7天
·TVC和存活率%
· 上清液收集
第10天至第11天
GREX100 MCS规模
扩大为GREX 500 MCS
将所有细胞悬浮液
转移到GREX500 MCS中
并且添加4L CM4
+IL-2 (3000 IU/mL)
第10天至第11天
GREX100 MCS规模
扩大为GREX 500 MCS
将所有细胞悬浮液
转移到GREX500 MCS中
并且添加4L CM4
+IL-2 (3000 IU/mL)
第10天至第11天
GREX100 MCS规模
扩大为GREX 500 MCS
将所有细胞悬浮液
转移到GREX500 MCS中
并且添加4L CM4
+IL-2 (3000 IU/mL)
第10-11天
·TVC和存活率%
· 上清液收集
第16-17天
采集
LOVO自动化细胞洗涤器
第16-17天
采集
LOVO自动化细胞洗涤器
第16-17天
采集
LOVO自动化细胞洗涤器
• TVC和存活率%
• 通过ELISA测量的INF-γ分泌
• CDR3分析
• 端粒（流式-荧光原位杂交）
• 代谢底物分析
• 通过ELISA测量的IL-2含量
• 免疫表型

图80

处理日	L4063干标准培养基中			L4064干无血清培养基中		
	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试
碎片数量	53	53	53	21	21	21
采集时每个碎片的平均TVC	1.37E+08	3.19E+08	3.53E+08	5.90E+08	7.57E+08	9.29E+08
第7天的TVC（*）	2.59E+07	6.43E+07	1.45E+08	7.35E+06	9.28E+07	1.39E+08
第10/11天的TVC（*）	6.07E+08	1.66E+09	1.83E+09	7.48E+08	1.28E+09	1.72E+09
第16/17天采集的TVC	7.26E+09	1.69E+10	1.87E+10	1.24E+10	1.59E+10	1.95E+10
倍数扩增（第10天或第11天/第7天）	23.4	25.8	12.6	101.8	13.8	12.4
倍数扩增（第16天/第17天采	280.3	262.8	129.0	1687.1	171.3	140.3

（*）FIO获得第7天和第10/11天的细胞计数。基于工艺的设计，在涡旋每个烧瓶的内容物之后直接从其中抽取样品-不存在体积减少。因此，对这些样品的细胞计数数据的分析和结论会因采用方法的性质而受限制。

图81

处理日	L4063干标准培养基中			L4064干CTS无血清培养基中		
	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试
再活化	74.6%	92.1%	88.7%	88.0%	92.8%	95.0%
规模扩大	92.1%	95.4%	94.0%	90.4%	94.3%	95.1%
采集	79.5%	89.4%	94.8%	88.8%	81.9%	84.9%

图82

肿瘤ID	L4063于标准培养基中			L4064于CTS无血清培养基中		
标记	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试
L/D Aqua	82.2	89.4	91.0	76.6	83.1	89.5
NK	1.3	0.4	1.0	2.5	0.2	0.5
TCRa/b+	88.6	97.5	95.5	93.0	97.3	96.7
CD4	56.4	85.8	77.5	33.8	64.8	57.4
CD4/CD27	3.8	2.1	3.4	6.7	0.7	2.2
CD4/CD28	82.7	71.8	80.2	97.5	73.5	66.8
CD4/CD56	0.4	0.5	0.7	0.5	0.5	0.3
CD4/CD57	6.7	17.0	20.5	16.0	7.6	8.0
CD8	29.6	11.2	16.8	51.9	28.9	36.1
CD8/CD27	15.0	25.6	30.5	14.1	3.3	6.7
CD8/CD28	47.5	23.0	24.5	88.0	45.1	37.3
CD8/CD56	3.3	2.3	4.2	6.6	10.3	10.0
CD8/CD57	0.3	1.2	1.1	1.3	2.0	2.5

图83

肿瘤ID	L4063干标准培养基中			L4064干CTS无血清培养基中		
标记	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试
CD3/CD4	56.4	85.8	77.5	33.8	64.8	57.4
CD4的TEMRA	0.4	0.7	0.4	1.1	0.7	0.2
CD4的幼稚	0.3	0.2	0.2	0.5	0.1	0.0
CD4的CM	45.6	16.8	29.3	46.3	30.6	29.9
CD4的EM	53.7	82.3	70.2	52.1	68.6	69.9
CD3/CD8	29.6	11.2	16.8	51.9	28.9	36.1
CD8的TEMRA	3.1	0.5	0.9	6.1	8.0	5.4
CD8的幼稚	0.7	0.1	0.4	2.2	0.7	1.0
CD8的CM	22.0	15.8	29.7	61.9	18.9	18.2
CD8的EM	74.3	83.5	69.0	29.8	72.4	75.5

图84

肿瘤ID	L4063干标准培养基中			L4064干CTS无血清培养基中		
标记	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试
2B4+	2.1	0.6	1.0	2.0	1.2	1.3
BTLA4	99.7	95.4	96.9	99.5	98.8	98.1
CD25+	48.6	10.5	3.9	58.2	41.7	32.1
CD69+	27.1	37.7	21.5	39.4	35.6	30.5
CD95+	99.9	99.9	99.5	99.6	99.0	97.3
CD103+	0.7	1.2	0.4	1.4	1.3	1.2
KLRG1+	1.6	3.7	3.3	11.4	8.3	10.7
LAG3+	5.6	8.2	3.3	1.5	1.6	1.4
PD1+	77.4	58.4	41.6	34.1	28.4	26.7
TIGIT+	68.5	40.3	30.3	45.8	52.1	52.2
TIM3+	58.0	42.4	59.4	61.0	58.4	56.8

图85

肿瘤ID	L4063于标准培养基中			L4064于CTS无血清培养基中		
标记	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试
2B4+	65.8	56.6	70.5	13.6	21.5	20.7
BTLA4	99.5	96.6	98.2	99.3	97.4	96.1
CD25+	41.4	10.5	5.9	60.6	32.0	17.1
CD69+	44.9	28.0	20.0	33.2	30.6	22.7
CD95+	99.6	99.6	98.9	98.9	96.1	93.5
CD103+	29.4	27.9	24.5	10.9	6.0	7.3
CXCR3+	99.9	99.9	99.8	99.3	99.2	99.2
KLRG1+	7.1	4.6	6.7	13.2	14.5	14.1
LAG3+	28.6	22.5	11.9	2.8	1.6	1.4
PD1+	56.9	54.5	51.7	25.4	20.0	23.6
TIGIT+	90.8	93.7	93.3	92.1	90.4	90.5
TIM3+	66.7	49.1	58.6	65.6	46.8	43.6

图86

TIL表征	L4063于标准培养基中			L4064于CTS无血清培养基中		
	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试
IFNγ (pg/mL)	907	428	2863	1485	3130	3863

以来自一个代表性实验的三份样品的平均值形式报告结果

图87

处理日	L4063于标准培养基中			L4064于CTS无血清培养基中		
	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试
再活化	12319.6	11928.7	11786.7	5891.6	5671.8	389.4[1]
规模扩大	32095.1	30368.6	26145.0	*	*	*
采集	17309.3	13828.4	16019.2	656.0	826.2	768.9

以来自一个代表性实验的三份样品的平均值形式报告结果
(*) 在轮次执行期间不收集关于L4064的第10/11天的废培养基。
(1) 再活化日的Gen 3.1测试L4064的数据明显低于Gen 3.1对照和Gen 3.0条件的相应值。由于获得的样品量较小，所以不可能重复分析以验证此数值的准确性。

图88

葡萄糖（g/L）							
处理日	L4063干标准培养基中			L4064干CTS无血清培养基中			
	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试	
再活化	1.8	1.7	1.4	4.3	4.1	3.8	
规模扩大	1.4	0.9	0.8	*	*	*	
采集	1.5	0.9	1.0	2.8	2.1	2.2	

（*）*在轮次执行期间不收集关于L4064的第10/11天的废培养基。*

图89

乳酸（g/L）						
处理日	L4063干标准培养基中			L4064干CTS无血清培养基中		
	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试
再活化	0.2	0.2	0.5	0.1	0.2	0.5
规模扩大	0.7	1.1	1.2	*	*	*
采集	1.1	1.7	1.6	1.5	2.0	1.9

（）在轮次执行期间不收集关于L4064的第10/11天的废培养基。*

图90

谷氨酰胺（mmol/L）						
	L4063干标准培养基中			L4064干CTS无血清培养基中		
处理日	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试
再活化	2.0	2.0	2.0	1.3	1.2	1.1
规模扩大	1.7	1.1	1.1	*	*	*
采集	1.9	1.3	1.3	0.7	0.6	0.6

（）在轮次执行期间不收集关于L4064的第10/11天的废培养基。*

图91

谷氨酰胺（mmol/L）						
	L4063干标准培养基中			L4064干CTS无血清培养基中		
处理日	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试
再活化	2.2	2.2	2.2	1.4	1.3	1.2
规模扩大	1.9	1.2	1.2	*	*	*
采集	2.1	1.5	1.5	0.8	0.7	0.7

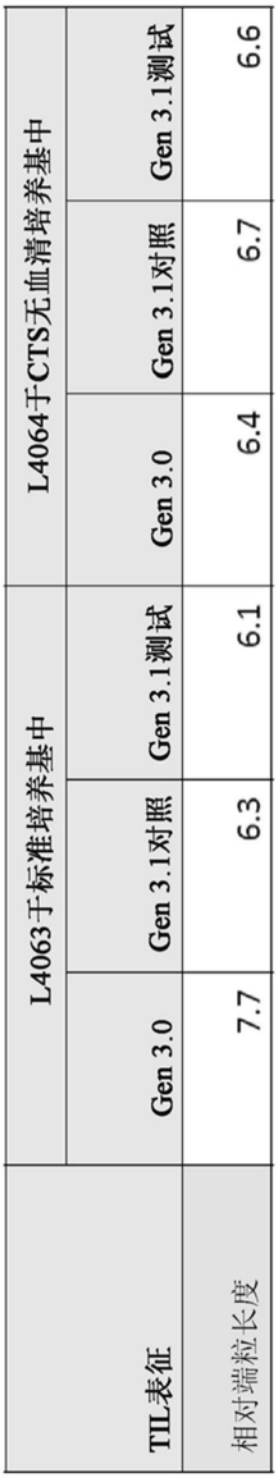
（）在轮次执行期间不收集关于L4064的第10/11天的废培养基。*

图92

氨（mmol/L）							
处理日	L4063于标准培养基中			L4064于CTS无血清培养基中			
	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试
再活化	1.9	1.9	2.0	0.7	0.8	0.9
规模扩大	1.8	2.2	2.3	*	*	*
采集	2.1	2.5	2.5	1.0	1.0	0.9

(*) *在轮次执行期间不收集关于L4064的第10/11天的废培养基。*

图93



TIL表征	L4063于标准培养基中			L4064于CTS无血清培养基中		
	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试
相对端粒长度	7.7	6.3	6.1	6.4	6.7	6.6

图94

TIL表征	L4063干标准培养基中			L4064干CTS无血清培养基中		
	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试
uCD3	14005.0	18149.0	17181.0	15107.0	21460.0	21503.0
香农熵指数	5.9	10.8	10.5	8.5	10.7	10.4

图95

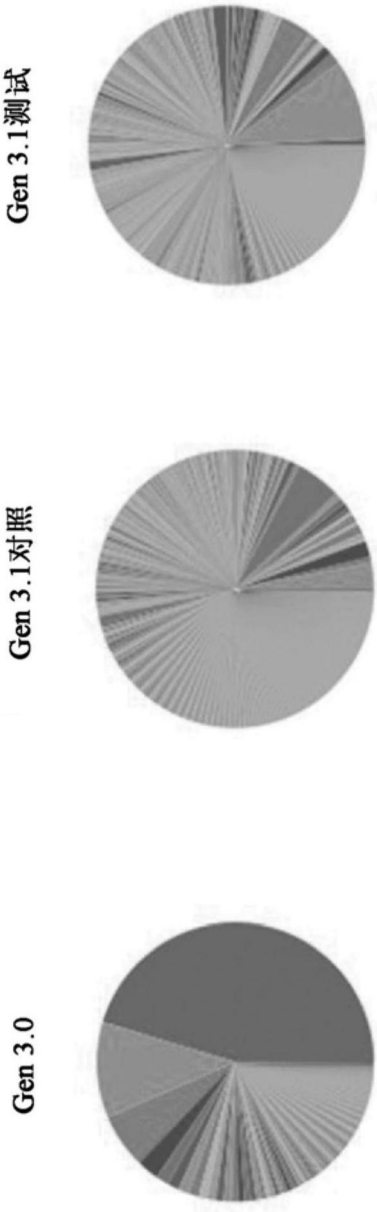
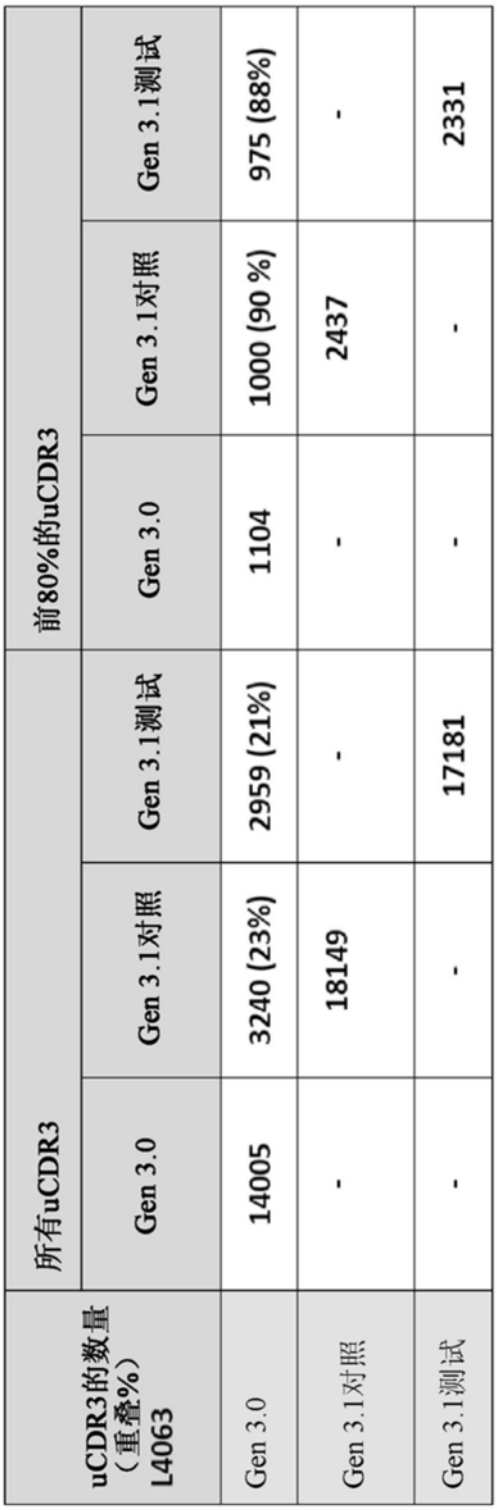


图96



uCDR3的数量（重叠%）L4063	所有uCDR3			前80%的uCDR3		
	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试
Gen 3.0	14005	3240 (23%)	2959 (21%)	1104	1000 (90 %)	975 (88%)
Gen 3.1对照	-	18149	-	-	2437	-
Gen 3.1测试	-	-	17181	-	-	2331

图97

uCDR3的数量（重叠%） L4064	所有uCDR3			前80%的uCDR3		
	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试
Gen 3.0	15107	5486 (36%)	5541 (36%)	2478	2186 (88%)	2163 (87%)
Gen 3.1对照	-	21460	-	-	3246	-
Gen 3.1测试	-	-	21503	-	-	3263

图98

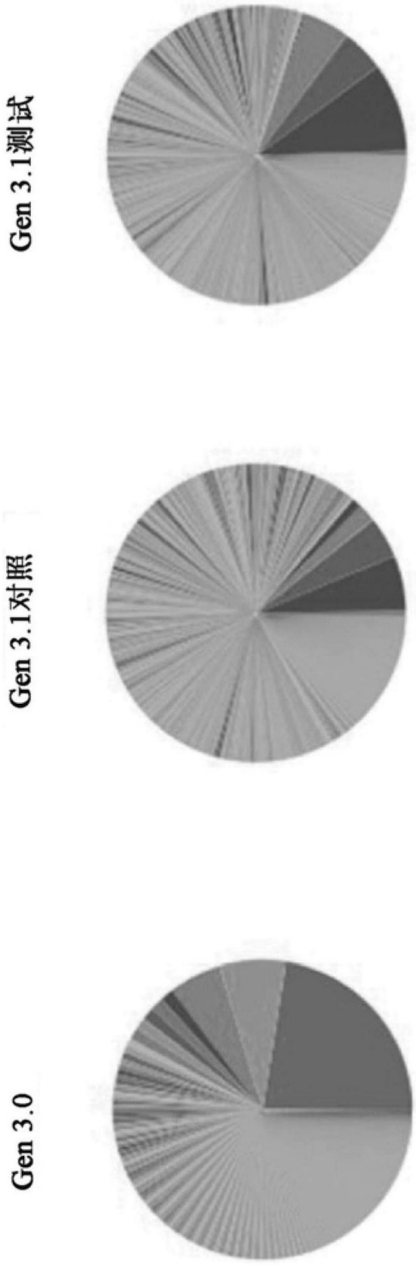


图99

步骤	工艺Gen 3-优化
第0天肿瘤 分离和活化	≤240个碎片 ≤60个碎片/烧瓶 ≤4个烧瓶 ≤2L培养基（500mL/烧瓶） IL-2（6000IU/mL） 2.5×10^8个饲养细胞/烧瓶 15ug OKT3/烧瓶
第7-8天再活化	新鲜TIL直接进入REP 活化整个培养 5×10^8个饲养细胞 30 ug OKT3/烧瓶 G-Rex 100MCS 添加500Ml培养基+ IL-2（6000IU/mL）
第10-11天规模 扩大或TIL传代 培养	≤4 G-REX 500MCS 规模扩大整个培养 将1L从GREX 100MCS转移到GREX 500MCS中 并且添加4L培养基+IL-2（3000 IU/mL）/烧瓶
第16-17天采集	采集 LOVO自动化细胞洗涤器 冷冻保存于Plasmalyte 1% HSA: CS10上

图100

测试	验收标准	Gen 3.1测试对比 Gen 3.0工艺
细胞计数（TVC）	相对于工艺Gen 3.0， Gen 3.1 > 30%	符合
存活率%	≥70%存活率	符合
免疫表型（CD3+%/CD45+%）	Gen 3.1与Gen 3.0工艺 之间的差异≤5%	符合
IFNγ分泌	Gen 3.1 ≥工艺Gen 3.0	符合

图101

再活化日的细胞计数

ID	体积（mL）		计数1（个细胞/毫升）	计数2（个细胞/毫升）	计数3（个细胞/毫升）	平均值（个细胞/毫升）	总细胞平均值*体积
Gen 3.0 (A) L4063	500	总数	7.10E+04	6.81E+04		6.96E+04	3.48E+07
		活的	5.27E+04	5.09E+04		5.18E+04	2.59E+07
		死亡的	1.83E+04	1.72E+04		1.78E+04	8.88E+06
		存活率%	74.30%	74.80%		74.55%	
Gen 3.1对照L4063	500	总数	1.41E+05	1.38E+05		1.40E+05	6.98E+07
		活的	1.31E+05	1.26E+05		1.29E+05	6.43E+07
		死亡的	9.84E+03	1.21E+04		1.10E+04	5.49E+06
		存活率%	93.00%	91.20%		92.10%	
Gen 3.1测试L4063	500	总数	3.26E+05	3.28E+05		3.27E+05	1.64E+08
		活的	2.83E+05	2.96E+05		2.90E+05	1.45E+08
		死亡的	4.25E+04	3.16E+04		3.71E+04	1.85E+07
		存活率%	87.00%	90.30%		88.65%	
Gen 3.0 (A) L4064	500	总数	1.59E+04	1.75E+04		1.67E+04	8.35E+06
		活的	1.39E+04	1.55E+04		1.47E+04	7.35E+06
		死亡的	1.98E+03	2.02E+03		2.00E+03	1.00E+06
		存活率%	87.50%	88.50%		88.00%	
Gen 3.1对照L4064	500	总数	2.02E+05	1.98E+05		2.00E+05	1.00E+08
		活的	1.88E+05	1.83E+05		1.86E+05	9.28E+07
		死亡的	1.38E+04	1.51E+04		1.45E+04	7.23E+06
		存活率%	93.20%	92.40%		92.80%	
Gen 3.1测试L4064	500	总数	2.70E+05	3.15E+05		2.93E+05	1.46E+08
		活的	2.55E+05	3.01E+05		2.78E+05	1.39E+08
		死亡的	1.51E+04	1.38E+04		1.45E+04	7.23E+06
		存活率%	94.40%	95.60%		95.00%	

图102

规模扩大日的细胞计数

ID	体积（mL）		计数1（个细胞/毫升）	计数3（个细胞/毫升）	计数2（个细胞/毫升）	平均值（个细胞/毫升）	总细胞平均值*体积
Gen 3.0 (A) L4063	1000	总数	6.57E+05	6.61E+05		6.59E+05	6.59E+08
		活的	6.00E+05	6.14E+05		6.07E+05	6.07E+08
		死亡的	5.71E+04	4.68E+04		5.20E+04	5.20E+07
		存活率%	91.30%	92.90%		92.10%	
Gen 3.1对照L4063	1000	总数	1.66E+06	1.82E+06		1.74E+06	1.74E+09
		活的	1.59E+06	1.72E+06		1.66E+06	1.66E+09
		死亡的	7.17E+04	9.07E+04		8.12E+04	8.12E+07
		存活率%	95.70%	95.00%		95.35%	
Gen 3.1测试L4063	1000	总数	1.88E+06	2.00E+06		1.94E+06	1.94E+09
		活的	1.76E+06	1.89E+06		1.83E+06	1.83E+09
		死亡的	1.20E+05	1.15E+05		1.18E+05	1.18E+08
		存活率%	93.60%	94.30%		93.95%	
Gen 3.0 (A) L4064	1000	总数	7.95E+05	8.58E+05		8.27E+05	8.27E+08
		活的	7.17E+05	7.78E+05		7.48E+05	7.48E+08
		死亡的	7.85E+04	8.05E+04		7.95E+04	7.95E+07
		存活率%	90.10%	90.60%		90.35%	
Gen 3.1对照L4064	1000	总数	1.38E+06	1.32E+06		1.35E+06	1.35E+09
		活的	1.31E+06	1.24E+06		1.28E+06	1.28E+09
		死亡的	7.20E+04	8.13E+04		7.67E+04	7.67E+07
		存活率%	94.80%	93.80%		94.30%	
Gen 3.1测试L4064	1000	总数	1.85E+06	1.76E+06		1.81E+06	1.81E+09
		活的	1.76E+06	1.67E+06		1.72E+06	1.72E+09
		死亡的	8.62E+04	8.95E+04		8.79E+04	8.79E+07
		存活率%	95.30%	94.90%		95.10%	

图103

L4063采集的细胞计数

ID	体积（mL）		计数1（个细胞/毫升）	计数2（个细胞/毫升）	计数3（个细胞/毫升）	平均值（个细胞/毫升）	总细胞 平均值*体积
Gen 3.0 (A) L4063，LOVO前	602.4	总数	1.68E+07	1.70E+07		1.69E+07	1.02E+10
		活的	1.52E+07	1.54E+07		1.53E+07	9.22E+09
		死亡的	1.60E+06	1.65E+06		1.63E+06	9.79E+08
		存活率%	90.50%	90.30%		90.40%	
3.1对照L4063，LOVO前	497.1	总数	3.39E+07	3.90E+07		3.65E+07	1.81E+10
		活的	3.25E+07	3.73E+07		3.49E+07	1.73E+10
		死亡的	1.41E+06	1.63E+06		1.52E+06	7.56E+08
		存活率%	95.80%	95.80%		95.80%	
Gen 3.1测试L4063，LOVO前	552.3	总数	3.71E+07	3.62E+07		3.67E+07	2.02E+10
		活的	3.56E+07	3.51E+07		3.54E+07	1.95E+10
		死亡的	1.50E+06	1.09E+06		1.30E+06	7.15E+08
		存活率%	96.00%	97.00%		96.50%	
Gen 3.0 (A) L4063，LOVO后	165	总数	5.37E+07	5.73E+07	5.50E+07	5.53E+07	9.13E+09
		活的	4.32E+07	4.52E+07	4.36E+07	4.40E+07	7.26E+09
		死亡的	1.04E+07	1.21E+07	1.14E+07	1.13E+07	1.86E+09
		存活率%	80.50%	78.80%	79.30%	79.53%	
Gen 3.1对照L4063，LOVO后	165	总数	1.21E+08	1.01E+08	1.22E+08	1.15E+08	1.89E+10
		活的	1.10E+08	8.85E+07	1.09E+08	1.03E+08	1.69E+10
		死亡的	1.11E+07	1.23E+07	1.27E+07	1.20E+07	1.99E+09
		存活率%	90.90%	87.80%	89.60%	89.43%	
Gen 3.1测试L4063，LOVO后	175	总数	1.05E+08	1.20E+08		1.13E+08	1.97E+10
		活的	9.93E+07	1.14E+08		1.07E+08	1.87E+10
		死亡的	5.51E+06	6.14E+06		5.83E+06	1.02E+09
		存活率%	94.70%	94.90%		94.80%	

图104

L4064采集的细胞计数

ID	体积（mL）		计数1（个细胞/毫升）	计数2（个细胞/毫升）	计数3（个细胞/毫升）	平均值（个细胞/毫升）	总细胞平均值*体积
Gen 3.0 (A) L4064，LOVO前	641.3	总数	1.99E+07	1.94E+07		1.97E+07	1.26E+10
		活的	1.83E+07	1.94E+07		1.89E+07	1.21E+10
		死亡的	1.60E+06	1.68E+06		1.64E+06	1.05E+09
		存活率%	92.00%	92.00%		92.00%	
Gen 3.1对照L4064，LOVO前	493.4	总数	3.98E+07	3.87E+07		3.93E+07	1.94E+10
		活的	3.65E+07	3.55E+07		3.60E+07	1.78E+10
		死亡的	3.31E+06	3.22E+06		3.27E+06	1.61E+09
		存活率%	91.70%	91.70%		91.70%	
Gen 3.1测试L4064，LOVO前	593.4	总数	3.92E+07	3.79E+07		3.86E+07	2.29E+10
		活的	3.67E+07	3.54E+07		3.61E+07	2.14E+10
		死亡的	2.55E+06	2.50E+06		2.53E+06	1.50E+09
		存活率%	93.50%	93.40%		93.45%	
Gen 3.0 (A) L4064，LOVO后	165	总数	8.58E+07	8.34E+07		8.46E+07	1.40E+10
		活的	7.56E+07	7.46E+07		7.51E+07	1.24E+10
		死亡的	1.02E+07	8.79E+06		9.50E+06	1.57E+09
		存活率%	88.10%	89.50%		88.80%	
Gen 3.1对照L4064，LOVO后	165	总数	1.13E+08	1.22E+08	1.15E+08	1.18E+08	1.94E+10
		活的	9.21E+07	1.01E+08	9.45E+07	9.66E+07	1.59E+10
		死亡的	2.14E+07	2.13E+07	2.07E+07	2.14E+07	3.52E+09
		存活率%	81.20%	82.60%	82.10%	81.90%	
Gen 3.1测试L4063，LOVO后	165	总数	1.33E+08	1.45E+08		1.39E+08	2.29E+10
		活的	1.14E+08	1.22E+08		1.18E+08	1.95E+10
		死亡的	1.94E+07	2.26E+07		2.10E+07	3.47E+09
		存活率%	85.40%	84.40%		84.90%	

图105

	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD4/CD27 | 亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD4/CD28 | 亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD4/CD56 | 亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD4/CD57 | 亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/CD27 | 亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/CD28 | 亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/CD56 | 亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/CD57 | 亲本频率（%）
	CD4+/CD27	CD4+/CD28	CD4+/CD56	CD4+/CD57	CD8+/CD27	CD8+/CD28	CD8+/CD56	CD8+/CD57
L4063-Gen 3.0	3.8	82.7	0.42	6.7	15	47.5	3.29	0.28
L4063-Gen 3.1 CT	2.08	71.8	0.53	17	25.6	23	2.33	1.18
L4063-Gen 3.1 +饲养细胞	3.35	80.2	0.69	20.5	30.5	24.5	4.19	1.07
L4064-Gen 3.0	6.66	97.5	0.54	16	14.1	88	6.62	1.29
L4064-Gen 3.1 CT	0.72	73.5	0.54	7.58	3.3	45.1	10.3	1.95
L4063-Gen 3.1 +饲养细胞	2.24	66.8	0.34	7.98	6.69	37.3	9.98	2.54

图106

		S1/S2/总数/活的 |亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14- |亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/CD8-/NK |裸细胞频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/CD19 |裸细胞频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab |裸细胞频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD4 |裸细胞频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD4/CD27 |裸细胞频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD4/CD28 |裸细胞频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD4/CD56 |裸细胞频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD4/CD57 |裸细胞频率（%）
		L/D	CD34+	NK	CD19	TCRab+	TCRab+/CD4+	TCRab+/CD4+/CD27	TCRab+/CD4+/CD28	TCRab+/CD4+/CD56	TCRab+/CD4+/CD57
L4063-Gen 3.0		C10 10.tcx	82.2	0.13	1.3	0.083	88.6	56.4	2.34	46.6	0.24	3.78
L4063-Gen 3.1 CT		C11 11.tcx	83.4	0.035	0.15	0.033	97.5	85.8	1.78	61.6	0.46	14.6
L4063-Gen 3.1 +饲养细胞		C12 12.tcx	91	0.032	1.04	0.007%	95.5	77.5	2.6	62.1	0.54	15.9
L4064-Gen 3.0		D1 13.tcx	76.6	0.18	2.45	0.11	93	33.8	2.25	32.9	0.18	5.4
L4064-Gen 3.1 CT		D2 14.tcx	83.1	0.068	0.23	0.011	97.3	64.8	0.46	47.6	0.35	4.91
L4063-Gen 3.1 +饲养细胞		D3 15.tcx	89.5	0.043	0.52	0.023	96.7	57.4	1.28	38.4	0.2	4.58

		S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD4/Q1: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ |亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD4/Q2: CCR7-PE-A+, CD45RA-AF700-A+ |亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD4/Q3: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A- |亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD4/Q4: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A- |亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD4/Q5: CD62L-DV421-A+, CD45RA-AF700-A+ |亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD4/Q6: CD62L-DV421-A+, CD45RA-AF700-A+ |亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD4/Q7: CD62L-DV421-A+, CD45RA-AF700-A- |亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD4/Q8: CD62L-DV421-A-, CD45RA-AF700-A- |亲本频率（%）
		TEMRA	幼稚	CM	EM	TEMRA	幼稚	CM	EM
L4063-Gen 3.0		0.58	0.77	11.2	87.4	0.36	0.26	45.6	53.7
L4063-Gen 3.1 CT		1.22	0.8	1.56	94.4	0.66	0.22	16.8	82.3
L4063-Gen 3.1 +饲养细胞		0.88	0.35	1.39	97.4	0.36	0.17	29.3	70.2
L4064-Gen 3.0		1.47	1.3	14.2	83	1.09	0.53	46.3	52.1
L4064-Gen 3.1 CT		0.41	0.096	5.28	94.2	0.73	0.11	30.6	68.6
L4063-Gen 3.1 +饲养细胞		0.44	0.07	2.78	95.7	0.37	0.035	29.9	69.9

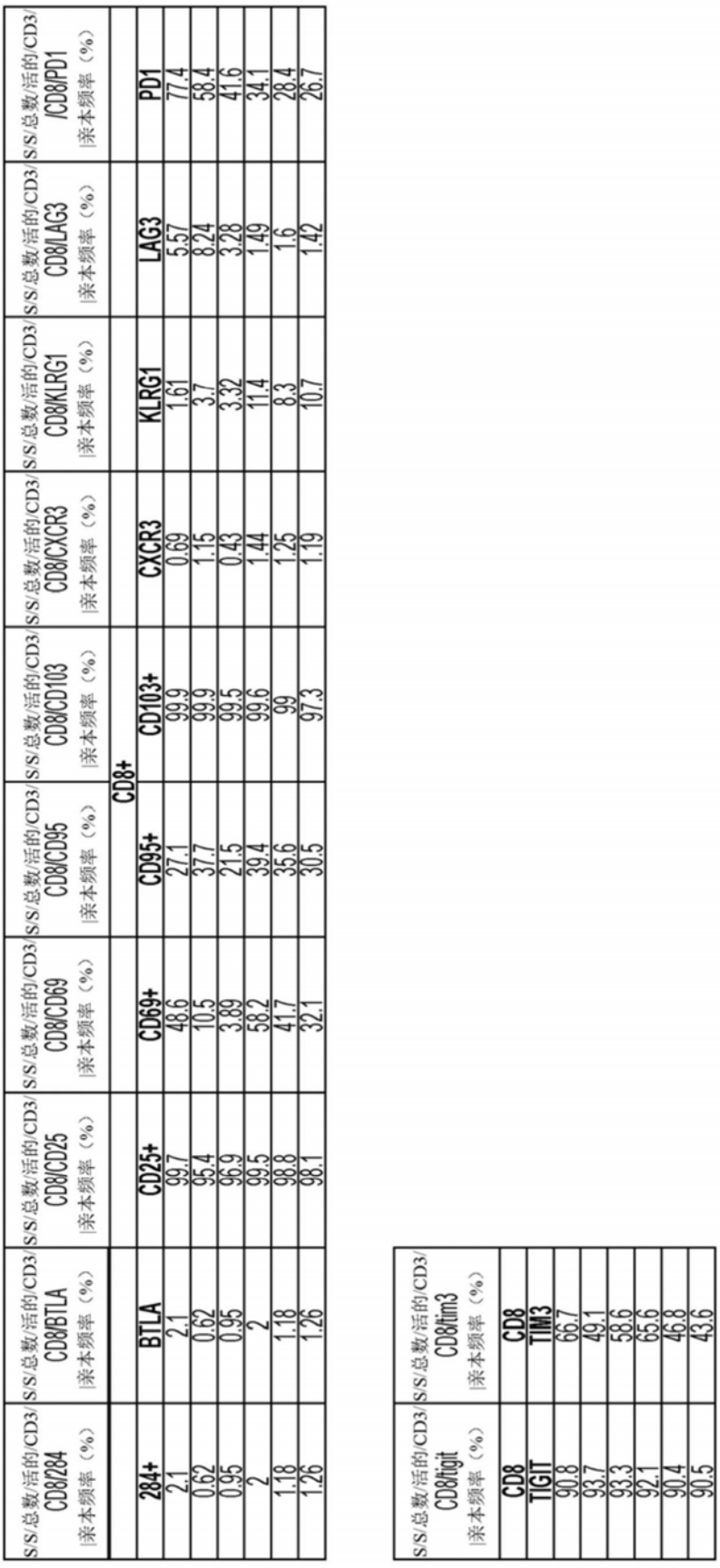
		S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/Q1: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ |亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/Q2: CCR7-PE-A+, CD45RA-AF700-A+ |亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/Q3: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A- |亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/Q4: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A- |亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/Q5: CD62L-DV421-A+, CD45RA-AF700-A+ |亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/Q6: CD62L-DV421-A+, CD45RA-AF700-A+ |亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/Q7: CD62L-DV421-A+, CD45RA-AF700-A- |亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRab/CD8/Q8: CD62L-DV421-A-, CD45RA-AF700-A- |亲本频率（%）	S1/S2/总数/活的/CD14-/TCRgd |亲本频率（%）
		TEMRA	幼稚	CM	EM	TEMRA	幼稚	CM	EM	
L4063-Gen 3.0		1.72	1.54	18.1	79.1	3.06	0.67	32	74.3	6.47
L4063-Gen 3.1 CT		1.65	0.62	3.39	94.3	0.52	0.097	15.8	83.5	1.11
L4063-Gen 3.1 +饲养细胞		2.65	0.73	1.66	95	0.89	0.41	29.7	789	2
L4064-Gen 3.0		6.49	4.31	10.9	70.3	6.05	3.31	61.9	39.8	2.36
L4064-Gen 3.1 CT		6.3	0.59	7.15	86	8	0.72	18.9	72.4	1.68
L4063-Gen 3.1 +饲养细胞		5.83	0.22	3.17	90.8	5.38	0.96	18.2	75.5	1.86

图107

		S/S/总数/活的/CD3/CD4/284 |亲本频率（%）	S/S/总数/活的/CD3/BTLA |亲本频率（%）	S/S/总数/活的/CD3/CD4/CD25 |亲本频率（%）	S/S/总数/活的/CD3/CD4/CD69 |亲本频率（%）	S/S/总数/活的/CD3/CD4/CD95 |亲本频率（%）	S/S/总数/活的/CD3/CD4/CD103 |亲本频率（%）	S/S/总数/活的/CD3/CD4/KLRG1+ |亲本频率（%）	S/S/总数/活的/CD3/CD4/LAG3 |亲本频率（%）	S/S/总数/活的/CD3/CD4/PD1 |亲本频率（%）
		284+	BTLA	CD25+	CD69+	CD4 CD95+	CD103+	KLRG1+	LAG3+	PD1+
L4063-Gen 3.0	G10 10.tcs	2.1	99.7	48.6	27.1	99.9	0.69	1.61	5.57	77.4
L4063-Gen 3.1 CT	G11 11.tcs	0.62	95.4	10.5	37.7	99.9	1.15	3.7	8.24	58.4
L4063-Gen 3.1 +饲养细胞	G12 12.tcs	0.95	96.9	3.89	21.5	99.5	0.43	3.32	3.28	41.6
L4064-Gen 3.0	H1 13.tcs	2	99.5	58.2	39.4	99.6	1.44	11.4	1.49	34.1
L4064-Gen 3.1 CT	H2 14.tcs	1.18	98.8	41.7	35.6	99	1.25	8.3	1.6	28.4
L4063-Gen 3.1 +饲养细胞	H3 15.tcs	1.26	98.1	32.1	30.5	97.3	1.19	10.7	1.42	26.7

S/S/总数/活的/CD3/CD4/tigit |亲本频率（%）	S/S/总数/活的/CD3/CD4/tigit |亲本频率（%）
CD4+	CD4+
TIGIT+	TIM3+
68.5	58
40.3	42.4
30.3	59.4
45.8	61
52.1	58.4
52.2	56.8

图108



S/S/总数/活的/CD3/ CD8/284 |亲本频率（%）	S/S/总数/活的/CD3/ CD8/BTLA |亲本频率（%）	S/S/总数/活的/CD3/ CD8/CD25 |亲本频率（%）	S/S/总数/活的/CD3/ CD8/CD69 |亲本频率（%）	S/S/总数/活的/CD3/ CD8/CD95 |亲本频率（%）	S/S/总数/活的/CD3/ CD8/CD103 |亲本频率（%）	S/S/总数/活的/CD3/ CD8/CXCR3 |亲本频率（%）	S/S/总数/活的/CD3/ CD8/KLRG1 |亲本频率（%）	S/S/总数/活的/CD3/ CD8/LAG3 |亲本频率（%）	S/S/总数/活的/CD3/ /CD8/PD1 |亲本频率（%）
CD8+									
284+	BTLA	CD25+	CD69+	CD95+	CD103+	CXCR3	KLRG1	LAG3	PD1
2.1	2.1	99.7	48.6	27.1	99.9	0.69	1.61	5.57	77.4
0.62	0.62	95.4	10.5	37.7	99.9	1.15	3.7	8.24	58.4
0.95	0.95	96.9	3.89	21.5	99.5	0.43	3.32	3.28	41.6
2	2	99.5	58.2	39.4	99.6	1.44	11.4	1.49	34.1
1.18	1.18	98.8	41.7	35.6	99	1.25	8.3	1.6	28.4
1.26	1.26	98.1	32.1	30.5	97.3	1.19	10.7	1.42	26.7

S/S/总数/活的/CD3/ CD8/tigit |亲本频率（%）	S/S/总数/活的/CD3/ CD8/tim3 |亲本频率（%）
CD8	CD8
TIGIT	TIM3
90.8	66.7
93.7	49.1
93.3	58.6
92.1	65.6
90.4	46.8
90.5	43.6

图109

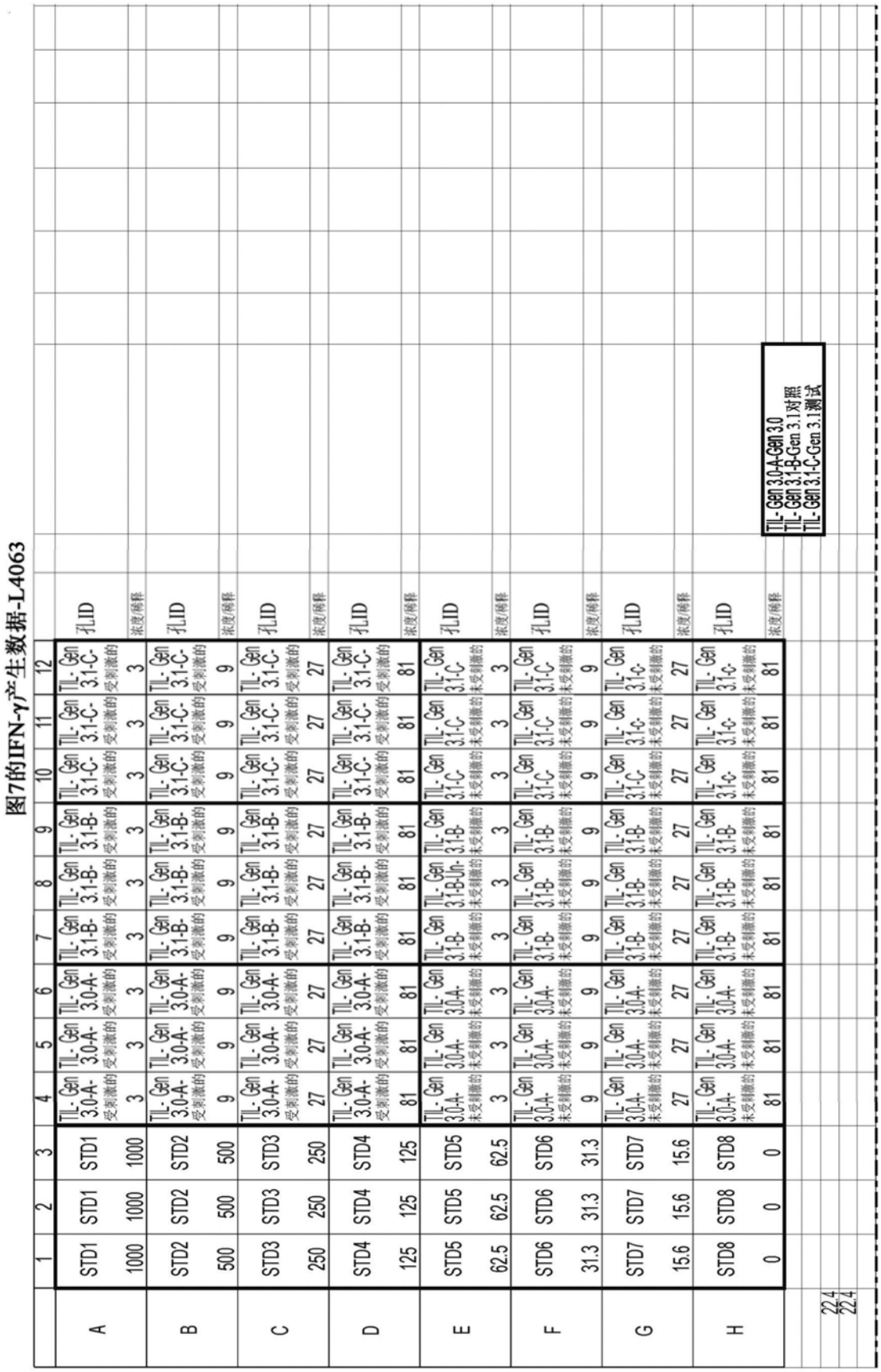
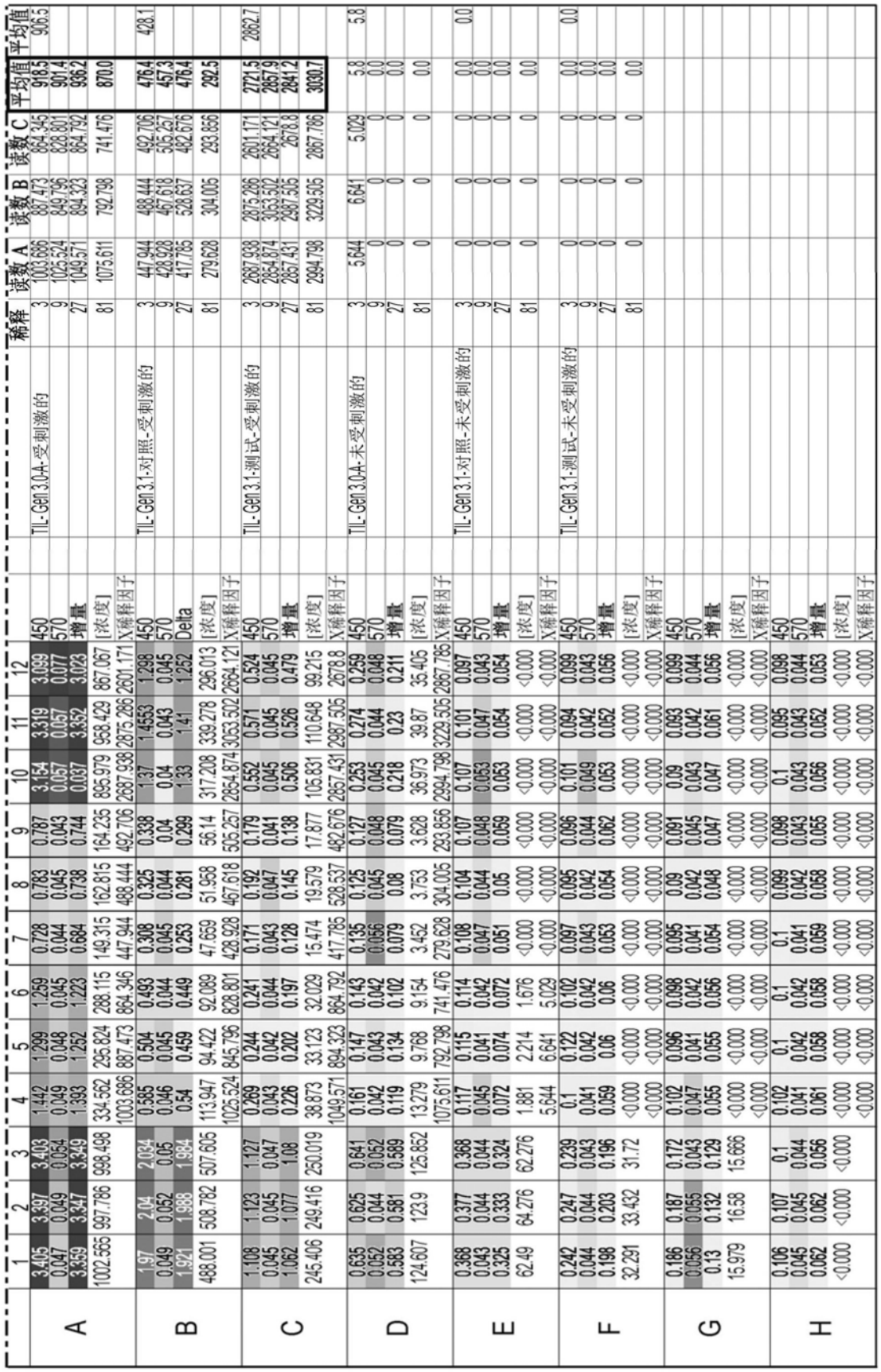

图7的IFN-γ产生数据-L4063
TIL-Gen 3.0-A-Gen 3.0
TIL-Gen 3.1-B-Gen 3.1对照
TIL-Gen 3.1-C-Gen 3.1测试
浓度/稀释
孔ID

图110A



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		稀释	读数 A	读数 B	读数 C	平均值	平均值
A	3.405	3.397	3.403	1.442	1.299	1.259	0.728	0.783	0.787	3.154	3.319	3.099	TIL-Gen3.0A-受刺激的	3	1003.686	887.473	854.345	918.5	906.5
	0.047	0.049	0.054	0.049	0.048	0.045	0.044	0.045	0.043	0.057	0.057	0.077		9	1025.524	849.796	828.801	901.4	
	3.359	3.347	3.349	1.393	1.252	1.223	0.684	0.738	0.744	0.037	3.352	3.023		27	1049.571	894.323	864.792	936.2	
	1002.565	997.786	998.498	334.562	295.824	288.115	149.315	162.815	164.235	895.979	958.429	867.067	[浓度]	81	1075.611	792.798	741.476	870.0	
				1003.686	887.473	864.346	447.944	488.444	492.706	2687.938	2875.286	2601.171	X稀释因子						
B	1.97	2.04	2.034	0.585	0.504	0.493	0.308	0.325	0.338	1.37	1.4553	1.298	TIL-Gen3.1-对照-受刺激的	3	447.944	488.444	492.706	476.4	428.1
	0.049	0.052	0.05	0.046	0.045	0.044	0.045	0.044	0.04	0.04	0.043	0.045		9	429.928	457.618	505.427	457.3	
	1.921	1.988	1.984	0.54	0.459	0.449	0.253	0.281	0.299	1.33	1.41	1.252	Delta	27	417.785	528.637	482.676	476.4	
	488.001	508.782	507.605	113.947	94.422	92.089	47.659	51.958	56.14	317.208	339.278	296.013	[浓度]	81	279.628	304.005	293.866	292.5	
				1025.524	845.796	828.801	428.928	467.618	505.257	2854.874	3053.502	2664.121	X稀释因子						
C	1.108	1.123	1.127	0.269	0.244	0.241	0.171	0.192	0.179	0.552	0.571	0.524	TIL-Gen3.1-测试-受刺激的	3	2687.938	2875.286	2601.171	2721.5	2862.7
	0.045	0.045	0.047	0.043	0.042	0.044	0.043	0.047	0.041	0.045	0.045	0.045		9	2554.874	3053.502	2664.121	2757.9	
	1.062	1.077	1.08	0.226	0.202	0.197	0.128	0.145	0.138	0.506	0.526	0.479	增量	27	2657.431	2987.505	2678.8	2784.2	
	245.406	249.416	250.019	38.873	33.123	32.029	15.474	19.579	17.877	105.831	110.648	99.215	[浓度]	81	2994.798	3229.505	2867.786	3030.7	
				1049.571	894.323	864.792	417.785	526.537	482.676	2857.431	2987.505	2678.8	X稀释因子						
D	0.635	0.625	0.641	0.161	0.147	0.143	0.135	0.125	0.127	0.253	0.274	0.259	TIL-Gen3.0A-未受刺激的	3	5.644	6.641	5.029	5.8	5.8
	0.052	0.044	0.052	0.042	0.043	0.042	0.066	0.045	0.048	0.045	0.044	0.048		9	0	0	0	0.0	
	0.583	0.581	0.589	0.119	0.134	0.102	0.079	0.08	0.079	0.218	0.23	0.211	增量	27	0	0	0	0.0	
	124.607	123.9	125.852	13.279	9.768	9.154	3.452	3.753	3.628	36.973	39.87	35.405	[浓度]	81	0	0	0	0.0	
				1075.611	792.798	741.476	279.628	304.005	293.856	2894.798	3229.505	2867.785	X稀释因子						
E	0.368	0.377	0.368	0.117	0.115	0.114	0.108	0.104	0.107	0.107	0.101	0.097	TIL-Gen3.1-对照-未受刺激的	3	0	0	0	0.0	0.0
	0.043	0.044	0.044	0.045	0.041	0.042	0.047	0.044	0.048	0.053	0.047	0.043		9	0	0	0	0.0	
	0.325	0.333	0.324	0.072	0.074	0.072	0.051	0.05	0.059	0.053	0.054	0.054	增量	27	0	0	0	0.0	
	62.49	64.276	62.276	1.881	2.214	1.676	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]	81	0	0	0	0.0	
				5.644	6.641	5.029	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	X稀释因子						
F	0.242	0.247	0.239	0.1	0.122	0.102	0.097	0.095	0.096	0.101	0.094	0.099	TIL-Gen3.1-测试-未受刺激的	3	0	0	0	0.0	0.0
	0.044	0.044	0.043	0.041	0.042	0.042	0.043	0.042	0.044	0.049	0.042	0.043		9	0	0	0	0.0	
	0.198	0.203	0.196	0.059	0.06	0.06	0.053	0.054	0.062	0.053	0.052	0.056	增量	27	0	0	0	0.0	
	32.291	33.432	31.72	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]	81	0	0	0	0.0	
				<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	X稀释因子						
G	0.186	0.187	0.172	0.102	0.096	0.098	0.095	0.09	0.091	0.09	0.083	0.099	450						
	0.056	0.055	0.043	0.047	0.041	0.042	0.041	0.042	0.045	0.043	0.042	0.044	570						
	0.13	0.132	0.129	0.055	0.055	0.056	0.054	0.048	0.047	0.047	0.061	0.056	增量						
	15.979	16.58	15.666	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]						
				<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	X稀释因子						
H	0.106	0.107	0.1	0.102	0.1	0.1	0.1	0.099	0.098	0.1	0.095	0.098	450						
	0.045	0.045	0.044	0.041	0.042	0.042	0.041	0.042	0.043	0.043	0.043	0.044	570						
	0.062	0.062	0.056	0.061	0.058	0.058	0.059	0.058	0.055	0.056	0.052	0.053	增量						
	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]						
				<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	X稀释因子						

图110B

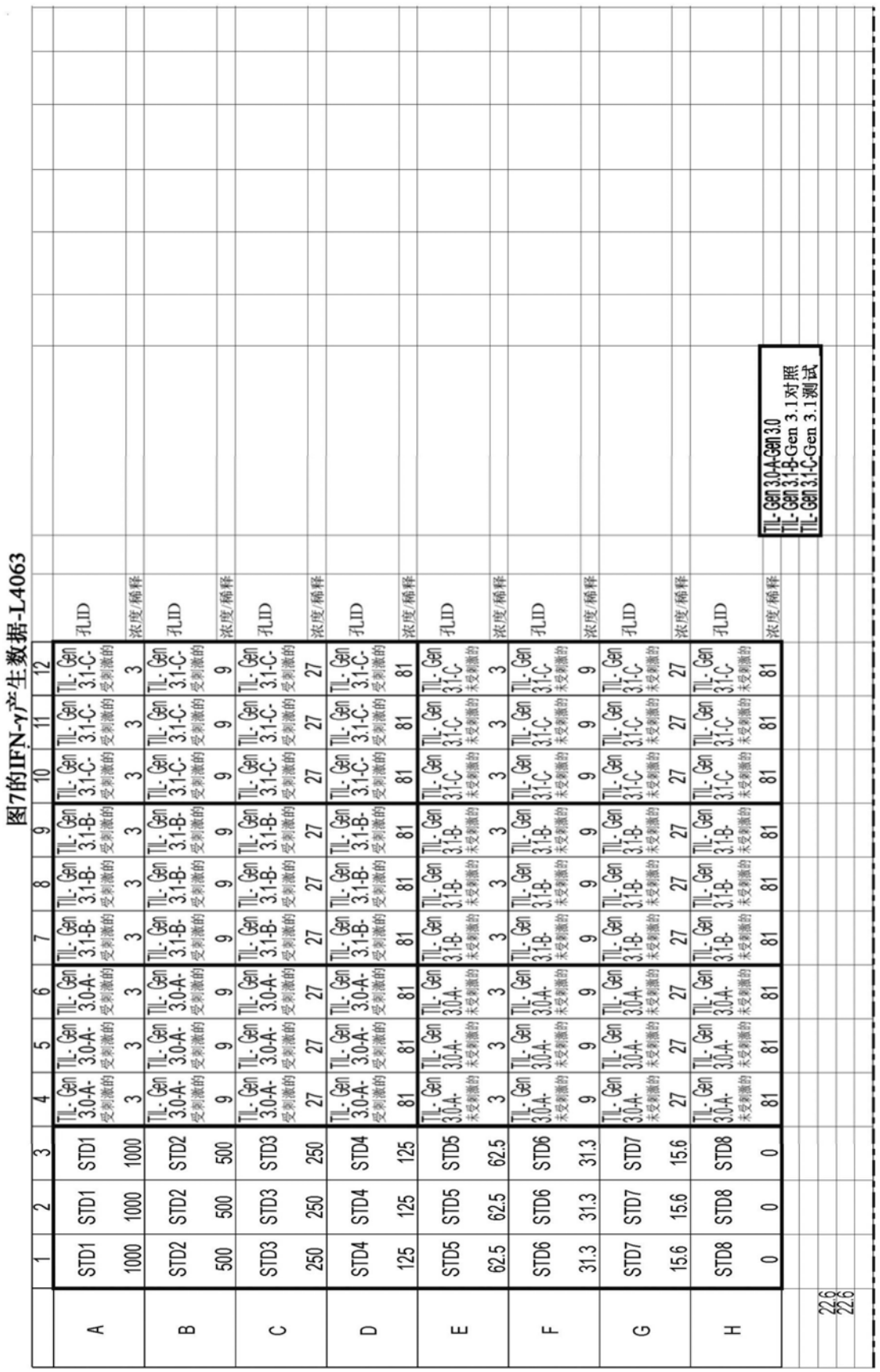

图7的IFN-γ产生数据-L4063
TIL-Gen 3.0-A-Gen 3.0
TIL-Gen 3.1-B-Gen 3.1对照
TIL-Gen 3.1-C-Gen 3.1测试
孔ID
浓度/稀释
受刺激的
未受刺激的
STD1
STD2
STD3
STD4
STD5
STD6
STD7
STD8
1000
500
250
125
62.5
31.3
15.6
0
22.6

图111A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		稀释	读数 A	读数 B	读数 C	平均值	平均值
A	3.165	3.22	3.239	1.821	1.889	1.886	3.07	3.076	3.168	3.438	3.447	3.533	450	TIL-Gen 3.0A-受刺激的	3	1500.622	1588.61	1559.291	1542.8	1484.5
	0.047	0.049	0.047	0.04	0.039	0.046	0.053	0.054	0.052	0.049	0.054	0.048	570		9	1466.698	1502.481	1501.971	1497.1	
	3.189	3.173	3.191	1.782	1.85	1.841	3.017	3.023	3.117	3.369	3.392	3.465	增量		27	1447.487	1407.513	1455.761	1463.6	
	988.846	1002.314	1009.363	500.207	522.87	519.764	941.686	943.838	980.208	1087.626	1089.11	1126.295	[浓度]		81	1382.905	1449.751	1470.802	1434.5	
				1500.622	1568.61	1559.291	2825.058	2831.514	2940.624	3262.879	3267.331	3378.885	X稀释因子						
B	1.801	1.851	1.81	0.732	0.739	0.741	1.34	1.296	1.326	1.587	1.619	1.676	450	TIL-Gen 3.0A-受刺激的	3	2825.058	2831.514	2940.624	2865.7	3130.0
	0.068	0.047	0.04	0.038	0.039	0.041	0.05	0.04	0.039	0.048	0.043	0.046	570		9	3080.537	2985.191	3072.713	3046.1	
	1.763	1.803	1.77	0.694	0.7	0.7	1.29	1.256	1.287	1.539	1.576	1.631	增量		27	3281.421	3122.775	3207.538	3203.9	
	493.919	507.341	496.135	165.189	166.942	166.886	342.282	331.688	341.413	420.895	432.774	450.716	[浓度]		81	3470.732	3328.622	3413.835	3404.4	
				1486.698	1502.481	1501.971	3080.537	2985.191	3072.713	3788.057	3894.965	4056.443	X稀释因子						
C	1.031	1.03	1.026	0.323	0.324	0.321	0.573	0.559	0.569	0.668	0.655	0.698	450	TIL-Gen 3.1-对照，受刺激的	3	3262.879	3267.331	3378.885	3303.0	3863.0
	0.034	0.034	0.04	0.042	0.037	0.039	0.036	0.044	0.042	0.044	0.044	0.045	570		9	3788.057	3894.965	4056.443	3913.2	
	0.997	0.994	0.986	0.281	0.287	0.282	0.537	0.515	0.527	0.236	0.612	0.653	增量		27	3929.339	3839.827	4152.144	3973.8	
	253.163	252.211	249.864	53.611	55.093	53.917	121.534	115.668	118.798	42.146	142.216	153.783	[浓度]		81	4107.196	4152.519	4526.823	7282.2	
				1447.487	1487.513	1455.761	3281.421	3122.775	3207.538	3929.339	3839.827	4152.144	X稀释因子						
D	0.579	0.579	0.59	0.177	0.178	0.179	0.283	0.275	0.279	0.317	0.315	0.338	450	TIL-Gen 3.1-测试，受刺激的	3	32.413	23.924	18.322	24.9	29.3
	0.035	0.043	0.044	0.044	0.042	0.042	0.045	0.043	0.044	0.047	0.043	0.048	570		9	23.936	17.959	9.948	17.3	
	0.544	0.537	0.546	0.133	0.136	0.137	0.238	0.231	0.236	0.269	0.272	0.29	增量		27	18.223	9.043	7.065	11.4	
	123.535	121.425	124.112	17.073	17.898	18.158	42.849	41.094	42.146	50.706	51.266	55.887	[浓度]		81	107.303	39.226	43.826	63.5	
				1382.905	1449.751	1470.802	3470.732	3328.622	3413.835	4107.196	4152.519	4526.823	X稀释因子						
E	0.353	0.367	0.386	0.149	0.136	0.13	0.154	0.154	0.164	0.22	0.209	0.21	450	TIL-Gen 3.0A-未受刺激的	3	35.99	36.819	42.025	38.3	23.3
	0.045	0.044	0.043	0.043	0.043	0.045	0.043	0.042	0.044	0.042	0.043	0.046	570		9	29.816	28.291	32.497	30.2	
	0.307	0.323	0.343	0.106	0.093	0.085	0.111	0.112	0.12	0.178	0.166	0.164	增量		27	10.043	2.294	0	4.1	
	60.383	64.414	69.586	10.804	7.975	6.107	11.997	12.273	14.008	27.905	24.995	24.585	[浓度]		81	15.362	30.128	16.81	20.8	
				32.413	23.924	18.322	35.99	36.819	42.025	83.716	74.986	73.755	X稀释因子						
F	0.232	0.23	0.231	0.113	0.108	0.105	0.114	0.113	0.115	0.135	0.136	0.138	450	TIL-Gen 3.1-对照，未受刺激的	3	83.716	0	0	0.0	0.0
	0.045	0.044	0.046	0.044	0.042	0.043	0.042	0.041	0.042	0.042	0.043	0.045	570		9	70.965	0	0	0.0	
	0.187	0.186	0.186	0.069	0.066	0.061	0.072	0.071	0.073	0.093	0.093	0.093	增量		27	31.452	0	0	0.0	
	30.2	29.784	29.759	2.66	1.995	1.105	3.313	3.143	3.611	7.885	7.975	7.997	[浓度]		81	65.646	0	0	0.0	
				23.936	17.959	9.948	29.816	28.291	32.497	70.965	71.771	71.973	X稀释因子						
G	0.167	0.173	0.166	0.102	0.1	0.099	0.098	0.097	0.099	0.104	0.11	0.109	450							
	0.047	0.042	0.045	0.043	0.042	0.042	0.041	0.041	0.049	0.042	0.047	0.042	570							
	0.121	0.131	0.121	0.059	0.057	0.057	0.057	0.056	0.05	0.062	0.064	0.067	增量							
	14.194	16.65	14.194	0.675	0.335	0.262	0.372	0.085	<0.000	1.165	1.628	2.347	[浓度]							
				18.223	9.043	7.065	10.043	2.294	<0.000	31.452	43.943	63.363	X稀释因子						
H	0.111	0.103	0.099	0.104	0.1	0.101	0.038	0.103	0.1	0.101	0.104	0.103	450							
	0.053	0.043	0.043	0.042	0.041	0.043	0.041	0.041	0.045	0.041	0.047	0.049	570							
	0.059	0.06	0.056	0.062	0.058	0.058	0.057	0.058	0.057	0.06	0.062	0.054	增量							
	0.598	0.81	0.154	1.325	0.484	0.541	0.19	0.372	0.208	0.81	1.265	<0.000	[浓度]							
				107.303	39.226	43.826	15.632	30.128	16.81	65.646	102.436	<0.000	X稀释因子						

图111B

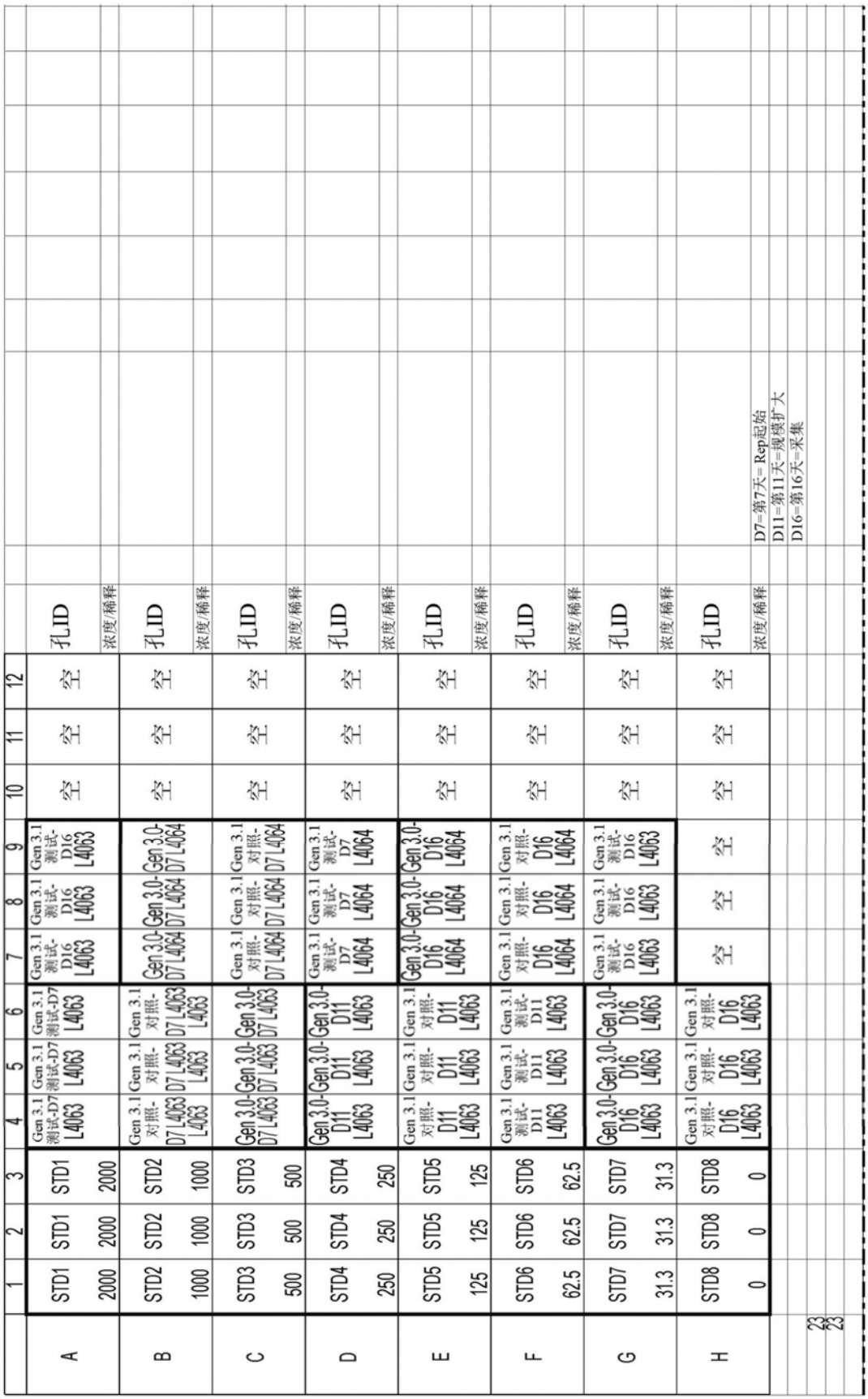
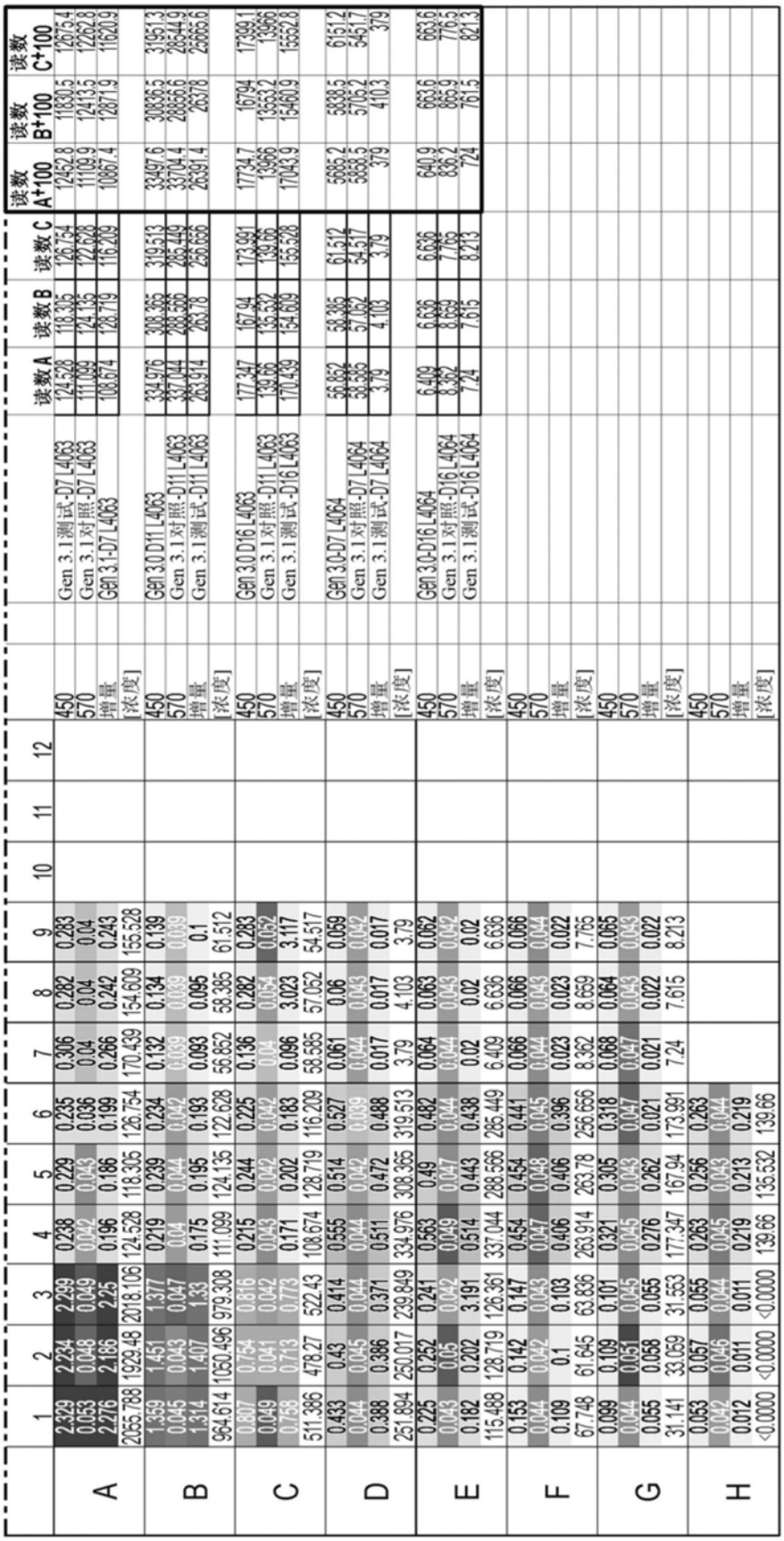

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A
B
C
D
E
F
G
H
STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 STD7 STD8
2000 1000 500 250 125 62.5 31.3 0
Gen 3.1 测试-D7 L4063
Gen 3.1 对照-D7 L4063
Gen 3.0-D7 L4064
Gen 3.1 测试-D16 L4063
Gen 3.1 对照-D16 L4064
Gen 3.0-D16 L4064
Gen 3.1 测试-D7 L4064
Gen 3.1 对照-D7 L4064
Gen 3.0-D11 L4063
Gen 3.1 测试-D11 L4063
Gen 3.1 对照-D11 L4063
Gen 3.0-D16 L4063
Gen 3.1 对照-D16 L4063
空
孔LID
浓度/稀释
D7=第7天= Rep起始
D11=第11天=规模扩大
D16=第16天=采集

图112A



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			读数 A	读数 B	读数 C	读数 A*100	读数 B*100	读数 C*100
A	2.329	2.234	2.799	0.238	0.229	0.235	0.306	0.282	0.283				450	Gen 3.1 测试-D7 L4063	124.528	118.305	126.754	12452.8	11830.5	12675.4
	0.053	0.048	0.049	0.042	0.043	0.036	0.04	0.04	0.04				570	Gen 3.1 对照-D7 L4063	111.099	124.135	122.628	11109.9	12413.5	12262.8
	2.276	2.186	2.25	0.196	0.186	0.199	0.266	0.242	0.243				增量	Gen 3.1-D7 L4063	108.674	128.719	116.209	10867.4	12871.9	11620.9
	2055.788	1929.948	2018.106	124.528	118.305	126.754	170.439	154.609	155.528				[浓度]							
B	1.359	1.451	1.377	0.219	0.239	0.234	0.132	0.134	0.139				450	Gen 3.0 D11 L4063	334.976	308.365	319.513	33497.6	30836.5	31951.3
	0.045	0.043	0.047	004	0.044	0.047	0.169	0.039	0.039				570	Gen 3.1 对照-D11 L4063	337.044	288.806	286.449	33704.4	28656.6	28644.9
	1.314	1.407	1.33	0.175	0.195	0.193	0.093	0.095	0.1				增量	Gen 3.1 测试-D11 L4063	263.914	263.78	256.656	26391.4	26378	25665.6
	964.614	1050.496	979.308	111.099	124.135	122.628	56.852	58.385	61.512				[浓度]							
C	0.807	0.754	0.816	0.215	0.244	0.225	0.136	0.282	0.283				450	Gen 3.0 D16 L4063	177.347	167.94	173.991	17734.7	16794	17399.1
	0.049	0.041	0.042	0.043	0.042	0.042	004	0.054	0.052				570	Gen 3.1 对照-D11 L4063	139.66	135.232	139.66	13966	13523.2	13966
	0.768	0.713	0.773	0.171	0.202	0.183	0.096	3.023	3.117				增量	Gen 3.1 测试-D16 L4063	170.439	154.609	155.528	17043.9	15460.9	15552.8
	511.386	478.27	522.43	108.674	128.719	116.209	58.585	57.052	54.517				[浓度]							
D	0.433	0.43	0.414	0.555	0.514	0.527	0.061	0.06	0.059				450	Gen 3.0-D7 L4064	56.862	58.365	61.512	5686.2	5838.5	6151.2
	0.044	0.045	0.044	0.044	0.042	0.039	0.044	0.043	0.042				570	Gen 3.1 对照-D7 L4064	58.365	57.052	54.517	5838.5	5705.2	5451.7
	0.388	0.386	0.371	0.511	0.472	0.488	0.017	0.017	0.017				增量	Gen 3.1 测试-D7 L4064	3.79	4.103	3.79	379	410.3	379
	251.894	250.017	239.849	334.976	308.365	319.513	3.79	4.103	3.79				[浓度]							
E	0.225	0.252	0.241	0.563	0.49	0.482	0.064	0.063	0.062				450	Gen 3.0-D16 L4064	6.409	6.636	6.636	640.9	663.6	663.6
	0.043	0.05	0.042	0.049	0.047	0.044	0.044	0.043	0.042				570	Gen 3.1 对照-D16 L4064	8.362	8.659	7.765	836.2	865.9	776.5
	0.182	0.202	3.191	0.514	0.443	0.438	0.02	0.02	0.02				增量	Gen 3.1 测试-D16 L4064	7.24	7.615	8.213	724	761.5	821.3
	115.488	128.719	126.361	337.044	288.586	285.449	6.409	6.636	6.636				[浓度]							
F	0.153	0.142	0.147	0.454	0.454	0.441	0.066	0.066	0.066				450							
	0.044	0.042	0.043	0.047	0.048	0.045	0.044	0.043	0.044				570							
	0.109	0.1	0.103	0.406	0.406	0.396	0.023	0.023	0.022				增量							
	67.748	61.645	63.836	263.914	263.78	256.656	8.362	8.659	7.765				[浓度]							
G	0.099	0.109	0.101	0.321	0.305	0.318	0.068	0.064	0.065				450							
	0.044	0.051	0.045	0.045	0.043	0.047	0.047	0.043	0.043				570							
	0.055	0.058	0.055	0.276	0.262	0.021	0.021	0.022	0.022				增量							
	31.141	33.059	31.553	177.347	167.94	173.991	7.24	7.615	8.213				[浓度]							
H	0.053	0.057	0.055	0.263	0.256	0.263							450							
	0.042	0.046	0.044	0.045	0.043	0.044							570							
	0.012	0.011	0.011	0.219	0.213	0.219							增量							
	<0.0000	<0.0000	<0.0000	139.66	135.532	139.66							[浓度]							

图112B

样品编号#	Gen 3.1优化的说明	葡萄糖（g/L）	乳酸（g/L）	氨（mmol/L）	谷氨酰胺（mmol/L）	Glutamax (mmol/L)	Glutamax-谷氨酰胺（mmol/L）
13	Gen 3.0-第16天第一轮#L4063	1.52	1.07	2.06	1.91	2.11	0.20
14	Gen 3.1对照-第16天第一轮#L4063	0.90	1.74	2.50	1.34	1.49	0.15
15	Gen 3.1测试-第16天第一轮#L4063	0.96	1.64	2.49	1.33	1.47	0.14
16	Gen 3.0-第11天第一轮#L4063	1.42	0.70	1.83	1.70	1.86	0.16
17	Gen 3.1对照-第11天第一轮#L4063	0.90	1.08	2.24	1.07	1.19	0.11
18	Gen 3.1测试-第11天第一轮#L4063	0.84	1.21	2.25	1.11	1.23	0.12
19	Gen 3.0-第7天第一轮#L4063	1.76	0.20	1.88	2.04	2.23	0.19
20	Gen 3.1对照-第7天第一轮#L4063	1.73	0.22	1.86	2.00	2.19	0.19
21	Gen 3.1测试-第7天第一轮#L4063	1.41	0.50	1.96	1.98	2.15	0.17
22	Gen 3.0-第16天第二轮#L4064	2.76	1.52	1.00	0.68	0.77	0.09
23	Gen 3.1对照-第16天第二轮#L4064	2.14	1.95	0.99	0.64	0.73	0.08
24	Gen 3.1测试-第16天第二轮#L4064	2.20	1.89	0.94	0.64	0.71	0.07
25	Gen 3.0-第7天第二轮#L4064	4.26	0.08	0.71	1.29	1.43	0.14
26	Gen 3.1对照-第7天第二轮#L4064	4.14	0.22	0.78	1.17	1.29	0.12
27	Gen 3.1测试-第7天第二轮#L4064	3.82	0.49	0.89	1.09	1.20	0.11

图113

顺序	名称		几何均值探针-fitc A	几何均值探针-fitc A	均值1301	均值T	相对于1301的长度
A1	Gen 3.0-L4063	A1 10.1.fcs	86	42.5			
A2		A2 10.2.fcs	85.4	42.3	85.7	42.4	
A3		A3 10.3.fcs	4585	207			
A4		A4 10.4.fcs	4389	216	4487	211.5	7.684093
A5	Gen 3.1对照-L4063	A5 11.1.fcs	82.7	33.3			
A6		A6 11.2.fcs	86	32.9	84.35	33.1	
A7		A7 11.3.fcs	4696	180			
A8		A8 11.4.fcs	4641	175	4668.5	177.5	6.299968
B1	Gen 3.1测试-L4063	B1 12.1.fcs	95.1	28.8			
B2		B2 12.2.fcs	84.7	26.7	89.9	27.75	
B3		B3 12.3.fcs	4764	169			
B4		B4 12.4.fcs	4800	174	4782	171.5	6.12732
B5	Gen 3.0 -L4064	B5 13.1.fcs	101	40.3			
B6		B6 13.2.fcs	89.6	34.1	95.3	37.2	
B7		B7 13.3.fcs	4300	174			
B8		B8 13.4.fcs	4367	172	4333.5	173	6.408381
C1	Gen 3.1对照-L4064	C1 14.1.fcs	92.1	31.1			
C2		C2 14.2.fcs	88.6	29.6	90.35	30.35	
C3		C3 14.3.fcs	4111	169			
C4		C4 14.4.fcs	4443	172	4277	170.5	6.69509
C5	Gen 3.1测试-L4064	C5 15.1.fcs	89.7	25.7			
C6		C6 15.2.fcs	85.7	24.7	87.7	25.2	
C7		C7 15.3.fcs	4342	172			
C8		C8 15.4.fcs	4560	166	4451	169	6.591341

图114

共享频率

对象	原始样品	uCDR3计数	比较样品	uCDR3计数	共享的uCDR3计数	uCDR3计数
L4063	L63GA	14005	L63GB	18149	3240	23.13459479
L4063	L63GA	14005	L63GC	17181	2959	21.12816851
L4063	L63GA	15107	L64GB	21460	5486	36.31429139
L4063	L63GA	15107	L64GC	21503	5541	36.67836102
编码：	L63GA = L4063 Gen 3.0					
	L63GB = L4063 Gen 3.1对照					
	L63GC = L4063 Gen 3.1测试					
	L64GA = L4064 Gen 3.0					
	L64GB = L4064 Gen 3.1对照					
	L64GC = L4064 Gen 3.1测试					

前80%

对象	样品1	uCDR3计数	样品2	uCDR3计数	共享的uCDR3计数	B列的共享%
L4063	L63GA	1104	L63GB	2437	1000	90.57971
L4063	L63GA	1104	L63GC	2331	975	88.31522
L4064	L64GA	2478	L64GB	3246	2186	88.2163
L4064	L64GA	2478	L64GC	3263	2163	87.28814
编码：	L63GA = L4063 Gen 3.0					
	L63GB = L4063 Gen 3.1对照					
	L63GC = L4063 Gen 3.1测试					
	L64GA = L4064 Gen 3.0					
	L64GB = L4064 Gen 3.1对照					
	L64GC = L4064 Gen 3.1测试					

图115

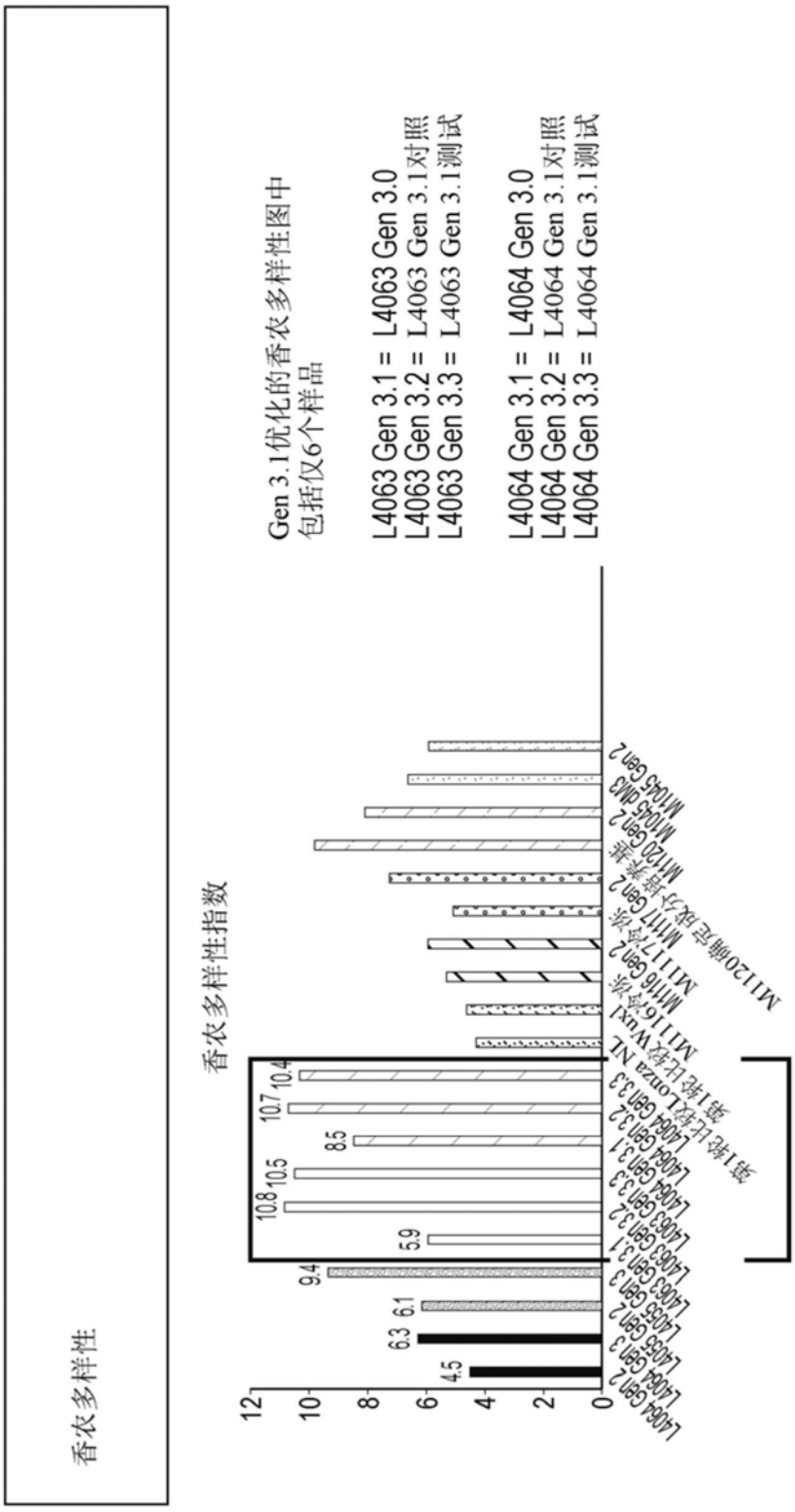

香农多样性
香农多样性指数
Gen 3.1优化的香农多样性图中
包括仅6个样品
L4063 Gen 3.1 = L4063 Gen 3.0
L4063 Gen 3.2 = L4063 Gen 3.1对照
L4063 Gen 3.3 = L4063 Gen 3.1测试
L4064 Gen 3.1 = L4064 Gen 3.0
L4064 Gen 3.2 = L4064 Gen 3.1对照
L4064 Gen 3.3 = L4064 Gen 3.1测试
12
10
8
6
4
2
0
4.5
6.3
6.1
9.4
5.9
10.8
10.5
8.5
10.7
10.4
第1轮比较Lomza NL
第1轮比较Wuxi
M1120确定成为原来
M1045 Gen 2
M1045 dM3
M1045 Gen 2
M1120 Gen 2
M1117 Gen 2
M1117 Gen
M1116 Gen 2
M1116 Gen
M1116 Gen
L4064 Gen 2
L4064 Gen 3
L4063 Gen 2
L4063 Gen 3
L4063 Gen 3.1
L4063 Gen 3.2
L4064 Gen 3.3
L4064 Gen 3.2
L4064 Gen 3.1
第1轮比较Lomza NL
第1轮比较Wuxi
M1116 Gen
M1116 Gen 2
M1117 Gen
M1117 Gen 2
M1120确定成为原来
M1120 Gen 2
M1045 dM3
M1045 Gen 2

图116