

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-527961
(P2024-527961A)

(43)公表日 令和6年7月26日(2024.7.26)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	4 B 0 6 5	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	4 C 0 8 4	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	4 C 0 8 5	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	E	4 C 0 8 6
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T	4 C 0 8 7
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全441頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-504941(P2024-504941)			(71)出願人	519006377
(86)(22)出願日	令和4年7月28日(2022.7.28)				アイオバンス バイオセラピューティク
(85)翻訳文提出日	令和6年3月25日(2024.3.25)				ス, インコーポレイテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2022/038665				アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9
(87)国際公開番号	WO2023/009716				4 0 7 0 サン カルロス インダストリ
(87)国際公開日	令和5年2月2日(2023.2.2)				アル ロード 8 2 5 スイート 4 0 0
(31)優先権主張番号	63/226,751			(74)代理人	100079108
(32)優先日	令和3年7月28日(2021.7.28)				弁理士 稲葉 良幸
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(74)代理人	100109346
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く			(74)代理人	弁理士 大貫 敏史
				(74)代理人	100117189
					弁理士 江口 昭彦
				(74)代理人	100134120
					弁理士 内藤 和彦
				(72)発明者	ジャガシア, マダン 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 K R A S 阻害剤と併用した腫瘍浸潤リンパ球療法によるがん患者の治療

(57)【要約】
本発明は、K R A S 阻害剤と組み合わせて、本明細書に記載の T I L による K R A S 変異を有するがんの治療のための治療効果が増加した治療的 T I L 集団を調製するために、T I L を調製するための改善及び／または短縮されたプロセス及び方法を提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団及び少なくとも1つのKRAS阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、任意選択的に、前記患者または前記対象が、少なくとも1つの前療法を受けており、前記少なくとも1つの前療法が、任意選択的に抗PD1抗体を含む、前記方法。

【請求項 2】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団及び少なくとも1つのKRAS阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

（a）前記対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、前記対象または前記患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

（b）前記第1のTIL集団を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

（c）IL-2を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成するステップであって、前記第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、前記第1の拡大が、約3～14日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ（b）からステップ（c）への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を生成するステップと、

（d）前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成するステップであって、前記第2の拡大が、約7～14日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、前記第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ（c）からステップ（d）への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を生成するステップと、

（e）ステップ（d）から取得された治療的TIL集団を採取するステップであって、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記採取するステップと、

（f）ステップ（e）からの前記採取されたTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（e）から（f）への移すことが、前記システムを開くことなく起こる、前記移すステップと、

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

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

（i）少なくとも1つのKRAS阻害剤を前記対象に投与するステップと、を含む、前記方法。

【請求項 3】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団及び少なくとも1つのKRAS阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

（a）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、前記対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得するステップと、

（b）前記腫瘍断片を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

（c）IL-2を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行って、第2のTIL集団を生成するステップであって、前記第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、前記第1の拡大が、約3～11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、前記第2のTIL集団が、前記

10

20

30

40

50

第1のTIL集団よりも数が少なくとも50倍多く、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を生成するステップと、

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成するステップであって、前記第2の拡大が、約7~11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を生成するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移すことが、前記システムを開くことなく起こる、前記移すステップと、

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

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

(i) 少なくとも1つのKRAS阻害剤を前記対象に投与するステップと、を含む、前記方法。

【請求項4】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団及び少なくとも1つのKRAS阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記患者もしくは前記対象からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 前記第1のTIL集団を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

(c) IL-2を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成するステップであって、前記第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、前記第1の拡大が、約3~11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を生成するステップと、

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成するステップであって、前記第2の拡大が、約7~11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を生成するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移すことが、前記システムを開くことなく起こる、前記移すステップと、

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

(h) 治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ(g)の前記注入バツ

10

20

30

40

50

グから前記対象に投与するステップと、

(i) 少なくとも1つのKRAS阻害剤を前記対象に投与するステップと、を含む、前記方法。

【請求項5】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団及び少なくとも1つのKRAS阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 任意選択的に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍から腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、前記対象または前記患者から前記腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、第1のTIL集団を含む、前記切除するステップと、

10

(b) 腫瘍断片を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

(c) IL-2を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成するステップであって、前記第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、前記第1の拡大が、約3～11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を生成するステップと、

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成するステップであって、前記第2の拡大が、約7～11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を生成するステップと、

20

(e) ステップ(d)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移すことが、前記システムを開くことなく起こる、前記移すステップと、

30

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

(h) 治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ(g)の前記注入バッグから前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、

(i) 少なくとも1つのKRAS阻害剤を前記対象に投与するステップと、を含む、前記方法。

【請求項6】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団及び少なくとも1つのKRAS阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

40

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記対象もしくは前記患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(c) 前記第1のTIL集団を第1の細胞培養培地と接触させるステップと、

(d) 前記第1の細胞培養培地中で前記第1のTIL集団の初期拡大(またはプライミングによる第1の拡大)を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、前記第1の細胞培養培地が、IL-2を含み、任意選択的に、前記プライミングによる第1の拡大が、1～8日の期間にわたって起こる、前記第2のTIL集団を取得するステップと、

(e) 第2の細胞培養培地中で前記第2のTIL集団の急速拡大を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、前記第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3 (

50

抗CD3抗体)、及び任意選択的に照射された同種異系末梢血単核細胞(PBMC)を含み、前記急速拡大が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択的に、前記第2のTIL拡大が、前記急速な第2の拡大の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、前記第3のTIL集団を取得するステップと、

(f) 前記第3のTIL集団を採取するステップと、

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

(i) 少なくとも1つのKRAS阻害剤を前記対象に投与するステップと、を含む、前記方法。

10

【請求項7】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団及び少なくとも1つのKRAS阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 任意選択的に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍から腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、前記対象または前記患者から前記腫瘍を切除するステップであって、前記対象または前記患者が、少なくとも1つのKRAS阻害剤で以前に治療されている、前記切除するステップと、

(b) 前記腫瘍を、腫瘍断片に断片化するステップと、

(c) 前記腫瘍断片を、第1の細胞培養培地と接触させるステップと、

20

(d) 前記第1の細胞培養培地中で前記第1のTIL集団の初期拡大(またはプライミングによる第1の拡大)を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、前記第2のTIL集団が、前記第1のTIL集団よりも数が少なくとも5倍多く、前記第1の細胞培養培地が、IL-2を含み、任意選択的に、前記プライミングによる第1の拡大が、1~8日の期間にわたって起こる、前記第2のTIL集団を取得するステップと、

(e) 第2の細胞培養培地中で前記第2のTIL集団の急速拡大を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、前記第3のTIL集団が、前記急速拡大の開始から7~8日後、前記第2のTIL集団よりも数が少なくとも50倍多く、前記第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3(抗CD3抗体)、及び任意選択的に照射された同種異系末梢血単核細胞(PBMC)を含み、前記急速拡大が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択的に、前記第2のTIL拡大が、前記急速な第2の拡大の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、前記第3のTIL集団を取得するステップと、

30

(f) 前記第3のTIL集団を採取するステップと、

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

(i) 少なくとも1つのKRAS阻害剤を前記対象に投与するステップと、を含む、前記方法。

【請求項8】

前記第2のTIL集団が、前記第1のTIL集団よりも数が少なくとも50倍多い、請求項1~5のいずれか1項に記載の方法。前記患者または前記対象が、NSCLCであるがんを有し、切除不能、転移性、KRAS阻害剤に耐性、及び／または不応性である前記NSCLCを有する、請求項1~8のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項9】

前記患者または前記対象が、KRAS遺伝子変異を有する、請求項1~8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

前記患者または前記対象が、p.G12C変異を示すがんを有する、請求項1~9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

50

前記がんが、K R A S 阻害剤で以前に治療されている、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記がんが、K R A S 阻害剤で以前に治療されていない、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記 K R A S 阻害剤が、A M G - 5 1 0 (ソトラシブ)、A M G - 5 1 0 ラセミ体 (ソトラシブラセミ体)、M R T X 8 4 9 (アダグラシブ)、J N J - 7 4 6 9 9 1 5 7 / A R S - 3 2 4 8、J D Q 4 4 3、L Y 3 4 9 9 4 4 6、L Y 3 5 3 7 9 8 2、R L Y - 1 9 7 1 / G D C - 6 0 3 6、B B P - 4 5 4、B I 1 7 0 1 9 6 3、B I 1 8 2 3 9 1 1、m R N A - 5 6 7 1 / V 9 4 1、D - 1 5 5 3、B I - 2 8 5 2、B I - 3 4 0 6、A R S - 1 6 2 0、B A Y - 2 9 3、M R T X - 1 2 5 7、P R O T A C K - R a s D e g r a d e r - 1、L C - 2、A R S - 8 5 3、A R S - 1 3 2 3、A R S - 1 3 2 3 - アルキン、A R S - 1 6 3 0、K - R a s G 1 2 C - I N - 2、K R A S 阻害剤 - 6、K R A S 阻害剤 8、K R A S 阻害剤 7、K R A S G 1 2 C 阻害剤 1 5、K R A S G 1 2 C 阻害剤 5、K R A S G 1 2 C 阻害剤 1 3、K R A S G 1 2 C 阻害剤 1 7、K R A S G 1 2 C 阻害剤 1 6、K R A S G 1 2 C 阻害剤 1 4、K R a s G 1 2 C 阻害剤 4、K R a s G 1 2 C 阻害剤 1、K R a s G 1 2 C 阻害剤 3、K R a s G 1 2 C 阻害剤 2、6 H 0 5、S A H - S O S 1 A T F A、K R A S 阻害剤 1 0、S A H - S O S 1 A、アトロバスタチン - P E G 3 - F I T C、C 6 M E、C S - 0 1 1 5 6 1 7、H Y - 1 3 0 2 6 0、H Y - 1 3 5 8 6 4、H Y - 1 3 5 8 6 6、C m p d 2、C S - 0 1 1 5 6 1 8、C S - 0 1 1 5 6 2 0、E X - A 4 3 8 7、C S - 0 1 0 6 1 3 4、H Y - 1 3 5 8 6 5、2 2 4 1 7 1 9 - 7 5 - 3、H Y - 1 2 5 8 7 3、C S - 0 0 4 6 1 3 8、C S - 0 0 4 6 1 3 7、C S - 0 1 0 1 4 7 4、H Y - 1 2 5 8 7 5、C S - 0 1 0 2 6 0 8、C S - 0 1 0 2 6 1 0、C S - 0 1 0 2 6 0 6、H Y - 1 1 2 4 9 3、C S - 0 0 4 6 1 3 9、1 - { 4 - [6 - クロロ - 8 - フルオロ - 7 - (5 - メチル - 1 h - インダゾール - 4 - イル) キナゾリン - 4 - イル] ピペラジン - 1 - イル } プロパン - 1 - オン、H Y - 1 2 6 2 9 2、H Y - 1 1 2 4 9 1、C S - 0 0 4 6 1 3 6、H Y - 1 1 4 1 6 8、H Y - 1 2 5 8 7 4、H Y - 1 1 2 4 9 4、C S - 0 1 0 2 6 0 7、B C P 2 9 4 7 5 | 2 2 0 6 7 3 5 - 6 1 - 5、H Y - 1 1 2 4 9 2、C S - 0 0 7 8 0 9 7、2 1 5 8 2 9 6 - 4 5 - 6、H Y - 1 2 5 8 7 2、及び 2 1 5 8 2 9 7 - 6 3 - 1、ならびにそれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記 K R A S 阻害剤が、A M G - 5 1 0 (ソトラシブ)、A M G - 5 1 0 ラセミ体 (ソトラシブラセミ体)、及び M R T X 8 4 9 (アダグラシブ) からなる群から選択される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記がんが、P D - 1 阻害剤及び／または P D - L 1 阻害剤またはそれらのバイオシミラーで以前に治療されている、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記がんが、P D - 1 阻害剤またはそのバイオシミラーで以前に治療されている、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記 P D - 1 阻害剤が、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記患者が、P D - L 1 阻害剤またはそのバイオシミラーで更に以前に治療されている、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 9】

10

20

30

40

50

前記 P D - L 1 阻害剤が、アベルマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記がんが、P D - 1 阻害剤及び／または P D - L 1 阻害剤またはそれらのバイオシミラーで以前に治療されていない、請求項 1 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

前記がんが、C T L A - 4 阻害剤またはそのバイオシミラーで以前に治療されている、請求項 1 ～ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

前記 C T L A - 4 阻害剤が、イビルムマブ、トレメリムマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記がんが、化学療法レジメンで以前に治療されている、請求項 1 ～ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記化学療法レジメンが、ダカルバジンまたはテモゾリミドを含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記第 1 の拡大が、約 11 日間の期間にわたって行われる、請求項 2 ～ 5 または 8 ～ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

前記初期拡大が、約 11 日の期間にわたって行われる、請求項 6 ～ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

前記 I L - 2 が、前記第 1 の拡大において、前記細胞培養培地中に 1000 I U / m L ～ 6000 I U / m L の初期濃度で存在する、請求項 2 ～ 5 または 8 ～ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

前記 I L - 2 が、前記初期拡大において、前記細胞培養培地中に 1000 I U / m L ～ 6000 I U / m L の初期濃度で存在する、請求項 6 ～ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

前記第 2 の拡大ステップにおいて、前記 I L - 2 が、1000 I U / m L ～ 6000 I U / m L の初期濃度で存在し、前記 O K T - 3 抗体が、約 30 n g / m L の初期濃度で存在する、請求項 2 ～ 5 または 8 ～ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

前記急速拡大ステップにおいて、前記 I L - 2 が、1000 I U / m L ～ 6000 I U / m L の初期濃度で存在し、前記 O K T - 3 抗体が、約 30 n g / m L の初期濃度で存在する、請求項 6 ～ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 31】

前記第 1 の拡大が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項 2 ～ 5 または 8 ～ 24 に記載の方法。

【請求項 32】

前記初期拡大が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項 6 ～ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 33】

前記第 2 の拡大が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項 2 ～ 5 または 8 ～ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 34】

前記急速拡大が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項 6 ～ 24 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 35】

前記第1の細胞培養培地が、IL-4、IL-7、IL-15、IL-21、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインを更に含む、請求項2～5または8～24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 36】

前記第1の拡大の前記細胞培養培地が、IL-4、IL-7、IL-15、IL-21、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインを更に含む、請求項6～24に記載の方法。

【請求項 37】

前記第2の細胞培養培地が、IL-4、IL-7、IL-15、IL-21、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインを更に含む、請求項2～5または8～24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 38】

前記第2の拡大の前記細胞培養培地が、IL-4、IL-7、IL-15、IL-21、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインを更に含む、請求項6～24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 39】

前記TILを前記患者に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで前記患者を治療するステップを更に含む、請求項1～38のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 40】

前記骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを $60\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを $25\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で5日間投与するステップを含む、請求項39に記載の方法。

【請求項 41】

前記骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを $60\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で、フルダラビンを $25\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを $25\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で3日間投与するステップを含む、請求項39に記載の方法。

【請求項 42】

前記シクロホスファミドが、メスナとともに投与される、請求項40または41のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 43】

前記患者への前記第3のTIL集団の投与の翌日に開始するIL-2レジメンで前記患者を治療するステップを更に含む、請求項1～42のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 44】

前記患者への前記第3のTIL集団の投与と同じ日に開始するIL-2レジメンで前記患者を治療するステップを更に含む、請求項1～42のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 45】

前記IL-2レジメンが、許容範囲まで8時間毎に15分間のボラス静脈内注入として投与される、 $600,000$ もしくは $720,000\text{ IU/kg}$ のアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリエーションを含む高用量IL-2レジメンである、請求項44に記載の方法。

【請求項 46】

治療上有効なTIL集団が、投与され、かつ約 2.3×10^{10} ～約 13.7×10^{10} TILを含む、請求項1～45のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 47】

前記初期拡大が、21日以内の期間にわたって行われる、請求項6～46のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 48】

前記初期拡大が、7日以内の期間にわたって行われる、請求項6～46のいずれか1項

10

20

30

40

50

に記載の方法。

【請求項 49】

前記急速拡大が、7日以内の期間にわたって行われる、請求項6～46のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 50】

ステップ(c)における第1の拡大及びステップ(d)における前記第2の拡大が、各々11日間の期間内に個別に行われる、請求項2～5または8～46のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 51】

ステップ(a)～(f)が、約10日～約22日で行われる、請求項2～5または8～46のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 52】

前記対象が、前記腫瘍の切除前に、KRAS阻害剤を投与することを含む以前の治療を受けた、請求項2、3、または8～46のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 53】

前記対象が、前記外科的切除の前に、KRAS阻害剤を投与することを含む以前の治療を受けた、請求項4、6、または8～46のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 54】

前記対象が、前記がんの切除前にKRAS阻害剤を投与することを含む以前の治療を受けた、請求項5、7、または8～46に記載の方法。

【請求項 55】

前記以前の治療が、ソトラシブもしくはアダグラシブ、またはその薬学的に許容される塩を、約500～1500mgの用量で投与することを含む、請求項52～54のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 56】

前記ソトラシブが、約960mgの用量で投与された、請求項55に記載の方法。

【請求項 57】

前記アダグラシブが、約600mgの用量で投与された、請求項55に記載の方法。

【請求項 58】

前記以前の治療が、ソトラシブもしくはアダグラシブ、またはその薬学的に許容される塩を、1日2回投与することを含む、請求項55～57のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 59】

前記少なくとも1つのKRAS阻害剤が、前記治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団と同時に投与される、請求項2～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 60】

前記治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団の前記投与後、前記少なくとも1つのKRAS阻害剤の前記投与が維持される、請求項59に記載の方法。

【請求項 61】

前記少なくとも1つのKRAS阻害剤が、前記治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を投与した後に投与される、請求項2～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 62】

前記対象が、前記治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を投与してから少なくとも1週間後に、前記少なくとも1つのKRAS阻害剤を投与される、請求項61に記載の方法。

【請求項 63】

前記患者が、前記治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を投与する前に、前記少なくとも1つのKRAS阻害剤も投与された、請求項61に記載の方法。

【請求項 64】

前記少なくとも1つのKRAS阻害剤が、前記治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団と同時に投与されない、請求項63に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 6 5】

前記少なくとも 1 つの K R A S 阻害剤が、約 5 0 0 ～ 1 5 0 0 m g の用量で投与されるソトラシブもしくはアダグラシブ、またはその薬学的に許容される塩を含む、請求項 5 9 ～ 6 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記ソトラシブが、約 9 6 0 m g の用量で投与される、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記アダグラシブが、約 6 0 0 m g の用量で投与される、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記ソトラシブまたはアダグラシブが、1 日 2 回投与される、請求項 6 5 ～ 6 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 6 9】

前記がんが、神経膠芽細胞腫（G B M）、胃腸癌、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（N S C L C）、肺癌、膀胱癌、乳癌、子宮内膜癌、胆管癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（H N S C C）を含む）、腎癌、腎細胞癌、多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、及びマントル細胞リンパ腫からなる群から選択される、請求項 1 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記がんが、皮膚黒色腫、眼黒色腫、ブドウ膜黒色腫、及び結膜悪性黒色腫からなる群から選択される、請求項 1 ～ 6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 7 1】

前記がんが、多形黄色星細胞腫、胚芽異形成神経上皮腫瘍、神経節膠腫、及び毛様細胞性星細胞腫からなる群から選択される、請求項 1 ～ 6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記がんが、非小細胞肺癌（N S C L C）を有する子宮内膜腺癌である、請求項 1 ～ 6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記がんが、著しい粘液分化（E C M D）を有する子宮内膜腺癌である、請求項 1 ～ 6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 7 4】

前記がんが、甲状腺乳頭癌である、請求項 1 ～ 6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記がんが、漿液性低悪性度または境界性卵巣癌である、請求項 1 ～ 6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記がんが、有毛細胞白血病である、請求項 1 ～ 6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記がんが、ランゲルハンス細胞組織球症である、請求項 1 ～ 6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 7 8】

前記がんが、K R A S タンパク質の p . G 1 2 C 変異を有するがんである、請求項 1 ～ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記がんが、p . G 1 2 C 変異を有する非小細胞肺癌（N S C L C）である、請求項 1 ～ 7 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記患者への前記第 3 の T I L 集団の前記投与後に I L - 2 レジメンで前記患者を治療するステップを更に含む、請求項 1 ～ 7 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 8 1】

前記患者への前記第 3 の T I L 集団の投与と同じ日に I L - 2 レジメンで前記患者を治療するステップを更に含む、請求項 1 ～ 8 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記 I L - 2 レジメンが、ネムバロイキンを含む、請求項 8 0 または 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記患者が、チェックポイント阻害剤療法を以前に受けた、請求項 8 0 または 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記患者が、K R A S 阻害剤療法を以前に受けた、請求項 8 0 または 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記患者が、N S C L C を有する、請求項 8 2 ～ 8 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 6】

腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) の集団及び少なくとも 1 つの K R A S 阻害剤を投与することを含む、N S C L C の治療を必要とする患者においてそれを行う方法であって、前記患者または前記対象が、少なくとも 1 つの前療法を受けており、前記少なくとも 1 つの前療法が、チェックポイント阻害剤療法を含む、前記方法。

【請求項 8 7】

腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) の集団及び 1 つ以上の K R A S 阻害剤を投与することを含む、N S C L C の治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 前記患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、前記患者から切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 前記第 1 の T I L 集団を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

(c) I L - 2 を含む細胞培養培地中で前記第 1 の T I L 集団を培養することによって第 1 の拡大を行い、第 2 の T I L 集団を生成するステップであって、前記第 1 の拡大が、第 1 のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、前記第 1 の拡大が、約 3 ～ 1 4 日間行われて、前記第 2 の T I L 集団を取得し、ステップ (b) からステップ (c) への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第 2 の T I L 集団を生成するステップと、

(d) 前記第 2 の T I L 集団の前記細胞培養培地を追加の I L - 2 、 O K T - 3 、及び抗原提示細胞 (A P C) で補充することによって第 2 の拡大を行い、第 3 の T I L 集団を生成するステップであって、前記第 2 の拡大が、約 7 ～ 1 4 日間行われて、前記第 3 の T I L 集団を取得し、前記第 3 の T I L 集団が、治療的 T I L 集団であり、前記第 2 の拡大が、第 2 のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ (c) からステップ (d) への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第 3 の T I L 集団を生成するステップと、

(e) ステップ (d) から取得された治療的 T I L 集団を採取するステップであって、ステップ (d) からステップ (e) への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ (e) からの前記採取された T I L 集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ (e) から (f) への移すことが、前記システムを開くことなく起こる、前記移すステップと、

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

(h) 1 つ以上の K R A S 阻害剤及び治療上有効な投与量の前記第 3 の T I L 集団を、ステップ (g) における前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、を含み、

10

20

30

40

50

前記患者が、少なくとも1つの前療法を受けており、前記少なくとも1つの前療法が、チェックポイント阻害剤療法を含む、前記方法。

【請求項88】

1つ以上のKRAS阻害剤及び腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含む、NSCLCの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であって、前記方法が、

（a）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、前記対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得するステップと、

（b）前記腫瘍断片を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

（c）IL-2を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成するステップであって、前記第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、前記第1の拡大が、約3～11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ（b）からステップ（c）への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を生成するステップと、

（d）前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成するステップであって、前記第2の拡大が、約7～11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ（c）からステップ（d）への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を生成するステップと、

（e）ステップ（d）から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記採取するステップと、

（f）ステップ（e）からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（e）から（f）への移すことが、前記システムを開くことなく起こる、前記移すステップと、

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

（h）1つ以上のKRAS阻害剤及び治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ（g）の前記注入バッグから前記患者に投与するステップと、を含み、

前記患者が、少なくとも1つの前療法を受けており、前記少なくとも1つの前療法が、チェックポイント阻害剤療法を含む、前記方法。

【請求項89】

1つ以上のKRAS阻害剤及び腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含む、NSCLCの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であって、前記方法が、

（a）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

（b）前記第1のTIL集団を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

（c）IL-2を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成するステップであって、前記第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、前記第1の拡大が、約3～11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ（b）からステップ（c）への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を生成するステップと、

（d）前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成するステップであって、前記第2の拡大が、約7～11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ（c）からステップ（d）への移行が、前記システムを開くこと

なく起こる、前記第3のTIL集団を生成するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移すことが、前記システムを開くことなく起こる、前記移すステップと、

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

(h) 1つ以上のKRAS阻害剤及び治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ(g)の前記注入バッグから前記患者に投与するステップと、を含み、

前記患者が、少なくとも1つの前療法を受けており、前記少なくとも1つの前療法が、チェックポイント阻害剤療法を含む、前記方法。

【請求項90】

1つ以上のKRAS阻害剤及び腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、NSCLCの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 任意選択的に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍から腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、前記患者から前記腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、第1のTIL集団を含む、前記切除するステップと、

(b) 腫瘍断片を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

(c) IL-2を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成するステップであって、前記第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、前記第1の拡大が、約3〜11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を生成するステップと、

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成するステップであって、前記第2の拡大が、約7〜11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を生成するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移すことが、前記システムを開くことなく起こる、前記移すステップと、

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

(h) 1つ以上のKRAS阻害剤及び治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ(g)の前記注入バッグからNSCLCを有する前記患者に投与するステップと、を含み、

前記患者が、少なくとも1つの前療法を受けており、前記少なくとも1つの前療法が、チェックポイント阻害剤療法を含む、前記方法。

【請求項91】

1つ以上のKRAS阻害剤及び腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、NSCLCの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは前記患者からの腫

10

20

30

40

50

瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 前記第1のTIL集団を第1の細胞培養培地と接触させるステップと、

(c) 前記第1の細胞培養培地中で前記第1のTIL集団の初期拡大（またはプライミングによる第1の拡大）を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、前記第2のTIL集団が、前記第1のTIL集団よりも数が少なくとも5倍多く、前記第1の細胞培養培地が、IL-2を含み、任意選択的に、前記プライミングによる第1の拡大が、1～8日の期間にわたって起こる、前記第2のTIL集団を取得するステップと、

(d) 第2の細胞培養培地中で前記第2のTIL集団の急速拡大を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、前記第3のTIL集団が、前記急速拡大の開始から7～8日後、前記第2のTIL集団よりも数が少なくとも50倍多く、前記第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、及び任意選択的に照射された同種異系末梢血単核細胞（PBMC）を含み、前記急速拡大が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択的に、前記第2のTIL拡大が、前記急速な第2の拡大の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、前記第3のTIL集団を取得するステップと、

(e) 前記第3のTIL集団を採取するステップと、

(f) 1つ以上のKRAS阻害剤及び前記第3のTIL集団の治療上有効な部分をNSCLCを有する前記患者に投与するステップと、を含み、

前記患者が、少なくとも1つの前療法を受けており、前記少なくとも1つの前療法が、チェックポイント阻害剤療法を含む、前記方法。

【請求項92】

1つ以上のKRAS阻害剤及び腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含み、NSCLCの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 任意選択的に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍から腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、対象または前記患者から前記腫瘍を切除するステップであって、前記患者が、第1のTIL集団を含む前記腫瘍を以前に治療されている、前記切除するステップと、

(b) 前記腫瘍を、腫瘍断片に断片化するステップと、

(c) 前記腫瘍断片を、第1の細胞培養培地と接触させるステップと、

(d) 前記第1の細胞培養培地中で前記第1のTIL集団の初期拡大（またはプライミングによる第1の拡大）を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、前記第2のTIL集団が、前記第1のTIL集団よりも数が少なくとも5倍多く、前記第1の細胞培養培地が、IL-2を含み、任意選択的に、前記プライミングによる第1の拡大が、1～8日の期間にわたって起こる、前記第2のTIL集団を取得するステップと、

(e) 第2の細胞培養培地中で前記第2のTIL集団の急速拡大を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、前記第3のTIL集団が、前記急速拡大の開始から7～8日後、前記第2のTIL集団よりも数が少なくとも50倍多く、前記第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、及び任意選択的に照射された同種異系末梢血単核細胞（PBMC）を含み、前記急速拡大が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択的に、前記第2のTIL拡大が、前記急速な第2の拡大の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、前記第3のTIL集団を取得するステップと、

(f) 前記第3のTIL集団を採取するステップと、

(g) 1つ以上のKRAS阻害剤及び前記第3のTIL集団の治療上有効な部分をNSCLCを有する前記患者に投与するステップと、を含み、

前記患者または前記対象が、少なくとも1つの前療法を受けており、前記少なくとも1つの前療法が、チェックポイント阻害剤療法を含む、前記方法。

【請求項93】

前記NSCLCが、切除不能、転移性、KRAS阻害剤に対して耐性及び／または不応

10

20

30

40

50

性である、請求項 86～92 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 94】

前記患者が、K R A S 遺伝子変異を有する、請求項 86～93 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 95】

前記患者が、p . G 1 2 C 変異を示す N S C L C を有する、請求項 94 に記載の方法。

【請求項 96】

前記少なくとも 1 つの前療法が、K R A S 阻害剤療法を更に含む、請求項 94～95 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 97】

前記患者への前記第 3 の T I L 集団の前記投与後に I L - 2 レジメンで前記患者を治療するステップを更に含む、請求項 86～96 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 98】

前記患者への前記第 3 の T I L 集団の投与と同じ日に I L - 2 レジメンで前記患者を治療するステップを更に含む、請求項 86～97 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 99】

前記 I L - 2 レジメンが、ネムバロイキンを含む、請求項 97 または 98 に記載の方法。

【請求項 100】

前記 T I L を前記患者に投与する前に、骨髓非破壊的リンパ球枯渇レジメンで前記患者を治療するステップを更に含む、請求項 86～99 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 101】

前記骨髓非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを $60 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で 2 日間投与し、続いてフルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で 5 日間投与するステップを含む、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 102】

前記骨髓非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを $60 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で、フルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で 2 日間投与し、続いてフルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で 3 日間投与するステップを含む、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 103】

前記シクロホスファミドが、メスナとともに投与される、請求項 101 または 102 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 104】

前記腫瘍が、前記腫瘍切除前に、1 つ以上の K R A S 阻害剤で前処置された患者から切除された、請求項 86～103 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 105】

前記 N S C L C が、切除不能、転移性、K R A S 阻害剤に対して耐性及び／または不応性である、請求項 86～104 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 106】

前記患者または前記対象が、K R A S 遺伝子変異を有する、請求項 86～105 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 107】

前記患者または前記対象が、p . G 1 2 C 変異を示すがんを有する、請求項 86～106 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 108】

前記がんが、K R A S 阻害剤で以前に治療されている、請求項 86～107 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 109】

前記がんが、K R A S 阻害剤で以前に治療されていない、請求項 86～107 のいずれ

10

20

30

40

50

か 1 項に記載の方法。

【請求項 110】

前記 K R A S 阻害剤が、A M G - 5 1 0 (ソトラシブ)、A M G - 5 1 0 ラセミ体 (ソトラシブラセミ体)、M R T X 8 4 9 (アダグラシブ)、J N J - 7 4 6 9 9 1 5 7 / A R S - 3 2 4 8、J D Q 4 4 3、L Y 3 4 9 9 4 4 6、L Y 3 5 3 7 9 8 2、R L Y - 1 9 7 1 / G D C - 6 0 3 6、B B P - 4 5 4、B I 1 7 0 1 9 6 3、B I 1 8 2 3 9 1 1、m R N A - 5 6 7 1 / V 9 4 1、D - 1 5 5 3、B I - 2 8 5 2、B I - 3 4 0 6、A R S - 1 6 2 0、B A Y - 2 9 3、M R T X - 1 2 5 7、P R O T A C K - R a s D e g r a d e r - 1、L C - 2、A R S - 8 5 3、A R S - 1 3 2 3、A R S - 1 3 2 3 - アルキン、A R S - 1 6 3 0、K - R a s G 1 2 C - I N - 2、K R A S 阻害剤 - 6、K R A S 阻害剤 8、K R A S 阻害剤 7、K R A S G 1 2 C 阻害剤 1 5、K R A S G 1 2 C 阻害剤 5、K R A S G 1 2 C 阻害剤 1 3、K R A S G 1 2 C 阻害剤 1 7、K R A S G 1 2 C 阻害剤 1 6、K R A S G 1 2 C 阻害剤 1 4、K R a s G 1 2 C 阻害剤 4、K R a s G 1 2 C 阻害剤 1、K R a s G 1 2 C 阻害剤 3、K R a s G 1 2 C 阻害剤 2、6 H 0 5、S A H - S O S 1 A T F A、K R A S 阻害剤 1 0、S A H - S O S 1 A、アトロバスタチン - P E G 3 - F I T C、C 6 M E、C S - 0 1 1 5 6 1 7、H Y - 1 3 0 2 6 0、H Y - 1 3 5 8 6 4、H Y - 1 3 5 8 6 6、C m p d 2、C S - 0 1 1 5 6 1 8、C S - 0 1 1 5 6 2 0、E X - A 4 3 8 7、C S - 0 1 0 6 1 3 4、H Y - 1 3 5 8 6 5、2 2 4 1 7 1 9 - 7 5 - 3、H Y - 1 2 5 8 7 3、C S - 0 0 4 6 1 3 8、C S - 0 0 4 6 1 3 7、C S - 0 1 0 1 4 7 4、H Y - 1 2 5 8 7 5、C S - 0 1 0 2 6 0 8、C S - 0 1 0 2 6 1 0、C S - 0 1 0 2 6 0 6、H Y - 1 1 2 4 9 3、C S - 0 0 4 6 1 3 9、1 - { 4 - [6 - クロロ - 8 - フルオロ - 7 - (5 - メチル - 1 h - インダゾール - 4 - イル) キナゾリン - 4 - イル] ピペラジン - 1 - イル } プロパン - 1 - オン、H Y - 1 2 6 2 9 2、H Y - 1 1 2 4 9 1、C S - 0 0 4 6 1 3 6、H Y - 1 1 4 1 6 8、H Y - 1 2 5 8 7 4、H Y - 1 1 2 4 9 4、C S - 0 1 0 2 6 0 7、B C P 2 9 4 7 5 | 2 2 0 6 7 3 5 - 6 1 - 5、H Y - 1 1 2 4 9 2、C S - 0 0 7 8 0 9 7、2 1 5 8 2 9 6 - 4 5 - 6、H Y - 1 2 5 8 7 2、及び 2 1 5 8 2 9 7 - 6 3 - 1、ならびにこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される、請求項 8 6 ~ 1 0 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

【請求項 111】

前記 K R A S 阻害剤が、A M G - 5 1 0 (ソトラシブ)、A M G - 5 1 0 ラセミ体 (ソトラシブラセミ体)、及び M R T X 8 4 9 (アダグラシブ) からなる群から選択される、請求項 110 に記載の方法。

30

【請求項 112】

がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、

(a) メルファランを含む骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで前記患者を治療することと、

(b) 腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) の集団及び 1 つ以上の K R A S 阻害剤を投与することと、

(c) 前記 T I L の集団の投与後に I L - 2 レジメンで前記患者を治療することであって、前記患者または前記対象が、がんを有する、前記治療することと、を含む、前記方法。

40

【請求項 113】

腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) の集団及び 1 つ以上の K R A S 阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、前記患者から切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を取得及び / または受容するステップと、

(b) 前記第 1 の T I L 集団を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

(c) I L - 2 を含む細胞培養培地中で前記第 1 の T I L 集団を培養することによって第 1 の拡大を行い、第 2 の T I L 集団を生成するステップであって、前記第 1 の拡大が、

50

第 1 のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、前記第 1 の拡大が、約 3 ～ 14 日間行われて、前記第 2 の T I L 集団を取得し、ステップ (b) からステップ (c) への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第 2 の T I L 集団を生成するステップと、

(d) 前記第 2 の T I L 集団の前記細胞培養培地を追加の I L - 2、O K T - 3、及び抗原提示細胞 (A P C) で補充することによって第 2 の拡大を行い、第 3 の T I L 集団を生成するステップであって、前記第 2 の拡大が、約 7 ～ 14 日間行われて、前記第 3 の T I L 集団を取得し、前記第 3 の T I L 集団が、治療的 T I L 集団であり、前記第 2 の拡大が、第 2 のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ (c) からステップ (d) への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第 3 の T I L 集団を生成するステップと、

10

(e) ステップ (d) から取得された治療的 T I L 集団を採取するステップであって、ステップ (d) からステップ (e) への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ (e) からの前記採取された T I L 集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ (e) から (f) への移すことが、前記システムを開くことなく起こる、前記移すステップと、

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

(h) 1 つ以上の K R A S 阻害剤及び治療上有効な投与量の前記第 3 の T I L 集団を、ステップ (g) の前記注入バッグから前記患者に投与するステップと、

20

(i) 前記 T I L 集団の投与後に I L - 2 レジメンで前記患者を治療するステップと、を含み、

前記治療上有効な投与量の前記第 3 の T I L 集団を前記患者に投与する前に、前記患者が、メルファランを含む骨髓非破壊的リンパ球枯渇レジメンで治療され、

前記患者が、がんを有する、前記方法。

【請求項 114】

腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) の集団及び 1 つ以上の K R A S 阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、前記患者から切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を取得するステップと、

30

(b) 前記腫瘍断片を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

(c) I L - 2 を含む細胞培養培地中で前記第 1 の T I L 集団を培養することによって第 1 の拡大を行い、第 2 の T I L 集団を生成するステップであって、前記第 1 の拡大が、第 1 のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、前記第 1 の拡大が、約 3 ～ 11 日間行われて、前記第 2 の T I L 集団を取得し、ステップ (b) からステップ (c) への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第 2 の T I L 集団を生成するステップと、

(d) 前記第 2 の T I L 集団の前記細胞培養培地を追加の I L - 2、O K T - 3、及び抗原提示細胞 (A P C) で補充することによって第 2 の拡大を行い、第 3 の T I L 集団を生成するステップであって、前記第 2 の拡大が、約 7 ～ 11 日間行われて、前記第 3 の T I L 集団を取得し、前記第 2 の拡大が、第 2 のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ (c) からステップ (d) への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第 3 の T I L 集団を生成するステップと、

40

(e) ステップ (d) から取得された前記第 3 の T I L 集団を採取するステップであって、ステップ (d) からステップ (e) への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ (e) からの前記採取された第 3 の T I L 集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ (e) から (f) への移すことが、前記システムを開くことなく起こる、前記移すステップと、

50

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

(h) 1つ以上の K R A S 阻害剤及び治療上有効な投与量の前記第 3 の T I L 集団を、ステップ (g) の前記注入バッグから前記患者に投与するステップと、

(i) 前記 T I L 集団の投与後に I L - 2 レジメンで前記患者を治療するステップと、を含み、

前記治療上有効な投与量の前記第 3 の T I L 集団を前記患者に投与する前に、前記患者が、メルファランを含む骨髓非破壊的リンパ球枯渇レジメンで治療され、

前記患者が、がんを有する、前記方法。

【請求項 1 1 5】

腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) の集団及び 1つ以上の K R A S 阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者からの腫瘍細胞と T I L 細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第 1 の T I L 集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 前記第 1 の T I L 集団を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

(c) I L - 2 を含む細胞培養培地中で前記第 1 の T I L 集団を培養することによって第 1 の拡大を行い、第 2 の T I L 集団を生成するステップであって、前記第 1 の拡大が、第 1 のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、前記第 1 の拡大が、約 3 ～ 1 1 日間行われて、前記第 2 の T I L 集団を取得し、ステップ (b) からステップ (c) への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第 2 の T I L 集団を生成するステップと、

(d) 前記第 2 の T I L 集団の前記細胞培養培地を追加の I L - 2、O K T - 3、及び抗原提示細胞 (A P C) で補充することによって第 2 の拡大を行い、第 3 の T I L 集団を生成するステップであって、前記第 2 の拡大が、約 7 ～ 1 1 日間行われて、前記第 3 の T I L 集団を取得し、前記第 2 の拡大が、第 2 のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ (c) からステップ (d) への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第 3 の T I L 集団を生成するステップと、

(e) ステップ (d) から取得された前記第 3 の T I L 集団を採取するステップであって、ステップ (d) からステップ (e) への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ (e) からの前記採取された第 3 の T I L 集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ (e) から (f) への移すことが、前記システムを開くことなく起こる、前記移すステップと、

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

(h) 1つ以上の K R A S 阻害剤及び治療上有効な投与量の前記第 3 の T I L 集団を、ステップ (g) の前記注入バッグから前記患者に投与するステップと、

(i) 前記 T I L 集団の投与後に I L - 2 レジメンで前記患者を治療するステップと、を含み、

前記治療上有効な投与量の前記第 3 の T I L 集団を前記患者に投与する前に、前記患者が、メルファランを含む骨髓非破壊的リンパ球枯渇レジメンで治療され、

前記患者が、がんを有する、前記方法。

【請求項 1 1 6】

腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) の集団及び 1つ以上の K R A S 阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 任意選択的に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍から腫瘍細胞と T I L 細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、対象または前記患者から前記腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、第 1 の T I L 集団を含む、前記切除するステップと、

(b) 腫瘍断片を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

(c) IL-2を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成するステップであって、前記第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、前記第1の拡大が、約3～11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を生成するステップと、

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成するステップであって、前記第2の拡大が、約7～11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を生成するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移すことが、前記システムを開くことなく起こる、前記移すステップと、

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

(h) 1つ以上のKRAS阻害剤及び治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ(g)における前記注入バッグからがんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、を含み、

(i) 前記TIL集団の投与後にIL-2レジメンで前記患者を治療するステップと、を含み、

前記治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を前記患者に投与する前に、前記患者が、メルファランを含む骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで治療され、

前記患者が、がんを有する、前記方法。

【請求項117】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団及び1つ以上のKRAS阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 前記第1のTIL集団を第1の細胞培養培地と接触させるステップと、

(c) 前記第1の細胞培養培地中で前記第1のTIL集団の初期拡大(またはプライミングによる第1の拡大)を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、前記第1の細胞培養培地が、IL-2を含み、任意選択的に、前記プライミングによる第1の拡大が、1～8日の期間にわたって起こる、前記第2のTIL集団を取得するステップと、

(d) 第2の細胞培養培地中で前記第2のTIL集団の急速拡大を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、前記第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3(抗CD3抗体)、及び任意選択的に、照射された同種異系末梢血単核細胞(PBMC)を含み、前記急速拡大が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択的に、前記第2のTIL拡大が、前記急速な第2の拡大の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、前記第3のTIL集団を取得するステップと、

(e) 前記第3のTIL集団を採取するステップと、

(f) 前記第3のTIL集団の治療上有効な部分ががんを有する対象または前記患者に投与するステップと、

(g) 前記第3のTIL集団の前記治療上有効な部分を投与した後に、IL-2レジメンで前記患者を治療するステップと、を含み、

前記第3のTIL集団の前記治療上有効な部分を前記患者に投与する前に、前記患者が、メルファランを含む骨髓非破壊的リンパ球枯渇レジメンで治療され、

前記患者が、がんを有する、前記方法。

【請求項118】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団及び1つ以上のKRAS阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 任意選択的に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍から腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、前記患者から前記腫瘍を切除するステップであって、前記患者が、第1のTIL集団を含む前記腫瘍を以前に治療されている、前記切除するステップと、

(b) 前記腫瘍を、腫瘍断片に断片化するステップと、

(c) 前記腫瘍断片を、第1の細胞培養培地と接触させるステップと、

(d) 前記第1の細胞培養培地中で前記第1のTIL集団の初期拡大(またはプライミングによる第1の拡大)を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、前記第1の細胞培養培地が、IL-2を含み、任意選択的に、前記プライミングによる第1の拡大が、1～8日の期間にわたって起こる、前記第2のTIL集団を取得するステップと、

(e) 第2の細胞培養培地中で前記第2のTIL集団の急速拡大を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、前記第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3(抗CD3抗体)、及び任意選択的に、照射された同種異系末梢血単核細胞(PBMC)を含み、前記急速拡大が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択的に、前記第2のTIL拡大が、前記急速な第2の拡大の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、前記第3のTIL集団を取得するステップと、

(f) 前記第3のTIL集団を採取するステップと、

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

(h) 前記第3のTIL集団の前記治療上有効な部分を投与した後に、IL-2レジメンで前記患者を治療するステップと、を含み、

前記第3のTIL集団の前記治療上有効な部分を前記患者に投与する前に、前記患者が、メルファランを含む骨髓非破壊的リンパ球枯渇レジメンで治療され、

前記患者が、がんを有する、前記方法。

【請求項119】

前記メルファランが、約100mg/m²の用量で2日間連続して静脈内投与される、請求項112～118のいずれか1項に記載の方法。

【請求項120】

IL-2レジメンが、前記TIL集団の投与後最大14日間、毎日低用量のIL-2を投与することを含む、請求項112～119のいずれか1項に記載の方法。

【請求項121】

前記第2のTIL集団が、前記第1のTIL集団よりも数が少なくとも50倍多い、請求項113～116または119～120のいずれか1項に記載の方法。

【請求項122】

前記がんが、神経膠芽細胞腫(GBM)、胃腸癌、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、子宮内膜癌、胆管癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌(頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)を含む)、腎癌、腎細胞癌、多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、及びマントル細胞リンパ腫からなる群から選択される、請求項112～121のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

前記がんが、皮膚黒色腫、眼黒色腫、ブドウ膜黒色腫、及び結膜悪性黒色腫からなる群から選択される、請求項 1 1 2 ～ 1 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記がんが、多形黄色星細胞腫、胚芽異形成神経上皮腫瘍、神経節膠腫、及び毛様細胞性星細胞腫からなる群から選択される、請求項 1 1 2 ～ 1 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記がんが、非小細胞肺癌（NSCLC）を有する子宮内膜腺癌である、請求項 1 1 2 ～ 1 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 2 6】

前記がんが、著しい粘液分化（ECMD）を有する子宮内膜腺癌である、請求項 1 1 2 ～ 1 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記がんが、甲状腺乳頭癌である、請求項 1 1 2 ～ 1 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記がんが、漿液性低悪性度または境界性卵巢癌である、請求項 1 1 2 ～ 1 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 1 2 9】

前記がんが、有毛細胞白血病である、請求項 1 1 2 ～ 1 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

前記がんが、ランゲルハンス細胞組織球症である、請求項 1 1 2 ～ 1 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記がんが、KRASタンパク質のp. G12C変異を有するがんである、請求項 1 1 2 ～ 1 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

前記がんが、p. G12C変異を有する非小細胞肺癌（NSCLC）である、請求項 1 1 2 ～ 1 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 1 3 3】

前記腫瘍が、前記腫瘍切除前に、1つ以上のKRAS阻害剤で前処置された患者から切除された、請求項 1 1 2 ～ 1 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

前記NSCLCが、切除不能、転移性、KRAS阻害剤に対して耐性及び／または不応性である、請求項 1 1 2 ～ 1 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

前記患者または前記対象が、KRAS遺伝子変異を有する、請求項 1 1 2 ～ 1 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 1 3 6】

前記患者または前記対象が、p. G12C変異を示すがんを有する、請求項 1 1 2 ～ 1 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

前記がんが、KRAS阻害剤で以前に治療されている、請求項 1 1 2 ～ 1 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

前記がんが、KRAS阻害剤で以前に治療されていない、請求項 1 1 2 ～ 1 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 9】

50

前記 K R A S 阻害剤が、A M G - 5 1 0 (ソトラシブ)、A M G - 5 1 0 ラセミ体 (ソトラシブラセミ体)、M R T X 8 4 9 (アダグラシブ)、J N J - 7 4 6 9 9 1 5 7 / A R S - 3 2 4 8、J D Q 4 4 3、L Y 3 4 9 9 4 4 6、L Y 3 5 3 7 9 8 2、R L Y - 1 9 7 1 / G D C - 6 0 3 6、B B P - 4 5 4、B I 1 7 0 1 9 6 3、B I 1 8 2 3 9 1 1、m R N A - 5 6 7 1 / V 9 4 1、D - 1 5 5 3、B I - 2 8 5 2、B I - 3 4 0 6、A R S - 1 6 2 0、B A Y - 2 9 3、M R T X - 1 2 5 7、P R O T A C K - R a s D e g r a d e r - 1、L C - 2、A R S - 8 5 3、A R S - 1 3 2 3、A R S - 1 3 2 3 - アルキン、A R S - 1 6 3 0、K - R a s G 1 2 C - I N - 2、K R A S 阻害剤 - 6、K R A S 阻害剤 8、K R A S 阻害剤 7、K R A S G 1 2 C 阻害剤 1 5、K R A S G 1 2 C 阻害剤 5、K R A S G 1 2 C 阻害剤 1 3、K R A S G 1 2 C 阻害剤 1 7、K R A S G 1 2 C 阻害剤 1 6、K R A S G 1 2 C 阻害剤 1 4、K R a s G 1 2 C 阻害剤 4、K R a s G 1 2 C 阻害剤 1、K R a s G 1 2 C 阻害剤 3、K R a s G 1 2 C 阻害剤 2、6 H 0 5、S A H - S O S 1 A T F A、K R A S 阻害剤 1 0、S A H - S O S 1 A、アトロバスタチン - P E G 3 - F I T C、C 6 M E、C S - 0 1 1 5 6 1 7、H Y - 1 3 0 2 6 0、H Y - 1 3 5 8 6 4、H Y - 1 3 5 8 6 6、C m p d 2、C S - 0 1 1 5 6 1 8、C S - 0 1 1 5 6 2 0、E X - A 4 3 8 7、C S - 0 1 0 6 1 3 4、H Y - 1 3 5 8 6 5、2 2 4 1 7 1 9 - 7 5 - 3、H Y - 1 2 5 8 7 3、C S - 0 0 4 6 1 3 8、C S - 0 0 4 6 1 3 7、C S - 0 1 0 1 4 7 4、H Y - 1 2 5 8 7 5、C S - 0 1 0 2 6 0 8、C S - 0 1 0 2 6 1 0、C S - 0 1 0 2 6 0 6、H Y - 1 1 2 4 9 3、C S - 0 0 4 6 1 3 9、1 - { 4 - [6 - クロロ - 8 - フルオロ - 7 - (5 - メチル - 1 h - インダゾール - 4 - イル) キナゾリン - 4 - イル] ピペラジン - 1 - イル } プロパン - 1 - オン、H Y - 1 2 6 2 9 2、H Y - 1 1 2 4 9 1、C S - 0 0 4 6 1 3 6、H Y - 1 1 4 1 6 8、H Y - 1 2 5 8 7 4、H Y - 1 1 2 4 9 4、C S - 0 1 0 2 6 0 7、B C P 2 9 4 7 5 | 2 2 0 6 7 3 5 - 6 1 - 5、H Y - 1 1 2 4 9 2、C S - 0 0 7 8 0 9 7、2 1 5 8 2 9 6 - 4 5 - 6、H Y - 1 2 5 8 7 2、及び 2 1 5 8 2 9 7 - 6 3 - 1、ならびにそれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される、請求項 1 1 2 ~ 1 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

【請求項 1 4 0】

前記 K R A S 阻害剤が、A M G - 5 1 0 (ソトラシブ)、A M G - 5 1 0 ラセミ体 (ソトラシブラセミ体)、及び M R T X 8 4 9 (アダグラシブ) からなる群から選択される、請求項 1 1 0 に記載の方法。

30

【請求項 1 4 1】

腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を治療的 T I L 集団に拡大する方法であって、前記方法が、

(a) 対象または患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、前記対象または前記患者から切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を取得及び / または受容することであって、前記対象または前記患者が、少なくとも 1 つの K R A S 阻害剤で以前に治療されている、前記第 1 の T I L 集団を取得及び / または受容することと、

(b) 前記第 1 の T I L 集団を閉鎖されたシステムに付加することと、

(c) I L - 2 を含む細胞培養培地中で前記第 1 の T I L 集団を培養することによって第 1 の拡大を行い、第 2 の T I L 集団を生成することであって、前記第 1 の拡大が、第 1 のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、前記第 1 の拡大が、約 3 ~ 1 4 日間行われて、前記第 2 の T I L 集団を取得し、ステップ (b) からステップ (c) への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第 2 の T I L 集団を生成することと

40

(d) 前記第 2 の T I L 集団の前記細胞培養培地を追加の I L - 2、O K T - 3、及び抗原提示細胞 (A P C) で補充することによって第 2 の拡大を行い、第 3 の T I L 集団を生成することであって、前記第 2 の拡大が、約 7 ~ 1 4 日間行われて、前記第 3 の T I L 集団を取得し、前記第 3 の T I L 集団が、治療的 T I L 集団であり、前記第 2 の拡大が、第 2 のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ (c) からステ

50

ップ（d）への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を生成することと、

（e）ステップ（d）から取得された治療的TIL集団を採取することであって、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記採取することと、

（f）ステップ（e）からの前記採取されたTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（e）から（f）への移すことが、前記システムを開くことなく起こる、前記移すことと、

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

10

【請求項142】

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

（a）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、前記対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得することであって、前記対象が、少なくとも1つのKRAS阻害剤で以前に治療されている、前記第1のTIL集団を取得することと、

（b）前記腫瘍断片を閉鎖されたシステムに付加することと、

（c）IL-2を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行って、第2のTIL集団を生成することであって、前記第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、前記第1の拡大が、約3～11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、前記第2のTIL集団が、前記第1のTIL集団よりも数が少なくとも50倍多く、ステップ（b）からステップ（c）への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を生成することと、

20

（d）前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成することであって、前記第2の拡大が、約7～11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ（c）からステップ（d）への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を生成することと、

30

（e）ステップ（d）から取得された前記第3のTIL集団を採取することであって、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記採取することと、

（f）ステップ（e）からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（e）から（f）への移すことが、前記システムを開くことなく起こる、前記移すことと、

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

【請求項143】

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

40

（a）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容することであって、前記対象または前記患者が、少なくとも1つのKRAS阻害剤で以前に治療されている、前記第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

（b）前記第1のTIL集団を閉鎖されたシステムに付加することと、

（c）IL-2を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成することであって、前記第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、前記第1の拡大が、約3～1

50

1日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を生成することと、

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成することであって、前記第2の拡大が、約7~11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を生成することと、

(e) ステップ(d)から取得された前記第3のTIL集団を採取することであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記採取することと、

(f) ステップ(e)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ(e)から(f)への移すことが、前記システムを開くことなく起こる、前記移すことと、

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

【請求項144】

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

(a) 任意選択的に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍から腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、対象または患者から前記腫瘍を切除することであって、前記腫瘍が、第1のTIL集団を含み、前記対象または前記患者が、少なくとも1つのKRAS阻害剤で以前に治療されている、前記切除することと、

(b) 腫瘍断片を閉鎖されたシステムに付加することと、

(c) IL-2を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成することであって、前記第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、前記第1の拡大が、約3~11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を生成することと、

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成することであって、前記第2の拡大が、約7~11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を生成することと、

(e) ステップ(d)から取得された前記第3のTIL集団を採取することであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、前記システムを開くことなく起こる、前記採取することと、

(f) ステップ(e)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ(e)から(f)への移すことが、前記システムを開くことなく起こる、前記移すことと、

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

【請求項145】

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

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞

10

20

30

40

50

胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容することであって、前記対象または前記患者が、少なくとも1つのKRAS阻害剤で以前に治療されている、前記第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(c) 前記第1のTIL集団を第1の細胞培養培地と接触させることと、

(d) 前記第1の細胞培養培地中で前記第1のTIL集団の初期拡大（またはプライミングによる第1の拡大）を行い、第2のTIL集団を取得することであって、前記第1の細胞培養培地が、IL-2を含み、任意選択的に、前記プライミングによる第1の拡大が、1～8日の期間にわたって起こる、前記第2のTIL集団を取得することと、

(e) 第2の細胞培養培地中で前記第2のTIL集団の急速拡大を行い、第3のTIL集団を取得することであって、前記第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、及び任意選択的に、照射された同種異系末梢血単核細胞（PBMC）を含み、前記急速拡大が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択的に、前記第2のTIL拡大が、前記急速な第2の拡大の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、前記第3のTIL集団を取得することと、

(f) 前記第3のTIL集団を採取することと、を含む、前記方法。

【請求項146】

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

(a) 任意選択的に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍から腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、対象または患者から前記腫瘍を切除することであって、前記対象または前記患者が、少なくとも1つのKRAS阻害剤で以前に治療されている、前記切除することと、

(b) 前記腫瘍を、腫瘍断片に断片化することと、

(c) 前記腫瘍断片を、第1の細胞培養培地と接触させることと、

(d) 前記第1の細胞培養培地中で前記第1のTIL集団の初期拡大（またはプライミングによる第1の拡大）を行い、第2のTIL集団を取得することであって、前記第2のTIL集団が、前記第1のTIL集団よりも数が少なくとも5倍多く、前記第1の細胞培養培地が、IL-2を含み、任意選択的に、前記プライミングによる第1の拡大が、1～8日の期間にわたって起こる、前記第2のTIL集団を取得することと、

(e) 第2の細胞培養培地中で前記第2のTIL集団の急速拡大を行い、第3のTIL集団を取得することであって、前記第3のTIL集団が、前記急速拡大の開始から7～8日後、前記第2のTIL集団よりも数が少なくとも50倍多く、前記第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、及び任意選択的に照射された同種異系末梢血単核細胞（PBMC）を含み、前記急速拡大が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択的に、前記第2のTIL拡大が、前記急速な第2の拡大の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、前記第3のTIL集団を取得することと、

(f) 前記第3のTIL集団を採取することと、を含む、前記方法。

【請求項147】

前記第2のTIL集団が、前記第1のTIL集団よりも数が少なくとも50倍多い、請求項141～145のいずれか1項に記載の方法。

【請求項148】

前記患者または前記対象が、NSCLCであるがんを有し、前記NSCLCが、切除不能、転移性、KRAS阻害剤に対して耐性及び／または不応性である、請求項141～147のいずれか1項に記載の方法。

【請求項149】

前記患者または前記対象が、KRAS遺伝子変異を有する、請求項141～148のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 150】

前記患者または前記対象が、p . G12C 変異を示すがんを有する、請求項 141～149 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 151】

前記 K R A S 阻害剤が、A M G - 5 1 0 (ソトラシブ)、A M G - 5 1 0 ラセミ体 (ソトラシブラセミ体)、M R T X 8 4 9 (アダグラシブ)、J N J - 7 4 6 9 9 1 5 7 / A R S - 3 2 4 8、J D Q 4 4 3、L Y 3 4 9 9 4 4 6、L Y 3 5 3 7 9 8 2、R L Y - 1 9 7 1 / G D C - 6 0 3 6、B B P - 4 5 4、B I 1 7 0 1 9 6 3、B I 1 8 2 3 9 1 1、m R N A - 5 6 7 1 / V 9 4 1、D - 1 5 5 3、B I - 2 8 5 2、B I - 3 4 0 6、A R S - 1 6 2 0、B A Y - 2 9 3、M R T X - 1 2 5 7、P R O T A C K - R a s D e g r a d e r - 1、L C - 2、A R S - 8 5 3、A R S - 1 3 2 3、A R S - 1 3 2 3 - アルキン、A R S - 1 6 3 0、K - R a s G 1 2 C - I N - 2、K R A S 阻害剤 - 6、K R A S 阻害剤 8、K R A S 阻害剤 7、K R A S G 1 2 C 阻害剤 1 5、K R A S G 1 2 C 阻害剤 5、K R A S G 1 2 C 阻害剤 1 3、K R A S G 1 2 C 阻害剤 1 7、K R A S G 1 2 C 阻害剤 1 6、K R A S G 1 2 C 阻害剤 1 4、K R a s G 1 2 C 阻害剤 4、K R a s G 1 2 C 阻害剤 1、K R a s G 1 2 C 阻害剤 3、K R a s G 1 2 C 阻害剤 2、6 H 0 5、S A H - S O S 1 A T F A、K R A S 阻害剤 1 0、S A H - S O S 1 A、アトロバスタチン - P E G 3 - F I T C、C 6 M E、C S - 0 1 1 5 6 1 7、H Y - 1 3 0 2 6 0、H Y - 1 3 5 8 6 4、H Y - 1 3 5 8 6 6、C m p d 2、C S - 0 1 1 5 6 1 8、C S - 0 1 1 5 6 2 0、E X - A 4 3 8 7、C S - 0 1 0 6 1 3 4、H Y - 1 3 5 8 6 5、2 2 4 1 7 1 9 - 7 5 - 3、H Y - 1 2 5 8 7 3、C S - 0 0 4 6 1 3 8、C S - 0 0 4 6 1 3 7、C S - 0 1 0 1 4 7 4、H Y - 1 2 5 8 7 5、C S - 0 1 0 2 6 0 8、C S - 0 1 0 2 6 1 0、C S - 0 1 0 2 6 0 6、H Y - 1 1 2 4 9 3、C S - 0 0 4 6 1 3 9、1 - { 4 - [6 - クロロ - 8 - フルオロ - 7 - (5 - メチル - 1 h - インダゾール - 4 - イル) キナゾリン - 4 - イル] ピペラジン - 1 - イル } プロパン - 1 - オン、H Y - 1 2 6 2 9 2、H Y - 1 1 2 4 9 1、C S - 0 0 4 6 1 3 6、H Y - 1 1 4 1 6 8、H Y - 1 2 5 8 7 4、H Y - 1 1 2 4 9 4、C S - 0 1 0 2 6 0 7、B C P 2 9 4 7 5 | 2 2 0 6 7 3 5 - 6 1 - 5、H Y - 1 1 2 4 9 2、C S - 0 0 7 8 0 9 7、2 1 5 8 2 9 6 - 4 5 - 6、H Y - 1 2 5 8 7 2、及び 2 1 5 8 2 9 7 - 6 3 - 1、ならびにそれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される、請求項 141～150 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

【請求項 152】

前記 K R A S 阻害剤が、A M G - 5 1 0 (ソトラシブ)、A M G - 5 1 0 ラセミ体 (ソトラシブラセミ体)、及び M R T X 8 4 9 (アダグラシブ) からなる群から選択される、請求項 151 に記載の方法。

【請求項 153】

前記がんが、P D - 1 阻害剤及び／または P D - L 1 阻害剤またはそれらのバイオシミラーで以前に治療されている、請求項 141～152 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 154】

前記がんが、P D - 1 阻害剤またはそのバイオシミラーで以前に治療されている、請求項 153 に記載の方法。

40

【請求項 155】

前記 P D - 1 阻害剤が、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される、請求項 154 に記載の方法。

【請求項 156】

前記患者が、P D - L 1 阻害剤またはそのバイオシミラーで更に以前に治療されている、請求項 155 に記載の方法。

【請求項 157】

前記 P D - L 1 阻害剤が、アベルマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される、請求項 153 に記載の方法。

50

【請求項 158】

前記がんが、PD-1 阻害剤及び／またはPD-L1 阻害剤またはそれらのバイオシミラーで以前に治療されていない、請求項 141～152 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 159】

前記がんが、CTLA-4 阻害剤またはそのバイオシミラーで以前に治療されている、請求項 141～158 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 160】

前記CTLA-4 阻害剤が、イピリムマブ、トレメリムマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される、請求項 159 に記載の方法。

【請求項 161】

前記がんが、化学療法レジメンで以前に治療されている、請求項 141～160 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 162】

前記化学療法レジメンが、ダカルバジンまたはテモゾリミドを含む、請求項 161 に記載の方法。

【請求項 163】

前記第 1 の拡大が、約 11 日間の期間にわたって行われる、請求項 142～145 または 147～162 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 164】

前記初期拡大が、約 11 日の期間にわたって行われる、請求項 146～162 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 165】

前記IL-2 が、前記第 1 の拡大において、前記細胞培養培地中に1000 IU/mL～6000 IU/mLの初期濃度で存在する、請求項 142～145 または 147～162 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 166】

前記IL-2 が、前記初期拡大において、前記細胞培養培地中に1000 IU/mL～6000 IU/mLの初期濃度で存在する、請求項 146～162 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 167】

前記第 2 の拡大ステップにおいて、前記IL-2 が、1000 IU/mL～6000 IU/mLの初期濃度で存在し、前記OKT-3 抗体が、約30 ng/mLの初期濃度で存在する、請求項 142～145 または 147～162 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 168】

前記急速拡大ステップにおいて、前記IL-2 が、1000 IU/mL～6000 IU/mLの初期濃度で存在し、前記OKT-3 抗体が、約30 ng/mLの初期濃度で存在する、請求項 146～162 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 169】

前記第 1 の拡大が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項 142～145 または 147～162 に記載の方法。

【請求項 170】

前記初期拡大が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項 146～162 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 171】

前記第 2 の拡大が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項 142～145 または 147～162 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 172】

前記急速拡大が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項 146～162 に記載の方法。

【請求項 173】

10

20

30

40

50

前記第1の細胞培養培地が、IL-4、IL-7、IL-15、IL-21、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインを更に含む、請求項142～145または147～162のいずれか1項に記載の方法。

【請求項174】

前記第1の拡大の前記細胞培養培地が、IL-4、IL-7、IL-15、IL-21、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインを更に含む、請求項146～162に記載の方法。

【請求項175】

前記第2の細胞培養培地が、IL-4、IL-7、IL-15、IL-21、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインを更に含む、請求項142～145または147～162のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項176】

前記第2の拡大の前記細胞培養培地が、IL-4、IL-7、IL-15、IL-21、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインを更に含む、請求項146～162のいずれか1項に記載の方法。

【請求項177】

治療上有効なTIL集団が、投与され、かつ約 2.3×10^{10} ～約 13.7×10^{10} TILを含む、請求項141～176のいずれか1項に記載の方法。

【請求項178】

前記初期拡大が、21日以内の期間にわたって行われる、請求項146～177のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項179】

前記初期拡大が、7日以内の期間にわたって行われる、請求項146～177のいずれか1項に記載の方法。

【請求項180】

前記急速拡大が、7日以内の期間にわたって行われる、請求項146～177のいずれか1項に記載の方法。

【請求項181】

ステップ(c)における第1の拡大及びステップ(d)における前記第2の拡大が、各々11日間の期間内に個別に行われる、請求項142～145または147～177のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項182】

ステップ(a)～(f)が、約10日～約22日で行われる、請求項142～145または147～177のいずれか1項に記載の方法。

【請求項183】

前記対象が、前記腫瘍の切除前に、KRAS阻害剤を投与することを含む以前の治療を受けた、請求項141、142または147～177のいずれか1項に記載の方法。

【請求項184】

前記対象が、前記外科的切除の前に、KRAS阻害剤を投与することを含む以前の治療を受けた、請求項143、145、または147～177のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項185】

前記対象が、前記がんの切除前にKRAS阻害剤を投与することを含む以前の治療を受けた、請求項144、146、または147～177に記載の方法。

【請求項186】

前記以前の治療が、ソトラシブもしくはアダグラシブ、またはその薬学的に許容される塩を、約500～1500mgの用量で投与することを含む、請求項183～185のいずれか1項に記載の方法。

【請求項187】

前記ソトラシブが、約960mgの用量で投与された、請求項186に記載の方法。

【請求項188】

50

前記アダグラシブが、約 600 mg の用量で投与された、請求項 186 に記載の方法。

【請求項 189】

前記以前の治療が、ソトラシブもしくはアダグラシブ、またはその薬学的に許容される塩を、1日2回投与することを含む、請求項 186～188 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 190】

前記少なくとも1つのKRAS阻害剤が、治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団と同時に投与される、請求項 141～146 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 191】

前記治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団の前記投与後、前記少なくとも1つのKRAS阻害剤の前記投与が維持される、請求項 190 に記載の方法。

【請求項 192】

前記少なくとも1つのKRAS阻害剤が、前記治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を投与した後に投与される、請求項 141～146 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 193】

前記対象が、前記治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を投与してから少なくとも1週間後に、前記少なくとも1つのKRAS阻害剤を投与される、請求項 192 に記載の方法。

【請求項 194】

前記患者が、前記治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を投与する前に、前記少なくとも1つのKRAS阻害剤も投与された、請求項 192 に記載の方法。

【請求項 195】

前記少なくとも1つのKRAS阻害剤が、前記治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団と同時に投与されない、請求項 194 に記載の方法。

【請求項 196】

前記少なくとも1つのKRAS阻害剤が、約 500～1500 mg の用量で投与されるソトラシブもしくはアダグラシブ、またはその薬学的に許容される塩を含む、請求項 190～195 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 197】

前記ソトラシブが、約 960 mg の用量で投与される、請求項 196 に記載の方法。

【請求項 198】

前記アダグラシブが、約 600 mg の用量で投与される、請求項 196 に記載の方法。

【請求項 199】

前記ソトラシブまたはアダグラシブが、1日2回投与される、請求項 196～198 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 200】

前記対象または前記患者が、神経膠芽細胞腫（GBM）、胃腸癌、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、子宮内膜癌、胆管癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、腎癌、腎細胞癌、多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、及びマントル細胞リンパ腫からなる群から選択されるがんを有する、請求項 141～199 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 201】

前記がんが、皮膚黒色腫、眼黒色腫、ブドウ膜黒色腫、及び結膜悪性黒色腫からなる群から選択される、請求項 141～200 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 202】

前記がんが、多形黄色星細胞腫、胚芽異形成神経上皮腫瘍、神経節膠腫、及び毛様細胞性星細胞腫からなる群から選択される、請求項 141～200 のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 203】

前記がんが、非小細胞肺癌（NSCLC）を有する子宮内膜腺癌である、請求項 141～200 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 204】

前記がんが、著しい粘液分化（ECMD）を有する子宮内膜腺癌である、請求項 141～200 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 205】

前記がんが、甲状腺乳頭癌である、請求項 141～200 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 206】

前記がんが、漿液性低悪性度または境界性卵巣癌である、請求項 141～200 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 207】

前記がんが、有毛細胞白血病である、請求項 141～200 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 208】

前記がんが、ランゲルハンス細胞組織球症である、請求項 141～200 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 209】

前記がんが、KRAS タンパク質の p. G12C 変異を有するがんである、請求項 141～208 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 210】

前記がんが、p. G12C 変異を有する非小細胞肺癌（NSCLC）である、請求項 141～209 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 211】

対象または患者から切除された腫瘍からの TIL 集団を拡大することによって取得可能な腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の拡大集団であって、前記腫瘍の切除の前に、前記対象または前記患者が少なくとも 1 つの KRAS 阻害剤で治療されている、前記拡大集団。

【請求項 212】

請求項 141～147 のいずれか 1 項に記載の方法によって取得可能な腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の拡大集団。

【請求項 213】

がんを治療するための少なくとも 1 つの KRAS 阻害剤と組み合わせて使用するための医薬の製造における、請求項 211 または請求項 212 に記載の腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団の使用。

【請求項 214】

がんを治療するための少なくとも 1 つの KRAS 阻害剤と組み合わせて使用するための医薬の製造における、請求項 1～212 のいずれか 1 項に記載の腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団の使用。

【請求項 215】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団の使用であって、前記 TIL が、がんを治療するための少なくとも 1 つの KRAS 阻害剤と組み合わせて使用するための医薬の製造における、請求項 1～210 のいずれか 1 項に記載の方法のうちのいずれかに従って拡大される、前記使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2021 年 7 月 28 日に出願された米国仮出願第 63 / 226, 751 号の優先権を主張し、この開示はその全体が本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0002】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の養子自家移入を使用した巨大な不応性がんの治療は、予後不良の患者の治療に対する強力なアプローチとなる。Gattinoni, et al., Nat. Rev. Immunol. 2006, 6, 383-393。TILは、T細胞に支配され、IL-2ベースのTIL拡大とそれに続く「急速拡大プロセス」（REP）は、その速度及び効率のためにTIL拡大の好ましい方法になっている。Dudley, et al., Science 2002, 298, 850-54、Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2005, 23, 2346-57、Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2008, 26, 5233-39、Riddell, et al., Science 1992, 257, 238-41、Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42。黒色腫におけるTIL療法への応答を改善し、TIL療法を他の腫瘍タイプに拡大するための多くのアプローチが限られた成功を収めており、この分野は依然として困難である。Goff, et al., J. Clin. Oncol. 2016, 34, 2389-97、Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2008, 26, 5233-39、Rosenberg, et al., Clin. Cancer Res. 2011, 17, 4550-57。単一免疫チェックポイント阻害剤との併用研究も記載されているが、更なる研究が進行中であり、追加の治療方法が必要である（Kverneland, et al., Oncotarget, 2020, 11(22), 2092-2105）。

10

20

【0003】

更に、現在のTIL製造及び治療プロセスは、長さ、コスト、無菌性の懸念、及び本明細書に記載される他の要因によって制限され、したがって、KRAS阻害剤治療に対して不応性である患者を治療する可能性が著しく制限されている。実行可能な治療選択肢がほとんどまたはまったく残っていない患者を治療する際に使用するのに適したTIL製造プロセス及びかかるプロセスに基づく治療法を提供することが緊急に必要である。本発明は、KRAS阻害剤と組み合わせて患者の治療に利用することができるTILの生成に使用するための製造プロセスを提供することによって、この必要性を満たす。

【発明の概要】

【0004】

本明細書に提供されるのは、拡大されたTIL集団及び少なくとも1つのKRAS阻害剤を使用して患者におけるがんを治療する方法、ならびに少なくとも1つのKRAS阻害剤で前処置された患者または対象から治療的TIL集団を生成する方法である。

30

【0005】

いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団及び少なくとも1つのKRAS阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、任意選択的に、当該患者または対象が、少なくとも1つの前療法を受けており、少なくとも1つの前療法が、任意選択的に抗PD1抗体を含む。

【0006】

いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団及び少なくとも1つのKRAS阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、本方法は、

40

（a）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、当該対象または患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

（b）第1のTIL集団を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

（c）IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成するステップであって、第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、第1の拡大が、約3～14日間行

50

われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第2のTIL集団を生成するステップと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成するステップであって、第2の拡大が、約7~14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第3のTIL集団を生成するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された治療的TIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの採取されたTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移すことが、システムを開くことなく起こる、当該移すステップと、

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

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

(i) 少なくとも1つのKRAS阻害剤を対象に投与するステップと、を含む、当該方法を提供する。

【0007】

いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団及び少なくとも1つのKRAS阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、本方法は、

(a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得するステップと、

(b) 腫瘍断片を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

(c) IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行って、第2のTIL集団を生成するステップであって、第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、第1の拡大が、約3~11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、第2のTIL集団が、第1のTIL集団よりも数が少なくとも50倍多く、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第2のTIL集団を生成するステップと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成するステップであって、第2の拡大が、約7~11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第3のTIL集団を生成するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移すことが、システムを開くことなく起こる、当該移すステップと、

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

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

(i) 少なくとも1つのKRAS阻害剤を対象に投与するステップと、を含む、当該方

10

20

30

40

50

法を提供する。

【0008】

いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団及び少なくとも1つのKRAS阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、本方法は、

（a）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

（b）第1のTIL集団を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

（c）IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成するステップであって、第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、第1の拡大が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ（b）からステップ（c）への移行が、システムを開くことなく起こる、第2のTIL集団を生成するステップと、

（d）第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成するステップであって、第2の拡大が、約7～11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ（c）からステップ（d）への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第3のTIL集団を生成するステップと、

（e）ステップ（d）から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、システムを開くことなく起こる、当該採取するステップと、

（f）ステップ（e）からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（e）から（f）への移すことが、システムを開くことなく起こる、当該移すステップと、

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

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

（i）少なくとも1つのKRAS阻害剤を対象に投与するステップと、を含む、当該方法を提供する。

【0009】

いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団及び少なくとも1つのKRAS阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、本方法は、

（a）任意選択的に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍から腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、対象または患者から当該腫瘍を切除するステップであって、当該腫瘍が、第1のTIL集団を含む、当該切除するステップと、

（b）腫瘍断片を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

（c）IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成するステップであって、第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、第1の拡大が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ（b）からステップ（c）への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第2のTIL集団を生成するステップと、

（d）第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成するステップであって、第2の拡大が、約7～11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステッ

ブ（c）からステップ（d）への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第3のTIL集団を生成するステップと、

（e）ステップ（d）から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、システムを開くことなく起こる、当該採取するステップと、

（f）ステップ（e）からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（e）から（f）への移すことが、システムを開くことなく起こる、当該移すステップと、

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

（h）治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ（g）の注入バッグからがんを有する対象または患者に投与するステップと、

（i）少なくとも1つのKRAS阻害剤を対象に投与するステップと、を含む、当該方法を提供する。

【0010】

いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団及び少なくとも1つのKRAS阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、本方法は、

（a）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

（c）第1のTIL集団を第1の細胞培養培地と接触させるステップと、

（d）第1の細胞培養培地中で第1のTIL集団の初期拡大（またはプライミングによる第1の拡大）を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、第1の細胞培養培地が、IL-2を含み、任意選択的に、プライミングによる第1の拡大が、1～8日の期間にわたって起こる、当該第2のTIL集団を取得するステップと、

（e）第2の細胞培養培地中で第2のTIL集団の急速拡大を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、及び任意選択的に照射された同種異系末梢血単核細胞（PBMC）を含み、急速拡大が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択的に、第2のTIL拡大が、急速な第2の拡大の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、当該第3のTIL集団を取得するステップと、

（f）第3のTIL集団を採取するステップと、

（g）第3のTIL集団の治療上有効な部分をがんを有する対象または患者に投与するステップと、

（i）少なくとも1つのKRAS阻害剤を対象に投与するステップと、を含む、当該方法を提供する。

【0011】

いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団及び少なくとも1つのKRAS阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、本方法は、

（a）任意選択的に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍から腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、対象または患者から腫瘍を切除するステップであって、当該対象または患者が、少なくとも1つのKRAS阻害剤で以前に治療されている、当該切除するステップと、

（b）腫瘍を、腫瘍断片に断片化するステップと、

（c）腫瘍断片を、第1の細胞培養培地と接触させるステップと、

（d）第1の細胞培養培地中で第1のTIL集団の初期拡大（またはプライミングによる第1の拡大）を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、第2のTIL集団が、第1のTIL集団よりも数が少なくとも5倍多く、第1の細胞培養培地が、IL-

10

20

30

40

50

2を含み、任意選択的に、プライミングによる第1の拡大が、1～8日の期間にわたって起こる、当該第2のTIL集団を取得するステップと、

(e) 第2の細胞培養培地中で第2のTIL集団の急速拡大を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、第3のTIL集団が、急速拡大の開始から7～8日後、第2のTIL集団よりも数が少なくとも50倍多く、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、及び任意選択的に照射された同種異系末梢血単核細胞（PBMC）を含み、急速拡大が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択的に、第2のTIL拡大が、急速な第2の拡大の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または10日にわたって進行することができる、当該第3のTIL集団を取得するステップと、

10

(f) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(g) 第3のTIL集団の治療上有効な部分をがんを有する対象または患者に投与するステップと、

(i) 少なくとも1つのKRAS阻害剤を対象に投与するステップと、を含む、当該方法を提供する。

【0012】

いくつかの実施形態では、第2のTIL集団は、第1のTIL集団よりも数が少なくとも50倍多い。

【0013】

いくつかの実施形態では、患者または対象は、NSCLCであるがんを有し、NSCLCは、切除不能、転移性、KRAS阻害剤に対して耐性及び／または不応性である。

20

【0014】

いくつかの実施形態では、患者または対象は、KRAS遺伝子変異を有する。

【0015】

いくつかの実施形態では、患者または対象は、p.G12C変異を示すがんを有する。

【0016】

いくつかの実施形態では、がんは、KRAS阻害剤で以前に治療されている。

【0017】

いくつかの実施形態では、がんは、KRAS阻害剤で以前に治療されていない。

【0018】

いくつかの実施形態では、KRAS阻害剤が、AMG-510（ソトラシブ）、AMG-510ラセミ体（ソトラシブラセミ体）、MRTX849（アダグラシブ）、JNJ-74699157／ARS-3248、JDQ443、LY3499446、LY3537982、RLY-1971／GDC-6036、BBP-454、BI 1701963、BI 1823911、mRNA-5671／V941、D-1553、BI-2852、BI-3406、ARS-1620、BAY-293、MRTX-1257、PROTAC K-Ras Degradator-1、LC-2、ARS-853、ARS-1323、ARS-1323-アルキン、ARS-1630、K-Ras G12C-IN-2、KRAS阻害剤-6、KRAS阻害剤8、KRAS阻害剤7、KRAS G12C阻害剤15、KRAS G12C阻害剤5、KRAS G12C阻害剤13、KRAS G12C阻害剤17、KRAS G12C阻害剤16、KRAS G12C阻害剤14、KRas G12C阻害剤4、KRas G12C阻害剤1、KRas G12C阻害剤3、KRas G12C阻害剤2、6H05、SAH-SOS1A TFA、KRAS阻害剤10、SAH-SOS1A、アトロバスタチン-PEG3-FITC、C6ME、CS-0115617、HY-130260、HY-135864、HY-135866、Cmpd2、CS-0115618、CS-0115620、EX-A4387、CS-0106134、HY-135865、2241719-75-3、HY-125873、CS-0046138、CS-0046137、CS-0101474、HY-125875、CS-0102608、CS-0102610、CS-0102606、HY-112493、CS-0046139、1- {4- [6-クロロ-8-フルオロ-7- (

30

40

50

5-メチル-1*h*-インダゾール-4-イル) キナゾリン-4-イル] ピペラジン-1-イル} プロパン-1-オン、HY-126292、HY-112491、CS-0046136、HY-114168、HY-125874、HY-112494、CS-0102607、BCP29475 | 2206735-61-5、HY-112492、CS-0078097、2158296-45-6、HY-125872、及び2158297-63-1、ならびにそれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される。

【0019】

いくつかの実施形態では、がんは、PD-1阻害剤及び／またはPD-L1阻害剤またはそのバイオシミラーで以前に治療されている。

【0020】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される。

【0021】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、アベルマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される。

【0022】

いくつかの実施形態では、がんは、PD-1阻害剤及び／またはPD-L1阻害剤またはそのバイオシミラーで以前に治療されていない。

【0023】

いくつかの実施形態では、がんは、CTLA-4阻害剤またはそのバイオシミラーで以前に治療されている。

【0024】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、イピルムマブ、トレメリムマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される。

【0025】

いくつかの実施形態では、がんは、化学療法レジメンで以前に治療されている。

【0026】

いくつかの実施形態では、化学療法レジメンは、ダカルバジンまたはテモゾリミドを含む。

【0027】

いくつかの実施形態では、第1の拡大または初期拡大は、約11日の期間にわたって行われる。

【0028】

いくつかの実施形態では、IL-2は、第1の拡大または初期拡大において、細胞培養培地中に1000IU/mL～6000IU/mLの初期濃度で存在する。

【0029】

いくつかの実施形態では、第2のまたは急速拡大ステップにおいて、IL-2は、1000IU/mL～6000IU/mLの初期濃度で存在し、OKT-3抗体は、約30ng/mLの初期濃度で存在する。

【0030】

いくつかの実施形態では、第1のまたは初期拡大は、ガス透過性容器を使用して行われる。

【0031】

いくつかの実施形態では、第2のまたは急速拡大は、ガス透過性容器を使用して行われる。

【0032】

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

【0033】

10

20

30

40

50

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

【0034】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供する方法は、TILを患者に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで患者を治療するステップを更に含む。

【0035】

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

【0036】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを $60 \text{ mg} / \text{m}^2$ /日の用量で、フルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2$ /日の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2$ /日の用量で3日間投与するステップを含む。

【0037】

いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。

【0038】

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

【0039】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、第3のTIL集団を患者に投与したのと同じ日に開始するIL-2レジメンで患者を治療するステップを更に含む。

【0040】

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

【0041】

いくつかの実施形態では、治療上有効なTIL集団が、投与され、かつ約 2.3×10^1 ~ 約 13.7×10^1 個のTILを含む。

【0042】

いくつかの実施形態では、初期拡大は、21日以内の期間にわたって行われる。

【0043】

いくつかの実施形態では、初期拡大は、7日以内の期間にわたって行われる。

【0044】

いくつかの実施形態では、急速拡大は、7日以内の期間にわたって行われる。

【0045】

いくつかの実施形態では、ステップ(c)における第1の拡大及びステップ(d)における第2の拡大は、各々、11日間の期間内で個別に行われる。

【0046】

いくつかの実施形態では、ステップ(a)~(f)は、約10日~約22日で行われる。

【0047】

いくつかの実施形態では、対象は、腫瘍の切除前にKRAS阻害剤を投与することを含む以前の治療を受けた。

【0048】

いくつかの実施形態では、対象は、外科的切除の前にKRAS阻害剤を投与することを含む以前の治療を受けた。

【0049】

いくつかの実施形態では、対象は、がんの切除前にKRAS阻害剤を投与することを含

10

20

30

40

50

む以前の治療を受けた。

【0050】

いくつかの実施形態では、以前の治療は、ソトラシブもしくはアダグラシブ、またはその薬学的に許容される塩を、約500～1500mgの用量で投与することを含む。

【0051】

いくつかの実施形態では、ソトラシブは、約960mgの用量で投与された。

【0052】

いくつかの実施形態では、アダグラシブは、約600mgの用量で投与された。

【0053】

いくつかの実施形態では、以前の治療は、ソトラシブもしくはアダグラシブ、またはその薬学的に許容される塩を1日2回投与することを含む。

10

【0054】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのKRAS阻害剤は、治療上有効な投与量の第3のTIL集団と同時に投与される。

【0055】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのKRAS阻害剤の投与は、治療上有効な投与量の第3のTIL集団の投与後に維持される。

【0056】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのKRAS阻害剤は、治療上有効な投与量の第3のTIL集団を投与した後に投与される。

20

【0057】

いくつかの実施形態では、対象は、治療上有効な投与量の第3のTIL集団を投与してから少なくとも1週間後に、少なくとも1つのKRAS阻害剤を投与される。

【0058】

いくつかの実施形態では、患者はまた、治療上有効な投与量の第3のTIL集団を投与する前に、少なくとも1つのKRAS阻害剤を投与された。

【0059】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのKRAS阻害剤は、治療上有効な投与量の第3のTIL集団と同時に投与されない。

【0060】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのKRAS阻害剤は、約500～1500mgの用量で投与される、ソトラシブもしくはアダグラシブ、またはその薬学的に許容される塩を含む。

30

【0061】

いくつかの実施形態では、ソトラシブは、約960mgの用量で投与される。

【0062】

いくつかの実施形態では、アダグラシブは、約600mgの用量で投与される。

【0063】

いくつかの実施形態では、ソトラシブまたはアダグラシブは、1日2回投与される。

【0064】

いくつかの実施形態では、がんは、神経膠芽細胞腫（GBM）、胃腸癌、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、子宮内膜癌、胆管癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、腎癌、腎細胞癌、多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、急性リンパ球性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、及びマントル細胞リンパ腫からなる群から選択される。

40

【0065】

いくつかの実施形態では、がんは、皮膚黒色腫、眼黒色腫、ブドウ膜黒色腫、及び結膜悪性黒色腫からなる群から選択される。

50

【0066】

いくつかの実施形態では、がんは、多形黄色星細胞腫、胚芽異形成神経上皮腫瘍、神経節腫、及び毛様細胞性星細胞腫からなる群から選択される。

【0067】

いくつかの実施形態では、がんは、非小細胞肺癌（NSCLC）を有する子宮内膜腺癌である。

【0068】

いくつかの実施形態では、がんは、著しい粘液分化（ECMD）を有する子宮内膜腺癌である。

【0069】

いくつかの実施形態では、がんは、甲状腺乳頭癌である。

【0070】

いくつかの実施形態では、がんは、漿液性低悪性度または境界性卵巣癌である。

【0071】

いくつかの実施形態では、がんは、有毛細胞白血病である。

【0072】

いくつかの実施形態では、がんは、ランゲルハンス細胞組織球症である。

【0073】

いくつかの実施形態では、がんは、KRASタンパク質のp.G12C変異を有するがんである。

【0074】

いくつかの実施形態では、がんは、p.G12C変異を有する非小細胞肺癌（NSCLC）である。

【0075】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、第3のTIL集団を患者に投与した後に、IL-2レジメンで患者を治療するステップを更に含む。

【0076】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、第3のTIL集団を患者に投与したのと同じ日にIL-2レジメンで患者を治療するステップを更に含む。

【0077】

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、ネムバロイキンを含む。

【0078】

いくつかの実施形態では、患者は、チェックポイント阻害剤療法を以前に受けた。

【0079】

いくつかの実施形態では、患者は、KRAS阻害剤療法を以前に受けた。

【0080】

いくつかの実施形態では、患者は、NSCLCを有する。

【0081】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）及び少なくとも1つのKRAS阻害剤の集団を投与することを含む、NSCLCの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であり、患者または対象は、少なくとも1つの前療法を受けており、少なくとも1つの前療法は、チェックポイント阻害剤療法を含む。

【0082】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団及び1つ以上のKRAS阻害剤を投与することを含む、NSCLCの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、本方法は、

（a）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

（b）第1のTIL集団を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

（c）IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1

10

20

30

40

50

の拡大を行い、第2のTIL集団を生成するステップであって、第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、第1の拡大が、約3～14日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第2のTIL集団を生成するステップと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成するステップであって、第2の拡大が、約7～14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第3のTIL集団を生成するステップと、

10

(e) ステップ(d)から取得された治療的TIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの採取されたTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移すことが、システムを開くことなく起こる、当該移すステップと、

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

(h) 1つ以上のKRAS阻害剤及び治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)における注入バッグから対象に投与するステップと、を含み、

20

患者が、少なくとも1つの前療法を受けており、少なくとも1つの前療法が、チェックポイント阻害剤療法を含む。

【0083】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、1つ以上のKRAS阻害剤及び腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、NSCLCの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であって、本方法は、

(a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得するステップと、

(b) 腫瘍断片を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

(c) IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成するステップであって、第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、第1の拡大が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第2のTIL集団を生成するステップと、

30

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成するステップであって、第2の拡大が、約7～11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第3のTIL集団を生成するステップと、

40

(e) ステップ(d)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移すことが、システムを開くことなく起こる、当該移すステップと、

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

(h) 1つ以上のKRAS阻害剤及び治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから患者に投与するステップと、を含み、

50

患者が、少なくとも1つの前療法を受けており、少なくとも1つの前療法が、チェックポイント阻害剤療法を含む。

【0084】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、1つ以上のKRAS阻害剤及び腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、NSCLCの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であって、本方法は、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 第1のTIL集団を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

(c) IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成するステップであって、第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、第1の拡大が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第2のTIL集団を生成するステップと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成するステップであって、第2の拡大が、約7～11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第3のTIL集団を生成するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移すことが、システムを開くことなく起こる、当該移すステップと、

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

(h) 1つ以上のKRAS阻害剤及び治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから患者に投与するステップと、を含み、

患者が、少なくとも1つの前療法を受けており、少なくとも1つの前療法が、チェックポイント阻害剤療法を含む。

【0085】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、1つ以上のKRAS阻害剤及び腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、NSCLCの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であって、本方法は、

(a) 任意選択的に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍から腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、患者から当該腫瘍を切除するステップであって、当該腫瘍が、第1のTIL集団を含む、当該切除するステップと、

(b) 腫瘍断片を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

(c) IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成するステップであって、第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、第1の拡大が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第2のTIL集団を生成するステップと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成するステップであって、第2の拡大が、約7～11日間行われて、第3のTIL集団を取得し

10

20

30

40

50

、第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第3のTIL集団を生成するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移すことが、システムを開くことなく起こる、当該移すステップと、

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

(h) 1つ以上のKRAS阻害剤及び治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグからNSCLCを有する患者に投与するステップと、を含み、

患者が、少なくとも1つの前療法を受けており、少なくとも1つの前療法が、チェックポイント阻害剤療法を含む。

【0086】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、1つ以上のKRAS阻害剤及び腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、NSCLCの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であって、本方法は、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 第1のTIL集団を第1の細胞培養培地と接触させるステップと、

(c) 第1の細胞培養培地中で第1のTIL集団の初期拡大(またはプライミングによる第1の拡大)を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、第2のTIL集団が、第1のTIL集団よりも数が少なくとも5倍多く、第1の細胞培養培地が、IL-2を含み、任意選択的に、プライミングによる第1の拡大が、1～8日の期間にわたって起こる、当該第2のTIL集団を取得するステップと、

(d) 第2の細胞培養培地中で第2のTIL集団の急速拡大を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、第3のTIL集団が、急速拡大の開始から7～8日後、第2のTIL集団よりも数が少なくとも50倍多く、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3(抗CD3抗体)、及び任意選択的に照射された同種異系末梢血単核細胞(PBMC)を含み、急速拡大が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択的に、第2のTIL拡大が、急速な第2の拡大の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、当該第3のTIL集団を取得するステップと、

(e) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(f) 1つ以上のKRAS阻害剤及び第3のTIL集団の治療上有効な部分をNSCLCを有する患者に投与するステップと、を含み、

患者が、少なくとも1つの前療法を受けており、少なくとも1つの前療法が、チェックポイント阻害剤療法を含む。

【0087】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、1つ以上のKRAS阻害剤及び腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、NSCLCの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であって、本方法は、

(a) 任意選択的に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍から腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、対象または患者から当該腫瘍を切除するステップであって、患者が、第1のTIL集団を含む腫瘍を以前に治療されている、当該切除するステップと、

(b) 腫瘍を、腫瘍断片に断片化するステップと、

(c) 腫瘍断片を、第1の細胞培養培地と接触させるステップと、

(d) 第1の細胞培養培地中で第1のTIL集団の初期拡大（またはプライミングによる第1の拡大）を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、第2のTIL集団が、第1のTIL集団よりも数が少なくとも5倍多く、第1の細胞培養培地が、IL-2を含み、任意選択的に、プライミングによる第1の拡大が、1～8日の期間にわたって起こる、当該第2のTIL集団を取得するステップと、

(e) 第2の細胞培養培地中で第2のTIL集団の急速拡大を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、第3のTIL集団が、急速拡大の開始から7～8日後、第2のTIL集団よりも数が少なくとも50倍多く、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、及び任意選択的に照射された同種異系末梢血単核細胞（PBMC）を含み、急速拡大が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択的に、第2のTIL拡大が、急速な第2の拡大の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または10日にわたって進行することができる、当該第3のTIL集団を取得するステップと、

(f) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(g) 1つ以上のKRAS阻害剤及び第3のTIL集団の治療上有効な部分をNSCLCを有する患者に投与するステップと、を含み、

患者または対象が、少なくとも1つの前療法を受けており、少なくとも1つの前療法が、チェックポイント阻害剤療法を含む。

【0088】

いくつかの実施形態では、NSCLCは、切除不能、転移性、KRAS阻害剤に対して耐性及び／または不応性である。

【0089】

いくつかの実施形態では、患者は、KRAS遺伝子変異を有し、

【0090】

いくつかの実施形態では、患者は、p.G12C変異を示すNSCLCを有する。

【0091】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの前療法は、KRAS阻害剤療法を更に含む。

【0092】

いくつかの実施形態では、本方法は、第3のTIL集団を患者に投与した後に、IL-2レジメンで患者を治療するステップを更に含む。

【0093】

いくつかの実施形態では、本方法は、第3のTIL集団を患者に投与したのと同じ日にIL-2レジメンで患者を治療するステップを更に含む。

【0094】

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、ネムバロイキンを含む。

【0095】

いくつかの実施形態では、本方法は、TILを患者に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで患者を治療するステップを更に含む。

【0096】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを60mg/m²/日の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを25mg/m²/日の用量で5日間投与するステップを含む。

【0097】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを60mg/m²/日の用量で、フルダラビンを25mg/m²/日の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを25mg/m²/日の用量で3日間投与するステップを含む。

【0098】

いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。

【0099】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、腫瘍切除前に、1つ以上のKRAS阻害剤で前処置された患者から切除された。

【0100】

いくつかの実施形態では、NSCLCは、切除不能、転移性、KRAS阻害剤に対して耐性及び／または不応性である。

【0101】

いくつかの実施形態では、患者または対象は、KRAS遺伝子変異を有する。

【0102】

いくつかの実施形態では、患者または対象は、p.G12C変異を示すがんを有する。

10

【0103】

いくつかの実施形態では、がんは、KRAS阻害剤で以前に治療されている。

【0104】

いくつかの実施形態では、がんは、KRAS阻害剤で以前に治療されていない。

【0105】

いくつかの実施形態では、KRAS阻害剤が、AMG-510（ソトラシブ）、AMG-510ラセミ体（ソトラシブラセミ体）、MRTX849（アダグラシブ）、JNJ-74699157／ARS-3248、JDQ443、LY3499446、LY3537982、RLY-1971／GDC-6036、BBP-454、BI 1701963、BI 1823911、mRNA-5671／V941、D-1553、BI-2852、BI-3406、ARS-1620、BAY-293、MRTX-1257、PROTAC K-Ras Degradер-1、LC-2、ARS-853、ARS-1323、ARS-1323-アルキン、ARS-1630、K-Ras G12C-IN-2、KRAS阻害剤-6、KRAS阻害剤8、KRAS阻害剤7、KRAS G12C阻害剤15、KRAS G12C阻害剤5、KRAS G12C阻害剤13、KRAS G12C阻害剤17、KRAS G12C阻害剤16、KRAS G12C阻害剤14、KRas G12C阻害剤4、KRas G12C阻害剤1、KRas G12C阻害剤3、KRas G12C阻害剤2、6H05、SAH-SOS1A TFA、KRAS阻害剤10、SAH-SOS1A、アトロバスタチン-PEG3-FITC、C6ME、CS-0115617、HY-130260、HY-135864、HY-135866、Cmpd2、CS-0115618、CS-0115620、EX-A4387、CS-0106134、HY-135865、2241719-75-3、HY-125873、CS-0046138、CS-0046137、CS-0101474、HY-125875、CS-0102608、CS-0102610、CS-0102606、HY-112493、CS-0046139、1- {4- [6-クロロ-8-フルオロ-7- (5-メチル-1h-インダゾール-4-イル) キナゾリン-4-イル] ピペラジン-1-イル} プロパン-1-オン、HY-126292、HY-112491、CS-0046136、HY-114168、HY-125874、HY-112494、CS-0102607、BCP29475 | 2206735-61-5、HY-112492、CS-0078097、2158296-45-6、HY-125872、及び2158297-63-1、ならびにそれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される。

20

30

40

【0106】

いくつかの実施形態では、KRAS阻害剤は、AMG-510（ソトラシブ）、AMG-510ラセミ体（ソトラシブラセミ体）、及びMRTX849（アダグラシブ）からなる群から選択される。

【0107】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、

(a) メルファランを含む骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで患者を治療することと

、

50

(b) 腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の集団及び 1 つ以上の K R A S 阻害剤を投与することと、

(c) TIL の集団の投与後に IL-2 レジメンで患者を治療することであって、患者または対象が、がんを有する、当該治療することと、を含む。

【0108】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の集団及び 1 つ以上の K R A S 阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であり、本方法は、

(a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、当該患者から切除された腫瘍から第 1 の TIL 集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 第 1 の TIL 集団を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

(c) IL-2 を含む細胞培養培地中で第 1 の TIL 集団を培養することによって第 1 の拡大を行い、第 2 の TIL 集団を生成するステップであって、第 1 の拡大が、第 1 のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、第 1 の拡大が、約 3 ～ 14 日間行われて、第 2 の TIL 集団を取得し、ステップ (b) からステップ (c) への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第 2 の TIL 集団を生成するステップと、

(d) 第 2 の TIL 集団の細胞培養培地を追加の IL-2、O K T-3、及び抗原提示細胞 (A P C) で補充することによって第 2 の拡大を行い、第 3 の TIL 集団を生成するステップであって、第 2 の拡大が、約 7 ～ 14 日間行われて、第 3 の TIL 集団を取得し、第 3 の TIL 集団が、治療的 TIL 集団であり、第 2 の拡大が、第 2 のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ (c) からステップ (d) への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第 3 の TIL 集団を生成するステップと、

(e) ステップ (d) から取得された治療的 TIL 集団を採取するステップであって、ステップ (d) からステップ (e) への移行が、システムを開くことなく起こる、当該採取するステップと、

(f) ステップ (e) からの採取された TIL 集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ (e) から (f) への移すことが、システムを開くことなく起こる、当該移すステップと、

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

(h) 1 つ以上の K R A S 阻害剤及び治療上有効な投与量の第 3 の TIL 集団を、ステップ (g) の注入バッグから患者に投与するステップと、

(i) TIL 集団の投与後に IL-2 レジメンで患者を治療するステップと、を含み、治療上有効な投与量の第 3 の TIL 集団を患者に投与する前に、当該患者が、メルファランを含む骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで治療され、

当該患者が、がんを有する。

【0109】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の集団及び 1 つ以上の K R A S 阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であり、本方法は、

(a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、当該患者から切除された腫瘍から第 1 の TIL 集団を取得するステップと、

(b) 腫瘍断片を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

(c) IL-2 を含む細胞培養培地中で第 1 の TIL 集団を培養することによって第 1 の拡大を行い、第 2 の TIL 集団を生成するステップであって、第 1 の拡大が、第 1 のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、第 1 の拡大が、約 3 ～ 11 日間行われて、第 2 の TIL 集団を取得し、ステップ (b) からステップ (c) への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第 2 の TIL 集団を生成するステップと、

(d) 第 2 の TIL 集団の細胞培養培地を追加の IL-2、O K T-3、及び抗原提示細胞 (A P C) で補充することによって第 2 の拡大を行い、第 3 の TIL 集団を生成する

ステップであって、第2の拡大が、約7～11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第3のTIL集団を生成するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移すことが、システムを開くことなく起こる、当該移すステップと、

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

(h) 1つ以上のKRAS阻害剤及び治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから患者に投与するステップと、

(i) TIL集団の投与後にIL-2レジメンで患者を治療するステップと、を含み、治療上有効な投与量の第3のTIL集団を患者に投与する前に、当該患者が、メルファランを含む骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで治療され、

当該患者が、がんを有する。

【0110】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団及び1つ以上のKRAS阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であり、本方法は、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 第1のTIL集団を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

(c) IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成するステップであって、第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、第1の拡大が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第2のTIL集団を生成するステップと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成するステップであって、第2の拡大が、約7～11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第3のTIL集団を生成するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移すことが、システムを開くことなく起こる、当該移すステップと、

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

(h) 1つ以上のKRAS阻害剤及び治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから患者に投与するステップと、

(i) TIL集団の投与後にIL-2レジメンで患者を治療するステップと、を含み、治療上有効な投与量の第3のTIL集団を患者に投与する前に、当該患者が、メルファランを含む骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで治療され、

10

20

30

40

50

当該患者が、がんを有する。

【0111】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団及び1つ以上のKRAS阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であり、本方法は、

（a）任意選択的に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍から腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、対象または患者から当該腫瘍を切除するステップであって、当該腫瘍が、第1のTIL集団を含む、当該切除するステップと、

（b）腫瘍断片を閉鎖されたシステムに付加するステップと、

10

（c）IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成するステップであって、第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、第1の拡大が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ（b）からステップ（c）への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第2のTIL集団を生成するステップと、

（d）第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成するステップであって、第2の拡大が、約7～11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ（c）からステップ（d）への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第3のTIL集団を生成するステップと、

20

（e）ステップ（d）から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、システムを開くことなく起こる、当該採取するステップと、

（f）ステップ（e）からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（e）から（f）への移すことが、システムを開くことなく起こる、当該移すステップと、

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

（h）1つ以上のKRAS阻害剤及び治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ（g）における注入バッグからがんを有する対象または患者に投与するステップと、を含み、

30

（i）TIL集団の投与後にIL-2レジメンで患者を治療するステップと、を含み、治療上有効な投与量の第3のTIL集団を患者に投与する前に、当該患者が、メルファランを含む骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで治療され、

当該患者が、がんを有する。

【0112】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団及び1つ以上のKRAS阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であり、本方法は、

40

（a）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

（b）第1のTIL集団を第1の細胞培養培地と接触させるステップと、

（c）第1の細胞培養培地中で第1のTIL集団の初期拡大（またはプライミングによる第1の拡大）を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、第1の細胞培養培地が、IL-2を含み、任意選択的に、プライミングによる第1の拡大が、1～8日の期間にわたって起こる、当該第2のTIL集団を取得するステップと、

（d）第2の細胞培養培地中で第2のTIL集団の急速拡大を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3

50

抗体)、及び任意選択的に、照射された同種異系末梢血単核細胞(PBMC)を含み、急速拡大が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択的に、第2のTIL拡大が、急速な第2の拡大の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、当該第3のTIL集団を取得するステップと、

(e) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(f) 第3のTIL集団の治療上有効な部分をがんを有する対象または患者に投与するステップと、

(g) 第3のTIL集団の治療上有効な部分を投与した後に、IL-2レジメンで患者を治療するステップと、を含み、

第3のTIL集団の治療上有効な部分を患者に投与する前に、患者が、メルファランを含む骨髓非破壊的リンパ球枯渇レジメンで治療され、

当該患者が、がんを有する。

【0113】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団及び1つ以上のKRAS阻害剤を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であり、本方法は、

(a) 任意選択的に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍から腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、患者から当該腫瘍を切除するステップであって、当該患者が、第1のTIL集団を含む腫瘍を以前に治療されている、当該切除するステップと、

(b) 腫瘍を、腫瘍断片に断片化するステップと、

(c) 腫瘍断片を、第1の細胞培養培地と接触させるステップと、

(d) 第1の細胞培養培地中で第1のTIL集団の初期拡大(またはプライミングによる第1の拡大)を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、第1の細胞培養培地が、IL-2を含み、任意選択的に、プライミングによる第1の拡大が、1~8日の期間にわたって起こる、当該第2のTIL集団を取得するステップと、

(e) 第2の細胞培養培地中で第2のTIL集団の急速拡大を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3(抗CD3抗体)、及び任意選択的に、照射された同種異系末梢血単核細胞(PBMC)を含み、急速拡大が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択的に、第2のTIL拡大が、急速な第2の拡大の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、当該第3のTIL集団を取得するステップと、

(f) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(g) 第3のTIL集団の治療上有効な部分をがんを有する対象または患者に投与するステップと、

(h) 第3のTIL集団の治療上有効な部分を投与した後に、IL-2レジメンで患者を治療するステップと、を含み、

第3のTIL集団の治療上有効な部分を患者に投与する前に、患者が、メルファランを含む骨髓非破壊的リンパ球枯渇レジメンで治療され、

当該患者が、がんを有する。

【0114】

いくつかの実施形態では、メルファランは、約100mg/m²の用量で2日間連続して静脈内投与される。

【0115】

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、TIL集団の投与後14日間まで毎日低用量のIL-2を投与することを含む。

【0116】

いくつかの実施形態では、第2のTIL集団は、第1のTIL集団よりも数が少なくとも50倍多い。

【0117】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、がんは、神経膠芽細胞腫（GBM）、胃腸癌、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、子宮内膜癌、胆管癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、腎癌、腎細胞癌、多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、急性リンパ球性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、及びマントル細胞リンパ腫からなる群から選択される。

【0118】

いくつかの実施形態では、がんは、皮膚黒色腫、眼黒色腫、ブドウ膜黒色腫、及び結膜悪性黒色腫からなる群から選択される。

【0119】

いくつかの実施形態では、がんは、多形黄色星細胞腫、胚芽異形成神経上皮腫瘍、神経節膠腫、及び毛様細胞性星細胞腫からなる群から選択される。

【0120】

いくつかの実施形態では、がんは、非小細胞肺癌（NSCLC）を有する子宮内膜腺癌である。

【0121】

いくつかの実施形態では、がんは、著しい粘液分化（ECMD）を有する子宮内膜腺癌である。

【0122】

いくつかの実施形態では、がんは、甲状腺乳頭癌である。

【0123】

いくつかの実施形態では、がんは、漿液性低悪性度または境界性卵巣癌である。

【0124】

いくつかの実施形態では、がんは、有毛細胞白血病である。

【0125】

いくつかの実施形態では、がんは、ランゲルハンス細胞組織球症である。

【0126】

いくつかの実施形態では、がんは、KRASタンパク質のp.G12C変異を有するがんである。

【0127】

いくつかの実施形態では、がんは、p.G12C変異を有する非小細胞肺癌（NSCLC）である。

【0128】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、腫瘍切除前に、1つ以上のKRAS阻害剤で前処置された患者から切除された。

【0129】

いくつかの実施形態では、NSCLCは、切除不能、転移性、KRAS阻害剤に対して耐性及び／または不応性である。

【0130】

いくつかの実施形態では、患者または対象は、KRAS遺伝子変異を有する。

【0131】

いくつかの実施形態では、患者または対象は、p.G12C変異を示すがんを有する。

【0132】

いくつかの実施形態では、がんは、KRAS阻害剤で以前に治療されている。

【0133】

いくつかの実施形態では、がんは、KRAS阻害剤で以前に治療されていない。

【0134】

いくつかの実施形態では、KRAS阻害剤が、AMG-510（ソトラシブ）、AMG-510ラセミ体（ソトラシブラセミ体）、MRTX849（アダグラシブ）、JNJ-

10

20

30

40

50

7 4 6 9 9 1 5 7 / A R S - 3 2 4 8、J D Q 4 4 3、L Y 3 4 9 9 4 4 6、L Y 3 5 3
7 9 8 2、R L Y - 1 9 7 1 / G D C - 6 0 3 6、B B P - 4 5 4、B I 1 7 0 1 9 6
3、B I 1 8 2 3 9 1 1、m R N A - 5 6 7 1 / V 9 4 1、D - 1 5 5 3、B I - 2 8
5 2、B I - 3 4 0 6、A R S - 1 6 2 0、B A Y - 2 9 3、M R T X - 1 2 5 7、P R
O T A C K - R a s D e g r a d e r - 1、L C - 2、A R S - 8 5 3、A R S - 1
3 2 3、A R S - 1 3 2 3 - ア ル キ ン、A R S - 1 6 3 0、K - R a s G 1 2 C - I N
- 2、K R A S 阻 害 剤 - 6、K R A S 阻 害 剤 8、K R A S 阻 害 剤 7、K R A S G 1 2 C
阻 害 剤 1 5、K R A S G 1 2 C 阻 害 剤 5、K R A S G 1 2 C 阻 害 剤 1 3、K R A S
G 1 2 C 阻 害 剤 1 7、K R A S G 1 2 C 阻 害 剤 1 6、K R A S G 1 2 C 阻 害 剤 1 4、
K R a s G 1 2 C 阻 害 剤 4、K R a s G 1 2 C 阻 害 剤 1、K R a s G 1 2 C 阻 害 剤
3、K R a s G 1 2 C 阻 害 剤 2、6 H 0 5、S A H - S O S 1 A T F A、K R A S 阻
害 剤 1 0、S A H - S O S 1 A、ア ト ロ バ ス タ チ ン - P E G 3 - F I T C、C 6 M E、C
S - 0 1 1 5 6 1 7、H Y - 1 3 0 2 6 0、H Y - 1 3 5 8 6 4、H Y - 1 3 5 8 6 6、
C m p d 2、C S - 0 1 1 5 6 1 8、C S - 0 1 1 5 6 2 0、E X - A 4 3 8 7、C S -
0 1 0 6 1 3 4、H Y - 1 3 5 8 6 5、2 2 4 1 7 1 9 - 7 5 - 3、H Y - 1 2 5 8 7 3
、C S - 0 0 4 6 1 3 8、C S - 0 0 4 6 1 3 7、C S - 0 1 0 1 4 7 4、H Y - 1 2 5
8 7 5、C S - 0 1 0 2 6 0 8、C S - 0 1 0 2 6 1 0、C S - 0 1 0 2 6 0 6、H Y -
1 1 2 4 9 3、C S - 0 0 4 6 1 3 9、1 - { 4 - [6 - ク ロ ロ - 8 - フ ル オ ロ - 7 - (5 -
メ チ ル - 1 h - イ ン ダ ザ ソ ル - 4 - イ ル) キ ナ ゾ リ ン - 4 - イ ル] ピ ペ ラ ジ ン - 1 -
イ ル } プ ロ パ ン - 1 - オ ン、H Y - 1 2 6 2 9 2、H Y - 1 1 2 4 9 1、C S - 0 0 4 6
1 3 6、H Y - 1 1 4 1 6 8、H Y - 1 2 5 8 7 4、H Y - 1 1 2 4 9 4、C S - 0 1 0
2 6 0 7、B C P 2 9 4 7 5 | 2 2 0 6 7 3 5 - 6 1 - 5、H Y - 1 1 2 4 9 2、C S -
0 0 7 8 0 9 7、2 1 5 8 2 9 6 - 4 5 - 6、H Y - 1 2 5 8 7 2、及 び 2 1 5 8 2 9 7
- 6 3 - 1、な ら び に そ れ ら の 薬 学 的 に 許 容 さ れ る 塩 か ら な る 群 か ら 選 択 さ れ る。

10

20

30

40

50

【0135】

いくつかの実施形態では、K R A S 阻 害 剤 は、A M G - 5 1 0 (ソトラシブ)、A M G
- 5 1 0 ラセミ体 (ソトラシブラセミ体)、及び M R T X 8 4 9 (アダグラシブ) からな
る群から選択される。

【0136】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を
治療的 T I L 集団に拡大する方法であって、本方法は、

(a) 対象または患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによっ
て、対象または患者から切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を取得及び / または受容す
ることであって、対象または患者が、少なくとも 1 つの K R A S 阻 害 剤 で以前に治療され
ている、当該取得及び / または受容することと、

(b) 第 1 の T I L 集団を閉鎖されたシステムに付加することと、

(c) I L - 2 を含む細胞培養培地中で第 1 の T I L 集団を培養することによって第 1
の拡大を行い、第 2 の T I L 集団を生成することであって、第 1 の拡大が、第 1 のガス透
過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、第 1 の拡大が、約 3 ~ 1 4 日間行われ
て、第 2 の T I L 集団を取得し、ステップ (b) からステップ (c) への移行が、システ
ムを開くことなく起こる、当該第 2 の T I L 集団を生成することと、

(d) 第 2 の T I L 集団の細胞培養培地を追加の I L - 2、O K T - 3、及び抗原提示
細胞 (A P C) で補充することによって第 2 の拡大を行い、第 3 の T I L 集団を生成する
ことであって、第 2 の拡大が、約 7 ~ 1 4 日間行われて、第 3 の T I L 集団を取得し、第
3 の T I L 集団が、治療的 T I L 集団であり、第 2 の拡大が、第 2 のガス透過性表面積を
提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ (c) からステップ (d) への移行が、シ
ステムを開くことなく起こる、当該第 3 の T I L 集団を生成することと、

(e) ステップ (d) から取得された治療的 T I L 集団を採取することであって、ステ
ップ (d) からステップ (e) への移行が、システムを開くことなく起こる、当該採取す
ることと、

(f) ステップ (e) からの採取された T I L 集団を注入バッグに移すことであって、ステップ (e) から (f) への移すことが、システムを開くことなく起こる、当該移すことと、

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

【0137】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を治療的 T I L 集団に拡大する方法であって、本方法は、

(a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を取得することであって、当該対象が、少なくとも 1 つの K R A S 阻害剤で以前に治療されている、当該第 1 の T I L 集団を取得することと、

(b) 腫瘍断片を閉鎖されたシステムに付加することと、

(c) I L - 2 を含む細胞培養培地中で第 1 の T I L 集団を培養することによって第 1 の拡大を行って、第 2 の T I L 集団を生成することであって、第 1 の拡大が、第 1 のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、第 1 の拡大が、約 3 ~ 1 1 日間行われて、第 2 の T I L 集団を取得し、第 2 の T I L 集団が、第 1 の T I L 集団よりも数が少なくとも 5 0 倍多く、ステップ (b) からステップ (c) への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第 2 の T I L 集団を生成することと、

(d) 第 2 の T I L 集団の細胞培養培地を追加の I L - 2、O K T - 3、及び抗原提示細胞 (A P C) で補充することによって第 2 の拡大を行い、第 3 の T I L 集団を生成することであって、第 2 の拡大が、約 7 ~ 1 1 日間行われて、第 3 の T I L 集団を取得し、第 2 の拡大が、第 2 のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ (c) からステップ (d) への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第 3 の T I L 集団を生成することと、

(e) ステップ (d) から取得された第 3 の T I L 集団を採取することであって、ステップ (d) からステップ (e) への移行が、システムを開くことなく起こる、当該採取することと、

(f) ステップ (e) からの採取された第 3 の T I L 集団を注入バッグに移すことであって、ステップ (e) から (f) への移すことが、システムを開くことなく起こる、当該移すことと、

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

【0138】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を治療的 T I L 集団に拡大する方法であって、本方法は、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象からの腫瘍細胞と T I L 細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第 1 の T I L 集団を取得及び／または受容することであって、対象または患者が、少なくとも 1 つの K R A S 阻害剤で以前に治療されている、第 1 の T I L 集団を取得及び／または受容することと、

(b) 第 1 の T I L 集団を閉鎖されたシステムに付加することと、

(c) I L - 2 を含む細胞培養培地中で第 1 の T I L 集団を培養することによって第 1 の拡大を行い、第 2 の T I L 集団を生成することであって、第 1 の拡大が、第 1 のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、第 1 の拡大が、約 3 ~ 1 1 日間行われて、第 2 の T I L 集団を取得し、ステップ (b) からステップ (c) への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第 2 の T I L 集団を生成することと、

(d) 第 2 の T I L 集団の細胞培養培地を追加の I L - 2、O K T - 3、及び抗原提示細胞 (A P C) で補充することによって第 2 の拡大を行い、第 3 の T I L 集団を生成することであって、第 2 の拡大が、約 7 ~ 1 1 日間行われて、第 3 の T I L 集団を取得し、第

2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第3のTIL集団を生成することと、

(e)ステップ(d)から取得された第3のTIL集団を採取することであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該採取することと、

(f)ステップ(e)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ(e)から(f)への移すことが、システムを開くことなく起こる、当該移すことと、

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

10

【0139】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡大する方法であって、本方法は、

(a)任意選択的に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または当該腫瘍から腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、対象または患者から腫瘍を切除することであって、当該腫瘍が、第1のTIL集団を含み、当該対象または患者が、少なくとも1つのKRAS阻害剤で以前に治療されている、当該切除することと、

(b)腫瘍断片を閉鎖されたシステムに付加することと、

20

(c)IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成することであって、第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、第1の拡大が、約3~11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第2のTIL集団を生成することと、

(d)第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成することであって、第2の拡大が、約7~11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第3のTIL集団を生成することと、

30

(e)ステップ(d)から取得された第3のTIL集団を採取することであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該採取することと、

(f)ステップ(e)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ(e)から(f)への移すことが、システムを開くことなく起こる、当該移すことと、

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

【0140】

40

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡大する方法であって、本方法は、

(a)外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容することであって、当該対象または当該患者が、少なくとも1つのKRAS阻害剤で以前に治療されている、当該第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(c)第1のTIL集団を第1の細胞培養培地と接触させることと、

(d)第1の細胞培養培地中で第1のTIL集団の初期拡大(またはプライミングによる第1の拡大)を行い、第2のTIL集団を取得することであって、第1の細胞培養培地

50

が、IL-2を含み、任意選択的に、プライミングによる第1の拡大が、1～8日の期間にわたって起こる、当該第2のTIL集団を取得することと、

(e) 第2の細胞培養培地中で第2のTIL集団の急速拡大を行い、第3のTIL集団を取得することであって、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、及び任意選択的に、照射された同種異系末梢血単核細胞（PBMC）を含み、急速拡大が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択的に、第2のTIL拡大が、急速な第2の拡大の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、当該第3のTIL集団を取得することと、

(f) 第3のTIL集団を採取することと、を含む。

【0141】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡大する方法であって、本方法は、

(a) 任意選択的に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍から腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、対象または患者から当該腫瘍を切除することであって、当該対象または当該患者が、少なくとも1つのKRAS阻害剤で以前に治療されている、当該切除することと、

(b) 腫瘍を、腫瘍断片に断片化することと、

(c) 腫瘍断片を、第1の細胞培養培地と接触させることと、

(d) 第1の細胞培養培地中で第1のTIL集団の初期拡大（またはプライミングによる第1の拡大）を行い、第2のTIL集団を取得することであって、第2のTIL集団が、第1のTIL集団よりも数が少なくとも5倍多く、第1の細胞培養培地が、IL-2を含み、任意選択的に、プライミングによる第1の拡大が、1～8日の期間にわたって起こる、当該第2のTIL集団を取得することと、

(e) 第2の細胞培養培地中で第2のTIL集団の急速拡大を行い、第3のTIL集団を取得することであって、第3のTIL集団が、急速拡大の開始から7～8日後、第2のTIL集団よりも数が少なくとも50倍多く、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、及び任意選択的に照射された同種異系末梢血単核細胞（PBMC）を含み、急速拡大が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択的に、第2のTIL拡大が、急速な第2の拡大の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、当該第3のTIL集団を取得することと、

(f) 第3のTIL集団を採取することと、を含む。

【0142】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるのは、対象または患者から切除された腫瘍からのTILの集団を拡大することによって取得可能な腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の拡大された集団であり、腫瘍の切除の前に、対象または患者は、少なくとも1つのKRAS阻害剤で治療されている。

【0143】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、本明細書で提供される拡大方法によって取得可能な腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の拡大された集団である。

【0144】

いくつかの実施形態では、本開示は、がんを治療するための少なくとも1つのKRAS阻害剤と組み合わせて使用するための医薬品の製造における腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団の使用を提供する。

【0145】

いくつかの実施形態では、本開示は、がんを治療するための少なくとも1つのKRAS阻害剤と組み合わせて使用するための医薬品の製造における腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団の使用を提供する。

【0146】

いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団の使用を提供

10

20

30

40

50

し、T I L は、がんを治療するための少なくとも 1 つの K R A S 阻害剤と組み合わせて使用するための医薬品の製造において、本明細書に記載の方法のうちのいずれかに従って拡大される。

【図面の簡単な説明】

【0147】

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

【図2 A】T I L 製造のための G e n 2（プロセス 2 A）の実施形態のプロセスフローチャート。

【図2 B】T I L 製造のための G e n 2（プロセス 2 A）の実施形態のプロセスフローチャート。

【図2 C】T I L 製造のための G e n 2（プロセス 2 A）の実施形態のプロセスフローチャート。

【図3】凍結保存された T I L の例示的な製造プロセス（約 22 日）の実施形態のダイアグラムを示す。

【図4】T I L 製造のための 22 日プロセスである、G e n 2（プロセス 2 A）の実施形態のダイアグラムを示す。

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

【図6】T I L 製造のためのプロセス 1 C の実施形態と G e n 2（プロセス 2 A）の実施形態との詳細な比較。

【図7】例示的な G e n 3 型 T I L 製造プロセス。

【図8 A】T I L 製造のための 2 A プロセス（およそ 22 日プロセス）と G e n 3 プロセス（およそ 14 日～16 日プロセス）の実施形態との比較を示す。

【図8 B】ステップ A ～ F の概要を提供する例示的なプロセス G e n 3 チャート（およそ 14 日～16 日プロセス）。

【図8 C】3 つのプロセスバリエーションの各々について、ステップ A ～ F（およそ 14 日～16 日プロセス）の概要とともに 3 つの例示的な G e n 3 プロセスを提供するチャート。

【図8 D】ステップ A ～ F の概要を提供する例示的な修正 G e n 2 様プロセス（およそ 22 日プロセス）。

【図9】G e n 2（プロセス 2 A）と G e n 3 プロセスとの比較のための実験フローチャートを提供する。

【図10】様々な G e n 2（プロセス 2 A）と G e n 3 . 1 プロセス実施形態との比較を示す。

【図11】G e n 2、G e n 2 . 1 及び G e n 3 . 0 プロセスの実施形態の様々な特徴を説明する表。

【図12】G e n 3 . 1 と称される、G e n 3 プロセスの実施形態のための培地条件の概要。

【図13】G e n 2、G e n 2 . 1 及び G e n 3 . 0 プロセスの実施形態の様々な特徴を説明する表。

【図14】G e n 2 及び G e n 3 . 0 プロセスの実施形態の様々な特徴を比較する表。

【図15】記載された拡大プロセスの様々な実施形態における培地の使用を提供する表。

【図16】G e n 3 プロセス（16 日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。

【図17】G e n 3 拡大プラットフォームを使用して造血器悪性腫瘍から T 細胞を拡大するための方法の例示的な実施形態の概略図。

【図18】構造 I - A 及び I - B を提供する。円筒は、個々のポリペプチド結合ドメインを指す。構造 I - A 及び I - B は、例えば、4 - 1 B B L または 4 - 1 B B に結合する抗体に由来する 3 つの直線的に連結された T N F R S F 結合ドメインを含み、これらが折り重なって三価タンパク質を形成し、その後、これが I g G 1 - F c（C H 3 及び C H 2 ドメインを含む）によって第 2 の三価タンパク質に連結され、その後、これを使用して、三

10

20

30

40

50

価タンパク質のうちの2つをジスルフィド結合（小さく長細い楕円）によって一緒に連結し、構造を安定化し、6つの受容体及びシグナル伝達タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを一緒にして、シグナル伝達複合体を形成することができるアゴニストを提供する。円筒として示されるTNFRSF結合ドメインは、例えば、親水性残基ならびに柔軟性のためのGly及びSer配列、ならびに溶解性のためのGlu及びLysを含み得るリンカーによって結合されたV_H鎖及びV_L鎖を含む、scFvドメインであり得る。

【図19】Gen3プロセス（16日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。

【図20】Gen3.1プロセス（16日プロセス）の例示的な実施形態のプロセス概要を提供する。

【図21】Gen3.1試験プロセス（16～17日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。 10

【図22】Gen3プロセス（16日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。

【図23】例示的なGen2プロセス及び例示的なGen3プロセスの比較表。

【図24】Gen3プロセス（16～17日プロセス）の調製タイムラインの例示的な実施形態の概略図。

【図25】Gen3プロセス（14～16日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。

【図26A】Gen3プロセス（16日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。

【図26B】Gen3プロセス（16日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。

【図27】Gen3プロセス（16日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。

【図28】Gen2、Gen2.1、及びGen3プロセス（16日プロセス）の実施形態の比較。 20

【図29】Gen2、Gen2.1、及びGen3プロセス（16日プロセス）の実施形態の比較。

【図30】Gen3実施形態の構成要素。

【図31】Gen3実施形態のフローチャート比較（Gen3.0、Gen3.1対照、Gen3.1試験）。

【図32】Gen3プロセス（16～17日プロセス）の例示的な実施形態の構成要素が示される。

【図33】承認基準表。

【図34】研究設計コホート1のダイアグラム。コホート1：KRAS p. G12C阻 30
害剤は、ナイーブであり、STK11またはCDKN2A/B＋低発現の甲状腺転写因子
-1（TTF-1）による共変異を有する：患者は、TIL切除前に、KRAS p. G
12C阻害剤（ソトラシブ 960mg 経口、1日1回またはアダグラシブ 600m
g 経口、1日2回）で3～4週間前処置される。患者は、TIL切除後及びNMA LD
の開始まで、KRAS p. G12C阻害剤を再開する。その後、進行または毒性まで、
TIL注入から3～4週間後に、再開する。図は、5日間のレジメンとしてNMA-LD
を示す。7日間のレジメンは、以下である：NMA-LDレジメンは、-7日目及び6日
目のメスナ（現場の標準治療またはUSPI/SmPC毎）を伴う2日間の静脈内（IV）
シクロホスファミド（60mg/kg）、及び5日間のフルダラビンIV（25mg/m²、
-5日目～1日目）で構成される。 40

【図35】研究設計コホート2のダイアグラム。コホート2：KRAS p. G12C阻
害剤は、前処置され、STK11またはCDKN2A/B＋低発現の甲状腺転写因子-1
（TTF-1）による共変異を有する：患者は、進行または毒性まで、TIL注入から3
～4週間後に、KRAS p. G12C阻害剤（ソトラシブ 960mg 経口、1日1
回またはアダグラシブ 600mg 経口、1日2回）を再開する。図は、5日間のレジ
メンとしてNMA-LDを示す。7日間のレジメンは、以下である：NMA-LDレジ
メンは、-7日目及び-6日目のメスナ（現場の標準治療またはUSPI/SmPC毎）を
伴う2日間の静脈内（IV）シクロホスファミド（60mg/kg）、及び5日間のフル
ダラビンIV（25mg/m²、-5日目～-1日目）で構成される。

【図36】研究設計コホート3のダイアグラム。コホート3：KRAS p. G12C阻 50

害剤は、ナイーブであり、TP53と共変異を有する：患者は、TIL切除後及びNMA LDの開始まで、KRAS p. G12C阻害剤（ソトラシブ 960mg 経口、1日1回またはアダグラシブ 600mg 経口、1日2回）を開始する。その後、進行または毒性まで、TIL注入から3～4週間後に、再開する。以下の図は、5日間のレジメンとしてNMA-LDを示す。7日間のレジメンは、以下である：NMA-LDレジメンは、-7日目及び-6日目のメスナ（現場の標準治療またはUSPI/SmpC毎）を伴う2日間の静脈内（IV）シクロホスファミド（60mg/kg）、及び5日間のフルダラビンIV（25mg/m²、-5日目～-1日目）で構成される。

【図37】研究設計コホート4のダイアグラム。コホート4：KRAS p. G12C阻害剤は、前処置され、TP53と共変異を有する：患者は、進行または毒性まで、TIL注入から3～4週間後に、KRAS p. G12C阻害剤（ソトラシブ 960mg 経口、1日1回またはアダグラシブ 600mg 経口、1日2回）を再開する。以下の図は、5日間のレジメンとしてNMA-LDを示す。7日間のレジメンは、以下である：NMA LDレジメンは、-7日目及び6日目のメスナ（現場の標準治療またはUSPI/SmpC毎）を伴う2日間の静脈内（IV）シクロホスファミド（60mg/kg）、及び5日間のフルダラビンIV（25mg/m²、-5日目～1日目）で構成される。

10

【0148】

配列表の簡単な説明

配列番号1は、ムロモナブの重鎖のアミノ酸配列である。

【0149】

配列番号2は、ムロモナブの軽鎖のアミノ酸配列である。

20

【0150】

配列番号3は、組換えヒトIL-2タンパク質のアミノ酸配列である。

【0151】

配列番号4は、アルデスロイキンのアミノ酸配列である。

【0152】

配列番号5は、IL-2形態である。

【0153】

配列番号6は、ネムバロイキンアルファのアミノ酸配列である。

【0154】

配列番号7は、IL-2形態である。

30

【0155】

配列番号8は、ムチンドメインポリペプチドである。

【0156】

配列番号9は、組換えヒトIL-4タンパク質のアミノ酸配列である。

【0157】

配列番号10は、組換えヒトIL-7タンパク質のアミノ酸配列である。

【0158】

配列番号11は、組換えヒトIL-15タンパク質のアミノ酸配列である。

【0159】

配列番号12は、組換えヒトIL-21タンパク質のアミノ酸配列である。

40

【0160】

配列番号13は、IL-2配列である。

【0161】

配列番号14は、IL-2ムテイン配列である。

【0162】

配列番号15は、IL-2ムテイン配列である。

【0163】

配列番号16は、IgG. IL2R67A. H1のHCDR1__IL-2である。

【0164】

50

- 配列番号 17 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 2 である。
【 0 1 6 5 】
配列番号 18 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 3 である。
【 0 1 6 6 】
配列番号 19 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 1 _ I L - 2 カバットである。
【 0 1 6 7 】
配列番号 20 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 2 カバットである。
【 0 1 6 8 】
配列番号 21 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 3 カバットである。 10
【 0 1 6 9 】
配列番号 22 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 1 _ I L - 2 クロチアである。
【 0 1 7 0 】
配列番号 23 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 2 クロチアである。
【 0 1 7 1 】
配列番号 24 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 3 クロチアである。
【 0 1 7 2 】
配列番号 25 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 1 _ I L - 2 I M G T である。 20
【 0 1 7 3 】
配列番号 26 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 2 I M G T である。
【 0 1 7 4 】
配列番号 27 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 3 I M G T である。
【 0 1 7 5 】
配列番号 28 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の V_H 鎖である。
【 0 1 7 6 】
配列番号 29 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の重鎖である。
【 0 1 7 7 】
配列番号 30 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 1 カバットである。 30
【 0 1 7 8 】
配列番号 31 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 2 カバットである。
【 0 1 7 9 】
配列番号 32 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 3 カバットである。
【 0 1 8 0 】
配列番号 33 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 1 クロチアである。
【 0 1 8 1 】
配列番号 34 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 2 クロチアである。
【 0 1 8 2 】
配列番号 35 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 3 クロチアである。 40
【 0 1 8 3 】
配列番号 36 は、V_L 鎖である。
【 0 1 8 4 】
配列番号 37 は、軽鎖である。
【 0 1 8 5 】
配列番号 38 は、軽鎖である。
【 0 1 8 6 】
配列番号 39 は、軽鎖である。
【 0 1 8 7 】
配列番号 40 は、ヒト 4 - 1 B B のアミノ酸配列である。 50

【0188】

配列番号41は、マウス4-1BBのアミノ酸配列である。

【0189】

配列番号42は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（PF-05082566）の重鎖である。

【0190】

配列番号43は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（PF-05082566）の軽鎖である。

【0191】

配列番号44は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（PF-05082566）の重鎖可変領域（V_H）である。

【0192】

配列番号45は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（PF-05082566）の軽鎖可変領域（V_L）である。

【0193】

配列番号46は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（PF-05082566）の重鎖CDR1である。

【0194】

配列番号47は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（PF-05082566）の重鎖CDR2である。

【0195】

配列番号48は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（PF-05082566）の重鎖CDR3である。

【0196】

配列番号49は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（PF-05082566）の軽鎖CDR1である。

【0197】

配列番号50は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（PF-05082566）の軽鎖CDR2である。

【0198】

配列番号51は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（PF-05082566）の軽鎖CDR3である。

【0199】

配列番号52は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（BMS-663513）の重鎖である。

【0200】

配列番号53は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（BMS-663513）の軽鎖である。

【0201】

配列番号54は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（BMS-663513）の重鎖可変領域（V_H）である。

【0202】

配列番号55は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（BMS-663513）の軽鎖可変領域（V_L）である。

【0203】

配列番号56は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（BMS-663513）の重鎖CDR1である。

【0204】

配列番号57は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（BMS-663513）の重鎖CDR2である。

10

20

30

40

50

【0205】

配列番号58は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（BMS-663513）の重鎖CDR3である。

【0206】

配列番号59は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（BMS-663513）の軽鎖CDR1である。

【0207】

配列番号60は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（BMS-663513）の軽鎖CDR2である。

【0208】

配列番号61は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（BMS-663513）の軽鎖CDR3である。

【0209】

配列番号62は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のFcドメインである。

【0210】

配列番号63は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0211】

配列番号64は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0212】

配列番号65は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0213】

配列番号66は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0214】

配列番号67は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0215】

配列番号68は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0216】

配列番号69は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0217】

配列番号70は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0218】

配列番号71は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0219】

配列番号72は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0220】

配列番号73は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のFcドメインである。

【0221】

配列番号74は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0222】

配列番号75は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0223】

配列番号76は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0224】

配列番号77は、4-1BBリガンド（4-1BBL）アミノ酸配列である。

【0225】

配列番号78は、4-1BBLポリペプチドの可溶性部分である。

【0226】

配列番号79は、4-1BBアゴニスト抗体4B4-1-1バージョン1の重鎖可変領域（V_H）である。

【0227】

10

20

30

40

50

配列番号 80 は、4-1BB アゴニスト抗体 4B4-1-1 バージョン 1 の軽鎖可変領域 (V_L) である。

【0228】

配列番号 81 は、4-1BB アゴニスト抗体 4B4-1-1 バージョン 2 の重鎖可変領域 (V_H) である。

【0229】

配列番号 82 は、4-1BB アゴニスト抗体 4B4-1-1 バージョン 2 の軽鎖可変領域 (V_L) である。

【0230】

配列番号 83 は、4-1BB アゴニスト抗体 H39E3-2 の重鎖可変領域 (V_H) である。

【0231】

配列番号 84 は、4-1BB アゴニスト抗体 H39E3-2 の軽鎖可変領域 (V_L) である。

【0232】

配列番号 85 は、ヒト OX40 のアミノ酸配列である。

【0233】

配列番号 86 は、マウス OX40 のアミノ酸配列である。

【0234】

配列番号 87 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 タボリキシズマブ (MEDI-0562) の重鎖である。

【0235】

配列番号 88 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 タボリキシズマブ (MEDI-0562) の軽鎖である。

【0236】

配列番号 89 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 タボリキシズマブ (MEDI-0562) の重鎖可変領域 (V_H) である。

【0237】

配列番号 90 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 タボリキシズマブ (MEDI-0562) の軽鎖可変領域 (V_L) である。

【0238】

配列番号 91 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 タボリキシズマブ (MEDI-0562) の重鎖 CDR1 である。

【0239】

配列番号 92 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 タボリキシズマブ (MEDI-0562) の重鎖 CDR2 である。

【0240】

配列番号 93 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 タボリキシズマブ (MEDI-0562) の重鎖 CDR3 である。

【0241】

配列番号 94 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 タボリキシズマブ (MEDI-0562) の軽鎖 CDR1 である。

【0242】

配列番号 95 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 タボリキシズマブ (MEDI-0562) の軽鎖 CDR2 である。

【0243】

配列番号 96 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 タボリキシズマブ (MEDI-0562) の軽鎖 CDR3 である。

【0244】

配列番号 97 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 11D4 の重鎖である。

10

20

30

40

50

【 0 2 4 5 】

配列番号 9 8 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の軽鎖である。

【 0 2 4 6 】

配列番号 9 9 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の重鎖可変領域 (V_H) である。

【 0 2 4 7 】

配列番号 1 0 0 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の軽鎖可変領域 (V_L) である。

【 0 2 4 8 】

配列番号 1 0 1 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の重鎖 C D R 1 である。

10

【 0 2 4 9 】

配列番号 1 0 2 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の重鎖 C D R 2 である。

【 0 2 5 0 】

配列番号 1 0 3 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の重鎖 C D R 3 である。

【 0 2 5 1 】

配列番号 1 0 4 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の軽鎖 C D R 1 である。

20

【 0 2 5 2 】

配列番号 1 0 5 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の軽鎖 C D R 2 である。

【 0 2 5 3 】

配列番号 1 0 6 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の軽鎖 C D R 3 である。

【 0 2 5 4 】

配列番号 1 0 7 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の重鎖である。

【 0 2 5 5 】

配列番号 1 0 8 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の軽鎖である。

30

【 0 2 5 6 】

配列番号 1 0 9 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の重鎖可変領域 (V_H) である。

【 0 2 5 7 】

配列番号 1 1 0 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の軽鎖可変領域 (V_L) である。

【 0 2 5 8 】

配列番号 1 1 1 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の重鎖 C D R 1 である。

【 0 2 5 9 】

配列番号 1 1 2 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の重鎖 C D R 2 である。

40

【 0 2 6 0 】

配列番号 1 1 3 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の重鎖 C D R 3 である。

【 0 2 6 1 】

配列番号 1 1 4 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の軽鎖 C D R 1 である。

【 0 2 6 2 】

配列番号 1 1 5 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の軽鎖 C D R 2 である。

50

ある。

【0263】

配列番号116は、OX40アゴニストモノクローナル抗体18D8の軽鎖CDR3である。

【0264】

配列番号117は、OX40アゴニストモノクローナル抗体Hu119-122の重鎖可変領域(V_H)である。

【0265】

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

【0266】

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

【0267】

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

【0268】

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

【0269】

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

【0270】

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

【0271】

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

【0272】

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

【0273】

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

【0274】

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

【0275】

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

【0276】

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

【0277】

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

【0278】

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

【0279】

10

20

30

40

50

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

【0280】

配列番号 133 は、OX40 リガンド (OX40L) アミノ酸配列である。

【0281】

配列番号 134 は、OX40L ポリペプチドの可溶性部分である。

【0282】

配列番号 135 は、OX40L ポリペプチドの代替可溶性部分である。

【0283】

配列番号 136 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 008 の重鎖可変領域 (V_H) である。 10

【0284】

配列番号 137 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 008 の軽鎖可変領域 (V_L) である。

【0285】

配列番号 138 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 011 の重鎖可変領域 (V_H) である。

【0286】

配列番号 139 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 011 の軽鎖可変領域 (V_L) である。 20

【0287】

配列番号 140 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 021 の重鎖可変領域 (V_H) である。

【0288】

配列番号 141 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 021 の軽鎖可変領域 (V_L) である。

【0289】

配列番号 142 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 023 の重鎖可変領域 (V_H) である。

【0290】

配列番号 143 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 023 の軽鎖可変領域 (V_L) である。 30

【0291】

配列番号 144 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域 (V_H) である。

【0292】

配列番号 145 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域 (V_L) である。

【0293】

配列番号 146 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域 (V_H) である。 40

【0294】

配列番号 147 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域 (V_L) である。

【0295】

配列番号 148 は、ヒト化 OX40 アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域 (V_H) である。

【0296】

配列番号 149 は、ヒト化 OX40 アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域 (V_H) である。 50

【0297】

配列番号150は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。

【0298】

配列番号151は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。

【0299】

配列番号152は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。

【0300】

配列番号153は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。

【0301】

配列番号154は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。

【0302】

配列番号155は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。

【0303】

配列番号156は、OX40アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。

【0304】

配列番号157は、OX40アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。

【0305】

配列番号158は、PD-1阻害剤ニボルマブの重鎖アミノ酸配列である。

【0306】

配列番号159は、PD-1阻害剤ニボルマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【0307】

配列番号160は、PD-1阻害剤ニボルマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。

【0308】

配列番号161は、PD-1阻害剤ニボルマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。

【0309】

配列番号162は、PD-1阻害剤ニボルマブの重鎖CDR1アミノ酸配列である。

【0310】

配列番号163は、PD-1阻害剤ニボルマブの重鎖CDR2アミノ酸配列である。

【0311】

配列番号164は、PD-1阻害剤ニボルマブの重鎖CDR3アミノ酸配列である。

【0312】

配列番号165は、PD-1阻害剤ニボルマブの軽鎖CDR1アミノ酸配列である。

【0313】

配列番号166は、PD-1阻害剤ニボルマブの軽鎖CDR2アミノ酸配列である。

【0314】

配列番号167は、PD-1阻害剤ニボルマブの軽鎖CDR3アミノ酸配列である。

【0315】

配列番号168は、PD-1阻害剤ペムブロリズマブの重鎖アミノ酸配列である。

【0316】

配列番号169は、PD-1阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖アミノ酸配列である。

10

20

30

40

50

【0317】

配列番号170は、PD-1阻害剤ペムブロリズマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。

【0318】

配列番号171は、PD-1阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。

【0319】

配列番号172は、PD-1阻害剤ペムブロリズマブの重鎖CDR1アミノ酸配列である。

【0320】

配列番号173は、PD-1阻害剤ペムブロリズマブの重鎖CDR2アミノ酸配列である。

【0321】

配列番号174は、PD-1阻害剤ペムブロリズマブの重鎖CDR3アミノ酸配列である。

【0322】

配列番号175は、PD-1阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖CDR1アミノ酸配列である。

【0323】

配列番号176は、PD-1阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖CDR2アミノ酸配列である。

【0324】

配列番号177は、PD-1阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖CDR3アミノ酸配列である。

【0325】

配列番号178は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの重鎖アミノ酸配列である。

【0326】

配列番号179は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【0327】

配列番号180は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。

【0328】

配列番号181は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。

【0329】

配列番号182は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの重鎖CDR1アミノ酸配列である。

【0330】

配列番号183は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの重鎖CDR2アミノ酸配列である。

【0331】

配列番号184は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの重鎖CDR3アミノ酸配列である。

【0332】

配列番号185は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの軽鎖CDR1アミノ酸配列である。

【0333】

配列番号186は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの軽鎖CDR2アミノ酸配列である。

【0334】

10

20

30

40

50

配列番号 187 は、PD-L1 阻害剤デュルバルマブの軽鎖 CDR3 アミノ酸配列である。

【0335】

配列番号 188 は、PD-L1 阻害剤アベルマブの重鎖 アミノ酸配列である。

【0336】

配列番号 189 は、PD-L1 阻害剤アベルマブの軽鎖 アミノ酸配列である。

【0337】

配列番号 190 は、PD-L1 阻害剤アベルマブの重鎖可変領域 (V_H) アミノ酸配列である。

【0338】

配列番号 191 は、PD-L1 阻害剤アベルマブの軽鎖可変領域 (V_L) アミノ酸配列である。

【0339】

配列番号 192 は、PD-L1 阻害剤アベルマブの重鎖 CDR1 アミノ酸配列である。

【0340】

配列番号 193 は、PD-L1 阻害剤アベルマブの重鎖 CDR2 アミノ酸配列である。

【0341】

配列番号 194 は、PD-L1 阻害剤アベルマブの重鎖 CDR3 アミノ酸配列である。

【0342】

配列番号 195 は、PD-L1 阻害剤アベルマブの軽鎖 CDR1 アミノ酸配列である。

【0343】

配列番号 196 は、PD-L1 阻害剤アベルマブの軽鎖 CDR2 アミノ酸配列である。

【0344】

配列番号 197 は、PD-L1 阻害剤アベルマブの軽鎖 CDR3 アミノ酸配列である。

【0345】

配列番号 198 は、PD-L1 阻害剤アテゾリズマブの重鎖 アミノ酸配列である。

【0346】

配列番号 199 は、PD-L1 阻害剤アテゾリズマブの軽鎖 アミノ酸配列である。

【0347】

配列番号 200 は、PD-L1 阻害剤アテゾリズマブの重鎖可変領域 (V_H) アミノ酸配列である。

【0348】

配列番号 201 は、PD-L1 阻害剤アテゾリズマブの軽鎖可変領域 (V_L) アミノ酸配列である。

【0349】

配列番号 202 は、PD-L1 阻害剤アテゾリズマブの重鎖 CDR1 アミノ酸配列である。

【0350】

配列番号 203 は、PD-L1 阻害剤アテゾリズマブの重鎖 CDR2 アミノ酸配列である。

【0351】

配列番号 204 は、PD-L1 阻害剤アテゾリズマブの重鎖 CDR3 アミノ酸配列である。

【0352】

配列番号 205 は、PD-L1 阻害剤アテゾリズマブの軽鎖 CDR1 アミノ酸配列である。

【0353】

配列番号 206 は、PD-L1 阻害剤アテゾリズマブの軽鎖 CDR2 アミノ酸配列である。

【0354】

10

20

30

40

50

配列番号 207 は、PD-L1 阻害剤アテゾリズマブの軽鎖 CDR3 アミノ酸配列である。

【0355】

配列番号 208 は、CTLA-4 阻害剤イピリムマブの重鎖 アミノ酸配列である。

【0356】

配列番号 209 は、CTLA-4 阻害剤イピリムマブの軽鎖 アミノ酸配列である。

【0357】

配列番号 210 は、CTLA-4 阻害剤イピリムマブの重鎖可変領域 (V_H) アミノ酸配列である。

【0358】

配列番号 211 は、CTLA-4 阻害剤イピリムマブの軽鎖可変領域 (V_L) アミノ酸配列である。

【0359】

配列番号 212 は、CTLA-4 阻害剤イピリムマブの重鎖 CDR1 アミノ酸配列である。

【0360】

配列番号 213 は、CTLA-4 阻害剤イピリムマブの重鎖 CDR2 アミノ酸配列である。

【0361】

配列番号 214 は、CTLA-4 阻害剤イピリムマブの重鎖 CDR3 アミノ酸配列である。

【0362】

配列番号 215 は、CTLA-4 阻害剤イピリムマブの軽鎖 CDR1 アミノ酸配列である。

【0363】

配列番号 216 は、CTLA-4 阻害剤イピリムマブの軽鎖 CDR2 アミノ酸配列である。

【0364】

配列番号 217 は、CTLA-4 阻害剤イピリムマブの軽鎖 CDR3 アミノ酸配列である。

【0365】

配列番号 218 は、CTLA-4 阻害剤トレメリムマブの重鎖 アミノ酸配列である。

【0366】

配列番号 219 は、CTLA-4 阻害剤トレメリムマブの軽鎖 アミノ酸配列である。

【0367】

配列番号 220 は、CTLA-4 阻害剤トレメリムマブの重鎖可変領域 (V_H) アミノ酸配列である。

【0368】

配列番号 221 は、CTLA-4 阻害剤トレメリムマブの軽鎖可変領域 (V_L) アミノ酸配列である。

【0369】

配列番号 222 は、CTLA-4 阻害剤トレメリムマブの重鎖 CDR1 アミノ酸配列である。

【0370】

配列番号 223 は、CTLA-4 阻害剤トレメリムマブの重鎖 CDR2 アミノ酸配列である。

【0371】

配列番号 224 は、CTLA-4 阻害剤トレメリムマブの重鎖 CDR3 アミノ酸配列である。

【0372】

10

20

30

40

50

配列番号 225 は、CTL A-4 阻害剤トレメリマブの軽鎖 CDR1 アミノ酸配列である。

【0373】

配列番号 226 は、CTL A-4 阻害剤トレメリマブの軽鎖 CDR2 アミノ酸配列である。

【0374】

配列番号 227 は、CTL A-4 阻害剤トレメリマブの軽鎖 CDR3 アミノ酸配列である。

【0375】

配列番号 228 は、CTL A-4 阻害剤ザリフレリマブの重鎖 アミノ酸配列である。

10

【0376】

配列番号 229 は、CTL A-4 阻害剤ザリフレリマブの軽鎖 アミノ酸配列である。

【0377】

配列番号 230 は、CTL A-4 阻害剤ザリフレリマブの重鎖可変領域 (V_H) アミノ酸配列である。

【0378】

配列番号 231 は、CTL A-4 阻害剤ザリフレリマブの軽鎖可変領域 (V_L) アミノ酸配列である。

【0379】

配列番号 232 は、CTL A-4 阻害剤ザリフレリマブの重鎖 CDR1 アミノ酸配列である。

20

【0380】

配列番号 233 は、CTL A-4 阻害剤ザリフレリマブの重鎖 CDR2 アミノ酸配列である。

【0381】

配列番号 234 は、CTL A-4 阻害剤ザリフレリマブの重鎖 CDR3 アミノ酸配列である。

【0382】

配列番号 235 は、CTL A-4 阻害剤ザリフレリマブの軽鎖 CDR1 アミノ酸配列である。

30

【0383】

配列番号 236 は、CTL A-4 阻害剤ザリフレリマブの軽鎖 CDR2 アミノ酸配列である。

【0384】

配列番号 237 は、CTL A-4 阻害剤ザリフレリマブの軽鎖 CDR3 アミノ酸配列である。

【0385】

I. 定義

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

40

【0386】

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

50

【0387】

「インビボ」という用語は、対象の体内で起こる事象を指す。

【0388】

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

【0389】

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

10

【0390】

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

【0391】

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

20

【0392】

本明細書における「細胞の集団」（TILを含む）とは、共通の形質を共有するいくつかの細胞を意味する。一般に、集団は、概して、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10}$ の数の範囲であり、異なるTIL集団は、異なる数を含む。例えば、IL-2の存在下での一次TILの初期成長は、およそ 1×10^8 細胞のバルクTILの集団をもたらす。REP拡大は、一般に、注入用の $1.5 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^{10}$ 細胞の集団を提供するために行われる。

30

【0393】

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

40

【0394】

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

【0395】

TILは、一般に、細胞表面マーカーを使用して生化学的に定義されるか、または腫瘍に浸潤して治療を達成するそれらの能力によって機能的に定義されるかのいずれかであり得る。TILは、一般に、CD4、CD8、TCR $\alpha\beta$ 、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1、及びCD25のうちの1つ以上のバイ

50

オマーカーの発現によって分類され得る。更に及び代替的に、TILは、患者への再導入時に固形腫瘍に浸潤する能力により機能的に定義され得る。

【0396】

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

10

【0397】

「セントラルメモリーT細胞」という用語は、ヒトではCD45RO+であり、CCR7 (CCR7高) 及びCD62L (CD62高) を構成的に発現するT細胞のサブセットを指す。セントラルメモリーT細胞の表面表現型には、TCR、CD3、CD127 (IL-7R)、及びIL-15Rも含まれる。セントラルメモリーT細胞の転写因子には、BCL-6、BCL-6B、MBD2、及びBMI1が含まれる。セントラルメモリーT細胞は、TCRトリガー後、エフェクター分子としてIL-2及びCD40Lを主に分泌する。セントラルメモリーT細胞は、血液中のCD4コンパートメントで優勢であり、ヒトではリンパ節及び扁桃腺において比例して濃縮される。

20

【0398】

「エフェクターメモリーT細胞」という用語は、セントラルメモリーT細胞と同様にCD45RO+であるが、CCR7の構成的発現を失い (CCR7低)、CD62L発現が不均一であるかまたは低い (CD62L低)、ヒトまたは哺乳動物T細胞のサブセットを指す。セントラルメモリーT細胞の表面表現型には、TCR、CD3、CD127 (IL-7R)、及びIL-15Rも含まれる。セントラルメモリーT細胞の転写因子には、BLIMP1が含まれる。エフェクターメモリーT細胞は、インターフェロンガンマ、IL-4、及びIL-5を含む、抗原刺激後に高レベルの炎症性サイトカインを急速に分泌する。エフェクターメモリーT細胞は、血液中のCD8コンパートメントで優勢であり、ヒトでは肺、肝臓、及び腸において比例して濃縮される。CD8+エフェクターメモリーT細胞は、大量のパーフォリンを担持する。

30

【0399】

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

【0400】

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

40

【0401】

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

【0402】

「末梢血リンパ球」及び「PBL」という用語は、末梢血から拡大したT細胞を指す。

50

いくつかの実施形態では、PBLは、ドナーからの全血またはアフエーシス生成物から分離される。いくつかの実施形態では、PBLは、CD3+CD45+のT細胞表現型などのT細胞表現型の正または負の選択によって、ドナー由来の全血またはアフエーシス生成物から分離される。

【0403】

「抗CD3抗体」という用語は、成熟T細胞のT細胞抗原受容体におけるCD3受容体に対するヒト、ヒト化、キメラ、またはマウス抗体を含む、抗体またはそのバリエーション、例えば、モノクローナル抗体を指す。抗CD3抗体には、ムロモナブとしても知られるOKT-3が含まれる。抗CD3抗体には、T3及びCD3εとしても知られるUHC1クローンも含まれる。他の抗CD3抗体には、例えば、オテリキシズマブ、テプリズマブ、及びビシリズマブが含まれる。

【0404】

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

【表1】

表1. ムロモナブのアミノ酸配列（例示的なOKT-3抗体）。

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

【0405】

「IL-2」（本明細書では「IL2」とも称される）という用語は、インターロイキン-2として知られるT細胞成長因子を指し、ヒト及び哺乳動物形態、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、バイオシミラー、及びバリエーションを含む、IL-2の全ての形態を含む。IL-2は、例えば、Nelson, J. Immunol. 2004, 172, 3983-88及びMalek, Annu. Rev. Immunol. 2008, 26,

453-79に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適な組換えヒトIL-2のアミノ酸配列を表2に示す(配列番号3)。例えば、IL-2という用語は、アルデスロイキン(PROLEUKIN、単回使用バイアル当たり2200万IUで複数の供給業者から市販されている)などのヒト組換えIL-2形態、ならびにCellGenix, Inc., Portsmouth, NH, USA (CELLGRO GMP) またはProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USAによって市販されている組換えIL-2形態(カタログ番号CYT-209-b)及び他のベンダーからの他の商用同等物を包含する。アルデスロイキン(デス-アラニル-1、セリン-125ヒトIL-2)は、およそ15kDaの分子量を有する非グリコシル化ヒト組換えIL-2形態である。本発明での使用に好適なアルデスロイキンのアミノ酸配列を表2に示す(配列番号4)。IL-2という用語はまた、ペグ化IL2プロドラッグベンパガルデスロイキン(NKTR-214、平均6個のリジン残基が[(2, 7-ビス{[メチルポリ(オキシエチレン)]カルバモイル}-9H-フルオレン-9-イル)メトキシ]カルボニル)で置換されたN⁶である、配列番号4のようなペグ化ヒト組換えIL-2)を含む、本明細書に記載のIL-2のペグ化形態も包含し、Nektar Therapeutics (South San Francisco, CA, USA)から入手可能であるか、または国際特許出願公開第WO2018/132496A1号の実施例19に記載の方法、または米国特許出願公開第US2019/0275133A1号の実施例1に記載の方法など、当該技術分野で知られている方法によって調製することができ、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適なベンパガルデスロイキン(NKTR-214)及び他のペグ化IL-2分子は、米国特許出願公開第US2014/0328791A1号及び国際特許出願公開第WO2012/065086A1号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適な複合化IL-2の代替形態は、米国特許第4,766,106号、同第5,206,344号、同第5,089,261号、及び同第4,902,502号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適なIL-2の配合物は、米国特許第6,706,289号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

[0406]

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

L 7 2、及び Y 1 0 7 から選択されるアミノ酸残基は、リジン、システイン、またはヒスチジンに更に変異する。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基は、システインに変異する。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基は、リジンに変異する。いくつかの実施形態では、K 3 5、T 3 7、R 3 8、T 4 1、F 4 2、K 4 3、F 4 4、Y 4 5、E 6 1、E 6 2、E 6 8、K 6 4、P 6 5、V 6 9、L 7 2、及び Y 1 0 7 から選択されるアミノ酸残基は、非天然アミノ酸に更に変異する。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸は、N 6 -アジドエトキシ-L-リジン (A z K)、N 6 -プロパルギルエトキシ-L-リジン (P r a K)、B C N-L-リジン、ノルボルネンリジン、T C O-リジン、メチルテトラジンリジン、アリルオキシカルボニルリジン、2-アミノ-8-オキソノナン酸、2-アミノ-8-オキソオクタン酸、p-アセチル-L-フェニルアラニン、p-アジドメチル-L-フェニルアラニン (p A M F)、p-ヨード-L-フェニルアラニン、m-アセチルフェニルアラニン、2-アミノ-8-オキソノナン酸、p-プロパルギルオキシフェニルアラニン、p-プロパルギル-L-フェニルアラニン、3-メチル-L-フェニルアラニン、L-ドーパ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、p-アジド-L-フェニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、p-プロモフェニルアラニン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、O-アリルチロシン、O-メチル-L-チロシン、O-4-アリル-L-チロシン、4-プロピル-L-チロシン、ホスホチロシン、トリ-O-アセチル-G l c N A c p-セリン、L-ホスホセリン、ホスホセリン、L-3-(2-ナフチル)アラニン、2-アミノ-3-((2-((3-(ベンジルオキシ)-3-オキソプロピル)アミノ)エチル)セラニル)プロパン酸、2-アミノ-3-(フェニルセラニル)プロパン酸、またはセレノシステインを含む。いくつかの実施形態では、I L-2 複合体は、野生型 I L-2 ポリペプチドと比較して、I L-2 受容体 α (I L-2 R α) サブユニットに対する減少した親和性を有する。いくつかの実施形態では、減少した親和性は、野生型 I L-2 ポリペプチドと比較して、I L-2 R α に対する結合親和性の約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 9 %、または 9 9 % を超える減少である。いくつかの実施形態では、減少した親和性は、野生型 I L-2 ポリペプチドと比較して、約 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、1 0 倍、3 0 倍、5 0 倍、1 0 0 倍、2 0 0 倍、3 0 0 倍、5 0 0 倍、1 0 0 0 倍以上である。いくつかの実施形態では、複合部分は、I L-2 と I L-2 R α との結合を損なうかまたは遮断する。いくつかの実施形態では、複合部分は、水溶性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、水溶性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ポリエチレングリコール (P E G)、ポリ(プロピレングリコール) (P P G)、エチレングリコール及びプロピレングリコールのコポリマー、ポリ(オキシエチル化ポリオール)、ポリ(オレフィンアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(ヒドロキシアルキルメタクリルアミド)、ポリ(ヒドロキシアルキルメタクリレート)、ポリ(サッカライド)、ポリ(α -ヒドロキシ酸)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン (P O Z)、ポリ(N-アクリロイルモルホリン)、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、P E G を含む。いくつかの実施形態では、P E G は、直鎖状 P E G または分岐状 P E G である。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ポリサッカライドを含む。いくつかの実施形態では、ポリサッカライドは、デキストラン、ポリシアル酸 (P S A)、ヒアルロン酸 (H A)、アミロース、ヘパリン、ヘパランサルフェート (H S)、デキストリン、またはヒドロキシエチルデンプン (H E S) を含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、グリカンを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ポリアミンを含む。いくつかの実施形態では、複合部分は、タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、アルブミン、トランスフェリン、またはトランスサイレチンを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、F

10

20

30

40

50

c 部分を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、I g G の F c 部分を含む。いくつかの実施形態では、複合部分は、ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、X T E N ペプチド、グリシンリッチホモアミノ酸ポリマー (H A P)、P A S ポリペプチド、エラスチン様ポリペプチド (E L P)、C T P ペプチド、またはゼラチン様タンパク質 (G L K) ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、単離及び精製 I L - 2 ポリペプチドは、グルタミル化によって修飾される。いくつかの実施形態では、複合部分は、単離及び精製 I L - 2 ポリペプチドと直接的に結合される。いくつかの実施形態では、複合部分は、リンカーを介して単離及び精製された I L - 2 ポリペプチドと間接的に結合される。いくつかの実施形態では、リンカーは、ホモ二官能性リンカーを含む。いくつかの実施形態では、ホモ二官能性リンカーは、ロマンツ試薬ジチオビス (スクシンイミジルプロピオネート) D S P、3 ' 3 ' - ジチオビス (スルホスクシンイミジルプロピオネート) (D T S S P)、ジスクシンイミジルスベラート (D S S)、ビス (スルホスクシンイミジル) スベラート (B S)、ジスクシンイミジルタータラート (D S T)、ジスルホスクシンイミジルタータラート (スルホ D S T)、エチレングリコビス (スクシンイミジルスクシネート) (E G S)、ジスクシンイミジルグルタラート (D S G)、N, N ' - ジスクシンイミジルカーボナート (D S C)、ジメチルアジピミデート (D M A)、ジメチルピメリミデート (D M P)、ジメチルスベリミデート (D M S)、ジメチル - 3, 3 ' - ジチオビスプロピオンイミデート (D T B P)、1, 4 - ジ - (3 ' - (2 ' - ピリジルジチオ) プロピオンアミド) ブタン (D P D P B)、ビスマレイミドヘキサン (B M H)、ハロゲン化アリール含有化合物 (D F D N B)、例えば、1, 5 - ジフルオロ - 2, 4 - ジニトロベンゼンまたは 1, 3 - ジフルオロ - 4, 6 - ジニトロベンゼン、4, 4 ' - ジフルオロ - 3, 3 ' - ジニトロフェニルスルホン (D F D N P S)、ビス - [β - (4 - アジドサリチルアミド) エチル] ジスルフィド (B A S E D)、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、1, 4 - ブタンジオールジグリシジルエーテル、アジピン酸ジヒドラジド、カルボヒドラジド、o - トルイジン、3, 3 ' - ジメチルベンジジン、ベンジジン、α, α ' - p - ジアミノジフェニル、ジヨード - p - キシレンスルホン酸、N, N ' - エチレン - ビス (ヨードアセトアミド)、または N, N ' - ヘキサメチレンビス (ヨードアセトアミド) を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、ヘテロ二官能性リンカーを含む。いくつかの実施形態では、ヘテロ二官能性リンカーは、N - スクシンイミジル 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオネート (s P D P)、長鎖 N - スクシンイミジル 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオネート (L C - s P D P)、水溶性長鎖 N - スクシンイミジル 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオネート (スルホ - L C - s P D P)、スクシンイミジルオキシカルボニル - α - メチル - α - (2 - ピリジルジチオ) トルエン (s M P T)、スルホスクシンイミジル - 6 - [α - メチル - α - (2 - ピリジルジチオ) トルアミド] ヘキサノエート (スルホ - L C - s M P T)、スクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (s M C C)、スルホスクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (スルホ - s M C C)、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (M B)、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル (スルホ - M B)、N - スクシンイミジル (4 - ヨードアセチル) アミノベンゾエート (s I A B)、スルホスクシンイミジル (4 - ヨードアセチル) アミノベンゾエート (スルホ - s I A B)、スクシンイミジル - 4 - (p - マレイミドフェニル) ブチレート (s M P B)、スルホスクシンイミジル - 4 - (p - マレイミドフェニル) ブチレート (スルホ - s M P B)、N - (γ - マレイミドブチリルオキシ) スクシンイミドエステル (G M B)、N - (γ - マレイミドブチリルオキシ) スルホスクシンイミドエステル (スルホ - G M B)、スクシンイミジル 6 - ((ヨードアセチル) アミノ) ヘキサノエート (s I A X)、スクシンイミジル 6 - [6 - ((ヨードアセチル) アミノ) ヘキサノイル] アミノ] ヘキサノエート (s L A X X)、スクシンイミジル 4 - ((ヨードアセチル) アミノ) メチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (s I A C)、ス

10

20

30

40

50

クシンイミジル 6-((4-ヨードアセチル)アミノ)メチル)シクロヘキサン-1-カルボニル)アミノ)ヘキサノエート (s I A C X)、p-ニトロフェニルヨードアセテート (N P I A)、カルボニル反応性及びスルフヒドリル反応性架橋剤、例えば、4-(4-N-マレイミドフェニル)酪酸ヒドラジド (M P B H)、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシル-ヒドラジド-8 (M 2 C 2 H)、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオニルヒドラジド (P D P H)、N-ヒドロキシスクシンイミジル-4-アジドサリチル酸 (N H s - A s A)、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドサリチル酸 (スルホ-N H s - A s A)、スルホスクシンイミジル-4-アジドサリチルアミド)ヘキサノエート (スルホ-N H s - L C - A s A)、スルホスクシンイミジル-2-(p-アジドサリチルアミド)エチル-1, 3'-ジチオプロピオネート (s A s D)、N-ヒドロキシスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート (H s A B)、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート (スルホ-H s A B)、N-スクシンイミジル-6-(4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノエート (s A N P A H)、スルホスクシンイミジル-6-(4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノエート (スルホ-s A N P A H)、N-5-アジド-2'-ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド (A N B - N O)、スルホスクシンイミジル-2-(m-アジド-o-ニトロベンズアミド)-エチル-1, 3'-ジチオプロピオネート (s A N D)、N-スクシンイミジル-4-(4-アジドフェニル)1, 3'-ジチオプロピオネート (s A D P)、N-スルホスクシンイミジル(4-アジドフェニル)-1, 3'-ジチオプロピオネート (スルホ-s A D P)、スルホスクシンイミジル4-(p-アジドフェニル)ブチレート (スルホ-s A P B)、スルホスクシンイミジル2-(7-アジド-4-メチルクマリン-3-アセトアミド)エチル-1, 3'-ジチオプロピオネート (s A E D)、スルホスクシンイミジル7-アジド-4-メチルクマリン-3-アセテート (スルホ-s A M C A)、p-ニトロフェニルジアゾピルベート (p N P D P)、p-ニトロフェニル-2-ジアゾ-3, 3, 3-トリフルオロプロピオネート (P N P - D T P)、1-(p-アジドサリチルアミド)-4-(ヨードアセトアミド)ブタン (A s I B)、N-[4-(p-アジドサリチルアミド)ブチル]-3'-(2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミド (A P D P)、ベンゾフェノン-4-ヨードアセトアミド、p-アジドベンゾイルヒドラジド (A B H)、4-(p-アジドサリチルアミド)ブチルアミン (A s B A)、またはp-アジドフェニルグリオキサール (A P G)を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、任意選択的に、ジペプチドリンカーを含む、切断不可能なリンカーを含む。いくつかの実施形態では、ジペプチドリンカーは、V a l - C i t、P h e - L y s、V a l - A l a、またはV a l - L y sを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、切断不可能なリンカーを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、任意選択的に、マレイミドカプロイル (m c)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (s M C C)、またはスルホスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (スルホ-s M C C)を含むマレイミド基を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、スパーサーを更に含む。いくつかの実施形態では、スパーサーは、p-アミノベンジルアルコール (P A B)、p-アミノベンジルオキシカルボニル (P A B C)、その誘導体、または類似体を含む。いくつかの実施形態では、複合部分は、I L-2 複合体の血清半減期を延長することができる。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、I L-2 複合体の血清半減期を延長することができる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なI L-2 形態は、本明細書に記載のI L-2 形態のうちのいずれかの断片である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なI L-2 形態は、米国特許出願公開第U S 2 0 2 0 / 0 1 8 1 2 2 0 A 1号及び米国特許出願公開第U S 2 0 2 0 / 0 3 3 0 6 0 1 A 1号に開示されているようにペグ化されている。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なI L-2 形態は、ポリエチレングリコール (P E G)を含む複合部分に共有結合したN 6-アジドエトキシー-L-リジン (A z K)を含むI L-2 ポリペプチドを含む、I L

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

10

20

30

40

50

【０４０７】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬー２形態は、ＡＬＫＳー４２３０（配列番号６）としても知られるネムバロイキンアルファであり、Ａｌｋｅｒｍｅｓ，Ｉｎｃ．から入手可能である。ネムバロイキンアルファは、ペプチジルリンカー（⁶⁰G G⁶¹）を介してヒトインターロイキン２断片（６２ー１３２）と融合し、ペプチジルリンカー（¹³³G S G G G S¹³⁸）を介してヒトインターロイキン２受容体α鎖断片（１３９ー３０３）と融合し、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞で生成され、グリコシル化されている、ヒトインターロイキン２断片（１ー５９）、バリエント（Ｃｙｓ¹²⁵>Ｓｅｒ⁵¹）；Ｇ₂ペプチドリンカー（６０ー６１）を介してヒトインターロイキン２（ＩＬー２）（４ー７４）ーペプチド（６２ー１３２）と融合し、ＧＳＧ₃Ｓペプチドリンカー（１３３ー１３８）を介してヒトインターロイキン２受容体α鎖（ＩＬ２Ｒサブユニットアルファ、ＩＬ２Ｒα、ＩＬ２ＲＡ）（１ー１６５）ーペプチド（１３９ー３０３）と融合し、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞で生成され、アルファグリコシル化されている、ヒトインターロイキン２（ＩＬー２）（７５ー１３３）ーペプチド〔Ｃｙｓ¹²⁵（５１）>Ｓｅｒ〕ー変異体（１ー５９）としても知られている。ネムバロイキンアルファのアミノ酸配列は、配列番号６に示される。いくつかの実施形態では、ネムバロイキンアルファは、以下の翻訳後修飾を示す：以下の位置でのジスルフィド架橋：３１ー１１６、１４１ー２８５、１８４ー２４２、２６９ー３０１、１６６ー１９７、または１６６ー１９９、１６８ー１９９または１６８ー１９７（配列番号６の番号付けを使用する）、及び以下の位置でのグリコシル化部位：配列番号６の番号付けを使用する、Ｎ１８７、Ｎ２０６、Ｔ２１２。ネムバロイキンアルファの調製及び特性、ならびに本発明での使用に好適な追加の代替形態のＩＬー２は、米国特許出願公開第ＵＳ２０２１／００３８６８４Ａ１号及び米国特許第１０，１８３，９７９号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明での使用

に好適な I L - 2 形態は、配列番号 6 と少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、または少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するタンパク質である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適な I L - 2 形態は、配列番号 6 で示されるアミノ酸配列またはその保存的アミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適な I L - 2 形態は、配列番号 7 のアミノ酸 2 4 ~ 4 5 2、またはそのバリエーション、断片、もしくは誘導体を含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適な I L - 2 形態は、配列番号 7 のアミノ酸 2 4 ~ 4 5 2 と少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列、またはそのバリエーション、断片、もしくは誘導体を含む融合タンパク質である。本発明での使用に好適な他の I L - 2 形態は、米国特許第 1 0 , 1 8 3 , 9 7 9 号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。任意選択的に、いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適な I L - 2 形態は、ムチンドメインポリペプチドリンカーによって第 2 の融合パートナーと連結された第 1 の融合パートナーを含む融合タンパク質であり、第 1 の融合パートナーは、I L - 1 R α 、または I L - 1 R α と少なくとも 9 8 % のアミノ酸配列同一性を有し、I L - R α の受容体アンタゴニスト活性を有するタンパク質であり、第 2 の融合パートナーは、F c 領域を含む免疫グロブリンの全部または一部を含み、ムチンドメインポリペプチドリンカーは、配列番号 8、または配列番号 8 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、融合タンパク質の半減期は、ムチンドメインポリペプチドリンカーの非存在下での第 2 の融合パートナーとの第 1 の融合パートナーの融合と比較して改善される。

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2. インターロイキンのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)			
配列番号3 組換えヒト IL-2(rhIL-2)	MAPTSSSTKK	TQLQLEHLLL	DLQMILNGIN	NYKNPKLTRM
	EEELKPLEEV	LNLAQSKNFH	LRPRDLISNI	NVIVLELKGS
	RWITFCQSII	STLT		
配列番号4 アルデスロイキン	PTSSSTKKTK	QLEHLLLDL	QMILNGINNY	KNPKLTRMLT
	ELKPLEEVLN	LAQSKNFHLR	PRDLISNINV	IVLELKGSSET
	ITFSQSIIST	LT		
配列番号5 IL-2形態	APTSSSTKKTK	QLEHLLLDL	LQMILNGINN	YKNPKLTRML
	EELKPLEEVL	NLAQSKNFHL	RPRDLISNIN	VIVLELKGSSE
	WITFCQSIIIS	TLT		
配列番号6 ネムバロイキン アルファ	SKNFHLRPRD	LISNINVIVL	ELKGSETTFM	CEYADETATI
	GSSSTKKTKQ	QLEHLLLDLQ	MILNGINNYK	NPKLTRMLTF
	LKPLEEVLNL	AQSGGGGSEL	CDDDPPEIPH	ATFKAMAYKE
配列番号7 IL-2形態	YMLCTGNSSH	SSWDNQCQCT	SSATRNTTKQ	VTPQPEEQKE
	HCREPPPPWEN	EATERIYHFV	VGQMVYYQCV	QGYRALHRGP
	CTG			
配列番号8 ムチンドメイン ポリペプチド	MDAMKRLGCC	VLLLCGAVFV	SARRPSGRKS	SKMQAFRIWD
	PNVNLEEKID	VVPIEPHALF	LGIHGGKMCL	SCVKSGDETR
	FAFIRSDSGP	TTSFESAACP	GWFLCTAMEA	DQPVSLTNMP
配列番号9 組換えヒトIL-4 (rhIL-4)	ASSESSASSD	GPHPVITESR	ASSESSASSD	GPHPVITESR
	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF
	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT
配列番号10 組換えヒトIL-7 (rhIL-7)	BEEMTKNQVSL	TCLVKGFPYS	DIAVEWESNG	QPENNYKTP
	RWQQGNVFS	SVMHEALHNH	YTQKSLSLSP	GK
配列番号11 組換えヒトIL-15 (rhIL-15)	SESSASSDGP	HPVITP		
配列番号12 組換えヒトIL-21 (rhIL-21)	MHKCDITLQE	IIKTLNLSLTE	QKTLCTELTV	TDIFAASKNT
	EKDTRCLGAT	AQQFHRHKQL	IRFLKRLDRN	LWGLAGLNSC
	MREKYSKCSS			
	MDCDIEGKDG	KQYESVLMVS	IDQLDSMKE	IGSNCLNNEF
	ARKLRQFLKM	NSTGDFDLHL	LKVSBGTTIL	LNCTGQVKGR
	KEQKKLNDLC	FLKRLLEIK	TCWNKILMGT	KEH
	MNWNVISDL	KKIEDLIQSM	HIDATLYTES	DVHPSCVKTA
	HDTVENLIIL	ANNSLSSNGN	VTESGCKECE	ELEEKNIEKF
	MQDRHMIRM	QLIDIVDQLK	NYVNDLVPEF	LPAPEDVETN
	NNERIINVS	KKLKRKPST	NAGRRQKHRL	TCFSCDSYEK
	HLSSRTHGSE	DS		

【0408】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なIL-2形態は、相補性決定領域HCDR1、HCDR2、HCDR3を含む、重鎖可変領域(V_H)と、LCDR1、LCDR2、LCDR3を含む軽鎖可変領域(V_L)と、V_HまたはV_LのCDRに移植されたIL-2分子またはその断片と、を含む抗体サイトカイン移植タンパク質を含み、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性T細胞よりもTエフェクター細胞を優先的に拡大させる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域HCDR1、HCDR2、HCDR3を含む、重鎖可変領域(V_H)と、LCDR1、LCDR2、LCDR3を含む軽鎖可変領域(V_L)と、V_HまたはV_LのCDRに移植されたIL-2分子またはその断片と、を含み、IL-2分子は、ムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性T細胞よりもTエフェクター細胞を優先的に拡大させる。いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、米国特許出願公開第US2020/0270334A1号に記載されている抗体の投与を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域HCDR1、HCDR2、HCDR3を含む、重鎖可変領域(V_H)と、L

C D R 1、L C D R 2、L C D R 3を含む軽鎖可変領域（V_L）と、V_HまたはV_LのC D Rに移植されたI L-2分子またはその断片と、を含み、I L-2分子は、ムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性T細胞よりもTエフェクター細胞を優先的に拡大させ、抗体は、配列番号39を含むI g Gクラス軽鎖及び配列番号38を含むI g Gクラス重鎖、配列番号37を含むI g Gクラスの軽鎖及び配列番号29を含むI g Gクラスの重鎖、配列番号39を含むI g Gクラス軽鎖及び配列番号29を含むI g Gクラス重鎖、配列番号37を含むI g Gクラス軽鎖及び配列番号38を含むI g Gクラス重鎖からなる群から選択されるI g Gクラスの重鎖及びI g Gクラスの軽鎖を更に含む。

【0409】

いくつかの実施形態では、I L-2分子またはその断片は、V_HのH C D R 1に移植され、I L-2分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、I L-2分子またはその断片は、V_HのH C D R 2に移植され、I L-2分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、I L-2分子またはその断片は、V_HのH C D R 3に移植され、I L-2分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、I L-2分子またはその断片は、V_LのL C D R 1に移植され、I L-2分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、I L-2分子またはその断片は、V_LのL C D R 2に移植され、I L-2分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、I L-2分子またはその断片は、V_LのL C D R 3に移植され、I L-2分子は、ムテインである。

【0410】

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

【0411】

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

【0412】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のI L-2分子は、I L-2ムテインである。いくつかの事例では、I L-2ムテインは、R 67 A置換を含む。いくつかの実施形態では、I L-2ムテインは、配列番号14または配列番号15のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、I L-2ムテインは、米国特許出願公開第US 2020/0270334 A 1号の表1のアミノ酸配列を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0413】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号16、配列番号19、配列番号22及び配列番号25からなる群から選択されるH C D R 1を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号7、配列番号10、配列番号13、及び配列番号16からなる群から選択されるH C D R 1を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号17、配列番号20、配列番号23、及び配列番号26からなる群から選択されるH C D R 2からなる群から選択されるH C D R 1を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号18、配列番号21、配列番号24、及び配列番号27からなる群から選択されるH C D R 3を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は

10

20

30

40

50

、配列番号 28 のアミノ酸配列を含む V_H 領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号 29 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号 36 のアミノ酸配列を含む V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号 37 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号 28 のアミノ酸配列を含む V_H 領域及び配列番号 36 のアミノ酸配列を含む V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号 29 のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号 37 のアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号 29 のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号 39 のアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号 38 のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号 39 のアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、米国特許出願公開第 2020/0270334 A1 号の IgG₁ IL2F71A₁ H1 もしくは IgG₁ IL2R67A₁ H1、またはそのバリエーション、誘導体、もしくは断片、またはその保存的アミノ酸置換体、またはそれと少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または少なくとも 98% の配列同一性を有するタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質の抗体成分は、免疫グロブリン配列、フレームワーク配列、またはパブリズマブの CDR 配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質は、アルデスロイキンまたは同等の分子などであるがこれらに限定されない野生型 IL-2 分子よりも長い血清半減期を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質は、表 3 に記載される配列を有する。

10

20

40

50

【表 3 - 1】

表 3：例示的なパブリズマブ抗体 - IL-2 移植タンパク質の配列

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 13 IL-2	MYRQQLLSCL ALSALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML 60 TFKFYMPKKA TELKHLQCLE BELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE 120 TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT 153
配列番号 14 IL-2 ムテイン	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 BELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLT 133
配列番号 15 IL-2 ムテイン	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TAKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 BELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLT 133
配列番号 16 HCDR1_IL-2	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL 60 QCLEEELKPL BEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE VADETATIVE 120 FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMSVG 145
配列番号 17 HCDR2	DIWDDKKDY NPSLKS 16
配列番号 18 HCDR3	SMITNWFYFDV 10
配列番号 19 HCDR1_IL-2 カバット	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 BELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLTSTSGMSV G 141
配列番号 20 HCDR2 カバット	DIWDDKKDY NPSLKS 16

【表 3 - 2】

配列番号 21 HCDR3 カバット	SMITNWFYFDV 10	
配列番号 22 HCDR1 IL-2 クロチア	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL 60 QCLEEBELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINIVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE 120 FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GM 142 WWDDK 5	
配列番号 23 HCDR2 クロチア	SMITNWFYFDV 10	
配列番号 24 HCDR3 クロチア	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL 60 QCLEEBELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINIVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE 120 FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMS 143 IWDDDK 7	
配列番号 25 HCDR1 IL-2 IMGT	ARSMITNWFY DV 12	
配列番号 26 HCDR2 IMGT	QVTLRESGPA LVKPTQTTLT TCTFSGFSLA PTSSSTKKTKQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY 60 KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISINIV 120 IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL 180 EWLADIWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWFY 240 DVWGAGTTVT VSS 253	10
配列番号 27 HCDR3 IMGT	QMLNGINNY KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR 60 PRDLISINIV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG 120 WIRQPPGKAL EWLADIWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC 180 ARSMITNWFY DVWGAGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV 240 TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR 300 VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTEVTCVVV AVSHEDPEVK 360 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALAAPIEK 420 TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT 480 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKQSLSLG PGK 533 KAQLSVGYMH 10	20
配列番号 28 V _H	KAQLSVGYMH 10	
配列番号 29 重鎖	DTSKLAS	7
配列番号 30 LCDR1 カバット	FQSGSGYFPT 9	
配列番号 31 LCDR2 カバット	QLSVGY	6
配列番号 32 LCDR3 カバット	DTS	3
配列番号 33 LCDR1 クロチア	GSGYPF	6
配列番号 34 LCDR2 クロチア	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR 60 FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIK 106	60
配列番号 35 LCDR3 クロチア	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR 60 FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213	120
配列番号 36 V _L	QVTLRESGPA LVKPTQTTLT TCTFSGFSLA PTSSSTKKTKQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY 60 KNPKLTRMLT AKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISINIV 120 IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL 180 EWLADIWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWFY 240 DVWGAGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT 300 SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH 360 TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTEVTCVVV AVSHEDPEVK FNWYVDGVEV 420 HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALAAPIEK TISKAKGQPR 480 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF 540	300
配列番号 37 軽鎖	FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKQSLSLG PGK 583	583
配列番号 38 軽鎖	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR 60 FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213	180
配列番号 39 軽鎖	FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKQSLSLG PGK 583	583

【0414】

「IL-4」（本明細書では「IL4」とも称される）という用語は、インターロイキン4として知られるサイトカインを指し、これは、Th2 T細胞、ならびに好酸球、好塩基球、及び肥満細胞によって生成される。IL-4は、ナイーブヘルパーT細胞（Th0細胞）からTh2 T細胞への分化を調節する。Steinke and Borish, Respir. Res. 2001, 2, 66-70。IL-4によって活性化されると、Th2 T細胞は、その後、正のフィードバックループで追加のIL-4を生成する。IL-4はまた、B細胞増殖及びクラスII MHC発現も刺激し、B細胞からのIgE及びIgG₁発現へのクラス切り替えを誘導する。本発明での使用に好適な組換えヒト

IL-4は、ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (カタログ番号CYT-211) 及びThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (ヒトIL-15組換えタンパク質、カタログ番号Gibco CTP0043) を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトIL-4のアミノ酸配列を表2に示す(配列番号9)。

【0415】

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

【0416】

「IL-15」(本明細書では「IL15」とも称される)という用語は、インターロイキン-15として知られるT細胞成長因子を指し、ヒト及び哺乳動物形態、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、バイオシミラー、及びバリエーションを含む、IL-2の全ての形態を含む。IL-15は、例えば、Fehniger and Caligiuri, Blood 2001, 97, 14-32に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。IL-15は、 β 及び γ シグナル伝達受容体サブユニットをIL-2と共有する。組換えヒトIL-15は、12.8 kDaの分子量を有する114個のアミノ酸(及びN末端メチオニン)を含む単一の非グリコシル化ポリペプチド鎖である。組換えヒトIL-15は、ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (カタログ番号CYT-230-b) 及びThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (ヒトIL-15組換えタンパク質、カタログ番号34-8159-82) を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトIL-15のアミノ酸配列を表2に示す(配列番号11)。

【0417】

「IL-21」(本明細書では「IL21」とも称される)という用語は、インターロイキン-21として知られる多面発現性サイトカインタンパク質を指し、ヒト及び哺乳動物形態、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、バイオシミラー、及びバリエーションを含む、IL-21の全ての形態を含む。IL-21は、例えば、Spolski and Leonard, Nat. Rev. Drug. Disc. 2014, 13, 379-95に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。IL-21は、主にナチュラルキラーT細胞及び活性化ヒトCD4+T細胞によって生成される。組換えヒトIL-21は、15.4 kDaの分子量を有する132個のアミノ酸を含む単一の非グリコシル化ポリペプチド鎖である。組換えヒトIL-21は、ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (カタログ番号CYT-408-b) 及びThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (ヒトIL-21組換えタンパク質、カタログ番号14-8219-80) を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトIL-21のアミノ酸配列を表2に示す(配列番号21)。

【0418】

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

10

【0419】

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

20

【0420】

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

30

【0421】

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

40

【0422】

いくつかの実施形態では、本発明は、TIL集団でがんを治療する方法を含み、患者は、本発明によるTILの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、TIL集団が提供され得、患者は、本発明によるTILの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド60mg/kg/日で2日間（TIL注入の27日前及び26日前）、ならびにフルダラビン25mg/m²/日で5日間（TIL注入の27日前～23日前）である。いくつかの実施形態では、本発明による骨髄非破壊的化学療法及びTIL注入（0日

50

目) 後、患者は、生理学的許容範囲まで8時間毎に720,000IU/kgでIL-2の静脈内注入を受ける。

【0423】

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

【0424】

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

【0425】

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

【0426】

「骨髄非破壊的化学療法」、「骨髄非破壊的リンパ枯渇」、「NMALD」、「NMALD」、「NMA-LD」、及び前述の任意のバリエーションは、患者のリンパ性免疫細胞を枯渇させながら、患者の骨髄性免疫細胞の枯渇を回避するように設計された化学療法レジメンを示すために互換的に使用される。典型的には、患者は、本明細書に記載されるように、腫瘍浸潤リンパ球を患者に投与する前に、骨髄非破壊的化学療法の経過を受ける。

【0427】

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

【0428】

2つ以上の核酸またはポリペプチドの文脈における「配列同一性」、「同一性パーセント」、及び「配列同一性パーセント」(もしくはそれらの同義語、例えば「99%同一」という用語は、同じであるか、または配列同一性の一部としていかなる保存的アミノ酸置換も考慮せずに、最大一致のために比較し整列させた場合(必要に応じてギャップを導

10

20

30

40

50

入する)、特定のパーセンテージの同じヌクレオチドもしくはアミノ酸残基を有する2つ以上の配列または部分配列を指す。同一性パーセントは、配列比較ソフトウェアもしくはアルゴリズムを使用して、または目視検査によって測定することができる。アミノ酸またはヌクレオチド配列のアラインメントを取得するために使用され得る様々なアルゴリズム及びソフトウェアが当該技術分野で知られている。配列同一性パーセントの決定に好適なプログラムには、例えば、米国政府の国立生物工学情報センターのBLASTウェブサイトから入手可能なBLASTプログラム一式が含まれる。2つの配列間の比較は、BLASTNまたはBLASTPアルゴリズムのいずれかを使用して実行することができる。BLASTNは、核酸配列を比較するために使用され、BLASTPは、アミノ酸配列を比較するために使用される。DNASTARから入手可能なALIGN、ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California)、またはMegAlignは、配列を整列させるために使用することができる追加の公的に入手可能なソフトウェアプログラムである。当業者であれば、特定のアラインメントソフトウェアによって最大アラインメントに適切なパラメータを決定することができる。ある特定の実施形態では、アラインメントソフトウェアのデフォルトパラメータが使用される。

10

【0429】

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

20

【0430】

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

30

【0431】

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

40

50

約 400 pg/mL を超える、約 500 pg/mL を超える、約 600 pg/mL を超える、約 700 pg/mL を超える、約 800 pg/mL を超える、約 900 pg/mL、約 1000 pg/mL を超える場合、TIL は強力であるとみなされ得る。

【0432】

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

【0433】

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

【0434】

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

【0435】

「約」及び「およそ」という用語は、値の統計的に有意な範囲内を意味する。かかる範囲は、所与の値または範囲の1桁以内、好ましくは50%以内、より好ましくは20%以内、なおより好ましくは10%以内、更により好ましくは5%以内であり得る。「約」または「およそ」という用語によって包含される許容偏差は、研究中の特定のシステムに依存し、当業者によって容易に理解され得る。更に、本明細書で使用される場合、「約」及び「およそ」という用語は、寸法、サイズ、配合、パラメータ、形状、ならびに他の量及び特徴が正確でなく、かつ正確である必要はないが、公差、変換係数、四捨五入、測定誤差など、及び当業者に知られている他の要因を反映して、必要に応じて、およそであってもよく、及び／またはそれよりも大きくても小さくてもよいことを意味する。一般に、寸法、サイズ、配合、パラメータ、形状、または他の量もしくは特徴は、そのように明示的に述べられているかにかかわらず、「約」または「およそ」である。非常に異なるサイズ、形状、及び寸法の実施形態が記載された配置を採用し得ることに留意されたい。

【0436】

添付の特許請求の範囲で使用される場合、「含む」、「から本質的になる」、及び「からなる」という移行用語は、元の形式及び補正された形式で、存在する場合、列挙されていない追加のクレーム要素またはステップが特許請求の範囲から除外されるかに関して特許請求の範囲を定義する。「含む」という用語は、包括的または自由形式であるよう意図されており、いずれの追加の列挙されていない要素、方法、ステップ、または材料も除外しない。「からなる」という用語は、特許請求の範囲で指定されたもの以外のいずれの要素、ステップ、または材料も除外し、後者の場合、指定された材料（複数可）に通常関連する不純物も除外する。「から本質的になる」という用語は、特許請求の範囲を、特定の要素、ステップ、または材料（複数可）、及び特許請求された本発明の基本的及び新規の

特徴（複数可）に実質的に影響を及ぼさないに限定する。本発明を具体化する本明細書に記載の全ての組成物、方法、及びキットは、代替の実施形態では、「含む」、「から本質的になる」、及び「からなる」という移行用語のうちのいずれかによってより具体的に定義され得る。

【0437】

「抗体」及びその複数形の「抗体」という用語は、免疫グロブリン全体及び任意の抗原結合断片（「抗原結合部分」）またはその一本鎖を指す。「抗体」は更に、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも2つの重鎖（H）鎖及び2つの軽（L）鎖を含む糖タンパク質、またはその抗原結合部分を指す。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書では V_H と略される）及び重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は、 $CH1$ 、 $CH2$ 、及び $CH3$ の3つのドメインで構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書では V_L と略される）及び軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、 CL で構成される。抗体の V_H 及び V_L 領域は、相補性決定領域（ CDR ）または超可変領域（ HVR ）と称され、フレームワーク領域（ FR ）と呼ばれる、より保存された領域が点在し得る、超可変性の領域に更に細分化することができる。各 V_H 及び V_L は、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序で配列された3つの CDR 及び4つの FR で構成される： $FR1$ 、 $CDR1$ 、 $FR2$ 、 $CDR2$ 、 $FR3$ 、 $CDR3$ 、 $FR4$ 。重鎖及び軽鎖の可変領域は、1つまたは複数の抗原エピトープと相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）及び古典的な補体系の第1の成分（ $C1q$ ）を含む宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。

【0438】

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

【0439】

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

【0440】

本明細書で使用される、抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合断片」（または単に「抗体部分」もしくは「断片」）という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する

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

10

20

30

40

50

【0441】

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

【0442】

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

【0443】

本明細書で使用される「組換えヒト抗体」という用語は、組換え手段によって調製、発現、作成、または単離される全てのヒト抗体、例えば(a) ヒト免疫グロブリン遺伝子またはそれから調製されたハイブリドーマ（以下で更に説明される）についてトランスジェニックまたはトランス染色体である動物（マウスなど）から単離された抗体、(b) ヒト

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

10

【0444】

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

【0445】

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

【0446】

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

20

【0447】

「ヒト化抗体」、「ヒト化抗体（複数）」、及び「ヒト化」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系に由来するCDR配列が、ヒトフレームワーク配列に移植されている抗体を指すことを意図している。追加のフレームワーク領域の修飾は、ヒトフレームワーク配列内で行うことができる。非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、レシピエントの超可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、ウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）または非ヒト霊長類の15超可変領域からの残基によって置き換えられる。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク（FR）残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体には見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体の性能を更に向上させるために行われる。一般に、ヒト化抗体は、超可変ループの全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域の全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的な全てを含むことになる。ヒト化抗体はまた、任意選択的に、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含むであろう。更なる詳細については、Jones, et al., Nature 1986, 321, 522-525、Riechmann, et al., Nature 1988, 332, 323-329、及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 1992, 2, 593-596を参照されたい。本明細書に記載される抗体はまた、エフェクター機能及び／またはFcR結合の改善（例えば、低減）を与えることが知られている任意のFcバリエーションを用いるように修飾され得る。Fcバリエーションは、例えば、国際特許出願公開第WO1988/07089A1号、同第WO1996/14339A1号、同第WO1998/05787A1号、同第WO1998/23289A1号、同第WO1999/51642A1号、同第WO99/58572A1号、同第WO2000/09560A2号、同第WO2000/32767A1号、同第WO2000/4207

30

40

50

2 A 2 号、同第 W O 2 0 0 2 / 4 4 2 1 5 A 2 号、同第 W O 2 0 0 2 / 0 6 0 9 1 9 A 2 号、同第 W O 2 0 0 3 / 0 7 4 5 6 9 A 2 号、同第 W O 2 0 0 4 / 0 1 6 7 5 0 A 2 号、同第 W O 2 0 0 4 / 0 2 9 2 0 7 A 2 号、同第 W O 2 0 0 4 / 0 3 5 7 5 2 A 2 号、同第 W O 2 0 0 4 / 0 6 3 3 5 1 A 2 号、同第 W O 2 0 0 4 / 0 7 4 4 5 5 A 2 号、同第 W O 2 0 0 4 / 0 9 9 2 4 9 A 2 号、同第 W O 2 0 0 5 / 0 4 0 2 1 7 A 2 号、同第 W O 2 0 0 5 / 0 7 0 9 6 3 A 1 号、同第 W O 2 0 0 5 / 0 7 7 9 8 1 A 2 号、同第 W O 2 0 0 5 / 0 9 2 9 2 5 A 2 号、同第 W O 2 0 0 5 / 1 2 3 7 8 0 A 2 号、同第 W O 2 0 0 6 / 0 1 9 4 4 7 A 1 号、同第 W O 2 0 0 6 / 0 4 7 3 5 0 A 2 号、及び同第 W O 2 0 0 6 / 0 8 5 9 6 7 A 2 号、ならびに米国特許第 5, 6 4 8, 2 6 0 号、同第 5, 7 3 9, 2 7 7 号、同第 5, 8 3 4, 2 5 0 号、同第 5, 8 6 9, 0 4 6 号、同第 6, 0 9 6, 8 7 1 号、同第 6, 1 2 1, 0 2 2 号、同第 6, 1 9 4, 5 5 1 号、同第 6, 2 4 2, 1 9 5 号、同第 6, 2 7 7, 3 7 5 号、同第 6, 5 2 8, 6 2 4 号、同第 6, 5 3 8, 1 2 4 号、同第 6, 7 3 7, 0 5 6 号、同第 6, 8 2 1, 5 0 5 号、同第 6, 9 9 8, 2 5 3 号、及び同第 7, 0 8 3, 7 8 4 号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるアミノ酸置換のうちのいずれか 1 つを含み得る。

10

【0448】

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

20

【0449】

「二重特異性抗体 (d i a b o d y)」は、2 つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片である。断片は、同じポリペプチド鎖 ($V_H - V_L$ または $V_L - V_H$) 中に軽鎖可変ドメイン (V_L) に接続された重鎖可変ドメイン (V_H) を含む。同じ鎖上の 2 つのドメインをペアリングするには短すぎるリンカーを使用すると、ドメインは別のチェーンの相補ドメインとペアリングさせられ、2 つの抗原結合部位が作成される。二重特異性抗体は、例えば、欧州特許第 E P 4 0 4, 0 9 7 号、国際特許公開第 W O 9 3 / 1 1 1 6 1 号、及び Bolliger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90, 6444-6448 においてより完全に記載されている。

【0450】

「グリコシル化」という用語は、抗体の修飾誘導体を指す。非グリコシル化抗体は、グリコシル化を欠いている。グリコシル化は、例えば、抗原に対する抗体の親和性を増加させるように変化され得る。かかる炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内の 1 つ以上のグリコシル化部位を変化させることによって達成され得る。例えば、1 つ以上の可変領域フレームワークのグリコシル化部位の排除をもたらす、1 つ以上のアミノ酸置換を行い、それによってその部位でのグリコシル化を排除することができる。米国特許第 5, 7 1 4, 3 5 0 号及び同第 6, 3 5 0, 8 6 1 号に記載されているように、非グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増加させる可能性がある。加えてまたは代替的に、改変した種類のグリコシル化を有する抗体、例えば、フコシル残基の量が低減した低フコシル化抗体または二分 G l c N a c 構造が増加した抗体が作製され得る。かかるグリコシル化パターンの変化は、抗体の能力を増加させることが実証されている。かかる炭水化物修飾は、例えば、抗体をグリコシル化機構が変化した宿主細胞で発現させることによって達成され得る。グリコシル化機構が変化した細胞については、当該技術分野で説明されており、本発明の組換え抗体を発現させ、それによりグリコシル化が変化した抗体を生成する宿主細胞として使用され得る。例えば、M s 7 0 4、M s 7 0 5、及び M s 7 0 9 細胞株で発現される抗体が、それらの炭水化物上のフコースを欠くように、細胞株 M s 7 0 4、M s 7 0 5、及び M s 7 0 9 は、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子 F U T 8 (アルファ (1, 6) フコシルトランスフェラーゼ) を欠く。M s 7 0 4、M s 7 0 5、及び M s 7 0 9 F U T 8 - / - 細胞株は、2 つの置換ベクターを使用した C H O / D G 4 4 細胞中の F U T 8 遺伝子の標的破壊によって作成された（例えば、米国特許公開第 2 0 0 4 / 0 1 1 0 7 0 4 号または Y a m a n e - O h n u k i, et al., Biotechnol. Bio

30

40

50

eng., 2004, 87, 614-622を参照)。別の例として、欧州特許第EP 1, 176, 195号は、フコシルトランスフェラーゼをコードし、それによりかかる細胞株で発現される抗体が、アルファ1, 6結合関連酵素を低減または排除することによって低フコシル化を示す、機能的に破壊されたFUT8遺伝子を有する細胞株を説明しており、抗体のFc領域に結合するN-アセチルグルコサミンにフコースを付加するための酵素活性が低いか、または酵素活性を有しない細胞株、例えばラット骨髄腫細胞株YB2/0 (ATCC CRL 1662)についても説明している。国際特許公開第WO 03/035835号は、フコースをAsn(297)結合型炭水化物に結合させる能力が低減し、更にその宿主細胞で発現される抗体の低フコシル化ももたらすバリエーションCHO細胞株、Lec 13細胞について説明している(Shields, et al., J. Biol. Chem. 2002, 277, 26733-26740も参照)。国際特許公開第WO 99/54342号は、糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ(例えば、ベータ(1, 4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIIII(GnTIIII))を発現するように操作され、それにより操作された細胞株で発現される抗体が、二分性GlcNac構造の増加を示し、抗体のADCC活性の増加をもたらす、細胞株について記載している(Umana, et al., Nat. Biotech. 1999, 17, 176-180も参照)。代替的に、抗体のフコース残基は、フコシダーゼ酵素を使用して、切断され得る。例えば、フコシダーゼアルファ-L-フコシダーゼは、Tarentino, et al., Biochem. 1975, 14, 5516-5523に記載されているように、抗体からフコシル残基を除去する。

10

20

【0451】

「ペグ化」は、1つ以上のPEG基が抗体または抗体断片に付着する条件下で、PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体などのポリエチレングリコール(PEG)と反応させる、修飾抗体またはその断片を指す。ペグ化は、例えば、抗体の生物学的(例えば、血清)半減期を増加させることができる。好ましくは、ペグ化は、反応性PEG分子(または類似の反応性水溶性ポリマー)とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実行される。本明細書で使用される場合、「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ(C₁-C₁₀)アルコキシーもしくはアリーールオキシーポリエチレングリコール、またはポリエチレングリコール-マレイミドなどの、他のタンパク質を誘導体化するために使用されているPEGの形態のうちのいずれかを包含することが意図される。ペグ化される抗体は、非グリコシル化抗体であり得る。ペグ化のための方法は、当該技術分野で知られており、例えば欧州特許第EP 0154316号及び同第EP 0401384号、ならびに米国特許第5, 824, 778号(各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているように、本発明の抗体に適用することができる。

30

【0452】

「バイオシミラー」という用語は、モノクローナル抗体またはタンパク質を含む、臨床的に不活性な成分にわずかな違いがあるにもかかわらず、米国で認可された参照生物学的生成物と非常に類似しており、生成物の安全性、純度、及び効力に関して生物学的生成物と参照生成物との間に臨床的に意味のある差異がない、生物学的生成物を意味する。欧州では、類似のバイオまたは「バイオシミラー」医薬品は、欧州医薬品庁によって既に使用が許可されている別のバイオ医薬品に類似したバイオ医薬品である。「バイオシミラー」という用語は、他の国及び地域の規制機関によっても同義的に使用されている。生物学的生成物またはバイオ医薬品は、細菌または酵母などの生物源によって作製された、またはそれに由来する医薬品である。それらは、ヒトインスリンもしくはエリスロポエチンなどの比較的小さな分子、またはモノクローナル抗体などの複雑な分子からなり得る。例えば、参照IL-2タンパク質がアルデスロイキン(PROLEUKIN)である場合、アルデスロイキンに関して薬物規制当局によって承認されたタンパク質は、アルデスロイキンの「バイオシミラー」であるか、またはアルデスロイキンの「そのバイオシミラー」である。欧州では、類似のバイオまたは「バイオシミラー」医薬品は、欧州医薬品庁(EMA)によって既に使用が許可されている別のバイオ医薬品に類似したバイオ医薬品である。

40

50

欧州における同様の生物学的用途に関連する法的根拠は、補正された Regulation (EC) No 726 / 2004 の第 6 条及び Directive 2001 / 83 / EC の第 10 (4) 条であり、したがって欧州では、バイオシミラーは、Regulation (EC) No 726 / 2004 の第 6 条及び Directive 2001 / 83 / EC の第 10 (4) 条の下で、認可または認可申請の対象について認可、承認され得る。既に認可されているオリジナルのバイオ医薬品は、欧州では「参照医薬品」と称され得る。バイオシミラーとみなされる生成物に対する要件のうちのいくつかは、バイオシミラー医薬品に関する CHMP ガイドラインに概説されている。更に、モノクローナル抗体バイオシミラーに関連するガイドラインを含む生成物固有のガイドラインは、EMA によって生成物毎に提供され、そのウェブサイトで公開されている。本明細書に記載のバイオシミラーは、品質特徴、生物活性、作用機序、安全性プロファイル、及び／または有効性の点で、参照医薬品に類似している可能性がある。更に、バイオシミラーは、参照医薬品と同じ状態を治療するために使用され得るか、または使用を意図され得る。したがって、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した品質特徴を有するとみなされ得る。代替的に、または更に、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した生物活性を有するとみなされ得る。代替的に、または更に、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した安全性プロファイルを有するとみなされ得る。代替的に、または更に、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した効力を有するとみなされ得る。本明細書に記載されているように、欧州におけるバイオシミラーは、EMA によって認可された参照医薬品と比較される。しかしながら、場合によっては、バイオシミラーは、特定の研究で欧州経済領域外で認可されたバイオ医薬品（EEA 認可されていない「コンパレーター」）と比較される場合がある。かかる研究には、例えば、特定の臨床研究及びインビボ非臨床研究が含まれる。本明細書で使用される場合、「バイオシミラー」という用語は、EEA 認可されていないコンパレーターと比較された、または比較され得るバイオ医薬品にも関する。特定のバイオシミラーは、抗体、抗体断片（例えば、抗原結合部分）、及び融合タンパク質などのタンパク質である。タンパク質バイオシミラーは、ポリペプチドの機能に有意な影響を及ぼさない、アミノ酸構造にわずかな修飾（例えば、アミノ酸の欠失、付加、及び／または置換を含む）を有するアミノ酸配列を有し得る。バイオシミラーは、その参照医薬品のアミノ酸配列に対して 97 % 以上、例えば、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。バイオシミラーは、その違いが医薬品の安全性及び／または有効性の変化をもたらさないならば、1 つ以上の翻訳後修飾、例えば、限定されないが、参照医薬品の翻訳後修飾とは異なる、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び／または切断を含み得る。バイオシミラーは、参照医薬品と同一または異なるグリコシル化パターンを有し得る。特に、排他的ではないが、バイオシミラーは、その違いが参照医薬品に関連する安全性の懸念に対処するか、対処することを意図している場合、異なるグリコシル化パターンを有し得る。加えて、バイオシミラーは、医薬品の安全性及び有効性が損なわれないならば、例えば、その強度、剤形、配合物、賦形剤、及び／または提示において参照医薬品から逸脱する可能性がある。バイオシミラーは、参照医薬品と比較して、例えば薬物動態（PK）及び／または薬力学的（PD）プロファイルの違いを含み得るが、それでも、認可される、または認可に適しているとみなされるように、参照医薬品と十分に類似しているとみなされる。特定の状況において、バイオシミラーは、参照医薬品と比較して異なる結合特徴を示し、異なる結合特徴は、EMA などの規制当局によって類似の生物学的生成物としての認可の障壁ではないとみなされる。「バイオシミラー」という用語は、他の国及び地域の規制機関によっても同義的に使用されている。

10

20

30

40

50

【0453】

II. Gen 2 TIL 製造プロセス

これらの特徴のうちのいくつかを含む、Gen 2 として知られる（プロセス 2 A としても知られる）TIL プロセスの例示的なファミリーが、図 1 及び 2 に示される。Gen 2

の実施形態を図 2 に示す。

【0454】

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

【0455】

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

【0456】

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

【0457】

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

【0458】

A. ステップ A : 患者の腫瘍試料を取得する

一般に、T I L は、最初に患者の腫瘍試料から取得され、その後、本明細書に記載される更なる操作のためにより大きい集団に拡大され、任意選択的に凍結保存され、本明細書に概説されるように再刺激され、任意選択的に T I L 健康の指標として表現型及び代謝パラメータについて評価される。

【0459】

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

【0460】

取得された時点で、腫瘍試料は、一般に、鋭的解剖を使用して 1 ~ 約 8 mm³ の小片に断片化され、約 2 ~ 3 mm³ が特に有用である。いくつかの実施形態では、T I L は、酵素腫瘍消化物を使用してこれらの断片から培養される。かかる腫瘍消化物は、酵素培地 (例えば、R o s w e l l P a r k M e m o r i a l I n s t i t u t e (R P M I

10

20

30

40

50

）1640緩衝液、2mMグルタメート、10mcg/mLゲンタマイシン、30単位/mL DNase、及び1.0mg/mLコラゲナーゼ）中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（例えば、組織解離機を使用する）によって生成され得る。腫瘍消化物は、腫瘍を酵素培地に入れ、腫瘍をおよそ1分間機械的に解離させ、続いて5%CO₂中37℃で30分間インキュベートし、続いて小さな組織片のみが存在するまで、前述の条件下で機械的解離及びインキュベーションのサイクルを繰り返すことによって生成することができる。このプロセスの終了時に、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、FICOLL分岐親水性多糖を使用した密度勾配分離は、これらの細胞を除去するために、行われ得る。米国特許出願公開第2012/0244133A1号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものなどの当該技術分野で知られている代替の方法を使用することができる。前述の方法のうちのいずれかが、TILを拡大する方法またはがんを治療する方法について本明細書に記載される実施形態のうちのいずれかにおいて使用され得る。

10

【0461】

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

20

【0462】

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

【0463】

いくつかの事例では、コラゲナーゼ（アニマルフリー1型コラゲナーゼなど）を、10mLの滅菌HBSSまたは別の緩衝液で再構成する。凍結乾燥ストック酵素は、2892PZ U/バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、5mL~15mLの緩衝液中で再構成される。いくつかの実施形態では、再構成後のコラゲナーゼストックは、約100PZ U/mL~約400PZ U/mLの範囲、例えば、約100PZ U/mL~約400PZ U/mL、約100PZ U/mL~約350PZ U/mL、約100PZ U/mL~約300PZ U/mL、約150PZ U/mL~約400PZ U/mL、約100PZ U/mL、約150PZ U/mL、約200PZ U/mL、約210PZ U/mL、約220PZ U/mL、約230PZ U/mL、約240PZ U/mL、約250PZ U/mL、約260PZ U/mL、約270PZ U/mL、約280PZ U/mL、約289.2PZ U/mL、約300PZ U/mL、約350PZ U/mL、または約400PZ U/mLである。

30

【0464】

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

40

50

【0465】

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

【0466】

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

【0467】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、約4.7 mLの滅菌HBSS中に約10.2 uLの中性プロテアーゼ（0.36 DMCU／mL）、21.3 μLのコラゲナーゼ（1.2 PZ／mL）及び250 uLのDNAse I（200 U／mL）を含む。

【0468】

上に示されるように、いくつかの実施形態では、TILは、固形腫瘍に由来する。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、断片化されない。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は断片化されず、全腫瘍として酵素消化に供される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、DNAse、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、DNAse、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で1～2時間消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、DNAse、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で1～2時間、37℃、5% CO₂で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、DNAse、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で1～2時間、37℃、5% CO₂で回転を伴って消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、一定の回転を伴って一晚消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、37℃、5% CO₂で一定の回転を伴って一晚消化される。いくつかの実施形態では、全腫瘍が酵素と組み合わせられて、腫瘍消化反応混合物が形成される。

【0469】

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

【0470】

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

【0471】

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

【0472】

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

【0473】

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

【0474】

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

【0475】

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

【0476】

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

【0477】

腫瘍が固形腫瘍であるいくつかの実施形態では、腫瘍試料が、例えば、ステップA（図1に提供される）で取得された後、腫瘍は物理的断片化を受ける。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存前に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存後に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、腫瘍を得た後に、いずれの凍結保存もない場合に起こる。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、10、20、30、40個またはそれ以上の断片または小片が、第1の拡大のために各容器内に配置される。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、30または40個の断片または小片が、第1の拡大のために各容器内に配置される。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、40個の断片または小片が、第1の拡大のために各容器内に配置される。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約4～約50個の断片を含み、各断片は、約 27 mm^3 の体積を有する。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約 1300 mm^3 ～約 1500 mm^3 の総体積を有する約30～約60個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約 1350 mm^3 の総体積を有する約50個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約1グラム～約1.5グラムの総質量を伴う約50個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約4個の断片を含む。

【0478】

いくつかの実施形態では、TILは、腫瘍断片から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、鋭的解剖によって取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 1 mm^3 ～ 10 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 1 mm^3 ～ 8 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 1 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 2 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 3 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 4 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 5 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 6 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 7 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 8 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 9 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 10 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、 $1\sim 4\text{ mm}\times 1\sim 4\text{ mm}\times 1\sim 4\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、 $1\text{ mm}\times 1\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、 $2\text{ mm}\times 2\text{ mm}\times 2\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、 $3\text{ mm}\times 3\text{ mm}\times 3\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、 $4\text{ mm}\times 4\text{ mm}\times 4\text{ mm}$ である。

【0479】

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

【0480】

いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、腫瘍の内部構造を維持するために行われる。いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、メスでのこ引き動作を行うことなく行われる。いくつかの実施形態では、TILは、腫瘍消化物から取得される。いくつかの実施形

10

20

30

40

50

態では、腫瘍消化物は、例えば、RPMI 1640 (2mM GlutaMAX、10mg/mL ゲンタマイシン、30U/mL DNase、及び1.0mg/mL コラゲナーゼ) であるが、これに限定されない酵素培地中でのインキュベーション、続いて、機械的解離 (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA) によって生成された。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍は、およそ1分間機械的に解離され得る。その後、溶液が5% CO₂ 中37℃で30分間インキュベートされ、その後、およそ1分間再び機械的に破壊され得る。5% CO₂ 中37℃で30分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ1分間、3回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きい組織片が存在する場合、3回目の機械的破壊後、5% CO₂ 中37℃で更に30分間インキュベートするかにかかわらず、1回または2回の追加の機械的解離が試料に適用された。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、Ficollを使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。

10

【0481】

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

【0482】

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

20

【0483】

1. 胸水T細胞及びTIL

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

【0484】

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

30

40

【0485】

いくつかの実施形態では、胸腔内液は、患者から直接除去された未処理の形態である。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、更なる処理ステップの前に、EDTAまたはヘパリンチューブなどの標準的な採血管に入れられる。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、更なる処理ステップの前に、標準的なCell Save (登録商標) チューブ (Veridex) に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、生存TILの数の減少を避けるために、患者から採取した直後にCell Save チューブに入れられる。生存TILの数は、4℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置されると、24

50

時間以内に大幅に減少する可能性がある。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの除去後 1 時間、5 時間、10 時間、15 時間、または最大 24 時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、4℃で、患者からの除去後 1 時間、5 時間、10 時間、15 時間、または最大 24 時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

【0486】

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

【0487】

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

【0488】

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

【0489】

いくつかの実施形態では、胸腔内液試料（例えば、未処理の胸腔内液を含む）、希釈胸水、または再懸濁細胞ペレットは、試料中に存在する無核赤血球を特異的に溶解する溶解試薬と接触させる。いくつかの実施形態では、このステップは、胸腔内液がかなりの数の RBC を含む状況で、更なる処理ステップの前に行われる。好適な溶解試薬には、単一の溶解試薬もしくは溶解試薬及びクエンチ試薬、または溶解剤、クエンチ試薬及び固定試薬が含まれる。好適な溶解システムは市販されており、BD Pharm Lyse（商標）システム（Becton Dickinson）が含まれる。他の溶解システムには、VersaLyse（商標）システム、FACS Lyse（商標）システム（Becton Dickinson）、Immunoprep（商標）システム、または Eryth

rolyse IIシステム (Beckman Coulter, Inc.)、または塩化アンモニウムシステムが含まれる。いくつかの実施形態では、溶解試薬は、赤血球の効率的な溶解、ならびに胸水におけるTIL及びTILの表現型特性の保存のような主要な要件によって異なり得る。溶解のための単一の試薬を利用することに加えて、本明細書に記載の方法に有用な溶解システムは、第2の試薬、例えば、方法の残りのステップ中に溶解試薬の効果をクエンチまたは遅延させるもの、例えばStabilys (商標) 試薬 (Beckman Coulter, Inc.) を含むことができる。溶解試薬の選択または方法の好ましい実施に応じて、従来の固定試薬を使用することもできる。

【0490】

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

【0491】

B. ステップB：第1の拡大

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

【0492】

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

つかの実施形態では、T細胞受容体（TCR）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、T細胞受容体（TCR）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、TCR $\alpha\beta$ （すなわち、TCR α/β ）の発現が増加する。

【0493】

例えば、図1のステップAに記載されるものなどの腫瘍断片の解剖または消化後に、結果として得られた細胞は、腫瘍及び他の細胞よりもTILの成長を好む条件下で、IL-2を含む血清中で培養される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、6000 IU/mLのIL-2を有する不活性化ヒトAB血清を含む培地中2 mLのウェル中でインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に3～14日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 個のバルクTIL細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、7～14日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 個のバルクTIL細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、10～14日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 個のバルクTIL細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、約11日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 個のバルクTIL細胞を生じる。

【0494】

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

【0495】

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

【0496】

いくつかの実施形態では、第1の拡大培養培地は、培養培地の略語である「CM」と称される。いくつかの実施形態では、ステップBのCMは、10%ヒトAB血清、25 mM HEPES、及び10 mg/mL ゲンタマイシンを補充した、GLUTAMAXを含むRPMI 1640からなる。培養物が40 mL容量及び 10 cm^2 ガス透過性シリコン底部（例えば、G-REX 10、Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN）を有するガス透過性フラスコ内で開始される実施形態では、各フラスコに、IL-2を含む10～40 mLのCM中の $10 \sim 40 \times 10^6$ 個の生きた腫瘍消化細胞または5～30個の腫瘍断片を装填した。G-REX 10及び24ウェルプレートの両方を、5% CO₂中37°Cの加湿インキュベーター内でインキュベートし、培養開始から5日後、培地の半分を取り除き、新たなCM及びIL-2と交換し、5日後、培地の半分を2～3日毎に交換した。

【0497】

腫瘍断片の調製後、結果として得られた細胞（すなわち、断片）は、腫瘍及び他の細胞よりもTILの成長を好む条件下で、IL-2を含む血清中で培養される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、6000 IU/mLのIL-2を有する不活性化ヒトAB血清を含む培地中2 mLのウェル中（または、いくつかの事例では、本明細書で概説されるように、APC細胞集団の存在下）でインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日

間、一般に10～14日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 個のバルクTIL細胞を生じる。いくつかの実施形態では、第1の拡大中の成長培地は、IL-2またはそのバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、ILは、組換えヒトIL-2 (rhIL-2) である。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、1mgバイアルにつき $20 \sim 30 \times 10^6$ IU/mgの比活性を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、1mgバイアルにつき 20×10^6 IU/mgの比活性を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、1mgバイアルにつき 25×10^6 IU/mgの比活性を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、1mgバイアルにつき 30×10^6 IU/mgの比活性を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、 $4 \sim 8 \times 10^6$ IU/mgのIL-2の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、 $5 \sim 7 \times 10^6$ IU/mgのIL-2の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、 6×10^6 IU/mgのIL-2の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、実施例5に記載されるように調製される。いくつかの実施形態では、第1の拡大培養培地は、約10,000 IU/mLのIL-2、約9,000 IU/mLのIL-2、約8,000 IU/mLのIL-2、約7,000 IU/mLのIL-2、約6,000 IU/mLのIL-2、または約5,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡大培養培地は、約9,000 IU/mLのIL-2～約5,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡大培養培地は、約8,000 IU/mLのIL-2～約6,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡大培養培地は、約7,000 IU/mLのIL-2～約6,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡大培養培地は、約6,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-2を更に含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約3,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-2を更に含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約3,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約1,000 IU/mL、約1,500 IU/mL、約2,000 IU/mL、約2,500 IU/mL、約3,000 IU/mL、約3,500 IU/mL、約4,000 IU/mL、約4,500 IU/mL、約5,000 IU/mL、約5,500 IU/mL、約6,000 IU/mL、約6,500 IU/mL、約7,000 IU/mL、約7,500 IU/mL、または約8,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、1,000～2,000 IU/mL、2,000～3,000 IU/mL、3,000～4,000 IU/mL、4,000～5,000 IU/mL、5,000～6,000 IU/mL、6,000～7,000 IU/mL、7,000～8,000 IU/mL、または約8,000 IU/mLのIL-2を含む。

10

20

30

40

50

【0498】

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

【0499】

いくつかの実施形態では、第1の拡大培養培地は、約20 IU/mLのIL-21、約15 IU/mLのIL-21、約12 IU/mLのIL-21、約10 IU/mLのIL-21、約5 IU/mLのIL-21、約4 IU/mLのIL-21、約3 IU/mLのIL-21、約2 IU/mLのIL-21、約1 IU/mLのIL-21、または約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡大培養培地は、約20 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡大培養培地は、約15 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡大培養培地は、約12 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡大培養培地は、約10 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡大培養培地は、約5 IU/mLのIL-21～約1 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡大培養培地は、約2 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約1 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-21を更に含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約1 IU/mLのIL-21を含む。

10

【0500】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、抗CD3アゴニスト抗体、例えば、OKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約30 ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL、及び約1 µg/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、0.1 ng/mL～1 ng/mL、1 ng/mL～5 ng/mL、5 ng/mL～10 ng/mL、10 ng/mL～20 ng/mL、20 ng/mL～30 ng/mL、30 ng/mL～40 ng/mL、40 ng/mL～50 ng/mL、及び50 ng/mL～100 ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、OKT-3抗体を含まない。いくつかの実施形態では、OKT-3抗体は、ムロモナブである。例えば、表1を参照されたい。

20

30

【0501】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、細胞培養培地中に1つ以上のTNFRSFアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、4-1BBアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは4-1BBアゴニストであり、4-1BBアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、EU-101、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリエーション、バイオシミラー、及び組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、0.1 µg/mL～100 µg/mLの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、20 µg/mL～40 µg/mLの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。

40

【0502】

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

【0503】

いくつかの実施形態では、第1の拡大培養培地は、培養培地の略語である「CM」と称される。いくつかの実施形態では、それは、CM1（培養培地1）と称される。いくつか

50

の実施形態では、CMは、10%ヒトAB血清、25mM Hepes、及び10mg/mLゲンタマイシンを補充した、GlutaMAXを含むRPMI1640からなる。培養物が40mL容量及び10cm²ガス透過性シリコン底部（例えば、G-R EX10、Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN）を有するガス透過性フラスコ内で開始される実施形態では、IL-2を含む10~40mLのCM中の10~40×10⁶個の生きた腫瘍消化細胞または5~30個の腫瘍断片を、各フラスコに入れた。G-R EX10及び24ウェルプレートの両方を、5%CO₂中37℃の加湿インキュベーター内でインキュベートし、培養開始から5日後、培地の半分を取り除き、新たなCM及びIL-2と交換し、5日後、培地の半分以上を2~3日毎に交換した。いくつかの実施形態では、CMは、実施例に記載されるCM1であり、実施例1を参照されたい。いくつかの実施形態では、第1の拡大は、初期細胞培養培地または第1の細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、初期細胞培養培地または第1の細胞培養培地は、IL-2を含む。

10

20

30

40

50

【0504】

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

【0505】

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

とができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡大は、11日間続行することができる。

【0506】

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

10

【0507】

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

【0508】

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

20

【0509】

1. サイトカイン及び他の添加物

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

30

代替的に、TILの急速拡大及びまたは第2の拡大のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第US 2017/0107490 A1号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、IL-2、IL-15及びIL-21のうちの2つ以上の組み合わせを用いて追加として可能である。したがって、可能な組み合わせには、IL-2及びIL-15、IL-2及びIL-21、IL-15及びIL-21、ならびにIL-2またはIL-15及びIL-21が含まれ、後者は、多くの実施形態において特定の用途を見出す。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにT細胞の生成に特に有利に働く。

【0510】

いくつかの実施形態では、ステップBはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、OKT-3抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ステップBはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、4-1BBアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップBはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、OX-40アゴニストの、培養培地への添加を含み得る。他の実施形態では、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（PPAR）-ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーター-1αアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第US 2019/0307796 A1号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップB中の培養培地で使用されてもよい。

40

【0511】

50

C. ステップC：第1の拡大から第2の拡大へと移行

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

【0512】

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

【0513】

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

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

10

【0514】

いくつかの実施形態では、TILは、第1の拡大後及び第2の拡大前に保存されず、TILは、第2の拡大に直接進む（例えば、いくつかの実施形態では、図1に示されるステップBからステップDへの移行中に保存されない）。いくつかの実施形態では、移行は、本明細書に記載されるように、閉鎖されたシステム内で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡大由来のTILである第2のTIL集団は、移行期間なしで第2の拡大に直接進む。

【0515】

いくつかの実施形態では、第1の拡大から第2の拡大への移行、例えば、図1によるステップCは、閉鎖されたシステムバイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖されたシステムがTIL拡大のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、G-R E X-10またはG-R E X-100バイオリアクターである。いくつかの実施形態では、閉鎖されたシステムバイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

20

【0516】

D. ステップD：第2の拡大

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

30

【0517】

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

40

【0518】

いくつかの実施形態では、第2の拡大は、本開示の方法（例えば、R E Pと称される拡

50

大、ならびに図1のステップDに示されるプロセスを含む)を使用して、ガス透過性容器内で行われ得る。例えば、TILは、インターロイキン-2(IL-2)またはインターロイキン-15(IL-15)の存在下で非特異的T細胞受容体刺激を使用して、急速に拡大され得る。非特異的T細胞受容体刺激は、例えば、抗CD3抗体、例えば約30 ng/mLのOKT3、マウスモノクローナル抗CD3抗体(Ortho-McNeil, Raritan, NJもしくはMiltenyi Biotech, Auburn, CAから市販)またはUHCT-1(BioLegend, San Diego, CA, USAから市販)を含み得る。TILは、がんのエピトープ(複数可)などの抗原性部分を含む、第2の拡大中に1つ以上の抗原を含むことによって、インビトロでTILの更なる刺激を誘導するように拡大され得、これは、ベクター、例えば、ヒト白血球抗原A2(HLA-A2)結合ペプチド、例えば、0.3 μMのMART-1:26-35(27L)またはgp100:209-217(210M)から、任意選択的に、300 IU/mLのIL-2またはIL-15などのT細胞成長因子の存在下で任意選択的に発現され得る。他の好適な抗原には、例えば、NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、チロシナーゼがん抗原、MAGE-A3、SSX-2、及びVEGFR2、またはそれらの抗原性部分が含まれ得る。TILは、HLA-A2を発現する抗原提示細胞にパルスされたがんの同じ抗原(複数可)で再刺激することによっても急速に拡大され得る。代替的に、TILは、例えば、例として照射された自己リンパ球または照射されたHLA-A2+同種異系リンパ球及びIL-2で更に再刺激され得る。いくつかの実施形態では、再刺激は、第2の拡大の一部として起こる。いくつかの実施形態では、第2の拡大は、照射された自己リンパ球の存在下で、または照射されたHLA-A2+同種異系リンパ球及びIL-2を用いて起こる。

10

20

30

40

50

【0519】

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

【0520】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、OKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約30 ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL、及び約1 μg/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、0.1 ng/mL~1 ng/mL、1 ng/mL~5 ng/mL、5 ng/mL~10 ng/mL、10 ng/mL~20 ng/mL、20 ng/mL~30 ng/mL、30 ng/mL~40 ng/mL、40 ng/mL~50 ng/mL、及び50 ng/mL~100 ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、OKT-3抗体を含まない。いくつかの実施形態では、OKT-3抗体は、ムロモナブである。

【0521】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、細胞培養培地中に1つ以上のTNFRSFアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、4-1BBアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは4-1BBアゴニストであり、4-1BBアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、EU-101、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリエーション、バイオシミラー、及び組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、 $20 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 40 \mu\text{g}/\text{mL}$ の細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。

【0522】

10

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

【0523】

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

20

【0524】

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

30

【0525】

いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約 $500 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15、約 $400 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15、約 $300 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15、約 $200 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15、約 $180 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15、約 $160 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15、約 $140 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15、約 $120 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15、または約 $100 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約 $500 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15～約 $100 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約 $400 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15～約 $100 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約 $300 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15～約 $100 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約 $200 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約 $180 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-15を更に含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約 $180 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15を含む。

40

【0526】

いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約 $20 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-21、約 $15 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-21、約 $12 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-21、約 $10 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL

50

－21、約5 IU/mLのIL-21、約4 IU/mLのIL-21、約3 IU/mLのIL-21、約2 IU/mLのIL-21、約1 IU/mLのIL-21、または約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約20 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約15 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約12 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約10 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約5 IU/mLのIL-21～約1 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約2 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約1 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-21を更に含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約1 IU/mLのIL-21を含む。

10

【0527】

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

20

【0528】

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

30

【0529】

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

【0530】

いくつかの実施形態では、REP及び／または第2の拡大は、以前に記載されたT-175フラスコ及びガス透過性バッグ（Tran, et al., J. Immunother. 2008, 31, 742-51、Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42）またはガス透過性培養器具（例えば、G-REXフラスコ）を使用して行われ得る。いくつかの実施形態では、第2の拡大（急速拡大と称される拡大を含む）は、T-175フラスコ内で行われ、150 mLの培地に懸濁された約 1×10^6 個のTILが、各T-175フラスコに添加され得る。TILは、3000 IU/mLのIL-2及び30 ng/mLの抗CD3を補充した、1：1のCMとAIM-V培地との混合物中で培養され得る。T-175フラスコを、5% CO₂中37℃でインキュベートすることができる。培地の半分を、3000 IU/mLのIL-2を含む50/50培地を使用して5日目に交換することができる。いくつかの実施形態では、7日目に、2つのT-175フラスコからの細胞が3 Lバッグ内で組み合わせられ得、5%ヒトAB血清及び3000 IU/mLのIL-2を含む300 mLのAIM-Vが、3

40

50

00 mLのTIL懸濁液に添加された。各バッグ内の細胞の数を、毎日または隔日カウントし、新鮮な培地を添加して、 $0.5 \sim 2.0 \times 10^6$ 細胞/mLの細胞数を維持した。

【0531】

いくつかの実施形態では、第2の拡大（REPと称される拡大、ならびに図1のステップDで参照される拡大を含み得る）は、100 cmのガス透過性シリコン底部（G-REX-100、Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USAから市販されている）を有する500 mL容量のガス透過性フラスコ内で行われ得る。 5×10^6 または 10×10^6 個のTILは、5%ヒトAB血清、3000 IU/mLのIL-2、及び30 ng/mLの抗CD3（OKT3）を補充した400 mLの50/50培地中、PBMCで培養され得る。G-REX-100フラスコを、5%CO₂中37℃でインキュベートすることができる。5日目に、250 mLの上清が除去され、遠心分離ボトルに入れられ、1500 rpm（ $491 \times g$ ）で10分間遠心分離され得る。TILペレットが、5%ヒトAB血清、3000 IU/mLのIL-2を含む150 mLの新鮮培地で再懸濁され、元のG-REX-100フラスコに戻し追加され得る。TILがG-REX-100フラスコ内で連続的に拡大される場合、7日目に、各G-REX-100内のTILを、各フラスコに存在する300 mLの培地に懸濁させてもよく、細胞懸濁液を3つの100 mLアリコートに分割してもよく、それを使用して3つのG-REX-100フラスコに播種してもよい。その後、5%ヒトAB血清及び3000 IU/mLのIL-2を含む150 mLのAIM-Vが各フラスコに添加されてもよい。G-REX-100フラスコが5%CO₂中37℃でインキュベートされ得、4日後に、3000 IU/mLのIL-2を含む150 mLのAIM-Vが、各G-REX-100フラスコに添加され得る。培養14日目に、細胞が採取され得る。

【0532】

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

【0533】

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

【0534】

任意選択的に、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準的なアッセイを使用して、第2の拡大（REP拡大と称される拡大を含む）後に行われ得る。例えば、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンプルー排除アッセイが、バルクTILの試料上で行われ得る。いくつかの実施形態では、TIL試料は、Cellometer K2自動セルカウンター（Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA）を使用して計数され、生存率が決定され得る。いくつかの実施形態では、生存率は、標準のCellometer K2 Image Cytometer Automatic Cell Counterプロトコルに従って決定される。

【0535】

いくつかの実施形態では、TILの第2の拡大（REPと称される拡大を含む）は、以前に記載されているT-175フラスコ及びガス透過性バッグ（Tran, et al., 2008, J Immunother., 31:742-751及びDudley, e

10

20

30

40

50

t a l . 2 0 0 3 , J I m m u n o t h e r . , 2 6 : 3 3 2 - 3 4 2) またはガス透過性 G - R E X フラスコを使用して行われ得る。いくつかの実施形態では、第 2 の拡大は、フラスコを使用して行われる。いくつかの実施形態では、第 2 の拡大は、ガス透過性 G - R E X フラスコを使用して行われる。いくつかの実施形態では、第 2 の拡大は、T - 1 7 5 フラスコ内で行われ、約 1×10^6 個の T I L が約 1 5 0 m L の培地に懸濁され、これが各 T - 1 7 5 フラスコに添加される。T I L は、「フィーダー」細胞として 1 対 1 0 0 の比で照射された (5 0 G y) 同種異系 P B M C とともに培養され、細胞が、3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 及び 3 0 n g / m L の抗 C D 3 を補充した、1 : 1 の C M と A I M - V 培地との混合物 (5 0 / 5 0 培地) 中で培養された。T - 1 7 5 フラスコを、5 % C O ₂ 中 3 7 ° C でインキュベートする。いくつかの実施形態では、培地の半分が、3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 を含む 5 0 / 5 0 培地を使用して 5 日目に交換される。いくつかの実施形態では、7 日目に、2 つの T - 1 7 5 フラスコからの細胞が 3 L バッグ内で組み合わせられ、5 % ヒト A B 血清及び 3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 を含む 3 0 0 m L の A I M - V が、3 0 0 m L の T I L 懸濁液に添加される。各バッグ内の細胞の数が毎日または隔日計数され得、新鮮な培地が添加されて、約 0 . 5 ~ 約 2 . 0 $\times 10^6$ 細胞 / m L の細胞数を維持することができる。

10

【 0 5 3 6 】

いくつかの実施形態では、第 2 の拡大 (R E P と称される拡大を含む) は、1 0 0 c m ² のガス透過性シリコン底部 (G - R E X - 1 0 0 , W i l s o n W o l f) を有する 5 0 0 m L 容量のフラスコ内で行われ、約 5×10^6 または 10×10^6 個の T I L が、3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 及び 3 0 n g / m L の抗 C D 3 を補充した、4 0 0 m L の 5 0 / 5 0 培地中、1 対 1 0 0 の比で照射された同種異系 P B M C と培養される。G - R E X - 1 0 0 フラスコを、5 % C O ₂ 中 3 7 ° C でインキュベートする。いくつかの実施形態では、5 日目に、2 5 0 m L の上清が除去され、遠心分離ボトルに入れられ、1 5 0 0 r p m (4 9 1 g) で 1 0 分間遠心分離される。その後、T I L ペレットが、3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 を含む 1 5 0 m L の新鮮な 5 0 / 5 0 培地に再懸濁され、元の G - R E X - 1 0 0 フラスコに戻し添加され得る。T I L が G - R E X - 1 0 0 フラスコ内で連続的に拡大される実施形態では、7 日目に、各 G - R E X - 1 0 0 内の T I L を、各フラスコ内に存在する 3 0 0 m L の培地に懸濁し、細胞懸濁液を 3 つの 1 0 0 m L アリコートに分割し、それを使用して 3 つの G - R E X - 1 0 0 フラスコに播種する。その後、5 % ヒト A B 血清及び 3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 を含む 1 5 0 m L の A I M - V が各フラスコに添加される。G - R E X - 1 0 0 フラスコが 5 % C O ₂ 中 3 7 ° C でインキュベートされ、4 日後に、3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 を含む 1 5 0 m L の A I M - V が、各 G - R E X - 1 0 0 フラスコに添加される。培養 1 4 日目に、細胞が採取される。

20

30

【 0 5 3 7 】

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

40

50

の実施形態では、T細胞受容体（TCR）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、TCRa β （すなわち、TCR α/β ）の発現が増加する。

【0538】

いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地（例えば、CM2または第2の細胞培養培地とも称される）は、以下で更に詳細に論じられるように、IL-2、OKT-3、ならびに抗原提示フィーダー細胞（APC）を含む。

【0539】

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

【0540】

いくつかの実施形態では、急速または第2の拡大ステップは、複数のステップに分けられて、（a）TILを、第1の容器、例えば、G-R EX-100 MCS容器内での小規模培養で約3～7日間培養することによって急速または第2の拡大を行うことと、その後、（b）小規模培養でのTILを、第1の容器よりも大きい第2の容器、例えば、G-R EX-500-MCS容器に移し、小規模培養由来のTILを、第2の容器内でのより大規模な培養で約4～7日間培養することによって、培養のスケールアップを達成する。

【0541】

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

【0542】

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

【0543】

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

【0544】

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

に移された小規模培養由来の T I L の一部がより大規模な培養で約 6 日間培養される。

【 0 5 4 5 】

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

【 0 5 4 6 】

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

【 0 5 4 7 】

いくつかの実施形態では、急速または第 2 の拡大の完了後、複数の亜集団は、治療有効量の T I L を含む。いくつかの実施形態では、急速または第 2 の拡大の完了後、1 つ以上の T I L の亜集団を一緒にプールして、治療有効量の T I L を生成する。いくつかの実施形態では、急速拡大の完了後、T I L の各亜集団は、治療有効量の T I L を含む。

【 0 5 4 8 】

いくつかの実施形態では、急速または第 2 の拡大は、複数のステップに分割される前に、約 3 ～ 7 日間行われる。いくつかの実施形態では、急速または第 2 の拡大の分裂は、急速または第 2 の拡大の開始後約 3 日目、4 日目、5 日目、6 日目、または 7 日目に起こる。

【 0 5 4 9 】

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

【 0 5 5 0 】

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

【 0 5 5 1 】

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

【 0 5 5 2 】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第 2 の拡大に使用される細胞培養培地は、I L - 2 、任意選択的に O K T - 3 、及び更に任意選択的に A P C を含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第 2 の拡大に使用される細胞培養培地は、I L - 2 、O K T - 3 、及び更に任意選択的に A P C を含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第 2 の拡大に使用される細胞培養培地は、I L - 2 、O K T - 3 、及び A P C を含む。

【 0 5 5 3 】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第 2 の拡大に使用される細胞培養培地は、第 1 の拡大中の細胞培養培地を、I L - 2 、任意選択的に O K T - 3 及び更に任意選択的に A P C を含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第 2 の拡大に使用される細胞培養培地は、第 1 の拡大中の細胞培養培地を、I L - 2 、O K T - 3 及び A P C を含む新鮮な培養培地で補充することに

10

20

30

40

50

よって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第2の拡大に使用される細胞培養培地は、第1の拡大中の細胞培養培地を、IL-2、任意選択的にOKT-3及び更に任意選択的にAPCを含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第2の拡大に使用される細胞培養培地は、第1の拡大中の細胞培養培地を、IL-2、OKT-3及びAPCを含む新鮮な細胞培養培地で置き換えることによって生成される。

【0554】

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

【0555】

いくつかの実施形態では、急速な拡大の分裂は、閉鎖されたシステムにおいて起こる。

【0556】

いくつかの実施形態では、急速または第2の拡大中のTIL培養物のスケールアップは、新鮮な細胞培養培地をTIL培養物に添加すること（TILを供給することとも称される）を含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をTIL培養物に頻繁に添加することを含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をTIL培養物に一定の間隔で添加することを含む。いくつかの実施形態では、新鮮な細胞培養培地は、一定の流れを介してTILに供給される。いくつかの実施形態では、Xuri W25などの自動細胞拡大システムは、急速な拡大及び供給のために使用される。

【0557】

1. フィーダー細胞及び抗原提示細胞

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

【0558】

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

【0559】

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

【0560】

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

【0561】

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

10

【0562】

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

20

【0563】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第2の拡大手順は、約 2.5×10^9 個のフィーダー細胞：約 100×10^6 個のTILの比を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載の第2の拡大手順は、約 2.5×10^9 個のフィーダー細胞：約 50×10^6 個のTILの比を必要とする。更に他の実施形態では、本明細書に記載の第2の拡大手順は、約 2.5×10^9 個のフィーダー細胞：約 25×10^6 個のTILを必要とする。

【0564】

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

30

【0565】

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

【0566】

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

40

【0567】

2. サイトカイン及び他の添加物

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

【0568】

あるいは、TILの急速拡大及びまたは第2の拡大のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第US2017/0107490A1号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、IL-2、IL-15、及びIL-21のうちの2つ以上の組み合わせを用いて追加として可能である。したが

50

って、可能な組み合わせには、IL-2 及び IL-15、IL-2 及び IL-21、IL-15 及び IL-21、ならびに IL-2、IL-15、及び IL-21 が含まれ、後者は多くの実施形態で特に有用である。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているように T 細胞の生成に特に有利に働く。

【0569】

いくつかの実施形態では、ステップ D はまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、OKT-3 抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ステップ D はまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、4-1BB アゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップ D はまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、OX-40 アゴニストの、培養培地への添加を含み得る。加えて、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体 (PPAR) - ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーター-1 アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第 US 2019/0307796 A1 号 (この開示は参照により本明細書に組み込まれる) に記載されるように、ステップ D 中の培養培地で使用されてもよい。

10

【0570】

E. ステップ E: TIL を採取する

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

20

【0571】

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

【0572】

細胞採取機及び／または細胞処理システムは、例えば、Fresenius Kabi、Tomtec Life Science、Perkin Elmer、及び Inotech Biosystems International, Inc. を含む、様々な供給源から市販されている。任意の細胞ベースの採取機が本方法とともに用いられ得る。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理システムは、膜ベースの細胞採取機である。いくつかの実施形態では、細胞採取は、LOVO システム (Fresenius Kabi によって製造されたもの) などの細胞処理システムによるものである。

30

「LOVO 細胞処理システム」という用語は、細胞を含む溶液を、滅菌及び／または閉鎖されたシステム環境で回転膜または回転フィルターなどの膜またはフィルターを通してポンプ輸送し、連続フローを可能にし、細胞を処理して、ペレット化せずに上清または細胞培養培地を除去する、任意のベンダーによって製造された任意の機器または装置も指す。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理システムは、滅菌閉鎖されたシステム内で、細胞分離、洗浄、流体交換、濃縮、及び／または他の細胞処理ステップを行うことができる。

40

【0573】

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

【0574】

50

いくつかの実施形態では、図 1 によるステップ E は、本明細書に記載のプロセスに従って行われる。いくつかの実施形態では、閉鎖されたシステムは、閉鎖されたシステムの無菌性及び閉鎖性を維持するために、滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、実施例に記載の閉鎖されたシステムが用いられる。

【0575】

いくつかの実施形態では、TIL は、実施例に記載の方法に従って採取される。いくつかの実施形態では、1 日目～11 日目の間の TIL は、実施例における 11 日目の TIL 採取のような、本明細書で言及されるステップにおいて記載される方法を使用して採取される。いくつかの実施形態では、12 日目～24 日目の間の TIL は、実施例における 22 日目の TIL 採取のような、本明細書で言及されるステップにおいて記載される方法を使用して採取される。いくつかの実施形態では、12 日目～22 日目の間の TIL は、実施例における 22 日目の TIL 採取のような、本明細書で言及されるステップにおいて記載される方法を使用して採取される。

10

【0576】

F. ステップ F：最終配合物及び注入容器への移行

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

20

【0577】

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

【0578】

III. Gen 3 TIL 製造プロセス

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

30

40

50

0、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器に移して配分することによって、培養のスケールアウトを達成し、各第2の容器内で、かかる第2の容器に移された第1の小規模培養由来のT細胞の一部が第2の小規模培養で約4～7日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡大ステップは、複数のステップに分けられ、(a) T細胞を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、(b) 小規模培養由来のT細胞を、第1の容器よりもサイズが大きい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器、例えば、G-R E X-500 M C S容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、かかる第2の容器に移された小規模培養由来のT細胞の一部がより大規模な培養で約4～7日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡大ステップは、複数のステップに分けられ、(a) T細胞を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での小規模培養で約4日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、(b) 小規模培養由来のT細胞を、第1の容器よりもサイズが大きい2、3、または4個の第2の容器、例えば、G-R E X-500 M C S容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、かかる第2の容器に移された小規模培養由来のT細胞の一部がより大規模な培養で約5日間培養される。

10

20

30

40

50

【0579】

いくつかの実施形態では、急速な拡大の分割時に、各第2の容器は、少なくとも 10^8 個のT I Lを含む。いくつかの実施形態では、急速な拡大の分割時に、各第2の容器は、少なくとも 10^8 個のT I L、少なくとも 10^9 個のT I L、または少なくとも 10^{10} 個のT I Lを含む。例示的な一実施形態では、各第2の容器は、少なくとも 10^{10} 個のT I Lを含む。

【0580】

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

【0581】

いくつかの実施形態では、急速拡大の完了後、複数の亜集団は、治療有効量のT I Lを含む。いくつかの実施形態では、急速拡大の完了後、1つ以上のT I Lの亜集団と一緒にプールして、治療有効量のT I Lを生成する。いくつかの実施形態では、急速拡大の完了後、T I Lの各亜集団は、治療有効量のT I Lを含む。

【0582】

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

【0583】

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

【0584】

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

【0585】

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

【0586】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡大に使用される細胞培養培地は、IL-2、任意選択的にOKT-3、及び更に任意選択的にAPCを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡大に使用される細胞培養培地は、IL-2、OKT-3、及び更に任意選択的にAPCを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡大に使用される細胞培養培地は、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む。

10

【0587】

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

20

【0588】

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

30

【0589】

いくつかの実施形態では、急速な拡大の分裂は、閉鎖されたシステムにおいて起こる。

【0590】

いくつかの実施形態では、急速拡大中のTIL培養物のスケールアップは、新鮮細胞培養培地をTIL培養物に添加すること（TILを供給することとも称される）を含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をTIL培養物に頻繁に添加することを含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をTIL培養物に一定の間隔で添加することを含む。いくつかの実施形態では、新鮮な細胞培養培地は、一定の流れを介してTILに供給される。いくつかの実施形態では、Xuri W25などの自動細胞拡大システムは、急速な拡大及び供給のために使用される。

40

【0591】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大は、プライミングによる第1の拡大によってもたらされるT細胞の活性化が減少、軽減、衰退、または沈静化し始めた後に行われる。

【0592】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大は、プライミングによる第1の拡大によってもたらされるT細胞の活性化が、正確にまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49

50

、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100%減少した後に行われる。

【0593】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大は、プライミングによる第1の拡大によってもたらされるT細胞の活性化が、正確にまたは約1%~100%の範囲のパーセンテージ減少した後に行われる。

【0594】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大は、プライミングによる第1の拡大によってもたらされるT細胞の活性化が、正確にまたは約1%~10%、10%~20%、20%~30%、30%~40%、40%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80%、80%~90%、または90%~100%の範囲のパーセンテージ減少した後に行われる。

【0595】

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

【0596】

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

【0597】

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

【0598】

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

【0599】

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

【0600】

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

10

20

30

40

50

【0601】

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

【0602】

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

【0603】

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

10

【0604】

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

【0605】

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

【0606】

いくつかの実施形態では、T細胞のプライミングによる第1の拡大は、正確にまたは約1日間～正確にまたは約8日間の期間中に行われ、T細胞の急速な第2の拡大は、正確にまたは約1日間～正確にまたは約9日間の期間中に行われる。

20

【0607】

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

【0608】

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

30

【0609】

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

【0610】

いくつかの実施形態では、T細胞は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）である。

【0611】

いくつかの実施形態では、T細胞は、骨髄浸潤リンパ球（MIL）である。

【0612】

いくつかの実施形態では、T細胞は、末梢血リンパ球（PBL）である。

【0613】

いくつかの実施形態では、T細胞は、がん罹患しているドナーから取得される。

40

【0614】

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

【0615】

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

【0616】

いくつかの実施形態では、T細胞は、ドナー由来の末梢血単核細胞（PBMC）から取得されたPBLである。いくつかの実施形態では、ドナーは、がん罹患している。いく

50

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

10

【0617】

本開示の特定の態様では、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞は、FICOLL分離などの当業者に知られている任意の数の技法を使用して対象から収集された血液の単位から得ることができる。好ましい一態様では、個体の循環血液由来の細胞は、アフエレーシスによって取得される。アフエレーシス生成物は、典型的には、リンパ球、例えば、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球、血小板を含む。一態様では、アフエレーシスによって収集された細胞が洗浄されて、血漿画分が除去され、任意選択的に、その後の処理ステップのために細胞を適切な緩衝液または培地に入れられ得る。いくつかの実施形態では、細胞は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄される。代替の実施形態では、洗浄溶液は、カルシウムを欠き、マグネシウムを欠き得るか、または全てではないが多くの二価カチオンを欠き得る。一態様では、T細胞は、赤血球を溶解し、かつ単球を枯渇させることによって、例えば、PERCOLL勾配による遠心分離によって、または対向流遠心溶出法によって末梢血リンパ球から単離される。

20

【0618】

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

30

40

【0619】

これらの特徴のうちのいくつかを含む、プロセス3として知られる（本明細書ではGen3とも称される）例示的なTILプロセスが、図8（特に、例えば図8B及び／または

50

図 8 C 及び／または図 8 D) に示され、本発明のこの実施形態の、Gen 2 を超える利点のうちのいくつかは、図 1、2、8、30、及び 31 (特に、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) に記載される。Gen 3 の実施形態を、図 1、8、及び 30 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) に示す。プロセス 2 A または Gen 2 または Gen 2 A はまた、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開第 2018/0280436 号にも記載されている。Gen 3 プロセスはまた、国際特許公開第 WO 2020/096988 号に記載されている。

【0620】

本明細書で考察され、かつ一般に概説されるように、TIL は、患者試料から採取され、本明細書に記載され、かつ Gen 3 と称される TIL 拡大プロセスを使用して患者に移植する前に、それらの数を拡大するように操作される。いくつかの実施形態では、TIL は、以下で考察されるように、任意選択的に遺伝子操作され得る。いくつかの実施形態では、TIL は、拡大前または拡大後に凍結保存され得る。解凍した時点で、それらが再刺激されて、患者への注入前に代謝を高めることができる。

【0621】

いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図において詳細に考察されるように、プライミングによる第 1 の拡大 (本明細書において急速拡大前 (REP 前) と称されるプロセス、ならびに図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) においてステップ B として示されるプロセスを含む) は、1～8 日に短縮され、急速な第 2 の拡大 (本明細書において急速拡大プロトコル (REP) と称されるプロセス、ならびに図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) においてステップ D として示されるプロセスを含む) は、1～9 日に短縮される。いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図において詳細に考察されるように、プライミングによる第 1 の拡大 (本明細書において急速拡大前 (REP 前) と称されるプロセス、ならびに図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) においてステップ B として示されるプロセスを含む) は、1～8 日に短縮され、急速な第 2 の拡大 (本明細書において急速拡大プロトコル (REP) と称されるプロセス、ならびに図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) においてステップ D として示されるプロセスを含む) は、1～8 日に短縮される。いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図において詳細に考察されるように、プライミングによる第 1 の拡大 (本明細書において急速拡大前 (REP 前) と称されるプロセス、ならびに図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) においてステップ B として示されるプロセスを含む) は、1～7 日に短縮され、急速な第 2 の拡大 (本明細書において急速拡大プロトコル (REP) と称されるプロセス、ならびに図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) においてステップ D として示されるプロセスを含む) は、1～9 日に短縮される。いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図で詳細に考察されるように、プライミングによる第 1 の拡大 (本明細書において急速拡大前 (REP 前) と称されるプロセス、ならびに図 8 (特に、例えば図 1 B 及び／または図 8 C) においてステップ B として示されるプロセスを含む) は、1～7 日間であり、急速な第 2 の拡大 (本明細書において急速拡大プロトコル (REP) と称されるプロセス、ならびに図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) においてステップ D として示されるプロセスを含む) は、1～10 日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大 (例えば、図 8 (特に、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) においてステップ B として記載される拡大) は、8 日に短縮され、急速な第 2 の拡大 (例えば、図 8 (特に、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) においてステップ D に記載される拡大) は、7～9 日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大 (例えば、図 8 (特に、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B

10

20

30

40

50

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

【0622】

10

20

30

40

50

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

【0623】

A. ステップ A：患者の腫瘍試料を取得する

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

10

【0624】

患者の腫瘍試料は、一般に、外科的切除、針生検、または腫瘍細胞と TIL 細胞との混合物を含有する試料を得るための他の手段により、当該技術分野で知られている方法を使用して得ることができる。一般に、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍試料は、血液系悪性腫瘍から取得された腫瘍などの液体腫瘍であり得る。固形腫瘍は、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、結腸直腸癌、肺癌、脳癌、腎癌、胃癌、及び皮膚癌を含むが、これらに限定されない（扁平上皮癌、基底細胞癌、及び黒色腫を含むが、これらに限定されない）、任意の種類のがんであり得る。いくつかの実施形態では、がんは、子宮頸癌、頭頸部癌（例えば、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、神経膠芽細胞腫（GBM）、胃腸癌、卵巣癌、肉腫、膵臓癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、及び非小細胞肺癌から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。いくつかの実施形態では、悪性黒色腫腫瘍が特に高レベルの TIL を有することが報告されているため、有用な TIL は、悪性黒色腫腫瘍から取得される。

20

【0625】

取得された時点で、腫瘍試料は、一般に、鋭的解剖を使用して 1～約 8 mm³ の小片に断片化され、約 2～3 mm³ が特に有用である。TIL は、酵素腫瘍消化物を使用してこれらの断片から培養される。かかる腫瘍消化物は、酵素培地（例えば、Roswell Park Memorial Institute（RPMI）1640 緩衝液、2 mM グルタメート、10 mcg/mL ゲンタマイシン、30 単位/mL DNase、及び 1.0 mg/mL コラゲナーゼ）中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（例えば、組織解離機を使用する）によって生成され得る。腫瘍消化物は、腫瘍を酵素培地に入れ、腫瘍をおよそ 1 分間機械的に解離させ、続いて 5% CO₂ 中 37°C で 30 分間インキュベートし、続いて小さな組織片のみが存在するまで、前述の条件下で機械的解離及びインキュベーションのサイクルを繰り返すことによって生成することができる。このプロセスの終了時に、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、FICOLL 分岐親水性多糖を使用した密度勾配分離は、これらの細胞を除去するために、行われ得る。米国特許出願公開第 2012/0244133 A1 号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものなどの当該技術分野で知られている代替の方法を使用することができる。前述の方法のうちのいずれかが、TIL を拡大する方法またはがんを治療する方法について本明細書に記載される実施形態のうちのいずれかにおいて使用され得る。

30

40

【0626】

上に示されるように、いくつかの実施形態では、TIL は、固形腫瘍に由来する。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、断片化されない。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は断片化されず、全腫瘍として酵素消化に供される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、

50

コラゲナーゼ、DNase、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、DNase、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で1～2時間消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、DNase、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で1～2時間、37℃、5%CO₂で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、DNase、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で1～2時間、37℃、5%CO₂で回転を伴って消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、37℃、5%CO₂で一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、全腫瘍が酵素と組み合わせられて、腫瘍消化反応混合物が形成される。

10

【0627】

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

【0628】

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

【0629】

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

20

【0630】

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

【0631】

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

【0632】

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

30

【0633】

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

【0634】

いくつかの実施形態では、断片化には、例えば、解剖及び消化を含む物理的断片化が含まれる。いくつかの実施形態では、断片化は、物理的断片化である。いくつかの実施形態では、断片化は、解剖である。いくつかの実施形態では、断片化は、消化によるものである。いくつかの実施形態では、TILは、最初に、患者から取得された酵素腫瘍消化物及び腫瘍断片から培養され得る。いくつかの実施形態では、TILは、最初に、患者から取得された酵素腫瘍消化物及び腫瘍断片から培養され得る。

40

【0635】

腫瘍が固形腫瘍であるいくつかの実施形態では、腫瘍試料が、例えば、ステップA（図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に提供される）で取得された後、腫瘍は物理的断片化を受ける。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存前に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存後に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、腫瘍を得た後に、いずれの凍結保存もない場合に起こる。いくつかの実施形態では、断片化ステップは、インビトロまたはエクスピボプロセスである。いくつかの実施形態では、腫瘍が断片化され、10、20、30、40個

50

、またはそれ以上の断片または小片が、プライミングによる第1の拡大のために各容器に入れられる。いくつかの実施形態では、腫瘍が断片化され、30個または40個の断片または小片が、プライミングによる第1の拡大のために各容器に入れられる。いくつかの実施形態では、腫瘍が断片化され、40個の断片または小片が、プライミングによる第1の拡大のために各容器に入れられる。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約4～約50個の断片を含み、各断片は、約 27 mm^3 の体積を有する。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約 1300 mm^3 ～約 1500 mm^3 の総体積を有する約30～約60個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約 1350 mm^3 の総体積を有する約50個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約1グラム～約1.5グラムの総質量を伴う約50個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約4個の断片を含む。

10

【0636】

いくつかの実施形態では、TILは、腫瘍断片から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、鋭的解剖によって取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 1 mm^3 ～ 10 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 1 mm^3 ～ 8 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 1 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 2 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 3 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 4 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 5 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 6 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 7 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 8 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 9 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 10 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、 $1\sim4\text{ mm}\times1\sim4\text{ mm}\times1\sim4\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、 $1\text{ mm}\times1\text{ mm}\times1\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、 $2\text{ mm}\times2\text{ mm}\times2\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、 $3\text{ mm}\times3\text{ mm}\times3\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、 $4\text{ mm}\times4\text{ mm}\times4\text{ mm}$ である。

20

【0637】

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

30

【0638】

いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、腫瘍の内部構造を維持するために行われる。いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、メスでのこ引き動作を行うことなく行われる。いくつかの実施形態では、TILは、腫瘍消化物から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、RPMI 1640 (2mM Glutamax、10mg/mL ゲンタマイシン、30U/mL DNase、及び1.0mg/mL コラゲナーゼ) であるが、これに限定されない酵素培地中でのインキュベーション、続いて、機械的解離 (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA) によって生成された。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍は、およそ1分間機械的に解離され得る。その後、溶液が5% CO_2 中37℃で30分間インキュベートされ、その後、およそ1分間再び機械的に破壊され得る。5% CO_2 中37℃で30分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ1分間、3回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きい組織片が存在する場合、3回目の機械的破壊後、5% CO_2 中37℃で更に30分間インキュベートするかにかかわらず、1回または2回の追加の機械的解離が試料に適用された。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細

40

50

胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、F i c o l l を使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。

【0639】

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

【0640】

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

【0641】

1. コア／小生検由来のTIL

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

【0642】

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

【0643】

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

【0644】

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

【0645】

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

【0646】

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

【0647】

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

【0648】

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

【0649】

いくつかの実施形態では、小生検は、頭頸部生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検であり、小さい組織片が異常に見える領域から切り取られる。いくつかの実施形態では、異常な領域に容易にアクセスできる場合、試料は、入院することなく採取され得る。いくつかの実施形態では、腫瘍が口または喉のより深くにある場合、生検は、全身麻酔を用いて手術室で行われる必要があり得る。いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、全領域が除去される切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、細針吸引（FNA）である。いくつかの実施形態では、小生検は、細針吸引（FNA）であり、シリンジに取り付けられた非常に細い針を使用して、腫瘍または塊から細胞を抽出（吸引）する。いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検であり、パンチ鉗子を使用して、疑わしい領域の一片を採取する。

【0650】

いくつかの実施形態では、小生検は、子宮頸部生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、膣鏡検査によって取得される。一般に、膣鏡検査は、拡大双眼鏡に取り付けられた照明付き拡大器具（膣鏡）の使用を採用し、その後、これを使用して、子宮頸部の表面の小さい切片を生検する。いくつかの実施形態では、小生検は、円錐切除／錐体生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、円錐切除／錐体生検であり、子宮頸部からより大きい組織片を採取するために外来手術が必要になる場合がある。いくつかの実施形態では、錐体生検は、診断の確認を助けることに加えて、錐体生検が初期治療となり得る。

【0651】

「固形腫瘍」という用語は、通常、嚢胞または液体領域を含まない異常な組織塊を指す。固形腫瘍は、良性または悪性であり得る。「固形腫瘍癌」という用語は、悪性、腫瘍性、またはがん性の固形腫瘍を指す。固形腫瘍癌には、肺のがんが含まれる。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。いくつかの実施形態では、がんは、非小細胞肺癌（NSCLC）である。固形腫瘍の組織構造には、実質（がん細胞）を含む相互依存的組織区画、及びがん細胞が分散しており、かつ支持微小環境を提供し得る支持間質細胞が含まれる。

10

20

30

40

50

【0652】

いくつかの実施形態では、腫瘍由来の試料は、細針吸引物（FNA）、コア生検、小生検（例えば、パンチ生検を含む）として取得される。いくつかの実施形態では、試料は、最初にG-R E X-10に入れられる。いくつかの実施形態では、1つまたは2つのコア生検及び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初にG-R E X-10に入れられる。いくつかの実施形態では、3、4、5、6、8、9、または10個以上のコア生検及び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初にG-R E X-100に入れられる。いくつかの実施形態では、3、4、5、6、8、9、または10個以上のコア生検及び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初にG-R E X-500に入れられる。

10

【0653】

FNAは、例えば、黒色腫を含む皮膚腫瘍から取得することができる。いくつかの実施形態では、FNAは、転移性黒色腫を有する患者からの皮膚腫瘍などの皮膚腫瘍から取得される。いくつかの事例では、黒色腫を有する患者は、外科的治療を以前に受けたことがある。

【0654】

FNAは、例えば、NSCLCを含む肺腫瘍から得ることができる。いくつかの実施形態では、FNAは、非小細胞肺癌（NSCLC）を有する患者由来の肺腫瘍などの肺腫瘍から取得される。いくつかの事例では、NSCLCを有する患者は、外科的治療を以前に受けたことがある。

20

【0655】

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

30

【0656】

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

40

【0657】

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

【0658】

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

【0659】

いくつかの実施形態では、TILは、腫瘍消化物から取得される。いくつかの実施形態

50

では、腫瘍消化物は、例えば、RPMI 1640 (2mM GlutaMAX、10mg/mL ゲンタマイシン、30U/mL DNase、及び1.0mg/mL コラゲナーゼ) であるが、これに限定されない酵素培地中でのインキュベーション、続いて、機械的解離 (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA) によって生成された。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍は、およそ1分間機械的に解離され得る。その後、溶液が5% CO₂ 中37℃で30分間インキュベートされ、その後、およそ1分間再び機械的に破壊され得る。5% CO₂ 中37℃で30分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ1分間、3回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きい組織片が存在する場合、3回目の機械的破壊後、5% CO₂ 中37℃で更に30分間インキュベートするかにかかわらず、1回または2回の追加の機械的解離が試料に適用された。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、Ficollを使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。

10

【0660】

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

【0661】

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

20

【0662】

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

【0663】

いくつかの事例では、コラゲナーゼ (アニマルフリー1型コラゲナーゼなど) を、10mLの滅菌HBSSまたは別の緩衝液で再構成する。凍結乾燥ストック酵素は、2892 PZ U/バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、5mL~15mLの緩衝液中で再構成される。いくつかの実施形態では、再構成後のコラゲナーゼストックは、約100 PZ U/mL~約400 PZ U/mLの範囲、例えば、約100 PZ U/mL~約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL~約350 PZ U/mL、約100 PZ U/mL~約300 PZ U/mL、約150 PZ U/mL~約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL、約150 PZ U/mL、約200 PZ U/mL、約210 PZ U/mL、約220 PZ U/mL、約230 PZ U/mL、約240 PZ U/mL、約250 PZ U/mL、約260 PZ U/mL、約270 PZ U/mL、約280 PZ U/mL、約289.2 PZ U/mL、約300 PZ U/mL、約350 PZ U/mL、または約400 PZ U/mLである。

30

40

【0664】

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

50

DMC / mL、約 150 DMC / mL、約 160 DMC / mL、約 170 DMC / mL、約 175 DMC / mL、約 180 DMC / mL、約 190 DMC / mL、約 200 DMC / mL、約 250 DMC / mL、約 300 DMC / mL、約 350 DMC / mL、または約 400 DMC / mL である。

【0665】

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

10

【0666】

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

【0667】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、約 4.7 mL の滅菌 HBSS 中に約 10.2 uL の中性プロテアーゼ (0.36 DMC U / mL)、21.3 uL のコラゲナーゼ (1.2 PZ / mL) 及び 250 uL の DNAse I (200 U / mL) を含む。

【0668】

2. 胸水 T 細胞及び TIL

20

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

【0669】

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

30

【0670】

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

40

50

られる。いくつかの実施形態では、試料は、4℃で、患者からの除去後1時間、5時間、10時間、15時間、または最大24時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

【0671】

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

10

【0672】

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

20

【0673】

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

30

【0674】

いくつかの実施形態では、胸腔内液試料（例えば、未処理の胸腔内液を含む）、希釈胸水、または再懸濁細胞ペレットは、試料中に存在する無核赤血球を特異的に溶解する溶解試薬と接触させる。いくつかの実施形態では、このステップは、胸腔内液がかなりの数のRBCを含む状況で、更なる処理ステップの前に行われる。好適な溶解試薬には、単一の溶解試薬もしくは溶解試薬及びクエンチ試薬、または溶解剤、クエンチ試薬及び固定試薬が含まれる。好適な溶解システムは市販されており、BD Pharm Lyse（商標）システム（Becton Dickinson）が含まれる。他の溶解システムには、VersaLyse（商標）システム、FACS Lyse（商標）システム（Becton Dickinson）、Immunoprep（商標）システム、またはErythroLyse IIシステム（Beckman Coulter, Inc.）、または塩化アンモニウムシステムが含まれる。いくつかの実施形態では、溶解試薬は、赤血球の効率的な溶解、ならびに胸水におけるTIL及びTILの表現型特性の保存のような主要な

40

50

要件によって異なり得る。溶解のための単一の試薬を利用することに加えて、本明細書に記載の方法に有用な溶解システムは、第2の試薬、例えば、方法の残りのステップ中に溶解試薬の効果をクエンチまたは遅延させるもの、例えばStabilysse（商標）試薬（Beckman Coulter, Inc.）を含むことができる。溶解試薬の選択または方法の好ましい実施に応じて、従来の固定試薬を使用することもできる。

【0675】

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

【0676】

3. 末梢血から末梢血リンパ球（PBL）を拡大する方法

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

【0677】

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

【0678】

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

【0679】

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

【0680】

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

【0681】

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

【0682】

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

10

20

30

40

50

単離される。本発明のいくつかの実施形態では、T細胞は、当該技術分野で知られている抗体選択方法、例えば、CD19の負の選択を使用して、PBMCから単離される。

【0683】

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

【0684】

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

【0685】

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

【0686】

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

【0687】

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

【0688】

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

【0689】

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

【0690】

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

10

20

30

40

50

【0691】

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

【0692】

4. 骨髄由来のPBMCから骨髄浸潤リンパ球（MIL）を拡大する方法

MIL方法3. 本発明のいくつかの実施形態では、方法は、骨髄からPBMCを取得することを含む。0日目に、PBMCがCD3+/CD33+/CD20+/CD14+について選択され、選別され、非CD3+/CD33+/CD20+/CD14+細胞画分が超音波処理され、超音波処理された細胞画分の一部が選択された細胞画分に戻し追加される。

10

【0693】

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

【0694】

本発明のいくつかの実施形態では、PBMCは、骨髄から取得される。いくつかの実施形態では、PBMCは、アフエーシス、吸引、針生検、または当該技術分野で知られている他の同様の手段により骨髄から取得される。いくつかの実施形態では、PBMCは、新鮮である。他の実施形態では、PBMCは、凍結保存される。

20

【0695】

本発明のいくつかの実施形態では、MILは、10~50mLの骨髄穿刺液から拡大される。本発明のいくつかの実施形態では、10mLの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、20mLの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、30mLの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、40mLの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、50mLの骨髄穿刺液が患者から取得される。

【0696】

本発明のいくつかの実施形態では、約10~50mLの骨髄穿刺液から生成されたPBMCの数は、約 5×10^7 ~約 10×10^7 個のPBMCである。他の実施形態では、生成されたPBMCの数は、約 7×10^7 個のPBMCである。

30

【0697】

本発明のいくつかの実施形態では、約 5×10^7 ~約 10×10^7 のPBMCが、約 0.5×10^6 ~約 1.5×10^6 のMILを生成する。本発明のいくつかの実施形態では、約 1×10^6 個のMILが、生成される。

【0698】

本発明のいくつかの実施形態では、骨髄穿刺液に由来する 12×10^6 個のPBMCは、およそ 1.4×10^5 個のMILを生成する。

40

【0699】

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

【0700】

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

【0701】

B. ステップB：プライミングによる第1の拡大

50

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

10

20

30

40

50

【0702】

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

【0703】

いくつかの実施形態では、TILの拡大は、以下及び本明細書に記載されるプライミングによる第1の拡大ステップ（例えば、REP前またはプライミングREPと称されるプロセスを含み得、0日目及び／または培養開始からのフィーダー細胞を含有する、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）のステ

ップBに記載されるものなど)、続いて以下のステップD及び本明細書に記載される急速な第2の拡大(ステップD、急速拡大プロトコル(REP)ステップと称されるプロセスを含む)、続いて任意選択的な凍結保存、続いて以下及び本明細書に記載される第2のステップD(再刺激REPステップと称されるプロセスを含む)を使用して行うことができる。このプロセスから取得されたTILは、本明細書に記載の表現型特徴及び代謝パラメータについて任意選択的に、特徴付けられ得る。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 $1\text{ mm}^3 \sim 10\text{ mm}^3$ である。

【0704】

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

【0705】

いくつかの実施形態では、240個以下の腫瘍断片が存在する。いくつかの実施形態では、4つ以下の容器に入れられた240個以下の腫瘍断片が存在する。いくつかの実施形態では、容器は、GREX 100 MCS フラスコである。いくつかの実施形態では、60個以下の腫瘍断片が1つの容器に入れられる。いくつかの実施形態では、各容器は、1容器当たり500 mL以下の培地を含む。いくつかの実施形態では、培地は、IL-2を含む。いくつかの実施形態では、培地は、6000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、培地は、抗原提示フィーダー細胞(本明細書では「抗原提示細胞」とも称される)を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり 2.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、OKT-3を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり30 ng/mLのOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、容器は、GREX 100 MCS フラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、6000 IU/mLのIL-2、30 ng/mLのOKT-3、及び 2.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり6000 IU/mLのIL-2、30 ng/mLのOKT-3、及び 2.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【0706】

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

液は、 $5 \sim 7 \times 10^6$ IU/mg の IL-2 の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、IL-2 ストック溶液は、 6×10^6 IU/mg の IL-2 の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、IL-2 ストック溶液は、実施例 C に記載されるように調製される。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大培養培地は、約 10,000 IU/mL の IL-2、約 9,000 IU/mL の IL-2、約 8,000 IU/mL の IL-2、約 7,000 IU/mL の IL-2、約 6000 IU/mL の IL-2、または約 5,000 IU/mL の IL-2 を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大培養培地は、約 9,000 IU/mL の IL-2 ～約 5,000 IU/mL の IL-2 を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大培養培地は、約 8,000 IU/mL の IL-2 ～約 6,000 IU/mL の IL-2 を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大培養培地は、約 7,000 IU/mL の IL-2 ～約 6,000 IU/mL の IL-2 を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大培養培地は、約 6,000 IU/mL の IL-2 を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-2 を更に含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大細胞培養培地は、約 3000 IU/mL の IL-2 を含む。ある実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大細胞培養培地は、IL-2 を更に含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大細胞培養培地は、約 3000 IU/mL の IL-2 を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大細胞培養培地は、約 1000 IU/mL、約 1500 IU/mL、約 2000 IU/mL、約 2500 IU/mL、約 3000 IU/mL、約 3500 IU/mL、約 4000 IU/mL、約 4500 IU/mL、約 5000 IU/mL、約 5500 IU/mL、約 6000 IU/mL、約 6500 IU/mL、約 7000 IU/mL、約 7500 IU/mL、または約 8000 IU/mL の IL-2 を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大細胞培養培地は、1000 ～2000 IU/mL、2000 ～3000 IU/mL、3000 ～4000 IU/mL、4000 ～5000 IU/mL、5000 ～6000 IU/mL、6000 ～7000 IU/mL、7000 ～8000 IU/mL、または約 8000 IU/mL の IL-2 を含む。

10

20

30

40

50

【0707】

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

【0708】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大培養培地は、約 20 IU/mL の IL-21、約 15 IU/mL の IL-21、約 12 IU/mL の IL-21、約 10 IU/mL の IL-21、約 5 IU/mL の IL-21、約 4 IU/mL の IL-21、約 3 IU/mL の IL-21、約 2 IU/mL の IL-21、約 1 IU/mL の IL-21、または約 0.5 IU/mL の IL-21 を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大培養培地は、約 20 IU/mL の IL-21 ～約 0.5 IU/mL

LのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大培養培地は、約15 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大培養培地は、約12 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大培養培地は、約10 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大培養培地は、約5 IU/mLのIL-21～約1 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大培養培地は、約2 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大細胞培養培地は、約1 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大細胞培養培地は、約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-21を更に含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大細胞培養培地は、約1 IU/mLのIL-21を含む。

10

【0709】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大細胞培養培地は、OKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大細胞培養培地は、約30 ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大細胞培養培地は、約0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL、及び約1 µg/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、0.1 ng/mL～1 ng/mL、1 ng/mL～5 ng/mL、5 ng/mL～10 ng/mL、10 ng/mL～20 ng/mL、20 ng/mL～30 ng/mL、30 ng/mL～40 ng/mL、40 ng/mL～50 ng/mL、及び50 ng/mL～100 ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約15 ng/mL～30 ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、30 ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、OKT-3抗体は、ムロモナブである。例えば、表1を参照されたい。

20

30

【0710】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大細胞培養培地は、細胞培養培地中に1つ以上のTNFRSFアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、4-1BBアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは4-1BBアゴニストであり、4-1BBアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、EU-101、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリエーション、バイオシミラー、及び組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、0.1 µg/mL～100 µg/mLの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、20 µg/mL～40 µg/mLの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。

40

【0711】

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

【0712】

50

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大培養培地は、培養培地の略語である「CM」と称される。いくつかの実施形態では、それは、CM1（培養培地1）と称される。いくつかの実施形態では、CMは、10%ヒトAB血清、25mM HEPES、及び10mg/mLゲンタマイシンを補充した、GLUTAMAXを含むRPMI1640からなる。いくつかの実施形態では、CMは、実施例に記載されるCM1である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大は、初期細胞培養培地または第1の細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大培地または初期細胞培養培地または第1の細胞培養培地は、IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞（本明細書ではフィーダー細胞とも称される）を含む。

【0713】

10

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

【0714】

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

20

【0715】

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

30

40

【0716】

いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Immune Cell Serum Replacementは、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion Basal Medium、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFM、CTS（商標）AIM-V Medium、CST（商標）AIM-V SFM、LymphoONE（商標）T-Cell Expansion Xeno-Free Medi

50

um、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、最小必須培地（MEM）、イーグル基礎培地（BME）、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地（αMEM）、グラスゴー最小必須培地（G-MEM）、RPMI 成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。

【0717】

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

10

【0718】

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

20

30

【0719】

いくつかの実施形態では、合成培地は、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFM（ThermoFisher Scientific）である。CTS（商標）Optmizer（商標）の任意の配合物も、本発明において有用である。CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMは、1LのCTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion Basal Mediumと、26mLのCTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion Supplementとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、55mMの2-メルカプトエタノールとともに、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）が補充されている。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）、55mMの2-メルカプトエタノール、及び2mMのL-グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Op

40

50

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

【0720】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約0.1mM~約10mM、0.5mM~約9mM、1mM~約8mM、2mM~約7mM、3mM~約6mM、または4mM~約5mMの濃度でグルタミン（すなわち、GlutaMAX（登録商標））が補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約2mMの濃度でグルタミン（すなわち、GlutaMAX（登録商標））が補充されている。

【0721】

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

【0722】

いくつかの実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる国際PCT公開第WO/1998/030679号に記載されている合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、1つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、1つ以上のコラーゲン前駆体、1つ以上の微量元素、及び1つ以上の抗生物質からなる群から選択される1つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び/またはベーターメルカプトエタノールを更に含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、1つ以上のコラーゲン前駆体、及び1つ以上の微量元素からなる群から選択される1つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag⁺、Al³⁺、Ba²⁺、Cd²⁺、Co²⁺、Cr³⁺、Ge⁴⁺、Se⁴⁺、Br、T、Mn²⁺、P、Si⁴⁺、V⁵⁺、Mo⁶⁺、Ni²⁺、Rb⁺、Sn²⁺、及びZr⁴⁺を含有する化合物からなる群から選択される1つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、最小必須培地(MEM)、イーグル基礎培地(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地(α MEM)、グラスゴー最小必須培地(GMEM)、RPMI 成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

【0723】

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

10

20

30

40

50

リウムの濃度は、約 0.0000001～0.0001 mg/L であり、アルブミン（例えば、AlbuMAX（登録商標）I）の濃度は、約 5000～50,000 mg/L である。

【0724】

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

【表 4】

表 4：非微量元素部分成分の濃度

成分	サプリメント中の好ましい実施形態 (mg/L) (約)	1×培地中の濃度範囲 (mg/L) (約)	1×培地中の好ましい実施形態 (mg/L) (約)
グリシン	150	5～200	53
L-ヒスチジン	940	5～250	183
L-イソロイシン	3400	5～300	615
L-メチオニン	90	5～200	44
L-フェニルアラニン	1800	5～400	336
L-プロリン	4000	1～1000	600
L-ヒドロキシプロリン	100	1～45	15
L-セリン	800	1～250	162
L-スレオニン	2200	10～500	425
L-トリプトファン	440	2～110	82
L-チロシン	77	3～175	84
L-バリン	2400	5～500	454
チアミン	33	1～20	9
還元型グルタチオン	10	1～20	1.5
アスコルビン酸-2-P O ₄ (Mg 塩)	330	1～200	50
トランスフェリン (鉄飽和)	55	1～50	8
インスリン	100	1～100	10
亜セレン酸ナトリウム	0.07	0.0000001～ 0.0001	0.000001
AlbuMAX (登録商標) I	83,000	5000～50,000	12,500

【0725】

いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約 260～350 mOsmol である

。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約 280～310 mOsmol である。いくつかの実施形態では、合成培地には、最大約 3.7 g/L、または約 2.2 g/L の重炭酸ナトリウムが補充されている。合成培地には、L-グルタミン（最終濃度約 2 mM）、1 つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸（NEAA、最終濃度約 100 μM）、2-メルカプトエタノール（最終濃度約 100 μM）が更に補充されていてもよい。

【0726】

いくつかの実施形態では、Smith, et al., Clin. Transl. Immunology, 4 (1), 2015 (doi:10.1038/cti.2014.31) に記載の合成培地が、本発明において有用である。簡潔には、RPMI または CTS（商標）Optmizer（商標）を基礎細胞培地として使用し、0、2%、5%、または 10% のいずれかの CTS（商標）Immune Cell Serum Replacement を補充した。

【0727】

いくつかの実施形態では、第 1 及び／または第 2 のガス透過性容器内の細胞培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡大するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第 1 及び／または第 2 のガス透過性容器内の細胞培地は、ベータ-メルカプトエタノール（BME または βME、2-メルカプトエタノールとしても知られる、CAS 60-24-2）を欠いている。

【0728】

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

10

20

30

40

50

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

10

【0730】

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

20

30

【0731】

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

40

【0732】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大、例えば、図8（特に、図8

50

A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) によるステップ B は、閉鎖されたシステムバイオリアクターにおいて行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖されたシステムが T I L 拡大のために用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが容器として用いられる。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、例えば、G - R E X - 1 0 または G - R E X - 1 0 0 である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、G - R E X - 1 0 0 である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、G - R E X - 1 0 である。

【 0 7 3 3 】

1. フィーダー細胞及び抗原提示細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡大手順（例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡大を含む）は、T I L 拡大の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろプライミングによる第 1 の拡大中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡大手順（例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡大を含む）は、T I L 拡大の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろプライミングによる第 1 の拡大中に 4 ～ 8 日目の任意の時点で追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡大手順（例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡大を含む）は、T I L 拡大の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろプライミングによる第 1 の拡大中に 4 ～ 7 日目の任意の時点で追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡大手順（例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡大を含む）は、T I L 拡大の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろプライミングによる第 1 の拡大中に 5 ～ 8 日目の任意の時点で追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡大手順（例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡大を含む）は、T I L 拡大の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろプライミングによる第 1 の拡大中に 5 ～ 7 日目の任意の時点で追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡大手順（例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡大を含む）は、T I L 拡大の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろプライミングによる第 1 の拡大中に 6 ～ 8 日目の任意の時点で追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡大手順（例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡大を含む）は、T I L 拡大の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろプライミングによる第 1 の拡大中に 6 ～ 7 日目の任意の時点で追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡大手順（例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び

10

20

30

40

50

／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡大を含む)) は、T I L 拡大の開始時にフィーダー細胞 (本明細書では「抗原提示細胞」とも称される) を必要とせず、むしろプライミングによる第 1 の拡大中に 7 または 8 日目の任意の時点で追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡大手順 (例えば、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡大を含む)) は、T I L 拡大の開始時にフィーダー細胞 (本明細書では「抗原提示細胞」とも称される) を必要とせず、むしろプライミングによる第 1 の拡大中に 7 日目の時点で追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡大手順 (例えば、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡大を含む)) は、T I L 拡大の開始時にフィーダー細胞 (本明細書では「抗原提示細胞」とも称される) を必要とせず、むしろプライミングによる第 1 の拡大中に 8 日目の時点で追加される。

10

20

30

40

50

【0734】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第 1 の拡大手順 (例えば、図 8 (特に、例えば図 8 B) からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡大を含む)) は、T I L 拡大の開始時及びプライミングによる第 1 の拡大中にフィーダー細胞 (本明細書では「抗原提示細胞」とも称される) を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者由来の標準の全血単位から取得される末梢血単核細胞 (P B M C) である。P B M C は、F i c o l l - P a q u e 勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、 2.5×10^8 個のフィーダー細胞が、プライミングによる第 1 の拡大中に使用される。いくつかの実施形態では、容器当たり 2.5×10^8 個のフィーダー細胞が、プライミングによる第 1 の拡大中に使用される。いくつかの実施形態では、G R E X - 10 当たり 2.5×10^8 個のフィーダー細胞が、プライミングによる第 1 の拡大中に使用される。いくつかの実施形態では、G R E X - 100 当たり 2.5×10^8 個のフィーダー細胞が、プライミングによる第 1 の拡大中に使用される。

【0735】

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

【0736】

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

【0737】

いくつかの実施形態では、7 日目の O K T 3 及び I L - 2 の存在下で培養された総生細胞数が、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、P B M C は、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載の T I L 拡大手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、P B M C は、 30 ng/mL の O K T 3 抗体及び 3000 IU/mL の I L - 2 の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M C は、 30 ng/mL の O K T 3 抗体及び 6000 IU/mL の I L - 2 の存在下で培養される。

【0738】

いくつかの実施形態では、7 日目の O K T 3 及び I L - 2 の存在下で培養された総生細胞数が、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、P B M C は、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載の T I L 拡大手

順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、P B M Cは、5 ~ 6 0 n g / m LのO K T 3抗体及び1 0 0 0 ~ 6 0 0 0 I U / m LのI L - 2の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M Cは、1 0 ~ 5 0 n g / m LのO K T 3抗体及び2 0 0 0 ~ 5 0 0 0 I U / m LのI L - 2の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M Cは、2 0 ~ 4 0 n g / m LのO K T 3抗体及び2 0 0 0 ~ 4 0 0 0 I U / m LのI L - 2の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M Cは、2 5 ~ 3 5 n g / m LのO K T 3抗体及び2 5 0 0 ~ 3 5 0 0 I U / m LのI L - 2の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M Cは、3 0 n g / m LのO K T 3抗体及び6 0 0 0 I U / m LのI L - 2の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M Cは、1 5 n g / m LのO K T 3抗体及び3 0 0 0 I U / m LのI L - 2の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M Cは、1 5 n g / m LのO K T 3抗体及び6 0 0 0 I U / m LのI L - 2の存在下で培養される。

10

【0739】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、P B M Cである。いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。いくつかの実施形態では、第2の拡大におけるT I Lの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、約1 : 2 5、約1 : 5 0、約1 : 1 0 0、約1 : 1 2 5、約1 : 1 5 0、約1 : 1 7 5、約1 : 2 0 0、約1 : 2 2 5、約1 : 2 5 0、約1 : 2 7 5、約1 : 3 0 0、約1 : 3 2 5、約1 : 3 5 0、約1 : 3 7 5、約1 : 4 0 0、または約1 : 5 0 0である。いくつかの実施形態では、第2の拡大におけるT I Lの、抗原提示フィーダー細胞に対する比は、1 : 5 0 ~ 1 : 3 0 0である。いくつかの実施形態では、第2の増殖におけるT I Lの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、1 : 1 0 0 ~ 1 : 2 0 0である。

20

【0740】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第1の拡大手順は、約 2.5×10^8 個のフィーダー細胞：約 100×10^6 個のT I Lの比を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第1の拡大手順は、約 2.5×10^8 個のフィーダー細胞：約 50×10^6 個のT I Lの比を必要とする。更に他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第1の拡大手順は、約 2.5×10^8 個のフィーダー細胞：約 25×10^6 個のT I Lを必要とする。更に他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第1の拡大は、約 2.5×10^8 個のフィーダー細胞を必要とする。更に他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大は、急速な第2の拡大で使用されるフィーダー細胞の数の4分の1、3分の1、12分の5、または半分を必要とする。

30

【0741】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大における培地は、I L - 2を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大における培地は、6 0 0 0 I U / m LのI L - 2を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大における培地は、容器当たり 2.5×10^8 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大における培地は、O K T - 3を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり3 0 n gのO K T - 3を含む。いくつかの実施形態では、容器は、G R E X 1 0 0 M C S フラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、6 0 0 0 I U / m LのI L - 2、3 0 n g / m LのO K T - 3、及び 2.5×10^8 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり6 0 0 0 I U / m LのI L - 2、3 0 n g / m LのO K T - 3、及び 2.5×10^8 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり5 0 0 m Lの培養培地及び 2.5×10^8 個の抗原提示フィーダー細胞当たり1 5 μ gのO K T - 3を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり5 0 0 m Lの培養培地及び1 5 μ gのO K T - 3を含む。いくつかの実施形態では、容器は、G R E X 1 0 0 M C S フラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、5 0 0 m Lの培

40

50

養培地、 6000 IU/mL のIL-2、 30 ng/mL のOKT-3、及び 2.5×10^8 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり 500 mL の培養培地、 6000 IU/mL のIL-2、 $15\text{ }\mu\text{g}$ のOKT-3、及び 2.5×10^8 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり 500 mL の培養培地及び 2.5×10^8 個の抗原提示フィーダー細胞当たり $15\text{ }\mu\text{g}$ のOKT-3を含む。

【0742】

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

10

【0743】

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

【0744】

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

20

【0745】

2. サイトカイン及び他の添加物

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

【0746】

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

30

【0747】

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

40

【0748】

C. ステップC：プライミングによる第1の拡大から急速な第2の拡大への移行

場合によっては、例えば図8(特に、例えば図8A及び/または図8B及び/または図8C及び/または図8D)に示されるようにステップBから取得されるTIL集団を含む、プライミングによる第1の拡大から取得されたバルクTIL母集団(REP前と称され

50

ることもある拡大を含み得る)は、急速な第2の拡大(これは、急速拡大プロトコル(REP)と称されることもある拡大を含み得る)に供され、次いで、以下で考察されるように凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾TILが療法に使用される場合、プライミングによる第1の拡大由来の拡大TIL集団または急速な第2の拡大由来の拡大TIL集団は、拡大ステップ前またはプライミングによる第1の拡大後及び急速な第2の拡大前に好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。

【0749】

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

【0750】

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

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

【0751】

いくつかの実施形態では、T I Lは、一次の第1の拡大後、及び急速な第2の拡大前に保存されず、T I Lは、急速な第2の拡大に直接進む（例えば、いくつかの実施形態では、図8（特に、例えば図8 A及び／または図8 B及び／または図8 C及び／または図8 D）に示されるようにステップBからステップDへの移行中の保存がない）。いくつかの実施形態では、移行は、本明細書に記載されるように、閉鎖されたシステム内で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大由来のT I Lである第2のT I L集団は、移行期間なしで急速な第2の拡大に直接進む。

【0752】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大から急速な第2の拡大への移行、例えば、図8（特に、例えば図8 A及び／または図8 B及び／または図8 C及び／または図8 D）によるステップCは、閉鎖されたシステムバイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖されたシステムがT I L拡大のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、G R E X - 1 0 またはG R E X - 1 0 0である。いくつかの実施形態では、閉鎖されたシステムバイ

オリアクターは、単一のバイオリアクターである。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大から急速な第2の拡大への移行は、容器サイズのスケールアップを伴う。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大は、急速な第2の拡大よりも小さい容器内で行われる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大は、GREX-100内で行われ、急速な第2の拡大は、GREX-500内で行われる。

【0753】

D. ステップD：急速な第2の拡大

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

【0754】

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

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

10

【0755】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大は、本開示の方法（例えば、REPと称される拡大、ならびに図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）のステップDに示されるプロセスを含む）を使用して、ガス透過性容器内で行うことができる。いくつかの実施形態では、TILは、IL-2、OKT-3、及びフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）の存在下での急速な第2の拡大において拡大される。いくつかの実施形態では、TILは、IL-2、OKT-3、及びフィーダー細胞の存在下での急速な第2の拡大において拡大され、フィーダー細胞は、プライミングによる第1の拡大において存在するフィーダー細胞の濃度の2倍、2.4倍、2.5倍、3倍、3.5倍、または4倍である最終濃度まで追加される。例えば、TILは、インターロイキン-2（IL-2）またはインターロイキン-15（IL-15）の存在下で非特異的T細胞受容体刺激を使用して、急速に拡大され得る。非特異的T細胞受容体刺激は、例えば、抗CD3抗体、例えば約30ng/mLのOKT3、マウスモノクローナル抗CD3抗体（Ortho-McNeil, Raritan, NJもしくはMiltenyi Biotech, Auburn, CAから市販）またはUHC T-1（BioLegend, San Diego, CA, USAから市販）を含み得る。TILは、がんのエピトープ（複数可）などの抗原性部分を含む、第2の拡大中に1つ以上の抗原を含むことによって、インビトロでTILの更なる刺激を誘導するように拡大され得、これは、ベクター、例えば、ヒト白血球抗原A2（HLA-A2）結合ペプチド、例えば、0.3μMのMART-1:26-35（27L）またはgp100:209-217（210M）から、任意選択的に、300IU/mLのIL-2またはIL-15などのT細胞成長因子の存在下で任意選択的に発現され得る。他の好適な抗原には、例えば、NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、チロシナーゼがん抗原、MAGE-A3、SSX-2、及びVEGFR2、またはそれらの抗原性部分が含まれ得る。TILは、HLA-A2を発現する抗原提示細胞にパルスされたがんの同じ抗原（複数可）で再刺激することによっても急速に拡大され得る。代替的に、TILは、例えば、例として照射された自己リンパ球または照射されたHLA-A2+同種異系リンパ球及びIL-2で更に再刺激され得る。いくつかの実施形態では、再刺激は、第2の拡大の一部として起こる。いくつかの実施形態では、第2の拡大は、照射された自己リンパ球の存在下で、または照射されたHLA-A2+同種異系リンパ球及びIL-2を用いて起こる。

20

30

40

【0756】

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

50

培養培地は、 $1000 \sim 2000 \text{ IU/mL}$ 、 $2000 \sim 3000 \text{ IU/mL}$ 、 $3000 \sim 4000 \text{ IU/mL}$ 、 $4000 \sim 5000 \text{ IU/mL}$ 、 $5000 \sim 6000 \text{ IU/mL}$ 、 $6000 \sim 7000 \text{ IU/mL}$ 、 $7000 \sim 8000 \text{ IU/mL}$ 、または 8000 IU/mL の IL-2 を含む。

【0757】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、 OKT-3 抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約 30 ng/mL の OKT-3 抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約 0.1 ng/mL 、約 0.5 ng/mL 、約 1 ng/mL 、約 2.5 ng/mL 、約 5 ng/mL 、約 7.5 ng/mL 、約 10 ng/mL 、約 15 ng/mL 、約 20 ng/mL 、約 25 ng/mL 、約 30 ng/mL 、約 35 ng/mL 、約 40 ng/mL 、約 50 ng/mL 、約 60 ng/mL 、約 70 ng/mL 、約 80 ng/mL 、約 90 ng/mL 、約 100 ng/mL 、約 200 ng/mL 、約 500 ng/mL 、及び約 $1 \mu\text{g/mL}$ の OKT-3 抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、 $0.1 \text{ ng/mL} \sim 1 \text{ ng/mL}$ 、 $1 \text{ ng/mL} \sim 5 \text{ ng/mL}$ 、 $5 \text{ ng/mL} \sim 10 \text{ ng/mL}$ 、 $10 \text{ ng/mL} \sim 20 \text{ ng/mL}$ 、 $20 \text{ ng/mL} \sim 30 \text{ ng/mL}$ 、 $30 \text{ ng/mL} \sim 40 \text{ ng/mL}$ 、 $40 \text{ ng/mL} \sim 50 \text{ ng/mL}$ 、及び $50 \text{ ng/mL} \sim 100 \text{ ng/mL}$ の OKT-3 抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、 $15 \text{ ng/mL} \sim 30 \text{ ng/mL}$ の OKT-3 抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、 $30 \text{ ng/mL} \sim 60 \text{ ng/mL}$ の OKT-3 抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約 30 ng/mL の OKT-3 を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約 60 ng/mL の OKT-3 を含む。いくつかの実施形態では、 OKT-3 抗体は、ムロモナブである。

【0758】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大における培地は、 IL-2 を含む。いくつかの実施形態では、培地は、 6000 IU/mL の IL-2 を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大における培地は、容器当たり 7.5×10^8 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大における培地は、 OKT-3 を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大培地中に、容器当たり 500 mL の培養培地及び $30 \mu\text{g}$ の OKT-3 を含む。いくつかの実施形態では、容器は、 G-Rex-100 MCS フラスコである。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大培地中に、 6000 IU/mL の IL-2 、 60 ng/mL の OKT-3 、及び 7.5×10^8 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり 500 mL の培養培地、 6000 IU/mL の IL-2 、 $30 \mu\text{g}$ の OKT-3 、及び 7.5×10^8 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【0759】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大における培地は、 IL-2 を含む。いくつかの実施形態では、培地は、 6000 IU/mL の IL-2 を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり $5 \times 10^8 \sim 7.5 \times 10^8$ 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大における培地は、 OKT-3 を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大における培地は、容器当たり 500 mL の培養培地及び $30 \mu\text{g}$ の OKT-3 を含む。いくつかの実施形態では、容器は、 G-Rex-100 MCS フラスコである。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大における培地は、 6000 IU/mL の IL-2 、 60 ng/mL の OKT-3 、及び $5 \times 10^8 \sim 7.5 \times 10^8$ 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大における培地は、容器当たり 500 mL の培養培地、ならびに 6000 IU/mL の IL-2 、 $30 \mu\text{g}$ の OKT-3 、及び $5 \times 10^8 \sim 7.5 \times 10^8$ 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【0760】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、細胞培養培地中に1つ以上のTNFRSFアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、4-1BBアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは4-1BBアゴニストであり、4-1BBアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、EU-101、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリエーション、バイオシミラー、及び組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、 $20 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 40 \mu\text{g}/\text{mL}$ の細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。

【0761】

10

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

【0762】

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

20

【0763】

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

30

【0764】

いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約 $500 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15、約 $400 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15、約 $300 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15、約 $200 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15、約 $180 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15、約 $160 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15、約 $140 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15、約 $120 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15、または約 $100 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約 $500 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15～約 $100 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約 $400 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15～約 $100 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約 $300 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15～約 $100 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約 $200 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約 $180 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-15を更に含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約 $180 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-15を含む。

40

【0765】

いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約 $20 \text{ IU}/\text{mL}$ のIL-21、約

50

15 IU/mLのIL-21、約12 IU/mLのIL-21、約10 IU/mLのIL-21、約5 IU/mLのIL-21、約4 IU/mLのIL-21、約3 IU/mLのIL-21、約2 IU/mLのIL-21、約1 IU/mLのIL-21、または約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約20 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約15 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約12 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約10 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約5 IU/mLのIL-21～約1 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡大培養培地は、約2 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約1 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-21を更に含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約1 IU/mLのIL-21を含む。

10

【0766】

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

20

【0767】

いくつかの実施形態では、REP及び／または急速な第2の拡大は、バルクTILを100倍または200倍過剰の不活性化フィーダー細胞と混合してフラスコ内で行われ、フィーダー細胞濃度は、150 mL培地中のプライミングによる第1の拡大、30 ng/mLのOKT3抗CD3抗体及び6000 IU/mLのIL-2におけるフィーダー細胞濃度の少なくとも1.1倍（1.1×）、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3.0倍、3.1倍、3.2倍、3.3倍、3.4倍、3.5倍、3.6倍、3.7倍、3.8倍、3.9倍または4.0倍である。培地交換（一般に、使用済み培地の3分の2の吸引及び等量の新鮮な培地との交換による、3分の2培地交換）は、細胞が代替の成長チャンバに移されるまで行われる。代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、G-REXフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

30

40

【0768】

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

【0769】

いくつかの実施形態では、第2の拡大（REPと称される拡大、ならびに図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）のステップDで参照される拡大を含み得る）は、100 cmのガス透過性シリコン底部（G-REX-100、Wilson Wolf Manufacturing Corporation

50

n, New Brighton, MN, USAから市販)を有する500mL容量のガス透過性フラスコ内で行うことができる。5×10⁶または10×10⁶TILは、5%ヒトAB血清、3000IU/mLのIL-2、及び30ng/mLの抗CD3(OKT3)を補充された400mLの50/50培地中でPBMCとともに培養され得る。GREX-100フラスコを、5%CO₂中37℃でインキュベートすることができる。5日目に、250mLの上清が除去され、遠心分離ボトルに入れられ、1500rpm(491×g)で10分間遠心分離され得る。TILペレットが、5%ヒトAB血清、6000IU/mLのIL-2を含む150mLの新鮮な培地で再懸濁され、元のGREX-100フラスコに戻し追加され得る。TILがGREX-100フラスコで連続して拡大される場合、10日目または11日目に、TILは、GREX-500などのより大きいフラスコに移され得る。培養14日目に、細胞が採取され得る。培養15日目に、細胞が採取され得る。培養16日目に、細胞が採取され得る。いくつかの実施形態では、培地交換は、細胞が代替の成長チャンバに移されるまで行われる。いくつかの実施形態では、培地の3分の2は、使用済み培地の吸引及び等体積の新鮮な培地との交換によって交換される。いくつかの実施形態では、代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、GREXフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

10

【0770】

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

20

【0771】

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

30

【0772】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、CTS(商標)OpTmizer T-Cell Expansion Serum Supplement、CTS(商標)Immune Cell Serum Replacement、1つ以上のアルブミンまたはアルブミン代用物、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代用物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代用物、1つ以上のコラーゲン前駆体、1つ以上の抗生物質、及び1つ以上の微量元素のうちの1つ以上が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag⁺、Al³⁺、Ba²⁺、Cd²⁺、Co²⁺、Cr³⁺、Ge⁴⁺、Se⁴⁺、Br、T、Mn²⁺、P、Si⁴⁺、V⁵⁺、Mo⁶⁺、Ni²⁺、Rb⁺、Sn²⁺、及びZr⁴⁺を含有する化合物からなる群から選択される1つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／または2-メルカプトエタノールを更に含む。

40

50

【0773】

いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Immune Cell Serum Replacementは、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion Basal Medium、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFM、CTS（商標）AIM-V Medium、CST（商標）AIM-V SFM、LymphoONE（商標）T-Cell Expansion Xeno-Free Medium、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、最小必須培地（MEM）、イーグル基礎培地（BME）、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地（ α MEM）、グラスゴー最小必須培地（G-MEM）、RPMI 成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。

10

【0774】

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

20

【0775】

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

30

【0776】

いくつかの実施形態では、合成培地は、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFM（ThermoFisher Scientific）である。CTS（商標）Optmizer（商標）の任意の配合物も、本発明において有用である。CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMは、1LのCTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion Basal Mediumと、26mLのCTS（商標）Optmizer（商標）T-Cell Expansion Supplementとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、55mMの2-メルカプトエタノールとともに、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）が補充されている。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）、55mMの2-メルカプトエタノール、及び2mMのL-グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Op

40

50

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

10

20

30

40

【0777】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約0.1mM~約10mM、0.5mM~約9mM、1mM~約8mM、2mM~約7mM、3mM~約6mM、または4mM~約5mMの濃度でグルタミン（すなわち、GlutaMAX（登録商標））が補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約2mMの濃度でグルタミン（すなわち、GlutaMAX（登録商標））が補充されている。

【0778】

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

50

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

【0779】

いくつかの実施形態では、国際特許出願公開第WO1998/030679号及び米国特許出願公開第US2002/0076747A1号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載される合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、1つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、1つ以上のコラーゲン前駆体、1つ以上の微量元素、及び1つ以上の抗生物質からなる群から選択される1つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び/またはベターメルカプトエタノールを更に含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、1つ以上のコラーゲン前駆体、及び1つ以上の微量元素からなる群から選択される1つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分 Ag^+ 、 Al^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Ge^{4+} 、 Se^{4+} 、 Br 、 T 、 Mn^{2+} 、 P 、 Si^{4+} 、 V^{5+} 、 Mo^{6+} 、 Ni^{2+} 、 Rb^+ 、 Sn^{2+} 、及び Zr^{4+} を含有する化合物からなる群から選択される1つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、最小必須培地（MEM）、イーグル基礎培地（BME）、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地（ α MEM）、グラスゴー最小必須培地（G-MEM）、RPMI 成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

【0780】

いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約5～200 mg/Lの範囲であり、L-ヒスチジンの濃度は、約5～250 mg/Lであり、L-イソロイシンの濃度は、約5～300 mg/Lであり、L-メチオニンの濃度は、約5～200 mg/Lであり、L-フェニルアラニンの濃度は、約5～400 mg/Lであり、L-プロリンの濃度は、約1～1000 mg/Lであり、L-ヒドロキシプロリンの濃度は、約1～45 mg/Lであり、L-セリンの濃度は、約1～250 mg/Lであり、L-スレオニンの濃度は、約10～500 mg/Lであり、L-トリプトファンの濃度は、約2～110 mg/Lであり、L-チロシンの濃度は、約3～175 mg/Lであり、L-バリンの濃度は、約5～500 mg/Lであり、チアミンの濃度は、約1～20 mg/Lであり、還元型グルタチオンの濃度は、約1～20 mg/Lであり、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩の濃度は、約1～200 mg/Lであり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約1～50 mg/Lであり、インスリンの濃度は、約1～100 mg/Lであり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約0.000001～0.0001 mg/Lであり、アルブミン（例えば、AlbuMAX（登録商標）I）の濃度は、約5000～50,000 mg/Lである。

【0781】

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

【０７８２】

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

【０７８３】

いくつかの実施形態では、Smith, et al., Clin. Transl. Immunology, 4 (1), 2015 (doi:10.1038/cti.2014.31)に記載の合成培地が、本発明において有用である。簡潔には、RPMIまたはCTS（商標）Optmizer（商標）を基礎細胞培地として使用し、０、２％、５％、または１０％のいずれかのCTS（商標）Immune Cell Serum Replacementを補充した。

【０７８４】

いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡大するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ベーターメルカプトエタノール（BMEまたはβME、２－メルカプトエタノールとしても知られる、CAS 60-24-2）を欠いている。

【０７８５】

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

【０７８６】

任意選択的に、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準のアッセイを使用して、急速な第２の拡大（REP拡大と称される拡大を含む）後に行われ得る。例えば、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンプルー排除アッセイが、バルクTILの試料上で行われ得る。いくつかの実施形態では、TIL試料は、Cellometer K2自動セルカウンター（Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA）を使用して計数され、生存率が決定され得る。いくつかの実施形態では、生存率は、標準のCellometer K2 Image Cytometer Automatic Cell Counterプロトコルに従って決定される。

【０７８７】

Tリンパ球及びBリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって生成される。これらの遺伝子セグメント：V（可変）、D（多様性）、J（接合）、及びC（一定）は、免疫グロブリン及びT細胞受容体（TCR）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、T細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるTILを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたTILは、T細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第２の拡大において取得されたTILは、T細胞レパートリー多様

性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはT細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、T細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるT細胞受容体のうちの1つにある。いくつかの実施形態では、T細胞受容体（TCR）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、T細胞受容体（TCR）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、T細胞受容体（TCR）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、TCRa β （すなわち、TCR α ／ β ）の発現が増加する。

10

【0788】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大培養培地（例えば、CM2または第2の細胞培養培地とも称される）は、以下で更に詳細に論じられるように、IL-2、OKT-3、ならびに抗原提示フィーダー細胞（APC）を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大培養培地（例えば、CM2または第2の細胞培養培地とも称される）は、以下で更に詳細に論じられるように、6000 IU/mLのIL-2、30 μ g / フラスコのOKT-3、ならびに 7.5×10^8 個の抗原提示フィーダー細胞（APC）を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大培養培地（例えば、CM2または第2の細胞培養培地とも称される）は、以下で更に詳細に論じられるように、IL-2、OKT-3、ならびに抗原提示フィーダー細胞（APC）を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大培養培地（例えば、CM2または第2の細胞培養培地とも称される）は、以下で更に詳細に論じられるように、6000 IU/mLのIL-2、30 μ g / フラスコのOKT-3、ならびに 5×10^8 個の抗原提示フィーダー細胞（APC）を含む。

20

【0789】

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

30

【0790】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大ステップは、複数のステップに分けられて、（a）TILを、第1の容器、例えば、G-Rex-100 MCS容器内での小規模培養で約3～7日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、（b）小規模培養でのTILを、第1の容器よりも大きい第2の容器、例えば、G-Rex-500-MCS容器に移し、小規模培養由来のTILを、第2の容器内でのより大規模な培養で約4～7日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。

40

【0791】

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

【0792】

50

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

【0793】

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

10

【0794】

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

20

【0795】

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

【0796】

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

30

【0797】

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

【0798】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大は、複数のステップに分割される前に、約3～7日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大の分裂は、急速または第2の拡大の開始後約3日目、4日目、5日目、6日目、または7日目に起こる。

40

【0799】

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

【0800】

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

50

【0801】

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

【0802】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第2の拡大に使用される細胞培養培地は、IL-2、任意選択的にOKT-3、及び更に任意選択的にAPCを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第2の拡大に使用される細胞培養培地は、IL-2、OKT-3、及び更に任意選択的にAPCを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第2の拡大に使用される細胞培養培地は、IL-2、OKT-3及びAPCを含む。

10

【0803】

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

20

【0804】

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

30

【0805】

1. フィーダー細胞及び抗原提示細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される急速な第2の拡大手順（例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）のステップDに記載されるような拡大、ならびにREPと称されるものを含む）は、REPTIL拡大中及び／または急速な第2の拡大中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な献血者からの標準の全血単位から取得される末梢血単核細胞（PBMC）である。PBMCは、Ficoll-Paque勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。

40

【0806】

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

【0807】

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

50

L 拡大手順での使用が認められる。

【0808】

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

10

【0809】

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

20

【0810】

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

30

【0811】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第2の拡大手順は、約 5×10^8 個のフィーダー細胞：約 100×10^6 個のTILの比を必要とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第2の拡大手順は、約 7.5×10^8 個のフィーダー細胞：約 100×10^6 個のTILの比を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載の第2の拡大手順は、約 5×10^8 個のフィーダー細胞：約 50×10^6 個のTILの比を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載の第2の拡大手順は、約 7.5×10^8 個のフィーダー細胞：約 50×10^6 個のTILの比を必要とする。更に他の実施形態では、本明細書に記載の第2の拡大手順は、約 5×10^8 個のフィーダー細胞：約 25×10^6 個のTILを必要とする。更に他の実施形態では、本明細書に記載の第2の拡大手順は、約 7.5×10^8 個のフィーダー細胞：約 25×10^6 個のTILを必要とする。更に他の実施形態では、急速な第2の拡大は、急速な第2の拡大の2倍の数のフィーダー細胞を必要とする。更に他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第1の拡大が約 2.5×10^8 個のフィーダー細胞を必要とする場合、急速な第2の拡大は、約 5×10^8 個の

40

50

フィーダー細胞を必要とする。更に他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第1の拡大が約 2.5×10^8 個のフィーダー細胞を必要とする場合、急速な第2の拡大は、約 7.5×10^8 個のフィーダー細胞を必要とする。更に他の実施形態では、急速な第2の拡大は、プライミングによる第1の拡大の2倍（2.0倍）、2.5倍、3.0倍、3.5倍、または4.0倍の数のフィーダー細胞を必要とする。

【0812】

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

【0813】

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

【0814】

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

【0815】

2. サイトカイン及び他の添加物

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

【0816】

代替的に、TILの急速な第2の拡大のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第US 2017/0107490 A1号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、IL-2、IL-15及びIL-21のうちの2つ以上の組み合わせを用いて追加として可能である。したがって、可能な組み合わせには、IL-2及びIL-15、IL-2及びIL-21、IL-15及びIL-21、ならびにIL-2、IL-15、及びIL-21が含まれ、後者は多くの実施形態で特に有用である。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにT細胞の生成に特に有利に働く。

【0817】

いくつかの実施形態では、ステップD（特に、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dから）はまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、OKT-3抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップDはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、4-1BBアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップD（特に、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dから）はまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、OX-40アゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。加えて、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（PPAR）-ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーター-アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第US 2019/0307796 A1号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップD（特に、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dから）中の培養培地で使用されてもよい。

【0818】

E. ステップE：TILを採取する

急速な第2の拡大ステップ後、細胞が採取され得る。いくつかの実施形態では、TIL

10

20

30

40

50

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

【0819】

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

【0820】

細胞採取機及び／または細胞処理システムは、例えば、Fresenius Kabi、Tomtec Life Science、Perkin Elmer、及び Inotech Biosystems International, Inc. を含む、様々な供給源から市販されている。任意の細胞ベースの採取機が本方法とともに用いられ得る。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理システムは、膜ベースの細胞採取機である。いくつかの実施形態では、細胞採取は、LOVO システム（Fresenius Kabi によって製造されたもの）などの細胞処理システムによるものである。

「LOVO 細胞処理システム」という用語は、細胞を含む溶液を、滅菌及び／または閉鎖されたシステム環境で回転膜または回転フィルターなどの膜またはフィルターを通してポンプ輸送し、連続フローを可能にし、細胞を処理して、ペレット化せずに上清または細胞培養培地を除去する、任意のベンダーによって製造された任意の機器または装置も指す。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理システムは、滅菌閉鎖されたシステム内で、細胞分離、洗浄、流体交換、濃縮、及び／または他の細胞処理ステップを行うことができる。

【0821】

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

【0822】

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

【0823】

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

て16日目に採取される。

【0824】

F. ステップF：最終配合物及び注入容器への移行

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

【0825】

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

【0826】

IV. 更なるGen2、Gen3、及び他のTIL製造プロセスの実施形態

A. PBMCフィーダー細胞比

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡大方法で使用する培養培地（例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）を参照）は、抗CD3抗体、例えばOKT-3を含む。IL-2と組み合わせた抗CD3抗体は、TIL集団におけるT細胞活性化及び細胞分裂を誘導する。この効果は、全長抗体、ならびにFab及びF(ab')₂断片で見ることができ、前者が一般に好まれ、例えば、Tsoukas et al., J. Immunol. 1985, 135, 1719（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【0827】

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

A. T細胞の体積（10μm直径）： $V = (4/3) \pi r^3 = 523.6 \mu m^3$

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

C. カラムBを充填するために必要な細胞数： $4 \times 10^{12} \mu m^3 / 523.6 \mu m^3 = 7.6 \times 10^8 \mu m^3 * 0.64 = 4.86 \times 10^8$

D. 四次元空間で最適に活性化され得る細胞の数： $4.86 \times 10^8 / 24 = 20.25 \times 10^6$

E. G-REX-500に外挿されるフィーダー及びTILの数：TIL： 100×10^6 及びフィーダー： 2.5×10^9

【0828】

この計算では、100cm²の底部を有するシリンジ中でのTILの活性化のために二十面体形状を提供するのに必要な単核細胞の数の近似値が使用される。この計算は、Jin, et al., J. Immunother. 2012, 35, 283-292に記載されているように、NCI実験データを密接に反映するT細胞の閾値活性化について、約 5×10^8 の実験結果を導き出す。（C）では、乗数（0.64）は、Jaeger and Nagel, Science, 1992, 255, 1523-3によって計算された等価球のランダム充填密度である。（D）において、除数24は、Musin, Russ. Math. Surv., 2003, 58, 794-795に記載される、四次元空間内の同様のオブジェクトと接触する可能性のある等価球の数または「ニュートン数」である。

【0829】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞の数は、急速な第2の拡大中に外因的に供給される抗原提示フィーダー

一細胞の数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、本方法は、急速な第2の拡大の細胞培養培地と比較しておよそ50%少ない抗原提示細胞を含む細胞培養培地中でプライミングによる第1の拡大を行うことを含む。

【0830】

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

【0831】

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約1.1:1~正確にまたは約20:1の範囲から選択される。

10

【0832】

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約1.1:1~正確にまたは約10:1の範囲から選択される。

【0833】

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約1.1:1~正確にまたは約9:1の範囲から選択される。

【0834】

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約1.1:1~正確にまたは約8:1の範囲から選択される。

20

【0835】

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約1.1:1~正確にまたは約7:1の範囲から選択される。

【0836】

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約1.1:1~正確にまたは約6:1の範囲から選択される。

30

【0837】

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約1.1:1~正確にまたは約5:1の範囲から選択される。

【0838】

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約1.1:1~正確にまたは約4:1の範囲から選択される。

【0839】

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数のプライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約1.1:1~正確にまたは約3:1の範囲から選択される。

40

【0840】

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約1.1:1~正確にまたは約2.9:1の範囲から選択される。

【0841】

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約

50

50

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2.9:1の範囲から選択される。

【0855】

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2.8:1の範囲から選択される。

【0856】

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2.7:1の範囲から選択される。

10

【0857】

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2.6:1の範囲から選択される。

【0858】

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2.5:1の範囲から選択される。

【0859】

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2.4:1の範囲から選択される。

20

【0860】

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2.3:1の範囲から選択される。

【0861】

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2.2:1の範囲から選択される。

30

【0862】

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2.1:1の範囲から選択される。

【0863】

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1である。

【0864】

他の実施形態では、急速な第2の拡大中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2:1、2.1:1、2.2:1、2.3:1、2.4:1、2.5:1、2.6:1、2.7:1、2.8:1、2.9:1、3:1、3.1:1、3.2:1、3.3:1、3.4:1、3.5:1、3.6:1、3.7:1、3.8:1、3.9:1、4:1、4.1:1、4.2:1、4.3:1、4.4:1、4.5:1、4.6:1、4.7:1、4.8:1、4.9:1、または5:1である。

40

【0865】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大中に外因的に供給されるAPCの数

50

は、正確にまたは約 1×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3×10^8 、 3.1×10^8 、 3.2×10^8 、 3.3×10^8 、 3.4×10^8 、または 3.5×10^8 個の APC であり、急速な第 2 の拡大中に外因的に供給される APC の数は、正確にまたは約 3.5×10^8 、 3.6×10^8 、 3.7×10^8 、 3.8×10^8 、 3.9×10^8 、 4×10^8 、 4.1×10^8 、 4.2×10^8 、 4.3×10^8 、 4.4×10^8 、 4.5×10^8 、 4.6×10^8 、 4.7×10^8 、 4.8×10^8 、 4.9×10^8 、 5×10^8 、 5.1×10^8 、 5.2×10^8 、 5.3×10^8 、 5.4×10^8 、 5.5×10^8 、 5.6×10^8 、 5.7×10^8 、 5.8×10^8 、 5.9×10^8 、 6×10^8 、 6.1×10^8 、 6.2×10^8 、 6.3×10^8 、 6.4×10^8 、 6.5×10^8 、 6.6×10^8 、 6.7×10^8 、 6.8×10^8 、 6.9×10^8 、 7×10^8 、 7.1×10^8 、 7.2×10^8 、 7.3×10^8 、 7.4×10^8 、 7.5×10^8 、 7.6×10^8 、 7.7×10^8 、 7.8×10^8 、 7.9×10^8 、 8×10^8 、 8.1×10^8 、 8.2×10^8 、 8.3×10^8 、 8.4×10^8 、 8.5×10^8 、 8.6×10^8 、 8.7×10^8 、 8.8×10^8 、 8.9×10^8 、 9×10^8 、 9.1×10^8 、 9.2×10^8 、 9.3×10^8 、 9.4×10^8 、 9.5×10^8 、 9.6×10^8 、 9.7×10^8 、 9.8×10^8 、 9.9×10^8 、または 1×10^9 個の APC である。

10

20

【0866】

他の実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大中に外因的に供給される APC の数は、正確にまたは約 1.5×10^8 個の APC ~ 正確にまたは約 3×10^8 個の APC の範囲から選択され、急速な第 2 の拡大中に外因的に供給される APC の数は、正確にまたは約 4×10^8 個の APC ~ 正確にまたは約 7.5×10^8 個の APC の範囲から選択される。

【0867】

他の実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大中に外因的に供給される APC の数は、正確にまたは約 2×10^8 個の APC ~ 正確にまたは約 2.5×10^8 個の APC の範囲から選択され、急速な第 2 の拡大中に外因的に供給される APC の数は、正確にまたは約 4.5×10^8 個の APC ~ 正確にまたは約 5.5×10^8 個の APC の範囲から選択される。

30

【0868】

他の実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大中に外因的に供給される APC の数は、正確にまたは約 2.5×10^8 個の APC であり、急速な第 2 の拡大中に外因的に供給される APC の数は、正確にまたは約 5×10^8 個の APC である。

【0869】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目に添加される APC (例えば、PBMC を含む) の数は、プライミングによる第 1 の拡大の 7 日目 (例えば、本方法の 7 日目) に添加される PBMC の数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、本方法は、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目に抗原提示細胞を第 1 の TIL 集団に添加することと、7 日目に抗原提示細胞を第 2 の TIL 集団に添加することとを含み、0 日目に添加される抗原提示細胞の数は、プライミングによる第 1 の拡大の 7 日目 (例えば、本方法の 7 日目) に添加される抗原提示細胞の数のおよそ 50 % である。

40

【0870】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡大の 7 日目に外因的に供給される APC (例えば、PBMC を含む) の数は、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目に外因的に供給される PBMC の数よりも多い。

【0871】

他の実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大において外因的に供給される APC

50

は、正確にまたは約 1.0×10^6 個の APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 4.5×10^6 個の APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【0872】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 1.5×10^6 個の APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 3.5×10^6 個の APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【0873】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 2×10^6 個の APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 3×10^6 個の APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【0874】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 2×10^6 個の APC / cm^2 の密度で培養フラスコに播種される。

【0875】

他の実施形態では、プライミング第1の拡大において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 1.0×10^6 、 1.1×10^6 、 1.2×10^6 、 1.3×10^6 、 1.4×10^6 、 1.5×10^6 、 1.6×10^6 、 1.7×10^6 、 1.8×10^6 、 1.9×10^6 、 2×10^6 、 2.1×10^6 、 2.2×10^6 、 2.3×10^6 、 2.4×10^6 、 2.5×10^6 、 2.6×10^6 、 2.7×10^6 、 2.8×10^6 、 2.9×10^6 、 3×10^6 、 3.1×10^6 、 3.2×10^6 、 3.3×10^6 、 3.4×10^6 、 3.5×10^6 、 3.6×10^6 、 3.7×10^6 、 3.8×10^6 、 3.9×10^6 、 4×10^6 、 4.1×10^6 、 4.2×10^6 、 4.3×10^6 、 4.4×10^6 または 4.5×10^6 個の APC / cm^2 の密度で培養フラスコに播種される。

【0876】

他の実施形態では、急速な第2の拡大において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 2.5×10^6 個の APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 7.5×10^6 個の APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【0877】

他の実施形態では、急速な第2の拡大において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 3.5×10^6 個の APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 6.0×10^6 個の APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【0878】

他の実施形態では、急速な第2の拡大において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 4.0×10^6 個の APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 5.5×10^6 個の APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【0879】

他の実施形態では、急速な第2の拡大において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 4.0×10^6 個の APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【0880】

他の実施形態では、急速な第2の拡大において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 2.5×10^6 個の APC / cm^2 、 2.6×10^6 個の APC / cm^2 、 2.7×10^6 個の 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 、 7.5×10^6 、 7.6×10^6 、 7.7×10^6 、 7.8×10^6 、 7.9×10^6 、 8×10^6 、 8.1×10^6 、 8.2×10^6 、 8.3×10^6 、 8.4×10^6 、 8.5×10^6 、 8.6×10^6 、 8.7×10^6 、 8.8×10^6 、 8.9×10^6 、 9×10^6 、 9.1×10^6 、 9.2×10^6 、 9.3×10^6 、 9.4×10^6 、 9.5×10^6 、 9.6×10^6 、 9.7×10^6 、 9.8×10^6 、 9.9×10^6 、 10×10^6 個の APC / cm^2 の密度で培養フラスコに播種される。

7×10^6 、 6.8×10^6 、 6.9×10^6 、 7×10^6 、 7.1×10^6 、 7.2×10^6 、 7.3×10^6 、 7.4×10^6 、または 7.5×10^6 個の APC / cm^2 の密度で培養フラスコに播種される。

【0881】

他の実施形態では、プライミング第1の拡大において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 1.0×10^6 、 1.1×10^6 、 1.2×10^6 、 1.3×10^6 、 1.4×10^6 、 1.5×10^6 、 1.6×10^6 、 1.7×10^6 、 1.8×10^6 、 1.9×10^6 、 2×10^6 、 2.1×10^6 、 2.2×10^6 、 2.3×10^6 、 2.4×10^6 、 2.5×10^6 、 2.6×10^6 、 2.7×10^6 、 2.8×10^6 、 2.9×10^6 、 3×10^6 、 3.1×10^6 、 3.2×10^6 、 3.3×10^6 、 3.4×10^6 、 3.5×10^6 、 3.6×10^6 、 3.7×10^6 、 3.8×10^6 、 3.9×10^6 、 4×10^6 、 4.1×10^6 、 4.2×10^6 、 4.3×10^6 、 4.4×10^6 、または 4.5×10^6 個の APC / cm^2 の密度で培養フラスコに播種され、急速な第2の拡大において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 2.5×10^6 個の APC / cm^2 、 2.6×10^6 個の APC / cm^2 、 2.7×10^6 個の APC / cm^2 、 2.8×10^6 、 2.9×10^6 、 3×10^6 、 3.1×10^6 、 3.2×10^6 、 3.3×10^6 、 3.4×10^6 、 3.5×10^6 、 3.6×10^6 、 3.7×10^6 、 3.8×10^6 、 3.9×10^6 、 4×10^6 、 4.1×10^6 、 4.2×10^6 、 4.3×10^6 、 4.4×10^6 、 4.5×10^6 、 4.6×10^6 、 4.7×10^6 、 4.8×10^6 、 4.9×10^6 、 5×10^6 、 5.1×10^6 、 5.2×10^6 、 5.3×10^6 、 5.4×10^6 、 5.5×10^6 、 5.6×10^6 、 5.7×10^6 、 5.8×10^6 、 5.9×10^6 、 6×10^6 、 6.1×10^6 、 6.2×10^6 、 6.3×10^6 、 6.4×10^6 、 6.5×10^6 、 6.6×10^6 、 6.7×10^6 、 6.8×10^6 、 6.9×10^6 、 7×10^6 、 7.1×10^6 、 7.2×10^6 、 7.3×10^6 、 7.4×10^6 、または 7.5×10^6 個の APC / cm^2 の密度で培養フラスコに播種される。

10

20

【0882】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 1.0×10^6 個の APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 4.5×10^6 個の APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第2の拡大において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 2.5×10^6 個の APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 7.5×10^6 個の APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

30

【0883】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 1.5×10^6 個の APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 3.5×10^6 個の APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第2の拡大において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 3.5×10^6 個の APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 6×10^6 個の APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

40

【0884】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 2×10^6 個の APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 3×10^6 個の APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第2の拡大において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 4×10^6 個の APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 5.5×10^6 個の APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【0885】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 2×10^6 個の APC / cm^2 の密度で培養フラスコに播種され、急

50

速な第2の拡大において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 4×10^6 個のAPC/cm²の密度で培養フラスコに播種される。

【0886】

他の実施形態では、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるPBMCの数に対する比は、正確にまたは約1.1：1～正確にまたは約20：1の範囲から選択される。

【0887】

他の実施形態では、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるPBMCの数に対する比は、正確にまたは約1.1：1～正確にまたは約10：1の範囲から選択される。

【0888】

他の実施形態では、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるPBMCの数に対する比は、正確にまたは約1.1：1～正確にまたは約9：1の範囲から選択される。

【0889】

他の実施形態では、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比は、正確にまたは約1.1：1～正確にまたは約8：1の範囲から選択される。

【0890】

他の実施形態では、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比は、正確にまたは約1.1：1～正確にまたは約7：1の範囲から選択される。

【0891】

他の実施形態では、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比は、正確にまたは約1.1：1～正確にまたは約6：1の範囲から選択される。

【0892】

他の実施形態では、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比は、正確にまたは約1.1：1～正確にまたは約5：1の範囲から選択される。

【0893】

他の実施形態では、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比は、正確にまたは約1.1：1～正確にまたは約4：1の範囲から選択される。

【0894】

他の実施形態では、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比は、正確にまたは約1.1：1～正確にまたは約3：1の範囲から選択される。

【0895】

他の実施形態では、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給される

10

20

30

40

50

A P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 1 . 1 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 9 : 1 の範囲から選択される。

【0896】

他の実施形態では、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるA P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるA P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 1 . 1 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 8 : 1 の範囲から選択される。

【0897】

他の実施形態では、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるA P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるA P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 1 . 1 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 7 : 1 の範囲から選択される。

【0898】

他の実施形態では、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるA P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるA P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 1 . 1 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 6 : 1 の範囲から選択される。

【0899】

他の実施形態では、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるA P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるA P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 1 . 1 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 5 : 1 の範囲から選択される。

【0900】

他の実施形態では、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるA P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるA P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 1 . 1 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 4 : 1 の範囲から選択される。

【0901】

他の実施形態では、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるA P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるA P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 1 . 1 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 3 : 1 の範囲から選択される。

【0902】

他の実施形態では、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるA P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるA P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 1 . 1 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 2 : 1 の範囲から選択される。

【0903】

他の実施形態では、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるA P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるA P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 1 . 1 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 1 : 1 の範囲から選択される。

【0904】

他の実施形態では、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるA P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるA P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 1 . 1 : 1 ~ 正確にまたは約 2 : 1 の範囲から選択される。

【0905】

他の実施形態では、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるA P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給される

10

20

30

40

50

A P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 10 : 1 の範囲から選択される。

【0906】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡大の 7 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 5 : 1 の範囲から選択される。

【0907】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡大の 7 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 4 : 1 の範囲から選択される。

【0908】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡大の 7 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 3 : 1 の範囲から選択される。

【0909】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡大の 7 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 9 : 1 の範囲から選択される。

【0910】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡大の 7 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 8 : 1 の範囲から選択される。

【0911】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡大の 7 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 7 : 1 の範囲から選択される。

【0912】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡大の 7 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 6 : 1 の範囲から選択される。

【0913】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡大の 7 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 5 : 1 の範囲から選択される。

【0914】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡大の 7 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 4 : 1 の範囲から選択される。

【0915】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡大の 7 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目に外因的に供給される

10

20

30

40

50

A P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 3 : 1 の範囲から選択される。

【0916】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡大の 7 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数のプライミングによる第 1 の拡大の 0 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 2 : 1 の範囲から選択される。

【0917】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡大の 7 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 1 : 1 の範囲から選択される。

【0918】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡大の 7 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 である。

【0919】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡大の 7 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 1 . 1 : 1、1 . 2 : 1、1 . 3 : 1、1 . 4 : 1、1 . 5 : 1、1 . 6 : 1、1 . 7 : 1、1 . 8 : 1、1 . 9 : 1、2 : 1、2 . 1 : 1、2 . 2 : 1、2 . 3 : 1、2 . 4 : 1、2 . 5 : 1、2 . 6 : 1、2 . 7 : 1、2 . 8 : 1、2 . 9 : 1、3 : 1、3 . 1 : 1、3 . 2 : 1、3 . 3 : 1、3 . 4 : 1、3 . 5 : 1、3 . 6 : 1、3 . 7 : 1、3 . 8 : 1、3 . 9 : 1、4 : 1、4 . 1 : 1、4 . 2 : 1、4 . 3 : 1、4 . 4 : 1、4 . 5 : 1、4 . 6 : 1、4 . 7 : 1、4 . 8 : 1、4 . 9 : 1、または 5 : 1 である。

【0920】

他の実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数は、正確にまたは約 1×10^8 、 $1 . 1 \times 10^8$ 、 $1 . 2 \times 10^8$ 、 $1 . 3 \times 10^8$ 、 $1 . 4 \times 10^8$ 、 $1 . 5 \times 10^8$ 、 $1 . 6 \times 10^8$ 、 $1 . 7 \times 10^8$ 、 $1 . 8 \times 10^8$ 、 $1 . 9 \times 10^8$ 、 2×10^8 、 $2 . 1 \times 10^8$ 、 $2 . 2 \times 10^8$ 、 $2 . 3 \times 10^8$ 、 $2 . 4 \times 10^8$ 、 $2 . 5 \times 10^8$ 、 $2 . 6 \times 10^8$ 、 $2 . 7 \times 10^8$ 、 $2 . 8 \times 10^8$ 、 $2 . 9 \times 10^8$ 、 3×10^8 、 $3 . 1 \times 10^8$ 、 $3 . 2 \times 10^8$ 、 $3 . 3 \times 10^8$ 、 $3 . 4 \times 10^8$ 、または $3 . 5 \times 10^8$ 個の A P C（例えば、P B M Cを含む）であり、急速な第 2 の拡大の 7 日目に外因的に供給される A P C（例えば、P B M Cを含む）の数は、正確にまたは約 $3 . 5 \times 10^8$ 、 $3 . 6 \times 10^8$ 、 $3 . 7 \times 10^8$ 、 $3 . 8 \times 10^8$ 、 $3 . 9 \times 10^8$ 、 4×10^8 、 $4 . 1 \times 10^8$ 、 $4 . 2 \times 10^8$ 、 $4 . 3 \times 10^8$ 、 $4 . 4 \times 10^8$ 、 $4 . 5 \times 10^8$ 、 $4 . 6 \times 10^8$ 、 $4 . 7 \times 10^8$ 、 $4 . 8 \times 10^8$ 、 $4 . 9 \times 10^8$ 、 5×10^8 、 $5 . 1 \times 10^8$ 、 $5 . 2 \times 10^8$ 、 $5 . 3 \times 10^8$ 、 $5 . 4 \times 10^8$ 、 $5 . 5 \times 10^8$ 、 $5 . 6 \times 10^8$ 、 $5 . 7 \times 10^8$ 、 $5 . 8 \times 10^8$ 、 $5 . 9 \times 10^8$ 、 6×10^8 、 $6 . 1 \times 10^8$ 、 $6 . 2 \times 10^8$ 、 $6 . 3 \times 10^8$ 、 $6 . 4 \times 10^8$ 、 $6 . 5 \times 10^8$ 、 $6 . 6 \times 10^8$ 、 $6 . 7 \times 10^8$ 、 $6 . 8 \times 10^8$ 、 $6 . 9 \times 10^8$ 、 7×10^8 、 $7 . 1 \times 10^8$ 、 $7 . 2 \times 10^8$ 、 $7 . 3 \times 10^8$ 、 $7 . 4 \times 10^8$ 、 $7 . 5 \times 10^8$ 、 $7 . 6 \times 10^8$ 、 $7 . 7 \times 10^8$ 、 $7 . 8 \times 10^8$ 、 $7 . 9 \times 10^8$ 、 8×10^8 、 $8 . 1 \times 10^8$ 、 $8 . 2 \times 10^8$ 、 $8 . 3 \times 10^8$ 、 $8 . 4 \times 10^8$ 、 $8 . 5 \times 10^8$ 、 $8 . 6 \times 10^8$ 、 $8 . 7 \times 10^8$ 、 $8 . 8 \times 10^8$ 、 $8 . 9 \times 10^8$ 、 9×10^8 、 $9 . 1 \times 10^8$ 、 $9 . 2 \times 10^8$ 、 $9 . 3 \times 10^8$ 、 $9 . 4 \times 10^8$ 、 $9 . 5 \times 10^8$ 、 $9 . 6 \times 10^8$ 、 $9 . 7 \times 10^8$ 、 $9 . 8 \times 10^8$ 、 $9 . 9 \times 10^8$ 、または 1×10^9 個の A P C（例えば、P B M Cを含む）である。

【0921】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 1×10^8 個のAPC（例えば、PBMCを含む）の範囲から選択され、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 3.5×10^8 個のAPC（例えば、PBMCを含む）の範囲から選択される。

【0922】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 1.5×10^8 個のAPC～正確にまたは約 3×10^8 個のAPC（例えば、PBMCを含む）の範囲から選択され、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 4×10^8 個のAPC（例えば、PBMCを含む）～正確にまたは約 7.5×10^8 個のAPC（例えば、PBMCを含む）の範囲から選択される。

【0923】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 2×10^8 個のAPC（例えば、PBMCを含む）～正確にまたは約 2.5×10^8 個のAPC（例えば、PBMCを含む）の範囲から選択され、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 4.5×10^8 個のAPC（例えば、PBMCを含む）～正確にまたは約 5.5×10^8 個のAPC（例えば、PBMCを含む）の範囲から選択される。

【0924】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 2.5×10^8 個のAPC（例えば、PBMCを含む）であり、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 5×10^8 個のAPC（例えば、PBMCを含む）である。

【0925】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目に追加されるAPC（例えば、PBMCを含む）層の数は、急速な第2の拡大の7日目に追加されるAPC（例えば、PBMCを含む）層の数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、方法は、プライミングによる第1の拡大の0日目に抗原提示細胞層を第1のTIL集団に追加することと、7日目に抗原提示細胞を第2のTIL集団に追加することを含み、0日目に追加される抗原提示細胞層の数は、7日目に追加される抗原提示細胞層の数のおよそ50%である。

【0926】

他の実施形態では、急速な第2の拡大の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）層の数は、プライミングによる第1の拡大の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）層の数よりも多い。

【0927】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目は、正確にまたは約2細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡大の7日目は、正確にまたは約4細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こる。

【0928】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目は、正確にまたは約1細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡大の7日目は、正確にまたは約3細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こる。

10

20

30

40

50

【0929】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目は、正確にまたは約1.5細胞層～正確にまたは約2.5細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡大の7日目は、正確にまたは約3細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こる。

【0930】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目は、正確にまたは約1細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡大の7日目は、正確にまたは約2細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こる。

10

【0931】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目は、正確にまたは約1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、または3細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡大の7日目は、正確にまたは約3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、または8細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こる。

20

【0932】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目は、正確にまたは約1細胞層～正確にまたは約2細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡大の7日目は、正確にまたは約3細胞層～正確にまたは約10細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こる。

【0933】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目は、正確にまたは約2細胞層～正確にまたは約3細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡大の7日目は、正確にまたは約4細胞層～正確にまたは約8細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こる。

30

【0934】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目は、正確にまたは約2細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡大の7日目は、正確にまたは約4細胞層～正確にまたは約8細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こる。

【0935】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目は、正確にまたは約1、2、または3細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡大の7日目は、正確にまたは約3、4、5、6、7、8、9、または10細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こる。

40

【0936】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目は、APC（例えば、PBMCを含む）の第1の層の数に等しい第1の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡大の7日目は、APC（例えば、PBMCを含む）の第2の層の数に等しい第2の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こる。

50

Cを含む)の存在下で起こり、APC(例えば、P BMCを含む)の第1の層の数の、APC(例えば、P BMCを含む)の第2の層の数に対する比は、正確にまたは約1:1.1~正確にまたは約1:10の範囲から選択される。

【0937】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目は、APC(例えば、P BMCを含む)の第1の層の数に等しい第1の平均厚さを有する層状APC(例えば、P BMCを含む)の存在下で起こり、急速な第2の拡大の7日目は、APC(例えば、P BMCを含む)の第2の層の数に等しい第2の平均厚さを有する層状APC(例えば、P BMCを含む)の存在下で起こり、APC(例えば、P BMCを含む)の第1の層の数の、APC(例えば、P BMCを含む)の第2の層の数に対する比は、正確にまたは約1:1.1~正確にまたは約1:8の範囲から選択される。

10

【0938】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目は、APC(例えば、P BMCを含む)の第1の層の数に等しい第1の平均厚さを有する層状APC(例えば、P BMCを含む)の存在下で起こり、急速な第2の拡大の7日目は、APC(例えば、P BMCを含む)の第2の層の数に等しい第2の平均厚さを有する層状APC(例えば、P BMCを含む)の存在下で起こり、APC(例えば、P BMCを含む)の第1の層の数のAPC(例えば、P BMCを含む)の第2の層の数に対する比は、正確にまたは約1:1.1~正確にまたは約1:7の範囲から選択される。

【0939】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目は、APC(例えば、P BMCを含む)の第1の層の数に等しい第1の平均厚さを有する層状APC(例えば、P BMCを含む)の存在下で起こり、急速な第2の拡大の7日目は、APC(例えば、P BMCを含む)の第2の層の数に等しい第2の平均厚さを有する層状APC(例えば、P BMCを含む)の存在下で起こり、APC(例えば、P BMCを含む)の第1の層の数のAPC(例えば、P BMCを含む)の第2の層の数に対する比は、正確にまたは約1:1.1~正確にまたは約1:6の範囲から選択される。

20

【0940】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目は、APC(例えば、P BMCを含む)の第1の層の数に等しい第1の平均厚さを有する層状APC(例えば、P BMCを含む)の存在下で起こり、急速な第2の拡大の7日目は、APC(例えば、P BMCを含む)の第2の層の数に等しい第2の平均厚さを有する層状APC(例えば、P BMCを含む)の存在下で起こり、APC(例えば、P BMCを含む)の第1の層の数のAPC(例えば、P BMCを含む)の第2の層の数に対する比は、正確にまたは約1:1.1~正確にまたは約1:5の範囲から選択される。

30

【0941】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目は、APC(例えば、P BMCを含む)の第1の層の数に等しい第1の平均厚さを有する層状APC(例えば、P BMCを含む)の存在下で起こり、急速な第2の拡大の7日目は、APC(例えば、P BMCを含む)の第2の層の数に等しい第2の平均厚さを有する層状APC(例えば、P BMCを含む)の存在下で起こり、APC(例えば、P BMCを含む)の第1の層の数のAPC(例えば、P BMCを含む)の第2の層の数に対する比は、正確にまたは約1:1.1~正確にまたは約1:4の範囲から選択される。

40

【0942】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目は、APC(例えば、P BMCを含む)の第1の層の数に等しい第1の平均厚さを有する層状APC(例えば、P BMCを含む)の存在下で起こり、急速な第2の拡大の7日目は、APC(例えば、P BMCを含む)の第2の層の数に等しい第2の平均厚さを有する層状APC(例えば、P BMCを含む)の存在下で起こり、APC(例えば、P BMCを含む)の第1の層の数のAPC(例えば、P BMCを含む)の第2の層の数に対する比は、正確にまたは約1:1.1~正確にまたは約1:4の範囲から選択される。

50

～正確にまたは約 1 : 3 の範囲から選択される。

【0943】

他の実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第 1 の層の数に等しい第 1 の平均厚さを有する層状 APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、急速な第 2 の拡大の 7 日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第 2 の層の数に等しい第 2 の平均厚さを有する層状 APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、APC（例えば、PBM Cを含む）の第 1 の層の数の APC（例えば、PBM Cを含む）の第 2 の層の数に対する比は、正確にまたは約 1 : 1. 1 ～正確にまたは約 1 : 2 の範囲から選択される。

【0944】

他の実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第 1 の層の数に等しい第 1 の平均厚さを有する層状 APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、急速な第 2 の拡大の 7 日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第 2 の層の数に等しい第 2 の平均厚さを有する層状 APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、APC（例えば、PBM Cを含む）の第 1 の層の数の APC（例えば、PBM Cを含む）の第 2 の層の数に対する比は、正確にまたは約 1 : 1. 2 ～正確にまたは約 1 : 8 の範囲から選択される。

【0945】

他の実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第 1 の層の数に等しい第 1 の平均厚さを有する層状 APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、急速な第 2 の拡大の 7 日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第 2 の層の数に等しい第 2 の平均厚さを有する層状 APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、APC（例えば、PBM Cを含む）の第 1 の層の数の APC（例えば、PBM Cを含む）の第 2 の層の数に対する比は、正確にまたは約 1 : 1. 3 ～正確にまたは約 1 : 7 の範囲から選択される。

【0946】

他の実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第 1 の層の数に等しい第 1 の平均厚さを有する層状 APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、急速な第 2 の拡大の 7 日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第 2 の層の数に等しい第 2 の平均厚さを有する層状 APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、APC（例えば、PBM Cを含む）の第 1 の層の数の APC（例えば、PBM Cを含む）の第 2 の層の数に対する比は、正確にまたは約 1 : 1. 4 ～正確にまたは約 1 : 6 の範囲から選択される。

【0947】

他の実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第 1 の層の数に等しい第 1 の平均厚さを有する層状 APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、急速な第 2 の拡大の 7 日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第 2 の層の数に等しい第 2 の平均厚さを有する層状 APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、APC（例えば、PBM Cを含む）の第 1 の層の数の APC（例えば、PBM Cを含む）の第 2 の層の数に対する比は、正確にまたは約 1 : 1. 5 ～正確にまたは約 1 : 5 の範囲から選択される。

【0948】

他の実施形態では、プライミングによる第 1 の拡大の 0 日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第 1 の層の数に等しい第 1 の平均厚さを有する層状 APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、急速な第 2 の拡大の 7 日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第 2 の層の数に等しい第 2 の平均厚さを有する層状 APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、APC（例えば、PBM Cを含む）の第 1 の層の数の APC（例えば、PBM Cを含む）の第 2 の層の数に対する比は、正確にまたは約 1 : 1. 6 ～正確にまたは約 1 : 4 の範囲から選択される。

【0949】

10

20

30

40

50

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層の数に等しい第1の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡大の7日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層の数に等しい第2の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層の数のAPC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層の数に対する比は、正確にまたは約1：1.7～正確にまたは約1：3.5の範囲から選択される。

【0950】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層の数に等しい第1の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡大の7日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層の数に等しい第2の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層の数のAPC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層の数に対する比は、正確にまたは約1：1.8～正確にまたは約1：3の範囲から選択される。

10

【0951】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層の数に等しい第1の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡大の7日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層の数に等しい第2の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層の数のAPC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層の数に対する比は、正確にまたは約1：1.9～正確にまたは約1：2.5の範囲から選択される。

20

【0952】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層の数に等しい第1の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡大の7日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層の数に等しい第2の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層の数の、APC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層の数に対する比は、正確にまたは約1：2である。

30

【0953】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡大の0日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層の数に等しい第1の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡大の7日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層の数に等しい第2の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、第1のAPC（例えば、PBM Cを含む）層の数の第2のAPC（例えば、PBM Cを含む）層の数に対する比は、約1：1.1、1：1.2、1：1.3、1：1.4、1：1.5、1：1.6、1：1.7、1：1.8、1：1.9、1：2.1、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、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、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、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、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、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、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、1：9.2、1：9.3、1：9.4、1：9.5

40

50

、1：9.6、1：9.7、1：9.8、1：9.9、または1：10から選択される。

【0954】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大におけるAPCの数は、約 1.0×10^6 個のAPC/cm²～約 4.5×10^6 個のAPC/cm²の範囲から選択され、急速な第2の拡大におけるAPCの数は、約 2.5×10^6 個のAPC/cm²～約 7.5×10^6 個のAPC/cm²の範囲から選択される。

【0955】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大におけるAPCの数は、約 1.5×10^6 個のAPC/cm²～約 3.5×10^6 個のAPC/cm²の範囲から選択され、急速な第2の拡大におけるAPCの数は、約 3.5×10^6 個のAPC/cm²～約 6.0×10^6 個のAPC/cm²の範囲から選択される。

10

【0956】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大におけるAPCの数は、約 2.0×10^6 個のAPC/cm²～約 3.0×10^6 個のAPC/cm²の範囲から選択され、急速な第2の拡大におけるAPCの数は、約 4.0×10^6 個のAPC/cm²～約 5.5×10^6 個のAPC/cm²の範囲から選択される。

【0957】

A. 任意選択的な細胞培地成分

1. 抗CD3抗体

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡大方法で使用される培養培地（REPと称されるものを含む、例えば、図1及び8（特に、例えば図8B）を参照）は、抗CD3抗体を含む。IL-2と組み合わせた抗CD3抗体は、TIL集団におけるT細胞活性化及び細胞分裂を誘導する。この効果は、全長抗体、ならびにFab及びF(ab')₂断片で見ることができ、前者が一般に好まれ、例えば、Tsoukas et al., J. Immunol. 1985, 135, 1719（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

20

【0958】

当業者によって理解されるように、マウス、ヒト、霊長類、ラット、及びイヌ抗体を含むが、これらに限定されない、様々な哺乳動物からの抗ヒトCD3ポリクローナル及びモノクローナル抗体を含む、本発明での使用が見出されるいくつかの好適な抗ヒトCD3抗体が存在する。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体ムロモナブであるOKT3が使用される（Ortho-McNeil, Raritan, NJまたはMiltenyi Biotech, Auburn, CAから市販されている）。表1を参照されたい。

30

【0959】

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

40

【0960】

2. 4-1BB（CD137）アゴニスト

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大及び／または急速な第2の拡大の細胞培養培地は、TNFRSFアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、4-1BB（CD137）アゴニストである。4-1BBアゴニストは、当該技術分野で知られている任意の4-1BB結合分子であり得る。4-1BB結合分子は、ヒトまたは哺乳動物4-1BBに結合することができるモノクローナル抗体または融合タンパク質であり得る。4-1BBアゴニストまたは4-1BB結合分子は、任意のアイソタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、及びIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2）、

50

またはサブクラスの免疫グロブリン分子の免疫グロブリン重鎖を含み得る。4-1BB アゴニストまたは4-1BB 結合分子は、重鎖及び軽鎖の両方を有し得る。本明細書で 사용되는場合、結合分子という用語は、抗体（全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、及び抗体断片、例えば、Fab断片、Fab'断片、Fab発現ライブラリーによって生成された断片、上記のうちのいずれかのエピトープ結合断片、ならびに4-1BBに結合する抗体の操作された形態、例えば、scFv分子も含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、完全ヒト抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、ヒト化抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示 10
される方法及び組成物に使用するための4-1BB アゴニストには、抗4-1BB抗体、ヒト抗4-1BB抗体、マウス抗4-1BB抗体、哺乳動物抗4-1BB抗体、モノクローナル抗4-1BB抗体、ポリクローナル抗4-1BB抗体、キメラ抗4-1BB抗体、抗4-1BB アドネクチン、抗4-1BB ドメイン抗体、一本鎖抗4-1BB断片、重鎖抗4-1BB断片、軽鎖抗4-1BB断片、抗4-1BB融合タンパク質、及びそれらの断片、誘導体、複合体、バリエーション、またはバイオシミラーが含まれる。アゴニスト抗4-1BB抗体は、強い免疫応答を誘導することが知られている。Lee, et al., PLOS One 2013, 8, e69677。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、アゴニスト、抗4-1BBヒト化、または完全ヒトモノクローナル抗体（すなわち、単一の細胞株に由来する抗体）である。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、EU-101 (Eutilex Co. Ltd.)、ウトミルマブ、もしくはウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、複合体、バリエーション、もしくはバイオシミラーである。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、ウトミルマブもしくはウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、複合体、バリエーション、もしくはバイオシミラーである。

【0961】

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

【0962】

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

【0963】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、高い親和性及びアゴニスト活性でヒト4-1BB（配列番号40）に結合することを特徴とする。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、ヒト4-1BB（配列番号40）に結合する結合分子である。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、マウス4-1BB（配列番号41）に結合する結合分子である。4-1BBアゴニストまたは結合分子が結合する4-1BB抗原のアミノ酸配列を表5に要約する。

【表5】

表5. 4-1BB抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号40 ヒト4-1BB、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー9（ホモサピエンス）	MGNSCYNIVA TLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRFPEEEE GGCEL 255
配列番号41 マウス4-1BB、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー9（ハツカネズミ）	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCKRY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 60 CNICRVGAGY FRFKKFCSSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG 180 GHSLQVLTLE LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGGYEL 256

【0964】

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

【0965】

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

【0966】

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

1/s以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約 2.8×10^{-5} 1/s以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約 2.9×10^{-5} 1/s以下の k_{dissoc} で結合する、またはヒトもしくはマウス4-1BBに約 3×10^{-5} 1/s以下の k_{dissoc} で結合する4-1BBアゴニストを含む。

【0967】

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

【0968】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、PF-05082566もしくはMOR-7480としても知られるウトミルマブ、またはその断片、誘導体、バリエーション、もしくはバイオシミラーである。ウトミルマブは、Pfizer, Inc. から入手可能である。ウトミルマブは、免疫グロブリンG2-ガンマ、抗[ホモサピエンスTNFRSF9（腫瘍壊死因子受容体（TNFR）スーパーファミリーメンバー9、4-1BB、T細胞抗原ILA、CD137）]、ホモサピエンス（完全ヒト）モノクローナル抗体である。ウトミルマブのアミノ酸配列を表6に示す。ウトミルマブは、Asn59及びAsn292にグリコシル化部位、22-96位（ V_H-V_L ）、143-199位（ C_H1-C_L ）、256-316位（ C_H2 ）、及び362-420位（ C_H3 ）に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、22'-87'位（ V_H-V_L ）及び136'-195'位（ C_H1-C_L ）に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、IgG2Aアイソフォーム218-218、219-219、222-222、及び225-225位、IgG2A/Bアイソフォーム218-130、219-219、222-222、及び225-225位、ならびにIgG2Bアイソフォーム219-130（2）、222-222、及び225-225位に鎖間重鎖-重鎖ジスルフィド架橋、ならびにIgG2Aアイソフォーム130-213'（2）位、IgG2A/Bアイソフォーム218-213'位、及び130-213'位、ならびにIgG2Bアイソフォーム218-213'（2）位に鎖間重鎖-軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウトミルマブならびにそのバリエーション及び断片の調製及び特性は、米国特許第8,821,867号、同第8,337,850号、及び同第9,468,678号、ならびに国際特許出願公開第WO2012/032433A1号（これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。ウトミルマブの前臨床特徴は、Fisher, et al., Cancer Immunolog. & Immunother. 2012, 61, 1721-33に記載されている。様々な血液学的及び固形腫瘍適応症におけるウトミルマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所のclinicaltrials.gov識別子NCT02444793、NCT01307267、NCT02315066、及びNCT02554812が含まれる。

【0969】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、配列番号42によって示される重鎖及び配列番号43によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、それぞれ、配列番号42及び配列番号43に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、一本鎖可変断片（scFv）、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号42及び配列番号43に示される配列と少なくとも99%同一

10

20

30

40

50

である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号42及び配列番号43に示される配列と少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号42及び配列番号43に示される配列と少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号42及び配列番号43に示される配列と少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号42及び配列番号43に示される配列と少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【0970】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、ウトミルマブの重鎖及び軽鎖CDRまたは可変領域(V_H)を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニスト重鎖可変領域(V_H)は、配列番号44に示される配列を含み、4-1BBアゴニスト軽鎖可変領域(V_L)は、配列番号45に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号44及び配列番号45に示される配列と少なくとも99%同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号44及び配列番号45に示される配列と少なくとも98%同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号44及び配列番号45に示される配列と少なくとも97%同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号44及び配列番号45に示される配列と少なくとも96%同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号44及び配列番号45に示される配列と少なくとも95%同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、配列番号44及び配列番号45に示される配列と少なくとも99%同一であるV_H領域及びV_L領域を含むs c F v抗体を含む。

【0971】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、それぞれ、配列番号46、配列番号47、及び配列番号48に示される配列を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号49、配列番号50、及び配列番号51に示される配列を有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【0972】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、ウトミルマブに関して薬物規制当局によって承認された4-1BBアゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列と少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して1つ以上の翻訳後修飾を含む4-1BB抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ウトミルマブである。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出された4-1BBアゴニスト抗体であり、4-1BBアゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ウトミルマブである。4-1BBアゴニスト抗体は、米国FDA及び／または欧州連合EMAなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ウトミルマブであ

10

20

30

40

50

る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ウトミルマブである。

【表 6】

表 6. ウトミルマブに関連する 4-1BB アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 4 2 ウトミルマブの重鎖	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTN 60 SPSFQGGVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK 120 GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS 180 LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP 240 KPKDITLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVSV 300 LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL 360 TCLVKGFPYS DIAVEWESNG QPENNYKTP PMLDSGGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC 420 SVMHEALHNH YTKSLSLSP G 441
配列番号 4 3 ウトミルマブの軽鎖	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF 120 PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNYKAASSYL 180 SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS 214
配列番号 4 4 ウトミルマブの重鎖可変領域	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG K IYPGDSYTN 60 YSPSFQGGVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS 118
配列番号 4 5 ウトミルマブの軽鎖可変領域	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGLAVFG GGTKLTVL 108
配列番号 4 6 ウトミルマブの重鎖 CDR 1	STYWIS 6
配列番号 4 7 ウトミルマブの重鎖 CDR 2	KIYPGDSYTN YSPSFQG 17
配列番号 4 8 ウトミルマブの重鎖 CDR 3	RGYGIFYD 8
配列番号 4 9 ウトミルマブの軽鎖 CDR 1	SGDNIGDQYA H 11
配列番号 5 0 ウトミルマブの軽鎖 CDR 2	QDKNRPS 7
配列番号 5 1 ウトミルマブの軽鎖 CDR 3	ATYTGFGSLA V 11

10

20

30

40

50

【0973】

いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、BMS-663513 及び 20H4.9.h4a としても知られるモノクローナル抗体ウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、バリエーション、もしくはバイオシミラーである。ウレルマブは、Bristol Myers Squibb, Inc. 及び Creative Biolabs, Inc. から入手可能である。ウレルマブは、免疫グロブリン G4-カッパ、抗 [ホモサピエンス TNFRSF9 (腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー 9、4-1BB、T 細胞抗原 ILA、CD137)]、ホモサピエンス (完全ヒト) モノクローナル抗体である。ウレルマブのアミノ酸配列を表 7 に示す。ウレルマブは、298 位 (及び 298' 位) に N-グリコシル化部位、22-95 位 (V_H-V_L)、148-204 位 (C_H1-C_L)、262-322 位 (C_H2)、及び 368-426 位 (C_H3) (ならびに 22'-95'、148'-204'、262'-322'、及び 368'-426' 位) に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、23'-88' 位 (V_H-V_L) 及び 136'-196' 位 (C_H1-C_L) (ならびに 23'''-88''' 及び 136'''-196''' 位) に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、227-227" 及び 230-230" 位に鎖間重鎖-重鎖ジスルフィド架橋、ならびに 135-216' 及び 135'-216''' に鎖間重鎖-軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウレルマブならびにそのバリエーション

及び断片の調製及び特性は、米国特許第7,288,638号及び同第8,962,804号に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ウレルマブの前臨床及び臨床特徴は、Segal, et al., Clin. Cancer Res. 2016に記載されており、<http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1272>で入手可能である。様々な血液学的及び固形腫瘍適応症におけるウレルマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所のclinicaltrials.gov識別子NCT01775631、NCT02110082、NCT02253992、及びNCT01471210が含まれる。

【0974】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、配列番号52によって示される重鎖及び配列番号53によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、それぞれ、配列番号52及び配列番号53に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、一本鎖可変断片(scFv)、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号52及び配列番号53に示される配列と少なくとも99%同一である重鎖及び軽鎖を含む。ある実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号52及び配列番号53に示される配列と少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。ある実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号52及び配列番号53に示される配列と少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。ある実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号52及び配列番号53に示される配列と少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。ある実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号52及び配列番号53に示される配列と少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【0975】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、ウレルマブの重鎖及び軽鎖CDRまたは可変領域(V_H)を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニスト重鎖可変領域(V_H)は、配列番号54に示される配列を含み、4-1BBアゴニスト軽鎖可変領域(V_L)は、配列番号55に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号54及び配列番号55に示される配列と少なくとも99%同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号54及び配列番号55に示される配列と少なくとも98%同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号54及び配列番号55に示される配列と少なくとも97%同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号54及び配列番号55に示される配列と少なくとも96%同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号54及び配列番号55に示される配列と少なくとも95%同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号54及び配列番号55に示される配列と少なくとも99%同一であるV_H領域及びV_L領域を含むscFv抗体を含む。

【0976】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、それぞれ、配列番号56、配列番号57、及び配列番号58に示される配列を有する重鎖CDR1、CDR2、及びCDR3ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号59、配列番号60、及び配列番号61に示される配列を有する軽鎖CDR1、CDR2、及びCDR3ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【0977】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、ウレルマブに関して薬物規制当局によって承認された4-1BBアゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。い

くつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列と少なくとも 97% の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して 1 つ以上の翻訳後修飾を含む 4-1BB 抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ウレルマブである。いくつかの実施形態では、1 つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出された 4-1BB アゴニスト抗体であり、4-1BB アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ウレルマブである。4-1BB アゴニスト抗体は、米国 F D A 及び／または欧州連合 E M A などの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ウレルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ウレルマブである。

10

20

30

40

50

【表 7】

表 7 . ウレルマブに関連する 4-1BB アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 5 2 ウレルマブの重鎖	QVQLQWAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFSG GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN 60 PSLESRVTIIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGSK TYTCNVDHKP SNTKVDKRV SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS 240 VFLEPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPSPQEEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK 448
配列番号 5 3 ウレルマブの軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTE CGGTPKVEIKR TVAAPSVFIF 120 PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST 180 LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC 216
配列番号 5 4 ウレルマブの可変重鎖	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQWAGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP 60 EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRTVISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP 120
配列番号 5 5 ウレルマブの可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP 60 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ 110
配列番号 5 6 ウレルマブの重鎖 C D R 1	GYYWS 5
配列番号 5 7 ウレルマブの重鎖 C D R 2	EINHGGYVTY NPSLES 16
配列番号 5 8 ウレルマブの重鎖 C D R 3	DYGPGNYDWY FDL 13
配列番号 5 9 ウレルマブの軽鎖 C D R 1	RASQSVSSYL A 11
配列番号 6 0 ウレルマブの軽鎖 C D R 2	DASNRAT 7
配列番号 6 1 ウレルマブの軽鎖 C D R 3	QQRSDWPPAL T 11

【0978】

いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、1D8、3E1or、4B4 (BioLegend 309809)、H4-1BB-M127 (BD Pharming

en 552532)、BBK2 (Thermo Fisher MS621PABX)、145501 (Leinco Technologies B591)、ATCC番号HB-11248として寄託された細胞株によって生成され、米国特許第6,974,863号に開示される抗体、5F4 (BioLegend 311503)、C65-485 (BD Pharmingen 559446)、米国特許出願公開第US2005/0095244号に開示される抗体、米国特許第7,288,638号に開示される抗体(例えば、20H4.9-IgG1(BMS-663031))、米国特許第6,887,673号に開示される抗体(例えば、4E9もしくはBMS-554271)、米国特許第7,214,493号に開示される抗体、米国特許第6,303,121号に開示される抗体、米国特許第6,569,997号に開示される抗体、米国特許第6,905,685号に開示される抗体(例えば、4E9もしくはBMS-554271)、米国特許第6,362,325号に開示される抗体(例えば、1D8もしくはBMS-469492、3H3もしくはBMS-469497、または3EL)、米国特許第6,974,863号に開示される抗体(例えば、53A2)、米国特許第6,210,669号に開示される抗体(例えば、1D8、3B8、もしくは3EL)、米国特許第5,928,893号に開示される抗体、米国特許第6,303,121号に開示される抗体、米国特許第6,569,997号に開示される抗体、国際特許出願公開第WO2012/177788号、同第WO2015/119923号、及び同第WO2010/042433号に開示される抗体、ならびにそれらの断片、誘導体、複合体、バリエーション、またはバイオシミラーからなる群から選択され、前述の特許または特許出願公開の各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

【0979】

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

30

【0980】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、構造I-A(C末端Fc抗体断片融合タンパク質)もしくは構造I-B(N末端Fc抗体断片融合タンパク質)に示されるような4-1BBアゴニスト融合タンパク質、またはそれらの断片、誘導体、複合体、バリエーション、もしくはバイオシミラーである(図18を参照)。構造I-A及びI-Bにおいて、円筒は、個々のポリペプチド結合ドメインを指す。構造I-A及びI-Bは、例えば、4-1BBL(4-1BBリガンド、CD137リガンド(CD137L)、もしくは腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー9(TNFSF9))または4-1BBに結合する抗体に由来する3つの直線的に連結されたTNFRSF結合ドメインを含み、これらが折り重なって三価タンパク質を形成し、その後、これがIgG1-Fc(CH3及びCH2ドメインを含む)によって第2の三価タンパク質に連結され、その後、これを使用して、三価タンパク質のうちの2つをジスルフィド結合(小さく長細い楕円)によって一緒に連結し、構造を安定化し、6つの受容体及びシグナル伝達タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを一緒にして、シグナル伝達複合体を形成することができるアゴニストを提供する。円筒として示されるTNFRSF結合ドメインは、例えば、親水性残基ならびに柔軟性のためのGly及びSer配列、ならびに溶解性のためのGlu及びLysを含み得るリンカーによって結合されたVH鎖及びVL鎖を含む、scFvドメインであり得る。de Marco, Microbial Cell Factories, 2011, 10, 44、Ahmad, et al., Clin. & Dev. Immunol. 20

40

50

12, 980250, Monnier, et al., Antibodies, 2013, 2, 193-208、または本明細書の他の場所に組み込まれている参照文献に記載されるものなどの任意の scFv ドメイン設計が使用され得る。この形態の融合タンパク質構造は、米国特許第 9,359,420 号、同第 9,340,599 号、同第 8,921,519 号、及び同第 8,450,460 号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0981】

図 18 に示される構造 I-A の他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表 8 に見出される。Fc ドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン（配列番号 62 のアミノ酸 17~230）、完全なヒンジドメイン（配列番号 62 のアミノ酸 1~16）、またはヒンジドメインの一部（例えば、配列番号 62 のアミノ酸 4~16）を含む。C 末端 Fc 抗体を結合するための好ましいリンカーは、追加のポリペプチドの融合に好適なリンカーを含む、配列番号 63~配列番号 72 に示される実施形態から選択され得る。

【表 8】

表 8. C 末端 Fc 抗体断片融合タンパク質設計（構造 I-A）を有する、4-1BB アゴニスト融合タンパク質を含む、TNFRSF アゴニスト融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 62 Fc ドメイン	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 60 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLVHQLWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS 120 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV 180 LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFCSCV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 230
配列番号 63 リンカー	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
配列番号 64 リンカー	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
配列番号 65 リンカー	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
配列番号 66 リンカー	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
配列番号 67 リンカー	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
配列番号 68 リンカー	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
配列番号 69 リンカー	GGPGSSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE 24
配列番号 70 リンカー	GGPGSSSGSGS DKTHTCPPCP APE 23
配列番号 71 リンカー	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E 21
配列番号 72 リンカー	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE 25

【0982】

図 18 に示される構造 I-B の他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表 9 に見出される。Fc 抗体断片が構造 I-B にあるような TNRF SF 融合タンパク質の N 末端に融合される場合、Fc モジュールの配列は、好ましくは、配列番号 73 に示されるものであり、リンカー配列は、好ましくは、配列番号 74~配列番号 76 に示される実施形態から選択される。

10

20

30

40

50

【表 9】

表 9 . N末端Fc抗体断片融合タンパク質設計（構造I-B）を有する、4-1BBアゴニスト融合タンパク質を含むTNFRSFアゴニスト融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号73 Fcドメイン	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKHTTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT 60 CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNATK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK 120 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE 180 WESNGQPENN YKTTTPVLDL DGSFFLYSKL TVDKSRWQGG NVFSCSVME ALHNHYTQKS 240 LSLSPG 246
配列番号74 リンカー	SGSGSGSGSG S 11
配列番号75 リンカー	SSSSSGSGS GS 12
配列番号76 リンカー	SSSSSGSGS GSGSGS 16

10

【0983】

いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-Bによる4-1BBアゴニスト融合タンパク質は、ウトミルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、ウレルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、ウトミルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、表10に記載の可変重鎖及び可変軽鎖から選択される可変重鎖及び可変軽鎖、前述の可変重鎖及び可変軽鎖の任意の組み合わせ、ならびにそれらの断片、誘導体、複合体、バリエーション、及びバイオシミラーからなる群から選択される1つ以上の4-1BB結合ドメインを含む。

20

【0984】

いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-Bによる4-1BBアゴニスト融合タンパク質は、4-1BB L配列を含む1つ以上の4-1BB結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-Bによる4-1BBアゴニスト融合タンパク質は、配列番号77による配列を含む1つ以上の4-1BB結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-Bによる4-1BBアゴニスト融合タンパク質は、可溶性4-1BB L配列を含む1つ以上の4-1BB結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-Bによる4-1BBアゴニスト融合タンパク質は、配列番号78による配列を含む1つ以上の4-1BB結合ドメインを含む。

30

【0985】

いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-Bによる4-1BBアゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号43及び配列番号44に示される配列と少なくとも95%同一であるV_H領域及びV_L領域を含むscFvドメインである1つ以上の4-1BB結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-Bによる4-1BBアゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号54及び配列番号55に示される配列と少なくとも95%同一であるV_H領域及びV_L領域を含むscFvドメインである1つ以上の4-1BB結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-Bによる4-1BBアゴニスト融合タンパク質は、各々が、表10に示されるV_H配列及びV_L配列と少なくとも95%同一であるV_H領域及びV_L領域を含むscFvドメインである1つ以上の4-1BB結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。

40

50

【表 10】

表 10 . 融合タンパク質における 4-1BB 結合ドメインとしてまたは s c F v 4-1BB アゴニスト抗体として有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 77 4-1BB L	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA 60 SPGSAASPRRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL 120 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YVVFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA 180 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHLETA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV 240 TPEIFAGLPS PRSE 254
配列番号 78 4-1 BB L 可溶性ドメイン	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYVVFQ 60 LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL 120 SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSRSE 168
配列番号 79 4B 4 -1-1 バージョン 1 の可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS 118
配列番号 80 4B 4-1-1 バージョン 1 の可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSIGGIPS 60 RFGSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVIYQCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK 107
配列番号 81 4B 4-1-1 バージョン 2 の可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA 119
配列番号 82 4B 4-1-1 バージョン 2 の可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSIGGIPS 60 RFGSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVIYQCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR 108
配列番号 83 H39 E3-2 の可変重鎖	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSVVRQAP 60 GKGLEWVADI KNDGSYTNIA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT 120
配列番号 84 H39 E3-2 の可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPTDTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL 60 WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA 110

10

20

30

40

50

【0986】

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

【0987】

いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、(i) 第 1 の可溶性腫瘍壊死因子 (TNF) スーパーファミリーサイトカインドメイン、(ii) 第 1 のペプチドリンカー、(iii) 第 2 の可溶性 TNF スーパーファミリーサイトカインドメイン、(iv) 第 2 のペプチドリンカー、及び (v) 第 3 の可溶性 TNF スーパーファミリーサイトカインドメインを含む 4-1BB アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、可溶性 TNF スーパーファミリーサイトカインドメインは各々、茎領域を欠き、第 1 及び第 2 のペプチドリンカーは独立して、3～8 アミノ酸長であり、各 TNF スーパーファミリーサイトカインドメインは、4-1BB 結合ドメインである。

【0988】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、前述のV_Lドメインのうちのいずれかに連結された前述のV_Hドメインのうちのいずれかを含む4-1BBアゴニストscFv抗体である。

【0989】

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

10

【0990】

3. OX40 (CD134) アゴニスト

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

20

30

【0991】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストまたはOX40結合分子は、融合タンパク質である場合もある。OX40Lに融合されたFcドメインを含むOX40融合タンパク質は、例えば、Sadun, et al., J. Immunother. 2009, 182, 1481-89に記載されている。いくつかの実施形態では、三量体または六量体OX40アゴニスト（3つまたは6つのリガンド結合ドメインを有する）などの多量体OX40アゴニストは、典型的に2つのリガンド結合ドメインを有するアゴニストモノクローナル抗体と比較して、優れた受容体（OX40L）クラスター化及び内部細胞シグナル伝達複合体形成を誘導し得る。3つのTNFRSF結合ドメイン及びIgG1-Fcを含み、かつ任意選択的にこれらの融合タンパク質のうちの2つ以上を更に結合する三量体（三価）または六量体（もしくは六価）またはそれ以上の融合タンパク質は、例えば、Giffers, et al., Mol. Cancer Therapeutics 2013, 12, 2735-47に記載されている。

40

【0992】

50

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

10

20

30

40

50

【0993】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、高い親和性及びアゴニスト活性でヒトOX40 (配列番号85) に結合することを特徴とする。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、ヒトOX40に結合する結合分子である (配列番号85)。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、マウスOX40に結合する結合分子である (配列番号86)。OX40アゴニストまたは結合分子が結合するOX40抗原のアミノ酸配列を表11に要約する。

【表11】

表11. OX40抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)					
配列番号85 ヒト OX40 (ホモサビエンス)	MCVGARRLGR	GPCAALLLLG	LGLSTVTGLH	CVGDTYPSND	RCCHECRPGN	GMVSRCSRSQ 60
	NTVCRPCGPG	FYNDVVSSKP	CKPCTWCNLR	SGSERKQLCT	ATQDTCRCR	AGTQPLDSYK 120
	PGVDCAPCPP	GHFSPGDNQA	CKPWTNCTLA	GKHTLQPASN	SSDAICEDRD	PPATQPQETQ 180
	GPPARPITVQ	PTEAWPRTSQ	GPSTRPVEVP	GGRAVAAILG	LGLVLGLLGP	LAILLALYLL 240
	RRDQRLPPDA	HKPPGGGSR	TPIQEEQADA	HSTLAKI		277
配列番号86 マウ スOX40 (ハツカネズミ)	MYVWVQQPTA	LLLLGLTLGV	TARRLNCVKH	TYPSGHKCCR	ECQPGHGMVS	RCDHTRDTLC 60
	HPCETGFYNE	AVNYDTCKQC	TQCNHRSGSE	LKQNCPTPTQD	TVCRCRPGTQ	PRQDSGYKLG 120
	VDCVPCPPGH	FSPGNNQACK	PWTNCTLSGK	QTRHPASDSL	DAVCEDRSLL	ATLLWETQRP 180
	TFRPTTVQST	TVWPRTSELP	SPPTLVTPPEG	PAFAVLLGLG	LGLLAPLTVL	LALYLLRKAW 240
	RLPNTFKPCW	GNSFRTPIQE	EHTDAHFTLA	KI		272

【0994】

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

【0995】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウスOX40に約 7.5×10^5 1/M・s以上の k_{assoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 7.5×10^5 1/M・s以上の k_{assoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 8×10^5 1/M・s以上の k_{assoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 8.5×10^5 1/M・s以上の k_{assoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 9×10^5 1/M・s以上の k_{assoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 9.5×10^5 1/M・s以上の k_{assoc} で結合する、またはヒトもしくはマウスOX40に約 1×10^6 1/M・s以上の k_a

s s o c で結合する O X 4 0 アゴニストを含む。

【0996】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 2×10^{-5} $1/s$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 2.1×10^{-5} $1/s$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 2.2×10^{-5} $1/s$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 2.3×10^{-5} $1/s$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 2.4×10^{-5} $1/s$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 2.5×10^{-5} $1/s$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 2.6×10^{-5} $1/s$ 以下の k_{dissoc} で結合する、またはヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 2.7×10^{-5} $1/s$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 2.8×10^{-5} $1/s$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 2.9×10^{-5} $1/s$ 以下の k_{dissoc} で結合する、またはヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 3×10^{-5} $1/s$ 以下の k_{dissoc} で結合する O X 4 0 アゴニストを含む。

10

【0997】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 10 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 9 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 8 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 7 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 6 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 5 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 4 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 3 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 2 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 1 nM 以下の IC_{50} で結合する、O X 4 0 アゴニストを含む。

20

【0998】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、M E D I 0 5 6 2 または M E D I 0 5 6 2 としても知られるタボリキシズマブである。タボリキシズマブは、A s t r a Z e n e c a, I n c. の子会社である M e d I m m u n e から入手可能である。タボリキシズマブは、免疫グロブリン G 1-カップ、抗 [ホモサピエンス T N F R S F 4 (腫瘍壊死因子受容体 (T N F R) スーパーファミリーメンバー 4、O X 4 0、C D 1 3 4)]、ヒト化及びキメラモノクローナル抗体である。タボリキシズマブのアミノ酸配列を表 1 2 に示す。タボリキシズマブは、3 0 1 及び 3 0 1' ' 位に N-グリコシル化部位 (フコシル化複合二分岐 C H O 型グリカンを含む)、2 2-9 5 位 (V_H-V_L)、1 4 8-2 0 4 位 (C_{H1}-C_L)、2 6 5-3 2 5 位 (C_{H2})、及び 3 7 1-4 2 9 位 (C_{H3}) (及び 2 2' '-9 5' '、1 4 8' '-2 0 4' '、2 6 5' '-3 2 5' '、及び 3 7 1' '-4 2 9' ' 位) に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、2 3' -8 8' 位 (V_H-V_L) 及び 1 3 4' -1 9 4' 位 (C_{H1}-C_L) (及び 2 3' ' ' -8 8' ' ' 及び 1 3 4' ' ' -1 9 4' ' ' 位) に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、2 3 0-2 3 0' ' 及び 2 3 3-2 3 3' ' 位に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、ならびに 2 2 4-2 1 4' 及び 2 2 4' ' -2 1 4' ' ' 位に鎖間重鎖-軽鎖ジスルフィド架橋を含む。様々な固形腫瘍適応症におけるタボリキシズマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所の c l i n i c a l t r i a l s . g o v 識別子 N C T 0 2 3 1 8 3 9 4 及び N C T 0 2 7 0 5 4 8 2 が含まれる。

30

40

【0999】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、配列番号 8 7 によって示される重鎖及び配列番号 8 8 によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、それぞれ、配列番号 8 7 及び配列番号 8 8 に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、F a b 断片、一本鎖可変断片 (s c F v)、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、O X 4 0 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 8 7 及び配列番号 8 8 に示される配列と少なくとも 9 9 % 同一である重鎖

50

及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号87及び配列番号88に示される配列と少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号87及び配列番号88に示される配列と少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号87及び配列番号88に示される配列と少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号87及び配列番号88に示される配列と少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【1000】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、タボリキシズマブの重鎖及び軽鎖CDRまたは可変領域(VR)を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニスト重鎖可変領域(VH)は、配列番号89に示される配列を含み、OX40アゴニスト軽鎖可変領域(VL)は、配列番号90に示される配列、及びその保守的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号89及び配列番号90に示される配列と少なくとも99%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号89及び配列番号90に示される配列と少なくとも98%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号89及び配列番号90に示される配列と少なくとも97%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号89及び配列番号90に示される配列と少なくとも96%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号89及び配列番号90に示される配列と少なくとも95%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、配列番号89及び配列番号90に示される配列と少なくとも99%同一であるVH領域及びVL領域を含むscFv抗体を含む。

【1001】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、それぞれ、配列番号91、配列番号92、及び配列番号93に示される配列を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、ならびにそれらの保守的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号94、配列番号95、及び配列番号96に示される配列を有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、ならびにそれらの保守的アミノ酸置換と、を含む。

【1002】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、タボリキシズマブに関して薬物規制当局によって承認されたOX40アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列と少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して1つ以上の翻訳後修飾を含むOX40抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、タボリキシズマブである。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたOX40アゴニスト抗体であり、OX40アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、タボリキシズマブである。OX40アゴニスト抗体は、米国FDA及び／または欧州連合EMAなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、タボリキシズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤を更に含む組成物

10

20

30

40

50

として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、タボリキシズマブである。

【表 1 2】

表 1 2 . タボリキシズマブに関連する O X 4 0 アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 8 7 タボリキシズマブの重鎖	QVQLQESGPG LVKPSQTLSTL TCAVYGGSF SSGYWNWIRKH PGKGLLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSTVPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGGTGLTVTS 120 SASTKGFSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRV E PKSCDKTHTC PPCPAPELLG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFPYSD IAVEWESNGQ PENNYKTPPP VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
配列番号 8 8 タボリキシズマブの軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFGSGSGSTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNQFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK 214
配列番号 8 9 タボリキシズマブの 重鎖可変領域	QVQLQESGPG LVKPSQTLSTL TCAVYGGSF SSGYWNWIRKH PGKGLLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSTVPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGGTGLTVT 118
配列番号 9 0 タボリキシズマブの 軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFGSGSGSTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR 108
配列番号 9 1 タボリキシズマブの 重鎖 CDR 1	GSFSSGYWN 9
配列番号 9 2 タボリキシズマブの 重鎖 CDR 2	YIGYISYNGI TYH 13
配列番号 9 3 タボリキシズマブの 重鎖 CDR 3	RYKYDYDGGH AMDY 14
配列番号 9 4 タボリキシズマブの 軽鎖 CDR 1	QDISNYLN 8
配列番号 9 5 タボリキシズマブの 軽鎖 CDR 2	LLIYYTSKLH S 11
配列番号 9 6 タボリキシズマブの 軽鎖 CDR 3	QQGSALPW 8

【1 0 0 3】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、P f i z e r , I n c . から入手可能な完全ヒト抗体である 1 1 D 4 である。1 1 D 4 の調製及び特性は、米国特許第 7 , 9 6 0 , 5 1 5 号、同第 8 , 2 3 6 , 9 3 0 号、及び同第 9 , 0 2 8 , 8 2 4 号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。1 1 D 4 のアミノ酸配列を表 1 3 に示す。

【1 0 0 4】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、配列番号 9 7 によって示される重鎖及び配列番号 9 8 によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、それぞれ、配列番号 9 7 及び配列番号 9 8 に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、F a b 断片、一本鎖可変断片 (s c F v) 、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、O X 4 0 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 9 7 及び配列番号 9 8 に示される配列と少なくとも 9 9 % 同一である重鎖

及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号97及び配列番号98に示される配列と少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号97及び配列番号98に示される配列と少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号97及び配列番号98に示される配列と少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号97及び配列番号98に示される配列と少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【1005】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、11D4の重鎖及び軽鎖CDRまたは可変領域（VR）を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニスト重鎖可変領域（VH）は、配列番号99に示される配列を含み、OX40アゴニスト軽鎖可変領域（VL）は、配列番号100に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号99及び配列番号100に示される配列と少なくとも99%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号99及び配列番号100に示される配列と少なくとも98%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号99及び配列番号100に示される配列と少なくとも97%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号99及び配列番号100に示される配列と少なくとも96%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号99及び配列番号100に示される配列と少なくとも95%同一であるVH領域及びVL領域を含む。

【1006】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、それぞれ、配列番号101、配列番号102、及び配列番号103に示される配列を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号104、配列番号105、及び配列番号106に示される配列を有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【1007】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、11D4に関して薬物規制当局によって承認されたOX40アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列と少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して1つ以上の翻訳後修飾を含むOX40抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、11D4である。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたOX40アゴニスト抗体であり、OX40アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、11D4である。OX40アゴニスト抗体は、米国FDA及び／または欧州連合EMAなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、11D4である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、11D4である。

10

20

30

40

50

【表 13】

表 13 . 11D4に関連するOX40アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号97 11 D4の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVS Y ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRD NAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLF D YWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPCPAP PVAGPSVFLF 240 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNATKPRE EQNSTFRVV 300 SVLT VVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV 360 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDS DGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF 420 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK 444
配列番号98 11D 4の軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFGSGSGGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGE C 214
配列番号99 11 D4の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVS Y ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRD NAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLF D YWGQ GTLVTVSS 118
配列番号100 11 D4の軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFGSGSGGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK 107
配列番号101 11 D4の重鎖CDR1	SYSMN 5
配列番号102 11 D4の重鎖CDR2	YISSSSSTID YADSVKG 17
配列番号103 11 D4の重鎖CDR3	ESGWYLF D Y 9
配列番号104 11 D4の軽鎖CDR1	RASQGISSWL A 11
配列番号105 11 D4の軽鎖CDR2	AASSLQS 7
配列番号106 11 D4の軽鎖CDR3	QQYNSYPPT 9

10

20

30

【1008】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、Pfizer, Inc. から入手可能な完全ヒト抗体である18D8である。18D8の調製及び特性は、米国特許第7,960,515号、同第8,236,930号、及び同第9,028,824号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。18D8のアミノ酸配列を表14に示す。

【1009】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号107によって示される重鎖及び配列番号108によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、それぞれ、配列番号107及び配列番号108に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、一本鎖可変断片（scFv）、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号107及び配列番号108に示される配列と少なくとも99%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号107及び配列番号108に示される配列と少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号107及び配列番号108に示される配列と少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号107及び配列番号108に示される配列と少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、

40

50

それぞれ、配列番号 107 及び配列番号 108 に示される配列と少なくとも 95% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【1010】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、18D8 の重鎖及び軽鎖 CDR または可変領域 (VR) を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニスト重鎖可変領域 (V_H) は、配列番号 109 に示される配列を含み、OX40 アゴニスト軽鎖可変領域 (V_L) は、配列番号 110 に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 109 及び配列番号 110 に示される配列と少なくとも 99% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 109 及び配列番号 110 に示される配列と少なくとも 98% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 109 及び配列番号 110 に示される配列と少なくとも 97% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 109 及び配列番号 110 に示される配列と少なくとも 96% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 109 及び配列番号 110 に示される配列と少なくとも 95% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。

10

【1011】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、それぞれ、配列番号 111、配列番号 112、及び配列番号 113 に示される配列を有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号 114、配列番号 115、及び配列番号 116 に示される配列を有する軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

20

【1012】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、18D8 に関して薬物規制当局によって承認された OX40 アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列と少なくとも 97% の配列同一性、例えば、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して 1 つ以上の翻訳後修飾を含む OX40 抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、18D8 である。いくつかの実施形態では、1 つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出された OX40 アゴニスト抗体であり、OX40 アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、18D8 である。OX40 アゴニスト抗体は、米国 FDA 及び／または欧州連合 EMA などの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、18D8 である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、18D8 である。

30

40

【表 1 4】

表 1 4 . 1 8 D 8 に関連する O X 4 0 アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 1 0 7 1 8 D 8 の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYFG MDVWGQGTTV 120 TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV 180 LQSSGLYSLs SVVTVPSNf GTQTYTCNVD HKPSNTKVdK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG 240 PSVFLFPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN 300 STFRVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE 360 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNNHYT QKSLSLSPGK 450
配列番号 1 0 8 1 8 D 8 の軽鎖	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVs SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFGSGSGGTD FTLTISSLEP EDFAVYVCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFFPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTl 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213
配列番号 1 0 9 1 8 D 8 の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYFG MDVWGQGTTV 120 TVSS 124
配列番号 1 1 0 1 8 D 8 の軽鎖可変領域	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVs SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFGSGSGGTD FTLTISSLEP EDFAVYVCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK 106
配列番号 1 1 1 1 8 D 8 の重鎖 CDR 1	DYAMH 5
配列番号 1 1 2 1 8 D 8 の重鎖 CDR 2	GISWNSGSIG YADSVKG 17
配列番号 1 1 3 1 8 D 8 の重鎖 CDR 3	DQSTADYYFY YGMDV 15
配列番号 1 1 4 1 8 D 8 の軽鎖 CDR 1	RASQSVSSYL A 11
配列番号 1 1 5 1 8 D 8 の軽鎖 CDR 2	DASNRAT 7
配列番号 1 1 6 1 8 D 8 の軽鎖 CDR 3	QQRSNWPT 8

【1 0 1 3】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、G l a x o S m i t h K l i n e p l c から入手可能なヒト化抗体である、H u 1 1 9 - 1 2 2 である。H u 1 1 9 - 1 2 2 の調製及び特性は、米国特許第 9 , 0 0 6 , 3 9 9 号及び同第 9 , 1 6 3 , 0 8 5 号、ならびに国際特許公開第 W O 2 0 1 2 / 0 2 7 3 2 8 号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。H u 1 1 9 - 1 2 2 のアミノ酸配列を表 1 5 に示す。

【1 0 1 4】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、H u 1 1 9 - 1 2 2 の重鎖及び軽鎖 C D R または可変領域 (V R) を含む。いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニスト重鎖可変領域 (V H) は、配列番号 1 1 7 に示される配列を含み、O X 4 0 アゴニスト軽鎖可変領域 (V L) は、配列番号 1 1 8 に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 1 7 及び配列番号 1 1 8 に示される配列と少なくとも 9 9 % 同一である V H 領域及び V L 領域を含む。いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 1 7 及び配列番号 1 1 8 に示される配列と少なくとも 9 8 % 同一である V H 領域及び V L 領域を含む。いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 1 7 及び配列番号 1 1 8 に示される配列と少なくとも 9 7 % 同一である V H 領域及び V L 領域を含む。いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、各々が、それ

それ、配列番号 1 1 7 及び配列番号 1 1 8 に示される配列と少なくとも 9 6 % 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 1 7 及び配列番号 1 1 8 に示される配列と少なくとも 9 5 % 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。

【1 0 1 5】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、それぞれ、配列番号 1 1 9、配列番号 1 2 0、及び配列番号 1 2 1 に示される配列を有する重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号 1 2 2、配列番号 1 2 3、及び配列番号 1 2 4 に示される配列を有する軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

10

【1 0 1 6】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、H u 1 1 9 - 1 2 2 に関して薬物規制当局によって承認された O X 4 0 アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列と少なくとも 9 7 % の配列同一性、例えば、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して 1 つ以上の翻訳後修飾を含む O X 4 0 抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、H u 1 1 9 - 1 2 2 である。いくつかの実施形態では、1 つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出された O X 4 0 アゴニスト抗体であり、O X 4 0 アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、H u 1 1 9 - 1 2 2 である。O X 4 0 アゴニスト抗体は、米国 F D A 及び／または欧州連合 E M A などの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、H u 1 1 9 - 1 2 2 である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、H u 1 1 9 - 1 2 2 である。

20

30

40

50

【表 15】

表 15 . Hu 119-122 に関連する OX40 アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)	
配列番号 117 Hu 119-122 の重鎖 可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRD NAKNSLY LQMNSLR AED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMTVTVSS	60 120
配列番号 118 Hu 119-122 の軽鎖 可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号 119 Hu 119 -122 の重鎖 CDR1	SHDMS	5
配列番号 120 Hu 119-122 の重鎖 CDR2	AINSDGGSTY YPDTMER	17
配列番号 121 Hu 119-122 の重鎖 C DR3	HYDDYYAWFA Y	11
配列番号 122 Hu 119-122 の軽鎖 C DR1	RASKSVSTSG YSYMH	15
配列番号 123 Hu 119-122 の軽鎖 C DR2	LASNLES	7
配列番号 124 Hu 119-122 の軽鎖 C DR3	QHSRELPLT	9

10

20

【1017】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、GlaxoSmithKline plc から入手可能なヒト化抗体である、Hu106-222 である。Hu106-222 の調製及び特性は、米国特許第 9,006,399 号及び同第 9,163,085 号、ならびに国際特許公開第 WO2012/027328 号に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。Hu106-222 のアミノ酸配列を表 16 に示す。

【1018】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、Hu106-222 の重鎖及び軽鎖 CDR または可変領域 (VR) を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニスト重鎖可変領域 (VH) は、配列番号 125 に示される配列を含み、OX40 アゴニスト軽鎖可変領域 (VL) は、配列番号 126 に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 125 及び配列番号 126 に示される配列と少なくとも 99% 同一である VH 領域及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 125 及び配列番号 126 に示される配列と少なくとも 98% 同一である VH 領域及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 125 及び配列番号 126 に示される配列と少なくとも 97% 同一である VH 領域及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 125 及び配列番号 126 に示される配列と少なくとも 96% 同一である VH 領域及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 125 及び配列番号 126 に示される配列と少なくとも 95% 同一である VH 領域及び VL 領域を含む。

30

40

【1019】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、それぞれ、配列番号 127、配列番号 128、及び配列番号 129 に示される配列を有する重鎖 CDR1、CDR2、及び CDR3 ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号 130、配列番号 131、及び配列番号 132 に示される配列を有する軽鎖 CDR1、CDR2、

50

及びCDR3ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【1020】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、Hu106-222に関して薬物規制当局によって承認されたOX40アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列と少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して1つ以上の翻訳後修飾を含むOX40抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、Hu106-222である。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたOX40アゴニスト抗体であり、OX40アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、Hu106-222である。OX40アゴニスト抗体は、米国FDA及び／または欧州連合EMAなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、Hu106-222である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、Hu106-222である。

【表16】

表16 . Hu106-222に関連するOX40アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号125 Hu106-222の重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISLKAED TAVYYCANPY YDYVSYAMD YWGQGTITVTV SS 60 120 122
配列番号126 Hu106-222の軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS RFGSGSGGTD FTFITISLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK 60 107
配列番号127 Hu106-222の重鎖CDR1	DYSMH 5
配列番号128 Hu106-222の重鎖CDR2	WINTETGEPT YADDFKG 17
配列番号129 Hu106-222の重鎖CDR3	PYYDYVSYA MDY 13
配列番号130 Hu106-222の軽鎖CDR1	KASQDVSTAV A 11
配列番号131 Hu106-222の軽鎖CDR2	SASYLYT 7
配列番号132 Hu106-222の軽鎖CDR3	QQHYSTPRT 9

【1021】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニスト抗体は、MEDI6469（9B12とも称される）である。MEDI6469は、マウスモノクローナル抗体である。Weinberg, et al., J. Immunother. 2006, 29, 575-585。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、Weinberg, et al., J. Immunother. 2006, 29, 575-585に記載されているように、

Biovest Inc. (Malvern, MA, USA) に寄託された 9B12 ハイブリドーマによって生成された抗体であり、その開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗体は、MEDI6469 の CDR 配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、MEDI6469 の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【1022】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、L106 BD (Pharming en 製品番号 340420) である。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、抗体 L106 (BD Pharmingen 製品番号 340420) の CDR を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、抗体 L106 (BD Pharmingen 製品番号 340420) の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、ACT35 (Santa Cruz Biotechnology、カタログ番号 20073) である。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、抗体 ACT35 (Santa Cruz Biotechnology、カタログ番号 20073) の CDR を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、抗体 ACT35 (Santa Cruz Biotechnology、カタログ番号 20073) の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、InvivoMab、BioXcell Inc (West Lebanon, NH) から市販されているマウスモノクローナル抗体抗 mCD134 / mOX40 (クローン OX86) である。

【1023】

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

【1024】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、構造 I-A (C 末端 Fc 抗体断片融合タンパク質) もしくは構造 I-B (N 末端 Fc 抗体断片融合タンパク質) に示される OX40 アゴニスト融合タンパク質、またはそれらの断片、誘導体、複合体、バリエーション、もしくはバイオシミラーである。構造 I-A 及び I-B の特性は、上記及び米国特許第 9,359,420 号、同第 9,340,599 号、同第 8,921,519 号、及び同第 8,450,460 号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。図 18 に示される構造 I-A のポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表 9 に見出される。Fc ドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン (配列番号 62 のアミノ酸 17 ~ 230)、完全なヒンジドメイン (配列番号 62 のアミノ酸 1 ~ 16)、またはヒンジドメインの一部 (例えば、配列番号 62 のアミノ酸 4 ~ 16) を含む。C 末端 Fc 抗体を結合するための好ましいリンカーは、追加のポリペプチドの融合に好適なリンカーを含む、配列番号 63 ~ 配列番号 72 に示される実施形態から選択され得る。同様に、図 18 に示される構造 I-B のポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表 10 に見出される。Fc 抗体断片が構造 I-B にあるような TNFRSF 融合タンパク質の N 末端に融合される場合、Fc モジュールの配列は、好ましくは、配列番号 73 に示されるものであり、リンカー配列は、好ましくは、配列番号 74 ~ 配列番号 76 に示される実施形態から選択される。

【1025】

いくつかの複合体実施形態では、構造I-AまたはI-BによるOX40アゴニスト融合タンパク質は、タボリキシズマブの可変重鎖及び可変軽鎖、11D4の可変重鎖及び可変軽鎖、18D8の可変重鎖及び可変軽鎖、Hu119-122の可変重鎖及び可変軽鎖、Hu106-222の可変重鎖及び可変軽鎖、表17に記載の可変重鎖及び可変軽鎖から選択される可変重鎖及び可変軽鎖、前述の可変重鎖及び可変軽鎖の任意の組み合わせ、ならびにそれらの断片、誘導體、複合体、バリエント、及びバイオシミラーからなる群から選択される1つ以上のOX40結合ドメインを含む。

【1026】

いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-BによるOX40アゴニスト融合タンパク質は、OX40L配列を含む1つ以上のOX40結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-BによるOX40アゴニスト融合タンパク質は、配列番号133による配列を含む1つ以上のOX40結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-BによるOX40アゴニスト融合タンパク質は、可溶性OX40L配列を含む1つ以上のOX40結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-BによるOX40アゴニスト融合タンパク質は、配列番号134による配列を含む1つ以上のOX40結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-BによるOX40アゴニスト融合タンパク質は、配列番号135による配列を含む1つ以上のOX40結合ドメインを含む。

【1027】

いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-BによるOX40アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号89及び配列番号90に示される配列と少なくとも95%同一であるV_H及びV_L領域を含むscFvドメインである1つ以上のOX40結合ドメインを含み、V_H及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-BによるOX40アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号99及び配列番号100に示される配列と少なくとも95%同一であるV_H領域及びV_L領域を含むscFvドメインである1つ以上のOX40結合ドメインを含み、V_H及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-BによるOX40アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号109及び配列番号110に示される配列と少なくとも95%同一であるV_H領域及びV_L領域を含むscFvドメインである1つ以上のOX40結合ドメインを含み、V_H及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-BによるOX40アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号127及び配列番号128に示される配列と少なくとも95%同一であるV_H領域及びV_L領域を含むscFvドメインである1つ以上のOX40結合ドメインを含み、V_H及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-BによるOX40アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号125及び配列番号126に示される配列と少なくとも95%同一であるV_H領域及びV_L領域を含むscFvドメインである1つ以上のOX40結合ドメインを含み、V_H及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-BによるOX40アゴニスト融合タンパク質は、各々が、表17に示されるV_H配列及びV_L配列と少なくとも95%同一であるV_H領域及びV_L領域を含むscFvドメインである1つ以上のOX40結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。

10

20

30

40

50

【表 17-1】

表 17 . 融合タンパク質（例えば、構造 I - A 及び I - B）における O X 4 0 結合ドメインとして
または s c F v O X 4 0 アゴニスト抗体ドメインとして有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）			
配列番号 133 O X 40 L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYSF QEVNISLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNSTL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF CVL	60 120 180 183		
配列番号 134 O X 40 L 可溶性ドメイン	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNV VIINCDGFYL ISLKGYSFQE VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNSTLDD FHVNGGELIL IHQNPGEFCV L	60 120 131		
配列番号 135 O X 40 L 可溶性ドメイン (代替)	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYSFQEVNI SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLVNVT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ NPGEFCVL	60 120 128		
配列番号 136 008 の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGLTVTS	60 120		
配列番号 137 008 の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNNGYNLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQYYNHP TTFGQGTK	60 108		
配列番号 138 011 の可変重鎖	EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYTMMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGSGSTYYAD SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA	60 120		
配列番号 139 011 の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNNGYNLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQYYNHP TTFGQGTK	60 108		
配列番号 140 021 の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGLTVTS	60 120		
配列番号 141 021 の可変軽鎖	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNNGYNLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQYKSNP PTFGQGTK	60 108		
配列番号 142 023 の可変重鎖	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGLTVTVSS	60 120		
配列番号 143 023 の可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR	60 108		

10

20

30

40

50

【表 17-2】

配列番号 144 重鎖 可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLMDYWG QGTSVTVSS	60 119
配列番号 145 軽鎖 可変領域	DIQMTQTTS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSLRHSGVPS RFGSGSGSTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR	60 108
配列番号 146 重鎖 可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFF DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY NQNFKD KATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTTVTS P	60 120 121
配列番号 147 軽鎖 可変領域	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD RFTGGSGSTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR	60 108
配列番号 148 ヒト 化抗体の重鎖可変領域	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLIKNE TATYFCANPY YDYVSYAMD YWGHGTSVTV SS	60 120 122
配列番号 149 ヒト 化抗体の重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYAMD YWGGTGTTVTV SS	60 120 122
配列番号 150 ヒト 化抗体の軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGGSGSTD FTFTISSVQA EDLAVYVCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号 151 ヒト 化抗体の軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGGSGSTD FTFTISSVQA EDLAVYVCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号 152 ヒト 化抗体の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEP SHDMSWVRKT PEKRLLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFII SRDNTKKTL Y LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLLTVSA	60 120
配列番号 153 ヒト 化抗体の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEP SHDMSWVRQA PGKGLLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMTVTVSS	60 120
配列番号 154 ヒト 化抗体の軽鎖可変領域	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K	60 111
配列番号 155 ヒト 化抗体の軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAV YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号 156 重鎖 可変領域	MYLGLNYVFI VFLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG EVFYFDYWGQ GTTLTVSS	60 120 138
配列番号 157 軽鎖 可変領域	MRPSIQFLGL LFLWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHQP GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFGSGSGGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLTLTFGAG TKLELK	60 120 126

10

20

30

【1028】

いくつか実施形態では、OX40アゴニストは、(i)第1の可溶性OX40結合ドメイン、(ii)第1のペプチドリンカー、(iii)第2の可溶性OX40結合ドメイン、(iv)第2のペプチドリンカー、及び(v)第3の可溶性OX40結合ドメインを含むOX40アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、N末端及び／またはC末端に追加のドメインを更に含み、追加のドメインは、FabまたはFc断片ドメインである。ある実施形態では、OX40アゴニストは、(i)第1の可溶性OX40結合ドメイン、(ii)第1のペプチドリンカー、(iii)第2の可溶性OX40結合ドメイン、(iv)第2のペプチドリンカー、及び(v)第3の可溶性OX40結合ドメインを含むOX40アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、N末端及び／またはC末端に追加のドメインを更に含み、追加のドメインは、FabまたはFc断片ドメインであり、可溶性OX40ドメインは各々、茎領域（三量体化に寄与し、細胞膜まである特定の距離を提供するが、

40

50

OX40 結合ドメインの一部ではない)を欠き、第1及び第2のペプチドリンカーは独立して、3～8アミノ酸長を有する。

【1029】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、(i)第1の可溶性腫瘍壊死因子(TNF)スーパーファミリーサイトカインドメイン、(ii)第1のペプチドリンカー、(iii)第2の可溶性TNFスーパーファミリーサイトカインドメイン、(iv)第2のペプチドリンカー、及び(v)第3の可溶性TNFスーパーファミリーサイトカインドメインを含むOX40アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、可溶性TNFスーパーファミリーサイトカインドメインは各々、茎領域を欠き、第1及び第2のペプチドリンカーは独立して、3～8アミノ酸長であり、TNFスーパーファミリーサイトカインドメインは、OX40結合ドメインである。

10

【1030】

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

【1031】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、前述のVLドメインのうちのいずれかに連結された前述のVHドメインのうちのいずれかを含むOX40アゴニストscFv抗体である。

20

【1032】

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

【1033】

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

【1034】

B. 任意選択的な細胞生存率分析

30

任意選択的に、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準のアッセイを使用して、プライミングによる第1の拡大(初期バルク拡大と称されることもある)後に行われ得る。したがって、ある特定の実施形態では、方法は、プライミングによる第1の拡大後に細胞生存率アッセイを行うことを含む。例えば、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンプルー排除アッセイが、バルクTILの試料上で行われ得る。生存率の試験に使用する他のアッセイには、アラマーブルーアッセイ及びMTTアッセイが含まれるが、これらに限定されない。

【1035】

1. 細胞数、生存率、フローサイトメトリー

いくつかの実施形態では、細胞数及び／または生存率が測定される。CD3、CD4、CD8、及びCD56などであるが、これらに限定されないマーカー、ならびに本明細書に開示または記載される任意の他のマーカーの発現は、FACSCanto(商標)フローサイトメーター(BD Biosciences)を使用して、例えば、BD Biosciences(BD Biosciences, San Jose, CA)から市販されているものであるが、これに限定されない抗体を用いたフローサイトメトリーによって測定され得る。細胞は、使い捨てのcチップ血球計数器(VWR, Batavia, IL)を使用して手動で計数することができ、生存率は、トリパンプルー染色を含むが、これに限定されない、当該技術分野で知られている任意の方法を使用して評価することができる。細胞生存率は、米国特許出願公開第2018/0282694号(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に基づいてアッセイされ得る。細胞生存率は、米国特

40

50

許出願公開第2018/0280436号または国際特許出願公開第WO/2018/081473号（いずれもあらゆる目的のためにそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に基づいてアッセイすることもできる。

【1036】

いくつかの事例では、バルクTIL集団は、以下で考察されるプロトコルを使用して直ちに凍結保存され得る。あるいは、以下で論じられるように、バルクTIL集団がREPに供されて、凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾TILが療法に使用される場合、バルクまたはREP TIL集団が好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。

【1037】

2. 細胞培養

いくつかの実施形態では、上で考察され、図1及び8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に例示されたものを含む、TILを拡大するための方法は、約5,000mL～約25,000mLの細胞培地、約5,000mL～約10,000mLの細胞培地、または約5,800mL～約8,700mLの細胞培地を使用することを含み得る。いくつかの実施形態では、培地は、無血清培地である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大における培地は、無血清である。いくつかの実施形態では、第2の拡大における培地は、無血清である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡大及び第2の拡大（急速な第2の拡大とも称される）における培地は、両方とも無血清である。いくつかの実施形態では、TILの数を拡大することは、わずか1種類の細胞培養培地を使用する。任意の好適な細胞培養培地、例えば、AIM-V細胞培地（L-グルタミン、50μMの硫酸ストレプトマイシン、及び10μMの硫酸ゲンタマイシン）細胞培養培地（Invitrogen, Carlsbad, CA）が使用され得る。これに関して、本発明の方法は、TILの数を拡大するために必要な培地の量及び培地の種類の数を有利に減少させる。いくつかの実施形態では、TILの数を拡大することは、3日または4日に1回以下の頻度で細胞にフィードすることを含み得る。ガス透過性容器内で細胞の数を拡大することは、細胞を拡大するために必要なフィード頻度を減少させることによって、細胞の数を拡大するために必要な手順を簡素化する。

【1038】

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

【1039】

いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、プライミングによる第1の拡大として約1～8日間、例えば約7日間、またはプライミングによる第1の拡大として約8日間にわたってIL-2、1X抗原提示フィーダー細胞、及びOKT-3を含む細胞培地を含有する第1のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を培養することと、TILを第2のガス透過性容器に移し、IL-2、2X抗原提示フィーダー細胞、及びOKT-3を含む細胞培地を含有する第2のガス透過性容器内でTILの数を約7～9日間、例えば約7日間、約8日間、または約9日間にわたって拡大することとを含む。

【1040】

いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、プライミングによる第1の拡大として、IL-2、1X抗原提示フィーダー細胞、及びOKT-3を含む細胞培地を含有する第1のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を約1～7日間、例えば、約7日間にわたって培養することと、TILを第2のガス透過性容器に移し、IL-2、2X抗原提示フィーダー細胞、及びOKT-3を含む細胞培地を含有する第2のガス透過性容器内でTILの数を約7～14日間、または約7～9日間、例えば、

10

20

30

40

50

約 7 日間、約 8 日間、または約 9 日間、約 10 日間、または約 11 日間にわたって拡大することと、を含む。

【1041】

いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、プライミングによる第 1 の拡大として、IL-2、1×抗原提示フィーダー細胞、及び OKT-3 を含む細胞培地を含有する第 1 のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を約 1～7 日間、例えば、約 7 日間培養することと、TIL を第 2 のガス透過性容器に移すことと、IL-2、2×抗原提示フィーダー細胞、及び OKT-3 を含む細胞培地を含有する第 2 のガス透過性容器内で TIL の数を約 7～11 日間、例えば、約 7 日間、約 8 日間、約 9 日間、約 10 日間、または約 11 日間にわたって拡大することと、を含む。

10

【1042】

いくつかの実施形態では、TIL は、ガス透過性容器内で拡大される。ガス透過性容器は、米国特許出願公開第 2005/0106717 A1 号に記載されるものを含む、当該技術分野で知られている方法、組成物、及びデバイスを使用して、PBMC を使用して TIL を拡大するために使用されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TIL は、ガス透過性バッグ内で拡大される。いくつかの実施形態では、TIL は、Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare) などのガス透過性バッグ内の TIL を拡大する細胞拡大システムを使用して拡大される。いくつかの実施形態では、TIL は、Xuri Cell Expansion System W5 (GE Healthcare) としても知られる WAVE Bioreactor System などのガス透過性バッグ内で TIL を拡大する細胞拡大システムを使用して拡大される。いくつかの実施形態では、細胞拡大システムは、約 100 mL、約 200 mL、約 300 mL、約 400 mL、約 500 mL、約 600 mL、約 700 mL、約 800 mL、約 900 mL、約 1 L、約 2 L、約 3 L、約 4 L、約 5 L、約 6 L、約 7 L、約 8 L、約 9 L、及び約 10 L からなる群から選択される体積を有するガス透過性細胞バッグを含む。

20

【1043】

いくつかの実施形態では、TIL は、G-REX フラスコ (Wilson Wolf Manufacturing から市販されている) 内で拡大され得る。かかる実施形態は、細胞集団が約 5×10^5 細胞/cm²～ 10×10^6 及び 30×10^6 細胞/cm² まで拡大するのを可能にする。いくつかの実施形態では、これは、フィードなしである。いくつかの実施形態では、これは、培地が G-REX フラスコ内の約 10 cm の高さに存在する限り、フィードなしである。いくつかの実施形態では、これは、フィードなしであるが、1 つ以上のサイトカインの追加を伴う。いくつかの実施形態では、サイトカインを培地と混合する必要なしに、サイトカインがボラスとして追加され得る。かかる容器、デバイス、及び方法は、当該技術分野で知られており、TIL を拡大するために使用されており、米国特許出願公開第 US 2014/0377739 A1 号、国際公開第 WO 2014/210036 A1 号、米国特許出願公開第 US 2013/0115617 A1 号、国際公開第 WO 2013/188427 A1 号、米国特許出願公開第 US 2011/0136228 A1 号、米国特許第 US 8,809,050 B2 号、国際公開第 WO 2011/072088 A2 号、米国特許出願公開第 US 2016/0208216 A1 号、米国特許出願公開第 US 2012/0244133 A1 号、国際公開第 WO 2012/129201 A1 号、米国特許出願公開第 US 2013/0102075 A1 号、米国特許第 US 8,956,860 B2 号、国際公開第 WO 2013/173835 A1 号、米国特許出願公開第 US 2015/0175966 A1 号に記載されるものを含み、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。かかるプロセスはまた、Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35:283-292 にも記載されている。

30

40

【1044】

C. TIL における遺伝子の任意選択的なノックダウンまたはノックアウト

いくつかの実施形態では、本発明の拡大 TIL は、タンパク質発現を一過的に変化させ

50

るために、各々本明細書で提供されるように、閉鎖滅菌製造プロセス中を含む、拡大ステップ前、拡大ステップ中、または拡大ステップ後に更に操作される。いくつかの実施形態では、一過的に変化したタンパク質発現は、一過性の遺伝子編集によるものである。いくつかの実施形態では、本発明の拡大 T I L は、T I L におけるタンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子 (T F) 及び／または他の分子で処理される。いくつかの実施形態では、タンパク質発現を一過的に変化させることができる T F 及び／または他の分子は、腫瘍抗原の発現の変化及び／または T I L 集団における腫瘍抗原特異的 T 細胞の数の変化を提供する。

【1045】

ある特定の実施形態では、方法は、T I L 集団を遺伝子編集することを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、第 1 の T I L 集団、第 2 の T I L 集団、及び／または第 3 の T I L 集団を遺伝子編集することを含む。

【1046】

いくつかの実施形態では、本発明は、1 つ以上のタンパク質の発現の促進または 1 つ以上のタンパク質の発現の阻害、ならびに一組のタンパク質の促進及び別の組のタンパク質の阻害の両方の組み合わせの同時発生のために、リボ核酸 (R N A) 挿入、例えば、メッセンジャー R N A (m R N A) または低分子 (もしくは短) 干渉 R N A (s i R N A) の T I L 集団への挿入などのヌクレオチド挿入による遺伝子編集を含む。

【1047】

いくつかの実施形態では、本発明の拡大 T I L は、タンパク質発現の一過性の変化を受ける。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図 8 (特に図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) に示されるようなステップ A から取得された T I L 集団を含む、第 1 の拡大前のバルク T I L 集団において起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図 8 (例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) に示されるように、例えば、ステップ B で拡大された T I L 集団におけるものを含む、第 1 の拡大中に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図 8 に示されるように、ステップ B から取得され、ステップ C に含まれる T I L 集団である、例えば、第 1 の拡大と第 2 の拡大との間の移行中の T I L 集団 (例えば、本明細書に記載の第 2 の T I L 集団) におけるものを含む、第 1 の拡大後に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図 8 に示されるように、例えば、ステップ C から取得され、ステップ D でのその拡大前の T I L 集団を含む、第 2 の拡大前のバルク T I L 集団において起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図 8 に示されるように、例えば、ステップ D で拡大された T I L 集団 (例えば、第 3 の T I L 集団) を含む、第 2 の拡大中に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図 8 に示されるように、例えば、ステップ D での拡大から取得された T I L 集団を含む、第 2 の拡大後に起こる。

【1048】

いくつかの実施形態では、T I L 集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、エレクトロポレーションステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、T s o n g , B i o p h y s . J . 1 9 9 1 , 6 0 , 2 9 7 - 3 0 6 及び米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 2 2 7 2 3 7 A 1 号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、T I L 集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法 (リン酸カルシウム D N A 沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス) は、当該技術分野で知られており、G r a h a m a n d v a n d e r E b , V i r o l o g y 1 9 7 3 , 5 2 , 4 5 6 - 4 6 7 、W i g l e r , e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 1 9 7 9 , 7 6 , 1 3 7 3 - 1 3 7 6 、及び C h e n a n d O k a y a r e a , M o l . C e l l . B i o l . 1 9 8 7 , 7 , 2 7 4 5 - 2 7 5 2 、ならび

に米国特許第 5, 593, 875 号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TIL 集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リボソームトランスフェクションステップを含む。リボソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質 N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-n, n, n-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA) 及びジオレオイルホスホチジルエタノールアミン (DOPE) の 1:1 (w/w) リボソーム配合物を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Rose, et al., Biotechniques 1991, 10, 520-525 及び Felgner, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 7413-7417、ならびに米国特許第 5, 279, 833 号、同第 5, 908, 635 号、同第 6, 056, 938 号、同第 6, 110, 490 号、同第 6, 534, 484 号、及び同第 7, 687, 070 号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TIL 集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、米国特許第 5, 766, 902 号、同第 6, 025, 337 号、同第 6, 410, 517 号、同第 6, 475, 994 号、及び同第 7, 189, 705 号に記載されている方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【1049】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、幹細胞メモリー T 細胞 (TSCM) の増加をもたらす。TSCM は、抗原を経験したセントラルメモリー T 細胞の初期前駆細胞である。TSCM は、一般に、幹細胞を定義する長期生存、自己再生、及び多分化能を示し、一般に、効果的な TIL 生成物の生成に望ましいものである。TSCM は、養子細胞移植のマウスモデルにおいて他の T 細胞サブセットと比較して増強された抗腫瘍活性を示している。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、高い割合の TSCM を含む組成を有する TIL 集団をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TSCM パーセンテージの少なくとも 5%、少なくとも 10%、少なくとも 10%、少なくとも 20%、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 35%、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、または少なくとも 95% の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TIL 集団中の TSCM の少なくとも 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、または 10 倍の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、少なくとも 5%、少なくとも 10%、少なくとも 10%、少なくとも 20%、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 35%、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、または少なくとも 95% の TSCM を有する TIL 集団をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、少なくとも 5%、少なくとも 10%、少なくとも 10%、少なくとも 20%、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 35%、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、または少なくとも 95% の TSCM を有する治療的 TIL 集団をもたらす。

20

30

40

【1050】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、抗原を経験した T 細胞の幼若化をもたらす。いくつかの実施形態では、幼若化には、例えば、増加した増殖、増加した T 細胞活性化、及び／または増加した抗原認識が含まれる。

【1051】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来の TCR レパー

50

トリーを保存するために、T細胞の大部分における発現を変化させる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のTCRレパートリーを変化させない。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のTCRレパートリーを維持する。

【1052】

いくつかの実施形態では、タンパク質の一過性の変化は、特定の遺伝子の発現の変化をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PD-1 (PDCD1またはCC279とも称される)、TGFB β 2、CCR4/5、CBLB (CBLB)、CISH、CCR (キメラ共刺激受容体)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH1/2 ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TGFB β 、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2 (MCP-1)、CCL3 (MIP-1 α)、CCL4 (MIP1- β)、CCL5 (RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1、胸腺細胞選択関連高移動度群 (HMG) ボックス (TOX)、アンキリンリピートドメイン11 (ANKRD11)、BCL6 コリプレッサー (BCOR)、及び/またはcAMPタンパク質キナーゼA (PKA) を含むが、これらに限定されない、遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PD-1、TGFB β 2、CCR4/5、CBLB (CBLB)、CISH、CCR (キメラ共刺激受容体)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH1/2 ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TGFB β 、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2 (MCP-1)、CCL3 (MIP-1 α)、CCL4 (MIP1- β)、CCL5 (RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1、胸腺細胞選択関連高移動度群 (HMG) ボックス (TOX)、アンキリンリピートドメイン11 (ANKRD11)、BCL6 コリプレッサー (BCOR)、及び/またはcAMPタンパク質キナーゼA (PKA) からなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、PD-1を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TGFB β 2を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCR4/5を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CBLBを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CISHを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCR (キメラ共刺激受容体) を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、IL-2を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、IL-12を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、IL-15を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、IL-21を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、NOTCH1/2 ICDを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TIM3を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、LAG3を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TIGITを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TGFB β を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCR1を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCR2を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCR4を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCR5を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CXCR1を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CXCR2を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CSCR3を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCL2 (MCP-1) を標的とする。いくつかの実

10

20

30

40

50

施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCL3 (MIP-1 α) を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCL4 (MIP1- β) を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCL5 (RANTES) を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CXCL1 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CXCL8 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCL22 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCL17 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、VHL を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CD44 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PIK3CD を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、SOCS1 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、胸腺細胞選択関連高移動度群 (HMG) ボックス (TOX) を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ANKRD11 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、BCL6 コリプレッサー (BCOR) を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、cAMP タンパク質キナーゼ A (PKA) を標的とする。

10

【1053】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、一過性タンパク質発現によって過剰発現されるケモカイン受容体は、CCL2 (MCP-1)、CCL3 (MIP-1 α)、CCL4 (MIP1- β)、CCL5 (RANTES)、CXCL1、CXCL8、CCL22、及び／またはCCL17を含むが、これらに限定されないリガンドを有する受容体を含む。

20

【1054】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PD-1、CTLA-4、TIM-3、LAG-3、TIGIT、TGF β R2、及び／またはTGF β の発現の低下及び／または減少をもたらす（例えば、TGF β 経路の遮断をもたらすを含む）。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CBLB (CBL-B) の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CISHの発現の低下及び／または減少をもたらす。

30

【1055】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、腫瘍部位へのTILの輸送または移動を改善するために、ケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCR (キメラ共刺激受容体) の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、及び／またはCSCR3からなる群から選択されるケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【1056】

40

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、インターロイキンの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、IL-2、IL-12、IL-15、及び／またはIL-21からなる群から選択されるインターロイキンの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【1057】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、NOTCH1/2 ICDの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、VHLの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CD44の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PI

50

K 3 C D の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、S O C S 1 の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【1058】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、c A M P タンパク質キナーゼ A (P K A) の発現の低下及び／または減少をもたらす。

【1059】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、P D - 1、L A G 3、T I M 3、C T L A - 4、T I G I T、C I S H、T G F β R 2、P K A、C B L B、B A F F (B R 3)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、P D - 1、L A G 3、T I M 3、C T L A - 4、T I G I T、C I S H、T G F β R 2、P K A、C B L B、B A F F (B R 3)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される2つの分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、P D - 1、ならびに L A G 3、T I M 3、C T L A - 4、T I G I T、C I S H、T G F β R 2、P K A、C B L B、B A F F (B R 3)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される1つの分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、P D - 1、L A G - 3、C I S H、C B L B、T I M 3、及びそれらの組み合わせの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、P D - 1、ならびに L A G 3、C I S H、C B L B、T I M 3、及びそれらの組み合わせのうちの1つの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、P D - 1 及び L A G 3 の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、P D - 1 及び C I S H の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、P D - 1 及び C B L B の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、L A G 3 及び C I S H の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、L A G 3 及び C B L B の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、C I S H 及び C B L B の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、T I M 3 及び P D - 1 の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、T I M 3 及び L A G 3 の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、T I M 3 及び C I S H の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、T I M 3 及び C B L B の発現の低下及び／または減少をもたらす。

【1060】

いくつかの実施形態では、C C R 2、C C R 4、C C R 5、C X C R 2、C X C R 3、C X 3 C R 1、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される接着分子は、ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法によって、第1の T I L 集団、第2の T I L 集団、または採取された T I L 集団に挿入される（例えば、接着分子の発現が増加する）。

【1061】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、P D - 1、L A G 3、T I M 3、C T L A - 4、T I G I T、C I S H、T G F β R 2、P K A、C B L B、B A F F (B R 3)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の低下及び／または減少、ならびに C C R 2、C C R 4、C C R 5、C X C R 2、C X C R 3、C X 3 C R 1、及びそれらの組み合わせの発現の増加及び／または増強をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、P D - 1、L A G 3、T I M 3、C I S H、C B L B、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の低

下及び／または減少、ならびにCCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、及びそれらの組み合わせの発現の増加及び／または増強をもたらす。

【1062】

いくつかの実施形態では、発現が約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約80%、約85%、約90%、または約95%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約85%、約90%、または約95%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約80%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約85%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約90%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約95%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約99%減少する。

10

【1063】

いくつかの実施形態では、発現が約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約80%、約85%、約90%、または約95%増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約85%、約90%、または約95%増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約80%増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約85%増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約90%増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約95%増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約99%増加する。

20

【1064】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TILにおけるタンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子(TF)及び／または他の分子でのTILの処理によって誘導される。いくつかの実施形態では、SQZベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームが、タンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子(TF)及び／または他の分子の細胞内送達のために用いられる。かかる方法は、転写因子を含むタンパク質をT細胞を含む様々な初代ヒト細胞に送達する能力を示し、米国特許出願公開第US2019/0093073A1号、同第US2018/0201889A1号、及び同第US2019/0017072A1号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。かかる方法は、TIL集団を、一過性タンパク質発現を誘導することができる転写因子(TF)及び／または他の分子に曝露するために本発明で用いることができ、当該一過性タンパク質発現を誘導することができるTF及び／または他の分子は、腫瘍抗原の増加した発現及び／またはTIL集団における腫瘍抗原特異的T細胞の数の増加をもたらす、それ故に、TIL集団の再プログラミング及び再プログラミングされていないTIL集団と比較して再プログラミングされたTIL集団の治療的有効性の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、本明細書に記載されるように、TIL開始集団またはTIL前集団(すなわち、再プログラミング前の)集団と比較して、エフェクターT細胞及び／またはセントラルメモリーT細胞の増加した亜集団をもたらす。

30

40

【1065】

いくつかの実施形態では、転写因子(TF)には、TCF-1、NOTCH1/2、ICD、及び／またはMYBが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態で

50

は、転写因子 (TF) は、TCF-1 である。いくつかの実施形態では、転写因子 (TF) は、NOTCH1/2 ICD である。いくつかの実施形態では、転写因子 (TF) は、MYB である。いくつかの実施形態では、転写因子 (TF) は、更なる TIL 再プログラミングを誘導するために、市販の KNOCKOUT Serum Replacement (Gibco/ThermoFisher) などの誘導多能性幹細胞培養物 (iPSC) とともに投与される。いくつかの実施形態では、転写因子 (TF) は、更なる TIL 再プログラミングを誘導するために、iPSC カクテルとともに投与される。いくつかの実施形態では、転写因子 (TF) は、iPSC カクテルなしで投与される。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、TSCM のパーセンテージの増加をもたらす。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、TSCM のパーセンテージの約 5 %、約 10 %、約 10 %、約 20 %、約 25 %、約 30 %、約 35 %、約 40 %、約 45 %、約 50 %、約 55 %、約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、または約 95 % TSCM の増加をもたらす。

10

【1066】

いくつかの実施形態では、上記のようにタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、TIL の集団を遺伝子修飾する方法と組み合わせられてもよく、1 つ以上のタンパク質の生成のための遺伝子の安定した組み込みステップを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、TIL 集団を遺伝子修飾するステップを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、第 1 の TIL 集団、第 2 の TIL 集団、及び／または第 3 の TIL 集団を遺伝子修飾することを含む。いくつかの実施形態では、TIL 集団を遺伝子修飾する方法は、レトロウイルス形質導入ステップを含む。いくつかの実施形態では、TIL 集団を遺伝子修飾する方法は、レンチウイルス形質導入ステップを含む。レンチウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Levine, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 2006, 103, 17372-77、Zufferey, et al., Nat. Biotechnol. 1997, 15, 871-75、Dull, et al., J. Virology 1998, 72, 8463-71、及び米国特許第 6,627,442 号 (それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる) に記載されている。いくつかの実施形態では、TIL 集団を遺伝子修飾する方法は、ガンマレトロウイルス形質導入ステップを含む。ガンマレトロウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Cepko and Pear, Cur. Prot. Mol. Biol. 1996, 9.9.1-9.9.16 に記載されており、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TIL 集団を遺伝子修飾する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入ステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入系は、当該技術分野で知られており、トランスポザーゼが、DNA 発現ベクターとしてまたは発現可能な RNA もしくはタンパク質として提供される系を含み、これにより、トランスポザーゼ、例えば、mRNA (例えば、キャップ及びポリ A 尾部を含む mRNA) として提供されるトランスポザーゼの長期発現がトランスジェニック細胞で起こらないようになる。SB10、SB11、及び SB100x などのサケ科型 Tel 様トランスポザーゼ (SB または Sleeping Beauty トランスポザーゼ) を含む好適なトランスポゾン媒介遺伝子導入システム、ならびに増加した酵素活性を有する操作された酵素は、例えば、Hackett, et al., Mol. Therapy 2010, 18, 674-83 及び米国特許第 6,489,458 号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

40

【1067】

いくつかの実施形態では、TIL 中のタンパク質発現の一過性変化は、短干渉 RNA またはサイレンシング RNA として知られることもある、低分子干渉 RNA (siRNA) は、一般に 19~25 塩基対長の二本鎖 RNA 分子である。siRNA は、RNA 干渉 (RNAi) において使用され、相補的なヌクレオチド配列を有する特定の遺伝子の発現に干渉する。

【1068】

50

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、発現の低下である。いくつかの実施形態では、TILにおけるタンパク質発現の一過性の変化は、高パーセンテージの2'-OH置換（典型的にはフッ素または-OCH₃）を有する化学的に合成された非対称siRNA二本鎖である自己送達RNA干渉（sdRNA）によって誘導され、これはテトラエチレングリコール（TEG）リンカーを使用してその3'末端でコレステロールに複合された、20ヌクレオチドアンチセンス（ガイド）鎖及び13～15塩基センス（パッセンジャー）鎖を含む。短干渉RNAまたはサイレンシングRNAとして知られることもある、低分子干渉RNA（siRNA）は、一般に19～25塩基対長の二本鎖RNA分子である。siRNAは、RNA干渉（RNAi）において使用され、相補的なヌクレオチド配列を有する特定の遺伝子の発現に干渉する。sdRNAは、共有結合及び疎水的に修飾されたRNAi化合物であり、細胞に侵入するために送達ビヒクルを必要としない。sdRNAは、一般に、最小限の二本鎖領域を有する非対称の化学修飾された核酸分子である。sdRNA分子は、典型的に一本鎖領域及び二本鎖領域を含み、分子の一本鎖領域及び二本鎖領域の両方に様々な化学修飾を含み得る。加えて、sdRNA分子は、本明細書に記載されているように、従来の高度なステロール型分子などの疎水性複合体に結合することができる。sdRNA及びかかるsdRNAを作製するための関連方法は、例えば、米国特許出願公開第US2016/0304873A1号、同第US2019/0211337A1号、同第US2009/0131360A1号、及び同第US2019/0048341A1号、ならびに米国特許第10,633,654号及び同第10,913,948B2号（これらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる）にも広く記載されている。sdRNA構造、化学、標的化位置、配列選択制などを最適化するために、sdRNA力価予測用のアルゴリズムが、開発及び利用されている。これらの分析に基づいて、機能的なsdRNA配列は、一般に、1μMの濃度で70%を超える発現の減少を有すると定義されており、確率は40%を超える。

10

20

30

40

50

【1069】

二本鎖DNA（dsRNA）は、一般に、RNAの相補鎖の対、一般にセンス（パッセンジャー）鎖及びアンチセンス（ガイド）鎖を含む任意の分子を定義するために使用することができ、一本鎖オーバーハング領域を含み得る。siRNAとは対照的に、dsRNAという用語は、一般に、ダイサーを含む切断酵素系の作用によりより大きいdsRNA分子から放出されるsiRNA分子の配列を含む前駆体分子を指す。

【1070】

いくつかの実施形態では、方法は、CCRを発現するように修飾されたTILを含む、TIL集団におけるタンパク質発現の一過性の変化を含み、例えば、テトラエチレングリコール（TEG）リンカーを使用して20ヌクレオチドアンチセンス（ガイド）鎖及び3'末端でコレステロールにコンジュゲートされた13～15塩基センス（パッセンジャー）鎖を含む、高いパーセンテージの2'-OH置換（典型的にはフッ素または-OCH₃）を有する化学的に合成された非対称siRNA二本鎖である、自己送達RNA干渉（sdRNA）の使用を含む。siRNA及びsdRNAを使用する方法は、Khvorov and Watts, Nat. Biotechnol. 2017, 35, 238-248、Byrne, et al., J. Ocul. Pharmacol. Ther. 2013, 29, 855-864、及びLigtenberg, et al., Mol. Therapy, 2018, 26, 1482-93（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。いくつかの実施形態では、siRNAの送達は、エレクトロポレーションまたは細胞膜破壊（スクイーズまたはSQZ法など）を使用して達成される。いくつかの実施形態では、TIL集団へのsiRNAまたはsdRNAの送達は、エレクトロポレーション、SQZ、または他の方法を使用せず、代わりに、TIL集団が培地中1μM/10,000TILの濃度でsiRNAまたはsdRNAに曝露される1～3日の期間を使用して達成される。ある特定の実施形態では、方法は、TIL集団を培地中1μM/10,000TILの濃度のsiRNAまたはsdRNAに1～3日間曝露することを含む、TIL集団へのsiRNAまたはsdRNAの送達を含む。いくつか

の実施形態では、T I L 集団への s i R N A または s d R N A の送達は、T I L 集団が培地中 10 μ M / 10, 000 T I L の濃度で s i R N A または s d R N A に曝露される 1 ~ 3 日の期間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、T I L 集団への s i R N A または s d R N A の送達は、T I L 集団が培地中 50 μ M / 10, 000 T I L の濃度で s i R N A または s d R N A に曝露される 1 ~ 3 日の期間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、T I L 集団への s i R N A または s d R N A の送達は、T I L 集団が培地中 0.1 μ M / 10, 000 T I L ~ 50 μ M / 10, 000 T I L の濃度で s i R N A または s d R N A に曝露される 1 ~ 3 日の期間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、T I L 集団への s i R N A または s d R N A の送達は、T I L 集団が培地中 0.1 μ M / 10, 000 T I L ~ 50 μ M / 10, 000 T I L の濃度で s i R N A または s d R N A に曝露される 1 ~ 3 日の期間を使用して達成され、s i R N A または s d R N A への曝露は、新鮮な s i R N A または s d R N A を培地に追加することによって、2 回、3 回、4 回、または 5 回行われる。他の好適なプロセスは、例えば、米国特許出願公開第 U S 2011 / 0039914 A1 号、同第 U S 2013 / 0131141 A1 号、及び同第 U S 2013 / 0131142 A1 号、ならびに米国特許第 9, 080, 171 号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【1071】

いくつかの実施形態では、s i R N A または s d R N A は、製造中に T I L 集団に挿入される。いくつかの実施形態では、s d R N A は、N O T C H 1 / 2 I C D、P D - 1、C T L A - 4 T I M - 3、L A G - 3、T I G I T、T G F β 、T G F B R 2、c A M P プロテインキナーゼ A (P K A)、B A F F B R 3、C I S H、及び／または C B L B に干渉する R N A をコードする。いくつかの実施形態では、発現の減少は、例えば、フローサイトメトリー及び／または q P C R によって評価される、遺伝子サイレンシングのパーセンテージに基づいて決定される。いくつかの実施形態では、発現が約 5 %、約 10 %、約 10 %、約 20 %、約 25 %、約 30 %、約 35 %、約 40 %、約 45 %、約 50 %、約 55 %、約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、または約 95 % 減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、または約 95 % 減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、または約 95 % 減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 80 %、約 85 %、約 90 %、または約 95 % 減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 85 %、約 90 %、または約 95 % 減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 80 % 減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 85 % 減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 90 % 減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 95 % 減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 99 % 減少する。

20

30

【1072】

s i R N A の化学修飾に基づく自己送達可能な R N A i 技術を本発明の方法とともに用いて、本明細書に記載されるように、s d R N A を T I L に首尾よく送達することができる。非対称 s i R N A 構造及び疎水性リガンドとの骨格修飾の組み合わせ（例えば、L i g t e n b e r g, e t a l. M o l. T h e r a p y, 2018, 26, 1482-93 及び米国特許出願公開第 2016 / 0304873 A1 号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）を参照）は、s d R N A のヌクレアーゼ安定性を利用して、培養培地に単に添加することによって、追加の配合物及び方法なしに、s d R N A が培養された哺乳類細胞に浸透することを可能にする。この安定性は、単に培地中の s d R N A の活性濃度を維持することによって、標的遺伝子活性の一定レベルの R N A i を介した低減の支援を可能にする。理論に拘束されることはないが、s d R N A の骨格安定化は、非分裂細胞で数カ月間続く可能性のある遺伝子発現効果の延長された低減を提供する。

40

【1073】

いくつかの実施形態では、T I L の 95 % を超えるトランスフェクション効率及び様々

50

な特定の *siRNA* または *sdRNA* による標的の発現の減少が起こる。いくつかの実施形態では、いくつかの未修飾リボース残基を含む *siRNA* または *sdRNA* は、*RNAi* 効果の効力及び／または寿命を増加させるために、完全に修飾された配列で置き換えられた。いくつかの実施形態では、発現効果の減少は、12時間、24時間、36時間、48時間、5日間、6日間、7日間、または8日間以上維持される。いくつかの実施形態では、発現効果の減少は、*TIL* の *siRNA* または *sdRNA* 処理後10日以上で減少する。いくつかの実施形態では、標的発現の発現の70%を超える減少が維持される。いくつかの実施形態では、標的発現の発現の70%を超える減少が維持される *TIL*。いくつかの実施形態では、*PD-1* / *PD-L1* 経路における発現の減少により、*TIL* がより強力なインビボ効果を示すことが可能になり、これは、いくつかの実施形態では、*PD-1* / *PD-L1* 経路の抑制効果の回避に起因する。いくつかの実施形態では、*siRNA* または *sdRNA* による *PD-1* の発現の減少は、*TIL* 拡大の増加をもたらす。

10

【1074】

いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、標的遺伝子の発現の70%の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、標的遺伝子の発現の75%の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、標的遺伝子の発現の80%の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、標的遺伝子の発現の85%の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、標的遺伝子の発現の90%の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、標的遺伝子の発現の95%の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、標的遺伝子の発現の99%の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、約0.25 μM ~ 約4 μM の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、約0.25 μM の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、約0.5 μM の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、約0.75 μM の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、約1.0 μM の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、約1.25 μM の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、約1.5 μM の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、約1.75 μM の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、約2.0 μM の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、約2.25 μM の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、約2.5 μM の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、約2.75 μM の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、約3.0 μM の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、約3.25 μM の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *siRNA* または *sdRNA* 配列は、約3.5 μM の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。

20

30

40

50

す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される s i R N A または s d R N A 配列は、約 3 . 7 5 μ M の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される s i R N A または s d R N A 配列は、約 4 . 0 μ M の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。

【1075】

いくつかの実施形態では、s i R N A または s d R N A オリゴヌクレオチド剤は、療剤の安定性及び／または有効性を増加させ、かつ治療される細胞または組織へのオリゴヌクレオチドの効率的な送達をもたらすための1つ以上の修飾を含む。かかる修飾には、2' - O - メチル修飾、2' - O - フルロ修飾、ジホスホロチオエート修飾、2' F 修飾ヌクレオチド、2' - O - メチル修飾、及び／または2' デオキシヌクレオチドが含まれ得る。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、例えば、ステロール、コレステロール、ビタミンD、ナフチル、イソブチル、ベンジル、インドール、トリプトファン、及び／またはフェニルを含む1つ以上の疎水性修飾を含むように修飾される。いくつかの実施形態では、化学修飾ヌクレオチドは、ホスホロチオエート、2' - O - メチル、2' デオキシ、疎水性修飾及びホスホロチオエートの組み合わせである。いくつかの実施形態では、糖が修飾され得、修飾された糖には、D - リボース、2' - O - アルキル (2' - O - メチル及び2' - O - エチルを含む)、すなわち、2' - アルコキシ、2' - アミノ、2' - S - アルキル、2' - ハロ (2' - フルオロを含む)、T - メトキシエトキシ、2' - アリルオキシ ($-OCH_2CH=CH_2$)、2' - プロパルギル、2' - プロピル、エチニル、エテニル、プロペニル、及びシアノなどが含まれ得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、糖部分は、ヘキソースであり得、Augustyns, et al., Nuc l. A c i d s. R e s. 1992, 18, 4711 (この開示は参照により本明細書に組み込まれる) に記載されているようにオリゴヌクレオチドに組み込まれ得る。

【1076】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖 s i R N A または s d R N A オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖であり、すなわち、分子のいずれかの末端にも一本鎖配列が突出しておらず、すなわち、平滑末端である。いくつかの実施形態では、個々の核酸分子は、異なる長さであり得る。言い換えれば、本発明の二本鎖 s i R N A または s d R N A オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖ではない。例えば、2つの別個の核酸分子が使用される場合、アンチセンス配列を含むそれらの分子の一方、例えば、第1の分子は、それにハイブリダイズする (分子の一部を一本鎖のままにする) 第2の分子よりも長い可能性がある。いくつかの実施形態では、単一の核酸分子が使用される場合、いずれかの末端の分子の一部は、一本鎖のままであり得る。

【1077】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖 s i R N A または s d R N A オリゴヌクレオチドは、ミスマッチ及び／またはループもしくはバルジを含むが、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約70%にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約80%にわたって二本鎖である。他の実施形態では、本発明の二本鎖 s i R N A または s d R N A オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約90%~95%にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖 s i R N A または s d R N A オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約96%~98%にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくともまたは最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15のミスマッチを含む。

【1078】

いくつかの実施形態では、s i R N A または s d R N A オリゴヌクレオチドは、例えば、米国特許第5,849,902号 (その開示は参照により本明細書に組み込まれる) に記載されているように3' または5' 結合を修飾することによって、ヌクレアーゼから実質的に保護され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、「ブロック基」を含めることに

よって耐性にすることができる。本明細書で使用される場合、「ブロッキング基」という用語は、合成のための保護基またはカップリング基のいずれかとして（例えば、FITC、プロピル（ $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ）、グリコール（ $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ）ホスフェート（ PO_3^{2-} ）、リン酸水素、もしくはホスホロアミダイト）、オリゴヌクレオチドまたはヌクレオモノマーに結合され得る置換基（例えば、OH基以外）を指す。「ブロッキング基」は、修飾ヌクレオチド及び非ヌクレオチドエキソヌクレアーゼ耐性構造を含む、オリゴヌクレオチドの5'及び3'末端を保護する「末端ブロッキング基」または「エキソヌクレアーゼブロッキング基」も含み得る。

【1079】

いくつかの実施形態では、siRNAまたはsdRNA内の隣接するポリヌクレオチドの少なくとも一部分は、代替の結合、例えば、ホスホロチオエート結合によって結合されている。

10

【1080】

いくつかの実施形態では、化学修飾は、siRNAまたはsdRNAの細胞取り込みの少なくとも1、5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500パーセントの増強をもたらし得る。いくつかの実施形態では、C残基またはU残基の少なくとも一方が、疎水性修飾を含む。いくつかの実施形態では、複数のC及びUが疎水性修飾を含む。いくつかの実施形態では、C及びUの少なくとも10%、15%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または少なくとも95%が疎水性修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、C及びUの全てが疎水性修飾を含む。

20

【1081】

いくつかの実施形態では、siRNAまたはsdRNA分子は、プロトン化可能なアミンの組み込みにより増強されたエンドソーム放出を示す。いくつかの実施形態では、プロトン化可能なアミンは、センス鎖（RISC負荷後に廃棄される分子の一部）に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明のsiRNAまたはsdRNA化合物は、二重鎖領域（10～15塩基長の効率的なRISC侵入に必要）及び4～12ヌクレオチド長の一本鎖領域を13ヌクレオチド二重鎖とともに含む非対称化合物を含む。いくつかの実施形態では、6ヌクレオチドの一本鎖領域が用いられる。いくつかの実施形態では、siRNAまたはsdRNAの一本鎖領域は、2～12個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合（ホスホロチオエート修飾と称される）を含む。いくつかの実施形態では、6～8個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合が用いられる。いくつかの実施形態では、本発明のsiRNAまたはsdRNA化合物は、安定性を提供し、かつRISC侵入と互換性がある固有の化学修飾パターンを含む。ガイド鎖は、例えば、RISC侵入に干渉することなく安定性を確証する任意の化学修飾によって修飾することもできる。いくつかの実施形態では、ガイド鎖における化学修飾パターンは、2'Fが修飾され、かつ5'末端がリン酸化されたC及びUヌクレオチドの大部分を含む。

30

40

【1082】

いくつかの実施形態では、siRNAまたはsdRNAのヌクレオチドの少なくとも30%が修飾されている。いくつかの実施形態では、siRNAまたはsdRNAのヌクレオチドの少なくとも30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%

50

、 88 %、 89 %、 90 %、 91 %、 92 %、 93 %、 94 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 または 99 % が修飾されている。いくつかの実施形態では、 s i R N A または s d R N A のヌクレオチドの 100 % が修飾されている。

【 1083 】

いくつかの実施形態では、 s i R N A または s d R N A 分子は、最小の二本鎖領域を有する。いくつかの実施形態では、二本鎖である分子の領域は、 8 ~ 15 ヌクレオチド長の範囲である。いくつかの実施形態では、二本鎖である分子の領域は、 8、 9、 10、 11、 12、 13、 14、 または 15 ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、二本鎖領域は、 13 ヌクレオチド長である。ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に 100 % の相補性が存在する場合もあれば、ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に 1 つ以上の不一致が存在する場合もある。いくつかの実施形態では、二本鎖分子の一端で、分子は、平滑末端であるか、または 1 ヌクレオチドのオーバーハングを有するかのいずれかである。分子の一本鎖領域は、いくつかの実施形態では、 4 ~ 12 ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 11 または 12 ヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、 4 ヌクレオチド長未満または 12 ヌクレオチド長超であることもできる。ある特定の実施形態では、一本鎖領域は、 6 または 7 ヌクレオチド長である。

【 1084 】

いくつかの実施形態では、 s i R N A または s d R N A 分子は、増加した安定性を有する。いくつかの事例では、化学修飾された s i R N A または s d R N A 分子は、 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 11、 12、 13、 14、 15、 16、 17、 18、 19、 20、 21、 22、 23、 24 時間以上、または 24 時間超（任意の中間値を含む）の培地中での半減期を有する。いくつかの実施形態では、 s i R N A または s d R N A は、 12 時間以上の培地中での半減期を有する。

【 1085 】

いくつかの実施形態では、 s i R N A または s d R N A は、効力の増加及び／または毒性の低減のために最適化されている。いくつかの実施形態では、ガイド鎖及び／またはパッセンジャー鎖のヌクレオチド長、及び／またはガイド鎖及び／またはパッセンジャー鎖におけるホスホロチオエート修飾の数が、いくつかの態様では、RNA 分子の効力に影響を与え得る一方で、 2' -フルオロ (2' F) 修飾の 2' -0-メチル (2' OMe) 修飾での置き換えは、いくつかの態様では、分子の毒性に影響を与え得る。いくつかの実施形態では、分子の 2' F 含有量の減少は、分子の毒性を低減すると予測される。いくつかの実施形態では、RNA 分子におけるホスホロチオエート修飾の数は、細胞への分子の取り込み、例えば、細胞への分子の受動的取り込みの効率に影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態では、 s i R N A または s d R N A は、 2' F 修飾を有しないが、それにもかかわらず、細胞取り込み及び組織浸透における同等の有効性を特徴とする。

【 1086 】

いくつかの実施形態では、ガイド鎖は、およそ 18 ~ 19 ヌクレオチド長であり、およそ 2 ~ 14 個のリン酸修飾を有する。例えば、ガイド鎖は、リン酸修飾された 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 11、 12、 13、 14 個、または 14 個超のヌクレオチドを含み得る。ガイド鎖は、RISC の侵入に干渉することなく増加した安定性を付与する 1 つ以上の修飾を含み得る。ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドなどのリン酸修飾ヌクレオチドは、 3' 末端にあるか、 5' 末端にあるか、またはガイド鎖全体に広がっている可能性がある。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の 3' 末端 10 ヌクレオチドは、 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 または 10 個のホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを含む。ガイド鎖は、分子全体に位置し得る 2' F 及び／または 2' OMe 修飾も含み得る。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の 1 位のヌクレオチド（ガイド鎖の最も 5' 側のヌクレオチド）は、 2' OMe 修飾及び／またはリン酸化されている。ガイド鎖内の C 及び U ヌクレオチドは、 2' F 修飾されていてもよい。例えば、 19 nt ガイド鎖の 2 ~ 10 位（または異なる長さのガイド鎖における対応する位置）の C 及び U ヌクレオチドは

、2' F 修飾されていてもよい。ガイド鎖内の C 及び U ヌクレオチドは、2' OMe 修飾されている場合もある。例えば、19 nt ガイド鎖の 11～18 位（または異なる長さのガイド鎖における対応する位置）の C 及び U ヌクレオチドは、2' OMe 修飾されていてもよい。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の最も 3' 側の末端のヌクレオチドは修飾されていない。ある特定の実施形態では、ガイド鎖内の C 及び U の大部分は 2' F 修飾されており、ガイド鎖の 5' 末端はリン酸化されている。他の実施形態では、1 位及び 11～18 位の C または U は 2' OMe 修飾されており、ガイド鎖の 5' 末端はリン酸化されている。他の実施形態では、1 位及び 11～18 位の C または U は 2' OMe 修飾されており、ガイド鎖の 5' 末端はリン酸化されており、2～10 位の C または U は 2' F 修飾されている。

10

【1087】

自己送達可能な RNAi 技術は、追加の配合物または技法を必要とすることなく RNAi 剤（siRNA、sdRNA、または他の RNAi 剤のいずれか）で細胞を直接トランスフェクトする方法を提供する。トランスフェクションが困難な細胞株をトランスフェクトする能力、高いインピボ活性、及び使用の単純さは、従来の siRNA ベースの技法に優る重大な機能的利点を提示する組成物及び方法の特徴であり、したがって、sdRNA 法は、本発明の TIL における標的遺伝子の発現を減少させる方法に関連するいくつかの実施形態で用いられる。sdRNA 法は、化学合成された化合物をエキスピボ及びインピボの両方で広範囲の一次細胞及び組織への直接送達を可能にする。本明細書における本発明のいくつかの実施形態に記載の sdRNA は、Advirna LLC (Worcester, MA, USA) から市販されている。

20

【1088】

siRNA 及び sdRNA は、疎水的に修飾された siRNA-アンチセンスオリゴヌクレオチドハイブリッド構造として形成されてもよく、例えば、Byrne, et al., J. Ocular Pharmacol. Therapeut., 2013, 29, 855-864（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている。

【1089】

いくつかの実施形態では、siRNA または sdRNA オリゴヌクレオチドは、滅菌エレクトロポレーションを使用して本明細書に記載の TIL に送達され得る。ある特定の実施形態では、方法は、siRNA または sdRNA オリゴヌクレオチドを送達するために TIL 集団の滅菌エレクトロポレーションを含む。

30

【1090】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、膜貫通送達システムと組み合わせて細胞に送達され得る。いくつかの実施形態では、この膜貫通送達システムは、脂質、ウイルスベクターなどを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド剤は、自己送達 RNAi 剤であり、いかなる送達剤も必要としない。特定の実施形態では、方法は、TIL の集団に siRNA または sdRNA オリゴヌクレオチドを送達するための膜貫通送達システムの使用を含む。

【1091】

オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド組成物は、本明細書に記載の TIL と接触し（例えば、接触させられ、本明細書では投与または送達されるとも称される）、TIL によって取り込まれる（TIL による受動的取り込みを含む）。sdRNA は、第 1 の拡大中（例えば、ステップ B）、第 1 の拡大後（例えば、ステップ C 中）、第 2 の拡大前または拡大中（例えば、ステップ D の前またはステップ D 中）、ステップ D 後及びステップ E における採取前、ステップ F における採取中または採取後、ステップ F における最終配合及び／または注入バッグへの移行前または移行中、ならびにステップ F における任意選択的な凍結保存ステップ前に、本明細書に記載の TIL に添加され得る。更に、sdRNA は、ステップ F における任意の凍結保存ステップから解凍した後に添加され得る。いくつかの実施形態では、PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH、及び CBLB を含む、本明細書に記載の 1 つ以上の sdRNA 標的遺伝子が、100 nM～20 mM、20

40

50

0 nM～10 mM、500 nM～1 mM、1 μ M～100 μ M、及び1 μ M～100 μ M からなる群から選択される濃度でTIL及び他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。いくつかの実施形態では、PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH、及びCBLBを含む、本明細書に記載の1つ以上のsdRNA標的遺伝子は、0.1 μ M sdRNA/10,000 TIL/100 μ L培地、0.5 μ M sdRNA/10,000 TIL/100 μ L培地、0.75 μ M sdRNA/10,000 TIL/100 μ L培地、1 μ M sdRNA/10,000 TIL/100 μ L培地、1.25 μ M sdRNA/10,000 TIL/100 μ L培地、1.5 μ M sdRNA/10,000 TIL/100 μ L培地、2 μ M sdRNA/10,000 TIL/100 μ L培地、5 μ M sdRNA/10,000 TIL/100 μ L培地、または10 μ M sdRNA/10,000 TIL/100 μ L培地からなる群から選択される量でTIL及び他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。いくつかの実施形態では、PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH、及びCBLBを含む、本明細書に記載の1つ以上のsdRNA標的遺伝子は、REP前段階またはREP段階中に1日2回、1日1回、2日毎、3日毎、4日毎、5日毎、6日毎、または7日毎にTIL培養物に添加され得る。

10

【1092】

siRNAまたはsdRNAを含む本発明のオリゴヌクレオチド組成物は、例えば、細胞培養培地にsiRNAまたはsdRNAを高濃度で溶解し、かつ受動的取り込みが起こるのに十分な時間を許容することによって、拡大プロセス中に本明細書に記載のTILと接触することができる。ある特定の実施形態では、本発明の方法は、TIL集団を、本明細書に記載のオリゴヌクレオチド組成物と接触させることを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、オリゴヌクレオチド、例えば、siRNAまたはsdRNAを細胞培養培地に溶解することと、細胞培養培地をTIL集団と接触させることを含む。TILは、本明細書に記載の第1の集団、第2の集団、及び／または第3の集団であり得る。

20

【1093】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの細胞への送達は、リン酸カルシウム、DMSO、グリセロールもしくはデキストラン、エレクトロポレーションを含む好適な技術分野で認識される方法によって、またはトランスフェクションによって、例えば、当該技術分野で知られている方法、例えば、米国特許第4,897,355号、同第5,459,127号、同第5,631,237号、同第5,955,365号、同第5,976,567号、同第10,087,464号、及び同第10,155,945号、ならびにBergan, et al., Nucl. Acids Res. 1993, 21, 3567（これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるような方法を使用して、例えば、カチオン性、アニオン性、または中性脂肪またはリポソームを使用して増強させ得る。

30

【1094】

いくつかの実施形態では、1つを超えるsiRNAまたはsdRNAが、標的遺伝子の発現を減少させるために使用されるいくつかの実施形態では、PD-1、TIM-3、CBLB、LAG3、及び／またはCISHを標的とするsiRNAまたはsdRNAのうちの1つ以上が一緒に使用される。いくつかの実施形態では、PD-1 siRNAまたはsdRNAは、1つを超える遺伝子標的の発現を減少させるために、TIM-3、CBLB、LAG3、及び／またはCISHのうちの1つ以上とともに使用される。いくつかの実施形態では、LAG3 siRNAまたはsdRNAは、両方の標的の遺伝子発現を減少させるために、CISHを標的とするsiRNAまたはsdRNAと組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、本明細書におけるPD-1、TIM-3、CBLB、LAG3、及び／またはCISHのうちの1つ以上を標的とするsiRNAまたはsdRNAは、Advirna LLC (Worcester, MA, USA) または複数の他のベンダーから市販されている。

40

【1095】

いくつかの実施形態では、siRNAまたはsdRNAは、PD-1、LAG3、TIL

50

M3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFB β R2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、siRNAまたはsdRNAは、PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFB β R2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、1つのsiRNAまたはsdRNAは、PD-1を標的とし、別のsiRNAまたはsdRNAは、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFB β R2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、siRNAまたはsdRNAは、PD-1、LAG3、CISH、CBLB、TIM3、及びそれらの組み合わせから選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、siRNAまたはsdRNAは、PD-1、ならびにLAG3、CISH、CBLB、TIM3のうちの1つ、及びそれらの組み合わせから選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、1つのsiRNAまたはsdRNAは、PD-1を標的とし、1つのsiRNAまたはsdRNAは、LAG3を標的とする。いくつかの実施形態では、1つのsiRNAまたはsdRNAは、PD-1を標的とし、1つのsiRNAまたはsdRNAは、CISHを標的とする。いくつかの実施形態では、1つのsiRNAまたはsdRNAは、PD-1を標的とし、1つのsiRNAまたはsdRNAは、CBLBを標的とする。いくつかの実施形態では、1つのsiRNAまたはsdRNAは、LAG3を標的とし、1つのsiRNAまたはsdRNAは、CISHを標的とする。いくつかの実施形態では、1つのsiRNAまたはsdRNAは、LAG3を標的とし、1つのsiRNAまたはsdRNAは、CBLBを標的とする。いくつかの実施形態では、1つのsiRNAまたはsdRNAは、TIM3を標的とし、1つのsiRNAまたはsdRNAは、PD-1を標的とする。いくつかの実施形態では、1つのsiRNAまたはsdRNAは、TIM3を標的とし、1つのsiRNAまたはsdRNAは、LAG3を標的とする。いくつかの実施形態では、1つのsiRNAまたはsdRNAは、TIM3を標的とし、1つのsiRNAまたはsdRNAは、CISHを標的とする。いくつかの実施形態では、1つのsiRNAまたはsdRNAは、TIM3を標的とし、1つのsiRNAまたはsdRNAは、CBLBを標的とする。

10

20

30

【1096】

本明細書で考察されたように、本発明の実施形態は、それらの治療効果を増強するために遺伝子編集を介して遺伝子修飾された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を提供する。本発明の実施形態は、1つ以上のタンパク質の発現の促進及び1つ以上のタンパク質の発現の阻害の両方、ならびにそれらの組み合わせのために、TIL集団へのヌクレオチド挿入(RNAまたはDNA)による遺伝子編集を包含する。本発明の実施形態は、TILを治療的集団に拡大するための方法も提供し、方法は、TILを遺伝子編集することを含む。TIL集団を遺伝子修飾するために使用され得るいくつかの遺伝子編集技術が存在し、それらは本発明による使用に好適である。かかる方法は、以下に記載の方法、ならびに本明細書の他の場所に記載のウイルス及びトランスポゾン方法を含む。いくつかの実施形態では、TIL、MIL、またはPBLを遺伝子修飾してCCRを発現させる方法はまた、かかる遺伝子の安定したノックアウトまたはかかる遺伝子の一過性ノックダウンのいずれかを介して遺伝子の発現を抑制する修飾を含んでもよい。

40

【1097】

いくつかの実施形態では、この方法は、本明細書に記載の第1の集団、第2の集団、及び／または第3の集団におけるTIL集団を遺伝子修飾する方法を含む。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、1つ以上のタンパク質の生成または阻害(例えば、サイレンシング)のために遺伝子の安定した組み込みステップを含む。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、エレクトロポレーションステッ

50

ブを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、Tsong, Biophys. J. 1991, 60, 297-306及び米国特許出願公開第2014/0227237A1号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。米国特許第5,019,034号、同第5,128,257号、同第5,137,817号、同第5,173,158号、同第5,232,856号、同第5,273,525号、同第5,304,120号、同第5,318,514号、同第6,010,613号、及び同第6,078,490号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどの当該技術分野で知られている他のエレクトロポレーション法が使用され得る。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、滅菌エレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルスエレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、TILをパルス電場で処理して、TILの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、100V/cm以上の電界強度を有する、少なくとも3つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたDC電気パルス列をTILに適用するステップを含み、少なくとも3つのDC電気パルス列は、以下の特徴のうちの1つ、2つ、または3つを有する：（1）少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つのパルス振幅が互いに異なる、（2）少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つのパルス幅が互いに異なる、及び（3）少なくとも3つのパルスのうちの2つの第1のセットの第1のパルス間隔が、少なくとも3つのパルスのうちの2つの第2のセットの第2のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、TILをパルス電場で処理して、TILの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、100V/cm以上の電界強度を有する、少なくとも3つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたDC電気パルス列をTILに適用するステップを含み、少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つのパルス振幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、TILをパルス電場で処理して、TILの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、100V/cm以上の電界強度を有する、少なくとも3つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたDC電気パルス列をTILに適用するステップを含み、少なくとも3つのパルスのうちの2つの第1のセットの第1のパルス間隔が、少なくとも3つのパルスのうちの2つの第2のセットの第2のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、TILをパルス電場で処理して、TILの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、100V/cm以上の電界強度を有する、少なくとも3つのDC電気パルス列をTILに適用するステップを含み、少なくとも3つのDC電気パルス列は、以下の特徴のうちの1つ、2つ、または3つを有する：（1）少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つのパルス振幅が互いに異なる、（2）少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つのパルス幅が互いに異なる、及び（3）少なくとも3つのパルスのうちの2つの第1のセットの第1のパルス間隔が、少なくとも3つのパルスのうちの2つの第2のセットの第2のパルス間隔とは異なり、これにより、誘導された細孔が比較的長期間にわたって持続され、TILの生存率が維持される。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法（リン酸カル

10

20

30

40

50

シウムDNA沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス)は、当該技術分野で知られており、Graham and van der Eb, Virology 1973, 52, 456-467、Wigler, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1979, 76, 1373-1376、及びChen and Okayama, Mol. Cell. Biol. 1987, 7, 2745-2752、ならびに米国特許第5,593,875号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、リボソームトランスフェクションステップを含む。リボソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-n, n, n-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)及びジオレオイルホスホチジルエタノールアミン(DOPE)の1:1(w/w)リボソーム配合物を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Rose, et al., Biotechniques 1991, 10, 520-525及びFelgner, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 7413-7417、ならびに米国特許第5,279,833号、同第5,908,635号、同第6,056,938号、同第6,110,490号、同第6,534,484号、及び同第7,687,070号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、米国特許第5,766,902号、同第6,025,337号、同第6,410,517号、同第6,475,994号、及び同第7,189,705号に記載されている方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。TILは、本明細書に記載のTILの第1の集団、第2の集団、及び／または第3の集団であり得る。

10

20

30

40

50

【1098】

ある実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。かかるプログラム可能なヌクレアーゼは、特定のゲノム遺伝子座に切断を導入することによって正確なゲノム編集を可能にし、すなわち、ゲノム内の特定のDNA配列の認識に依存して、ヌクレアーゼドメインをこの位置に標的し、標的配列での二本鎖切断の生成を媒介する。DNAの二本鎖切断は、その後、内因性修復機構を切断部位に動員して、非相同末端結合(NHEJ)または相同指向修復(HDR)のいずれかによるゲノム編集を媒介する。したがって、切断の修復は、標的遺伝子生成物を破壊する(例えば、サイレンス、抑制、または増強する)挿入／欠失変異の導入をもたらす可能性がある。

【1099】

部位特異的ゲノム編集を可能にするために開発されたヌクレアーゼの主要なクラスには、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様ヌクレアーゼ(TALEN)、及びCRISPR関連ヌクレアーゼ(例えば、CRISPR/Cas9)が含まれる。これらのヌクレアーゼシステムは、DNA認識のモードに基づいて大きく2つのカテゴリーに分類され得、ZFN及びTALENは、タンパク質-DNA相互作用を介して特定のDNA結合を達成するが、Cas9などのCRISPRシステムは、標的DNAと直接塩基対を形成する短いRNAガイド分子によって、かつタンパク質-DNA相互作用によって特定のDNA配列を標的とする。例えば、Cox et al., Nature Medicine, 2015, Vol. 21, No. 2を参照されたい。

【1100】

本発明のTIL拡大法に従って使用され得る遺伝子編集法の非限定的な例には、CRISPR法、TALE法、及びZFN法が含まれ、これらは以下でより詳細に説明される。ある実施形態によれば、TILを治療的集団に拡大するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態(例えば、Gen2)に従って、または米国特許出願公開第US2020/0299644A1号及び同第US2020/0121719A1号、ならびに米国特許第10,925,900号(それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる)に記載されるように実行することができ、方法は、増強された治療効果を提供する

ことができるTILを生成するために、CRISPR法、TALE法、またはZFN法のうちの1つ以上によって、TILの少なくとも一部を遺伝子編集することを更に含む。ある実施形態によれば、遺伝子編集されたTILは、インビトロでそれらを修飾されていないTILと比較することによって、例えば、修飾されていないTILと比較してインビトロでのエフェクター機能、サイトカインプロファイルなどを評価することによって、改善された治療効果について評価され得る。ある特定の実施形態では、この方法は、CRISPR法、TALE法、及び／またはZFN法を使用してTIL集団を遺伝子編集することを含む。

【1101】

本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションは、CRISPRシステム、TALENシステム、及びZFNシステムなどの遺伝子編集システムの送達のために使用される。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、フローエレクトロポレーションシステムである。本発明のいくつかの実施形態との使用に好適な、好適なフローエレクトロポレーションシステムの例は、市販のMaxCyte STXシステムである。本発明との使用に好適であり得る、BTX-Harvard Apparatusから入手可能なAgilePulseシステムもしくはECM830、Cellaxess Elektra (Cellecetricon)、Nucleofector (Lonza / Amaxa)、GenePulser MXcell (BIO RAD)、iPorator-96 (Primax)、またはsiPORTer96 (Ambion)などのいくつかの代替の市販エレクトロポレーション機器が存在する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、TIL拡大法の残りとともに、滅菌閉鎖されたシステムを形成する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、本明細書に記載のパルスエレクトロポレーションシステムであり、TIL拡大法の残りとともに、滅菌閉鎖されたシステムを形成する。

【1102】

TILを治療的集団に拡大するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、Gen2）に従って、または米国特許出願公開第US2020/0299644A1号及び同第US2020/0121719A1号、ならびに米国特許第10,925,900号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように実行することができ、方法は、CRISPR法（例えば、CRISPR/Cas9またはCRISPR/Cpf1）によってTILの少なくとも一部を遺伝子編集することを更に含む。特定の実施形態によれば、TIL拡大プロセス中のCRISPR法の使用は、1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を引き起こし、治療的TIL集団の少なくとも一部分においてサイレンシングまたは減少させる。あるいは、TIL拡大プロセス中のCRISPR法の使用は、1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的TIL集団の少なくとも一部において増強させる。

【1103】

CRISPRは、「clustered regularly interspaced short palindromic repeats（クラスター化された定期的な間隔をあけた短いパリンドロミックリピート）」の略語である。遺伝子編集のためにCRISPRシステムを使用する方法は、本明細書ではCRISPR法とも称される。RNA及びCasタンパク質を組み込み、かつ本発明に従って使用され得るCRISPRシステムには、3つの型：I型、II型、及びIII型がある。II型CRISPR（Cas9によって例示される）は、最もよく特徴付けられているシステムのうちの1つである。

【1104】

CRISPR技術は、細菌及び古細菌（単細胞微生物のドメイン）の自然防御機構から適合された。これらの生物は、CRISPR由来のRNA及びCas9を含む様々なCasタンパク質を使用して、外来侵入物のDNAを切り刻んで破壊することによって、ウイルス及び他の異物による攻撃を阻止する。CRISPRは、ヌクレオチド反復配列及びスペーサーの存在という2つの異なる特徴を有するDNAの特殊な領域である。ヌクレオチ

ドの反復配列は、C R I S P R 領域全体に分布しており、外来DNA（スペーサー）の短いセグメントが反復配列の間に散在している。I I 型C R I S P R / C a s システムでは、スペーサーは、C R I S P R ゲノム遺伝子座内に組み込まれ、転写され、短いC R I S P R RNA (c r RNA) に処理される。これらのc r RNA は、トランス活性化c r RNA (t r a c r RNA) にアニーリングし、C a s タンパク質による病原性DNAの配列特異的切断及びサイレンシングを指示する。C a s 9 タンパク質による標的認識には、c r RNA 内の「シード」配列、及びc r RNA 結合領域の上流にある保存されたジヌクレオチドを含むプロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) 配列が必要である。これにより、C R I S P R / C a s システムが再標的されて、c r RNA を再設計することにより、実質的にいずれのDNA配列も切断することができる。天然システムにおけるc r RNA 及びt r a c r RNA は、遺伝子操作で使用するために、およそ100ヌクレオチドの単一ガイドRNA (s g RNA) に簡略化され得る。C R I S P R / C a s システムは、C a s 9 エンドヌクレアーゼを発現するプラスミドと必要なc r RNA 成分を同時送達することにより、ヒト細胞に直接運搬可能である。C a s タンパク質の異なるバリエーション（例えば、C p f 1 などのC a s 9 のオルソログ）を使用して、標的の制限を低減することができる。

10

【1105】

C R I S P R 法によりT I L を永久に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、P D - 1、C T L A - 4、L A G - 3、H A V C R 2 (T I M - 3)、C i s h、T G F β 、P K A、C B L - B、P P P 2 C A、P P P 2 C B、P T P N 6、P T P N 2 2、P D C D 1、B T L A、C D 1 6 0、T I G I T、C D 9 6、C R T A M、L A I R 1、S I G L E C 7、S I G L E C 9、C D 2 4 4、T N F R S F 1 0 B、T N F R S F 1 0 A、C A S P 8、C A S P 1 0、C A S P 3、C A S P 6、C A S P 7、F A D D、F A S、S M A D 2、S M A D 3、S M A D 4、S M A D 1 0、S K I、S K I L、T G I F 1、I L 1 0 R A、I L 1 0 R B、H M O X 2、I L 6 R、I L 6 S T、E I F 2 A K 4、C S K、P A G 1、S I T 1、F O X P 3、P R D M 1、B A T F、G U C Y 1 A 2、G U C Y 1 A 3、G U C Y 1 B 2、G U C Y 1 B 3、T O X、S O C S 1、A N K R D 1 1、及びB C O R が含まれる。

20

【1106】

C R I S P R 法によりT I L を永久に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、C C R 2、C C R 4、C C R 5、C X C R 2、C X C R 3、C X 3 C R 1、I L - 2、I L 1 2、I L - 1 5、及びI L - 2 1 が含まれる。

30

【1107】

C R I S P R 法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第8,697,359号、同第8,993,233号、同第8,795,965号、同第8,771,945号、同第8,889,356号、同第8,865,406号、同第8,999,641号、同第8,945,839号、同第8,932,814号、同第8,871,445号、同第8,906,616号、及び同第8,895,308号に記載されており、各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。C R I S P R / C a s 9 及びC R I S P R / C p f 1 を発現するためのプラスミドなどのC R I S P R 法を行うための供給源は、G e n S c r i p t などの企業から市販されている。

40

【1108】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のT I L 集団の遺伝子修飾は、米国特許第US9790490号に記載されているC R I S P R / C p f 1 システムを使用して行うことができ、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【1109】

T I L を治療的集団に拡大するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、G e n 2）に従って、または米国特許出願公開第US2020/0299644A1号及び同第US2020/0121719A1号、ならびに米国特許第10,

50

925, 900号(それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる)に記載されるように実行することができ、方法は、T A L E法によってT I Lの少なくとも一部を遺伝子編集することを更に含む。特定の実施形態によれば、T I L拡大プロセス中のT A L E法の使用は、1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を引き起こし、治療的T I L集団の少なくとも一部分においてサイレンシングまたは減少させる。あるいは、T I L拡大プロセス中のT A L E法の使用は、1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的T I L集団の少なくとも一部分において増強させる。

【1110】

T A L Eは、転写活性化因子様エフェクタータンパク質を表し、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(T A L E N)を含む。遺伝子編集のためにT A L Eシステムを使用する方法は、本明細書ではT A L E法とも称され得る。T A L Eは、植物病原菌X a n t h o m o n a s属由来の天然に存在するタンパク質であり、各々単一の塩基対を認識する一連の33~35アミノ酸反復ドメインで構成されるDNA結合ドメインを含む。T A L E特異性は、反復可変二残基(R V D)として知られる2つの超可変アミノ酸によって決定される。モジュラーT A L E反復配列は、隣接するDNA配列を認識するために一緒に結合される。DNA結合ドメイン内の特定のR V Dは、標的遺伝子座内の塩基を認識し、予測可能なDNA結合ドメインを組み立てるための構造的特徴を提供する。T A L EのDNA結合ドメインは、I I S型F o k Iエンドヌクレアーゼの触媒ドメインに融合して、標的可能なT A L Eヌクレアーゼを作製する。部位特異的変異を誘導するために、14~20塩基対のスペーサー領域によって分離された2つの個々のT A L E NアームがF o k Iモノマーを密接に接近させて二量体化し、標的とされる二本鎖切断を生成する。

【1111】

様々な組み立て方法を利用したいくつかの大規模な系統的研究により、T A L E反復配列を組み合わせ、実質的に全てのユーザ定義配列を認識することができることが示されている。カスタム設計されたT A L Eアレイも、C e l l e c t i s B i o r e s e a r c h (P a r i s , F r a n c e)、T r a n s p o s a g e n B i o p h a r m a c e u t i c a l s (L e x i n g t o n , K Y , U S A)、及びL i f e T e c h n o l o g i e s (G r a n d I s l a n d , N Y , U S A)から市販されている。本発明での使用に好適なT A L E法及びT A L E N法は、米国特許公開第US2011/0201118A1号、同第US2013/0117869A1号、同第US2013/0315884A1号、同第US2015/0203871A1号、及び同第US2016/0120906A1号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【1112】

T A L E法によりT I Lを永久に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、P D-1、C T L A-4、L A G-3、H A V C R 2 (T I M-3)、C i s h、T G F β 、P K A、C B L-B、P P P 2 C A、P P P 2 C B、P T P N 6、P T P N 2 2、P D C D 1、B T L A、C D 1 6 0、T I G I T、C D 9 6、C R T A M、L A I R 1、S I G L E C 7、S I G L E C 9、C D 2 4 4、T N F R S F 1 0 B、T N F R S F 1 0 A、C A S P 8、C A S P 1 0、C A S P 3、C A S P 6、C A S P 7、F A D D、F A S、S M A D 2、S M A D 3、S M A D 4、S M A D 1 0、S K I、S K I L、T G I F 1、I L 1 0 R A、I L 1 0 R B、H M O X 2、I L 6 R、I L 6 S T、E I F 2 A K 4、C S K、P A G 1、S I T 1、F O X P 3、P R D M 1、B A T F、G U C Y 1 A 2、G U C Y 1 A 3、G U C Y 1 B 2、G U C Y 1 B 3、T O X、S O C S 1、A N K R D 1 1、及びB C O Rが含まれる。

【1113】

T A L E法によりT I Lを永久に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、C C R 2、C C R 4、C C R 5、C X C R 2、C X C R 3、C X 3 C R 1、I L-2、I L 1 2、I L-15、及びI L-21が含まれる。

【1114】

T A L E 法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第 8, 586, 526 号に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【1115】

T I L を治療的集団に拡大するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態に従って、または米国特許出願公開第 U S 2 0 2 0 / 0 2 9 9 6 4 4 A 1 号及び同第 U S 2 0 2 0 / 0 1 2 1 7 1 9 A 1 号、ならびに米国特許第 10, 925, 900 号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように実行することができ、方法は、ジンクフィンガーまたはジンクフィンガーヌクレアーゼ法によって T I L の少なくとも一部を遺伝子編集することを更に含む。特定の実施形態によれば、T I L 拡大プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を引き起こし、治療的 T I L 集団の少なくとも一部分においてサイレンシングまたは減少させる。あるいは、T I L 拡大プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的 T I L 集団の少なくとも一部において増強させる。

10

【1116】

個々のジンクフィンガーは、保存された $\beta\beta\alpha$ 立体配置でおよそ 30 個のアミノ酸を含む。 α らせんの表面上のいくつかのアミノ酸は、典型的には、異なる選択性レベルで D N A の主溝の 3 b p と接触する。ジンクフィンガーは、2つのタンパク質ドメインを有する。第1のドメインは、DNA 結合ドメインであり、真核生物転写因子を含み、ジンクフィンガーを含む。第2のドメインは、ヌクレアーゼドメインであり、F o k I 制限酵素を含み、DNA の触媒的切断を担っている。

20

【1117】

個々の Z F N の DNA 結合ドメインは、典型的には、3～6 個の個々のジンクフィンガー反復配列を含み、各々 9～18 塩基対を認識することができる。ジンクフィンガードメインが目的の標的部位に特異的である場合、合計 18 塩基対を認識する 3 フィンガー Z F N の対でさえ、理論的には、哺乳動物ゲノムの単一遺伝子座を標的とすることができる。新たなジンクフィンガーアレイを生成するための 1 つの方法は、既知の特異性を有するより小さいジンクフィンガー「モジュール」を組み合わせることである。最も一般的なモジュラーアセンブリプロセスは、各々 3 塩基対の DNA 配列を認識することができる 3 つの別個のジンクフィンガーを組み合わせ、9 塩基対の標的部位を認識することができる 3 フィンガーアレイを生成することを含む。あるいは、オリゴマー化プールエンジニアリング (O P E N) などの選択ベースのアプローチを使用して、隣接するフィンガー間のコンテキスト依存的相互作用を考慮したランダム化ライブラリーから新たなジンクフィンガーアレイを選択することができる。操作されたジンクフィンガーは、S a n g a m o B i o s c i e n c e s (R i c h m o n d , C A , U S A) 及び S i g m a - A l d r i c h (S t . L o u i s , M O , U S A) から市販されている。

30

【1118】

ジンクフィンガー法により T I L を永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、P D - 1、C T L A - 4、L A G - 3、H A V C R 2 (T I M - 3)、C i s h、T G F β 、P K A、C B L - B、P P P 2 C A、P P P 2 C B、P T P N 6、P T P N 2 2、P D C D 1、B T L A、C D 1 6 0、T I G I T、C D 9 6、C R T A M、L A I R 1、S I G L E C 7、S I G L E C 9、C D 2 4 4、T N F R S F 1 0 B、T N F R S F 1 0 A、C A S P 8、C A S P 1 0、C A S P 3、C A S P 6、C A S P 7、F A D D、F A S、S M A D 2、S M A D 3、S M A D 4、S M A D 1 0、S K I、S K I L、T G I F 1、I L 1 0 R A、I L 1 0 R B、H M O X 2、I L 6 R、I L 6 S T、E I F 2 A K 4、C S K、P A G 1、S I T 1、F O X P 3、P R D M 1、B A T F、G U C Y 1 A 2、G U C Y 1 A 3、G U C Y 1 B 2、G U C Y 1 B 3、T O X、S O C S 1、A N K R D 1 1、及び B C O R が含まれる。

40

【1119】

50

ジンクフィンガー法により T I L を永久に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、C C R 2、C C R 4、C C R 5、C X C R 2、C X C R 3、C X 3 C R 1、I L - 2、I L 1 2、I L - 1 5、及び I L - 2 1 が含まれる。

【1120】

ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第 6, 534, 261 号、同第 6, 607, 882 号、同第 6, 746, 838 号、同第 6, 794, 136 号、同第 6, 824, 978 号、同第 6, 866, 997 号、同第 6, 933, 113 号、同第 6, 979, 539 号、同第 7, 013, 219 号、同第 7, 030, 215 号、同第 7, 220, 719 号、同第 7, 241, 573 号、同第 7, 241, 574 号、同第 7, 585, 849 号、同第 7, 595, 376 号、同第 6, 903, 185 号、及び同第 6, 479, 626 号に記載されており、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【1121】

ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の他の例は、Beane, et al., Mol. Therapy, 2015, 23 1380-1390 に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【1122】

いくつかの実施形態では、T I L は、高親和性 T C R、例えば、M A G E - 1、H E R 2、もしくは N Y - E S O - 1 などの腫瘍関連抗原で標的とされる T C R、または腫瘍関連細胞表面分子（例えば、メソセリン）もしくは系統制限細胞表面分子（例えば、C D 19）に結合するキメラ抗原受容体（C A R）を含むが、これらに限定されない追加の機能を含むように任意選択的に遺伝子操作される。ある特定の実施形態では、この方法は、高親和性 T C R、例えば、M A G E - 1、H E R 2、もしくは N Y - E S O - 1 などの腫瘍関連抗原で標的とされる T C R、または腫瘍関連細胞表面分子（例えば、メソセリン）もしくは系統制限細胞表面分子（例えば、C D 19）に結合するキメラ抗原受容体（C A R）を含むように T I L 集団を遺伝子操作することを含む。適切には、T I L 集団は、本明細書に記載の T I L の第 1 の集団、第 2 の集団、及び／または第 3 の集団であり得る。

20

【1123】

D. T I L 製造のための閉鎖されたシステム

本発明は、T I L 培養プロセス中に閉鎖されたシステムの使用を提供する。かかる閉鎖されたシステムは、微生物汚染の防止及び／または低減を可能にし、より少数のフラスコの使用を可能にし、コスト削減を可能にする。いくつかの実施形態では、閉鎖されたシステムは、2 つの容器を使用する。

30

【1124】

かかる閉鎖されたシステムは当該技術分野でよく知られており、例えば、<http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm> 及び <https://www.fda.gov/BioLogicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm> で見つけることができる。

40

【1125】

滅菌接続装置（S T C D）は、互換性のある 2 本の管間の滅菌溶接をもたらす。この手順により、様々な容器と管径との滅菌接続が可能になる。いくつかの実施形態では、閉鎖されたシステムには、実施例に記載のルアーロック系及びヒートシール系が含まれる。いくつかの実施形態では、閉鎖されたシステムは、閉鎖されたシステムの無菌性及び閉鎖性を維持するために、滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、実施例に記載の閉鎖されたシステムが用いられる。いくつかの実施形態では、T I L は、実施例において本明細書に記載される方法に従って、最終生成物配合容器内で配合される。

50

【1126】

いくつかの実施形態では、閉鎖されたシステムは、腫瘍断片が得られてから、TILを患者に投与するかまたは凍結保存する準備が整うまで、1つの容器を使用する。いくつかの実施形態では、2つの容器が使用される場合、第1の容器は閉鎖されたG容器であり、TIL集団が遠心分離され、第1の閉鎖されたG容器を開かずに注入バッグに移される。いくつかの実施形態では、2つの容器が使用される場合、注入バッグは、Hypothermosolを含有する注入バッグである。閉鎖されたシステムまたは閉鎖されたTIL細胞培養システムは、腫瘍試料及び／または腫瘍断片が追加されると、このシステムが外部からしっかりと密閉され、細菌、真菌、及び／またはいずれの他の微生物汚染も侵入しない閉鎖環境を形成することの特徴とする。

10

【1127】

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

【1128】

閉鎖されたシステムは、微生物汚染の不在下で及び／または微生物汚染が大幅に低減された状態で、TILの成長を可能にする。

20

【1129】

更に、TIL細胞培養環境のpH、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧は各々、細胞が培養されるにつれて変化する。したがって、細胞培養に適切な培地を循環させても、TIL増殖に最適な環境として閉鎖環境を常に一定に維持する必要がある。この目的のために、閉鎖環境の培養液中のpH、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧の物理的要因がセンサーによって監視されること、そのシグナルが培養環境の入口に設置されたガス交換器を制御するために使用されること、及び閉鎖環境のガス分圧が細胞培養環境を最適化するように培養液の変化に応じてリアルタイムで調整されることが望ましい。いくつかの実施形態では、本発明は、閉鎖環境のpH、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧を測定する監視装置を備えたガス交換器を閉鎖環境の入口に組み込み、かつ監視装置からのシグナルに基づいてガス濃度を自動的に調整することによって細胞培養環境を最適化する閉鎖された細胞培養システムを提供する。

30

【1130】

いくつかの実施形態では、閉鎖環境内の圧力は、連続的または断続的に制御される。すなわち、閉鎖環境内の圧力を、例えば、圧力維持装置によって変化させることができ、それ故に、空間が正圧状態でTILの成長に好適であることを確実にするか、または負圧状態で流体の浸出を促進し、ひいては細胞増殖を促進する。更に、負圧を断続的に加えることにより、閉鎖環境内の体積の一時的な収縮によって、閉鎖環境内の循環液体を均一かつ効率的に置き換えることが可能である。

40

【1131】

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

【1132】

E. TILの任意選択的な凍結保存

バルクTIL集団（例えば、第2のTIL集団）または拡大されたTIL集団（例えば、第3のTIL集団）のいずれかを、任意選択的に凍結保存することができる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、治療的TIL集団に起こる。いくつかの実施形態では、凍

50

結保存は、第2の拡大後に採取されたTILに起こる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、図1及び／または8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）の例示的なステップFにおいてTILに起こる。いくつかの実施形態では、TILは、注入バッグ内で凍結保存される。いくつかの実施形態では、TILは、注入バッグに入れる前に凍結保存される。いくつかの実施形態では、TILは、凍結保存され、注入バッグに入っていない。いくつかの実施形態では、凍結保存は、凍結保存培地を使用して行われる。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、ジメチルスルホキシド（DMSO）を含有する。これは、一般に、TIL集団を凍結溶液、例えば、85%補体不活性化AB血清及び15%ジメチルスルホキシド（DMSO）に入れることによって達成される。溶液中の細胞が極低温バイアルに入れられ、 -80°C で24時間保存され、任意選択的に凍結保存のためにガス状窒素冷凍庫に移される。Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-986を参照されたい。

10

【1133】

適切な場合、細胞が冷凍庫から取り出され、溶液のおよそ5分の4が解凍されるまで 37°C の水浴中で解凍される。細胞は、一般に、完全培地中に再懸濁され、任意選択的に1回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍されたTILは、当該技術分野で知られているように計数され、生存率について評価され得る。

【1134】

いくつかの実施形態では、TIL集団は、CS10凍結保存培地（CryoStor 10、BioLife Solutions）を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、TIL集団は、ジメチルスルホキシド（DMSO）を含有する凍結保存培地を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、TIL集団は、1:1（体積：体積）比のCS10及び細胞培養培地を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、TIL集団は、約1:1（体積：体積）比のCS10及び細胞培養培地を使用して凍結保存され、追加のIL-2を更に含む。

20

【1135】

上で考察されたように、また図1及び／または8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に示されるステップA～Eで例示されるように、凍結保存は、TIL拡大プロセス全体の様々な時点で起こり得る。いくつかの実施形態では、第1の拡大後のTILの拡大集団（例えば、ステップBに従って提供される、または図1もしくは8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）のステップDによる1回以上の第2の拡大後のTILの拡大集団を凍結保存することができる。凍結保存は、一般に、TIL集団を凍結溶液、例えば、85%補体不活性化AB血清及び15%ジメチルスルホキシド（DMSO）に入れることによって達成され得る。溶液中の細胞が極低温バイアルに入れられ、 -80°C で24時間保存され、任意選択的に凍結保存のためにガス状窒素冷凍庫に移される。Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-986を参照されたい。いくつかの実施形態では、TILは、5%DMSO中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、TILは、細胞培養培地+5%DMSO中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、TILは、実施例6に提供される方法に従って凍結保存される。

30

40

【1136】

適切な場合、細胞が冷凍庫から取り出され、溶液のおよそ5分の4が解凍されるまで 37°C の水浴中で解凍される。細胞は、一般に、完全培地中に再懸濁され、任意選択的に1回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍されたTILは、当該技術分野で知られているように計数され、生存率について評価され得る。

【1137】

場合によっては、図1または8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）からのステップBのTIL集団は、以下に論じられるプロトコルを使用して、直ちに凍結保存され得る。あるいは、バルクTIL集団を、図1または

50

8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）からのステップC及びステップDに供し、その後、図1または8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）からのステップDの後に凍結保存することができる。同様に、遺伝子修飾されたTILが治療法に使用される場合、図1または8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）からのステップBまたはステップDを、好適な治療のために遺伝子修飾に供することができる。

【1138】

F．拡大TILの表現型特徴

いくつかの実施形態では、TILは、本明細書及び実施例に記載されているものを含む、拡大後の多数の表現型マーカーの発現について分析される。いくつかの実施形態では、1つ以上の表現型マーカーの発現が調べられる。いくつかの実施形態では、TILの表現型特徴は、図1または8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）からのステップBにおける第1の拡大後に分析される。いくつかの実施形態では、TILの表現型特徴は、図1または8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）からのステップCにおける遷移中に分析される。いくつかの実施形態では、TILの表現型特徴は、図1または8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）からのステップCによる移行中及び凍結保存後に分析される。いくつかの実施形態では、TILの表現型特徴は、図1または8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）からのステップDにおける第2の拡大後に分析される。いくつかの実施形態では、TILの表現型特徴は、図1または8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）からのステップDによる2回以上の拡大後に分析される。

【1139】

いくつかの実施形態では、マーカーは、CD8及びCD28からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、CD8の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、CD28の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、CD8及び／またはCD28の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に提供されるGen3プロセス）と比較して、例えば図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に提供される2Aプロセスと比較して、現行の本発明のプロセスに従って生成されたTIL上でより高い。いくつかの実施形態では、CD8の発現は、他のプロセス（例えば、図8（特に、例えば、図8B）に提供される、例えば、Gen3プロセス）と比較して、例えば、図8（特に、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に提供される2Aプロセスと比較して、本発明のプロセスに従って生成されたTILでより高い。いくつかの実施形態では、CD28の発現は、他のプロセス（例えば、図8（図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に提供される、例えば、Gen3プロセス）と比較して、例えば、図8（特に、例えば、図8A）に提供される2Aプロセスと比較して、本発明のプロセスに従って生成されたTILでより高い。いくつかの実施形態では、高いCD28発現は、より若く、より持続的なTIL表現型を示す。いくつかの実施形態では、1つ以上の調節マーカーの発現が測定される。

【1140】

いくつかの実施形態では、CD8及び／またはCD28に基づく第1のTIL集団、第2のTIL集団、第3のTIL集団、または採取されたTIL集団の選択は、本明細書に記載の腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を拡大するための方法のいずれのステップ中にも行われない。

【1141】

いくつかの実施形態では、セントラルメモリー細胞のパーセンテージは、他のプロセス（例えば、例えば図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び

／または図 8 D) に提供される Gen 3 プロセス) と比較して、例えば図 8 (特に、例えば図 8 A) に提供される 2 A プロセスと比較して、本発明のプロセスに従って生成された T I L 上でより高い。いくつかの実施形態では、セントラルメモリー細胞のメモリーマーカーは、C C R 7 及び C D 6 2 L からなる群から選択される。

【1142】

いくつかの実施形態では、C D 4 + 及び／または C D 8 + T I L メモリーサブセットは、異なるメモリーサブセットに分類され得る。いくつかの実施形態では、C D 4 + 及び／または C D 8 + T I L は、ナイーブ (C D 4 5 R A + C D 6 2 L +) T I L を含む。いくつかの実施形態では、C D 4 + 及び／または C D 8 + T I L は、セントラルメモリー (C M、C D 4 5 R A - C D 6 2 L +) T I L を含む。いくつかの実施形態では、C D 4 + 及び／または C D 8 + T I L は、エフェクターメモリー (E M、C D 4 5 R A - C D 6 2 L -) T I L を含む。いくつかの実施形態では、C D 4 + 及び／または C D 8 + T I L は、R A + エフェクターメモリー／エフェクター (T E M R A / T E F F、C D 4 5 R A + C D 6 2 L +) T I L を含む。

【1143】

いくつかの実施形態では、T I L は、グランザイム B、パーフォリン、及びグラニュライシンからなる群から選択されるもう 1 つのマーカーを発現する。いくつかの実施形態では、T I L は、グランザイム B を発現する。いくつかの実施形態では、T I L は、パーフォリンを発現する。いくつかの実施形態では、T I L は、グラニュライシンを発現する。

【1144】

いくつかの実施形態では、再刺激された T I L は、サイトカイン放出アッセイを使用して、サイトカイン放出についても評価され得る。いくつかの実施形態では、T I L は、インターフェロングamma (I F N - γ) 分泌について評価され得る。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌は、E L I S A アッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌は、例えば、図 8 (特に、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) に提供されるように、ステップ D の後の急速な第 2 の拡大ステップの後の E L I S A アッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、T I L の健康は、I F N - gamma (I F N - γ) 分泌によって測定される。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌は、活性な T I L を示す。いくつかの実施形態では、I F N - γ 生成の効力アッセイが用いられる。I F N - γ 生成は、細胞傷害能の別の尺度である。I F N - γ 生成は、C D 3、C D 2 8、及び C D 1 3 7 / 4 - 1 B B に対する抗体で刺激された T I L の培地中のサイトカイン I F N - γ のレベルを決定することによって測定され得る。これらの刺激された T I L からの培地中の I F N - γ レベルは、I F N - γ 放出を測定することによって決定され得る。いくつかの実施形態では、例えば図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) T I L に提供されるような Gen 3 プロセスのステップ D における I F N - γ 生成の増加は、例えば図 8 (特に、例えば図 8 A) に提供される 2 A プロセスのステップ D と比較して、ステップ D T I L の細胞傷害能の増加を示している。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌は、1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、または 5 倍以上増加する。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌は、1 倍増加する。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌は、2 倍増加する。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌は、3 倍増加する。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌は、4 倍増加する。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌は、5 倍増加する。いくつかの実施形態では、I F N - γ は、Q u a n t i k i n e E L I S A キットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、I F N - γ は、エクスピボでの T I L 中で測定される。いくつかの実施形態では、I F N - γ は、例えば図 8 B の方法を含む、本発明の方法によって生成された T I L を含む、T I L においてエクスピボで測定される。

【1145】

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、または 5 倍以上の I F N - γ 分泌が可能な T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及

10

20

30

40

50

50

10

20

30

40

50

5細胞のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも5000pg/mL/5e5細胞のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも6000pg/mL/5e5細胞のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも7000pg/mL/5e5細胞のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも8000pg/mL/5e5細胞のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも9000pg/mL/5e5細胞のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも10,000pg/mL/5e5細胞のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも15,000pg/mL/5e5細胞のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも20,000pg/mL/5e5細胞のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも25,000pg/mL/5e5細胞のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも30,000pg/mL/5e5細胞のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも35,000pg/mL/5e5細胞のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも40,000pg/mL/5e5細胞のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも45,000pg/mL/5e5細胞のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも50,000pg/mL/5e5細胞のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。

10

20

30

40

50

【1148】

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

つかの実施形態では、本方法によって得られたTILは、新たに採取されたTIL及び／または例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILと比較して、T細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって得られたTILは、新たに採取されたTIL及び／または図8（特に、例えば図8A）に例示されるようにGen2と称される方法を使用して調製されたTILと比較して、T細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第1の拡大で取得されたTILは、T細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはT細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、T細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるT細胞受容体のうちの1つにある。いくつかの実施形態では、T細胞受容体（TCR）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、T細胞受容体（TCR）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、T細胞受容体（TCR）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、TCRab（すなわち、TCR α/β ）の発現が増加する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセス（例えば、Gen3プロセス）は、他のプロセス、例えば、試料中の固有のペプチドCDRの数に基づくGen2と称されるプロセスと比較して、より高いクローン多様性を示す。

10

20

【1149】

いくつかの実施形態では、TILの活性化及び疲弊は、1つ以上のマーカーを調べることによって決定され得る。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊は、多色フローサイトメトリーを使用して決定され得る。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊のマーカーには、CD3、PD-1、2B4／CD244、CD8、CD25、BTLA、KLRG、TIM-3、CD194／CCR4、CD4、TIGIT、CD183、CD69、CD95、CD127、CD103、及び／またはLAG-3）からなる群から選択される1つ以上のマーカーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊のマーカーには、BTLA、CTLA-4、ICOS、Ki67、LAG-3、PD-1、TIGIT、及び／またはTIM-3からなる群から選択される1つ以上のマーカーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊のマーカーには、BTLA、CTLA-4、ICOS、Ki67、LAG-3、CD103+／CD69+、CD103+／CD69-、PD-1、TIGIT及び／またはTIM-3からなる群から選択される1つ以上のマーカーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、T細胞マーカー（活性化及び疲弊マーカーを含む）は、T細胞の活性化、阻害、または機能を調べるために決定及び／または分析され得る。いくつかの実施形態では、T細胞マーカーには、TIGIT、CD3、FoxP3、Tim-3、PD-1、CD103、CTLA-4、LAG-3、BTLA-4、ICOS、Ki67、CD8、CD25、CD45、CD4、及び／またはCD59からなる群から選択される1つ以上のマーカーが含まれ得るが、これらに限定されない。

30

40

【1150】

いくつかの実施形態では、3000pg／10⁶超のTIL～300000pg／10⁶以上のTILグランザイムB分泌を示すTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dを含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、3000pg／10⁶超のTIL、5000pg／10⁶超のTIL、7000pg／10⁶超のTIL、9000pg／10⁶超のTIL、11000pg／10⁶超のTIL、13000pg／10⁶超のTIL、15000pg／10⁶超のTIL、17000pg／10⁶超のTIL、19000pg／10⁶超のTIL、20000pg／10⁶超のTIL、40000pg／10⁶超のTIL

50

50

50

50

【 1 1 5 1 】

50

ザイム B を示す T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D を含む、本発明の拡大方法によって生成される T I L である。いくつかの実施形態では、6 0 0 0 0 p g / m L 超のグランザイム B を示す T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D を含む、本発明の拡大方法によって生成される T I L である。いくつかの実施形態では、7 0 0 0 0 p g / m L 超のグランザイム B を示す T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D を含む、本発明の拡大方法によって生成される T I L である。いくつかの実施形態では、8 0 0 0 0 p g / m L 超のグランザイム B を示す T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D を含む、本発明の拡大方法によって生成される T I L である。いくつかの実施形態では、9 0 0 0 0 p g / m L 超のグランザイム B を示す T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D を含む、本発明の拡大方法によって生成される T I L である。いくつかの実施形態では、1 0 0 0 0 0 p g / m L 超のグランザイム B を示す T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D を含む、本発明の拡大方法によって生成される T I L である。いくつかの実施形態では、1 2 0 0 0 0 p g / m L 超のグランザイム B 分泌を示す T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D を含む、本発明の拡大方法によって生成される T I L である。いくつかの実施形態では、1 4 0 0 0 0 p g / m L 超のグランザイム B を示す T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D を含む、本発明の拡大方法によって生成される T I L グランザイム B 分泌である。いくつかの実施形態では、1 6 0 0 0 0 p g / m L 超のグランザイム B 分泌を示す T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D を含む、本発明の拡大方法によって生成される T I L である。いくつかの実施形態では、1 8 0 0 0 0 p g / m L 超のグランザイム B 分泌を示す T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D を含む、本発明の拡大方法によって生成される T I L である。いくつかの実施形態では、2 0 0 0 0 0 p g / m L 超のグランザイム B 分泌を示す T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D を含む、本発明の拡大方法によって生成される T I L である。いくつかの実施形態では、2 2 0 0 0 0 p g / m L 超のグランザイム B 分泌を示す T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D を含む、本発明の拡大方法によって生成される T I L である。いくつかの実施形態では、2 4 0 0 0 0 p g / m L 超のグランザイム B 分泌を示す T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D を含む、本発明の拡大方法によって生成される T I L である。いくつかの実施形態では、2 6 0 0 0 0 p g / m L 超のグランザイム B 分泌を示す T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D を含む、本発明の拡大方法によって生成される T I L である。いくつかの実施形態では、2 8 0 0 0 0 p g / m L 超のグランザイム B 分泌を示す T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D を含む、本発明の拡大方法によって生成される T I L である。いくつかの実施形態では、3 0 0 0 0 0 p g / m L 超のグランザイム B 分泌を示す T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D を含む、本発明の拡大方法によって生成される T I L である。

10

20

30

40

【 1 1 5 2 】

いくつかの実施形態では、本発明の拡大方法は、拡大されていない T I L 集団と比較して、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D に提供されるような T I L を含む、インビトロで増加したグランザイム B 分泌を示す拡大された T I L 集団を生成する。いくつかの実施形態では、本発明の拡大された T I L 集団のグランザイム B 分泌は、拡大されていない T I L 集団と比較して、少なくとも 1 倍～50 倍以上増加する。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌は、拡大されていない T I L 集団と比較して、少なくとも 1 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、少なく

50

とも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、またはそれ以上増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡大されたTIL集団のグランザイムB分泌は、拡大されていないTIL集団と比較して、少なくとも1倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡大されたTIL集団のグランザイムB分泌は、拡大されていないTIL集団と比較して、少なくとも2倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡大されたTIL集団のグランザイムB分泌は、拡大されていないTIL集団と比較して、少なくとも3倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡大されたTIL集団のグランザイムB分泌は、拡大されていないTIL集団と比較して、少なくとも4倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡大されたTIL集団のグランザイムB分泌は、拡大されていないTIL集団と比較して、少なくとも5倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡大されたTIL集団のグランザイムB分泌は、拡大されていないTIL集団と比較して、少なくとも6倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡大されたTIL集団のグランザイムB分泌は、拡大されていないTIL集団と比較して、少なくとも7倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡大されたTIL集団のグランザイムB分泌は、拡大されていないTIL集団と比較して、少なくとも8倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡大されたTIL集団のグランザイムB分泌は、拡大されていないTIL集団と比較して、少なくとも9倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡大されたTIL集団のグランザイムB分泌は、拡大されていないTIL集団と比較して、少なくとも10倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡大されたTIL集団のグランザイムB分泌は、拡大されていないTIL集団と比較して、少なくとも20倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡大されたTIL集団のグランザイムB分泌は、拡大されていないTIL集団と比較して、少なくとも30倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡大されたTIL集団のグランザイムB分泌は、拡大されていないTIL集団と比較して、少なくとも40倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡大されたTIL集団のグランザイムB分泌は、拡大されていないTIL集団と比較して、少なくとも50倍増加する。

10

20

30

40

50

【1153】

いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌と比較して、少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、または5倍以上低いレベルのTNF- α （すなわち、TNF-アルファ）分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌と比較して、少なくとも1倍低いレベルのTNF- α 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌と比較して、少なくとも2倍低いレベルのTNF- α 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌と比較して、少なくとも3倍低いレベルのTNF- α 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌と比較して、少なくとも4倍低いレベルのTNF- α 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌と比較して、少なくとも5倍低いレベルのTNF- α 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。

【1154】

いくつかの実施形態では、少なくとも200 pg/mL / 5e5細胞～約10,000 pg/mL / 5e5細胞以上のTNF- α （すなわち、TNF-アルファ）分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの

方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも500 pg/mL/5e5細胞～約10,000 pg/mL/5e5細胞以上のTNF-α分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも1000 pg/mL/5e5細胞～約10,000 pg/mL/5e5細胞以上のTNF-α分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも2000 pg/mL/5e5細胞～約10,000 pg/mL/5e5細胞以上のTNF-α分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも3000 pg/mL/5e5細胞～約10,000 pg/mL/5e5細胞以上のTNF-α分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも4000 pg/mL/5e5細胞～約10,000 pg/mL/5e5細胞以上のTNF-α分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも5000 pg/mL/5e5細胞～約10,000 pg/mL/5e5細胞以上のTNF-α分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも6000 pg/mL/5e5細胞～約10,000 pg/mL/5e5細胞以上のTNF-α分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも7000 pg/mL/5e5細胞～約10,000 pg/mL/5e5細胞以上のTNF-α分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも8000 pg/mL/5e5細胞～約10,000 pg/mL/5e5細胞以上のTNF-α分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも9000 pg/mL/5e5細胞～約10,000 pg/mL/5e5細胞以上のTNF-α分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILである。

10

20

30

40

【1155】

いくつかの実施形態では、IFN-γ及びグランザイムBのレベルを測定して、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILの表現型特徴を決定する。いくつかの実施形態では、IFN-γ及びTNF-αのレベルを測定して、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILの表現型特徴を決定する。いくつかの実施形態では、IFN-γ及びTNF-αのレベルを測定して、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILの表現型特徴を決定する。いくつかの実施形態では、IFN-γ、グランザイムB及びTNF-αのレベルを測定して、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡大方法によって生成されるTILの表現型特徴を決定する。

【1156】

いくつかの実施形態では、表現型特性決定は、凍結保存後に調べられる。

50

【1157】

G. 追加のプロセスの実施形態

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡大するための方法であって、（a）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得することと、（b）IL-2及びOKT-3を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによってプライミングによる第1の拡大を行うことであって、プライミングによる第1の拡大を約1～7日間または約1～8日間行って第2のTIL集団を取得し、第2のTIL集団が、第1のTIL集団よりも数が多い、プライミングによる第1の拡大を行うことと、（c）第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び外因性抗原提示細胞（APC）を含む細胞培養培地と接触させて急速な第2の拡大を行って第3のTIL集団を生成することであって、急速な第2の拡大を約1～11日間または約1～10日間行って第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団である、第3のTIL集団を生成することと、（d）ステップ（c）から取得された治療的TIL集団を採取することと、を含む、当該方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大ステップは、複数のステップに分けられて、（1）第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-Rex-100MCS容器内での小規模培養で約3～4日間、または約2～4日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、（2）小規模培養由来の第2のTIL集団を、第1の容器よりも大きい第2の容器、例えば、G-Rex-500MCS容器に移すこととによって、培養のスケールアップを達成し、第2の容器内で、小規模培養由来の第2のTIL集団が、より大規模な培養で約4～7日間、または約4～8日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡大ステップは、複数のステップに分けられて、（1）第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-Rex-100MCS容器内での第1の小規模培養で約3～4日間の期間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、（2）第1の小規模培養からの第2のTIL集団を、第1の容器とサイズが等しい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第2の容器内で、第1の小規模培養からのかかる第2の容器に移された第2のTIL集団の一部が、第2の小規模培養で約4～7日間、または約4～8日間の期間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡大ステップは、複数のステップに分けられて、（1）第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-Rex-100MCS容器内での小規模培養で約3～4日間、または約2～4日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、（2）第1の小規模培養由来の第2のTIL集団を、第1の容器よりもサイズが大きい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器、例えば、G-Rex-500MCS容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第2のTIL集団の一部が、より大規模な培養で約5～7日間培養される。

【1158】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡大するための方法であって、（a）対象から得られた腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処

理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることと、(b) IL-2及びOKT-3を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによってプライミングによる第1の拡大を行うことであって、プライミングによる第1の拡大が約1～8日間行われて第2のTIL集団が取得され、第2のTIL集団は第1のTIL集団よりも数が多い、プライミングによる第1の拡大を行うことと、(c) 第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3及び外因性抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成することであって、急速な第2の拡大が約1～8日間行われて第3のTIL集団が取得され、第3のTIL集団が治療的TIL集団である、第3のTIL集団を生成することと、(d) ステップ(c)から取得された治療的TIL集団を採取することと、を含む、当該方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-R EX-100 MCS容器内での小規模培養で約2～4日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、(2) 小規模培養由来の第2のTIL集団を、第1の容器よりも大きい第2の容器、例えば、G-R EX-500 MCS容器に移すこととによって、培養のスケールアップを達成し、第2の容器内で、小規模培養由来の第2のTIL集団が、より大規模な培養で約4～8日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡大ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-R EX-100 MCS容器内での第1の小規模培養で約2～4日間の期間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、(2) 第1の小規模培養からの第2のTIL集団を、第1の容器とサイズが等しい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第2の容器内で、第1の小規模培養からのかかる第2の容器に移された第2のTIL集団の一部が、第2の小規模培養で約4～6日間の期間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡大ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-R EX-100 MCS容器内での小規模培養で約2～4日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、(2) 第1の小規模培養由来の第2のTIL集団を、第1の容器よりもサイズが大きい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器、例えば、G-R EX-500 MCS容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第2のTIL集団の一部が、より大規模な培養で約4～6日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡大ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-R EX-100 MCS容器内での小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、(2) 第1の小規模培養由来の第2のTIL集団を、第1の容器よりもサイズが大きい少なくとも2、3、または4個の第2の容器、例えば、G-R EX-500 MCS容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第2のTIL集団の一部が、より大規模な培養で約4～5日間培養される。

10

20

30

40

【1159】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡大するための方法であって、(a) 対象から得られた腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることと、(b) IL-2及びOKT-3を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによってプライミングによる第1の拡大を行うことであって、プライミングによる第1の拡大が約1～7日間行われて第2のTIL集団が得られ、第2のTIL集団は第1のTIL集団よりも数が多い、プライミングによる第1の拡大を行うことと、(c) 第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び外因性抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地と

50

接触させることによって急速な第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成することによって、急速な第2の拡大が約1～11日間行われて第3のTIL集団が得られ、第3のTIL集団が治療的TIL集団である、第3のTIL集団を生成することと、(d)ステップ(c)から得られた治療的TIL集団を採取することと、を含む、当該方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡大ステップは、複数のステップに分けられて、(1)第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、(2)小規模培養由来の第2のTIL集団を、第1の容器よりも大きい第2の容器、例えば、G-R E X-500 M C S容器に移すこととによって、培養のスケールアップを達成し、第2の容器内で、小規模培養由来の第2のTIL集団が、より大規模な培養で約4～7日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡大ステップは、複数のステップに分けられて、(1)第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での第1の小規模培養で約3～4日間の期間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、(2)第1の小規模培養からの第2のTIL集団を、第1の容器とサイズが等しい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第2の容器内で、第1の小規模培養からのかかる第2の容器に移された第2のTIL集団の一部が、第2の小規模培養で約4～7日間の期間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡大ステップは、複数のステップに分けられて、(1)第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、(2)第1の小規模培養由来の第2のTIL集団を、第1の容器よりもサイズが大きい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器、例えば、G-R E X-500 M C S容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第2のTIL集団の一部が、より大規模な培養で約4～7日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な拡大ステップは、複数のステップに分けられて、(1)第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での小規模培養で約4日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、(2)第1の小規模培養からの第2のTIL集団を、第1の容器よりもサイズが大きい少なくとも2、3、または4個の第2の容器、例えば、G-R E X-g 500 M C S容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養からのかかる第2の容器に移された第2のTIL集団の一部が、より大規模な培養で約5日間培養される。

10

20

30

40

50

【1160】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、一次の第1の拡大が、第1のTIL集団を、外因性抗原提示細胞(APC)を更に含む培養培地と接触させることによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ(c)における培養培地中のAPCの数が、ステップ(b)における培養培地中のAPCの数よりも多い、方法を提供する。

【1161】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)において培養培地に追加の外因性APCが補充されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1162】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約1.1:1～正確にまたは約20:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1163】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約1.1:1～正確にまたは約10:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1164】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約1.1:1～正確にまたは約9:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1165】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約1.1:1～正確にまたは約8:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1166】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約1.1:1～正確にまたは約7:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1167】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約1.1:1～正確にまたは約6:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1168】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約1.1:1～正確にまたは約5:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1169】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約1.1:1～正確にまたは約4:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1170】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約1.1:1～正確にまたは約3:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1171】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約1.1:1～正確にまたは約2.9:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1172】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約1.1:1～正確にまたは約2.8:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

50

【1173】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約1.1:1～正確にまたは約2.7:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1174】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約1.1:1～正確にまたは約2.6:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1175】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約1.1:1～正確にまたは約2.5:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1176】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約1.1:1～正確にまたは約2.4:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1177】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約1.1:1～正確にまたは約2.3:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1178】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約1.1:1～正確にまたは約2.2:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1179】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約1.1:1～正確にまたは約2.1:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1180】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約1.1:1～正確にまたは約2:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1181】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、約2:1～約10:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1182】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、約2:1～約5:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

50

【1183】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、約2:1~約4:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1184】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、約2:1~約3:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1185】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2:1~正確にまたは約2.9:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1186】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、約2:1~約2.8:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1187】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、約2:1~約2.7:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1188】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、約2:1~約2.6:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1189】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、約2:1~約2.5:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1190】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、約2:1~約2.4:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1191】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、約2:1~約2.3:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1192】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、約2:1~約2.2:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

50

【1193】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、約2:1～約2.1:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1194】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2:1であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1195】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2:1、2.1:1、2.2:1、2.3:1、2.4:1、2.5:1、2.6:1、2.7:1、2.8:1、2.9:1、3:1、3.1:1、3.2:1、3.3:1、3.4:1、3.5:1、3.6:1、3.7:1、3.8:1、3.9:1、4:1、4.1:1、4.2:1、4.3:1、4.4:1、4.5:1、4.6:1、4.7:1、4.8:1、4.9:1、または5:1になるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1196】

他の実施形態では、本発明は、一次の第1の拡大で追加されるAPCの数が、正確にまたは約 1×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3×10^8 、 3.1×10^8 、 3.2×10^8 、 3.3×10^8 、 3.4×10^8 、または 3.5×10^8 個のAPCであり、急速な第2の拡大で追加されるAPCの数が、正確にまたは約 3.5×10^8 、 3.6×10^8 、 3.7×10^8 、 3.8×10^8 、 3.9×10^8 、 4×10^8 、 4.1×10^8 、 4.2×10^8 、 4.3×10^8 、 4.4×10^8 、 4.5×10^8 、 4.6×10^8 、 4.7×10^8 、 4.8×10^8 、 4.9×10^8 、 5×10^8 、 5.1×10^8 、 5.2×10^8 、 5.3×10^8 、 5.4×10^8 、 5.5×10^8 、 5.6×10^8 、 5.7×10^8 、 5.8×10^8 、 5.9×10^8 、 6×10^8 、 6.1×10^8 、 6.2×10^8 、 6.3×10^8 、 6.4×10^8 、 6.5×10^8 、 6.6×10^8 、 6.7×10^8 、 6.8×10^8 、 6.9×10^8 、 7×10^8 、 7.1×10^8 、 7.2×10^8 、 7.3×10^8 、 7.4×10^8 、 7.5×10^8 、 7.6×10^8 、 7.7×10^8 、 7.8×10^8 、 7.9×10^8 、 8×10^8 、 8.1×10^8 、 8.2×10^8 、 8.3×10^8 、 8.4×10^8 、 8.5×10^8 、 8.6×10^8 、 8.7×10^8 、 8.8×10^8 、 8.9×10^8 、 9×10^8 、 9.1×10^8 、 9.2×10^8 、 9.3×10^8 、 9.4×10^8 、 9.5×10^8 、 9.6×10^8 、 9.7×10^8 、 9.8×10^8 、 9.9×10^8 、または 1×10^9 個のAPCであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1197】

他の実施形態では、本発明は、一次の第1の拡大において追加されるAPCの数が、正確にまたは約 1×10^8 個のAPC～正確にまたは約 3.5×10^8 個のAPCの範囲から選択され、急速な第2の拡大において追加されるAPCの数が、正確にまたは約 3.5×10^8 個のAPC～正確にまたは約 1×10^9 個のAPCの範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1198】

他の実施形態では、本発明は、一次の第1の拡大において追加されるAPCの数が、正

確にまたは約 1.5×10^8 個の APC ~ 正確にまたは約 3×10^8 個の APC の範囲から選択され、急速な第 2 の拡大において追加される APC の数が、正確にまたは約 4×10^8 個の APC ~ 正確にまたは約 7.5×10^8 個の APC の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1199】

他の実施形態では、本発明は、一次の第 1 の拡大において追加される APC の数が、正確にまたは約 2×10^8 個の APC ~ 正確にまたは約 2.5×10^8 個の APC の範囲から選択され、急速な第 2 の拡大において追加される APC の数が、正確にまたは約 4.5×10^8 個の APC ~ 正確にまたは約 5.5×10^8 個の APC の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1200】

他の実施形態では、本発明は、正確にまたは約 2.5×10^8 個の APC が一次の第 1 の拡大に追加され、かつ正確にまたは約 5×10^8 個の APC が急速な第 2 の拡大に追加されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1201】

他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が、末梢血単核細胞 (PBMC) であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1202】

他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍断片が複数の別個の容器に分配され、それらの別個の容器の各々の中で、第 1 の TIL 集団がステップ (a) において取得され、第 2 の TIL 集団がステップ (b) において取得され、第 3 の TIL 集団がステップ (c) において取得され、ステップ (c) における複数の容器からの治療的 TIL 集団が合わされ、ステップ (d) からの採取された TIL 集団を生成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1203】

他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍が複数の別個の容器に均等に分配されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1204】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が少なくとも 2 個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1205】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が 2 ~ 20 個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1206】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が 2 ~ 15 個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1207】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が 2 ~ 10 個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1208】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が 2 ~ 5 個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1209】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1210】

他の実施形態では、本発明は、プライミングによる第 1 の拡大がステップ (b) におい

50

て第1のTIL集団で行われる各容器の場合、ステップ(c)における急速な第2の拡大が、同じ容器内でかかる第1のTIL集団から生成された第2のTIL集団で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1211】

他の実施形態では、本発明は、別個の容器の各々が第1のガス透過性表面積を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1212】

他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍断片が単一の容器に分配されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1213】

他の実施形態では、本発明は、単一の容器が第1のガス透過性表面積を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1214】

他の実施形態では、ステップ(b)において、一次の第1の拡大が、第1のTIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞(APC)を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ(c)において追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ(b)において、APCが、正確にまたは約1細胞層～正確にまたは約3細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化される、当該方法を提供する。

【1215】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、APCが、正確にまたは約1.5細胞層～正確にまたは約2.5細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1216】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、APCが、正確にまたは約2細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1217】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、APCが、正確にまたは約1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、または3細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1218】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)において、APCが、正確にまたは約3細胞層～正確にまたは約10細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1219】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)において、APCが、正確にまたは約4細胞層～正確にまたは約8細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1220】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)において、APCが、正確にまたは約3、4、5、6、7、8、9、または10細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1221】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)において、APCが、正確にまたは約4

10

20

30

40

50

、 4 . 1、 4 . 2、 4 . 3、 4 . 4、 4 . 5、 4 . 6、 4 . 7、 4 . 8、 4 . 9、 5、 5 . 1、 5 . 2、 5 . 3、 5 . 4、 5 . 5、 5 . 6、 5 . 7、 5 . 8、 5 . 9、 6、 6 . 1、 6 . 2、 6 . 3、 6 . 4、 6 . 5、 6 . 6、 6 . 7、 6 . 8、 6 . 9、 7、 7 . 1、 7 . 2、 7 . 3、 7 . 4、 7 . 5、 7 . 6、 7 . 7、 7 . 8、 7 . 9、または8細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 2 2 2 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、プライミングによる第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を含む第1の容器内で行われ、ステップ（c）において、急速な第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を含む第2の容器内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【 1 2 2 3 】

他の実施形態では、本発明は、第2の容器が第1の容器よりも大きいように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 2 2 4 】

他の実施形態では、ステップ（b）において、一次の第1の拡大が、第1のTIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において、APCが、正確にまたは約1細胞層～正確にまたは約3細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化される、当該方法を提供する。

20

【 1 2 2 5 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、APCが、正確にまたは約1 . 5細胞層～正確にまたは約2 . 5細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 2 2 6 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、APCが、正確にまたは約2細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【 1 2 2 7 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、APCが、正確にまたは約1 . 1、 1 . 2、 1 . 3、 1 . 4、 1 . 5、 1 . 6、 1 . 7、 1 . 8、 1 . 9、 2、 2 . 1、 2 . 2、 2 . 3、 2 . 4、 2 . 5、 2 . 6、 2 . 7、 2 . 8、 2 . 9、または3細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 2 2 8 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、APCが、正確にまたは約3細胞層～正確にまたは約10細胞層の平均厚さで第2のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【 1 2 2 9 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、APCが、正確にまたは約4細胞層～正確にまたは約8細胞層の平均厚さで第2のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 2 3 0 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、APCが、正確にまたは約3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、または10細胞層の平均厚さで第2のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

50

【1231】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、APCが、正確にまたは約4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、または8細胞層の平均厚さで第2のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1232】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、プライミングによる第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を含む第1の容器内で行われ、ステップ（c）において、急速な第2の拡大が、第1の容器内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1233】

他の実施形態では、ステップ（b）において、一次の第1の拡大が、第1のTIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において、APCが、正確にまたは約1細胞層～正確にまたは約3細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化される、当該方法を提供する。

20

【1234】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、APCが、正確にまたは約1.5細胞層～正確にまたは約2.5細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1235】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、APCが、正確にまたは約2細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1236】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、APCが、正確にまたは約1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、または3細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1237】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、APCが、正確にまたは約3細胞層～正確にまたは約10細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1238】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、APCが、正確にまたは約4細胞層～正確にまたは約8細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1239】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、APCが、正確にまたは約3、4、5、6、7、8、9、または10細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1240】

50

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、APCが、正確にまたは約4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、または8細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1241】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡大が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：10の範囲から選択される、当該方法を提供する。

【1242】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡大が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：9の範囲から選択される、当該方法を提供する。

【1243】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡大が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：8の範囲から選択される、当該方法を提供する。

【1244】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡大が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：7の範囲から選択される、当該方法を提供する。

【1245】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡大が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：6の範囲から選択される、当該方法を提供する。

【1246】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡大が行われる

ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ(c)において追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ(b)において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ(c)において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1:1.1~正確にまたは約1:5の範囲から選択される、当該方法を提供する。

【1247】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞(APC)で補充することにより一次の第1の拡大が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ(c)において追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ(b)において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ(c)において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1:1.1~正確にまたは約1:4の範囲から選択される、当該方法を提供する。

10

【1248】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞(APC)で補充することにより一次の第1の拡大が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ(c)において追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ(b)において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ(c)において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1:1.1~正確にまたは約1:3の範囲から選択される、当該方法を提供する。

20

【1249】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞(APC)で補充することにより一次の第1の拡大が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ(c)において追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ(b)において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ(c)において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1:1.1~正確にまたは約1:2の範囲から選択される、当該方法を提供する。

【1250】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞(APC)で補充することにより一次の第1の拡大が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ(c)において追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ(b)において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ(c)において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1:1.2~正確にまたは約1:8の範囲から選択される、当該方法を提供する。

30

【1251】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞(APC)で補充することにより一次の第1の拡大が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ(c)において追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ(b)において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ(c)において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1:1.3~正確にまたは約1:7の範囲から選択される、当該方法を提供する。

40

【1252】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞(APC)で補充することにより一次の第1の拡大が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ(c)において追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPC

50

の数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.4～正確にまたは約1：6の範囲から選択される、当該方法を提供する。

【1253】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡大が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.5～正確にまたは約1：5の範囲から選択される、当該方法を提供する。

10

【1254】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡大が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.6～正確にまたは約1：4の範囲から選択される、当該方法を提供する。

20

【1255】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡大が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.7～正確にまたは約1：3.5の範囲から選択される、当該方法を提供する。

【1256】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡大が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.8～正確にまたは約1：3の範囲から選択される、当該方法を提供する。

30

【1257】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡大が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.9～正確にまたは約1：2.5の範囲から選択される、当該方法を提供する。

40

【1258】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、一次の第1の拡大が、第1のTIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われ、ステップ（c）において添加されるAPCの数が、ステップ（b）において添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されたAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されたAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：2の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれか

50

に記載の方法を提供する。

【1259】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、一次の第1の拡大が、第1のTIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われ、ステップ（c）において添加されるAPCの数が、ステップ（b）において添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されたAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されたAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1、1：1.2、1：1.3、1：1.4、1：1.5、1：1.6、1：1.7、1：1.8、1：1.9、1：2、1：2.1、1：2.2、1：2.3、1：2.4、1：2.5、1：2.6、1：2.7、1：2.8、1：2.9、1：3、1：3.1、1：3.2、1：3.3、1：3.4、1：3.5、1：3.6、1：3.7、1：3.8、1：3.9、1：4、1：4.1、1：4.2、1：4.3、1：4.4、1：4.5、1：4.6、1：4.7、1：4.8、1：4.9、1：5、1：5.1、1：5.2、1：5.3、1：5.4、1：5.5、1：5.6、1：5.7、1：5.8、1：5.9、1：6、1：6.1、1：6.2、1：6.3、1：6.4、1：6.5、1：6.6、1：6.7、1：6.8、1：6.9、1：7、1：7.1、1：7.2、1：7.3、1：7.4、1：7.5、1：7.6、1：7.7、1：7.8、1：7.9、1：8、1：8.1、1：8.2、1：8.3、1：8.4、1：8.5、1：8.6、1：8.7、1：8.8、1：8.9、1：9、1：9.1、1：9.2、1：9.3、1：9.4、1：9.5、1：9.6、1：9.7、1：9.8、1：9.9、または1：10から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

20

【1260】

他の実施形態では、本発明は、第2のTIL集団におけるTILの数の、第1のTIL集団におけるTILの数に対する比が、正確にまたは約1.5：1～正確にまたは約100：1であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1261】

他の実施形態では、本発明は、第2のTIL集団におけるTILの数の、第1のTIL集団におけるTILの数に対する比が、正確にまたは約50：1であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1262】

他の実施形態では、本発明は、第2のTIL集団中のTILの数の、第1のTIL集団中のTILの数に対する比が、正確にまたは約25：1であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1263】

他の実施形態では、本発明は、第2のTIL集団中のTILの数の、第1のTIL集団中のTILの数に対する比が、正確にまたは約20：1であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1264】

他の実施形態では、本発明は、第2のTIL集団中のTILの数の、第1のTIL集団中のTILの数に対する比が、正確にまたは約10：1であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1265】

他の実施形態では、本発明は、第2のTIL集団が、第1のTIL集団よりも数が少なくとも正確にまたは約50倍多いように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1266】

他の実施形態では、本発明は、第2のTIL集団が、第1のTIL集団よりも数が少なくとも正確にまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、

50

14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50倍多いように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1267】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)における第2の期間の開始の正確にまたは約2日後または正確にまたは約3日後に、細胞培養培地に追加のIL-2が補充されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1268】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスを使用して、ステップ(d)において採取されたTIL集団を凍結保存するステップを更に含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1269】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(d)の後に、(e)ステップ(d)からの採取されたTIL集団を、任意選択的にHypothermosolを含有する注入バッグに移す追加のステップを行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1270】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスを使用して、ステップ(e)において採取されたTIL集団を含む注入バッグを凍結保存するステップを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1271】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスが、採取されたTIL集団の、凍結保存培地に対する1:1の比を使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1272】

他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が、末梢血単核細胞(PBMC)であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1273】

他の実施形態では、本発明は、PBMCが照射され、かつ同種異系であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1274】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において細胞培養に追加されるAPCの総数が 2.5×10^8 であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1275】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)において細胞培養に追加されるAPCの総数が 5×10^8 であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1276】

他の実施形態では、本発明は、APCがPBMCであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1277】

他の実施形態では、本発明は、PBMCが照射され、かつ同種異系であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1278】

他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が人工抗原提示細胞であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1279】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(d)における採取が膜ベースの細胞処理シス

10

20

30

40

50

テムを使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1280】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（d）における採取がL O V O細胞処理システムを使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1281】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約5～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1282】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約10～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1283】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約15～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1284】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約20～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1285】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約25～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1286】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約30～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1287】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約35～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1288】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約40～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1289】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約45～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1290】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約50～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1291】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、2

10

20

30

40

50

9、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または60個の断片（複数可）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1292】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 27 mm^3 の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1293】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 20 mm^3 ～正確にまたは約 50 mm^3 の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1294】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 21 mm^3 ～正確にまたは約 30 mm^3 の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1295】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 22 mm^3 ～正確にまたは約 29.5 mm^3 の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1296】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 23 mm^3 ～正確にまたは約 29 mm^3 の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1297】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 24 mm^3 ～正確にまたは約 28.5 mm^3 の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1298】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 25 mm^3 ～正確にまたは約 28 mm^3 の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1299】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 26.5 mm^3 ～正確にまたは約 27.5 mm^3 の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1300】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または 50 mm^3 の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1301】

他の実施形態では、本発明は、複数の断片が正確にまたは約30～正確にまたは約60個の断片を含み、正確にまたは約 1300 mm^3 ～正確にまたは約 1500 mm^3 の総体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1302】

他の実施形態では、本発明は、複数の断片が正確にまたは約50個の断片を含み、正確にまたは約 1350 mm^3 の総体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

50

【1303】

他の実施形態では、本発明は、複数の断片が正確にまたは約50個の断片を含み、正確にまたは約1グラム～正確にまたは約1.5グラムの総質量を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1304】

他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地がG容器またはXuri細胞バッグである容器内に提供されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1305】

他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地中のIL-2濃度が約10,000IU/mL～約5000IU/mLであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1306】

他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地中のIL-2濃度が約6,000IU/mLであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1307】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地がジメチルスルホキシド(DMSO)を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1308】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地が7%～10%のDMSOを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1309】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)における第1の期間が正確にまたは約1日、2日、3日、4日、5日、6日、または7日の期間内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1310】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)における第2の期間が正確にまたは約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、または11日の期間内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1311】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)における第1の期間及びステップ(c)における第2の期間が各々、正確にまたは約1日、2日、3日、4日、5日、6日、または7日の期間内に個別に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1312】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)における第1の期間及びステップ(c)における第2の期間が各々、正確にまたは約5日、6日、または7日の期間内に個別に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1313】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)における第1の期間及びステップ(c)における第2の期間が各々、正確にまたは約7日の期間内に個別に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1314】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)～(d)が合計で正確にまたは約14日～正確にまたは約18日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1315】

50

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約１５日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３１６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約１６日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３１７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約１７日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【１３１８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約１４日～正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３１９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約１５日～正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約１６日～正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【１３２１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約１４日～正確にまたは約１６日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約１５日～正確にまたは約１６日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【１３２３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約１４日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約１５日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約１６日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【１３２６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３２７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提

50

供する。

【1328】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約14日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1329】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約15日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1330】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約16日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1331】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約18日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1332】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（d）で採取された治療的TIL集団が、TILの治療上有効な投与量に十分なTILを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1333】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量に十分なTILの数が、正確にまたは約 2.3×10^{10} ～正確にまたは約 13.7×10^{10} であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1334】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）における第3のTIL集団が、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ生成、及び／または増加したポリクロン性を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1335】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）における第3のTIL集団が、16日間より長いプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも1倍～5倍、またはそれより多くのインターフェロンガンマ生成を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1336】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）における第3のTIL集団が、17日より長いプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも1倍～5倍以上のインターフェロンガンマ生成を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1337】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）における第3のTIL集団が、18日より長いプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも1倍～5倍以上のインターフェロンガンマ生成を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1338】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）の第3のTIL集団から取得されたエフェクターT細胞及び／またはセントラルメモリーT細胞が、ステップ（b）の第2の細胞集団から取得されたエフェクターT細胞及び／またはセントラルメモリーT細胞と比較して増加したCD8及びCD28発現を示すように修正された、上記の該当する前段落のう

10

20

30

40

50

ちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1339】

他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器が閉鎖された容器であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1340】

他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がG容器であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1341】

他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がGREX-10であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1342】

他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がGREX-100であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1343】

他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がGREX-500であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1344】

他の実施形態では、本発明は、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法によって作製された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の治療的集団を提供する。

【1345】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の治療的集団であって、治療的TIL集団が、抗原提示細胞(APC)またはOKT3を添加せずにTILの第1の拡大が行われるプロセスによって調製されたTILと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ生成、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

20

【1346】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の治療的集団であって、治療的TIL集団が、抗原提示細胞(APC)を添加せずにTILの第1の拡大が行われるプロセスによって調製されたTILと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ生成、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

30

【1347】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の治療的集団であって、治療的TIL集団が、OKT3を添加せずにTILの第1の拡大が行われるプロセスによって調製されたTILと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ生成、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

【1348】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の治療的集団であって、治療的TIL集団が、抗原提示細胞(APC)を添加せず、かつOKT3を添加せずにTILの第1の拡大が行われるプロセスによって調製されたTILと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ生成、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

40

【1349】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の治療的集団であって、16日間より長いプロセスによってプロセスによって調製されたTILと比較して、治療的TIL集団が、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ生成、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

。

【1350】

50

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団であって、１７日間より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、治療的ＴＩＬ集団が、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ生成、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

【１３５１】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団であって、１８日間より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、治療的ＴＩＬ集団が、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ生成、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

10

【１３５２】

他の実施形態では、本発明は、増加したインターフェロンガンマ生成を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【１３５３】

他の実施形態では、本発明は、増加したポリクローン性を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【１３５４】

他の実施形態では、本発明は、増加した有効性を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。

20

【１３５５】

他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ生成が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ生成が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ生成が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（または、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡大プロセスに起因する少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ生成が可能になる。

30

【１３５６】

他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ生成が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ生成が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ生成が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（または、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡大プロセスに起因する少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ生成が可能になる。

40

50

【1357】

他の実施形態では、本発明は、治療的TIL集団が、16日より長いプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも3倍多いインターフェロンガンマ生成が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的TIL集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的TIL集団が、17日より長いプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも3倍多いインターフェロンガンマ生成が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的TIL集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的TIL集団が、18日より長いプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも3倍多いインターフェロンガンマ生成が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的TIL集団を提供する。いくつかの実施形態では、TILは、例えば、上記のステップA～Fに記載されるように、または上記のステップA～Fに従って（また、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に示されているように）、本明細書に記載される拡大プロセスに起因する少なくとも3倍多いインターフェロンガンマ生成が可能になる。

10

【1358】

他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞（APC）を添加せずにTILの第1の拡大が行われるプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも1倍多いインターフェロンガンマ生成が可能である腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、TILは、例えば、上記のステップA～Fに記載されるように、または上記のステップA～Fに従って（また、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に示されているように）、本明細書に記載される拡大プロセスに起因する少なくとも1倍多いインターフェロンガンマ生成が可能になる。

20

【1359】

他の実施形態では、本発明は、OKT3を添加せずにTILの第1の拡大が行われるプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも1倍多いインターフェロンガンマ生成が可能である腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、TILは、例えば、上記のステップA～Fに記載されるように、または上記のステップA～Fに従って（また、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に示されているように）、本明細書に記載される拡大プロセスに起因する少なくとも1倍多いインターフェロンガンマ生成が可能になる。

30

【1360】

他の実施形態では、本発明は、APCを添加せずにTILの第1の拡大が行われるプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも2倍多いインターフェロンガンマ生成が可能である腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、TILは、例えば、上記のステップA～Fに記載されるように、または上記のステップA～Fに従って（また、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に示されているように）、本明細書に記載される拡大プロセスに起因する少なくとも2倍多いインターフェロンガンマ生成が可能になる。

40

【1361】

他の実施形態では、本発明は、OKT3を添加せずにTILの第1の拡大が行われるプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも2倍多いインターフェロンガンマ生成が可能である治療的TIL集団を提供する。いくつかの実施形態では、TILは、例えば、上記のステップA～Fに記載されるように、または上記のステップA～Fに従って（また、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に示されているように）、本明細書に記載される拡大プロセスに起因する少なくとも2倍多いインターフェロンガンマ生成が可能になる。

50

【1362】

他の実施形態では、本発明は、APCを添加せずにTILの第1の拡大が行われるプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも3倍多いインターフェロンガンマ生成が可能である治療的TIL集団を提供する。いくつかの実施形態では、TILは、例えば、上記のステップA～Fに記載されるように、または上記のステップA～Fに従って（また、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に示されているように）、本明細書に記載される拡大プロセスに起因する少なくとも1倍多いインターフェロンガンマ生成が可能になる。

【1363】

他の実施形態では、本発明は、OKT3を添加せずにTILの第1の拡大が行われるプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも3倍多いインターフェロンガンマ生成が可能である治療的TIL集団を提供する。いくつかの実施形態では、TILは、例えば、上記のステップA～Fに記載されるように、または上記のステップA～Fに従って（また、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に示されているように）、本明細書に記載される拡大プロセスに起因する少なくとも3倍多いインターフェロンガンマ生成が可能になる。

【1364】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が、小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物であるように修正された、上記の該当する前の段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1365】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片がコア生検であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1366】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が細針吸引物であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1367】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が小生検（例えば、パンチ生検を含む）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1368】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片がコア針生検であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1369】

他の実施形態では、本発明は、（i）方法が、対象由来の腫瘍組織の1つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から第1のTIL集団を取得することを含み、（ii）方法が、プライミングによる第1の拡大ステップを行う前に、IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を約3日間培養するステップを行うことを含み、（iii）方法が、約8日間にわたってプライミングによる第1の拡大を行うことを含み、かつ（iv）方法が、約11日間にわたって急速な第2の拡大を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約22日で完了する。

【1370】

他の実施形態では、本発明は、（i）方法が、対象由来の腫瘍組織の1つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から第1のTIL集団を取得することを含み、（ii）方法が、プライミングによる第1の拡大ステップを行う前に、IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を約3日間培養するステップを行うことを含み、（iii）方法が、約8日間にわたってプライミングによる第1の拡大を行うことを含み、かつ（iv）方法が、第2のTIL集団の培養物を約5日間培養し、培養物を最大5つの継代培養物に分割し、かつ継代培養物を約6日間培養するこ

とによって、急速な第2の拡大を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、最大5つの継代培養物が各々、第2のTIL集団の培養が急速な第2の拡大で開始される容器と同じサイズのまたはそれよりも大きい容器内で培養される。前述の実施形態のうちのいくつかでは、第2のTIL集団の培養物は、最大5つの継代培養物間で均等に分けられる。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約22日で完了する。

【1371】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1～約20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1372】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1～約10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1373】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1374】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1375】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1～約20個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1376】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1～約10個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1377】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1378】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1379】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1～約20個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1380】

50

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1～約10個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1381】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1382】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1383】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1～約20個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1384】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1～約10個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1385】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1386】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1387】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1～約20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1388】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1～約10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1389】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1390】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1391】

他の実施形態では、本発明は、（i）方法が、対象由来の腫瘍組織の1～約10個のコア生検から第1のTIL集団を取得することを含み、（ii）方法が、プライミングによ

50

る第1の拡大ステップを行う前に、IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を約3日間培養するステップを行うことを含み、(iii)方法が、第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む培養培地中で約8日間培養することによってプライミングによる第1の拡大ステップを行い、第2のTIL集団を取得することを含み、かつ(iv)方法が、第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む培養培地中で約11日間培養することによって急速な第2の拡大ステップを行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約22日間で完了する。

【1392】

他の実施形態では、本発明は、(i)方法が、対象由来の腫瘍組織の1～約10個のコア生検から第1のTIL集団を取得することを含み、(ii)方法が、プライミングによる第1の拡大ステップを行う前に、IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を約3日間培養するステップを行うことを含み、(iii)方法が、第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む培養培地中で約8日間培養することによってプライミングによる第1の拡大ステップを行い、第2のTIL集団を取得することを含み、かつ(iv)方法が、第2のTIL集団の培養物を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む培養培地中で約5日間培養し、培養物を最大5つの継代培養物に分割し、かつ継代培養物の各々を、IL-2を含む培養培地中で約6日間培養することによって、急速な第2の拡大を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、最大5つの継代培養物が各々、第2のTIL集団の培養が急速な第2の拡大で開始される容器と同じサイズのまたはそれよりも大きい容器内で培養される。前述の実施形態のうちのいくつかでは、第2のTIL集団の培養物は、最大5つの継代培養物間で均等に分けられる。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約22日で完了する。

【1393】

他の実施形態では、本発明は、(i)方法が、対象由来の腫瘍組織の1～約10個のコア生検から第1のTIL集団を取得することを含み、(ii)方法が、プライミングによる第1の拡大ステップを行う前に、G-REX-100Mフラスコ内の0.5LのCM1培養培地中6000IU IL-2/mLを含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を約3日間培養するステップを行うことを含み、(iii)方法が、6000IU/mL IL-2、30ng/mL OKT-3、及び約 10^8 個のフィーダー細胞を含む0.5LのCM1培養培地を添加し、約8日間培養することによって、プライミングによる第1の拡大を行うことを含み、かつ(iv)方法が、(a)第2のTIL集団を、3000IU/mL IL-2、30ng/mL OKT-3、及び 5×10^9 個のフィーダー細胞を有する5LのCM2培養培地を含むG-REX-500MCSフラスコに移し、約5日間培養し、(b) 10^9 個のTILを、3000IU/mL IL-2を有する5LのAIM-V培地を含む最大5つのG-REX-500MCSフラスコの各々に移すことによって培養物を最大5つの継代培養物に分割し、継代培養物を約6日間培養することによって、急速な第2の拡大を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約22日で完了する。

【1394】

他の実施形態では、本発明は、(a)第1のT細胞集団を培養することによってドナーから取得された第1のT細胞集団のプライミングによる第1の増殖を行って成長をもたらし、第1のT細胞集団の活性化をプライミングすることと、(b)ステップ(a)においてプライミングされた第1のT細胞集団の活性化が減衰し始めた後、第1のT細胞集団を培養することによって第1のT細胞集団の急速な第2の増殖を行って成長をもたらし、第1のT細胞集団の活性化を促進して第2のT細胞集団を取得することと、(c)第2のT

細胞集団を採取することと、を含む、T細胞を拡大する方法を提供する。他の実施形態では、急速な第2の拡大ステップは、複数のステップに分けられて、(a)第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での小規模培養で約3~4日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、(b)小規模培養由来の第1のT細胞集団を、第1の容器よりも大きい第2の容器、例えば、G-R E X-500 M C S容器に移し、小規模培養由来の第1のT細胞集団を、第2の容器内でのより大規模な培養で約4~7日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。他の実施形態では、急速な拡大ステップは、複数のステップに分けられて、(a)第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での第1の小規模培養で約3~4日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、(b)第1の小規模培養由来の第1のT細胞集団を、第1の容器とサイズが等しい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第2の容器内で、第1の小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第1のT細胞集団の一部が、第2の小規模培養で約4~7日間培養される。他の実施形態では、急速な拡大ステップは、複数のステップに分けられて、(a)第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での小規模培養で約3~4日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、(b)小規模培養由来の第1のT細胞集団を、第1の容器よりもサイズが大きい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器、例えば、G-R E X-500 M C S容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、かかる第2の容器に移された小規模培養由来の第1のT細胞集団の一部が、より大規模な培養で約4~7日間培養される。他の実施形態では、急速な拡大ステップは、複数のステップに分けられて、(a)第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での小規模培養で約4日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、(b)小規模培養由来の第1のT細胞集団を、第1の容器よりもサイズが大きい2、3、または4個の第2の容器、例えば、G-R E X-500 M C S容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、かかる第2の容器に移された小規模培養由来の第1のT細胞集団の一部が、より大規模な培養で約5日間培養される。

【1395】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡大ステップが、複数のステップに分けられて、(a)第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での小規模培養で約2~4日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、(b)小規模培養由来の第1のT細胞集団を、第1の容器よりもサイズが大きい第2の容器、例えば、G-R E X-500 M C S容器に移し、小規模培養由来の第1のT細胞集団を、第2の容器内での大規模培養で約5~7日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1396】

他の実施形態では、本発明は、急速な拡大ステップが、複数のステップに分けられて、(a)第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での第1の小規模培養で約2~4日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、(b)第1の小規模培養由来の第1のT細胞集団を、第1の容器とサイズが等しい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第2の容器内で、第1の小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第1のT細胞集団の一部が、第2の小規模培養で約5~7日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1397】

他の実施形態では、急速な拡大ステップが、複数のステップに分けられて、(a) 第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での小規模培養で約2～4日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、(b) 小規模培養由来の第1のT細胞集団を、第1の容器よりもサイズが大きい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器、例えば、G-R E X-500 M C S容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、かかる第2の容器に移された小規模培養由来の第1のT細胞集団の一部が、より大規模な培養で約5～7日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1398】

他の実施形態では、本発明は、急速な拡大ステップが、複数のステップに分けられて、(a) 第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、(b) 小規模培養由来の第1のT細胞集団を、第1の容器よりもサイズが大きい2、3、または4個の第2の容器、例えば、G-R E X-500 M C S容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、かかる第2の容器に移された小規模培養由来の第1のT細胞集団の一部が、より大規模な培養で約5～6日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1399】

他の実施形態では、本発明は、急速な拡大ステップが、複数のステップに分けられて、(a) 第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、(b) 小規模培養由来の第1のT細胞集団を、第1の容器よりもサイズが大きい2、3、または4個の第2の容器、例えば、G-R E X-500 M C S容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、かかる第2の容器に移された小規模培養由来の第1のT細胞集団の一部が、より大規模な培養で約5日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1400】

他の実施形態では、本発明は、急速な拡大ステップが、複数のステップに分けられて、(a) 第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、(b) 小規模培養由来の第1のT細胞集団を、第1の容器よりもサイズが大きい2、3、または4個の第2の容器、例えば、G-R E X-500 M C S容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、かかる第2の容器に移された小規模培養由来の第1のT細胞集団の一部が、より大規模な培養で約6日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1401】

他の実施形態では、本発明は、急速な拡大ステップが、複数のステップに分けられて、(a) 第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡大を行うことと、その後、(b) 小規模培養由来の第1のT細胞集団を、第1の容器よりもサイズが大きい2、3、または4個の第2の容器、例えば、G-R E X-500 M C S容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、かかる第2の容器に移された小規模培養由来の第1のT細胞集団の一部が、より大規模な培養で約7日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに

50

記載の方法を提供する。

【1402】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）のプライミングによる第1の拡大が最大7日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1403】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）の急速な第2の拡大が最大8日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1404】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）の急速な第2の拡大が最大9日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1405】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）の急速な第2の拡大が最大10日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1406】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）の急速な第2の拡大が最大11日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1407】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）におけるプライミングによる第1の拡大が7日の期間中に行われ、かつステップ（b）の急速な第2の拡大が最大9日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1408】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）におけるプライミングによる第1の拡大が7日の期間中に行われ、かつステップ（b）の急速な第2の拡大が最大10日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1409】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）におけるプライミングによる第1の拡大が7日または8日の期間中に行われ、かつステップ（b）の急速な第2の拡大が最大9日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1410】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）におけるプライミングによる第1の拡大が7日または8日の期間中に行われ、かつステップ（b）の急速な第2の拡大が最大10日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1411】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）におけるプライミングによる第1の拡大が8日の期間中に行われ、かつステップ（b）の急速な第2の拡大が最大9日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1412】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）におけるプライミングによる第1の拡大が8日の期間中に行われ、かつステップ（b）の急速な第2の拡大が最大8日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供

10

20

30

40

50

する。

【1413】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のT細胞集団がOKT-3及びIL-2を含む第1の培養培地中で培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1414】

他の実施形態では、本発明は、第1の培養培地が4-1BBアゴニスト、OKT-3及びIL-2を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1415】

他の実施形態では、本発明は、第1の培養培地がOKT-3、IL-2及び抗原提示細胞（APC）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1416】

他の実施形態では、本発明は、第1の培養培地が4-1BBアゴニスト、OKT-3、IL-2及び抗原提示細胞（APC）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1417】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のT細胞集団がOKT-3、IL-2及び抗原提示細胞（APC）を含む第2の培養培地中で培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1418】

他の実施形態では、本発明は、第2の培養培地が4-1BBアゴニスト、OKT-3、IL-2及び抗原提示細胞（APC）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1419】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のT細胞集団が、第1のガス透過性表面を含む容器内の第1の培養培地中で培養され（ここで、第1の培養培地が、OKT-3、IL-2及び第1の抗原提示細胞（APC）集団を含み、第1のAPC集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第1のAPC集団が、第1のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（b）において、第1のT細胞集団が、容器内の第2の培養培地中で培養される（ここで、第2の培養培地が、OKT-3、IL-2及び第2のAPC集団を含み、第2のAPC集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第2のAPC集団が、第1のガス透過性表面上に層状化され、第2のAPC集団が、第1のAPC集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1420】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のT細胞集団が、第1のガス透過性表面を含む容器内の第1の培養培地中で培養され（ここで、第1の培養培地が、4-1BBアゴニスト、OKT-3、IL-2及び第1の抗原提示細胞（APC）集団を含み、第1のAPC集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第1のAPC集団が、第1のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（b）において、第1のT細胞集団が、容器内の第2の培養培地中で培養される（ここで、第2の培養培地が、OKT-3、IL-2及び第2のAPC集団を含み、第2のAPC集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第2のAPC集団が、第1のガス透過性表面上に層状化され、第2のAPC集団が、第1のAPC集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1421】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のT細胞集団が、第1のガス透過性表面を含む容器内の第1の培養培地中で培養され（ここで、第1の培養培地が

10

20

30

40

50

、OKT-3、IL-2及び第1の抗原提示細胞（APC）集団を含み、第1のAPC集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第1のAPC集団が、第1のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（b）において、第1のT細胞集団が、容器内の第2の培養培地中で培養される（ここで、第2の培養培地が、4-1BBアゴニスト、OKT-3、IL-2及び第2のAPC集団を含み、第2のAPC集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第2のAPC集団が、第1のガス透過性表面上に層状化され、第2のAPC集団が、第1のAPC集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1422】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のT細胞集団が、第1のガス透過性表面を含む容器内の第1の培養培地中で培養され（ここで、第1の培養培地が、4-1BBアゴニスト、OKT-3、IL-2及び第1の抗原提示細胞（APC）集団を含み、第1のAPC集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第1のAPC集団が、第1のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（b）において、第1のT細胞集団が、容器内の第2の培養培地中で培養される（ここで、第2の培養培地が、4-1BBアゴニスト、OKT-3、IL-2及び第2のAPC集団を含み、第2のAPC集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第2のAPC集団が、第1のガス透過性表面上に層状化され、第2のAPC集団が、第1のAPC集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1423】

他の実施形態では、本発明は、第2のAPC集団中のAPCの数の、第1のAPC集団中のAPCの数に対する比が、約2：1であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1424】

他の実施形態では、本発明は、第1のAPC集団中のAPCの数が約 2.5×10^8 であり、第2のAPC集団中のAPCの数が約 5×10^8 であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1425】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のAPC集団が、2層のAPCの平均厚さで第1のガス透過性表面上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1426】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第2のAPC集団が、4～8層のAPCから選択される平均厚さで第1のガス透過性表面上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1427】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において第1のガス透過性表面上に層状化されたAPCの平均層数の、ステップ（a）において第1のガス透過性表面上に層状化されたAPCの平均層数に対する比が、2：1であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1428】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のAPC集団が正確にまたは約 1.0×10^6 個のAPC/cm²～正確にまたは約 4.5×10^6 個のAPC/cm²の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1429】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のAPC集団が正確にまたは約 1.5×10^6 個のAPC/cm²～正確にまたは約 3.5×10^6 個のAPC/cm²の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1430】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のAPC集団が正確にまたは約 2.0×10^6 個のAPC/cm²～正確にまたは約 3.0×10^6 個のAPC/cm²の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1431】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のAPC集団が正確にまたは約 2.0×10^6 個のAPC/cm²の密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1432】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第2のAPC集団が正確にまたは約 2.5×10^6 個のAPC/cm²～正確にまたは約 7.5×10^6 個のAPC/cm²の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1433】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第2のAPC集団が正確にまたは約 3.5×10^6 個のAPC/cm²～正確にまたは約 6.0×10^6 個のAPC/cm²の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1434】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第2のAPC集団が正確にまたは約 4.0×10^6 個のAPC/cm²～正確にまたは約 5.5×10^6 個のAPC/cm²の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1435】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第2のAPC集団が正確にまたは約 4.0×10^6 個のAPC/cm²の密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1436】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のAPC集団が正確にまたは約 1.0×10^6 個のAPC/cm²～正確にまたは約 4.5×10^6 個のAPC/cm²の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種され、ステップ（b）において、第2のAPC集団が正確にまたは約 2.5×10^6 個のAPC/cm²～正確にまたは約 7.5×10^6 個のAPC/cm²の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1437】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のAPC集団が正確にまたは約 1.5×10^6 個のAPC/cm²～正確にまたは約 3.5×10^6 個のAPC/cm²の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種され、ステップ（b）において、第2のAPC集団が正確にまたは約 3.5×10^6 個のAPC/cm²～正確にまたは約 6.0×10^6 個のAPC/cm²の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1438】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のAPC集団が正確にまたは約 2.0×10^6 個のAPC/cm²～正確にまたは約 3.0×10^6 個のAPC/cm²の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種され、ステップ（b）において、第2のAPC集団が正確にまたは約 4.0×10^6 個のAPC/cm²～正確にまたは約 5.5×10^6 個のAPC/cm²の範囲から選択される密度で第1のガス透過

性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1439】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のAPC集団が正確にまたは約 2.0×10^6 個のAPC/cm²の密度で第1のガス透過性表面に播種され、ステップ（b）において、第2のAPC集団が正確にまたは約 4.0×10^6 個のAPC/cm²の密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1440】

他の実施形態では、本発明は、APCが末梢血単核細胞（PBMC）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1441】

他の実施形態では、本発明は、PBMCが照射され、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1442】

他の実施形態では、本発明は、T細胞が腫瘍浸潤リンパ球（TIL）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1443】

他の実施形態では、本発明は、T細胞が骨髄浸潤リンパ球（MIL）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1444】

他の実施形態では、本発明は、T細胞が末梢血リンパ球（PBL）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1445】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団がドナーの全血からの分離によって取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1446】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団がドナーのアフェレーシス生成物からの分離によって取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1447】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、T細胞表現型の正または負の選択によってドナーの全血またはアフェレーシス生成物から分離されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1448】

他の実施形態では、本発明は、T細胞表現型がCD3+及びCD45+であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1449】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団のプライミングによる第1の拡大を行う前に、T細胞がNK細胞から分離されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。他の実施形態では、T細胞は、第1のT細胞集団からのCD3-CD56+細胞の除去によって、第1のT細胞集団中のNK細胞から分離される。他の実施形態では、CD3-CD56+細胞は、CD3-CD56+細胞画分を除去し、かつ陰性画分を回収するゲーティング戦略を使用して、第1のT細胞集団を細胞選別に供することによって、第1のT細胞集団から除去される。他の実施形態では、前述の方法は、高いNK細胞パーセンテージを特徴とする第1のT細胞集団におけるT細胞の拡大のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、高いCD3-CD56+細胞パーセンテージを特徴とする第1のT細胞集団におけるT細胞の拡大のために利用され

40

50

る。他の実施形態では、前述の方法は、多数のNK細胞の存在を特徴とする腫瘍組織におけるT細胞の拡大のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のCD3-CD56+細胞を特徴とする腫瘍組織におけるT細胞の拡大のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のNK細胞の存在を特徴とする腫瘍に罹患している患者から取得された腫瘍組織におけるT細胞の拡大のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のCD3-CD56+細胞の存在を特徴とする腫瘍に罹患している患者から取得された腫瘍組織におけるT細胞の拡大のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、卵巣癌に罹患している患者から取得された腫瘍組織におけるT細胞の拡大のために利用される。

【1450】

10

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団由来の正確にまたは約 1×10^7 T細胞が容器内に播種されて、かかる容器内で一次の第1の拡大を開始するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1451】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が複数の容器に分配され、各容器内で、第1のT細胞集団由来の正確にまたは約 1×10^7 T細胞が播種されて、かかる容器内で一次の第1の拡大を開始するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1452】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)において採取された第2のT細胞集団が治療的TIL集団であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1453】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1454】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1~20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1455】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1~10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1456】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1457】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1458】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1つ以上

50

のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1459】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1～20個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1460】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1～10個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1461】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1462】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1463】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1つ以上の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1464】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1～20個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1465】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1～10個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1466】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1467】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1468】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1469】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1～20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1470】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1～10

10

20

30

40

50

個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1471】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1472】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1473】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1つ以上のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1474】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1～20個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1475】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1～10個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1476】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1477】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1478】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡大するための方法であって、i）IL-2を含む第1の細胞培養培地中で腫瘍試料を約3日間培養することによって対象における腫瘍の1つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、（ii）IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）を含む第2の細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによってプライミングによる第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成することであって、プライミングによる第1の拡大が第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第1の拡大が約7日または8日間の第1の期間行われて、第2のTIL集団が取得され、第2のTIL集団は第1のTIL集団よりも数が多い、第2のTIL集団を生成することと、（iii）第2のTIL集団の第2の細胞培養培地に追加のIL-2、OKT-3、及びAPCを補充することによって急速な第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成することであって、急速な第2の拡大において添加されるAPCの数が、ステップ（ii）において添加されるAPCの数の少なくとも2倍であり、急速な第2の拡大が約11日間の第2の期間行われて、第3のTIL集団が取得され、第3のTIL集団が治療的TIL集団であり、急速な第2の拡大が第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、第3のTIL集団を生成することと、（i

v) ステップ (i i i) から取得され治療的 T I L 集団を採取することと、(v) ステップ (i v) からの採取された T I L 集団を注入バッグに移すことと、を含む、当該方法を提供する。

【1479】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を治療的 T I L 集団に拡大するための方法であって、(i) I L-2 を含む第 1 の細胞培養培地中で腫瘍試料を約 3 日間培養することによって対象における腫瘍の 1 つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料から第 1 の T I L 集団を取得及び／または受容することと、(i i) I L-2、O K T-3、及び抗原提示細胞 (A P C) を含む第 2 の細胞培養培地中で第 1 の T I L 集団を培養することによってプライミングによる第 1 の拡大を行い、第 2 の T I L 集団を生成することであって、プライミングによる第 1 の拡大が約 7 日または 8 日間の第 1 の期間行われて、第 2 の T I L 集団が取得され、第 2 の T I L 集団は第 1 の T I L 集団よりも数が多い、第 2 の T I L 集団を生成することと、(i i i) 第 2 の T I L 集団を、I L-2、O K T-3、及び A P C を含む第 3 の細胞培養培地と接触させることによって急速な第 2 の拡大を行い、第 3 の T I L 集団を生成することであって、急速な第 2 の拡大が約 11 日間の第 2 の期間行われて、第 3 の T I L 集団が取得され、第 3 の T I L 集団が治療的 T I L 集団である、第 3 の T I L 集団を生成することと、(i v) ステップ (i i i) から取得された治療的 T I L 集団を採取することと、を含む、当該方法を提供する。

10

【1480】

他の実施形態では、本発明は、第 2 の期間の 5 日目の後に、培養物が 2 つ以上の継代培養物に分割され、各継代培養物に追加量の第 3 の培養培地が補充され、約 6 日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1481】

他の実施形態では、本発明は、第 2 の期間の 5 日目の後に、培養物が 2 つ以上の継代培養物に分割され、各継代培養物に I L-2 を含む第 4 の培養培地が補充され、約 6 日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1482】

他の実施形態では、本発明は、第 2 の期間の 5 日目の後に、培養物が最大 5 つの継代培養物に分割されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1483】

他の実施形態では、本発明は、方法における全てのステップが約 22 日間で完了するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1484】

他の実施形態では、本発明は、(i) 第 1 の T 細胞集団を培養することによってドナーにおける腫瘍の 1 つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料からの第 1 の T 細胞集団のプライミングによる第 1 の拡大を行って成長をもたらし、第 1 の T 細胞集団の活性化をプライミングすることと、(i i) ステップ (a) においてプライミングされた第 1 の T 細胞集団の活性化が減衰し始めた後、第 1 の T 細胞集団を培養することによって第 1 の T 細胞集団の急速な第 2 の拡大を行って成長をもたらし、第 1 の T 細胞集団の活性化を促進して第 2 の T 細胞集団を取得することと、(i v) 第 2 の T 細胞集団を採取することと、を含む、T 細胞を拡大する方法を提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍試料は、複数のコア生検から取得される。いくつかの実施形態では、複数のコア生検は、2、3、4、5、6、7、8、9 及び 10 個のコア生検からなる群から選択される。

40

【1485】

いくつかの実施形態では、本発明は、T 細胞または T I L が腫瘍消化物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載される方法。いくつか

50

の実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、RPMI1640、2mM GlutaMAX、10mg/mLゲンタマイシン、30U/mL DNase、及び1.0mg/mLコラゲナーゼであるが、これらに限定されない酵素培地中で腫瘍をインキュベートすること、続いて、機械的解離（GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA）によって生成される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはタイプのコラゲナーゼを含む）、Accutase（商標）、Accumax（商標）、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、キモトリプシン、キモパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパイン、プロテアーゼタイプXIV（プロナーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼI（DNase）、トリプシン阻害剤、任意の他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びこれらの任意の組み合わせ等の1つ以上の解離（消化）酵素を含むが、これらに限定されない腫瘍解離酵素混合物の中に配置される。他の実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはタイプのコラゲナーゼを含む）、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、及びデオキシリボヌクレアーゼI（DNase）を含む腫瘍解離酵素混合物中に配置される。

10

20

30

40

50

【1486】

V. 薬学的組成物、投与量、及び投薬レジメン

いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して拡大及び／または遺伝子修飾された（CCRを発現するように遺伝子修飾されたTIL、MIL、またはPBLを含む）TIL、MIL、またはPBLは、薬学的組成物として患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌緩衝液中のTIL懸濁液である。本開示のPBM Cを使用して拡大されたTILは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、T細胞は、単回の動脈内または静脈内注入として投与され、これは、好ましくは、およそ30～60分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内投与が含まれる。

【1487】

任意の好適な用量のTILが投与され得る。いくつかの実施形態では、特にがんがNSCLCまたは黒色腫である場合、約 2.3×10^{10} ～約 13.7×10^{10} のTILが投与され、平均約 7.8×10^{10} のTILである。いくつかの実施形態では、約 1.2×10^{10} ～約 4.3×10^{10} のTILが、投与される。いくつかの実施形態では、約 3×10^{10} ～約 12×10^{10} のTILが投与される。いくつかの実施形態では、約 4×10^{10} ～約 10×10^{10} のTILが投与される。いくつかの実施形態では、約 5×10^{10} ～約 8×10^{10} のTILが投与される。いくつかの実施形態では、約 6×10^{10} ～約 8×10^{10} のTILが投与される。いくつかの実施形態では、約 7×10^{10} ～約 8×10^{10} のTILが投与される。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 2.3×10^{10} ～約 13.7×10^{10} である。いくつかの実施形態では、特にがんが黒色腫である場合、治療上有効な投与量は、約 7.8×10^{10} のTILである。いくつかの実施形態では、特にがんがNSCLCである場合、治療上有効な投与量は、約 7.8×10^{10} のTILである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 1.2×10^{10} ～約 4.3×10^{10} のTILである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 3×10^{10} ～約 12×10^{10} のTILである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 4×10^{10} ～約 10×10^{10} のTILである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 5×10^{10} ～約 8×10^{10} のTILである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 6×10^{10} ～約 8×10^{10} のTILである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 7×10^{10} ～約 8×10^{10} のTILである。

【1488】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物に提供されるTILの数は、約 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、 9×10^{13} 、 1×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 、 9×10^{14} 、 1×10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 、 9×10^{15} 、 1×10^{16} 、 2×10^{16} 、 3×10^{16} 、 4×10^{16} 、 5×10^{16} 、 6×10^{16} 、 7×10^{16} 、 8×10^{16} 、 9×10^{16} 、 1×10^{17} 、 2×10^{17} 、 3×10^{17} 、 4×10^{17} 、 5×10^{17} 、 6×10^{17} 、 7×10^{17} 、 8×10^{17} 、 9×10^{17} 、 1×10^{18} 、 2×10^{18} 、 3×10^{18} 、 4×10^{18} 、 5×10^{18} 、 6×10^{18} 、 7×10^{18} 、 8×10^{18} 、 9×10^{18} 、 1×10^{19} 、 2×10^{19} 、 3×10^{19} 、 4×10^{19} 、 5×10^{19} 、 6×10^{19} 、 7×10^{19} 、 8×10^{19} 、 9×10^{19} 、 1×10^{20} 、 2×10^{20} 、 3×10^{20} 、 4×10^{20} 、 5×10^{20} 、 6×10^{20} 、 7×10^{20} 、 8×10^{20} 、 9×10^{20} 、 1×10^{21} 、 2×10^{21} 、 3×10^{21} 、 4×10^{21} 、 5×10^{21} 、 6×10^{21} 、 7×10^{21} 、 8×10^{21} 、 9×10^{21} 、 1×10^{22} 、 2×10^{22} 、 3×10^{22} 、 4×10^{22} 、 5×10^{22} 、 6×10^{22} 、 7×10^{22} 、 8×10^{22} 、 9×10^{22} 、 1×10^{23} 、 2×10^{23} 、 3×10^{23} 、 4×10^{23} 、 5×10^{23} 、 6×10^{23} 、 7×10^{23} 、 8×10^{23} 、 9×10^{23} 、 1×10^{24} 、 2×10^{24} 、 3×10^{24} 、 4×10^{24} 、 5×10^{24} 、 6×10^{24} 、 7×10^{24} 、 8×10^{24} 、 9×10^{24} 、 1×10^{25} 、 2×10^{25} 、 3×10^{25} 、 4×10^{25} 、 5×10^{25} 、 6×10^{25} 、 7×10^{25} 、 8×10^{25} 、 9×10^{25} 、 1×10^{26} 、 2×10^{26} 、 3×10^{26} 、 4×10^{26} 、 5×10^{26} 、 6×10^{26} 、 7×10^{26} 、 8×10^{26} 、 9×10^{26} 、 1×10^{27} 、 2×10^{27} 、 3×10^{27} 、 4×10^{27} 、 5×10^{27} 、 6×10^{27} 、 7×10^{27} 、 8×10^{27} 、 9×10^{27} 、 1×10^{28} 、 2×10^{28} 、 3×10^{28} 、 4×10^{28} 、 5×10^{28} 、 6×10^{28} 、 7×10^{28} 、 8×10^{28} 、 9×10^{28} 、 1×10^{29} 、 2×10^{29} 、 3×10^{29} 、 4×10^{29} 、 5×10^{29} 、 6×10^{29} 、 7×10^{29} 、 8×10^{29} 、 9×10^{29} 、 1×10^{30} 、 2×10^{30} 、 3×10^{30} 、 4×10^{30} 、 5×10^{30} 、 6×10^{30} 、 7×10^{30} 、 8×10^{30} 、 9×10^{30} 、 1×10^{31} 、 2×10^{31} 、 3×10^{31} 、 4×10^{31} 、 5×10^{31} 、 6×10^{31} 、 7×10^{31} 、 8×10^{31} 、 9×10^{31} 、 1×10^{32} 、 2×10^{32} 、 3×10^{32} 、 4×10^{32} 、 5×10^{32} 、 6×10^{32} 、 7×10^{32} 、 8×10^{32} 、 9×10^{32} 、 1×10^{33} 、 2×10^{33} 、 3×10^{33} 、 4×10^{33} 、 5×10^{33} 、 6×10^{33} 、 7×10^{33} 、 8×10^{33} 、 9×10^{33} 、 1×10^{34} 、 2×10^{34} 、 3×10^{34} 、 4×10^{34} 、 5×10^{34} 、 6×10^{34} 、 7×10^{34} 、 8×10^{34} 、 9×10^{34} 、 1×10^{35} 、 2×10^{35} 、 3×10^{35} 、 4×10^{35} 、 5×10^{35} 、 6×10^{35} 、 7×10^{35} 、 8×10^{35} 、 9×10^{35} 、 1×10^{36} 、 2×10^{36} 、 3×10^{36} 、 4×10^{36} 、 5×10^{36} 、 6×10^{36} 、 7×10^{36} 、 8×10^{36} 、 9×10^{36} 、 1×10^{37} 、 2×10^{37} 、 3×10^{37} 、 4×10^{37} 、 5×10^{37} 、 6×10^{37} 、 7×10^{37} 、 8×10^{37} 、 9×10^{37} 、 1×10^{38} 、 2×10^{38} 、 3×10^{38} 、 4×10^{38} 、 5×10^{38} 、 6×10^{38} 、 7×10^{38} 、 8×10^{38} 、 9×10^{38} 、 1×10^{39} 、 2×10^{39} 、 3×10^{39} 、 4×10^{39} 、 5×10^{39} 、 6×10^{39} 、 7×10^{39} 、 8×10^{39} 、 9×10^{39} 、 1×10^{40} 、 2×10^{40} 、 3×10^{40} 、 4×10^{40} 、 5×10^{40} 、 6×10^{40} 、 7×10^{40} 、 8×10^{40} 、 9×10^{40} 、 1×10^{41} 、 2×10^{41} 、 3×10^{41} 、 4×10^{41} 、 5×10^{41} 、 6×10^{41} 、 7×10^{41} 、 8×10^{41} 、 9×10^{41} 、 1×10^{42} 、 2×10^{42} 、 3×10^{42} 、 4×10^{42} 、 5×10^{42} 、 6×10^{42} 、 7×10^{42} 、 8×10^{42} 、 9×10^{42} 、 1×10^{43} 、 2×10^{43} 、 3×10^{43} 、 4×10^{43} 、 5×10^{43} 、 6×10^{43} 、 7×10^{43} 、 8×10^{43} 、 9×10^{43} 、 1×10^{44} 、 2×10^{44} 、 3×10^{44} 、 4×10^{44} 、 5×10^{44} 、 6×10^{44} 、 7×10^{44} 、 8×10^{44} 、 9×10^{44} 、 1×10^{45} 、 2×10^{45} 、 3×10^{45} 、 4×10^{45} 、 5×10^{45} 、 6×10^{45} 、 7×10^{45} 、 8×10^{45} 、 9×10^{45} 、 1×10^{46} 、 2×10^{46} 、 3×10^{46} 、 4×10^{46} 、 5×10^{46} 、 6×10^{46} 、 7×10^{46} 、 8×10^{46} 、 9×10^{46} 、 1×10^{47} 、 2×10^{47} 、 3×10^{47} 、 4×10^{47} 、 5×10^{47} 、 6×10^{47} 、 7×10^{47} 、 8×10^{47} 、 9×10^{47} 、 1×10^{48} 、 2×10^{48} 、 3×10^{48} 、 4×10^{48} 、 5×10^{48} 、 6×10^{48} 、 7×10^{48} 、 8×10^{48} 、 9×10^{48} 、 1×10^{49} 、 2×10^{49} 、 3×10^{49} 、 4×10^{49} 、 5×10^{49} 、 6×10^{49} 、 7×10^{49} 、 8×10^{49} 、 9×10^{49} 、 1×10^{50} 、 2×10^{50} 、 3×10^{50} 、 4×10^{50} 、 5×10^{50} 、 6×10^{50} 、 7×10^{50} 、 8×10^{50} 、 9×10^{50} 、 1×10^{51} 、 2×10^{51} 、 3×10^{51} 、 4×10^{51} 、 5×10^{51} 、 6×10^{51} 、 7×10^{51} 、 8×10^{51} 、 9×10^{51} 、 1×10^{52} 、 2×10^{52} 、 3×10^{52} 、 4×10^{52} 、 5×10^{52} 、 6×10^{52} 、 7×10^{52} 、 8×10^{52} 、 9×10^{52} 、 1×10^{53} 、 2×10^{53} 、 3×10^{53} 、 4×10^{53} 、 5×10^{53} 、 6×10^{53} 、 7×10^{53} 、 8×10^{53} 、 9×10^{53} 、 1×10^{54} 、 2×10^{54} 、 3×10^{54} 、 4×10^{54} 、 5×10^{54} 、 6×10^{54} 、 7×10^{54} 、 8×10^{54} 、 9×10^{54} 、 1×10^{55} 、 2×10^{55} 、 3×10^{55} 、 4×10^{55} 、 5×10^{55} 、 6×10^{55} 、 7×10^{55} 、 8×10^{55} 、 9×10^{55} 、 1×10^{56} 、 2×10^{56} 、 3×10^{56} 、 4×10^{56} 、 5×10^{56} 、 6×10^{56} 、 7×10^{56} 、 8×10^{56} 、 9×10^{56} 、 1×10^{57} 、 2×10^{57} 、 3×10^{57} 、 4×10^{57} 、 5×10^{57} 、 6×10^{57} 、 7×10^{57} 、 8×10^{57} 、 9×10^{57} 、 1×10^{58} 、 2×10^{58} 、 3×10^{58} 、 4×10^{58} 、 5×10^{58} 、 6×10^{58} 、 7×10^{58} 、 8×10^{58} 、 9×10^{58} 、 1×10^{59} 、 2×10^{59} 、 3×10^{59} 、 4×10^{59} 、 5×10^{59} 、 6×10^{59} 、 7×10^{59} 、 8×10^{59} 、 9×10^{59} 、 1×10^{60} 、 2×10^{60} 、 3×10^{60} 、 4×10^{60} 、 5×10^{60} 、 6×10^{60} 、 7×10^{60} 、 8×10^{60} 、 9×10^{60} 、 1×10^{61} 、 2×10^{61} 、 3×10^{61} 、 4×10^{61} 、 5×10^{61} 、 6×10^{61} 、 7×10^{61} 、 8×10^{61} 、 9×10^{61} 、 1×10^{62} 、 2×10^{62} 、 3×10^{62} 、 4×10^{62} 、 5×10^{62} 、 6×10^{62} 、 7×10^{62} 、 8×10^{62} 、 9×10^{62} 、 1×10^{63} 、 2×10^{63} 、 3×10^{63} 、 4×10^{63} 、 5×10^{63} 、 6×10^{63} 、 7×10^{63} 、 8×10^{63} 、 9×10^{63} 、 1×10^{64} 、 2×10^{64} 、 3×10^{64} 、 4×10^{64} 、 5×10^{64} 、 6×10^{64} 、 7×10^{64} 、 8×10^{64} 、 9×10^{64} 、 1×10^{65} 、 2×10^{65} 、 3×10^{65} 、 4×10^{65} 、 5×10^{65} 、 6×10^{65} 、 7×10^{65} 、 8×10^{65} 、 9×10^{65} 、 1×10^{66} 、 2×10^{66} 、 3×10^{66} 、 4×10^{66} 、 5×10^{66} 、 6×10^{66} 、 7×10^{66} 、 8×10^{66} 、 9×10^{66} 、 1×10^{67} 、 2×10^{67} 、 3×10^{67} 、 4×10^{67} 、 5×10^{67} 、 6×10^{67} 、 7×10^{67} 、 8×10^{67} 、 9×10^{67} 、 1×10^{68} 、 2×10^{68} 、 3×10^{68} 、 4×10^{68} 、 5×10^{68} 、 6×10^{68} 、 7×10^{68} 、 8×10^{68} 、 9×10^{68} 、 1×10^{69} 、 2×10^{69} 、 3×10^{69} 、 4×10^{69} 、 5×10^{69} 、 6×10^{69} 、 7×10^{69} 、 8×10^{69} 、 9×10^{69} 、 1×10^{70} 、 2×10^{70} 、 3×10^{70} 、 4×10^{70} 、 5×10^{70} 、 6×10^{70} 、 7×10^{70} 、 8×10^{70} 、 9×10^{70} 、 1×10^{71} 、 2×10^{71} 、 3×10^{71} 、 4×10^{71} 、 5×10^{71} 、 6×10^{71} 、 7×10^{71} 、 8×10^{71} 、 9×10^{71} 、 1×10^{72} 、 2×10^{72} 、 3×10^{72} 、 4×10^{72} 、 5×10^{72} 、 6×10^{72} 、 7×10^{72} 、 8×10^{72} 、 9×10^{72} 、 1×10^{73} 、 2×10^{73} 、 3×10^{73} 、 4×10^{73} 、 5×10^{73} 、 6×10^{73} 、 7×10^{73} 、 8×10^{73} 、 9×10^{73} 、 1×10^{74} 、 2×10^{74} 、 3×10^{74} 、 4×10^{74} 、 5×10^{74} 、 6×10^{74} 、 7×10^{74} 、 8×10^{74} 、 9×10^{74} 、 1×10^{75} 、 2×10^{75} 、 3×10^{75} 、 4×10^{75} 、 5×10^{75} 、 6×10^{75} 、 7×10^{75} 、 8×10^{75} 、 9×10^{75} 、 1×10^{76} 、 2×10^{76} 、 3×10^{76} 、 4×10^{76} 、 5×10^{76} 、 6×10^{76} 、 7×10^{76} 、 8×10^{76} 、 9×10^{76} 、 1×10^{77} 、 2×10^{77} 、 3×10^{77} 、 4×10^{77} 、 5×10^{77} 、 6×10^{77} 、 7×10^{77} 、 8×10^{77} 、 9×10^{77} 、 1×10^{78} 、 2×10^{78} 、 3×10^{78} 、 4×10^{78} 、 5×10^{78} 、 6×10^{78} 、 7×10^{78} 、 $8 \times 10^{78}</$

0^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、及び 9×10^{13} である。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供される TIL の数は、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 、及び $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ の範囲内である。

【1489】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供される TIL の濃度は、例えば、薬学的組成物の 100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%、または $0.0001\% w/w$ 、 w/v 、または v/v より小さい。

【1490】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供される TIL の濃度は、薬学的組成物の 90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19.75%、19.50%、19.25%、19%、18.75%、18.50%、18.25%、18%、17.75%、17.50%、17.25%、17%、16.75%、16.50%、16.25%、16%、15.75%、15.50%、15.25%、15%、14.75%、14.50%、14.25%、14%、13.75%、13.50%、13.25%、13%、12.75%、12.50%、12.25%、12%、11.75%、11.50%、11.25%、11%、10.75%、10.50%、10.25%、10%、9.75%、9.50%、9.25%、9%、8.75%、8.50%、8.25%、8%、7.75%、7.50%、7.25%、7%、6.75%、6.50%、6.25%、6%、5.75%、5.50%、5.25%、5%、4.75%、4.50%、4.25%、4%、3.75%、3.50%、3.25%、3%、2.75%、2.50%、2.25%、2%、1.75%、1.50%、1.25%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%、または $0.0001\% w/w$ 、 w/v 、または v/v より大きい。

【1491】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供される TIL の濃度は、薬学的組成物の約 0.0001%～約 50%、約 0.001%～約 40%、約 0.01%～約 30%、約 0.02%～約 29%、約 0.03%～約 28%、約 0.04%～約 27%、約 0.05%～約 26%、約 0.06%～約 25%、約 0.07%～約 24%、約 0.0

8%～約23%、約0.09%～約22%、約0.1%～約21%、約0.2%～約20%、約0.3%～約19%、約0.4%～約18%、約0.5%～約17%、約0.6%～約16%、約0.7%～約15%、約0.8%～約14%、約0.9%～約12%、または約1%～約10% w/w、w/v、またはv/vの範囲内である。

【1492】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるTILの濃度は、薬学的組成物の約0.001%～約10%、約0.01%～約5%、約0.02%～約4.5%、約0.03%～約4%、約0.04%～約3.5%、約0.05%～約3%、約0.06%～約2.5%、約0.07%～約2%、約0.08%～約1.5%、約0.09%～約1%、約0.1%～約0.9% w/w、w/v、またはv/vの範囲内である。

10

【1493】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるTILの量は、10g、9.5g、9.0g、8.5g、8.0g、7.5g、7.0g、6.5g、6.0g、5.5g、5.0g、4.5g、4.0g、3.5g、3.0g、2.5g、2.0g、1.5g、1.0g、0.95g、0.9g、0.85g、0.8g、0.75g、0.7g、0.65g、0.6g、0.55g、0.5g、0.45g、0.4g、0.35g、0.3g、0.25g、0.2g、0.15g、0.1g、0.09g、0.08g、0.07g、0.06g、0.05g、0.04g、0.03g、0.02g、0.01g、0.009g、0.008g、0.007g、0.006g、0.005g、0.004g、0.003g、0.002g、0.001g、0.0009g、0.0008g、0.0007g、0.0006g、0.0005g、0.0004g、0.0003g、0.0002g、または0.0001g以下である。

20

【1494】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるTILの量は、0.0001g、0.0002g、0.0003g、0.0004g、0.0005g、0.0006g、0.0007g、0.0008g、0.0009g、0.001g、0.0015g、0.002g、0.0025g、0.003g、0.0035g、0.004g、0.0045g、0.005g、0.0055g、0.006g、0.0065g、0.007g、0.0075g、0.008g、0.0085g、0.009g、0.0095g、0.01g、0.015g、0.02g、0.025g、0.03g、0.035g、0.04g、0.045g、0.05g、0.055g、0.06g、0.065g、0.07g、0.075g、0.08g、0.085g、0.09g、0.095g、0.1g、0.15g、0.2g、0.25g、0.3g、0.35g、0.4g、0.45g、0.5g、0.55g、0.6g、0.65g、0.7g、0.75g、0.8g、0.85g、0.9g、0.95g、1g、1.5g、2g、2.5g、3g、3.5g、4g、4.5g、5g、5.5g、6g、6.5g、7g、7.5g、8g、8.5g、9g、9.5g、または10gより大きい。

30

【1495】

本発明の薬学的組成物中に提供されるTILは、広い投与量範囲にわたって有効である。正確な投与量は、投与経路、化合物が投与される形態、治療される対象の性別及び年齢、治療される対象の体重、ならびに主治医の選好及び経験に依存するであろう。適切な場合、TILの臨床的に確立された投与量を使用される場合もある。TILの投与量などの本明細書の方法を使用して投与される薬学的組成物の量は、治療されるヒトまたは哺乳動物、障害または状態の重症度、投与速度、医薬品有効成分の性質、及び処方医師の裁量に依存するであろう。

40

【1496】

いくつかの実施形態では、TILは、単回用量で投与され得る。かかる投与は、注射、例えば、静脈内注射によるものであり得る。いくつかの実施形態では、TILは、複数回用量で投与され得る。投薬は、1年に1回、2回、3回、4回、5回、6回、または6回より多くてもよい。投薬は、月1回、2週間に1回、週1回、または隔日に1回であり得

50

る。T I L の投与は、必要な限り継続することができる。

【1497】

いくつかの実施形態では、T I L の有効用量は、約 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、及び 9×10^{13} である。いくつかの実施形態では、T I L の有効投与量は、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 、及び $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ の範囲内である。

【1498】

いくつかの実施形態では、T I L の有効な投与量は、約 0.01 mg/kg ～ 約 4.3 mg/kg 、約 0.15 mg/kg ～ 約 3.6 mg/kg 、約 0.3 mg/kg ～ 約 3.2 mg/kg 、約 0.35 mg/kg ～ 約 2.85 mg/kg 、約 0.15 mg/kg ～ 約 2.85 mg/kg 、約 0.3 mg/kg ～ 約 2.15 mg/kg 、約 0.45 mg/kg ～ 約 1.7 mg/kg 、約 0.15 mg/kg ～ 約 1.3 mg/kg 、約 0.3 mg/kg ～ 約 1.15 mg/kg 、約 0.45 mg/kg ～ 約 1 mg/kg 、約 0.55 mg/kg ～ 約 0.85 mg/kg 、約 0.65 mg/kg ～ 約 0.8 mg/kg 、約 0.7 mg/kg ～ 約 0.75 mg/kg 、約 0.7 mg/kg ～ 約 2.15 mg/kg 、約 0.85 mg/kg ～ 約 2 mg/kg 、約 1 mg/kg ～ 約 1.85 mg/kg 、約 1.15 mg/kg ～ 約 1.7 mg/kg 、約 1.3 mg/kg ～ 約 1.6 mg/kg 、約 1.35 mg/kg ～ 約 1.5 mg/kg 、約 2.15 mg/kg ～ 約 3.6 mg/kg 、約 2.3 mg/kg ～ 約 3.4 mg/kg 、約 2.4 mg/kg ～ 約 3.3 mg/kg 、約 2.6 mg/kg ～ 約 3.15 mg/kg 、約 2.7 mg/kg ～ 約 3 mg/kg 、約 2.8 mg/kg ～ 約 3 mg/kg 、または約 2.85 mg/kg ～ 約 2.95 mg/kg の範囲内である。

【1499】

いくつかの実施形態では、T I L の有効な投与量は、約 1 mg ～ 約 500 mg 、約 10 mg ～ 約 300 mg 、約 20 mg ～ 約 250 mg 、約 25 mg ～ 約 200 mg 、約 1 mg ～ 約 50 mg 、約 5 mg ～ 約 45 mg 、約 10 mg ～ 約 40 mg 、約 15 mg ～ 約 35 mg 、約 20 mg ～ 約 30 mg 、約 23 mg ～ 約 28 mg 、約 50 mg ～ 約 150 mg 、約 60 mg ～ 約 140 mg 、約 70 mg ～ 約 130 mg 、約 80 mg ～ 約 120 mg 、約 90 mg ～ 約 110 mg 、または約 95 mg ～ 約 105 mg 、約 98 mg ～ 約 102 mg 、約 150 mg ～ 約 250 mg 、約 160 mg ～ 約 240 mg 、約 170 mg ～ 約 230 mg 、約 180 mg ～ 約 220 mg 、約 190 mg ～ 約 210 mg 、約 195 mg ～ 約 205 mg 、または約 $198 \sim 207 \text{ mg}$ の範囲内である。

【1500】

T I L の有効量は、鼻腔内経路及び経皮経路を含む、同様の有用性を有する薬剤の認められた投与様式のうちのいずれかによって、動脈内注射によって、静脈内、腹腔内、非経口、筋肉内、皮下、局所、移植によって、または吸入によって、単回用量または複数回用

量のいずれかで投与され得る。

【1501】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的TIL集団を含む注入バッグを提供する。

【1502】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的TIL集団及び薬学的に許容される担体を含む腫瘍浸潤リンパ球（TIL）組成物を提供する。

【1503】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載のTIL組成物を含む注入バッグを提供する。

【1504】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的TIL集団の凍結保存された調製物を提供する。

【1505】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的TIL集団及び凍結保存培地を含む腫瘍浸潤リンパ球（TIL）組成物を提供する。

【1506】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地がDMSOを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のTIL組成物を提供する。

【1507】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地が7～10%のDMSOを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のTIL組成物を提供する。

【1508】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載のTIL組成物の凍結保存された調製物を提供する。

【1509】

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

【1510】

任意の好適な用量のTILが投与され得る。いくつかの実施形態では、特にがんがNSCLCである場合、約 2.3×10^{10} ～約 13.7×10^{10} のTILが投与され、平均約 7.8×10^{10} のTILである。いくつかの実施形態では、約 1.2×10^{10} ～約 4.3×10^{10} のTILが投与される。いくつかの実施形態では、約 3×10^{10} ～約 12×10^{10} のTILが投与される。いくつかの実施形態では、約 4×10^{10} ～約 10×10^{10} のTILが投与される。いくつかの実施形態では、約 5×10^{10} ～約 8×10^{10} のTILが投与される。いくつかの実施形態では、約 6×10^{10} ～約 8×10^{10} のTILが投与される。いくつかの実施形態では、約 7×10^{10} ～約 8×10^{10} のTILが投与される。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 2.3×10^{10} ～約 13.7×10^{10} である。いくつかの実施形態では、特にがんがNSCLCである場合、治療上有効な投与量は、約 7.8×10^{10} のTILである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 1.2×10^{10} ～約 4.3×10^{10} のTILである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 3×10^{10} ～約 12×10^{10} のTILである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 4×10^{10} ～約 10×10^{10} のTILである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 5×10^{10} ～約 8×10^{10} のTILである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 6×10^{10} ～約 8×10^{10} のTILである。いくつかの実施形

10

20

30

40

50

態では、治療上有効な投与量は、約 7×10^{10} ～ 約 8×10^{10} の T I L である。

【1511】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物に提供される T I L の数は、約 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、及び 9×10^{13} である。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供される T I L の数は、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 、及び $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ の範囲内である。

10

20

【1512】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供される T I L の濃度は、例えば、薬学的組成物の 100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%、または 0.0001% w/w、w/v、または v/v より小さい。

30

【1513】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供される T I L の濃度は、薬学的組成物の 90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19.75%、19.50%、19.25%、19%、18.75%、18.50%、18.25%、18%、17.75%、17.50%、17.25%、17%、16.75%、16.50%、16.25%、16%、15.75%、15.50%、15.25%、15%、14.75%、14.50%、14.25%、14%、13.75%、13.50%、13.25%、13%、12.75%、12.50%、12.25%、12%、11.75%、11.50%、11.25%、11%、10.75%、10.50%、10.25%、10%、9.75%、9.50%、9.25%、9%、8.75%、8.50%、8.25%、8%、7.75%、7.50%、7.25%、7%、6.75%、6.50%、6.25%、6%、5.75%、5.50%、5.25%、5%、4.75%、4.50%、4.25%、4%、3.75%、3.50%、3.25%、3%、2.75%、2.50%、2.25%、2%、1.75%、1.50%、1.25%、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%

40

50

、または0.0001%w/w、w/v、またはv/vより大きい。

【1514】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるTILの濃度は、薬学的組成物の約0.0001%~約50%、約0.001%~約40%、約0.01%~約30%、約0.02%~約29%、約0.03%~約28%、約0.04%~約27%、約0.05%~約26%、約0.06%~約25%、約0.07%~約24%、約0.08%~約23%、約0.09%~約22%、約0.1%~約21%、約0.2%~約20%、約0.3%~約19%、約0.4%~約18%、約0.5%~約17%、約0.6%~約16%、約0.7%~約15%、約0.8%~約14%、約0.9%~約12%、または約1%~約10%w/w、w/v、またはv/vの範囲内である。

10

【1515】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるTILの濃度は、薬学的組成物の約0.001%~約10%、約0.01%~約5%、約0.02%~約4.5%、約0.03%~約4%、約0.04%~約3.5%、約0.05%~約3%、約0.06%~約2.5%、約0.07%~約2%、約0.08%~約1.5%、約0.09%~約1%、約0.1%~約0.9%w/w、w/v、またはv/vの範囲内である。

【1516】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるTILの量は、10g、9.5g、9.0g、8.5g、8.0g、7.5g、7.0g、6.5g、6.0g、5.5g、5.0g、4.5g、4.0g、3.5g、3.0g、2.5g、2.0g、1.5g、1.0g、0.95g、0.9g、0.85g、0.8g、0.75g、0.7g、0.65g、0.6g、0.55g、0.5g、0.45g、0.4g、0.35g、0.3g、0.25g、0.2g、0.15g、0.1g、0.09g、0.08g、0.07g、0.06g、0.05g、0.04g、0.03g、0.02g、0.01g、0.009g、0.008g、0.007g、0.006g、0.005g、0.004g、0.003g、0.002g、0.001g、0.0009g、0.0008g、0.0007g、0.0006g、0.0005g、0.0004g、0.0003g、0.0002g、または0.0001g以下である。

20

【1517】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるTILの量は、0.0001g、0.0002g、0.0003g、0.0004g、0.0005g、0.0006g、0.0007g、0.0008g、0.0009g、0.001g、0.0015g、0.002g、0.0025g、0.003g、0.0035g、0.004g、0.0045g、0.005g、0.0055g、0.006g、0.0065g、0.007g、0.0075g、0.008g、0.0085g、0.009g、0.0095g、0.01g、0.015g、0.02g、0.025g、0.03g、0.035g、0.04g、0.045g、0.05g、0.055g、0.06g、0.065g、0.07g、0.075g、0.08g、0.085g、0.09g、0.095g、0.1g、0.15g、0.2g、0.25g、0.3g、0.35g、0.4g、0.45g、0.5g、0.55g、0.6g、0.65g、0.7g、0.75g、0.8g、0.85g、0.9g、0.95g、1g、1.5g、2g、2.5g、3g、3.5g、4g、4.5g、5g、5.5g、6g、6.5g、7g、7.5g、8g、8.5g、9g、9.5g、または10gより大きい。

30

40

【1518】

本発明の薬学的組成物中に提供されるTILは、広い投与量範囲にわたって有効である。正確な投与量は、投与経路、化合物が投与される形態、治療される対象の性別及び年齢、治療される対象の体重、ならびに主治医の選好及び経験に依存するであろう。適切な場合、TILの臨床的に確立された投与量が使用される場合もある。TILの投与量などの本明細書の方法を使用して投与される薬学的組成物の量は、治療されるヒトまたは哺乳動物、障害または状態の重症度、投与速度、医薬品有効成分の性質、及び処方医師の裁量に

50

依存するであろう。

【1519】

いくつかの実施形態では、TILは、単回用量で投与され得る。かかる投与は、注射、例えば、静脈内注射によるものであり得る。いくつかの実施形態では、TILは、複数回用量で投与され得る。投薬は、1年に1回、2回、3回、4回、5回、6回、または6回より多くてもよい。投薬は、月1回、2週間に1回、週1回、または隔日に1回であり得る。TILの投与は、必要な限り継続することができる。

【1520】

いくつかの実施形態では、TILの有効な投与量は、約 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、及び 9×10^{13} である。いくつかの実施形態では、TILの有効な投与量は、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 、及び $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ の範囲内である。

【1521】

いくつかの実施形態では、TILの有効な投与量は、約 0.01 mg/kg ～約 4.3 mg/kg 、約 0.15 mg/kg ～約 3.6 mg/kg 、約 0.3 mg/kg ～約 3.2 mg/kg 、約 0.35 mg/kg ～約 2.85 mg/kg 、約 0.15 mg/kg ～約 2.85 mg/kg 、約 0.3 mg/kg ～約 2.15 mg/kg 、約 0.45 mg/kg ～約 1.7 mg/kg 、約 0.15 mg/kg ～約 1.3 mg/kg 、約 0.3 mg/kg ～約 1.15 mg/kg 、約 0.45 mg/kg ～約 1 mg/kg 、約 0.55 mg/kg ～約 0.85 mg/kg 、約 0.65 mg/kg ～約 0.8 mg/kg 、約 0.7 mg/kg ～約 0.75 mg/kg 、約 0.7 mg/kg ～約 2.15 mg/kg 、約 0.85 mg/kg ～約 2 mg/kg 、約 1 mg/kg ～約 1.85 mg/kg 、約 1.15 mg/kg ～約 1.7 mg/kg 、約 1.3 mg/kg ～約 1.6 mg/kg 、約 1.35 mg/kg ～約 1.5 mg/kg 、約 2.15 mg/kg ～約 3.6 mg/kg 、約 2.3 mg/kg ～約 3.4 mg/kg 、約 2.4 mg/kg ～約 3.3 mg/kg 、約 2.6 mg/kg ～約 3.15 mg/kg 、約 2.7 mg/kg ～約 3 mg/kg 、約 2.8 mg/kg ～約 3 mg/kg 、または約 2.85 mg/kg ～約 2.95 mg/kg の範囲内である。

【1522】

いくつかの実施形態では、TILの有効な投与量は、約 1 mg ～約 500 mg 、約 10 mg ～約 300 mg 、約 20 mg ～約 250 mg 、約 25 mg ～約 200 mg 、約 1 mg ～約 50 mg 、約 5 mg ～約 45 mg 、約 10 mg ～約 40 mg 、約 15 mg ～約 35 mg 、約 20 mg ～約 30 mg 、約 23 mg ～約 28 mg 、約 50 mg ～約 150 mg 、約 60 mg ～約 140 mg 、約 70 mg ～約 130 mg 、約 80 mg ～約 120 mg 、約 90 mg ～約 110 mg 、または約 95 mg ～約 105 mg 、約 98 mg ～約 102 mg 、約 150 mg ～約 250 mg 、約 160 mg ～約 240 mg 、約 170 mg ～約 230 mg

g、約180mg～約220mg、約190mg～約210mg、約195mg～約205mg、または約198～約207mgの範囲内である。

【1523】

TILの有効量は、鼻腔内経路及び経皮経路を含む、同様の有用性を有する薬剤の認められた投与様式のうちのいずれかによって、動脈内注射によって、静脈内、腹腔内、非経口、筋肉内、皮下、局所、移植によって、または吸入によって、単回用量または複数回用量のいずれかで投与され得る。

【1524】

VI. 患者を治療する方法

治療方法は、最初のTIL収集及びTILの培養から始まる。かかる方法は両方とも、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35 (3): 283-292によって当該技術分野で説明されている。治療方法の実施形態は、実施例を含む以下の節全体に記載されている。

【1525】

本明細書に記載の方法に従って、例えば、上記のステップA～Fに記載されるように、または上記のステップA～Fに従って（また例えば、図1及びまたは図8に示されるように）生成される拡大TILは、がんを有する患者の治療における特定の用途を見出す（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Goff, et al., J. Clinical Oncology, 2016, 34 (20): 2389-2399、及び補足内容に記載される）。いくつかの実施形態では、TILは、以前に記載されたように、転移性黒色腫の切除された沈着物から成長させた（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Dudley, et al., J. Immunother., 2003, 26: 332-342を参照されたい）。新鮮な腫瘍は、滅菌条件下で解剖され得る。代表的な試料は、正式な病理学的分析のために収集され得る。2mm³～3mm³の単一断片が使用され得る。いくつかの実施形態では、患者当たり5、10、15、20、25、または30個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり20、25、または30個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり20、22、24、26、または28個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり24個の試料が取得される。試料は、24ウェルプレートの個々のウェルに入れ、高用量IL-2（6,000 IU/mL）を含む成長培地中で維持し、腫瘍の破壊及び／またはTILの増殖をモニターすることができる。処理後に生細胞が残っている腫瘍は、本明細書に記載されるように、単一細胞懸濁液中に酵素的に消化され、凍結保存され得る。

【1526】

いくつかの実施形態では、成功裏に成長したTILは、表現型分析（CD3、CD4、CD8、及びCD56）のためにサンプリングされ、利用可能な場合、自己腫瘍に対して試験され得る。一晚の共培養によりインターフェロンガンマ（IFN-γ）レベルが200pg/mLを超え、バックグラウンドの2倍になった場合、TILは反応性があるとみなされ得る。（Goff, et al., J. Immunother., 2010, 33: 840-847、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態では、自己反応性または十分な成長パターンの証拠を有する培養物は、急速拡大（REP）と称されることもある第2の拡大を含む、第2の拡大（例えば、図1及び／または図8のステップDに従って提供される第2の拡大）のために選択され得る。いくつかの実施形態では、高い自己反応性（例えば、第2の拡大中の高い増殖）を有する拡大TILが、追加の第2の拡大のために選択される。いくつかの実施形態では、高い自己反応性（例えば、図1及び／または図8のステップDで提供されるような第2の拡大中の高い拡大）を有するTILが、図1及び／または図8のステップDに従って、追加の第2の拡大のために選択される。

【1527】

注入バッグTILの凍結保存試料の細胞表現型は、表面マーカーCD3、CD4、CD

10

20

30

40

50

8、CCR7、及びCD45RA (BD Biosciences) のフローサイトメトリ（例えば、FlowJo）、ならびに本明細書に記載の方法のうちのいずれかによって分析され得る。血清サイトカインは、標準的な酵素結合免疫吸着アッセイ技術を使用することにより測定された。血清IFN- γ の上昇は、100 pg/mLを超え、かつ43ベースラインレベルを超えると定義された。

【1528】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図1及び／または図8に例示される方法によって生成されるTILは、TILの臨床効果の驚くべき改善を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図1及び／または図8に例示される方法によって生成されるTILは、例えば、図1及び／または図8に例示されるもの以外の方法を含む、本明細書に記載されるもの以外の方法によって生成されるTILと比較して、増加した臨床効果を示す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるもの以外の方法は、プロセス1C及び／または第1世代 (Gen 1) と称される方法を含む。いくつかの実施形態では、増加した有効性は、DCR、ORR、及び／または他の臨床応答によって測定される。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図1に例示される方法によって生成されるTILは、例えば、図1及び／または図8に例示されるもの以外の方法を含む、本明細書に記載されるもの以外の方法によって生成されるTILと比較して、同様の応答時間及び安全性プロファイルを示す。

【1529】

いくつかの実施形態では、IFN- γ (IFN- γ) は、治療有効性及び／または増加した臨床的有效性を示す。いくつかの実施形態では、TILで治療された対象の血液中のIFN- γ は、活性なTILを示す。いくつかの実施形態では、IFN- γ 生成の効力アッセイが用いられる。IFN- γ 生成は、細胞傷害能の別の尺度である。IFN- γ 生成は、例えば、図1及び／または図8に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたTILで治療された対象のエクスピボでの血液、血清、またはTIL中のサイトカインIFN- γ のレベルを決定することによって測定することができる。いくつかの実施形態では、IFN- γ の増加は、本発明の方法によって生成されるTILで治療された患者における治療有効性を示す。いくつかの実施形態では、IFN- γ は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、IFN- γ が1倍、2倍、3倍、4倍、または5倍以上増加する。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、1倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、2倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、3倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、4倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、5倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- γ は、Quantikine ELISAキットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、IFN- γ は、例えば、図1及び／または図8に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたTILで治療された対象のエクスピボでのTILにおいて測定される。いくつかの実施形態で

は、 $\text{IFN-}\gamma$ は、例えば図 1 及び／または図 8 に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製された TIL で治療された対象の血液において測定される。いくつかの実施形態では、 $\text{IFN-}\gamma$ は、例えば、図 1 及び／または図 8 に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製された TIL で治療された対象の TIL 血清において測定される。いくつかの実施形態では、 $\text{IFN-}\gamma$ ($\text{IFN-}\gamma$) は、がんの治療における治療有効性及び／または増加した臨床的有效性を示す。

【1530】

いくつかの実施形態では、例えば図 1 に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製された TIL。いくつかの実施形態では、 $\text{IFN-}\gamma$ ($\text{IFN-}\gamma$) は、治療有効性及び／または臨床的有效性の増加を示す。いくつかの実施形態では、TIL で治療された対象の血液中の $\text{IFN-}\gamma$ は、活性な TIL を示す。いくつかの実施形態では、 $\text{IFN-}\gamma$ 生成の効力アッセイが用いられる。 $\text{IFN-}\gamma$ 生成は、細胞傷害能の別の尺度である。 $\text{IFN-}\gamma$ 生成は、例えば、図 1 及び／または図 8 に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製された TIL で治療された対象のエキスピボでの血液、血清、または TIL 中のサイトカイン $\text{IFN-}\gamma$ のレベルを決定することによって測定することができる。いくつかの実施形態では、 $\text{IFN-}\gamma$ の増加は、本発明の方法によって生成される TIL で治療された患者における治療有効性を示す。いくつかの実施形態では、 $\text{IFN-}\gamma$ は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図 1 及び／または図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された TIL で治療された患者と比較して、 $\text{IFN-}\gamma$ が 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、または 5 倍以上増加する。

【1531】

いくつかの実施形態では、例えば図 1 及び／または図 8 に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製される TIL は、例えばプロセス 1C 法と称される方法を含む、図 1 及び／または図 8 に例示されていないものを含む他の方法によって生成される TIL と比較して、増加したポリクローン性を示す。いくつかの実施形態では、有意に改善されたポリクローン性及び／または増加したポリクローン性は、治療有効性及び／または増加した臨床的有效性を示す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、T 細胞レパートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性の増加は、本発明の方法によって生成された TIL の投与に関する治療有効性を示すことができる。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、例えば、図 1 及び／または図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された TIL と比較して、1 倍、2 倍、10 倍、100 倍、500 倍、または 1000 倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図 1 及び／または図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された TIL で治療された患者と比較して、1 倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図 1 及び／または図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された TIL で治療された患者と比較して、2 倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図 1 及び／または図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された TIL で治療された患者と比較して、10 倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図 1 及び／または図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された TIL で治療された患者と比較して、100 倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図 1 及び／または図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された TIL で治療された患者と比較して、500 倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図 1 及び／または図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む

、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された T I L で治療された患者と比較して、1 0 0 0 倍増加する。

【1 5 3 2】

有効性の尺度には、当該技術分野で知られており、本明細書にも記載されている、疾患制御率（D C R）及び全応答率（O R R）が含まれ得る。

【1 5 3 3】

A．がんを治療する方法

本明細書に記載の組成物及び方法は、疾患を治療するための方法で使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法は、成人患者または小児患者における、がんなどの過剰増殖性障害の治療に使用するためのものである。本明細書に記載の組成物及び方法は、本明細書及び以下の段落に記載される他の障害の治療にも使用され得る。

【1 5 3 4】

いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、がんである。いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、固形腫瘍癌である。いくつかの実施形態では、固形腫瘍癌は、肛門癌、膀胱癌、乳癌（トリプルネガティブ乳癌を含む）、骨癌、ヒト乳頭腫ウイルス（H P V）によって引き起こされるがん、中枢神経系関連癌（上衣腫、髄芽細胞腫、神経芽細胞腫、松果芽細胞腫、及び原始神経外胚腫瘍を含む）、子宮頸癌（扁平上皮細胞子宮頸癌、腺扁平上皮子宮頸癌、及び子宮頸部腺癌を含む）、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、食道胃接合部癌、胃癌、胃腸癌、胃腸間質腫瘍、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（H N S C C）、下咽頭癌、喉頭癌、鼻咽頭癌、中咽頭癌、及び咽頭癌を含む）、腎癌、肝癌、肺癌（非小細胞肺癌（N S C L C）及び小細胞肺癌を含む）、黒色腫（ブドウ膜黒色腫、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫を含む）、中皮腫（悪性胸膜中皮腫を含む）、卵巣癌、膵臓癌（膵管腺癌を含む）、陰茎癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉腫（ユーイング肉腫、骨肉腫、横紋筋肉腫、及び他の骨及び軟部組織の肉腫を含む）、甲状腺癌（未分化甲状腺癌を含む）、子宮癌、及び腫瘍からなる群から選択される。

【1 5 3 5】

いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、慢性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、及び多発性骨髄腫からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、血液悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、本発明は、1 つ以上の C C R を発現するように修飾された T I L、M I L、または P B L を使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、本発明は、1 つ以上の C C R を発現するように修飾された M I L または P B L を使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。

【1 5 3 6】

いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、または免疫療法を含む少なくとも 1 つの以前の療法による治療に対して再発するか、または不応性である、固形腫瘍癌及び血液学的悪性腫瘍を含む、前述のがんのうちの 1 つである。いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、及び／または免疫療法を含む少なくとも 2 つの以前の療法による治療に対して再発するか、または不応性である、前述のがんのうちの 1 つである。いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、及び／または免疫療法を含む少なくとも 3 つの以前の療法による治療に対して再発するか、または不応性である前述のがんのうちの 1 つである。

【1 5 3 7】

いくつかの実施形態では、がんは、高頻度マイクロサテライト不安定性（M S I - H）またはミスマッチ修復機能欠損（d M M R）がんである。したがって、M S I - H 及び d

10

20

30

40

50

MMRがん及び試験は、Kawakami, et al., Curr. Treat. Options Oncol. 2015, 16, 30に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【1538】

いくつかの実施形態では、本発明は、1つ以上のCCRを発現するように修飾されたTIL、MIL、またはPBLを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、ヒトである。いくつかの実施形態では、本発明は、1つ以上のCCRを発現するように修飾されたTIL、MIL、またはPBLを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、非ヒトである。いくつかの実施形態では、本発明は、1つ以上のCCRを発現するように修飾されたTIL、MIL、またはPBLを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、コンパニオンアニマルである。

10

【1539】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、KRAS阻害剤による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、AMG-510（ソトラシブ）、AMG-510ラセミ体（ソトラシブラセミ体）、MRTX849（アダグラシブ）、JNJ-74699157/ARS-3248、JDQ443、LY3499446、LY3537982、RLY-1971/GDC-6036、BBP-454、BI 1701963、BI 1823911、mRNA-5671/V941、D-1553、BI-2852、BI-3406、ARS-1620、BAY-293、MRTX-1257、PROTAC K-Ras Degradер-1、LC-2、ARS-853、ARS-1323、ARS-1323-アルキン、ARS-1630、K-Ras G12C-IN-2、KRAS阻害剤-6、KRAS阻害剤8、KRAS阻害剤7、KRAS G12C阻害剤15、KRAS G12C阻害剤5、KRAS G12C阻害剤13、KRAS G12C阻害剤17、KRAS G12C阻害剤16、KRAS G12C阻害剤14、KRas G12C阻害剤4、KRas G12C阻害剤1、KRas G12C阻害剤3、KRas G12C阻害剤2、6H05、SAH-SOS1A TFA、KRAS阻害剤10、SAH-SOS1A、アトロバスタチン-PEG3-FITC、C6ME、CS-0115617、HY-130260、HY-135864、HY-135866、Cmpd2、CS-0115618、CS-0115620、EX-A4387、CS-0106134、HY-135865、2241719-75-3、HY-125873、CS-0046138、CS-0046137、CS-0101474、HY-125875、CS-0102608、CS-0102610、CS-0102606、HY-112493、CS-0046139、1-{4-[6-クロロ-8-フルオロ-7-(5-メチル-1H-インダゾール-4-イル)キナゾリン-4-イル]ピペラジン-1-イル}プロパン-1-オン、HY-126292、HY-112491、CS-0046136、HY-114168、HY-125874、HY-112494、CS-0102607、BCP29475 | 2206735-61-5、HY-112492、CS-0078097、2158296-45-6、HY-125872、及び2158297-63-1、ならびにそれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される、KRAS阻害剤による治療に対して不応性である。

20

30

40

【1540】

いくつかの実施形態では、KRAS阻害剤は、AMG-510（ソトラシブ）、AMG-510ラセミ体（ソトラシブラセミ体）、及びMRTX849（アダグラシブ）、JNJ-74699157/ARS-3248、JDQ443、LY3499446、LY3537982、RLY-1971/GDC-6036、BBP-454、BI 1701963、BI 1823911、mRNA-5671/V941、D-1553、ならびにそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択される。

【1541】

いくつかの実施形態では、KRAS阻害剤は、AMG-510（ソトラシブ）である。

50

いくつかの実施形態では、K R A S 阻害剤は、A M G - 5 1 0 ラセミ体（ソトラシブラセミ体）である。いくつかの実施形態では、K R A S 阻害剤は、M R T X 8 4 9（アダグラシブ）である。いくつかの実施形態では、K R A S 阻害剤は、J N J - 7 4 6 9 9 1 5 7 / A R S - 3 2 4 8 である。いくつかの実施形態では、K R A S 阻害剤は、J D Q 4 4 3 である。いくつかの実施形態では、K R A S 阻害剤は、L Y 3 4 9 9 4 4 6 である。いくつかの実施形態では、K R A S 阻害剤は、L Y 3 5 3 7 9 8 2 である。いくつかの実施形態では、K R A S 阻害剤は、R L Y - 1 9 7 1 / G D C - 6 0 3 6 である。いくつかの実施形態では、K R A S 阻害剤は、B B P - 4 5 4 である。いくつかの実施形態では、K R A S 阻害剤は、B I 1 7 0 1 9 6 3 である。いくつかの実施形態では、K R A S 阻害剤は、B I 1 8 2 3 9 1 1 である。いくつかの実施形態では、K R A S 阻害剤は、m R N A - 5 6 7 1 / V 9 4 1 である。いくつかの実施形態では、K R A S 阻害剤は、D - 1 5 5 3 である。

10

【1542】

いくつかの実施形態では、がんの治療を必要とするがん患者は、本明細書に提供される T I L 及び少なくとも1つの K R A S 阻害剤の両方で治療される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤は、T I L と同時に患者に投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤及び T I L は、連続的に投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤は、T I L の投与前に投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤は、T I L の投与後に投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤は、T I L の投与の前後に投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤の投与は、T I L の投与後に維持される。

20

【1543】

いくつかの実施形態では、T I L の投与前に、がん患者は、少なくとも1つの K R A S 阻害剤で治療されている。いくつかの実施形態では、がん患者は、腫瘍収縮の前に少なくとも1つの K R A S 阻害剤で治療されている。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤は、患者からの腫瘍の切除前に投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤は、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者から腫瘍試料を取得するための他の手段の前に投与される。

30

【1544】

いくつかの実施形態では、患者は、少なくとも1つの K R A S 阻害剤による前治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、患者は、少なくとも1つの K R A S 阻害剤による前治療に応答する。

【1545】

いくつかの実施形態では、本明細書中提供される少なくとも1つの K R A S 阻害剤は、1日約100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、1,000mg、1,100mg、1,200mg、1,300mg、1,400mg、1,500mg、1,600mg、1,700mg、1,800mg、1,900mg、または2,000mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤は、1日約100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、1,000mg、1,100mg、1,200mg、1,300mg、1,400mg、1,500mg、1,600mg、1,700mg、1,800mg、1,900mg、または2,000mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤は、1日1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10回投与される。例示的な実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤は、約960mgの投与量で投与される。例示的な実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤は、600mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、

40

50

本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、小児癌である。

【1546】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ブドウ膜黒色腫である。

【1547】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、ブドウ膜黒色腫は、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫である。

【1548】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児癌は、神経芽腫である。

【1549】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児癌は、肉腫である。

【1550】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、肉腫は、骨肉腫である。

【1551】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、肉腫は、軟部組織肉腫である。

【1552】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、軟部組織肉腫は、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、または未分化神経外胚葉性腫瘍（PNET）である。

【1553】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児癌は、中枢神経系（CNS）関連がんである。いくつかの実施形態では、小児癌は、化学療法による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、小児癌は、放射線療法による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、小児癌は、ジヌツキシマブによる治療に対して不応性である。

【1554】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、CNS関連がんは、髄芽腫、松果芽腫、神経膠腫、上衣腫、または神経膠芽細胞腫である。

【1555】

本明細書に記載の組成物及び方法は、がんを治療するための方法において使用することができ、がんは、抗PD-1または抗PD-L1抗体による治療に対して不応性であるか、または抗PD-1または抗PD-L1抗体による治療に対する前治療に対して耐性である。いくつかの実施形態では、患者は、抗PD-1または抗PD-L1抗体に対する一次不応性患者である。いくつかの実施形態では、患者は、抗PD-1または抗PD-L1抗体に対する事前の応答を示さない。いくつかの実施形態では、患者は、抗PD-1または抗PD-L1抗体に対する事前の応答を示し、その後患者のがんの進行が続く。いくつかの実施形態では、がんは、少なくとも1つの化学療法剤と組み合わせた抗CTLA-4抗体及び／または抗PD-1もしくは抗PD-L1抗体に対して不応性である。いくつかの実施形態では、以前の化学療法剤は、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、及び／またはシスプラチンである。いくつかの以前の実施形態では、化学療法剤（複数可）は、白金ダブレット化学療法剤である。いくつかの実施形態では、白金ダブレット療法は、シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第1の化学療法剤と、ビンORELビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはナブ-パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第2の化学療法剤と、を含む。いくつかの実施形態では、白金ダブレット化学療法剤は、ペメトレキセドと組み合わされている。

10

20

30

40

50

【1556】

いくつかの実施形態では、NSCLCは、PD-L1陰性であり、及び／または本明細書の他の場所に記載されるように、＜1%の腫瘍割合スコア（TPS）でPD-L1を発現するがんを有する患者からのものである。

【1557】

いくつかの実施形態では、NSCLCは、抗PD-1または抗PD-L1及び白金ダブルット療法を含む併用療法に対して不応性であり、白金ダブルット療法は、

- i) シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第1の化学療法剤と、
- ii) ビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはnab-パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第2の化学療法剤と、を含む。

10

【1558】

いくつかの実施形態では、NSCLCは、抗PD-1または抗PD-L1抗体、ペメトレキセド、及び白金ダブルット療法を含む併用療法に対して不応性であり、白金ダブルット療法は、

- i) シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第1の化学療法剤と、
- ii) ビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはnab-パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第2の化学療法剤と、を含む。

【1559】

いくつかの実施形態では、NSCLCは、抗PD-1抗体で治療されている。いくつかの実施形態では、NSCLCは、抗PD-L1抗体で処理されている。いくつかの実施形態では、NSCLC患者は、治療ナীবである。いくつかの実施形態では、NSCLCは、抗PD-1抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、NSCLCは、抗PD-L1抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、NSCLCは、以前に化学療法剤で治療されている。いくつかの実施形態では、NSCLCは、以前に化学療法剤で治療されているが、もはや化学療法剤で治療されていない。いくつかの実施形態では、NSCLC患者は、抗PD-1／PD-L1ナীবである。いくつかの実施形態では、NSCLC患者は、低いPD-L1の発現を有する。いくつかの実施形態では、NSCLC患者は、治療ナীবのNSCLCを有するか、または化学療法治療後であるが、抗PD-1／PD-L1ナীবである。いくつかの実施形態では、NSCLC患者は、治療ナীবであるか、または化学療法治療後であるが、抗PD-1／PD-L1ナীবであり、低いPD-L1の発現を有する。いくつかの実施形態では、NSCLC患者は、ベースラインで巨大腫瘍病変を有する。いくつかの実施形態では、対象は、ベースラインで巨大腫瘍病変を有し、低いPD-L1の発現を有する。いくつかの実施形態では、NSCLC患者は、検出可能なPD-L1の発現を有しない。いくつかの実施形態では、NSCLC患者は、治療ナীবであるか、または化学療法治療後であるが、抗PD-1／PD-L1ナীবであり、検出可能なPD-L1の発現を有しない。いくつかの実施形態では、患者は、ベースラインで巨大腫瘍病変を有し、検出可能なPD-L1の発現を有しない。いくつかの実施形態では、NSCLC患者は、治療ナীবのNSCLCまたは化学療法後（例えば、化学療法剤後）であるが、PD-L1の発現が低く、及び／またはベースラインで巨大腫瘍病変を有する抗PD-1／PD-L1ナীবである。いくつかの実施形態では、最大腫瘍直径が横方向または冠状面のいずれかで測定された7cmより大きい場合、巨大腫瘍病変が示される。いくつかの実施形態では、巨大腫瘍病変は、20mm以上の短軸直径を有する腫れたリンパ節がある場合に示される。いくつかの実施形態では、化学療法剤は、NSCLCの標準治療の治療薬を含む。

20

30

40

【1560】

いくつかの実施形態では、PD-L1発現は、腫瘍割合スコアによって決定される。いくつかの実施形態では、不応性NSCLC腫瘍を有する対象は、＜1%の腫瘍割合スコア（TPS）を有する。いくつかの実施形態では、不応性NSCLC腫瘍を有する対象は、

50

≥ 1 % T P S を有する。いくつかの実施形態では、不応性 N S C L C を有する対象は、抗 P D - 1 及び／または抗 P D - L 1 抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、当該抗 P D - 1 及び／または抗 P D - L 1 抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性 N S C L C を有する対象は、抗 P D - L 1 抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、当該抗 P D - L 1 抗体治療の前に決定された。

【 1 5 6 1 】

いくつかの実施形態では、例えば、図 1 または図 8 に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製される T I L は、例えば、プロセス 1 C 法と称される方法などの、図 1 または図 8 に例示されていないものを含む他の方法によって生成される T I L と比較して、増加したポリクローン性を示す。いくつかの実施形態では、有意に改善されたポリクローン性及び／または増加したポリクローン性は、がん治療に対する治療有効性及び／または増加した臨床的有效性を示す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、T 細胞レパートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性の増加は、本発明の方法によって生成された T I L の投与に関する治療有効性を示すことができる。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、例えば、図 1 または図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された T I L と比較して、1 倍、2 倍、10 倍、100 倍、500 倍、または 1000 倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図 1 または図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された T I L で治療された患者と比較して、1 倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図 1 または図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された T I L で治療された患者と比較して、2 倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図 1 または図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された T I L で治療された患者と比較して、10 倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図 1 または図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された T I L で治療された患者と比較して、100 倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図 1 または図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された T I L で治療された患者と比較して、500 倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図 1 または図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された T I L で治療された患者と比較して、1000 倍増加する。

【 1 5 6 2 】

いくつかの実施形態では、P D - L 1 発現は、本明細書に記載の 1 つの更なる試験方法を使用して、腫瘍割合スコアによって決定される。いくつかの実施形態では、N S C L C 腫瘍を有する対象または患者は、< 1 % の腫瘍割合スコア (T P S) を有する。いくつかの実施形態では、N S C L C 腫瘍は、≥ 1 % T P S を有する。いくつかの実施形態では、N S C L C を有する対象または患者は、抗 P D - 1 及び／または抗 P D - L 1 抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗 P D - 1 及び／または抗 P D - L 1 抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、N S C L C を有する対象または患者は、抗 P D - L 1 抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗 P D - L 1 抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性または耐性 N S C L C 腫瘍を有する対象または患者は、< 1 % の腫瘍割合スコア (T P S) を有する。いくつかの実施形態では、不応性または耐性 N S C L C 腫瘍を有する対象または患者は、≥ 1 % T P S を有する。いくつかの実施形態では、不応性または耐性 N S C L C を有する対象または患者は、抗 P D - 1 及び／または抗 P D - L 1 抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗 P D - 1 及び／または抗 P D - L 1 抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応

性または耐性 NSCLC を有する対象または患者は、抗 PD-L1 抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗 PD-L1 抗体治療の前に決定された。

【1563】

いくつかの実施形態では、NSCLC は、1%未満 (TPS < 1%) の PD-L1 タンパク質についての任意の強度での部分的または完全な膜染色を示す、抗 PD-L1 または抗 PD-L1 療法の前に採取された患者からの腫瘍割合スコア (TPS) または生存腫瘍細胞のパーセンテージを示す NSCLC である。いくつかの実施形態では、NSCLC は、< 50%、< 45%、< 40%、< 35%、< 30%、< 25%、< 20%、< 15%、< 10%、< 9%、< 8%、< 7%、< 6%、< 5%、< 4%、< 3%、< 2%、< 1%、< 0.9%、< 0.8%、< 0.7%、< 0.6%、< 0.5%、< 0.4%、< 0.3%、< 0.2%、< 0.1%、< 0.09%、< 0.08%、< 0.07%、< 0.06%、< 0.05%、< 0.04%、< 0.03%、< 0.02%、及び < 0.01% からなる群から選択される TPS を示す NSCLC である。いくつかの実施形態では、NSCLC は、約 50%、約 45%、約 40%、約 35%、約 30%、約 25%、約 20%、約 15%、約 10%、約 9%、約 8%、約 7%、約 6%、約 5%、約 4%、約 3%、約 2%、約 1%、約 0.9%、約 0.8%、約 0.7%、約 0.6%、約 0.5%、約 0.4%、約 0.3%、約 0.2%、約 0.1%、約 0.09%、約 0.08%、約 0.07%、約 0.06%、約 0.05%、約 0.04%、約 0.03%、約 0.02%、及び約 0.01% からなる群から選択される TPS を示す NSCLC である。いくつかの実施形態では、NSCLC は、0%~1% の TPS を示す NSCLC である。いくつかの実施形態では、NSCLC は、0%~0.9% の TPS を示す NSCLC である。いくつかの実施形態では、NSCLC は、0%~0.8% の TPS を示す NSCLC である。いくつかの実施形態では、NSCLC は、0%~0.7% の TPS を示す NSCLC である。いくつかの実施形態では、NSCLC は、0%~0.6% の TPS を示す NSCLC である。いくつかの実施形態では、NSCLC は、0%~0.5% の TPS を示す NSCLC である。いくつかの実施形態では、NSCLC は、0%~0.4% の TPS を示す NSCLC である。いくつかの実施形態では、NSCLC は、0%~0.3% の TPS を示す NSCLC である。いくつかの実施形態では、NSCLC は、0%~0.2% の TPS を示す NSCLC である。いくつかの実施形態では、NSCLC は、0%~0.1% の TPS を示す NSCLC である。TPS は、当該技術分野で知られている方法、例えば、Hirsch, et al., J. Thorac. Oncol., 2017, 12, 208-222 に記載される方法、あるいはペムブロリズマブまたは他の抗 PD-1 もしくは抗 PD-L1 療法による治療前の TPS の決定に使用される方法によって測定され得る。米国食品医薬品局 (U.S. Food and Drug Administration) によって承認された TPS の測定のための方法を使用することもできる。いくつかの実施形態では、PD-L1 は、エクソソーム PD-L1 である。いくつかの実施形態では、PD-L1 は、循環腫瘍細胞上に見出される。

【1564】

いくつかの実施形態では、部分的な膜染色は、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、またはそれ以上を含む。いくつかの実施形態では、完了した膜染色は、およそ 100% 膜染色を含む。

【1565】

いくつかの実施形態では、PD-L1 の試験は、患者の血清中の PD-L1 のレベルを測定することを伴い得る。これらの実施形態では、患者の血清中の PD-L1 の測定は、腫瘍の不均一性の不確実性及び連続生検の患者の不快感を除去する。

【1566】

いくつかの実施形態では、ベースラインまたは標準レベルと比較して、可溶性 PD-L1 の上昇は、NSCLC における予後の悪化と相関する。例えば、Okuma, et al., Clinical Lung Cancer, 2018, 19, 410-417、

Vecchiarelli, et al., Oncotarget, 2018, 9, 17554-17563を参照されたい。いくつかの実施形態では、PD-L1は、エクソソームPD-L1である。いくつかの実施形態では、PD-L1は、循環腫瘍細胞上に発現される。

【1567】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（NSCLC）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することによって、NSCLCを治療する方法を提供し、対象または患者は、

i. <1%のPD-L1所定の腫瘍割合スコア（TPS）、

ii. 1%～49%のPD-L1のTPSスコア、または

iii. 1つ以上のドライバー変異の所定の非存在のうちの少なくとも1つを有し、

ドライバー変異は、EGFR変異、EGFR挿入、EGFRExon20、KRAS変異、BRAF変異、ALK変異、c-ROS変異（ROS1変異）、ROS1融合、RET変異、RET融合、ERBB2変異、ERBB2増幅、BRCA変異、MAP2K1変異、PIK3CA、CDKN2A、PTEN変異、UMD変異、NRAS変異、KRAS変異、NF1変異、MET変異、METスプライス及び／または変化したMETシグナル伝達、TP53変異、CREBBP変異、KMT2C変異、KMT2D変異、ARID1A変異、RB1変異、ATM変異、SETD2変異、FLT3変異、PTPN11変異、FGFR1変異、EP300変異、MYC変異、EZH2変異、JAK2変異、FBXW7変異、CCND3変異、及びGNA11変異からなる群から選択され、本方法は、

（a）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

（b）第1のTIL集団を閉鎖されたシステムに付加することと、

（c）IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成することであって、第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、第1の拡大が、約3～14日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ（b）からステップ（c）への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第2のTIL集団を生成することと、

（d）第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成することであって、第2の拡大が、約7～14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ（c）からステップ（d）への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第3のTIL集団を生成することと、

（e）ステップ（d）から取得された治療的TIL集団を採取することであって、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、システムを開くことなく起こる、当該採取することと、

（f）ステップ（e）からの採取されたTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（e）から（f）への移すことが、システムを開くことなく起こる、当該移すことと、

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

（h）治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ（g）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【1568】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（NSCLC）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することによって、NSCLCを治療する方法を提供し、本方法は、

【1569】

（a）PD-L1のPD-L1発現及び腫瘍割合スコア（TPS）について患者の腫瘍

10

20

30

40

50

を試験することと、

【1570】

(b) 1つ以上のドライバー変異の所定の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、EGFR変異、EGFR挿入、EGFREクソン20、KRAS変異、BRAF変異、ALK変異、c-ROS変異(ROS1変異)、ROS1融合、RET変異、RET融合、ERBB2変異、ERBB2増幅、BRCA変異、MAP2K1変異、PIK3CA、CDKN2A、PTEN変異、UMD変異、NRAS変異、KRAS変異、NF1変異、MET変異、METスプライス及び／または変化したMETシグナル伝達、TP53変異、CREBBP変異、KMT2C変異、KMT2D変異、ARID1A変異、RB1変異、ATM変異、SETD2変異、FLT3変異、PTPN11変異、FGFR1変異、EP300変異、MYC変異、EZH2変異、JAK2変異、FBXW7変異、CCND3変異、及びGNA11変異からなる群から選択される、当該試験することと、

10

【1571】

(c) 患者が、約1%～約49%のPD-L1のTPSスコアを有していることを判定し、かつ患者が、ドライバー変異を有しないことを判定することと、

【1572】

(d) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(e) 第1のTIL集団を閉鎖されたシステムに添加することと、

20

(f) IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成することであって、第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、第1の拡大が、約3～14日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第2のTIL集団を生成することと、

(g) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成することであって、第2の拡大が、約7～14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ(f)からステップ(g)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第3のTIL集団を生成することと、

30

(h) ステップ(d)から取得された治療的TIL集団を採取することであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該採取することと、

(i) ステップ(e)からの採取されたTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ(e)から(f)への移すことが、システムを開くことなく起こる、当該移すことと、

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

(k) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

40

【1573】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌(NSCLC)の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することによって、NSCLCを治療する方法を提供し、本方法は、

【1574】

(a) PD-L1のPD-L1発現及び腫瘍割合スコア(TPS)について患者の腫瘍を試験することと、

【1575】

(b) 1つ以上のドライバー変異の所定の非存在について患者を試験することであって

50

、ドライバー変異が、EGFR変異、EGFR挿入、EGFREクソン20、KRAS変異、BRAF変異、ALK変異、c-ROS変異（ROS1変異）、ROS1融合、RET変異、RET融合、ERBB2変異、ERBB2増幅、BRCA変異、MAP2K1変異、PIK3CA、CDKN2A、PTEN変異、UMD変異、NRAS変異、KRAS変異、NF1変異、MET変異、METスプライス及び／または変化したMETシグナル伝達、TP53変異、CREBBP変異、KMT2C変異、KMT2D変異、ARID1A変異、RB1変異、ATM変異、SETD2変異、FLT3変異、PTPN11変異、FGFR1変異、EP300変異、MYC変異、EZH2変異、JAK2変異、FBXW7変異、CCND3変異、及びGNA11変異からなる群から選択される、当該試験すること、

10

【1576】

（c）患者が、約1%未満のPD-L1のTPSスコアを有していることを判定し、かつ患者が、ドライバー変異を有しないことも判定すること、

【1577】

（d）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容すること、

（e）第1のTIL集団を閉鎖されたシステムに添加すること、

（f）IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成することであって、第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、第1の拡大が、約3～14日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ（e）からステップ（f）への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第2のTIL集団を生成すること、

20

（g）第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成することであって、第2の拡大が、約7～14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ（f）からステップ（g）への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第3のTIL集団を生成すること、

（h）ステップ（d）から取得された治療的TIL集団を採取することであって、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、システムを開くことなく起こる、採取すること、

30

（i）ステップ（e）からの採取されたTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（e）から（f）への移すことが、システムを開くことなく起こる、当該移すこと、

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

（k）治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ（g）の注入バッグから対象または患者に投与すること、を含む。

【1578】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（NSCLC）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することによって、NSCLCを治療する方法を提供し、本方法は、

40

【1579】

（a）PD-L1のPD-L1発現及び腫瘍割合スコア（TPS）について患者の腫瘍を試験すること、

【1580】

（b）1つ以上のドライバー変異の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、EGFR変異、EGFR挿入、KRAS変異、BRAF変異、ALK変異、c-ROS変異（ROS1変異）、ROS1融合、RET変異、またはRET融合からなる群から選択される、当該試験すること、

50

【1581】

(c) 患者が、約1%～約49%のPD-L1のTPSスコアを有していることを判定し、かつ患者が、ドライバー変異を有しないことを判定することと、

【1582】

(d) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(e) 第1のTIL集団を閉鎖されたシステムに添加することと、

(f) IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成することであって、第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、第1の拡大が、約3～14日間行われ、第2のTIL集団を取得し、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第2のTIL集団を生成することと、

(g) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成することであって、第2の拡大が、約7～14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ(f)からステップ(g)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第3のTIL集団を生成することと、

(h) ステップ(d)から取得された治療的TIL集団を採取することであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該採取することと、

(i) ステップ(e)からの採取されたTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ(e)から(f)への移すことが、システムを開くことなく起こる、当該移すことと、

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

(k) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【1583】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌(NSCLC)の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することによって、NSCLCを治療する方法を提供し、本方法は、

【1584】

(a) PD-L1のPD-L1発現及び腫瘍割合スコア(TPS)について患者の腫瘍を試験することと、

【1585】

(b) 1つ以上のドライバー変異の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、EGFR変異、EGFR挿入、KRAS変異、BRAF変異、ALK変異、c-ROS変異(ROS1変異)、ROS1融合、RET変異、またはRET融合からなる群から選択される、当該試験することと、

【1586】

(c) 患者が、約1%未満のPD-L1のTPSスコアを有していることを判定し、かつ患者が、ドライバー変異を有しないことも判定することと、

【1587】

(d) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(e) 第1のTIL集団を閉鎖されたシステムに添加することと、

(f) IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡大を行い、第2のTIL集団を生成することであって、第1の拡大が、第1のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、第1の拡大が、約3～14日間行われ

10

20

30

40

50

て、第2のTIL集団を取得し、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該第2のTIL集団を生成することと、

(g) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡大を行い、第3のTIL集団を生成することであって、第2の拡大が、約7~14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡大が、第2のガス透過性表面積を提供する閉鎖された容器内で行われ、ステップ(f)からステップ(g)への移行が、システムを開くことなく起こる、第3のTIL集団を生成することと、

(h) ステップ(d)から取得された治療的TIL集団を採取することであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、システムを開くことなく起こる、当該採取することと、

(i) ステップ(e)からの採取されたTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ(e)から(f)への移すことが、システムを開くことなく起こる、当該移すことと、

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

(k) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【1588】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の本明細書に記載の治療的TIL集団を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1589】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の本明細書に記載のTIL組成物を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1590】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の本明細書に記載の治療的TIL集団及びTIL組成物をそれぞれ投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1591】

他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、 60 mg/m^2 /日の用量で2日間のシクロホスファミドの投与に続いて、 25 mg/m^2 /日の用量で5日間のフルダラビンを投与するステップを含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1592】

他の実施形態では、本発明は、対象にTIL細胞を投与した翌日に開始する、高用量のIL-2レジメンで対象を治療するステップを更に含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1593】

他の実施形態では、本発明は、高用量IL-2レジメンが、許容範囲まで8時間毎に15分間のボラス静脈内注入として投与される $600,000$ または $720,000\text{ IU/kg}$ を含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1594】

他の実施形態では、本発明は、がんが固形腫瘍であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1595】

他の実施形態では、本発明は、がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭癌ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌(頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)を含む)、神経膠芽

10

20

30

40

50

細胞腫（GBMを含む）、胃腸癌、腎癌、または腎細胞癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1596】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神経膠芽細胞腫（GBMを含む）、及び胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1597】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1598】

他の実施形態では、本発明は、がんがHNSCCであるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1599】

他の実施形態では、本発明は、がんが子宮頸癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1600】

他の実施形態では、本発明は、がんがNSCLCであるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1601】

他の実施形態では、本発明は、がんが神経膠芽細胞腫（GBMを含む）であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1602】

他の実施形態では、本発明は、がんが胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1603】

他の実施形態では、本発明は、がんが超変異癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1604】

他の実施形態では、本発明は、がんが小児超変異癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1605】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的TIL集団を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法で使用するための、本明細書に記載の治療的TIL集団を提供する。

【1606】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量のTIL組成物を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法で使用するための、本明細書に記載のTIL組成物を提供する。

【1607】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の本明細書に記載の治療的TIL集団または本明細書に記載のTIL組成物を対象に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されるように修正された、本明細書に記載の治療的TIL集団または本明細書に記載のTIL組成物を提供する。

【1608】

他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、 60 mg/m^2 ／日の用量で2日間のシクロホスファミドの投与に続いて、 25 mg/m^2 ／日の用量で5日間のフルダラビンを投与するステップを含むように修正された、本明細書に記載の治療的TIL集団またはTIL組成物を提供する。

【1609】

他の実施形態では、本発明は、TIL細胞を患者に投与した翌日から開始する、高用量

10

20

30

40

50

IL-2 レジメンで患者を治療するステップを更に含むように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1610】

他の実施形態では、本発明は、高用量 IL-2 レジメンが、許容範囲まで 8 時間毎に 15 分間のボラス静脈内注入として投与される 600, 000 または 720, 000 IU/kg を含むように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1611】

他の実施形態では、本発明は、がんが固形腫瘍であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1612】

他の実施形態では、本発明は、がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌 (NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭癌ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌 (頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) を含む)、神経膠芽細胞腫 (GBM を含む)、胃腸癌、腎癌、または腎細胞癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1613】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神経膠芽細胞腫 (GBM を含む)、及び胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1614】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1615】

他の実施形態では、本発明は、がんが HNSCC であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1616】

他の実施形態では、本発明は、がんが子宮頸癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1617】

他の実施形態では、本発明は、がんが NSCLC であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1618】

他の実施形態では、本発明は、がんが、神経膠芽細胞腫であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1619】

他の実施形態では、本発明は、がんが胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1620】

他の実施形態では、本発明は、がんが超変異癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1621】

他の実施形態では、本発明は、がんが小児超変異癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1622】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的 TIL 集団を対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法における本明細書に記載の治療的 TIL 集団の使用を提供する。

【1623】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の TIL 組成物を対象に投与するこ

10

20

30

40

50

とを含む、対象におけるがんを治療する方法における上記の前段落のうちのいずれかに記載の T I L 組成物の使用を提供する。

【1624】

他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンを患者に投与することと、次いで治療上有効な投与量の前段落のうちのいずれかに記載の治療的 T I L 集団または治療上有効な投与量の本明細書に記載の T I L 組成物を対象に投与することとを含む、患者においてがんを治療する方法における本明細書に記載の治療的 T I L 集団または本明細書に記載の T I L 組成物の使用を提供する。

【1625】

いくつかの実施形態では、患者または対象は、S T K 1 1 または C D K N 2 A / B + 低発現の甲状腺転写因子-1 (T T F - 1) による共変異を示す。

【1626】

いくつかの実施形態では、患者または対象は、S T K 1 1 または C D K N 2 A / B + 低発現の甲状腺転写因子-1 (T T F - 1) による共変異を示す。

【1627】

いくつかの実施形態では、患者または対象は、K R A S p . G 1 2 C 阻害剤で以前に治療されておらず、T P 5 3 による共変異を示す。

【1628】

いくつかの実施形態では、患者または対象は、以前に治療された K R A S p . G 1 2 C 阻害剤で治療され、T P 5 3 による共変異を示す。

【1629】

1. P D - 1 及び P D - L 1 阻害剤との併用

いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供される T I L 療法は、T I L 単独の治療集団による治療を含んでもよく、または T I L 及び 1 つ以上の P D - 1 及び / または P D - L 1 阻害剤を含む併用治療を含んでもよい。

【1630】

プログラム死 1 (P D - 1) は、T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー (N K) T 細胞、活性化単球、及び樹状細胞によって発現される 288 アミノ酸の膜貫通免疫チェックポイント受容体タンパク質である。C D 279 としても知られる P D - 1 は、C D 28 ファミリーに属し、ヒトでは第 2 染色体上の P d c d 1 遺伝子によってコードされる。P D - 1 は、1 つの免疫グロブリン (I g) スーパーファミリードメイン、膜貫通領域、ならびに免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ (I T I M) 及び免疫受容体チロシンベースのスイッチモチーフ (I T S M) を含む細胞内ドメインからなる。P D - 1 とそのリガンド (P D - L 1 及び P D - L 2) は、K e i r , e t a l . , A n n u . R e v . I m m u n o l . 2008, 26, 677-704 に記載されるように、免疫寛容において重要な役割を果たすことが知られている。P D - 1 は、T 細胞の免疫応答を負に調節する阻害シグナルを提供する。P D - L 1 (B 7 - H 1 または C D 274 としても知られる) 及び P D - L 2 (B 7 - D C または C D 273 としても知られる) は、腫瘍細胞及び間質細胞上に発現され、P D - 1 を発現する活性化 T 細胞が遭遇する可能性があり、T 細胞の免疫抑制につながる。P D - L 1 は、ヒト第 9 染色体上の C d 274 遺伝子によってコードされる 290 アミノ酸の膜貫通タンパク質である。例えば、T o p a l i a n , e t a l . , N . E n g . J . M e d . 2012, 366, 2443-54 に記載されるものなどの最近の臨床研究で実証されているように、P D - 1 阻害剤、P D - L 1 阻害剤、及び / または P D - L 2 阻害剤の使用による、P D - 1 とそのリガンド P D - L 1 及び P D - L 2 との間の相互作用をブロックすることで、免疫抵抗を克服することができる。P D - L 1 は、多くの腫瘍細胞株上で発現されるが、P D - L 2 は、主に樹状細胞及びいくつかの腫瘍株上で発現される。T 細胞 (活性化後に P D - 1 を誘導的に発現する) に加えて、P D - 1 は、B 細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、活性化単球、樹状細胞上でも発現される。

【1631】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、当該技術分野で知られている任意の PD-1 阻害剤または PD-1 遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載される PD-1 阻害剤または遮断剤のうちの 1 つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、PD-1 阻害剤に関して互換的に使用される。誤解を避けるために、抗体である PD-1 阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリエーション、複合体、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、PD-1 阻害剤への本明細書での言及はまた、小分子化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【1632】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、抗体（すなわち、抗 PD-1 抗体）、Fab 断片を含むその断片、またはその一本鎖可変断片（scFv）である。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、PD-1 との結合について競合し、及び／または PD-1 上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、PD-1 との結合について競合し、及び／または PD-1 上のエピトープに結合する。

【1633】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ヒト PD-1 に約 100 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 90 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 80 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 70 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 60 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 50 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 40 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 30 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 20 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 10 pM 以下の KD で結合する、またはヒト PD-1 に約 1 pM 以下の KD で結合するものである。

【1634】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ヒト PD-1 に約 7.5×10^5 1/M·s 以上の k_{assoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 7.5×10^5 1/M·s 以上の k_{assoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 8×10^5 1/M·s 以上の k_{assoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 8.5×10^5 1/M·s 以上の k_{assoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 9×10^5 1/M·s 以上の k_{assoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 9.5×10^5 1/M·s 以上の k_{assoc} で結合する、またはヒト PD-1 に約 1×10^6 1/M·s 以上の k_{assoc} で結合するものである。

【1635】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ヒト PD-1 に約 2×10^{-5} 1/s 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 2.1×10^{-5} 1/s 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 2.2×10^{-5} 1/s 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 2.3×10^{-5} 1/s 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 2.4×10^{-5} 1/s 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 2.5×10^{-5} 1/s 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 2.6×10^{-5} 1/s 以下の k_{dissoc} で結合する、またはヒト PD-1 に約 2.7×10^{-5} 1/s 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 2.8×10^{-5} 1/s 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 2.9×10^{-5} 1/s 以下の k_{dissoc} で結合する、またはヒト PD-1 に約 3×10^{-5} 1/s 以下の k_{dissoc} で結合するものである。

【1636】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、約 10 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮断もしくは阻害し、約 9 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮

10

20

30

40

50

10

20

30 ' ,
, , ,
2 1 4
重

40

50

【1639】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ニボルマブの重鎖及び軽鎖 CDR または可変領域 (VR) を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤重鎖可変領域 (V_H) は、配列番号 160 に示される配列を含み、PD-1 阻害剤軽鎖可変領域 (V_L) は、配列番号 161 に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 160 及び配列番号 161 に示される配列と少なくとも 99% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 160 及び配列番号 161 に示される配列と少なくとも 98% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 160 及び配列番号 161 に示される配列と少なくとも 97% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 160 及び配列番号 161 に示される配列と少なくとも 96% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 160 及び配列番号 161 に示される配列と少なくとも 95% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。

10

【1640】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、それぞれ、配列番号 162、配列番号 163、及び配列番号 164 に示される配列を有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号 165、配列番号 166、及び配列番号 167 に示される配列を有する軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／または PD-1 上の同じエピトープに結合する。

20

【1641】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ニボルマブに関して薬物規制当局によって承認された抗 PD-1 バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列と少なくとも 97% の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して 1 つ以上の翻訳後修飾を含む抗 PD-1 抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ニボルマブである。いくつかの実施形態では、1 つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗 PD-1 抗体であり、抗 PD-1 抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ニボルマブである。抗 PD-1 抗体は、米国 FDA 及び／または欧州連合の EMA などの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ニボルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ニボルマブである。

30

40

【表 18-1】

表 18. ニボルマブに関連する PD-1 阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 158 ニボルマブ重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSRLR DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTTLVT VSSASTKGPS 120 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS 180 VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPCCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP 240 KDTLMISRTF EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT 300 VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC 360 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LQSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV 420 MHEALHNHYT QKSLSLSLGK 440
配列番号 159 ニボルマブ軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFGSGSGSTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY BREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号 160 ニボルマブ可変重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSRLR DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTTLVT VSS 113
配列番号 161 ニボルマブ可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFGSGSGSTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIK 107
配列番号 162 ニボルマブ重鎖 CDR 1	NSGMH 5

【表 18-2】

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 163 ニボルマブ重鎖 CDR 2	VIWYDGSKRY YADSVKG 17
配列番号 164 ニボルマブ重鎖 CDR 3	NDDY 4
配列番号 165 ニボルマブ軽鎖 CDR 1	RASQSVSSYL A 11
配列番号 166 ニボルマブ軽鎖 CDR 2	DASNRAT 7
配列番号 167 ニボルマブ軽鎖 CDR 3	QQSSNWPRT 9

【1642】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約 0.5 mg/kg ~ 約 10 mg/kg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約 0.5 mg/kg、約 1 mg/kg、約 1.5 mg/kg、約 2 mg/kg、約 2.5 mg/kg、約 3 mg/kg、約 3.5 mg/kg、約 4 mg/kg、約 4.5 mg/kg、約 5 mg/kg、約 5.5 mg/kg、約 6 mg/kg、約 6.5 mg/kg、約 7 mg/kg、約 7.5 mg/kg、約 8 mg/kg、約 8.5 mg/kg、約 9 mg/kg、約 9.5 mg/kg、または約 10 mg/kg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2 投与後 1、2、3、4、または 5

日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1643】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約200mg～約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約200mg、約220mg、約240mg、約260mg、約280mg、約300mg、約320mg、約340mg、約360mg、約380mg、約400mg、約420mg、約440mg、約460mg、約480mg、または約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1644】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、2週間毎、3週間毎、4週間毎、5週間毎、または6週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1645】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与され、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与され、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与され、約1mg/kg、続いてイピリムマブ3mg/kgを同じ日に3週間毎に4回、次いで240mgを2週間毎、または480mgを4週間毎に投与される。

【1646】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1647】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、2週間毎に約3mg/kgで、6週間毎に1mg/kgのイピリムマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、3週間毎に約360mgで、6週間毎に1mg/kgのイピリムマブ及び2サイクルのプラチナダブレット化学療法とともに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、2週間毎に約240mgまたは4週間毎に480mg投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

10

【1648】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、小細胞肺癌を治療するために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

20

【1649】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、悪性胸膜中皮腫を治療するために、3週間毎に約360mgで、6週間毎に1mg/kgのイピリムマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

30

【1650】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約3mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ約1mg/kgを3週間毎に4回、次いで240mgを2週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約3mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ約1mg/kgを3週間毎に4回、次いで240mgを2週間毎、480mgを4週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

40

50

【1651】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的なホジキンリンパ腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的なホジキンリンパ腫を治療するために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的なホジキンリンパ腫を治療するために、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

10

【1652】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

20

【1653】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、局所進行性または転移性尿路上皮癌を治療するために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、局所進行性または転移性尿路上皮癌を治療するために、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

30

【1654】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復機能欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復機能欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、成人及び40kg以上の小児患者における2週間毎に約240mgで高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復機能欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、成人及び40kg以上の小児患者における4週間毎に約480mgで高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復機能欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試

40

50

料を取得する前に)投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に)投与することができる。

【1655】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、40kg未満の小児患者における2週間毎に約3mg/kgで高頻度マイクロサテライト不安定性(MSI-H)またはミスマッチ修復機能欠損(dMMR)転移性結腸直腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、成人及び40kg以上の小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性(MSI-H)またはミスマッチ修復機能欠損(dMMR)転移性結腸直腸癌を治療するために約3mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ1mg/kgを3週間毎に4回、次いで240mgを2週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、成人及び40kg以上の小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性(MSI-H)またはミスマッチ修復機能欠損(dMMR)転移性結腸直腸癌を治療するために約3mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ1mg/kgを3週間毎に4回、次いで480mgを4週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に)投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に)投与することができる。

【1656】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、約1mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ3mg/kgを3週間毎に4回、次いで240mgを2週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、約1mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ3mg/kgを3週間毎に4回、次いで480mgを4週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に)投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に)投与することができる。

【1657】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、食道扁平上皮癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、食道扁平上皮癌を治療するために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、食道扁平上皮癌を治療するために、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に)投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に)投与することができる。

【1658】

他の実施形態では、PD-1阻害剤は、ペムブロリズマブ(Merck & Co., Inc.)

c (Kenilworth, NJ, USA) から KEYTRUDA として市販されている)、またはそれらの抗原結合断片、コンジュゲート、もしくはバリエーションを含む。ペムブロリズマブには、C A S 登録番号 1374853-91-4 が割り当てられており、ラムブロリズマブ、MK-3475、及び SCH-900475 としても知られている。ペムブロリズマブは、免疫グロブリン G4、抗(ヒトタンパク質 P D C D 1 (プログラム細胞死 1)) (ヒト-ハツカネズミモノクローナル重鎖)、ヒト-ハツカネズミモノクローナル軽鎖、二量体構造を有するジスルフィドを有する。ペムブロリズマブの構造は、免疫グロブリン G4、抗(ヒトプログラム細胞死 1) ; ヒト化マウスモノクローナル κ 軽鎖二量体 (226-226' : 229-229') - ビスジスルフィドを有するヒト化マウスモノクローナル [228-Loop (H10-S>P)] γ4 重鎖 (134-218') - ジスルフィドとしても記載され得る。ペムブロリズマブの特性、使用、及び調製は、国際特許公開第 WO2008/156712 A1 号、米国特許第 8,354,509 号、ならびに米国特許出願公開第 US2010/0266617 A1 号、同第 US2013/0108651 A1 号、及び同第 US2013/0109843 A2 号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。様々な形態のがんにおけるペムブロリズマブの臨床的安全性及び有効性は、Fuert, Oncology Times, 2014, 36, 35-36、Robert, et al., Lancet, 2014, 384, 1109-17、及び Thomas, et al., Exp. Opin. Biol. Ther., 2014, 14, 1061-1064 に記載されている。ペムブロリズマブのアミノ酸配列を表 19 に示す。ペムブロリズマブは、ジスルフィド架橋 : 22-96、22'-96'、23'-92'、23'-92'、134-218'、134'-218'、138'-198'、138'-198'、147-203、147'-203'、226-226'、229-229'、261-321、261'-321'、367-425、及び 367'-425'、ならびにグリコシル化部位 (N) : Asn-297 及び Asn-297' を含む。ペムブロリズマブは、Fc 領域に安定化 S228P 変異を有する IgG4 / カッパアイソタイプであり、この変異を IgG4 ヒンジ領域に挿入すると、IgG4 抗体で典型的に観察される半分子の形成が防止される。ペムブロリズマブは、各重鎖の Fc ドメイン内の Asn297 で不均一にグリコシル化されており、無傷の抗体の分子量はおよそ 149 kDa になる。ペムブロリズマブの優性グリコフォームは、フコシル化アガラクト二分性グリカンフォーム (G0F) である。

【1659】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、配列番号 168 によって示される重鎖及び配列番号 169 によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、それぞれ、配列番号 168 及び配列番号 169 に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab 断片、一本鎖可変断片 (scFv)、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 168 及び配列番号 169 に示される配列と少なくとも 99% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 168 及び配列番号 169 に示される配列と少なくとも 98% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 168 及び配列番号 169 に示される配列と少なくとも 97% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 168 及び配列番号 169 に示される配列と少なくとも 96% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 168 及び配列番号 169 に示される配列と少なくとも 95% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【1660】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ペムブロリズマブの重鎖及び軽鎖 CDR または可変領域 (VR) を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤重鎖可変領域 (VH) は、配列番号 170 に示される配列を含み、PD-1 阻害剤軽鎖可変領域 (VL

）は、配列番号 171 に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 170 及び配列番号 171 に示される配列と少なくとも 99% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 170 及び配列番号 171 に示される配列と少なくとも 98% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 170 及び配列番号 171 に示される配列と少なくとも 97% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 170 及び配列番号 171 に示される配列と少なくとも 96% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 170 及び配列番号 171 に示される配列と少なくとも 95% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。

10

【1661】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、それぞれ、配列番号 172、配列番号 173、及び配列番号 174 に示される配列を有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号 175、配列番号 176、及び配列番号 177 に示される配列を有する軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／または PD-1 上の同じエピトープに結合する。

20

【1662】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ペムブロリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗 PD-1 バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列に対して少なくとも 97% の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して、1 つ以上の翻訳後修飾を含む、PD-1 抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ペムブロリズマブである。いくつかの実施形態では、1 つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗 PD-1 抗体であり、抗 PD-1 抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ペムブロリズマブである。抗 PD-1 抗体は、米国 FDA 及び／または欧州連合の EMA などの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ペムブロリズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ペムブロリズマブである。

30

40

【表 19】

表 19. ペムブロリズマブに関連する PD-1 阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 168 ペムブロリズマブ重鎖	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF 60 NEKFKNRVTI TTDSSSTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTITVTSS 120 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 180 GLYSLSSVVT VPSSSLGKT YTCNVDPKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV 240 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY 300 RVSVLTIVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPDSQEEMTK 360 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLD SGSFFLYSRL TVDKSRWQEG 420 NVFSCSVME ALHNNHYTQKS LSLSLGK 447
配列番号 169 ペムブロリズマブ軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QKPGQAPRL LIYLAAYLES 60 GVPARFSGSG SGTDFLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLP TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF 120 IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS 180 STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSPVT KSFNRGEC 218
配列番号 170 ペムブロリズマブ可変重鎖	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF 60 NEKFKNRVTI TTDSSSTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTITVTSS 120
配列番号 171 ペムブロリズマブ可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QKPGQAPRL LIYLAAYLES 60 GVPARFSGSG SGTDFLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLP TFGGGTKVEI K 111
配列番号 172 ペムブロリズマブ重鎖 CDR1	NYYMY 5
配列番号 173 ペムブロリズマブ重鎖 CDR2	GINPSNGGTN FNEKFK 16
配列番号 174 ペムブロリズマブ重鎖 CDR3	RDYRFDMGFD Y 11
配列番号 175 ペムブロリズマブ軽鎖 CDR1	RASKGVSTSG YSYLH 15
配列番号 176 ペムブロリズマブ軽鎖 CDR2	LASYLES 7
配列番号 177 ペムブロリズマブ軽鎖 CDR3	QHSRDLPIT 9

【1663】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約 0.5 mg/kg ~ 約 10 mg/kg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約 0.5 mg/kg、約 1 mg/kg、約 1.5 mg/kg、約 2 mg/kg、約 2.5 mg/kg、約 3 mg/kg、約 3.5 mg/kg、約 4 mg/kg、約 4.5 mg/kg、約 5 mg/kg、約 5.5 mg/kg、約 6 mg/kg、約 6.5 mg/kg、約 7 mg/kg、約 7.5 mg/kg、約 8 mg/kg、約 8.5 mg/kg、約 9 mg/kg、約 9.5 mg/kg、または約 10 mg/kg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2 投与後 1、2、3、4、または 5 日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2 投与後 1、2、または 3 日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前 1、2、3、4、または 5 週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前 1、2、または 3 週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1664】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約200mg～約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約200mg、約220mg、約240mg、約260mg、約280mg、約300mg、約320mg、約340mg、約360mg、約380mg、約400mg、約420mg、約440mg、約460mg、約480mg、または約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

10

【1665】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、2週間毎、3週間毎、4週間毎、5週間毎、または6週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

20

【1666】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、黒色腫を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、黒色腫を治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

30

【1667】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、NSCLCを治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、NSCLCを治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、NSCLCを治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

40

【1668】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、小細胞肺癌（SCLC）を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、SCLCを治療するた

50

めに、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、SCLCを治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1669】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、HNSCCを治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、HNSCC治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1670】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、古典的なホジキンリンパ腫（cHL）または原発性縦隔大細胞型B細胞リンパ腫（PMBCL）を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、古典的なホジキンリンパ腫（cHL）または原発性縦隔大細胞型B細胞リンパ腫（PMBCL）を治療するために、成人の場合、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、古典的なホジキンリンパ腫（cHL）または原発性縦隔大細胞型B細胞リンパ腫（PMBCL）を治療するために、小児の場合、3週間毎に約2mg/kg（最大200mg）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1671】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、尿路上皮癌を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、尿路上皮癌を治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1672】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復機能欠損（dMMR）癌を治療するために、3週間毎

10

20

30

40

50

に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、MSI-HまたはdMMR癌を治療するために、成人の場合、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、MSI-HまたはdMMR癌を治療するために、小児の場合、3週間毎に約2mg/kg（最大200mg）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

10

【1673】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復機能欠損結腸直腸癌（dMMR CRC）を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、MSI-HまたはdMMR CRCを治療するために、成人の場合、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

20

【1674】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、胃癌を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、胃癌を治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

30

【1675】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、食道癌を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、食道癌を治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

40

【1676】

50

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮頸癌を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮頸癌を治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

10

【1677】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、肝細胞癌（HCC）を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、HCCを治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

20

【1678】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、メルケル細胞癌（MCC）を治療するために、成人の場合、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、MCCを治療するために、成人の場合、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、MCCを治療するために、小児の場合、3週間毎に約2mg/kg（最大200mg）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

30

40

【1679】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、腎細胞癌（RCC）を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、RCCを治療するために、6週間毎に約400mgで、1日2回の経口でのアキシチニブ5mgとともに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象また

50

は患者から腫瘍試料を取得する前に) 投与することができる。

【1680】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮内膜癌を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮内膜癌を治療するために、6週間毎に約400mgで、MSI-HまたはdMMRではない腫瘍の場合、1日1回の経口でのレンパチニブ20mgとともに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 投与することができる。

10

【1681】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高腫瘍変異負荷(TMB-H)癌を治療するために、成人の場合、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、TMB-H癌を治療するために、成人の場合、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、TMB-H癌を治療するために、小児の場合、3週間毎に約2mg/kg(最大200mg)で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 投与することができる。

20

【1682】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、皮膚扁平上皮癌(cSCC)を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、cSCCを治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 投与することができる。

30

【1683】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、トリプルネガティブ乳癌(TNBC)を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、TNBCを治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 投与することができる。

40

【1684】

いくつかの実施形態では、患者または対象が成人である場合、すなわち、成人適応症の

50

治療、及び6週間毎の400mgの追加の投薬レジメンが用いられ得る。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1685】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、抗m-PD-1クローンJ43（カタログ番号BE0033-2）及びRMP1-14（カタログ番号BE0146）（Bio X Cell, Inc., West Lebanon, NH USA）などの市販の抗PD-1モノクローナル抗体である。いくつかの市販の抗PD-1抗体が、当業者に知られている。

【1686】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、米国特許第8,354,509号または米国特許出願公開第2010/0266617A1号、同第2013/0108651A1号、同第2013/0109843A2号に開示されている抗体であり、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、米国特許第8,287,856号、同第8,580,247号、及び同第8,168,757号、ならびに米国特許出願公開第2009/0028857A1号、同第2010/0285013A1号、同第2013/0022600A1号、及び同第2011/0008369A1号に記載されている抗PD-1抗体であり、それらの教示は参照により本明細書に組み込まれる。他の実施形態では、PD-1阻害剤は、米国特許第8,735,553B1号に開示されている抗PD-1抗体であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、CT-011としても知られるピジリズマブであり、これは米国特許第8,686,119号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【1687】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、米国特許第8,907,053号、同第9,096,642号、及び同第9,044,442号、ならびに米国特許出願公開第US2015/0087581号に記載されるものなどの小分子またはペプチドもしくはペプチド誘導体；米国特許出願公開第2015/0073024号に記載されるものなどの1,2,4-オキサジアゾール化合物及び誘導体；米国特許出願公開第US2015/0073042号に記載されるものなどの環状ペプチド模倣化合物及び誘導体；米国特許出願公開第US2015/0125491号に記載されるものなどの環状化合物及び誘導体；国際特許出願公開第WO2015/033301号に記載されるものなどの1,3,4-オキサジアゾール及び1,3,4-チアジアゾール化合物ならびに誘導体；国際特許出願公開第WO2015/036927号及びWO2015/04490号に記載されるものなどのペプチド系化合物及び誘導体、または米国特許出願公開第US2014/0294898号に記載されるものなどの大環状ペプチド系化合物及び誘導体であり得、各々の開示は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、Regeneron, Inc. から市販されているセンプリマブである。

【1688】

いくつかの実施形態では、PD-L1またはPD-L2阻害剤は、当該技術分野で知られている任意のPD-L1もしくはPD-L2阻害剤、アンタゴニスト、または遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるPD-L1もしくはPD-L2阻害剤、アンタゴニスト、または遮断剤のうちの1つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、PD-L1及びPD-L2阻害剤に関し

10

20

30

40

50

て交換可能に使用される。誤解を避けるために、抗体であるPD-L1またはPD-L2阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリエーション、複合体、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、PD-L1またはPD-L2阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【1689】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物、プロセス、及び方法は、PD-L1またはPD-L2阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1またはPD-L2阻害剤は、小分子である。いくつかの実施形態では、PD-L1またはPD-L2阻害剤は、抗体（すなわち、抗PD-1抗体）、Fab断片を含むその断片、またはその一本鎖可変断片（scFv）である。いくつかの実施形態では、PD-L1またはPD-L2阻害剤は、ポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、PD-L1またはPD-L2阻害剤は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、PD-L1またはPD-L2阻害剤は、PD-L1もしくはPD-L2との結合について競合し、及び／またはPD-L1もしくはPD-L2上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、PD-L1もしくはPD-L2との結合について競合し、及び／またはPD-L1もしくはPD-L2上のエピトープに結合する。

10

【1690】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるPD-L1阻害剤は、化合物が、PD-L2受容体を含む他の受容体と結合または相互作用するよりも実質的に低い濃度でPD-L1と結合または相互作用するという点で、PD-L1に対して選択的である。特定の実施形態では、化合物は、PD-L2受容体に対するより少なくとも約2倍高い濃度、約3倍高い濃度、約5倍高い濃度、約10倍高い濃度、約20倍高い濃度、約30倍高い濃度、約50倍高い濃度、約100倍高い濃度、約200倍高い濃度、約300倍高い濃度、または約500倍高い濃度である結合定数でPD-L1受容体に結合する。

20

【1691】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるPD-L2阻害剤は、化合物が、PD-L1受容体を含む他の受容体と結合または相互作用するよりも実質的に低い濃度でPD-L2と結合または相互作用するという点で、PD-L2に対して選択的である。特定の実施形態では、化合物は、PD-L1受容体に対するより少なくとも約2倍高い濃度、約3倍高い濃度、約5倍高い濃度、約10倍高い濃度、約20倍高い濃度、約30倍高い濃度、約50倍高い濃度、約100倍高い濃度、約200倍高い濃度、約300倍高い濃度、または約500倍高い濃度である結合定数でPD-L2受容体に結合する。

30

【1692】

いかなる理論にも縛られることなく、腫瘍細胞はPD-L1を発現し、T細胞はPD-1を発現すると考えられている。しかしながら、腫瘍細胞によるPD-L1の発現は、PD-1またはPD-L1の阻害剤または遮断剤の有効性には必要とされない。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、PD-L1を発現する。他の実施形態では、腫瘍細胞は、PD-L1を発現しない。いくつかの実施形態では、方法は、TILと組み合わせて、本明細書に記載されるものなどのPD-1及びPD-L1抗体の組み合わせを含むことができる。PD-1及びPD-L1抗体とTILとの組み合わせの投与は、同時または連続的であり得る。

40

【1693】

いくつかの実施形態では、PD-L1及び／またはPD-L2阻害剤は、ヒトPD-L1及び／またはPD-L2に約100 pM以下のKDで結合する、ヒトPD-L1及び／またはPD-L2に約90 pM以下のKDで結合する、ヒトPD-L1及び／またはPD-L2に約80 pM以下のKDで結合する、ヒトPD-L1及び／またはPD-L2に約70 pM以下のKDで結合する、ヒトPD-L1及び／またはPD-L2に約60 pM以下のKDで結合する、ヒトPD-L1及び／またはPD-L2に約50 pM以下のKDで結合する、ヒトPD-L1及び／またはPD-L2に約40 pM以下のKDで結合する、

50

またはヒトPD-L1及び／またはPD-L2に約30pM以下のKDで結合するものである。

【1694】

いくつかの実施形態では、PD-L1及び／またはPD-L2阻害剤は、ヒトPD-L1及び／またはPD-L2に約 7.5×10^5 1/M・s以上の k_{assoc} で結合する、ヒトPD-L1及び／またはPD-L2に約 8×10^5 1/M・s以上の k_{assoc} で結合する、ヒトPD-L1及び／またはPD-L2に約 8.5×10^5 1/M・s以上の k_{assoc} で結合する、ヒトPD-L1及び／またはPD-L2に約 9×10^5 1/M・s以上の k_{assoc} で結合する、ヒトPD-L1及び／またはPD-L2に約 9.5×10^5 1/M・s以上の k_{assoc} で結合する、またはヒトPD-L1及び／またはPD-L2に約 1×10^6 1/M・s以上の k_{assoc} で結合するものである。

10

【1695】

いくつかの実施形態では、PD-L1及び／またはPD-L2阻害剤は、ヒトPD-L1またはPD-L2に約 2×10^{-5} 1/s以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトPD-1に約 2.1×10^{-5} 1/s以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトPD-1に約 2.2×10^{-5} 1/s以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトPD-1に約 2.3×10^{-5} 1/s以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトPD-1に約 2.4×10^{-5} 1/s以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトPD-1に約 2.5×10^{-5} 1/s以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトPD-1に約 2.6×10^{-5} 1/s以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトPD-L1もしくはPD-L2に約 2.7×10^{-5} 1/s以下の k_{dissoc} で結合する、またはヒトPD-L1もしくはPD-L2に約 3×10^{-5} 1/s以下の k_{dissoc} で結合するものである。

20

【1696】

いくつかの実施形態では、PD-L1及び／またはPD-L2阻害剤は、約10nM以下のIC50でのヒトPD-1へのヒトPD-L1もしくはヒトPD-L2の結合を遮断もしくは阻害し、約9nM以下のIC50でのヒトPD-1へのヒトPD-L1もしくはヒトPD-L2の結合を遮断もしくは阻害し、約8nM以下のIC50でのヒトPD-1へのヒトPD-L1もしくはヒトPD-L2の結合を遮断もしくは阻害し、約7nM以下のIC50でのヒトPD-1へのヒトPD-L1もしくはヒトPD-L2の結合を遮断もしくは阻害し、約6nM以下のIC50でのヒトPD-1へのヒトPD-L1もしくはヒトPD-L2の結合を遮断もしくは阻害し、約5nM以下のIC50でのヒトPD-1へのヒトPD-L1もしくはヒトPD-L2の結合を遮断もしくは阻害し、約4nM以下のIC50でのヒトPD-1へのヒトPD-L1もしくはヒトPD-L2の結合を遮断もしくは阻害し、約3nM以下のIC50でのヒトPD-1へのヒトPD-L1もしくはヒトPD-L2の結合を遮断もしくは阻害し、約2nM以下のIC50でのヒトPD-1へのヒトPD-L1もしくはヒトPD-L2の結合を遮断もしくは阻害し、またはヒトPD-1を遮断し、または約1nM以下のIC50でのヒトPD-1へのヒトPD-L1もしくはヒトPD-L2の結合を遮断するものである。

30

【1697】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、MEDI4736としても知られるデュルバルマブ（これは、AstraZeneca plc.の子会社であるMedimmune, LLC (Gaithersburg, Maryland)から市販されている）、またはその抗原結合断片、複合体、もしくはバリエーションである。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、米国特許第8,779,108号または米国特許出願公開第2013/0034559号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。デュルバルマブの臨床的有効性は、Page, et al., Rev. Med., 2014, 65, 185-202、Brahmer, et al., J. Clin. Oncol. 2014, 32, 5s（補足、要約8021）、及びMcDermott, et al., Cancer Treatment Rev., 2014, 40,

40

50

1056-64に記載されている。デュルバルマブの調製及び特性は、米国特許第8,779,108号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。デュルバルマブのアミノ酸配列を表20に示す。デュルバルマブモノクローナル抗体は、22-96、22'-96'、23'-89'、23'-89'、135'-195'、135'-195'、148-204、148'-204'、215'-224、215'-224'、230-230'、233-233'、265-325、265'-325'、371-429、及び371'-429'におけるジスルフィド結合、ならびにAsn-301及びAsn-301'におけるN-グリコシル化部位を含む。

【1698】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号178によって与えられる重鎖及び配列番号179によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、それぞれ、配列番号178及び配列番号179に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、一本鎖可変断片(scfv)、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号178及び配列番号179に示される配列と少なくとも99%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号178及び配列番号179に示される配列と少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号178及び配列番号179に示される配列と少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号178及び配列番号179に示される配列と少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号178及び配列番号179に示される配列と少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【1699】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、デュルバルマブの重鎖及び軽鎖CDRまたは可変領域(VR)を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤重鎖可変領域(VH)は、配列番号180に示される配列を含み、PD-L1阻害剤軽鎖可変領域(VL)は、配列番号181に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号180及び配列番号181に示される配列と少なくとも99%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号180及び配列番号181に示される配列と少なくとも98%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号180及び配列番号181に示される配列と少なくとも97%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号180及び配列番号181に示される配列と少なくとも96%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号180及び配列番号181に示される配列と少なくとも95%同一であるVH領域及びVL領域を含む。

【1700】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、それぞれ、配列番号182、配列番号183、及び配列番号184に示される配列を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号185、配列番号186、及び配列番号187に示される配列を有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはPD-L1上の同じエピトープに結合する。

【1701】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、デュルバルマブに関して薬物規制当局によって承認された抗PD-L1バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して、1つ以上の翻訳後修飾を含む、PD-L1抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、デュルバルマブである。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗PD-L1抗体であり、抗PD-L1抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、デュルバルマブである。抗PD-L1抗体は、米国FDA及び／または欧州連合のEMAなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、デュルバルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、デュルバルマブである。

10

20

30

40

50

【表 20】

表 20. デュルバルマブに関連する PD-L1 阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 178 デュルバルマブ重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY 60 VDSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGEIAFDY WGQGTTLTVS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAAAGCLV KDYFPEPVTW SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVK PKSCDKHTHC PCFAPFEG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPASIETI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAEWEESNGQ PENNYKTPP VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNY TQKSLSLSPG K 451
配列番号 179 デュルバルマブ軽鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN EIVLTQSPGT 60 LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT 120 DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT 180 ASVVCCLNNF YPREAKVQWK VDNLQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSTL TSLKADYEKH 240 KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEK 265
配列番号 180 デュルバルマブ可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY 60 VDSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGEIAFDY WGQGTTLTVS 120 S 121
配列番号 181 デュルバルマブ可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIK 108
配列番号 182 デュルバルマブ重鎖 CDR1	RYWMS 5
配列番号 183 デュルバルマブ重鎖 CDR2	NIKQDGSEKY YVDSVKG 17
配列番号 184 デュルバルマブ重鎖 CDR3	EGGWFGELAF DY 12
配列番号 185 デュルバルマブ軽鎖 CDR1	RASQRVSSSY LA 12
配列番号 186 デュルバルマブ軽鎖 CDR2	DASSRAT 7
配列番号 187 デュルバルマブ軽鎖 CDR3	QQYGSLPWT 9

【1702】

いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、MSB0010718C (Merck KGaA / EMD Serono から市販されている) としても知られるアベルマブ、またはその抗原結合断片、複合体、もしくはバリエーションである。アベルマブの調製及び特性は、米国特許出願公開第 US2014/0341917A1 号に記載されており、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。アベルマブのアミノ酸配列を表 21 に示す。アベルマブは、22~96、147~203、264~324、370~428、22'~96'、147'~203'、264'~324'、及び 370'~428' ける重鎖内ジスルフィド結合 (C23~C104)、22'~90'、138'~197'、22'~90'、及び 138'~197' における軽鎖内ジスルフィド結合 (C23~C104)、223~215' 及び 223'~215' における重鎖-軽鎖間ジスルフィド結合 (h5~CL126)、229~229' 及び 232~232' における重鎖-重鎖間ジスルフィド結合 (h11、h14)、300、300' における N-グリコシル化部位 (H C H2 N84.4)、フコシル化複合体二分性 CHO 型グリカン、及び 450 及び 450' における H C H S K2 C 末端リジンクリッピングを有する。

【1703】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号188によって示される重鎖及び配列番号189によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、それぞれ、配列番号188及び配列番号189に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、一本鎖可変断片(scfv)、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号188及び配列番号189に示される配列と少なくとも99%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号188及び配列番号189に示される配列と少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号188及び配列番号189に示される配列と少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号188及び配列番号189に示される配列と少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号188及び配列番号189に示される配列と少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

10

【1704】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、アベルマブの重鎖及び軽鎖CDRまたは可変領域(VR)を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤重鎖可変領域(VH)は、配列番号190に示される配列を含み、PD-L1阻害剤軽鎖可変領域(VL)は、配列番号191に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号190及び配列番号191に示される配列と少なくとも99%同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号190及び配列番号191に示される配列と少なくとも98%同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号190及び配列番号191に示される配列と少なくとも97%同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号190及び配列番号191に示される配列と少なくとも96%同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号190及び配列番号191に示される配列と少なくとも95%同一であるV_H及びV_L領域を含む。

20

30

【1705】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、それぞれ、配列番号192、配列番号193、及び配列番号194に示される配列を有する重鎖CDR1、CDR2、及びCDR3ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号195、配列番号196、及び配列番号197に示される配列を有する軽鎖CDR1、CDR2、及びCDR3ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換とを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはPD-L1上の同じエピトープに結合する。

【1706】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、アベルマブに関して薬物規制当局によって承認された抗PD-L1バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して、1つ以上の翻訳後修飾を含む、PD-L1抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、アベルマブである。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗PD-L1抗体であり、抗PD-L1抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物

40

50

とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、アベルマブである。抗PD-L1抗体は、米国FDA及び／または欧州連合のEMAなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、アベルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、アベルマブである。

【表 2 1】

10

表 2 1. アベルマブに関連するPD-L1阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号188 アベルマブ重鎖	EVQLLESQGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY 60 ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTILVTVSS 120 ASTKGPSVFQ LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 180 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKHTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTF EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
配列番号189 アベルマブ軽鎖	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLM IYDVSNRPSGV 60 SNRFGSGKSG NTASLTISGL QAEDADYYC SSYTSSSTRV FGTGTVKTVL GQPKANPTVT 120 LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNKNYAASS 180 YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS 216
配列番号190 アベルマブ可変重鎖	EVQLLESQGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY 60 ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTILVTVSS 120
配列番号191 アベルマブ可変軽鎖	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLM IYDVSNRPSGV 60 SNRFGSGKSG NTASLTISGL QAEDADYYC SSYTSSSTRV FGTGTVKTVL 110
配列番号192 アベルマブ重鎖CD R 1	SYIMM 5
配列番号193 アベルマブ重鎖CD R 2	SIYPSGGITF YADTVKG 17
配列番号194 アベルマブ重鎖CD R 3	IKLGTVTTVD Y 11
配列番号195 アベルマブ軽鎖CD R 1	TGTSSDVGGY NYVS 14
配列番号196 アベルマブ軽鎖C DR 2	DVSNRPS 7
配列番号197 アベルマブ軽鎖C DR 3	SSYTSSSTRV 10

20

30

40

【1707】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、MPDL3280AまたはRG7446としても知られるアテゾリズマブ (Roche Holding AG (Basel, Switzerland) の子会社であるGenentech, Inc. からTECENTRIQとして市販されている)、またはその抗原結合断片、複合体、もしくはバリエーションである。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、米国特許第8,217,149号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれ

50

る。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、米国特許出願公開第 2010/0203056 A1 号、同第 2013/0045200 A1 号、同第 2013/0045201 A1 号、同第 2013/0045202 A1 号、または同第 2014/0065135 A1 号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。アテゾリズマブの調製及び特性は、米国特許第 8,217,149 号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。アテゾリズマブのアミノ酸配列を表 22 に示す。アテゾリズマブは、22~96、145~201、262~322、368~426、22'~96'、145'~201'、262'~322'、及び 368'~426' に重鎖内ジスルフィド結合 (C23~C104)、23'~88'、134'~194'、23'~88'、及び 134'~194' に軽鎖内ジスルフィド結合 (C2104)、221~214' 及び 221'~214' に重鎖-軽鎖間ジスルフィド結合 (h5~CL126)、227~227' 及び 230~230' に重鎖-重鎖間ジスルフィド結合 (h11、h14)、及び 298 及び 298' に N-グリコシル化部位 (H2N84、4>A) を有する。

【1708】

いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、配列番号 198 によって示される重鎖及び配列番号 199 によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、それぞれ、配列番号 198 及び配列番号 199 に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab 断片、一本鎖可変断片 (scFv)、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 198 及び配列番号 199 に示される配列と少なくとも 99% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 198 及び配列番号 199 に示される配列と少なくとも 98% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 198 及び配列番号 199 に示される配列と少なくとも 97% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 198 及び配列番号 199 に示される配列と少なくとも 96% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 198 及び配列番号 199 に示される配列と少なくとも 95% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【1709】

いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、アテゾリズマブの重鎖及び軽鎖 CDR または可変領域 (VR) を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤重鎖可変領域 (VH) は、配列番号 200 に示される配列を含み、PD-L1 阻害剤軽鎖可変領域 (VL) は、配列番号 201 に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 200 及び配列番号 201 に示される配列と少なくとも 99% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 200 及び配列番号 201 に示される配列と少なくとも 98% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 200 及び配列番号 201 に示される配列と少なくとも 97% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 200 及び配列番号 201 に示される配列と少なくとも 96% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 200 及び配列番号 201 に示される配列と少なくとも 95% 同一である VH 及び VL 領域を含む。

【1710】

いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、それぞれ、配列番号 202、配列番号 203、及び配列番号 204 に示される配列を有する重鎖 CDR1、CDR2、及び CDR3 ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号 205、配列番号 206、及び配列番号 207 に示される配列を有する軽鎖 CDR1、CDR2、及び

C D R 3 ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／または P D - L 1 上の同じエピトープに結合する。

【 1 7 1 1 】

いくつかの実施形態では、抗 P D - L 1 抗体は、アテゾリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗 P D - L 1 バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 7 % の配列同一性、例えば、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して、1 つ以上の翻訳後修飾を含む、P D - L 1 抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、アテゾリズマブである。いくつかの実施形態では、1 つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗 P D - L 1 抗体であり、抗 P D - L 1 抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、アテゾリズマブである。抗 P D - L 1 抗体は、米国 F D A 及び／または欧州連合の E M A などの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、アテゾリズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、アテゾリズマブである。

10

20

30

40

50

【表 2 2】

表 2 2. アテゾリズマブに関連する P D - L 1 阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 1 9 8 アテゾリズマブ重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPFVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS 240 VFLFPKPKD TLMISRTPEV TCVVDVVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYAST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
配列番号 1 9 9 アテゾリズマブ軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS 60 RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号 2 0 0 アテゾリズマブ可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSA 118
配列番号 2 0 1 アテゾリズマブ可変軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS 60 RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKR 108
配列番号 2 0 2 アテゾリズマブ重鎖 CDR 1	GFTFSDSWIH 10
配列番号 2 0 3 アテゾリズマブ重鎖 CDR 2	AWISPYGGST YYADSVKG 18
配列番号 2 0 4 アテゾリズマブ重鎖 CDR 3	RHWPGGFDY 9
配列番号 2 0 5 アテゾリズマブ軽鎖 CDR 1	RASQDVSTAV A 11
配列番号 2 0 6 アテゾリズマブ軽鎖 CDR 2	SASFLYS 7
配列番号 2 0 7 アテゾリズマブ軽鎖 CDR 3	QQYLYHPAT 9

【1 7 1 2】

いくつかの実施形態では、P D - L 1 阻害剤は、米国特許出願公開第 U S 2 0 1 4 / 0 3 4 1 9 1 7 A 1 号に記載されている抗体を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。他の実施形態では、P D - L 1 への結合についてこれらの抗体のうちのいずれかと競合する抗体も含まれる。いくつかの実施形態では、抗 P D - L 1 抗体は、B M S - 9 3 5 5 5 9 としても知られる M D X - 1 1 0 5 であり、これは米国特許第 U S 7 , 9 4 3 , 7 4 3 号に開示されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗 P D - L 1 抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 U S 7 , 9 4 3 , 7 4 3 号に開示されている抗 P D - L 1 抗体から選択される。

【1 7 1 3】

いくつかの実施形態では、P D - L 1 阻害剤は、I N V I V O M A B 抗 m - P D - L 1 クローン 1 0 F . 9 G 2 (カタログ番号 B E 0 1 0 1、B i o X C e l l , I n c . , W e s t L e b a n o n , N H , U S A) などの市販のモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗 P D - L 1 抗体は、A F F Y M E T R I X E B I O S C I E N C E (M I H 1) などの市販のモノクローナル抗体である。いくつかの市販の抗 P D - L 1 抗体が、当業者に知られている。

【1714】

いくつかの実施形態では、PD-L2阻害剤は、BIOLEGEND 24F.10C12マウスIgG2a、カップアイソタイプ（カタログ番号329602 Biologend, Inc., San Diego, CA）、SIGMA抗PD-L2抗体（カタログ番号SAB3500395, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO）、または当業者に知られている他の市販のPD-L2抗体などの市販のモノクローナル抗体である。

【1715】

2. CTLA-4阻害剤との併用

いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるTIL療法は、TIL単独の治療集団による治療を含んでもよく、またはTIL及び1つ以上のCTLA-4阻害剤を含む併用治療を含んでもよい。

【1716】

細胞傷害性Tリンパ球抗原4（CTLA-4）は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、ヘルパーT細胞の表面で発現する。CTLA-4は、CD28依存性T細胞活性化の負の制御因子であり、適応免疫応答のチェックポイントとして機能する。T細胞共刺激タンパク質CD28と同様に、CTLA-4結合抗原は、細胞上でCD80及びCD86を提示する。CTLA-4は抑制シグナルをT細胞に伝達し、CD28は刺激シグナルを伝達する。ヒトCTLA-4に対するヒト抗体は、ウイルス感染及び細菌感染を治療または予防すること、ならびにがんを治療するためのものなど、多くの疾患状態における免疫刺激調節因子として記載されている（WO01/14424及びWO00/37504）。イピリムマブ（MDX-010）及びトレメリムマブ（CP-675, 206）を含むが、これらに限定されない、様々な種類の固形腫瘍の治療のためのいくつかの完全ヒト抗ヒトCTLA-4モノクローナル抗体（mAb）が、臨床試験で研究されている。

【1717】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、当技術分野で知られている任意のCTLA-4阻害剤またはCTLA-4遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるCTLA-4阻害剤または遮断剤のうちの1つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、CTLA-4阻害剤に関して互換的に使用される。誤解を避けるために、抗体であるCTLA-4阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリエーション、複合体、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、CTLA-4阻害剤への本明細書での言及はまた、小分子化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【1718】

本発明の方法で使用するための好適なCTLA-4阻害剤には、抗CTLA-4抗体、ヒト抗CTLA-4抗体、マウス抗CTLA-4抗体、哺乳動物抗CTLA-4抗体、ヒト化抗CTLA-4抗体、モノクローナル抗CTLA-4抗体、ポリクローナル抗CTLA-4抗体、キメラ抗CTLA-4抗体、MDX-010（イピリムマブ）、トレメリムマブ、抗CD28抗体、抗CTLA-4アドネクチン、抗CTLA-4ドメイン抗体、一本鎖抗CTLA-4断片、重鎖抗CTLA-4断片、軽鎖抗CTLA-4断片、共刺激経路を刺激するCTLA-4の阻害剤、PCT公開第WO2001/014424号に開示される抗体、PCT公開第WO2004/035607号に開示される抗体、米国特許出願公開第2005/0201994号に開示される抗体、ならびに付与された欧州特許第EP1212422B1号に開示された抗体が含まれるが、これらに限定されず、各々の開示が参照により本明細書に組み込まれる。更なるCTLA-4抗体は、米国特許第5,811,097号、同第5,855,887号、同第6,051,227号、及び同第6,984,720号、PCT公開第WO01/14424号及び同第WO00/37504号、ならびに米国公開第2002/0039581号及び同第2002/086014

号に記載されており、これらの各々の開示が参照により本明細書に組み込まれる。本発明の方法で 사용할 ことができる他の抗CTLA-4抗体には、例えば、WO98/42752、米国特許第6,682,736号及び同第6,207,156号、Hurwitz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(17):10067-10071(1998)、Camacho et al., J. Clin. Oncology, 22(145):Abstract No. 2505(2004)(抗体CP-675206)、Mokyr et al., Cancer Res., 58:5301-5304(1998)、ならびに米国特許第5,977,318号、同第6,682,736号、同第7,109,003号、及び同第7,132,281号に開示されるものが含まれ、これらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【1719】

更なるCTLA-4阻害剤には、CD28抗原がその同族リガンドと結合する能力を妨害すること、CTLA-4がその同族リガンドと結合する能力を阻害すること、共刺激経路を介してT細胞応答を増強すること、B7がCD28及び／またはCTLA-4と結合する能力を破壊すること、B7が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、CD80がCD28及び／またはCTLA-4と結合する能力を破壊すること、CD80が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、CD86がCD28及び／またはCTLA-4と結合する能力を破壊すること、CD86が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、及び共刺激経路を一般に活性化されることから破壊することが可能である任意の阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。これには、共刺激経路の他のメンバーの中でもCD28、CD80、CD86、CTLA-4の小分子阻害剤、共刺激経路の他のメンバーの中でもCD28、CD80、CD86、CTLA-4に指向する抗体、共刺激経路の他のメンバーの中でもCD28、CD80、CD86、CTLA-4に指向するアンチセンス分子、共刺激経路の他のメンバーの中でもCD28、CD80、CD86、CTLA-4に指向するアドネクチン、他のCTLA-4阻害剤の中でも、共刺激経路の他のメンバーの中でもCD28、CD80、CD86、CTLA-4のRNAi阻害剤(一本鎖及び二本鎖の両方)が必ず含まれる。

20

【1720】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、約 10^{-6} M以下、約 10^{-7} M以下、約 10^{-8} M以下、約 10^{-9} M以下、約 10^{-10} M以下、約 10^{-11} M以下、約 10^{-12} M以下の、例えば、約 10^{-13} M~ 10^{-16} Mの間、またはエンドポイントとして前述の値のうちの任意の2つを有する任意の範囲内の、 K_d でCTLA-4に結合する。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、同じアッセイを使用して比較した場合、イピリムマブの K_d の10倍以下の K_d でCTLA-4に結合する。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、同じアッセイを使用して比較した場合、イピリムマブとほぼ同じかまたはそれ以下(例えば、最大10倍低い、または最大100倍低い)の K_d でCTLA-4と結合する。いくつかの実施形態では、CD80またはCD86とのCTLA-4結合のCTLA-4阻害剤による阻害のIC50値は、同じアッセイを使用して比較した場合、それぞれCD80またはCD86とのCTLA-4結合のイピリムマブ媒介阻害より10倍以下で大きい。いくつかの実施形態では、CD80またはCD86とのCTLA-4結合のCTLA-4阻害剤による阻害のIC50値は、同じアッセイを使用して比較した場合、それぞれCD80またはCD86とのCTLA-4結合のイピリムマブ媒介性阻害とほぼ同じかまたはそれ以下(例えば、最大10倍低い、または最大100倍低い)である。

30

40

【1721】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、好適な対照と比較して、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または100%、例えば、50%~75%、75%~90%、または90%~100%の間でCTLA-4の発現を阻害する、及び／または生物学的活性を減少させるのに十分な量で使用する。いくつかの実施形態では、CTLA-4経路阻害剤は、好適な対照と比較して、

50

少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または100%、例えば、50%～75%、75%～90%、または90%～100%の間でCTLA-4のCD80、CD86、またはその両方との結合を減少させることにより、CTLA-4の生物学的活性を減少させるのに十分な量で使用される。関心対象の薬剤の効果を評価または定量化する状況下における好適な対照は、典型的には、関心対象の薬剤、例えば、CTLA-4経路阻害剤に曝露されていないか、または治療されていない（またはわずかな量に曝露されているか、または治療されている）同等の生物学的システム（例えば、細胞または対象）である。いくつかの実施形態では、生物学的システムは、それ自体の対照として機能し得る（例えば、生物学的システムは、薬剤への曝露または治療の前に評価され得、曝露または治療が開始または終了した後の状態と比較され得る。いくつかの実施形態では、歴史的対照が使用され得る。

10

【1722】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、イピリムマブ（Bristol-Myers Squibb Co. からYervoyとして市販されている）、またはそのバイオシミラー、抗原結合断片、複合体、もしくはバリエーションである。当該技術分野で知られているように、イピリムマブは、機能的ヒトレパートリーを生成するための重鎖及び軽鎖をコードするヒト遺伝子を有するトランスジェニックマウスに由来する完全ヒトIgG 1κ抗体である、抗CTLA-4抗体を指す。イピリムマブは、そのCAS登録番号477202-00-9及びPCT公開第WO01/14424号で参照することもでき、その全体が全ての目的で参照により本明細書に組み込まれる。それは抗体10DIとして開示されている。具体的には、イピリムマブは、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域（配列番号211を含む軽鎖可変領域を有し、配列番号210を含む重鎖可変領域を有する）を含む。イピリムマブの薬学的組成物は、イピリムマブ及び1つ以上の希釈剤、ビヒクル、または賦形剤を含有する全ての薬学的に許容される組成物を含む。イピリムマブを含有する薬学的組成物の例は、国際特許出願公開第WO2007/67959号に記載されている。イピリムマブは、静脈内（IV）投与され得る。

20

【1723】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号208によって与えられる重鎖及び配列番号209によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、それぞれ、配列番号208及び配列番号209に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、一本鎖可変断片（scFv）、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号208及び配列番号209に示される配列と少なくとも99%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号208及び配列番号209に示される配列と少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号208及び配列番号209に示される配列と少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号208及び配列番号209に示される配列と少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号208及び配列番号209に示される配列と少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

30

40

【1724】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、イピリムマブの重鎖及び軽鎖のCDRまたは可変領域（VR）を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤重鎖可変領域（VH）は、配列番号210に示される配列を含み、CTLA-4阻害剤軽鎖可変領域（VL）は、配列番号211に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号210及び配列番号211に示される配列と少なくとも99%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号

50

210及び配列番号211に示される配列と少なくとも98%同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号210及び配列番号211に示される配列と少なくとも97%同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号210及び配列番号211に示される配列と少なくとも96%同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号210及び配列番号211に示される配列と少なくとも95%同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【1725】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、それぞれ、配列番号212、配列番号213、及び配列番号214に示される配列を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号215、配列番号216、及び配列番号217に示される配列を有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはCTLA-4上の同じエピトープに結合する。

【1726】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、イピリムマブに関して薬物規制当局によって承認されたCTLA-4バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して、1つ以上の翻訳後修飾を含む、CTLA-4抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、イピリムマブである。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。イピリムマブのアミノ酸配列を表23に示す。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗CTLA-4抗体であり、抗CTLA-4抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、イピリムマブである。抗CTLA-4抗体は、米国FDA及び／または欧州連合のEMAなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、イピリムマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、イピリムマブである。

10

20

30

40

50

【表 2 3】

表 2 3. イピリムマブのアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 2 0 8 イピリムマブ重鎖	QVQLVESGGG VVQPGKSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNKKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVPEKS CDKTH 225
配列番号 2 0 9 イピリムマブ軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP 120 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSTL 180 TLISKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC 215
配列番号 2 1 0 イピリムマブ可変重鎖	QVQLVESGGG VVQPGKSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNKKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLTVSS 118
配列番号 2 1 1 イピリムマブ可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIK 108
配列番号 2 1 2 イピリムマブ重鎖 C DR 1	GFTFSSYT 8
配列番号 2 1 3 イピリムマブ重鎖 C DR 2	TFISYDGNKK 10
配列番号 2 1 4 イピリムマブ重鎖 C DR 3	ARTGWLGPFD Y 11
配列番号 2 1 5 イピリムマブ軽鎖 C DR 1	QSVGSSY 7
配列番号 2 1 6 イピリムマブ軽鎖 C DR 2	GAF 3
配列番号 2 1 7 イピリムマブ軽鎖 C DR 3	QQYGSSPWT 9

【1 7 2 7】

いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約 0.5 mg/kg～約 10 mg/kg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約 0.5 mg/kg、約 1 mg/kg、約 1.5 mg/kg、約 2 mg/kg、約 2.5 mg/kg、約 3 mg/kg、約 3.5 mg/kg、約 4 mg/kg、約 4.5 mg/kg、約 5 mg/kg、約 5.5 mg/kg、約 6 mg/kg、約 6.5 mg/kg、約 7 mg/kg、約 7.5 mg/kg、約 8 mg/kg、約 8.5 mg/kg、約 9 mg/kg、約 9.5 mg/kg、または約 10 mg/kg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前 1、2、3、4、または 5 週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前 1、2、または 3 週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【1 7 2 8】

いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約 200 mg～約 500 mg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約 200 mg、約 220 mg、約 240 mg、約 260 mg、約 2

80 mg、約300 mg、約320 mg、約340 mg、約360 mg、約380 mg、約400 mg、約420 mg、約440 mg、約460 mg、約480 mg、または約500 mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【1729】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、2週間毎、3週間毎、4週間毎、5週間毎、または6週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

10

【1730】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために、3週間毎に約mg/kgで最大4用量投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

20

【1731】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、黒色腫のアジュバント治療のために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、3週間毎に約10 mg/kgで4回投与され、その後12週間毎に10 mg/kgで最大3年間投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【1732】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、進行性腎細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約1 mg/kgで投与され、すぐ後に続いて同じ日にニボルマブ3 mg/kgを3週間毎に4回投与される。いくつかの実施形態では、4用量の組み合わせを完了した後、ニボルマブは、進行性腎細胞癌及び／または腎細胞癌の標準的な投薬レジメンに従って単剤として投与され得る。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

30

【1733】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復機能欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復機能欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために、30分間にわたって約1 mg/kgを静脈内投与され、すぐ後に続いて同じ日に30分間にわたってニボルマブ約3 mg/kgを3週間毎に4回投与される。いくつかの実施形態では、4用量の組み合わせを完了した後、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復機能欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌の標準的な投薬レジメンに従って推奨されるように、ニボルマブを単剤として投与する。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわ

40

50

ち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【1734】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、肝細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、肝細胞癌を治療するために、30分間にわたって約3mg/kgを静脈内投与され、すぐ後に続いて同じ日に30分間にわたってニボルマブ約1mg/kgを3週間毎に4回投与される。いくつかの実施形態では、4用量の組み合わせを完了した後、肝細胞癌の標準的な投薬レジメンに従って、ニボルマブを単剤として投与する。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

10

【1735】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、6週間毎に約1mg/kgで、2週間毎に3mg/kgのニボルマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、6週間毎に約1mg/kgで、3週間毎に360mgのニボルマブ及び2サイクルのプラチナダブルット化学療法とともに投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

20

【1736】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、悪性胸膜中皮腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、悪性胸膜中皮腫を治療するために、6週間毎に約1mg/kgで、3週間毎に360mgのニボルマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

30

【1737】

トレメリムマブ（CP-675, 206としても知られる）は、完全ヒトIgG2モノクローナル抗体であり、CAS番号745013-59-6を有する。トレメリムマブは、米国特許第6,682,736号（参照により本明細書に組み込まれる）において抗体11.2.1として開示されている。トレメリムマブの重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を、それぞれ表218及び219に示す。トレメリムマブは、黒色腫及び乳癌を含む種々の腫瘍の治療のための臨床試験において研究されており、トレメリムマブは、0.01及び15mg/kgの用量範囲で4週間または12週間毎に単回用量または複数回用量として静脈内投与される。本発明によって提供されるレジメンでは、トレメリムマブは、局所的に、特に皮内または皮下に投与される。皮内または皮下投与されるトレメリムマブの有効量は、典型的には、人当たり5~200mg/用量の範囲である。いくつかの実施形態では、トレメリムマブの有効量は、用量当たり人当たり10~150mg/用量の範囲である。いくつかの特定の実施形態では、トレメリムマブの有効量は、人当たり約10、25、37.5、40、50、75、100、125、150、175、または200mg/用量である。

40

【1738】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号218によって示される重鎖及び配列番号219によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA

50

ー 4 阻害剤は、それぞれ、配列番号 2 1 8 及び配列番号 2 1 9 に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、F a b 断片、一本鎖可変断片（s c F v）、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、C T L A－4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 1 8 及び配列番号 2 1 9 に示される配列と少なくとも 9 9 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、C T L A－4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 1 8 及び配列番号 2 1 9 に示される配列と少なくとも 9 8 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、C T L A－4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 1 8 及び配列番号 2 1 9 に示される配列と少なくとも 9 7 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、C T L A－4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 1 8 及び配列番号 2 1 9 に示される配列と少なくとも 9 6 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、C T L A－4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 1 8 及び配列番号 2 1 9 に示される配列と少なくとも 9 5 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。

10

【1 7 3 9】

いくつかの実施形態では、C T L A－4 阻害剤は、トレメリムマブの重鎖及び軽鎖の C D R または可変領域（V R）を含む。いくつかの実施形態では、C T L A－4 阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号 2 2 0 に示される配列を含み、C T L A－4 阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号 2 2 1 に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、C T L A－4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 2 0 及び配列番号 2 2 1 に示される配列と少なくとも 9 9 % 同一である V_H 及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、C T L A－4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 2 0 及び配列番号 2 2 1 に示される配列と少なくとも 9 8 % 同一である V_H 及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、C T L A－4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 2 0 及び配列番号 2 2 1 に示される配列と少なくとも 9 7 % 同一である V_H 及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、C T L A－4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 2 0 及び配列番号 2 2 1 に示される配列と少なくとも 9 6 % 同一である V_H 及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、C T L A－4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 2 0 及び配列番号 2 2 1 に示される配列と少なくとも 9 5 % 同一である V_H 及び V_L 領域を含む。

20

【1 7 4 0】

いくつかの実施形態では、C T L A－4 阻害剤は、それぞれ、配列番号 2 2 2、配列番号 2 2 3、及び配列番号 2 2 4 に示される配列を有する重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号 2 2 5、配列番号 2 2 6、及び配列番号 2 2 7 に示される配列を有する軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／または C T L A－4 上の同じエピトープに結合する。

30

【1 7 4 1】

いくつかの実施形態では、C T L A－4 阻害剤は、トレメリムマブに関して薬物規制当局によって承認された抗 C T L A－4 バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 7 % の配列同一性、例えば、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して、1 つ以上の翻訳後修飾を含む、C T L A－4 抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、トレメリムマブである。いくつかの実施形態では、1 つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つ以上から選択される。トレメリムマブのアミノ酸配列を表 2 4 に示す。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗 C T L A－4 抗体であり、抗 C T L A－4 抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、トレメリムマブである。抗 C T L A

40

50

－ 4 抗体は、米国 F D A 及び／または欧州連合の E M A などの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、トレメリムマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、トレメリムマブである。

【表 2 4】

表 2 4. トレメリムマブのアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 2 1 8 トレメリムマブ重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSRLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP RGATLYYYYY GMDVWGQGT 120 VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA 180 VLQSSGLYSL SSVVTVPSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVERKCCVE CPPCPAPPVA 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF 300 NSTFRVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFPYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP MLDSGGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
配列番号 2 1 9 トレメリムマブ軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQIN SYLDWYQQKPGAPKLLIYA ASSLQSGVPS 60 RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYSTPFTFGP GTKVEIKRTV AAPSVFIFFP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号 2 2 0 トレメリムマブ可変重鎖	GVVQPGRSRLR LSCAASGFTF SSYGMHWVRQ APGKGLEWVA VIWYDGSNKY YADSVKGRFT 60 ISRDNSKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCARD PRGATLYYYY YGMDVWGQGT TVTVSSASTK 120 GPSVFPLAPC SRSTSESTAAL LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVH 167
配列番号 2 2 1 トレメリムマブ可変軽鎖	PSSLSASVGD RVTITCRASQ SINSYLDWYQ QKPGKAPKLL IYAASSLQSG VPSRFGSGSG 60 GTDFTLTIS LQPEDFATYY CQQYYSTPFT FPGGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS 120 GTASVCLLN NFYPREAKV 139
配列番号 2 2 2 トレメリムマブ重鎖 CDR 1	GFTFSSYGMH 10
配列番号 2 2 3 トレメリムマブ重鎖 CDR 2	VIWYDGSNKY YADSV 15
配列番号 2 2 4 トレメリムマブ重鎖 CDR 3	DPRGATLYYYY YGMDV 16
配列番号 2 2 5 トレメリムマブ軽鎖 CDR 1	RASQSINSYL D 11
配列番号 2 2 6 トレメリムマブ軽鎖 CDR 2	AASSLQS 7
配列番号 2 2 7 トレメリムマブ軽鎖 CDR 3	QQYYSTPFT 9

【1 7 4 2】

いくつかの実施形態では、C T L A－4 阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約 0.5 mg/kg～約 10 mg/kg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、C T L A－4 阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約 0.5 mg/kg、約 1 mg/kg、約 1.5 mg/kg、約 2 mg/kg、約 2.5 mg/kg、約 3 mg/kg、約 3.5 mg/kg、約 4 mg/kg、約 4.5 mg/kg、約 5 mg/kg、約 5.5 mg/kg、約 6 mg/kg、約 6.5 mg/kg、約 7 mg/kg、約 7.5 mg/kg、約 8 mg/kg

kg、約8.5mg/kg、約9mg/kg、約9.5mg/kg、または約10mg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【1743】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約200mg～約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約200mg、約220mg、約240mg、約260mg、約280mg、約300mg、約320mg、約340mg、約360mg、約380mg、約400mg、約420mg、約440mg、約460mg、約480mg、または約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【1744】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、2週間毎、3週間毎、4週間毎、5週間毎、または6週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【1745】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、Agenusからのザリフレリマブ、またはそのバイオシミラー、抗原結合断片、複合体、もしくはバリエーションである。ザリフレリマブは、完全ヒトモノクローナル抗体である。ザリフレリマブには、Chemical Abstracts Service (CAS) 登録番号2148321-69-9が割り当てられており、AGEN1884としても知られている。ザリフレリマブの調製及び特性は、米国特許第10,144,779号及び米国特許出願公開第US2020/0024350A1号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【1746】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号228によって示される重鎖及び配列番号229によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、それぞれ、配列番号228及び配列番号229に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、一本鎖可変断片(scfv)、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号228及び配列番号229に示される配列と少なくとも99%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号228及び配列番号229に示される配列と少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号228及び配列番号229に示される配列と少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号228及び配列番号229に示される配列と少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号228及び配列番号229に示される配列と少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【1747】

いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、ザリフレリマブの重鎖及び軽鎖の CDR または可変領域 (V_H) を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤重鎖可変領域 (V_H) は、配列番号 230 に示される配列を含み、CTLA-4 阻害剤軽鎖可変領域 (V_L) は、配列番号 231 に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 230 及び配列番号 231 に示される配列と少なくとも 99% 同一である V_H 及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 230 及び配列番号 231 に示される配列と少なくとも 98% 同一である V_H 及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 230 及び配列番号 231 に示される配列と少なくとも 97% 同一である V_H 及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 230 及び配列番号 231 に示される配列と少なくとも 96% 同一である V_H 及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 230 及び配列番号 231 に示される配列と少なくとも 95% 同一である V_H 及び V_L 領域を含む。

10

20

30

40

50

【1748】

いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、それぞれ、配列番号 231、配列番号 233、及び配列番号 234 に示される配列を有する重鎖 CDR1、CDR2、及び CDR3 ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号 235、配列番号 236、及び配列番号 237 に示される配列を有する軽鎖 CDR1、CDR2、及び CDR3 ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／または CTLA-4 上の同じエピトープに結合する。

【1749】

いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、ザリフレリマブに関して薬物規制当局によって承認された CTLA-4 バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列に対して少なくとも 97% の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して、1 つ以上の翻訳後修飾を含む、CTLA-4 抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ザリフレリマブである。いくつかの実施形態では、1 つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つ以上から選択される。ザリフレリマブのアミノ酸配列を表 25 に示す。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗 CTLA-4 抗体であり、抗 CTLA-4 抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ザリフレリマブである。抗 CTLA-4 抗体は、米国 FDA 及び／または欧州連合の EMA などの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ザリフレリマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ザリフレリマブである。

【表 2 5】

表 2 5. ギリフレリマブのアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）					
配列番号 2 2 8 ギリフレリマブ重鎖	EVQLVESGGG	LVKPGGSLRL	SCAASGFTFS	SYSMNWVRQA	PGKGLEWVSS	ISSSSSYIYY 60
	ADSVKGRFTI	SRDNAKNSLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVG	LMGPFDIWGQ	GTMTVTSSAS 120
	TKGPSVFPLA	PSSKSTSGGT	AALGCLVKDY	FPEPVTISWN	SGALTSGVHT	FPAVLQSSGL 180
	YSLSSVTVTP	SSSLGTQTYI	CNVNHKPSNT	KVDRVEPKS	CDKTHTCPPC	PAPELLGGPS 240
	VFLFPPKPKD	TLMISRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV	DGVEVHNAKT	KPREEQYNST 300
	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP	APIEKTISKA	KGQPREPQVY	TLPPSREEMT 360
	KNQVSLTCLV	KGFPYSDIAV	EWESNGQPEN	NYKTPPVLD	SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ 420
	GNVFSCSVMH	EALHNHYTQK	SLSLSPGK			448
配列番号 2 2 9 ギリフレリマブ軽鎖	EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	RYLGWYQQKP	GQAPRLLIYG	ASTRATGIPD 60
	RFSGSGSGTD	FTLTITRLEP	EDFAVYYCQQ	YGSSPWTFGQ	GTKVEIKRTV	AAPSVFIFPP 120
	SDEQLKSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYSLSSTLT 180
	LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGEC		214
配列番号 2 3 0 ギリフレリマブ可変重鎖	EVQLVESGGG	LVKPGGSLRL	SCAASGFTFS	SYSMNWVRQA	PGKGLEWVSS	ISSSSSYIYY 60
	ADSVKGRFTI	SRDNAKNSLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVG	LMGPFDIWGQ	GTMTVTSS 118
配列番号 2 3 1 ギリフレリマブ可変軽鎖	EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	RYLGWYQQKP	GQAPRLLIYG	ASTRATGIPD 60
	RFSGSGSGTD	FTLTITRLEP	EDFAVYYCQQ	YGSSPWTFGQ	GTKVEIK	107
配列番号 2 3 2 ギリフレリマブ重鎖 CDR 1	GFTFSSYS					8
配列番号 2 3 3 ギリフレリマブ重鎖 CDR 2	ISSSSSYI					8
配列番号 2 3 4 ギリフレリマブ重鎖 CDR 3	ARVGLMGPFDD I					11
配列番号 2 3 5 ギリフレリマブ軽鎖 CDR 1	QSVSRV					6
配列番号 2 3 6 ギリフレリマブ軽鎖 CDR 2	GAS					3
配列番号 2 3 7 ギリフレリマブ軽鎖 CDR 3	QQYGSSPWT					9

10

20

30

【1 7 5 0】

更なる抗 C T L A - 4 抗体の例には、A G E N 1 1 8 1、B M S - 9 8 6 2 1 8、B C D - 1 4 5、O N C - 3 9 2、C S 1 0 0 2、R E G N 4 6 5 9、及び A D G 1 1 6 が含まれるが、これらに限定されず、これらは当業者に即知である。

【1 7 5 1】

いくつかの実施形態では、抗 C T L A - 4 抗体は、以下の特許公開のうちのいずれかに開示される抗 C T L A - 4 抗体である：U S 2 0 1 9 / 0 0 4 8 0 9 6 A 1、U S 2 0 2 0 / 0 2 2 3 9 0 7、U S 2 0 1 9 / 0 2 0 1 3 3 4、U S 2 0 1 9 / 0 2 0 1 3 3 4、U S 2 0 0 5 / 0 2 0 1 9 9 4、E P 1 2 1 2 4 2 2 B 1、W O 2 0 1 8 / 2 0 4 7 6 0、W O 2 0 1 8 / 2 0 4 7 6 0、W O 2 0 0 1 / 0 1 4 4 2 4、W O 2 0 0 4 / 0 3 5 6 0 7、W O 2 0 0 3 / 0 8 6 4 5 9、W O 2 0 1 2 / 1 2 0 1 2 5、W O 2 0 0 0 / 0 3 7 5 0 4、W O 2 0 0 9 / 1 0 0 1 4 0、W O 2 0 0 6 / 0 9 6 4 9、W O 2 0 0 5 0 9 2 3 8 0、W O 2 0 0 7 / 1 2 3 7 3 7、W O 2 0 0 6 / 0 2 9 2 1 9、W O 2 0 1 0 / 0 9 7 9 5 9 7、W O 2 0 0 6 / 1 2 1 6 8、及び W O 1 9 9 7 0 2 0 5 7 4（これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる）。更なる C T L A - 4 抗体は、米国特許第 5

40

50

、811,097号、同第5,855,887号、同第6,051,227号、及び同第6,984,720号、PCT公開第WO01/14424号及び同第WO00/37504号、ならびに米国公開第2002/0039581号及び同第2002/086014号、及び／または米国特許第5,977,318号、同第6,682,736号、同第7,109,003号、及び同第7,132,281号に記載されており、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗CTLA-4抗体は、例えば、WO98/42752、米国特許第6,682,736号及び同第6,207,156号、Hurwitz, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 10067-10071 (1998)、Camacho, et al., J. Clin. Oncol., 2004, 22, 145 (Abstract No. 2505 (2004) (抗体CP-675206)、またはMokyr, et al., Cancer Res., 1998, 58, 5301-5304 (1998)に開示されているものであり、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【1752】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、WO1996/040915（参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるCTLA-4リガンドである。

【1753】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、CTLA-4発現の核酸阻害剤である。例えば、抗CTLA-4 RNAi分子は、PCT公開第WO1999/032619号及び同第WO2001/029058号、米国公開第2003/0051263号、同第2003/0055020号、同第2003/0056235号、同第2004/265839号、同第2005/0100913号、同第2006/0024798号、同第2008/0050342号、同第2008/0081373号、同第2008/0248576号、及び同第2008/055443号、及び／または米国特許第6,506,559号、同第7,282,564号、同第7,538,095号、及び同第7,560,438号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載される分子の形態を取り得る。いくつかの事例では、抗CTLA-4 RNAi分子は、欧州特許第EP1309726号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載される二本鎖RNAi分子の形態を取る。いくつかの事例では、抗CTLA-4 RNAi分子は、米国特許第7,056,704号及び同第7,078,196号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載される二本鎖RNAi分子の形態を取る。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、国際特許出願公開第WO2004/081021号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるアプタマーである。

20

30

【1754】

他の実施形態では、本発明の抗CTLA-4 RNAi分子は、米国特許第5,898,031号、同第6,107,094号、同第7,432,249号、及び同第7,432,250号、ならびに欧州出願第EP0928290号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるRNA分子である。

【1755】

3. KRAS阻害剤との組み合わせ

40

上記の実施形態のうちのいずれかによれば、KRAS変異を有するがんを有する患者に提供されるTIL療法は、TIL単独の治療集団による治療を含んでもよく、またはTIL及び1つ以上のKRAS阻害剤を含む併用治療を含んでもよい。ある実施形態では、がんは、KRAS変異を有するがんである。ある実施形態では、がんは、KRAS p. G12C変異を有するがんである。ある実施形態では、がんは、KRAS p. G12C変異を有する非小細胞肺癌（NSCLC）である。図34～37は、本明細書に記載の方法に従ってKRAS阻害剤が対象に投与されるための様々な例示的なプロトコルを示す。

【1756】

例示的な実施形態では、1つ以上のKRAS阻害剤は、自家TIL治療薬が由来するソース腫瘍の切除前に患者に提供される。いかなる特定の操作理論にも拘束されことなく

50

、ソース腫瘍の切除前のK R A S治療は、腫瘍から取得されるT I Lの抗原リモデリングをもたらし、したがって、本明細書で提供されるT I L療法における拡大及び下流使用のためのより堅牢なT I Lを提供すると考えられる。いくつかの実施形態では、患者には、ソース腫瘍の切除前に少なくとも1、2、3、4、5、6、または7日間、1つ以上のK R A S阻害剤が提供される。いくつかの実施形態では、患者は、ソース腫瘍の切除前に少なくとも1、2、3、4週間、1つ以上のK R A S阻害剤を受けた。いくつかの実施形態では、患者は、ソース腫瘍の切除前に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12カ月間、1つ以上のK R A S阻害剤を受けた。いくつかの実施形態では、患者は、ソース腫瘍の切除前に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10年間、1つ以上のK R A S阻害剤を受けた。いくつかの実施形態では、1つ以上のK R A S阻害剤は、ソース腫瘍の切除後に提供される。

10

【1757】

いくつかの実施形態では、1つ以上のK R A S阻害剤は、T I L注入により患者に提供される。いくつかの実施形態では、1つ以上のK R A S阻害剤は、T I L注入と同時に患者に提供されない。いくつかの実施形態では、1つ以上のK R A S阻害剤は、T I L注入後に患者に提供される。いくつかの実施形態では、1つ以上のK R A S阻害剤は、T I L注入と同時に患者に提供され、T I L注入後にも提供される。特定の実施形態では、1つ以上のK R A S阻害剤は、T I L注入の約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、16、または24時間後に患者に提供される。ある特定の実施形態では、1つ以上のK R A S阻害剤は、T I L注入の約1、2、3、4、5、6、または7日後に患者に提供される。ある特定の実施形態では、1つ以上のK R A S阻害剤は、T I L注入の約1、2、3、4、5、6、または7日後に患者に提供される。例示的な実施形態では、1つ以上のK R A S阻害剤は、T I L注入の約1、2、3、または4週間後に患者に提供される。特定の実施形態では、1つ以上のK R A S阻害剤は、T I L注入の約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12カ月後に患者に提供される。いくつかの実施形態では、対象T I L治療を投与された患者は、1つ以上のK R A S阻害剤を以前に投与され、治療後も1つ以上のK R A S阻害剤を受け続ける。例示的な実施形態では、患者は、対象T I L治療を受けた後、少なくとも1、2、3、または4週間、K R A S阻害剤治療を受け続ける。例示的な実施形態では、患者は、対象T I L治療を受けた後、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12カ月間、K R A S阻害剤治療を受け続ける。例示的な実施形態では、患者は、対象T I L治療を受けた後、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10年間、K R A S阻害剤治療を受け続ける。いくつかの実施形態では、患者は、対象T I L治療を受けた後に患者のがんの進行または許容できない毒性が生じるまで、K R A S阻害剤治療を受け続ける。いくつかの実施形態では、患者は、対象T I L治療後も一生K R A S阻害剤治療を受け続ける。

20

30

【1758】

K R A Sタンパク質は、細胞分裂、分化、及び分泌に影響を与えるR A S／M A P Kシグナル伝達経路を調節する役割を果たす。K R A S遺伝子変異は、K R A Sタンパク質の活性を増加させ、R A S／M A P K経路の下流シグナル伝達を増加させ、腫瘍の成長につながる。K R A Sは最も頻繁に変異したがん遺伝子であるため、K R A S変異は、がんの最も一般的な原因の1つである。

40

【1759】

本明細書で使用される場合、「K - r a s阻害剤」または「K R A S阻害剤」は、K R A S、ならびに他の野生型または変異体セリン／スレオニンタンパク質キナーゼファミリーメンバーの生物学的活性を阻害する阻害剤を含む、野生型またはB - r a fの任意の変異体形態の生物学的活性の任意の阻害剤である。活性は、例えば、適切な対照と比較して、K R A Sの活性の少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、95%または100%の減少を含む、統計的に有意な量で減少し得る。

50

【1760】

KRAS 阻害剤には、AMG-510（ソトラシブ）、AMG-510ラセミ体（ソトラシブラセミ体）、MRTX849（アダグラシブ）、JNJ-74699157/ARS-3248、JDQ443、LY3499446、LY3537982、RLY-1971/GDC-6036、BBP-454、BI 1701963、BI 1823911、mRNA-5671/V941、D-1553、BI-2852、BI-3406、ARS-1620、BAY-293、MRTX-1257、PROTAC K-Ras Degradер-1、LC-2、ARS-853、ARS-1323、ARS-1323-アルキン、ARS-1630、K-Ras G12C-IN-2、KRAS 阻害剤-6、KRAS 阻害剤8、KRAS 阻害剤7、KRAS G12C 阻害剤15、KRAS G12C 阻害剤5、KRAS G12C 阻害剤13、KRAS G12C 阻害剤17、KRAS G12C 阻害剤16、KRAS G12C 阻害剤14、KRas G12C 阻害剤4、KRas G12C 阻害剤1、KRas G12C 阻害剤3、KRas G12C 阻害剤2、6H05、SAH-SOS1A TFA、KRAS 阻害剤10、SAH-SOS1A、アトロバスタチン-PEG3-FITC、C6ME、CS-0115617、HY-130260、HY-135864、HY-135866、Cmpd2、CS-0115618、CS-0115620、EX-A4387、CS-0106134、HY-135865、2241719-75-3、HY-125873、CS-0046138、CS-0046137、CS-0101474、HY-125875、CS-0102608、CS-0102610、CS-0102606、HY-112493、CS-0046139、1- {4- [6-クロロ-8-フルオロ-7- (5-メチル-1h-インダゾール-4-イル) キナゾリン-4-イル] ピペラジン-1-イル} プロパン-1-オン、HY-126292、HY-112491、CS-0046136、HY-114168、HY-125874、HY-112494、CS-0102607、BCP29475 | 2206735-61-5、HY-112492、CS-0078097、2158296-45-6、HY-125872、及び2158297-63-1、ならびにそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、KRAS 阻害剤は、KRAS p. G12C に対する選好の増加を有する。

【1761】

いくつかの実施形態では、KRAS 阻害剤は、AMG-510（ソトラシブ）、AMG-510ラセミ体（ソトラシブラセミ体）、及びMRTX849（アダグラシブ）、JNJ-74699157/ARS-3248、JDQ443、LY3499446、LY3537982、RLY-1971/GDC-6036、BBP-454、BI 1701963、BI 1823911、mRNA-5671/V941、D-1553、ならびにそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択される。

【1762】

いくつかの実施形態では、KRAS 阻害剤は、AMG-510（ソトラシブ）である。いくつかの実施形態では、KRAS 阻害剤は、AMG-510ラセミ体（ソトラシブラセミ体）である。いくつかの実施形態では、KRAS 阻害剤は、MRTX849（アダグラシブ）である。いくつかの実施形態では、KRAS 阻害剤は、JNJ-74699157/ARS-3248である。いくつかの実施形態では、KRAS 阻害剤は、JDQ443である。いくつかの実施形態では、KRAS 阻害剤は、LY3499446である。いくつかの実施形態では、KRAS 阻害剤は、LY3537982である。いくつかの実施形態では、KRAS 阻害剤は、RLY-1971/GDC-6036である。いくつかの実施形態では、KRAS 阻害剤は、BBP-454である。いくつかの実施形態では、KRAS 阻害剤は、BI 1701963である。いくつかの実施形態では、KRAS 阻害剤は、BI 1823911である。いくつかの実施形態では、KRAS 阻害剤は、mRNA-5671/V941である。いくつかの実施形態では、KRAS 阻害剤は、D-1553である。

【1763】

いくつかの実施形態では、がんの治療を必要とするがん患者は、本明細書に提供される T I L 及び少なくとも1つの K R A S 阻害剤の両方で治療される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤は、T I L と同時に患者に投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤及び T I L は、連続的に投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤が、T I L の投与前に投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤が、T I L の投与後に投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤が、T I L の投与の前後に投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤の投与は、T I L の投与後に維持される。

10

【1764】

いくつかの実施形態では、T I L の投与前に、がん患者は、少なくとも1つの K R A S 阻害剤で治療されている。いくつかの実施形態では、がん患者は、腫瘍収獲の前に少なくとも1つの K R A S 阻害剤で治療されている。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤は、患者からの腫瘍の切除前に投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤は、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者から腫瘍試料を取得するための他の手段の前に投与される。

【1765】

いくつかの実施形態では、患者は、少なくとも1つの K R A S 阻害剤による前治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、患者は、少なくとも1つの K R A S 阻害剤による前治療に应答する。

20

【1766】

いくつかの実施形態では、本明細書中提供される少なくとも1つの K R A S 阻害剤は、1日約100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、1,000mg、1,100mg、1,200mg、1,300mg、1,400mg、1,500mg、1,600mg、1,700mg、1,800mg、1,900mg、または2,000mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤は、1日約100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、1,000mg、1,100mg、1,200mg、1,300mg、1,400mg、1,500mg、1,600mg、1,700mg、1,800mg、1,900mg、または2,000mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤は、1日1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10回投与される。例示的な実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤は、約960mgの投与量で投与される。例示的な実施形態では、少なくとも1つの K R A S 阻害剤は、約600mgの投与量で投与される。

30

【1767】

いくつかの実施形態では、K R A S 阻害剤は、ソトラシブもしくはアダグラシブ、またはその薬学的に許容される塩である。いくつかの実施形態では、ソトラシブもしくはアダグラシブ、またはその薬学的に許容される塩は、1日約100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、1,000mg、1,100mg、1,200mg、1,300mg、1,400mg、1,500mg、1,600mg、1,700mg、1,800mg、1,900mg、または2,000mgの投与量で摂取または提供される。いくつかの実施形態では、ソトラシブもしくはアダグラシブ、またはその薬学的に許容される塩は、1日少なくとも100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750

40

50

mg、800mg、850mg、900mg、950mg、1,000mg、1,100mg、1,200mg、1,300mg、1,400mg、1,500mg、1,600mg、1,700mg、1,800mg、1,900mg、または2,000mgの投与量で摂取または提供される。いくつかの実施形態では、ソトラシブまたはアダグラシブは、1日1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10回摂取または提供される。例示的な実施形態では、ソトラシブもしくはアダグラシブ、またはその薬学的に許容される塩は、約960mgの投与量で摂取または提供される。例示的な実施形態では、アダグラシブまたはその薬学的に許容される塩は、約600mgの投与量で摂取または提供される。

【1768】

4. 患者のリンパ球枯渇前処置

いくつかの実施形態では、本発明は、TIL集団でがんを治療する方法を含み、患者は、本開示によるTILの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的化学療法で前治療された患者のがんの治療に使用するためのTIL集団を含む。いくつかの実施形態では、TIL集団は、注入による投与用である。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド60mg/kg/日で2日間（TIL注入の27日前及び26日前）、ならびにフルダラビン25mg/m²/日で5日間（TIL注入の27日前～23日前）である。いくつかの実施形態では、本開示による骨髄非破壊的化学療法及びTIL注入（0日目）後、患者は、生理学的許容範囲まで8時間毎に720,000IU/kgで静脈内にIL-2（PROLEUKINとして市販されている、アルデスロイキン）の静脈内注入を受ける。特定の実施形態では、TIL集団は、IL-2と組み合わせてがんを治療する際に使用するためのものであり、IL-2は、TIL集団の後に投与される。

【1769】

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

【1770】

一般に、リンパ球枯渇は、フルダラビンまたはシクロホスファミド（マホスファミドと称される活性形態）及びそれらの組み合わせの投与を使用して達成される。かかる方法は、Gassner, et al., Cancer Immunol. Immunother. 2011, 60, 75-85、Muranski, et al., Nat. Clin. Pract. Oncol., 2006, 3, 668-681、Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2008, 26, 5233-5239、及びDudley, et al., J. Clin. Oncol. 2005, 23, 2346-2357に記載されており、これらは全て、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【1771】

いくつかの実施形態では、フルダラビンは、0.5µg/mL～10µg/mLのフルダラビン濃度で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、1µg/mLのフルダラビン濃度で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、または7日以上投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、10mg/kg/日、15mg/kg/日、20mg/kg/日、25mg/kg/日、30mg/kg/日、35mg/kg/日、40mg/kg/日、または45mg/kg/日の投与量で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、35mg/kg/日で2～7日間投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、35mg/kg/日で4～5日間投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、25mg/kg/日で4～5日間投与される。

【1772】

いくつかの実施形態では、シクロホスファミドの活性形態であるマホスファミドは、シ

クロホスファミドの投与により、 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で取得される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドの活性形態であるマホスファミドは、シクロホスファミドの投与により、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で取得される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、または7日以上投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、 $100 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $150 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $175 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $200 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $225 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $250 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $275 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、または $300 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の投与量で投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、静脈内（すなわち、i.v.）に投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、 $35 \text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ で2～7日間投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、 $250 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ で4～5日間静脈内に投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、 $250 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ で4日間静脈内に投与される。

10

【1773】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、患者にフルダラビンとシクロホスファミドを一緒に投与することによって行われる。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、 $25 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ で静脈内に投与され、シクロホスファミドは、 $250 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ で4日間にわたって静脈内に投与される。

【1774】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを $60 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを $25 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で5日間投与することによって行われる。

20

【1775】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを $60 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、フルダラビンを $25 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で5日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の2日間に投与され、リンパ球枯渇は合計5日間で行われる。

【1776】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約 $50 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、フルダラビンを約 $25 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で5日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の2日間に投与され、リンパ球枯渇は合計5日間で行われる。

30

【1777】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約 $50 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、フルダラビンを約 $20 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で5日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の2日間に投与され、リンパ球枯渇は合計5日間で行われる。

【1778】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約 $40 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、フルダラビンを約 $20 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で5日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の2日間に投与され、リンパ球枯渇は合計5日間で行われる。

40

【1779】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約 $40 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、フルダラビンを約 $15 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で5日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の2日間に投与され、リンパ球枯渇は合計5日間で行われる。

【1780】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを $60 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で、フルダラビンを $25 \text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で2日間、続いてフルダラビンを2

50

5 mg / m² / 日の用量で3日間投与することによって行われる。

【1781】

いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。いくつかの実施形態では、メスナは、15 mg / kgで投与される。メスナが注入されるいくつかの実施形態では、連続的に注入される場合、メスナは、約2時間にわたってシクロホスファミドを注入することができ（-5日目及び/または-4日目）、次いで、各シクロホスファミド用量と同時に開始する24時間にわたって残りの22時間で3 mg / kg / 時間の速度で注入することができる。

【1782】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、第3のTIL集団を患者に投与した翌日から開始するIL-2レジメンで患者を治療するステップを更に含む。

【1783】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、第3のTIL集団を患者に投与したのと同じ日に開始するIL-2レジメンで患者を治療するステップを更に含む。

【1784】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、5日間の前処置治療を含む。いくつかの実施形態では、該日は、-5日から-1日、または0日から4日として示される。いくつかの実施形態では、レジメンは、-5日目及び-4日目（すなわち、0日目及び1日目）にシクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、-5日目及び-4日目（すなわち、0日目及び1日目）に静脈内シクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、-5日目及び-4日目（すなわち、0日目及び1日目）に60 mg / kgの静脈内シクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。いくつかの実施形態では、レジメンは、フルダラビンを更に含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、静脈内フルダラビンを更に含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、25 mg / m²の静脈内フルダラビンを更に含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、-5日目及び-1日目（すなわち、0～4日目）に25 mg / m²の静脈内フルダラビンを更に含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、-5日目及び-1日目（すなわち、0～4日目）に25 mg / m²の静脈内フルダラビンを更に含む。

【1785】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを60 mg / m² / 日の用量で、フルダラビンを25 mg / m² / 日の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを25 mg / m² / 日の用量で5日間投与するステップを含む。

【1786】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを60 mg / m² / 日の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを25 mg / m² / 日の用量で5日間投与するステップを含む。

【1787】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを60 mg / m² / 日の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを25 mg / m² / 日の用量で3日間投与するステップを含む。

【1788】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを60 mg / m² / 日の用量で、フルダラビンを25 mg / m² / 日の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを25 mg / m² / 日の用量で3日間投与するステップを含む。

【1789】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを60 mg / m² / 日の用量で、フルダラビンを25 mg / m² / 日の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを25 mg / m² / 日の用量で1日間投与するステップを含む。

【1790】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを $60 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で3日間投与するステップを含む。

【1791】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを $60 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で、フルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で3日間投与するステップを含む。

【1792】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表26に従って投与される。

【表26】

表26. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	— 5	— 4	— 3	— 2	— 1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド $60 \text{ mg} / \text{kg}$	X	X								
メスナ (必要に応じて)	X	X								
フルダラビン $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$	X	X	X	X	X					
TIL注入						X				

【1793】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表27に従って投与される。

【表27】

表27. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	— 4	— 3	— 2	— 1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド $60 \text{ mg} / \text{kg}$	X	X							
メスナ (必要に応じて)	X	X							
フルダラビン $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$	X	X	X	X					
TIL注入					X				

【1794】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表28に従って投与される。

10

20

30

40

50

【表 2 8】

表 2 8. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	－ 3	－ 2	－ 1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60 mg / k g	X	X						
メスナ (必要に応じて)	X	X						
フルダラビン 25 mg / m ² / 日	X	X	X					
T I L 注入				X				

10

【1 7 9 5】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表 2 9 に従って投与される。

【表 2 9】

表 2 9. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	－ 5	－ 4	－ 3	－ 2	－ 1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60 mg / k g	X	X								
メスナ (必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 25 mg / m ² / 日			X	X	X					
T I L 注入						X				

20

【1 7 9 6】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表 3 0 に従って投与される。

【表 3 0】

表 3 0. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	－ 5	－ 4	－ 3	－ 2	－ 1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300 mg / k g	X	X								
メスナ (必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 30 mg / m ² / 日	X	X	X	X	X					
T I L 注入						X				

30

40

【1 7 9 7】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表 3 1 に従って投与される。

50

【表 3 1】

表 3 1. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	－ 4	－ 3	－ 2	－ 1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X							
メスナ（必要に応じて）	X	X							
フルダラビン 30mg/m ² /日	X	X	X	X					
T I L 注入					X				

10

【1798】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表 3 2 に従って投与される。

【表 3 2】

表 3 2. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	－ 3	－ 2	－ 1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X						
メスナ（必要に応じて）	X	X						
フルダラビン 30mg/m ² /日	X	X	X					
T I L 注入				X				

20

【1799】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表 3 3 に従って投与される。

【表 3 3】

表 3 3. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	－ 5	－ 4	－ 3	－ 2	－ 1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X								
メスナ（必要に応じて）	X	X								
フルダラビン 30mg/m ² /日			X	X	X					
T I L 注入						X				

30

40

【1800】

いくつかの実施形態では、骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンの前述の実施形態で使用する T I L 注入は、本明細書に記載の任意の T I L 組成物であり得、また本明細書に記載されるような I L－2 レジメンの追加及び併用療法（P D－1 及び／または P D－L 1 阻害剤など）の投与であり得る。

50

【1801】

5. IL-2レジメン

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、高用量IL-2レジメンを含み、高用量IL-2レジメンは、治療的TIL集団の治療有効分量を投与した翌日から静脈内投与されるアルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリエーションを含み、アルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリエーションは、許容範囲まで8時間毎に最大14用量にわたって、 0.037 mg/kg または 0.044 mg/kg IU/kg （患者の体重）の用量で15分のボラス静脈内注入を使用して投与される。9日間の休止後、このスケジュールは、更に14用量、合計最大28用量にわたって繰り返され得る。いくつかの実施形態では、IL-2は、1、2、3、4、5、または6用量で投与される。いくつかの実施形態では、IL-2は、最大6用量の最大投与量で投与される。

10

【1802】

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、デクレッシェンドIL-2レジメンを含む。デクレッシェンドIL-2レジメンは、O'Day, et al., J. Clin. Oncol. 1999, 17, 2752-61、及びEton, et al., Cancer 2000, 88, 1703-9に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、デクレッシェンドIL-2レジメンは、6時間にわたって静脈内投与される $18 \times 10^6\text{ IU/m}^2$ アルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリエーション、続いて12時間にわたって静脈内投与される $18 \times 10^6\text{ IU/m}^2$ 、続いて24時間にわたって静脈内投与される $18 \times 10^6\text{ IU/m}^2$ 、続いて72時間にわたって静脈内投与される $4.5 \times 10^6\text{ IU/m}^2$ を含む。この治療サイクルは、28日毎に最大4サイクル繰り返され得る。いくつかの実施形態では、デクレッシェンドIL-2レジメンは、1日目の $18,000,000\text{ IU/m}^2$ 、2日目の $9,000,000\text{ IU/m}^2$ 、3日目及び4日目の $4,500,000\text{ IU/m}^2$ を含む。

20

【1803】

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、低用量IL-2レジメンを含む。Domínguez-Villar and Hafler, Nat. Immunology 2000, 19, 665-673、Hartemann, et al., Lancet Diabetes Endocrinol. 2013, 1, 295-305、及びRosenzweig, et al., Ann. Rheum. Dis. 2019, 78, 209-217（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている低用量IL-2レジメンを含む、当該技術分野で知られている任意の低用量IL-2レジメンを使用することができる。いくつかの実施形態では、低用量IL-2レジメンは、24時間当たり m^2 当たり $18 \times 10^6\text{ IU}$ のアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリエーションを5日間の連続的注入として、その後IL-2療法なしで2～6日間、その後任意選択的にアルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリエーションを静脈内に更に5日間、24時間当たり m^2 当たり $18 \times 10^6\text{ IU}$ の連続的注入として、その後任意選択的にIL-2療法なしで3週間投与することを含み、その後追加のサイクルが投与され得る。

30

40

【1804】

いくつかの実施形態では、IL-2は、最大6用量の最大投与量で投与される。いくつかの実施形態では、高用量IL-2レジメンは、小児の使用に適合される。いくつかの実施形態では、最大6用量まで、8～12時間毎に $600,000\text{ 国際単位 (IU)/kg}$ のアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大6用量まで、8～12時間毎に $500,000\text{ 国際単位 (IU)/kg}$ のアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大6用量まで、8～12時間毎に $400,000\text{ 国際単位 (IU)/kg}$ のアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大6用量まで、8～12時間毎に $500,000\text{ 国際単位 (IU)/kg}$ のアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大6用量まで、8～12時間

50

毎に300,000国際単位(IU)/kgのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大6用量まで、8~12時間毎に200,000国際単位(IU)/kgのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大6用量まで、8~12時間毎に100,000国際単位(IU)/kgのアルデスロイキンの用量が使用される。

【1805】

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、0.10mg/日~50mg/日の用量で、1、2、4、6、7、14、または21日毎にペグ化IL-2を投与することを含む。いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、0.10mg/日~50mg/日の用量で、1、2、4、6、7、14または21日毎に、ベンパガルデスロイキン、またはその断片、バリエーション、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

10

【1806】

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、0.10mg/日~50mg/日の用量で、1、2、4、6、7、14、または21日毎に、THOR-707、またはその断片、バリエーション、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

【1807】

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、TILの投与後に、ネムバロイキンアルファ、またはその断片、バリエーション、もしくはバイオシミラーの投与を含む。特定の実施形態では、患者にネムバロイキンを1日、2日、4日、6日、7日、14日または21日毎に、0.10mg/日~50mg/日の用量で投与される。

20

【1808】

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、抗体骨格に移植されたIL-2断片の投与を含む。いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、IL-2低親和性受容体と結合する抗体-サイトカイン移植タンパク質の投与を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域HCDR1、HCDR2、HCDR3を含む、重鎖可変領域(V_H)と、LCDR1、LCDR2、LCDR3を含む軽鎖可変領域(V_L)と、V_HまたはV_LのCDRに移植されたIL-2分子またはその断片と、を含み、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性T細胞よりもTエフェクター細胞を優先的に拡大させる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域HCDR1、HCDR2、HCDR3を含む、重鎖可変領域(V_H)と、LCDR1、LCDR2、LCDR3を含む軽鎖可変領域(V_L)と、V_HまたはV_LのCDRに移植されたIL-2分子またはその断片と、を含み、IL-2分子は、ムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性T細胞よりもTエフェクター細胞を優先的に拡大させる。いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、0.10mg/日~50mg/日の用量で、1、2、4、6、7、14、または21日毎に、配列番号29及び配列番号38からなる群から選択される重鎖と、配列番号37及び配列番号39からなる群から選択される軽鎖と、を含む抗体、またはその断片、バリエーション、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

30

【1809】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質は、アルデスロイキン(Proleukin(登録商標))または同等の分子などであるがこれらに限定されない野生型IL-2分子よりも長い血清半減期を有する。

40

【1810】

いくつかの実施形態では、骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンの前述の実施形態で使用されるTIL注入は、本明細書に記載の任意のTIL組成物であってもよく、また、TIL注入の代わりにMIL及びPBLの注入、ならびに本明細書に記載のIL-2レジメンの追加及び併用療法(PD-1及び/またはPD-L1阻害剤及び/またはCTLA-4阻害剤など)の投与も含み得る。

【実施例】

【1811】

50

本明細書に包含される実施形態は、ここで以下の実施例を参照して説明される。これらの実施例は、例示のみを目的として提供されており、本明細書に包含される本開示は、決してこれらの実施例に限定されると解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書で提供される教示の結果として明らかになるありとあらゆる変形を包含すると解釈されるべきである。

【1812】

実施例1：REP前プロセス及びREPプロセスのための培地の調製

この実施例は、様々な固体腫瘍に由来する腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の培養を含むプロトコルで使用するための組織培養培地の調製手順を説明する。この培地を、本出願及び実施例に記載のTILのうちのいずれかの調製に使用することができる。

10

【1813】

CM1の調製。以下の試薬を冷蔵から取り出し、37℃の水浴（RPMI 1640、ヒトAB血清、200mM L-グルタミン）中で温めた。濾過される容量に適した0.2µmフィルターユニットの上部に各成分を添加することによって、以下の表34に従ってCM1培地を調製した。4℃で保存する。

【表34】

表34. CM1の調製

成分	最終濃度	最終体積500mL	最終体積1L
RPMI 1640	NA	450mL	900mL
ヒトAB血清、熱不活性化10%	50mL	100mL	
200mM L-グルタミン	2mM	5mL	10mL
55mM BME	55µM	0.5mL	1mL
50mg/mL 硫酸ゲンタマイシン	50µg/mL	0.5mL	1mL

20

30

【1814】

使用日に、37℃の水浴中で必要量のCM1を事前に温め、6000IU/mLのIL-2を添加した。

【1815】

表35に従って、必要に応じて追加の補充を行ってもよい。

40

50

【表 3 5】

表 3 5. 必要に応じたCM1の追加の補充。

サプリメント	ストック濃度	希釈	最終濃度
G l u t a M A X (商標)	2 0 0 m M	1 : 1 0 0	2 m M
ペニシリン／ストレプトマイシン	1 0, 0 0 0 U / m L ペニシリン 1 0, 0 0 0 μ g / m L ストレプトマイシン	1 : 1 0 0	1 0 0 U / m L ペニシリン 1 0 0 μ g / m L ストレプトマイシン
アンホテリシンB	2 5 0 μ g / m L	1 : 1 0 0	2 . 5 μ g / m L

10

【1 8 1 6】

C M 2 の調製

調製したC M 1を冷蔵庫から取り出すか、新鮮なC M 1を調製する。A I M - V (登録商標)を冷蔵庫から取り出し、調製したC M 1を滅菌培地ボトル内で等体積のA I M - V (登録商標)と混合することによって、必要な量のC M 2を調製した。使用日に3 0 0 0 I U / m LのI L - 2をC M 2培地に追加した。使用日に3 0 0 0 I U / m LのI L - 2を含む十分な量のC M 2を作製した。C M 2培地ボトルにその名前、調製者のイニシャル、濾過／調製日、2週間の有効期限をラベル付けし、組織培養に必要なまで4℃で保存した。

20

【1 8 1 7】

C M 3 の調製

使用が必要になった日にC M 3を調製した。C M 3は、A I M - V (登録商標)培地と同じであり、使用日に3 0 0 0 I U / m LのI L - 2を補充した。I L - 2ストック溶液をA I M - Vのボトルまたはバッグに直接追加することによって、実験のニーズに十分な量のC M 3を調製した。穏やかに振盪することによって十分に混合した。ボトルに、A I M - Vに追加した直後に「3 0 0 0 I U / m L I L - 2」とラベル付けする。過剰なC M 3が存在する場合は、培地名、調製者のイニシャル、培地を調製した日、及びその有効期限(調製後7日)でラベル付けしたボトル内で4℃で保存した。4℃で7日間保存した後、I L - 2を補充した培地を廃棄した。

30

【1 8 1 8】

C M 4 の調製

C M 4は、C M 3と同じであり、2 m M G l u t a M A X (商標) (最終濃度)を追加で補充した。1 LのC M 3毎に、1 0 m Lの2 0 0 m M G l u t a M A X (商標)を添加する。I L - 2ストック溶液及びG l u t a M A X (商標)ストック溶液をA I M - Vのボトルまたはバッグに直接添加することによって、実験のニーズに十分な量のC M 4を調製した。穏やかに振盪することによって十分に混合した。ボトルに、A I M - Vに追加した直後に「3 0 0 0 I L / m L I L - 2 及び G l u t a M A X」とラベル付けした。過剰なC M 4が存在する場合は、培地名、「G l u t a M A X」、及びその有効期限(調製後7日)をラベル付けしたボトル内で4℃で保存した。4℃で7日間より長く保存した後、I L - 2を補充した培地を廃棄した。

40

【1 8 1 9】

実施例 2 : I L - 2、I L - 1 5、及びI L - 2 1 サイトカインカクテルの使用

この実施例は、本明細書の実施例のいずれかのT I Lプロセスと組み合わせた、追加のT細胞成長因子として機能するI L - 2、I L - 1 5、及びI L - 2 1 サイトカインの使

50

用を説明する。

【1820】

本明細書に記載のプロセスを使用して、TILは、培養の開始時に、実験の一方のアームにおいてIL-2の存在下で腫瘍から、及びもう一方のアームではIL-2の代わりにIL-2、IL-15、及びIL-21の組み合わせから成長させることができる。REP前の完了時に、培養物を、拡大、表現型、機能(CD107a+及びIFN-γ)、及びTCR Vβレパートリーについて評価した。IL-15及びIL-21は、本明細書の他の場所及びSantegoets, et al., J. Transl. Med., 2013, 11, 37に記載されている。

【1821】

結果は、IL-2、IL-15、及びIL-21処理条件でのCD4⁺及びCD8⁺細胞の両方で、IL-2のみの条件と比較して増強したTIL拡大(>20%)が観察できることを示し得る。IL-2単独培養物と比較して、IL-2、IL-15、及びIL-21で処理した培養物から取得されたTILには、歪んだTCR Vβレパートリーを伴う主にCD8⁺集団への歪みがあった。IFN-γ及びCD107aは、IL-2のみで処理されたTILと比較して、IL-2、IL-15、及びIL-21で処理されたTILで上昇した。

【1822】

実施例3：ガンマ線照射末梢単核細胞の個々のロットを適格性確認する

この実施例は、本明細書に記載の例示的な方法において同種異系フィーダー細胞として使用するためのガンマ線照射末梢単核細胞(PBMC、単核細胞またはMNCとしても知られる)の個々のロットを適格性確認するための簡略化された手順を説明する。

【1823】

照射された各MNCフィーダーロットは、個々のドナーから調製した。各ロットまたはドナーは、精製された抗CD3(クローンOKT3)抗体及びインターロイキン-2(IL-2)の存在下でREP内のTILを拡大する能力について個々にスクリーニングした。更に、フィーダー細胞の各ロットを、TILを添加せずに試験し、受けたガンマ線の線量がそれらを複製不全にするのに十分であることを確認した。

【1824】

TILのREPには、ガンマ線を照射し、成長を停止させたMNCフィーダー細胞が必要である。フィーダーMNCの膜受容体は、抗CD3(クローンOKT3)抗体に結合し、REPフラスコ内のTILに架橋し、TILを刺激して拡大させる。フィーダーロットは、個々のドナーから採取した全血の白血球アフェレーシスから調製した。白血球アフェレーシス生成物を、Ficoll-Hypaque上で遠心分離し、洗浄し、照射し、GMP条件下で凍結保存した。

【1825】

TIL療法を受けた患者には、移植片対宿主病(GVHD)を引き起こす可能性があるため、生存可能なフィーダー細胞を注入しないことが重要である。したがって、フィーダー細胞は、細胞にガンマ線を照射することによって成長を停止させ、再培養時に二本鎖DNA切断が起こり、MNC細胞の細胞生存性が喪失する。

【1826】

フィーダーロットを、2つの基準：(1)共培養でTILを100倍超拡大する能力、及び(2)複製不全で評価した。

【1827】

フィーダーロットを、直立したT25組織培養フラスコ内で成長した2つの主要なREP前TIL株を利用して、mini-REP形式で試験した。各TIL株は、REPでの活性化に応答して増殖する能力が独特であるため、フィーダーロットを、2つの異なるTIL株に対して試験した。対照として、上記の基準を満たすことが歴史的に示されている多くの照射されたMNCフィーダー細胞を、試験ロットと並行して実行した。

【1828】

1 回の実験で試験された全てのロットが同等の試験を受けることを保証するために、全ての条件及び全てのフィーダーロットを試験するために、同じ R E P 前 T I L 株の十分なストックが利用可能であった。

【1829】

試験したフィーダー細胞の各ロットに、合計 6 つの T 2 5 フラスコがあった：R E P 前 T I L 株 # 1 (2 フラスコ)、R E P 前 T I L 株 # 2 (2 フラスコ)、及びフィーダー対照 (2 フラスコ)。T I L 株番号 1 及び番号 2 を含むフラスコは、フィーダーロットが T I L を拡大する能力を評価した。フィーダー対照フラスコは、フィーダーロットの複製不全を評価した。

【1830】

A. 実験プロトコル

− 2 / 3 日目、T I L 株の解凍 C M 2 培地を調製し、C M 2 を 3 7 °C の水浴中で温める。3 0 0 0 I U / m L の I L − 2 を補充した 4 0 m L の C M 2 を調製する。使用まで保温する。I L − 2 を含まない 2 0 m L の予熱した C M 2 を、使用した T I L 株の名前がラベル付けされた 2 本の 5 0 m L コニカルチューブの各々に入れる。L N 2 ストレージから 2 つの指定された R E P 前 T I L 株を取り出し、バイアルを組織培養室に移した。少量の氷が残るまで、3 7 °C の水浴内の密封されたジップーストレージバッグ内にバイアルを入れて解凍した。

【1831】

無菌トランスファーピペットを使用して、各バイアルの内容物を、調製した、ラベル付けされた 5 0 m L のコニカルチューブ中の 2 0 m L の C M 2 に直ちに移した。細胞を洗浄し、4 0 0 × C F で 5 分間遠心分離するために、I L − 2 なしの C M 2 を使用して 4 0 m L に Q S。上清を吸引し、3 0 0 0 I U / m L の I L − 2 で補充された 5 m L の温かい C M 2 に再懸濁した。

【1832】

自動セルカウンターを使用して細胞を計数するために、少量のアリコート (2 0 μ L) を重複して取り出した。計数を記録した。計数しながら、T I L 細胞を含む 5 0 m L のコニカルチューブを、加湿した 3 7 °C、5 % C O ₂ インキュベーターに入れ、ガス交換を可能にするためにキャップを緩めた。細胞濃度を決定し、T I L を、3 0 0 0 I U / m L の I L − 2 を補充した C M 2 中で 1×10^6 細胞 / m L に希釈した。

【1833】

m i n i − R E P の 0 日目まで、加湿した 3 7 °C のインキュベーターで必要な数のウェルにおいて、2 4 ウェル組織培養プレートの 1 ウェル当たり 2 m L で培養した。混乱及び潜在的な相互汚染を避けるために、別々の 2 4 ウェル組織培養プレートで異なる T I L 株を培養した。

【1834】

0 日目、M i n i − R E P を開始する試験されるフィーダーロットの数に十分な C M 2 培地を調製した (例えば、一度に 4 つのフィーダーロットを試験するために、8 0 0 m L の C M 2 培地を調製した)。上記で調製した C M 2 の一部を等分し、細胞培養のために 3 0 0 0 I U / m L の I L − 2 で補充した (例えば、4 つのフィーダーロットを一度に試験するために、3 0 0 0 I U / m L の I L − 2 で 5 0 0 m L の C M 2 培地を調製する)。

【1835】

相互汚染を防ぐために各 T I L 株を別々に操作し、T I L 培養物を入れた 2 4 ウェルプレートをインキュベーターから取り出し、B S C に移した。

【1836】

無菌トランスファーピペットまたは 1 0 0 ~ 1 0 0 0 μ L ピペッター及びチップを使用して、約 1 m L の培地を、使用される T I L の各ウェルから取り出し、2 4 ウェル組織培養プレートの未使用のウェルに入れる。

【1837】

新鮮な無菌トランスファーピペットまたは 1 0 0 ~ 1 0 0 0 μ L ピペッター及びチップ

10

20

30

40

50

を使用して、残りの培地をウェル内の T I L と混合して細胞を再懸濁し、次いで細胞懸濁液を、T I L ロット名のラベルが付いた 5 0 m L コニカルチューブに移し、容量を記録した。

【1 8 3 8】

予備の培地でウェルを洗浄し、その容量を同じ 5 0 m L コニカルチューブに移した。細胞を 4 0 0 × C F で回転させて、細胞ペレットを収集する。培地上清を吸引除去し、3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 を含有する 2 ~ 5 m L の C M 2 培地に細胞ペレットを再懸濁し（採取したウェルの数及びペレットのサイズに基づいて使用される容量）、容量は、 1.3×10^6 細胞 / m L を超える濃度を保証するのに十分である必要がある。

【1 8 3 9】

血清学的ピペットを使用して、細胞懸濁液を十分に混合し、容量を記録した。自動セルカウンターを使用して細胞を計数するために、2 0 0 μ L を取り出した。計数しながら、T I L 細胞を含む 5 0 m L のコニカルチューブを、加湿した 5 % C O ₂、3 7 °C インキュベーターに入れ、ガス交換を可能にするためにキャップを緩めた。計数を記録した。

【1 8 4 0】

T I L 細胞を含有する 5 0 m L のコニカルチューブをインキュベーターから取り出し、3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 で補充された温かい C M 2 中、 1.3×10^6 細胞 / m L の濃度でそれらの細胞を再懸濁した。キャップを緩めた状態で、5 0 m L のコニカルチューブをインキュベーターに戻した。

【1 8 4 1】

第 2 の T I L 株について、上記のステップを繰り返した。

【1 8 4 2】

T I L を実験用の T 2 5 フラスコに入れる直前に、T I L を、以下の通り 1 : 1 0 に希釈して 1.3×10^5 細胞 / m L の最終濃度にした。

【1 8 4 3】

M A C S G M P C D 3 ピュア (O K T 3) 作用溶液を調製する O K T 3 のストック溶液 (1 m g / m L) を 4 °C の冷蔵庫から取り出し、B S C に入れた。mini-REP の培地では、最終濃度 3 0 n g / m L の O K T 3 を使用した。

【1 8 4 4】

実験の各 T 2 5 フラスコ内の 2 0 m L に対して 6 0 0 n g の O K T 3 が必要であり、これは、2 0 m L 毎に 6 0 μ L の 1 0 μ g / m L 溶液、または各フィーダーロットについて試験した 6 つのフラスコ全てで 3 6 0 μ L に相当する。

【1 8 4 5】

試験した各フィーダーロットについて、4 0 0 μ L の 1 : 1 0 0 希釈の 1 m g / m L O K T 3 を、1 0 μ g / m L の作業濃度で作製した（例えば、4 つのフィーダーロットを一度に試験する場合、1 6 0 0 μ L の 1 : 1 0 0 希釈の 1 m g / m L O K T 3 : 1 6 μ L の 1 m g / m L O K T 3 + 3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 を含む 1 . 5 8 4 m L の C M 2 培地を作製する）。

【1 8 4 6】

T 2 5 フラスコを調製するフィーダー細胞を調製する前に、各フラスコにラベルを付け、フラスコに C M 2 培地を充填した。フラスコを 3 7 °C の加湿した 5 % C O ₂ インキュベーターに入れ、残りの成分を添加するのを待つ間、培地を保温した。一旦フィーダー細胞が調製されると、各フラスコ内の C M 2 に成分が添加される。

【1 8 4 7】

更なる情報を表 3 6 に提供する。

10

20

30

40

50

【表 3 6】

表 3 6. 溶液情報。

成分	共培養フラスコ 内の容量	対照（フィーダ ーのみ）フラス コ内の容量
CM2 + 3 0 0 0 IU / mL の IL-2	1 8 mL	1 9 mL
MNC : CM2 + 3 0 0 0 IU の IL-2 中 1.3×10^7 / mL (最終濃度 1.3×10^7 / フラスコ)	1 mL	1 mL
OKT3 : CM2 中 $10 \mu\text{L}$ / mL = 3 0 0 0 IU IL-2	$60 \mu\text{L}$	$60 \mu\text{L}$
TIL : 3 0 0 0 IU の IL-2 を含む C M2 中の 1.3×10^5 / mL (最終濃度 1.3×10^5 / フラスコ)	1 mL	0

10

20

【1 8 4 8】

フィーダー細胞を調製する。このプロトコルについて試験されたロット当たり 78×10^6 フィーダー細胞の最小値が必要であった。SDBBによって凍結された各 1 mL バイアルは、凍結時に 100×10^6 個の生細胞を有していた。液体 N_2 ストレージからの解凍時の 50% の回収率を仮定すると、ロット当たり少なくとも 2 つの 1 mL バイアルのフィーダー細胞を解凍して、各 REP に推定 100×10^6 個の生細胞を与えることが推奨された。代替的に、1.8 mL バイアルで供給された場合、1 つのバイアルだけで十分なフィーダー細胞が提供された。

【1 8 4 9】

フィーダー細胞を解凍する前に、試験される各フィーダーロットに IL-2 を含まないおよそ 50 mL の CM2 を予熱した。指定されたフィーダーロットバイアルを LN_2 ストレージから取り出し、ジッパーストレージバッグに入れ、氷上に置いた。37°C の水浴に浸すことによって、閉じたジッパーストレージバッグ内のバイアルを解凍した。バイアルをジッパーストレージバッグから取り出し、70% EtOH でスプレーまたはワイプし、BSC に移した。

30

【1 8 5 0】

トランスファーピペットを使用して、フィーダーバイアルの内容物を、50 mL のコニカルチューブ中の 30 mL の温かい CM2 に直ちに移した。バイアルを少量の CM2 で洗浄して、バイアル内の残留細胞を除去し、 $400 \times \text{CF}$ で 5 分間遠心分離した。上清を吸引し、3000 IU / mL の IL-2 を加えた 4 mL の温かい CM2 に再懸濁した。自動セルカウンターを使用して細胞を計数するために、 $200 \mu\text{L}$ を取り出した。計数を記録した。

40

【1 8 5 1】

3000 IU / mL の IL-2 を加えた温かい CM2 中、 1.3×10^7 細胞 / mL で細胞を再懸濁した。TIL 細胞を 1.3×10^6 細胞 / mL から 1.3×10^5 細胞 / mL に希釈した。

【1 8 5 2】

共培養物を準備する。TIL 細胞を 1.3×10^6 細胞 / mL から 1.3×10^5 細胞 / mL に希釈した。4.5 mL の CM2 培地を 15 mL のコニカルチューブに添加した。インキュベーターから TIL 細胞を取り出し、10 mL の血清ピペットを使用して十分に

50

再懸濁した。1. 3×10^6 細胞/mL の T I L 懸濁液から 0.5 mL の細胞を取り出し、15 mL のコニカルチューブ中の 4.5 mL の培地に添加した。T I L ストックバイアルをインキュベーターに戻した。よく混ぜた。第 2 の T I L 株に対して繰り返した。

【1853】

単一フィーダーロット用に予熱した培地を入れたフラスコを、インキュベーターから B S C に移した。1 mL のピペットチップで数回上下にピペッティングすることによってフィーダー細胞を混合し、そのフィーダーロットの各フラスコに 1 mL (1.3×10^7 細胞) を移した。60 μ L の O K T 3 作用ストック (10 μ g/mL) を各フラスコに追加した。2 つの対照フラスコをインキュベーターに戻した。

【1854】

各 T I L ロットの 1 mL (1.3×10^5) を、対応するラベルの付いた T 2 5 フラスコに移した。フラスコをインキュベーターに戻し、直立させてインキュベートした。5 日目まで乱さなかった。試験した全てのフィーダーロットについて、この手順を繰り返した。

【1855】

5 日目、培地変更 3000 I U/mL の I L - 2 で C M 2 を調製した。各フラスコには 10 mL が必要である。10 mL ピペットを使用して、3000 I U/mL の I L - 2 を含む 10 mL の温かい C M 2 を各フラスコに移した。フラスコをインキュベーターに戻し、7 日目まで直立させてインキュベートした。試験した全てのフィーダーロットについて繰り返した。

【1856】

7 日目、採取インキュベーターからフラスコを取り出し、B S C に移し、フラスコの底部の細胞層を乱さないように注意する。フラスコの底部で成長する細胞を乱すことなく、各試験フラスコから 10 mL の培地を取り出し、対照フラスコの各々から 15 mL の培地を取り出した。

【1857】

10 mL の血清ピペットを使用して、残りの培地に細胞を再懸濁し、よく混合して細胞の塊を全て破壊した。ピペッティングすることによって細胞懸濁液を完全に混合した後、細胞計数のために 200 μ L を取り出した。自動セルカウンター装置とともに適切な標準操作手順を使用して、T I L を計数した。7 日目に計数を記録した。試験した全てのフィーダーロットについて、この手順を繰り返した。

【1858】

フィーダー対照フラスコは、複製不全について評価し、T I L を含むフラスコは、0 日目からの倍率拡大について評価した。

【1859】

7 日目、フィーダー対照フラスコの 14 日目までの継続フィーダー対照フラスコの 7 日目の計数を完了した後、3000 I U/mL の I L - 2 を含む 15 mL の新鮮な C M 2 培地を対照フラスコの各々に追加した。対照フラスコをインキュベーターに戻し、14 日目まで直立位置でインキュベートした。

【1860】

14 日目、フィーダー対照フラスコの長期非増殖インキュベーターからフラスコを取り出し、B S C に移し、フラスコの底部の細胞層を乱さないように注意した。フラスコの底部で成長する細胞を乱すことなく、各対照フラスコからおよそ 17 mL の培地を取り出した。5 mL の血清ピペットを使用して、残りの培地に細胞を再懸濁し、よく混合して細胞の塊を全て破壊した。各フラスコについて、容量を記録した。

【1861】

ピペッティングすることによって細胞懸濁液を完全に混合した後、細胞計数のために 200 μ L を取り出した。T I L は、自動セルカウンター装置と併せて適切な標準操作手順を使用して計数し、計数を記録した。試験した全てのフィーダーロットについて、この手順を繰り返した。

10

20

30

40

50

【1862】

B. 結果及び承認基準プロトコル

結果ガンマ線照射の線量は、フィーダー細胞を複製不全にするのに十分であった。全てのロットは、評価基準を満たすことが予想され、また0日目と比較して、REP培養の7日目に残っているフィーダー細胞の総有効数の低減を示した。全てのフィーダーロットは、REP培養の7日目までのTIL成長の100倍拡大の評価基準を満たすことが予想された。フィーダー対照フラスコの14日目の計数は、7日目に見られた非増殖傾向を継続すると予想された。

【1863】

承認基準フィーダー細胞の各ロットについて試験された各複製TIL株について、以下の承認基準が満たされた。承認基準は、以下の表37に示すように、2倍であった。

【表37】

表37. 承認基準の実施形態。

試験	承認基準
MNCの照射及び複製不全	7日目及び14日目に成長は観察されなかった
TIL拡大	各TILの少なくとも100倍の拡大（最低 1.3×10^7 個の生細胞）

【1864】

30 ng/mLのOKT3抗体及び3000 IU/mLのIL-2の存在下で培養した場合に、MNCフィーダー細胞の複製を不全にするのに十分な放射線量を評価した。複製不全は、REPの7日目及び14日目の自動細胞計数によって決定された総生細胞数（TVC）によって評価した。

【1865】

承認基準は、「成長なし」であり、これは、REPの0日目に培養された最初の生細胞数から7日目及び14日目に総生細胞数が増加していないことを意味する。

【1866】

フィーダー細胞がTIL拡大をサポートする能力を評価した。TIL成長は、REPの0日目の培養開始からREPの7日目までの生細胞の倍率拡大の観点から測定された。自動細胞計数によって評価されるように、7日目に、TIL培養物は最低100倍の拡大を達成した（すなわち、REPの0日目に培養された生TIL細胞の総数の100倍超）。

【1867】

承認基準を満たさないMNCフィーダーロットの偶発性試験MNCフィーダーロットが上で概説された承認基準のうちのいずれかを満たさなかった場合は、以下のステップを実行してロットを再試験し、単純な実験者エラーを原因として除外する。

【1868】

ロットの衛星試験バイアルが2つ以上残っている場合は、ロットを再試験した。ロットの衛星試験バイアルが1つ残っているか、まったく残っていない場合、上記の承認基準に従ってロットは失敗であった。

【1869】

適格となるには、問題のロット及び対照ロットが、上記の承認基準を達成する必要があった。これらの基準を満たすと、ロットは使用のために放出される。

【1870】

実施例4：IL-2ストック溶液の調製

この実施例は、精製されて凍結乾燥された組換えヒトインターロイキン-2を、rhI

L-2の使用を含むものを含む、本出願及び実施例に記載されるもの全てを含む、更なる組織培養プロトコルでの使用に好適なストック試料に溶解するプロセスを説明する。

【1871】

手順。0.2%酢酸溶液(HAc)を調製した。29mLの滅菌水を、50mLのコニカルチューブに移した。50mLのコニカルチューブに1mLの1N酢酸を添加した。チューブを2~3回反転させながら十分に混合した。Steriflipフィルターを使用した濾過によってHAc溶液を滅菌した。

【1872】

PBS中の1%HSAを調製する。4mLの25%HSAストック溶液を、150mLの滅菌フィルターユニット内の96mLのPBSに添加した。溶液を濾過した。4℃で保存した。調製したrhIL-2の各バイアルについて、フォームに記入する。

10

【1873】

rhIL-2ストック溶液を調製した(最終濃度 6×10^6 IU/mL)。rhIL-2の各ロットは異なり、1) 1バイアル当たりのrhIL-2の質量(mg)、2) rhIL-2の比活性(IU/mg)、及び3) 推奨される0.2%HAc再構成体積(mL)などの製造業者の分析証明書(COA)に見られる情報を必要とした。

【1874】

以下の等式を使用して、rhIL-2ロットに必要な1%HSAの体積を計算した。

【数1】

$$\left(\frac{\text{バイアル質量(mg)} \times \text{生物学的活性} \left(\frac{\text{IU}}{\text{mg}} \right)}{6 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mL}}} \right) - \text{HAcの体積(mL)} = 1\% \text{HSAの体積(mL)}$$

20

【1875】

例えば、rhIL-2ロット10200121(Cellgenix)のCOAによると、1mgバイアルの比活性は、 25×10^6 IU/mgである。rhIL-2を2mLの0.2%HAc中で再構成することが推奨される。

【数2】

$$\left(\frac{1\text{mg} \times 25 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mg}}}{6 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mL}}} \right) - 2\text{mL} = 2.167\text{mL HSA}$$

30

【1876】

IL-2バイアルのゴム栓をアルコールワイプで拭いた。3mLシリンジに取り付けた16G針を使用して、推奨体積の0.2%HAcをバイアルに注入した。針を抜くときに栓が外れないように注意した。バイアルを3回反転させ、全ての粉末が溶解するまで回転させた。栓を慎重に取り外し、アルコールワイプ上に置いた。計算した体積の1%HSAをバイアルに追加した。

40

【1877】

rhIL-2溶液の保存。短期保存(72時間未満)の場合、4℃でバイアルを保存した。長期保存(72時間超)の場合、バイアルをより小さい体積に等分し、使用の準備が整うまで-20℃でクライオバイアル内で保存した。凍結/解凍サイクルを回避した。調製日から6カ月後に有効期限が切れた。Rh-IL-2ラベルに、ベンダー及びカタログ番号、ロット番号、有効期限、オペレーターのイニシャル、濃度、ならびにアリコート体積を含めた。

50

【1878】

実施例5：凍結保存プロセス

この実施例では、CryoMed制御速度冷凍庫、モデル7454（Thermo Scientific）を使用して、本明細書に記載の手順で調製したTILの凍結保存プロセス方法について説明する。

【1879】

使用した機器は以下の通りであった：アルミニウムカセットホルダーラック（CS750フリーザーバッグに対応）、750mLバッグ用凍結保存カセット、低圧（22psi）液体窒素タンク、冷蔵庫、熱電対センサー（バッグ用リボンタイプ）、及びCryostore CS750冷凍バッグ（Origon Scientific）。 10

【1880】

凍結プロセスは、核形成から−20℃まで0.5℃の速度、及び−80℃の終了温度まで毎分1℃の冷却速度を提供する。プログラムパラメータは、以下の通りである：ステップ1：−4℃で待つ、ステップ2：−4℃まで1.0℃/分（試料温度）、ステップ3：−45℃まで20.0℃/分（チャンバ温度）、ステップ4：−10.0℃まで10.0℃/分（チャンバ温度）、ステップ5：−20℃まで0.5℃/分（チャンバ温度）、及びステップ6：−80℃まで1.0℃/分（試料温度）。

【1881】

実施例6：合成培地を用いた腫瘍拡大プロセス

上記で開示されるプロセスは、CM1培地及びCM2培地を、合成培地（例えば、CTS（商標）Optmizer（商標）T-Cell Expansion SFM、ThermoFisher、例えば、DM1及びDM2を含む）で置き換えることによって行われ得る。 20

【1882】

実施例7：凍結保存TIL細胞療法の例示的Gen2生成

この実施例は、Iovance Biotherapeutics, Inc. のcGMP製造を説明する。現在の適正組織基準及び現在の適正製造基準に従った、G-REXフラスコ内のTIL細胞療法プロセス。この実施例は、現在の適正組織基準及び現在の適正製造基準に従った、G-REXフラスコ内のTIL細胞療法プロセスの例示的なcGMP製造を説明する。 30

【表 3 8】

表 3 8. プロセス拡大の例示的な計画。

推定日 (播種後)	活性	標的基準	予想される容器	推定総体積 (mL)
0	腫瘍解剖	G-R E X-1 0 0 M C S 当たり ≤ 50 個の望ましい 腫瘍断片	G-R E X-1 0 0 M C S 1 フラスコ	$\leq 1 0 0 0$
1 1	R E P 播種	G-R E X-5 0 0 M C S 当たり $5 \sim 200 \times 10^6$ 個の生細胞	G-R E X-5 0 0 M C S 1 フラスコ	$\leq 5 0 0 0$
1 6	R E P 分割	G-R E X-5 0 0 M C S 当たり 1×10^9 個の生細胞	G-R E X-5 0 0 M C S ≤ 5 フラスコ	$\leq 2 5 0 0 0$
2 2	採取	全利用可能な細胞	3 ~ 4 つの C S-7 5 0 バッグ	$\leq 5 3 0$

10

20

【表 3 9】

表 3 9. フラスコ容積

フラスコタイプ	作業体積/フラスコ (mL)
G-R E X-1 0 0 M C S	1 0 0 0
G-R E X-5 0 0 M C S	5 0 0 0

30

【1 8 8 3】

0 日目の C M 1 培地の調製 B S C 内で、試薬を R P M I 1 6 4 0 培地ボトルに追加した。ボトル当たり追加された以下の試薬を追加した：不活化ヒト A B 血清 (1 0 0 . 0 m L)、G l u t a M a x (商標) (1 0 . 0 m L)、硫酸ゲンタマイシン、5 0 m g / m L (1 . 0 m L)、2-メルカプトエタノール (1 . 0 m L) を加熱する

【1 8 8 4】

B S C から不要な材料を取り出した。B S C から培地試薬を抜き取り、配合された洗浄培地の調製のために硫酸ゲンタマイシン及び H B S S を B S C の中に残した。

【1 8 8 5】

I L-2 アリコートを解凍した。全ての氷が融解するまで、1 つの 1 . 1 m L の I L-2 アリコート (6×10^6 I U / m L) (B R 7 1 4 2 4) を解凍した。I L-2 : ロット番号及び有効期限を記録した。

40

【1 8 8 6】

I L-2 ストック溶液を培地に移した。B S C 内で、1 . 0 m L の I L-2 ストック溶液を、調製された C M 1 の 0 日目培地ボトルに移した。C M 1 の 0 日目培地 1 ボトル及び I L-2 (6×10^6 I U / m L) 1 . 0 m L を追加した。

【1 8 8 7】

G-R E X 1 0 0 M C S を B S C の中に通過させた。無菌的に G-R E X 1 0 0 M C S (W 3 0 1 3 1 3 0) を B S C の中に通過させた。

【1 8 8 8】

50

全ての完全なCM1の0日目培地をG-R EX 100 MCS フラスコにポンプで注入した。組織断片円錐形またはG R e x 100 MCS。

【1889】

0日目の腫瘍洗浄培地の調製BSC内で、5.0mLのゲンタマイシン(W3009832またはW3012735)を1本の500mLのHBSS培地(W3013128)ボトルに追加した。ボトル当たりの追加:HBSS(500.0mL)、硫酸ゲンタマイシン、50mg/mL(5.0mL)。1Lの0.22ミクロンフィルターユニット(W1218810)を通して調製されたゲンタマイシンを含有するHBSSを濾過した。

【1890】

0日目の腫瘍処理腫瘍検体を取得し、即時に処理のために2~8℃における部屋に移した。腫瘍洗浄培地を等分した。腫瘍洗浄1は、8インチ鉗子(W3009771)を使用して行う。腫瘍を検体ボトルから取り出し、調製した「洗浄1」皿に移す。この後、腫瘍洗浄2及び腫瘍洗浄3が続く。腫瘍を測定し、評価した。腫瘍領域全体の30%未満が壊死及び/または脂肪組織であることが観察されたかどうかを評価した。該当する場合、クリーンアップ解剖を行う。腫瘍が大きく、外部の組織の30%未満が壊死/脂肪性であることが観察された場合、メス及び/または鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍の内側構造を温存しながら壊死/脂肪組織を除去することによって、「クリーンアップ解剖」を行った。腫瘍を切除した。メス及び/または鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍検体を均等で適切なサイズの断片(最大6つの中間断片)に切断した。中間腫瘍断片を移した。腫瘍断片を、およそ3×3×3mmのサイズの小片に切除した。乾燥を防止するために中間断片を保存した。中間断片の解剖を繰り返した。収集された切片の数を決定した。望ましい組織が残っている場合、「好ましい中間断片」6ウェルプレートから追加の好ましい腫瘍片を選択し、最大50片のために液滴を充填した。

【1891】

コニカルチューブを準備した。腫瘍片を50mLのコニカルチューブに移した。G-R EX 100 MCSのためのBSCを準備した。インキュベーターからG-R EX 100 MCSを取り出した。無菌的にG-R EX 100 MCS フラスコをBSCの中に通過させた。腫瘍断片をG-R EX 100 MCS フラスコに追加した。切片を均等に分配した。

【1892】

以下のパラメータにおいてG-R EX 100 MCSをインキュベートした:G-R EX フラスコをインキュベートした:温度LEDディスプレイ:37.0±2.0℃、CO₂パーセンテージ:5.0±1.5%CO₂。計算:培養の時間、下限=培養の時間+252時間、上限=培養の時間+276時間。

【1893】

プロセスが完了した後、いずれの残りの温められた培地も廃棄し、IL-2のアリコートを解凍した。

【1894】

11日目-培地の調製インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ:温度LEDディスプレイ:37.0±2.0℃、CO₂パーセンテージ:5.0±1.5%CO₂。

【1895】

3本の1000mLのRPMI1640培地(W3013112)ボトル及び3本の1000mLのAIM-V(W3009501)ボトルを、インキュベーター内で30分以上温めた。インキュベーターからRPMI1640培地を取り出した。RPMI1640培地を調製した。培地を濾過した。3つのIL-2の1.1mLのアリコート(6×106IU/mL)(BR71424)を解凍した。インキュベーターからAIM-V培地を取り出した。IL-2をAIM-Vに追加した。10LのLab tainer バッグ及びリピータポンプ移送セットを、BSCの中に無菌的に移した。

【1896】

10LのLab tainer 培地バッグを準備した。Baxaポンプを準備した。10

10

20

30

40

50

LのLabtainer培地バッグを準備した。培地を10LのLabtainerにポンプで注入した。Labtainerバッグからポンプマティックを取り出した。

【1897】

培地を混合した。バッグを穏やかにマッサージして混合した。試料計画に従って培地を試料採取した。20.0mLの培地を取り出し、50mLのコニカルチューブに入れた。細胞計数希釈管を準備した。BSCに、「細胞計数希釈液用」及びロット番号でラベル付けされた4.5mLのAIM-V培地を、4本の15mLコニカルチューブに追加した。試薬をBSCから2~8℃に移した。1L移送パックを準備した。(プロセス注記5.11に従って)BSC溶接の外側で、「完全なCM2の11日目培地」バッグに取り付けられた移送セットへの1L移送パックを準備した。フィーダー細胞移送パックを準備した。完全なCM2の11日目培地をインキュベートした。

10

【1898】

11日目-TIL採取前処理表。インキュベーターパラメータ：温度LEDディスプレイ：37.0±2.0℃、CO₂パーセンテージ：5.0±1.5%CO₂。インキュベーターからG-REX100MCSを取り出した。300mL移送パックを準備した。移送パックをG-REX100MCSに溶接した。

【1899】

TIL採取及びTIL採取の開始のためにフラスコを準備する。TILが採取された。GathereXを使用して、血液フィルターを介して細胞懸濁液を300mLの移送パックに移した。付着した細胞について膜を点検した。

20

【1900】

フラスコ膜をすすいだ。G-REX100MCS上のクランプを閉じた。全てのクランプが閉じられていることを確実にした。TIL及び「上清」移送パックを熱融着した。TIL懸濁液の体積を計算した。試料採取のために上清移送パックを準備した。

【1901】

Bac-T試料を引き出した。BSC内で、1L「上清」移送パックからおおよそ20.0mLの上清を引き上げ、無菌50mLコニカルチューブに分注する。

【1902】

試料計画に従ってBacTを接種した。適切なサイズのシリンジを使用して調製されたBacTとラベル付けされた50mLコニカルから1.0mLの試料を取り出し、嫌気性ボトルに接種した。

30

【1903】

TILをインキュベートした。必要とされるまで、TIL移送パックをインキュベーターに入れた。細胞計数及び計算を行った。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。生存率÷2。生細胞濃度÷2。計数の上限及び下限を決定した。下限：生細胞濃度の平均×0.9。上限：生細胞濃度の平均×1.1。許容限界内の両方の計数を確認した。行われた4つ全ての計数から平均生細胞濃度を決定した。

【1904】

TIL懸濁液の調整された体積：細胞計数試料を取り出した後のTIL懸濁液の調整された体積を計算する。総TIL細胞体積(A)。取り出された細胞計数試料の体積(4.0mL)(B)調整された総TIL細胞体積C=A-B。

40

【1905】

総生TIL細胞を計算した。平均生細胞濃度*：総体積、総生細胞：C=A×B。

【1906】

フローサイトメトリーのための計算：総生TIL細胞数が、 4.0×10^7 以上であった場合、フローサイトメトリー試料のために 1.0×10^7 細胞を取得するための体積を計算した。

【1907】

フローサイトメトリーに必要とされる総生細胞： 1.0×10^7 個の細胞。フローサイトメトリーに必要とされる細胞の体積：生細胞濃度を 1.0×10^7 個の細胞Aで割った

50

もの。

【1908】

2.0 × 10⁸ 個の生細胞に等しい T I L 懸濁液の体積を計算した。必要に応じて、取り出す T I L 細胞の過剰体積を計算し、過剰な T I L を取り出し、必要に応じて T I L をインキュベーターに入れた。必要に応じて、取り出された全過剰 T I L を計算した。

【1909】

凍結のための標的細胞濃度が 1.0 × 10⁸ 細胞 / mL である過剰な T I L 細胞に追加する C S - 10 培地の量を計算した。必要に応じて、過剰な T I L を遠心分離した。コニカルチューブを観察し、C S - 10 を追加した。

【1910】

バイアルを充填した。1.0 mL の細胞懸濁液を、適切なサイズの凍結バイアルに等分した。残留体積を適切なサイズのクライオバイアルに等分した。体積が ≤ 0.5 mL である場合、体積が 0.5 mL になるまで C S 10 をバイアルに追加する。

【1911】

凍結保存のための 1 × 10⁷ 細胞を取得するために必要とされる細胞の体積を計算した。凍結保存のために試料を取り出した。T I L をインキュベーターに入れた。

【1912】

試料の凍結保存コニカルチューブを観察し、C S - 10 をゆっくりと追加し、追加された 0.5 mL の C S 10 の体積を記録した。

【1913】

11 日目 - フィーダー細胞フィーダー細胞を取得した。L N 2 冷凍庫から少なくとも 2 つの異なるロット番号を伴うフィーダー細胞の 3 つのバッグを取得した。解凍する準備が整うまで、細胞をドライアイス上で保存した。水浴または c r y o t h e r m を準備した。37.0 ± 2.0 °C の水浴または c y t o t h e r m において約 3 ~ 5 分間、または氷が消滅するまで、フィーダー細胞を解凍した。インキュベーターから培地を取り出した。解凍されたフィーダー細胞をプールした。フィーダー細胞を移送パックに追加した。シリンジから移送パックにフィーダー細胞を分注した。プールされたフィーダー細胞を混合し、移送パックをラベル付けした。

【1914】

移送パック内のフィーダー細胞懸濁液の総体積を計算した。細胞計数試料を取り出した。各試料に別個の 3 mL シリンジを使用して、不要注入ポートを使用してフィーダー細胞懸濁液移送パックから 4 × 1.0 mL の細胞計数試料を引き出した。各試料をラベル付けされたクライオバイアルに等分した。細胞計数を行い、増倍率を決定し、プロトコルを選択し、増倍率を入力した。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定し、限界内で確認した。

【1915】

フィーダー細胞懸濁液の調整された体積。細胞計数試料を取り出した後のフィーダー細胞懸濁液の調整された体積を計算した。総生フィーダー細胞を計算した。必要に応じて追加のフィーダー細胞を取得した。必要に応じて追加のフィーダー細胞を解凍した。第 4 のフィーダー細胞バッグをジップトップバッグに入れ、37.0 ± 2.0 °C の水浴または c y t o t h e r m 内で約 3 ~ 5 分間解凍し、追加のフィーダー細胞をプールした。体積を測定した。シリンジ内のフィーダー細胞の体積を測定し、以下に記録した (B)。フィーダー細胞の新しい総体積を計算した。フィーダー細胞を移送パックに追加した。

【1916】

必要に応じて希釈液を調製し、4.5 mL の A I M - V 培地を 4 本の 15 mL コニカルチューブに追加した。細胞計数を準備した。各試料に対して別個の 3 mL シリンジを使用して、不要注入ポートを使用して、フィーダー細胞懸濁液移送パックから 4 × 1.0 mL の細胞計数試料を取り出した。細胞計数及び計算を行った。行われた 4 つ全ての計数から平均生細胞濃度を決定した。フィーダー細胞懸濁液の体積を調整し、細胞計数試料を取り出した後のフィーダー細胞懸濁液の調整された体積を計算した。4.0 mL を差し引いた

10

20

30

40

50

総フィーダー細胞体積が取り出された。 5×10^9 個の生フィーダー細胞を取得するために必要とされたフィーダー細胞懸濁液の体積を計算した。過剰なフィーダー細胞体積を計算した。取り出す過剰なフィーダー細胞の体積を計算した。過剰なフィーダー細胞を取り出した。

【1917】

1. 0 mL シリンジ及び16 G 針を使用して、0.15 mL のOKT3を引き上げ、OKT3を追加した。フィーダー細胞懸濁液移送パックを熱融着した。

【1918】

11日目 G-R E X 充填及びシード設定G-R E X 500 M C S。「完全なCM2の11日目培地」をインキュベーターから取り出し、培地をG-R E X 500 M C Sにポンプで注入した。4.5 Lの培地をG-R E X 500 M C Sにポンプで注入し、フラスコ上にマークされたラインまで充填した。必要に応じてフラスコを熱融着し、インキュベートした。フィーダー細胞の懸濁液移送パックを、G-R E X 500 M C Sに溶接した。フィーダー細胞をG-R E X 500 M C Sに追加した。熱融着した。T I L 懸濁液移送パックをフラスコに溶接した。T I L をG-R E X 500 M C Sに追加した。熱融着した。G-R E X 500 M C Sを $37.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ でインキュベートした、CO₂パーセンテージ： $5.0 \pm 1.5\%$ CO₂。

【1919】

インキュベーション時間帯を計算した。16日目にインキュベーターからG-R E X 500 M C Sを取り出すための適切な時間を決定するための計算を行った。下限：インキュベーションの時間+108時間。上限：インキュベーションの時間+132時間。

【1920】

11日目 過剰T I L 凍結保存該当：過剰T I L バイアルを凍結させた。凍結前にC R Fが設定されていることを検証した。凍結保存を行った。バイアルを速度制御された冷凍庫から適切な保存場所に移した。凍結の完了時に、バイアルをC R Fから適切な保存容器に移した。バイアルを適切な保存場所に移した。L N 2における保存場所を記録した。

【1921】

16日目 培地の調製A I M - V 培地を事前に温めた。培地バッグ1、2、及び3について培地が温められた時間を計算した。全てのバッグが12~24時間の持続時間にわたって温められていることを確実にした。上清用の10 LのL a b t a i n e r を設定した。ルアーコネクタを使用して、流体ポンプ移送セットのより大きな直径の端部を10 LのL a b t a i n e r バッグのメス型ポートのうちの1つに取り付けた。上清用の10 LのL a b t a i n e r を設定し、ラベル付けした。上清用の10 LのL a b t a i n e r を設定した。B S C から取り出す前に、全てのクランプが閉じられていることを確実にした。注記：上清バッグは、培地調製と同時に行為れ得るT I L 採取中に使用された。

【1922】

I L - 2 を解凍した。全ての氷が融解するまで、C T S A I M V 培地の1バッグ当たりI L - 2 (6×10^6 I U / mL) (B R 7 1 4 2 4) の 5×1.1 mL アリコート解凍した。100.0 mL のG l u t a M a x (商標) を等分した。I L - 2 をG l u t a M a x (商標) に追加した。配合用のC T S A I M V 培地バッグを準備した。配合用のC T S A I M V 培地バッグを準備した。ステージB a x a ポンプ。培地を配合することを準備した。G l u t a M a x (商標) + I L - 2 をバッグにポンプで注入した。パラメータを監視した：温度L E D ディスプレイ： $37.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ 、CO₂パーセンテージ： $5.0 \pm 1.5\%$ CO₂。完全なCM4の16日目培地を温めた。希釈液を調製した。

【1923】

16日目のR E P 分割。インキュベーターパラメータを監視した：温度L E D ディスプレイ： $37.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ 、CO₂パーセンテージ： $5.0 \pm 1.5\%$ CO₂。インキュベーターからG-R E X 500 M C Sを取り出した。1 Lの移送パックを準備し、T I L 懸濁液としてラベル付けし、1 Lの重量を量った。

【1924】

G-R E X 5 0 0 M C S の減容約 4 . 5 L の培養上清を G - R E X 5 0 0 M C S から 1 0 L の L a b t a i n e r に移した。

【1925】

T I L 採取用のフラスコを準備した。上清を取り出した後に、赤色ラインへの全てのクランプを閉じた。

【1926】

T I L 採取の開始。フラスコを激しく叩き、培地を旋回させて細胞を解放し、全ての細胞が引き離されていることを確実にする。

【1927】

T I L 採取。T I L 懸濁液移送パックにつながる全てのクランプを解放した。G a t h e R e x を使用して、細胞懸濁液を T I L 懸濁液移送パックの中に移した。注記：全ての細胞及び培地が収集されるまで、傾斜した縁を必ず維持すること。付着した細胞について膜を点検した。フラスコ膜をすすいだ。G - R E X 5 0 0 M C S 上のクランプを閉じた。T I L を含む移送パックを熱融着した。上清を含む 1 0 L の L a b t a i n e r を熱融着した。細胞懸濁液を伴う移送パックの重量を記録し、細胞懸濁液を計算した。試料を取り出すための移送パックを準備した。細胞上清から試験試料を取り出した。

【1928】

無菌性及び B a c T 試験サンプリング。調製した B a c T ラベル付けされた 1 5 m L のコニカルから 1 . 0 m L の試料を取り出した。細胞計数試料を取り出した。B S C 内で、各試料に別個の 3 m L シリンジを使用して、「T I L 懸濁液」移送パックから 4 × 1 . 0 m L の細胞計数試料を取り出した。

【1929】

マイコプラズマ試料を取り出した。3 m L シリンジを使用して、T I L 懸濁液移送パックから 1 . 0 m L を取り出し、調製された「マイコプラズマ希釈液」とラベル付けされた 1 5 m L コニカルチューブに入れた。

【1930】

播種用の移送パックを準備した。T I L をインキュベーターに入れた。細胞懸濁液を B S C から取り出し、必要とされるまでインキュベーターに入れた。細胞計数及び計算を行った。最初に、0 . 5 m L の細胞懸濁液を調製された 4 . 5 m L の A I M - V 培地に追加することによって、細胞計数試料を希釈し、1 : 1 0 希釈液を生じた。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。注記：希釈は、細胞の期待濃度に基づいて調整され得る。行われた 4 つ全ての計数から平均生細胞濃度を決定した。T I L 懸濁液の調整された体積。細胞計数試料を取り出した後の T I L 懸濁液の調整された体積を計算した。5 . 0 m L を差し引いた総 T I L 細胞体積が試験のために取り出された。

【1931】

総生 T I L 細胞を計算した。播種するフラスコの総数を計算した。注記：播種する G - R E X 5 0 0 M C S フラスコの最大数は 5 であった。播種するフラスコの計算された数が 5 つを超えた場合、5 つのみが利用可能な細胞懸濁液の体積全体を使用して播種された。

【1932】

二次培養用のフラスコの数計算した。準備されたバッグに加えて必要とされる培地バッグの数を計算した。計算されたように必要とされる 2 つの G - R E X - 5 0 0 M フラスコ毎に「C M 4 の 1 6 日目培地」の 1 つの 1 0 L バッグを準備した。追加の培地が調製され、温められている間に、続けて第 1 の G R E X - 5 0 0 M フラスコ（複数可）を播種した。計算された数の決定された追加の培地バッグを調製し、温めた。G - R E X 5 0 0 M C S を充填した。培地をポンプで注入するように準備し、4 . 5 L の培地を G - R E X 5 0 0 M C S にポンプで注入した。熱融着した。充填を繰り返した。フラスコをインキュベートした。新しい G - R E X 5 0 0 M C S フラスコに追加する T I L 懸濁液の標的体積を計算した。フラスコの計算された数が 5 つを超える場合、5 つのみが細胞懸濁液の体積全

10

20

30

40

50

体を使用して播種されるであろう。播種用のフラスコを準備した。インキュベーターから G-R E X 5 0 0 M C S を取り出した。ポンプで注入するための G-R E X 5 0 0 M C S を準備した。大型フィルターラインを除く全てのクランプを閉じた。インキュベーターから T I L を取り出した。播種用の細胞懸濁液を調製した。(プロセス注記 5.11 に従って)「T I L 懸濁液」移送バックをポンプ入口ラインに滅菌溶接した。T I L 懸濁液バッグを秤の上に置いた。

【1933】

フラスコに T I L 懸濁液を播種した。計算された T I L 懸濁液の体積をフラスコにポンプで注入した。熱融着した。残りのフラスコを充填した。

【1934】

インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ：温度 L E D ディスプレイ：37.0 ± 2.0 °C、C O₂ パーセンテージ：5.0 ± 1.5 % C O₂。フラスコをインキュベートした。

【1935】

22 日目にインキュベーターから G-R E X 5 0 0 M C S を取り出す時間範囲を決定した。

【1936】

22 日目 洗浄緩衝液の調製 10 L の L a b t a i n e r バッグを準備した。B S C 内で、ルアー接続を介して 4 インチ血漿移送セットを 10 L の L a b t a i n e r バッグに取り付けた。10 L の L a b t a i n e r バッグを準備した。B S C から外に移す前に、全てのクランプを閉じた。注記：採取される 2 つの G-R E X 5 0 0 M C S フラスコ毎に、1 つの 10 L L a b t a i n e r バッグを準備した。P l a s m a l y t e を 3 0 0 0 m L バッグにポンプで注入し、ポンプを反転させてバッグの位置を操作することによって、3 0 0 0 m L の O r i g e n バッグから空気を除去した。ヒトアルブミン 25 % を 3 0 0 0 m L のバッグに追加した。120.0 m L の最終体積のヒトアルブミン 25 % を取得する。

【1937】

I L-2 希釈液を調製した。10 m L シリンジを使用して、L O V O 洗浄緩衝液バッグ上の無針注入ポートを使用して、5.0 m L の L O V O 洗浄緩衝液を取り出した。L O V O 洗浄緩衝液を 50 m L のコニカルチューブに分注した。

【1938】

等分された C R F ブランクバッグ L O V O 洗浄緩衝液。100 m L のシリンジを使用して、無針注入ポートから 70.0 m L の L O V O 洗浄緩衝液を引き上げた。

【1939】

全ての氷が融解するまで、1 つの 1.1 m L の I L-2 (6 × 10⁶ I U / m L) を解凍した。50 μ L の I L-2 ストック (6 × 10⁶ I U / m L) を「I L-2 希釈液」とラベル付けされた 50 m L のコニカルチューブに追加した。

【1940】

凍結保存調製。5 つのクライオカセットを 2 ~ 8 °C に置き、最終生成物の凍結保存のためにそれらを前調整した。

【1941】

細胞計数希釈液を調製した。B S C 内で、ロット番号及び「細胞計数希釈液用」でラベル付けされた 4.5 m L の A I M-V 培地を、4 本の別個の 15 m L コニカルチューブに追加した。細胞計数を準備した。4 つのクライオバイアルをバイアル番号 (1 ~ 4) でラベル付けした。使用される B S C の下でバイアルを保存した。

【1942】

22 日目 T I L 採取インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ温度 L E D ディスプレイ：37 ± 2.0 °C、C O₂ パーセンテージ：5 % ± 1.5 %。インキュベーターから G-R E X 5 0 0 M C S フラスコを取り外した。T I L 収集バッグを準備し、ラベル付けした。余分な接続を密封した。減容：約 4.5 L の上清を G-R E X 5 0

10

20

30

40

50

0 M C S から上清バッグに移した。

【1943】

T I L 採取用のフラスコを準備した。T I L の収集を開始した。フラスコを激しく叩き、培地旋回させて細胞を解放した。全ての細胞が引き離されていることを確実にした。T I L の収集を開始した。T I L 懸濁液収集バッグにつながる全てのクランプを解放した。T I L 採取。G a t h e R e x を使用して、T I L 懸濁液を 3 0 0 0 m L の収集バッグに移した。付着した細胞について膜を点検した。フラスコ膜をすすいだ。G - R e x 5 0 0 M C S 上のクランプを閉じ、全てのクランプが閉じていることを確実にした。細胞懸濁液を L O V O ソースバッグの中に移した。全てのクランプを閉じた。熱融着した。4 × 1 . 0 m L の細胞計数試料を取り出した。

10

【1944】

細胞計数を行った。N C - 2 0 0 及びプロセス注記 5 . 1 4 を利用して、細胞計数及び計算を行った。最初に、0 . 5 m L の細胞懸濁液を調製された 4 . 5 m L の A I M - V 培地に追加することによって、細胞計数試料を希釈した。これは、1 : 1 0 希釈液を生じた。行われた細胞計数の平均生存率、生細胞濃度、及び総有核細胞濃度を決定した。計数の上限及び下限を決定した。行われた細胞計数の平均生存率、生細胞濃度、及び総有核細胞濃度を決定した。L O V O ソースバッグの重量を量った。総生 T I L 細胞を計算した。総有核細胞を計算した。

【1945】

マイコプラズマ希釈液を調製した。ルアー試料ポートを介して 1 つの上清バッグから 1 0 . 0 m L を取り出し、1 5 m L コニカルに入れた。

20

【1946】

「T I L G - R E X 採取」プロトコルを行い、最終生成物の標的体積を決定した。使い捨てキットを装填した。濾液バッグを取り出した。濾液容量を入力した。濾液容器をベンチトップの上に置いた。P l a s m a L y t e を取り付けした。P l a s m a L y t e が取り付けられていることを検証し、P l a s m a L y t e が動いていることを観察した。ソース容器をチューブに取り付け、ソース容器が取り付けられていることを検証した。P l a s m a L y t e が動いていることを確認した。

【1947】

最終配合物及び充填標的体積／バッグの計算。ブランクバッグを配合するための C S - 1 0 及び L O V O 洗浄緩衝液の体積を計算した。C R F ブランクを調製した。

30

【1948】

最終生成物に追加する I L - 2 の体積を計算した。所望される最終 I L - 2 濃度 (I U / m L) - 3 0 0 I U / m L 。 I L - 2 作業ストック : 6 × 1 0 ⁴ I U / m L 。接続装置を組み立てた。4 S - 4 M 6 0 を C C 2 細胞接続に滅菌溶接した。C S 7 5 0 クライオバッグを準備したハーネスに滅菌溶接した。C S - 1 0 バッグを 4 S - 4 M 6 0 のスパイクに溶接した。I L - 2 とともに T I L 調製した。適切なサイズのシリンジを使用して、「I L - 2 6 × 1 0 ⁴」アリコートから決定された I L - 2 の量を取り出した。配合された T I L バッグをラベル付けした。配合された T I L バッグを装置に追加した。C S 1 0 を追加した。シリンジを交換した。約 1 0 m L の空気を 1 0 0 m L のシリンジに引き込み、装置上の 6 0 m L シリンジを交換した。C S 1 0 を追加した。C S - 7 5 0 バッグを準備した。細胞を分注した。

40

【1949】

最終生成物バッグから空気を除去し、保持液を得た。最後の最終生成物バッグが充填されると、全てのクランプを閉じた。1 0 m L の空気を新しい 1 0 0 m L シリンジに引き込み、装置のシリンジを交換する。保持液を 5 0 m L コニカルチューブに分注し、管を「保持液」及びロット番号としてラベル付けした。各バッグについて空気除去ステップを繰り返した。

【1950】

目視検査を含み、凍結保存のための最終生成物を調製した。凍結保存までクライオバツ

50

グを低温パック上で、または 2 ～ 8 °C で保持した。

【 1 9 5 1 】

細胞計数試料を取り出した。適切なサイズのピペットを使用して、2 . 0 m L の保持液を取り出し、細胞計数に使用されるように 1 5 m L コニカルチューブに入れる。細胞計数及び計算を行った。注記：1 つだけの試料を適切な希釈に希釈し、希釈が十分であることを検証した。追加の試料を適切な希釈倍率に希釈し、計数を進めた。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。注記：希釈は、細胞の期待濃度に基づいて調整され得る。生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。I F N - γ を計算した。最終生成物バッグを熱融着した。

【 1 9 5 2 】

以下の例示的試料計画に従って試料をラベル付けし、収集した。

【表 4 0 】

表 4 0 . 試料計画。

試料	容器の数	各々に追加する 試料体積	容器タイプ
* マイコプラズマ	1	1 . 0 m L	1 5 m L コニカル
内毒素	2	1 . 0 m L	2 m L クライオバイアル
グラム染色	1	1 . 0 m L	2 m L クライオバイアル
I F N - γ	1	1 . 0 m L	2 m L クライオバイアル
フローサイトメトリー	1	1 . 0 m L	2 m L クライオバイアル
** B a c - T 無菌性	2	1 . 0 m L	B a c - T ボトル
Q C 保持	4	1 . 0 m L	2 m L クライオバイアル
サテライトバイアル	1 0	0 . 5 m L	2 m L クライオバイアル

【 1 9 5 3 】

無菌性及び B a c T 試験。試験試料採取。B S C 内で、適切なサイズのシリンジを使用して収集された保持細胞懸濁液から 1 . 0 m L の試料を取り出し、嫌気性ボトルに接種する。好気性ボトルについて上記を繰り返す。

【 1 9 5 4 】

最終生成物の凍結保存制御速度冷凍庫（C R F）を準備した。C R F が設定されていることを検証した。C R F プローブを設定した。最終生成物及び試料を C R F に入れた。4 °C ± 1 . 5 °C に達し、C R F 実行を進めるために必要な時間を決定した。C R F が完了し、保存された。実行の完了後に C R F を停止させた。カセット及びバイアルを C R F から取り出した。保存のためにカセット及びバイアルを蒸気相 L N 2 に移した。保存場所を記録した。

【 1 9 5 5 】

最終医薬品の後処理及び分析には、以下の試験が含まれた：（2 2 日目）フローサイトメトリーによる 2 2 日目 R E P の C D 3 + 細胞の決定、（2 2 日目）グラム染色法（G M P）、（2 2 日目）ゲルクロット L A L アッセイ（G M P）による細菌内毒素試験、（1 6 日目）B a c T 滅菌アッセイ（G M P）、（1 6 日目）T D - P C R によるマイコプラズマ D N A 検出（G M P）、許容される外観属性、（2 2 日目）B a c T 滅菌アッセイ（G M P）（2 2 日目）、（2 2 日目）I F N - ガンマアッセイ。本明細書に記載の他の効力アッセイもまた、T I L 生成物を分析するために用いられる。

【 1 9 5 6 】

実施例 8 : G e n 3 拡大プラットフォームの例示的な実施形態

0 日目

腫瘍洗浄培地を調製した。培地を開始前に温めた。5 mL のゲンタマイシン (50 mg / mL) を 500 mL ボトルの HBS S に添加した。5 mL の腫瘍洗浄培地を、OKT3 希釈に使用する 15 mL のコニカルチューブに添加した。フィーダー細胞バッグを調製した。フィーダー細胞をフィーダー細胞バッグに無菌で移し、使用するまで 37 °C で保存するか、または凍結させた。37 °C の場合、フィーダー細胞を計数した。凍結した場合は、解凍した後、フィーダー細胞を計数した。

【1957】

フィーダー細胞濃度の最適範囲は、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 細胞 / mL である。4.5 mL の AIM-V を含む 4 つのコニカルチューブを準備した。各細胞計数について 0.5 mL の細胞画分を追加した。総生フィーダー細胞数が 1×10^9 細胞以上であった場合、進んでフィーダー細胞濃度を調整した。フィーダー細胞の体積を計算し、第1のフィーダー細胞バッグから取り出して、 1×10^9 細胞を第2のフィーダー細胞バッグに添加した。

10

【1958】

p1000 マイクロピペットを使用して、900 μ L の腫瘍洗浄培地を OKT3 アリコート (100 μ L) に移した。シリンジ及び滅菌技法を使用して、0.6 mL の OKT3 を吸引し、第2のフィーダー細胞バッグに添加した。培地体積を全体積 2 L に調整した。第2のフィーダー細胞バッグをインキュベーターに移した。

【1959】

OKT3 配合物の詳細：OKT3 は、100 μ L のアリコート中のバイアル (1 mg / mL) からの元のストック濃度でアリコートされ、凍結されてもよい。1 mL のバイアル当たり約 10 倍のアリコート。-80 °C で保存した。0 日目：15 μ g / フラスコ、すなわち 500 mL 中 30 ng / mL $\sim$ 60 μ L 最大約 1 アリコート。

20

【1960】

5 mL の腫瘍洗浄培地を、過剰腫瘍片とラベル付けした 6 ウェルプレートすべてのウェルに添加した。解剖中に腫瘍を水和状態に保持する際に、腫瘍洗浄培地を更なる使用のために利用可能にした。50 mL の腫瘍洗浄培地を、各 100 mm ペトリ皿に追加した。

【1961】

解剖皿の蓋の下の定規を参照として使用して、腫瘍を 27 mm³ 断片 (3 $\times$ 3 $\times$ 3 mm) に解剖した。60 個の断片に達するまで中間断片を解剖した。生成した最終断片の数に応じて、最終断片の総数を計数し、G-REX-100 MCS フラスコを調製した (一般に、1 フラスコ当たり 60 個の断片)。

30

【1962】

断片チューブ 1 $\sim$ 断片チューブ 4 とラベル付けしたコニカルチューブ内に好ましい組織断片を保持した。起源とする断片チューブの数に応じて、フィーダー細胞懸濁液を播種する G-REX-100 MCS フラスコの数进行計算した。

【1963】

フィーダー細胞バッグをインキュベーターから取り出し、G-REX-100 MCS を播種する。D0 (0 日目) とラベル付けする。

40

【1964】

G-REX-100 MCS 中の培養物への腫瘍断片の追加滅菌条件下で、腫瘍断片培養物 (D0) 1 とラベル付けした G-REX-100 MCS 及び断片チューブとラベル付けした 50 mL のコニカルチューブのキャップを緩めた。開いた断片チューブ 1 を回転させ、同時に G-REX-100 MCS のキャップをわずかに持ち上げた。断片を含む培地を、回転している間に G-REX-100 MCS に追加した。G-REX-100 MCS に移送された断片の数を記録した。

【1965】

断片が G-REX フラスコの底に配置された時点で、7 mL の培地を吸引し、7 つの 1 mL アリコートを作製した (拡大された特徴付け用に 5 mL、滅菌試料用に 2 mL)。拡大

50

された特徴付け用の5つのアリコート（最終断片培養上清）を、必要になるまで -20°C で保存した。

【1966】

1本の嫌気性BacT/AlerTボトル及び1本の好気性BacT/AlerTボトルに各々1mLの最終断片培養上清を接種した。サンプリングしたフラスコ毎に繰り返す。

【1967】

7日目～8日目

フィーダー細胞バッグを調製した。凍結時に 37°C の水浴中で3～5分間フィーダーバッグを解凍した。凍結している場合、フィーダー細胞を計数した。フィーダー細胞濃度の最適範囲は、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 細胞/mLである。4.5mLのAIM-Vを含む4つのコニカルチューブを準備した。各細胞計数について0.5mLの細胞画分を新しいクライオバイアル管に追加した。試料を十分に混合し、細胞計数を続けた。

10

【1968】

総生フィーダー細胞数が 2×10^9 細胞以上であった場合、次のステップに進んでフィーダー細胞濃度を調整した。フィーダー細胞の体積を計算し、第1のフィーダー細胞バッグから取り出して、 2×10^9 細胞を第2のフィーダー細胞バッグに追加した。

【1969】

p1000マイクロピペットを使用して、900 μL のHBSSを100 μL のOKT3アリコートに移す。上下に3回ピペッティングして混合する。2つのアリコートを調製した。

20

【1970】

OKT3配合物の詳細：OKT3は、100 μL のアリコート中のバイアル（1mg/mL）からの元のストック濃度でアリコートされ、凍結されてもよい。1mLのバイアル当たり約10倍のアリコート。 -80°C で保存した。7日目／8日目：30 μg /フラスコ、すなわち500mL中60ng/mL $\sim$ 120 μL 最大約2アリコート。

【1971】

シリンジ及び滅菌技法を使用して、0.6mLのOKT3を吸引し、フィーダー細胞バッグに添加して、全て添加されたことを確認した。培地量を合計2Lに調整した。第2のOKT3アリコートで繰り返し、フィーダー細胞バッグに追加した。第2のフィーダー細胞バッグをインキュベーターに移した。

30

【1972】

フィーダー細胞懸濁液を含むG-R EX 100 MCS フラスコの準備。0日目に生成されたG-R EX フラスコの数に従って処理するためにG-R EX - 100 MCS フラスコ数を記録した。G-R EX フラスコをインキュベーターから取り出し、第2のフィーダー細胞バッグをインキュベーターから取り出した。

【1973】

フィーダー細胞懸濁液を添加する前の上清の除去：1本の10mLシリンジをG-R EX 100 フラスコに接続し、5mLの培地を引き上げた。5つの1mLアリコート（拡大された特徴付け用に5mL）を作製し、治験依頼者からの要求があるまで、拡大された特徴付け用に5つのアリコート（最終断片培養上清）を -20°C で保存した。各G-R EX 100 フラスコにラベル付けし、繰り返した。

40

【1974】

フラスコの数に応じた、特徴付け用の5 $\sim$ 20 $\times$ 1mL試料：

- 5mL = 1 フラスコ
- 10mL = 2 フラスコ
- 15mL = 3 フラスコ
- 20mL = 4 フラスコ

【1975】

フィーダー細胞をG-R EX 100 MCS に播種し続け、G-R EX 100 MCS フラ

50

スコ毎に繰り返した。無菌移送法を使用して、各 G-R E X-1 0 0 M C S フラスコに重量で 5 0 0 m L の第 2 のフィーダー細胞バッグを重力移送し (1 g = 1 m L と想定)、量を記録した。7 日目培養とラベル付けし、G-R E X 1 0 0 フラスコ毎に繰り返した。G-R E X-1 0 0 M C S フラスコをインキュベーターに移した。

【1 9 7 6】

1 0 ~ 1 1 日目

第 1 の G-R E X-1 0 0 M C S フラスコを取り出し、滅菌条件を使用して、1 0 m L シリンジを使用して 7 m L の前処理培養上清を取り出した。7 つの 1 m L アリコートを作製した (拡大された特徴付け用に 5 m L、滅菌試料用に 2 m L)。

【1 9 7 7】

フラスコを注意深く混合し、新たな 1 0 m L シリンジを使用して 1 0 m L の上清を取り出し、D 1 0 / 1 1 マイコプラズマ上清とラベル付けした 1 5 m L のチューブに移す。

【1 9 7 8】

フラスコを注意深く混合し、新しい注射器を使用して、処理されるフラスコの数に応じて以下の量を除去した。

● 1 フラスコ = 4 0 m L

● 2 フラスコ = 2 0 m L / フラスコ

● 3 フラスコ = 1 3 . 3 m L / フラスコ

● 4 フラスコ = 1 0 m L / フラスコ

【1 9 7 9】

合計 4 0 m L を全てのフラスコから取り出し、「1 0 / 1 1 日目 Q C 試料」とラベル付けした 5 0 m L のコニカルチューブにプールし、必要になるまでインキュベーター内で保存すべきである。細胞計数を行い、細胞を割り当てた。

【1 9 8 0】

必要になるまで - 2 0 ° C 以下で拡大された特徴付けのために 5 つのアリコート (前処理培養上清) を保存した。1 本の嫌気性 B a c T / A l e r t ボトル及び 1 本の好気性 B a c T / A l e r t ボトルに各々 1 m L の前処理培養上清を接種した。

【1 9 8 1】

細胞懸濁液を G-R E X-5 0 0 M C S に移し、G-R E X-1 0 0 M C S 毎に繰り返した。滅菌条件を使用して、各 G-R E X-1 0 0 M C S の内容物を G-R E X-5 0 0 M C S に移し、一度に約 1 0 0 m L の液体移送を監視した。G-R E X-1 0 0 M C S の容量が 5 0 0 m L に低減したとき、移送を停止した。

【1 9 8 2】

移送ステップ中、1 0 m L シリンジを使用し、G-R E X-1 0 0 M C S からシリンジに 1 0 m L の細胞懸濁液を引き上げた。培養中のフラスコの数に従って指示に従った。1 つのフラスコの場合：2 つのシリンジを使用して合計 2 0 m L を取り出した。フラスコが 2 つの場合：1 フラスコ当たり 1 0 m L を取り出した。フラスコが 3 つの場合：1 フラスコ当たり 7 m L を取り出した。フラスコが 4 つの場合：1 フラスコ当たり 5 m L を取り出した。細胞懸濁液を 1 本の一般的な 5 0 m L のコニカルチューブに移した。細胞計数ステップ及び Q C 試料までインキュベーター内で保存する。Q C に必要な細胞の総数は、約 2.0×10^6 細胞であった： 4×0.5 m L の細胞数 (細胞数を最初に希釈しなかった)。

【1 9 8 3】

アッセイに必要な細胞の量は、以下の通りである。

1 . 本明細書に記載されるものなどの効力アッセイ、または I F N - γ もしくはグランザイム B アッセイのための最小 1.0×10^6 細胞

2 . マイコプラズマのための 1×10^6 細胞

3 . C D 3 + / C D 4 5 + のためのフローサイトメトリーのための 5×10^6 細胞

【1 9 8 4】

G-R E X-5 0 0 M C S フラスコをインキュベーターに移した。

【1 9 8 5】

10

20

30

40

50

QC 試料を調製した。この実施形態のアッセイには少なくとも 15×10^8 細胞が必要であった。アッセイは、細胞数及び生存率、マイコプラズマ (1×10^6 細胞／平均生存濃度)、フロー (5×10^6 細胞／平均生存濃度) 及び IFN- γ アッセイ (5×10^6 細胞 $\sim 1 \times 10^6$ 細胞を含み、 $8 \sim 10 \times 10^6$ 細胞が、IFN- γ アッセイに必要なである。

【1986】

10×10^6 細胞／mL で凍結保存のための細胞画分の体積を計算し、調製するバイアルの数を計算した。

【1987】

16～17日目

洗浄緩衝液の調製 (1% HSA PlasmaLyte A)。HSA 及び PlasmaLyte を 5 L バッグに移して、LOVO 洗浄緩衝液を作製した。滅菌条件を使用して、総体積 125 mL の 25% HSA を 5 L バッグに移した。10 mL または 40 mL の洗浄緩衝液を取り出し、「IL-2 6×10^4 IU/mL」チューブに移した (IL-2 を事前に調製した場合は 10 mL、IL-2 を新たに調製した場合は 40 mL)。

【1988】

PlasmaLyte + 1% HSA に添加する再構成 IL-2 の量を計算した：再構成 IL-2 の量 = (IL-2 の最終濃度 $\times$ 最終体積) / IL-2 の比活性 (標準アッセイに基づく)。IL-2 の最終濃度は、 6×10^4 IU/mL であった。最終体積は、40 mL であった。

【1989】

再構成 IL-2 に必要な IL-2 の計算された初期体積を取り出し、「IL-2 の 6×10^4 IU/mL」チューブに移した。事前に調製したアリコートから 100 μ L の IL-2 の 6×10^6 IU/mL を、10 mL の LOVO 洗浄緩衝液を含有する「IL-2 の 6×10^4 IU/mL」とラベル付けしたチューブに追加した。

【1990】

約 4500 mL の上清を G-REX-500 MCS フラスコから取り出した。残りの上清を回転させ、細胞を細胞収集プールバッグに移した。全ての G-REX-500 MCS フラスコで繰り返した。

【1991】

60 mL の上清を除去し、マイコプラズマ検出を含む品質管理アッセイのために上清チューブに添加した。 $+2 \sim 8^\circ\text{C}$ で保存した。

【1992】

細胞収集細胞を計数した。4.5 mL の AIM-V を含む 4 つの 15 mL コニカルチューブを準備する。これらは、事前に準備してもよい。最適範囲は、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 細胞/mL である。(1:10 希釈が推奨された)。1:10 希釈の場合、事前に調製した 4500 μ L の AIM-V に、500 μ L の CF を追加する。希釈倍率を記録した。

【1993】

TC (総細胞) LOVO 前 (生 + 死) を計算した =

平均総細胞

濃度 (TC 濃度 LOVO 前)

(生 + 死)

$\times$

ソースバッグの体積

【1994】

TVC (総生細胞) LOVO 前 (生) を計算した =

平均総生細胞

濃度 (TVC LOVO 前)

(生)

$\times$

10

20

30

40

50

LOVOソースバッグの体積

【1995】

総細胞（TC）数が 5×10^9 超であった場合、 5×10^8 細胞を取り出して、MDA保持試料として凍結保存する。 $5 \times 10^8 \div$ 平均TC濃度（ステップ14.44）＝取り出す体積

【1996】

総細胞（TC）数が 5×10^9 以下であった場合、 4×10^6 細胞を取り出して、MDA保持試料として凍結保存する。 $4 \times 10^6 \div$ 平均TC濃度＝取り出す体積

【1997】

総細胞数が決定された場合、取り出す細胞の数は、 150×10^9 生細胞の保持を可能にすべきである。TVCLOVO前 5×10^8 もしくは 4×10^6 を確認するか、または該当なしである。取り出す細胞の体積量を計算した。

【1998】

バッグに残っている残りの総細胞を計算した。TC（総細胞）LOVO前〔平均総細胞濃度×残りの体積＝残りのTC LOVO前〕を計算した。

【1999】

残存する細胞の総数に従って、表41の対応するプロセスを選択する。

【表41】

表41. セルの総数。

総細胞：	保持液（mL）
$0 < \text{総細胞} \leq 31 \times 10^9$	115
$31 \times 10^9 < \text{総細胞} \leq 71 \times 10^9$	165
$71 \times 10^9 < \text{総細胞} \leq 110 \times 10^9$	215
$110 \times 10^9 < \text{総細胞} \leq 115 \times 10^9$	265

【2000】

使用したプロセスに対応して添加するIL-2の体積を選択する。次のように計算された体積：保持体積 $\times 2 \times 300 \text{ IU} / \text{mL}$ ＝必要とされるIL-2のIU。必要なIL-2のIU $\div 6 \times 10^4 \text{ IU} / \text{mL}$ ＝LOVO後バッグに追加するIL-2の体積。添加した全ての体積を記録した。更なる分析のために試料をクライオバイアル内に得た。

【2001】

細胞生成物を十分に混合した。該当する場合、凍結保存を含む更なる処理のために全てのバッグを密封した。

【2002】

取得されたクライオバイアル試料に対して、内毒素、IFN- γ 、無菌性、及び必要に応じて他のアッセイを行った。

【2003】

実施例9：Gen2及びGen3の例示的なプロセス

この実施例は、Gen2及びGen3のプロセスを示す。Gen2プロセス及びGen3プロセスのTILは、一般に腫瘍の外科的切除によって個々の患者から得られ、その後、エキスピボで拡大された自己TILで構成されている。Gen3プロセスのプライミングによる第1の拡大ステップは、インターロイキン-2（IL-2）及びモノクローナル抗体OKT3の存在下での細胞培養であり、照射された末梢血単核細胞（PBMC）の足場上のT細胞共受容体CD3を標的とする。

【2004】

Gen2 TIL生成物の製造は、2つの相からなる：1）急速拡大前（REP前）及

び2) 急速拡大プロトコル (REP)。REP前中に、切除腫瘍を、各寸法2～3mmの50個以下の断片に切断し、血清含有培養培地 (10% HuSABを補充したRPMI1640培地) 及び6,000IU/mLのインターロイキン-2 (IL-2) で、11日間の期間培養した。11日目にTILを採取し、大規模二次REP拡大に導入した。REPは、5日間の3000IU/mLのrhIL-2を補充した5L体積のCM2中の150µgのモノクローナル抗CD3抗体 (OKT3) を装填した 5×10^9 個の照射された同種異系PBMCフィーダー細胞の共培養におけるREP前由来の 200×10^6 個以下の生細胞の活性化からなる。16日目に、培養物の体積を90%減少させ、細胞画分を1フラスコ当たり 1×10^9 個以上の生リンパ球で複数のG-REX-500フラスコに分割し、CM4で5Lにする。TILを更に6日間インキュベートする。REPを22日目に採取し、洗浄し、配合し、凍結保存した後に、注入のために臨床現場に-150℃で発送する。

10

【2005】

Gen3 TIL生成物の製造は、3つの相からなる：1) プライミングによる第1の拡大プロトコル、2) 急速な第2の拡大プロトコル (急速拡大相またはREPとも称される)、及び3) 継代培養分割。プライミングによる第1の拡大TIL増殖を行うために、切除した腫瘍を各寸法2～3mmの120個以下の断片に切断した。プライミングによる第1の拡大の0日目に、OKT-3を装填したおよそ 2.5×10^8 個の照射された同種異系PBMCフィーダー細胞のフィーダー層を、3つの100MCS容器の各々内のおおよそ 100cm^2 の表面積上に確立した。腫瘍断片を、各々が500mLの血清含有CM1培養培地及び6,000IU/mLのインターロイキン-2 (IL-2) 及び15µgのOKT-3を含む3つの100MCS容器に分布し、その中で7日間培養した。7日目に、OKT-3を装填したおよそ 5×10^8 個の照射された同種異系PBMCフィーダー細胞の追加のフィーダー細胞層を、3つの100MCS容器の各々内の腫瘍断片化培養相に組み込み、500mLのCM2培養培地及び6,000IU/mLのIL-2及び30µgのOKT-3で培養することによって、REPを開始した。REPの開始を、100MCS容器へのOKT3を装填したフィーダー細胞の閉鎖されたシステム流体移行を使用して、同じ容器内のプライミングによる第1の拡大培養物全体を活性化することによって増強した。Gen3の場合、TILのスケールアップまたは分割に、細胞培養物全体を閉鎖されたシステム流体移送によってより大きい容器にスケールアップし、移し (100Mフラスコから500Mフラスコに)、追加の4LのCM4培地を添加するプロセスステップを含めた。16日目にREP細胞を採取し、洗浄し、配合し、凍結保存した後に、注入のために臨床現場に-150℃で発送する。

20

30

【2006】

全体として、Gen3プロセスは、より短く、よりスケーラブルであり、かつ簡単に修正可能な拡大プラットフォームであり、堅牢な製造及びプロセス比較可能性に適するように適応する。

40

50

【表 4 2】

表 5 0. 例示的な Gen 2 及び例示的な Gen 3 製造プロセスの比較。

ステップ	プロセス(Gen2)	プロセス(Gen3)
REP 前-0 日目	最大 50 個の断片、1 つの G-REX-100MCS 11 日 1L の CM1 培地 +IL-2(6000IU/mL)	全腫瘍最大 120 個の断片を最大 3 つの フラスコに均等に分割した。1 つのフ ラスコ:1~60 個の断片 2 つのフラスコ 61~89 個の断片 3 つのフラスコ:90~120 個の断片 7 日 500mL の CM1 培地 +IL-2(6000IU/mL) 2.5×10 ⁸ 個のフィーダー細胞/フラスコ 15ug OKT-3/フラスコ
REP 開始	REP に誘導する、11 日目、 <200×10 ⁶ TIL (1)5L CM2 培地中の G-REX- 500MCS IL-2(3000IU/mL) 5×10 ⁹ 個のフィーダー細胞 150ug OKT-3	REP に誘導する、7 日目、全ての細 胞、同じ G-REX-100MCS 500CM2 培地を添加する IL-2(6000IU/mL) 5×10 ⁸ 個のフィーダー細胞/フラスコ 30ug の OKT-3/フラスコ
TIL の増 殖または スケール アップ	減容し、細胞画分を最大 5 つの G- REX-500MCS に分割する 4.5L CM4 培地+IL-2(3000IU/mL) ≥1×10 ⁹ TVC/フラスコ 16 日目に分割する	各 G-REX-100MCS(1L)が 1 つの G- REX-500MCS に移行する 4L の CM4 培地+IL-2(3000IU/mL)を添 加する 9~11 日目にスケールアップする
採取	22 日目に採取する、 LOVO-自動細胞洗浄機	16 日目に採取する LOVO 自動細胞洗浄機
最終配合 物	凍結保存した生成物 LN ₂ 中の 300IU/mL の IL2-CS10、 複数のアリコート	凍結保存した生成物 LN ₂ 中の 300IU/mL の IL-2-CS10 複数のアリコート
プロセス 時間	22 日	16 日

10

20

30

40

【2007】

0 日目に、両方のプロセスについて、腫瘍を 3 回洗浄し、断片をランダム化し、2 つのプールに分けた（プロセス毎に 1 つのプール）。Gen 2 プロセスの場合、断片を、6,000 IU/mL の rhIL-2 を含有する 1 L の CM1 培地を含む 1 つの G-REX-100MCS フラスコに移した。Gen 3 プロセスでは、断片を、6,000 IU/mL の rhIL-2、15 ug の OKT-3 及び 2.5×10⁸ 個のフィーダー細胞を含有する 500 mL の CM1 を含む 1 つの G-REX-100MCS フラスコに移した。Rep 開始日の TIL の播種は、各プロセスに従って異なる日に起こった。G-REX-100MCS フラスコを 90% 減容させた Gen 2 プロセスの場合、収集した細胞懸濁液を新たな G

50

ー R E X - 5 0 0 M C S に移して、I L - 2 (3 0 0 0 I U / m L) + 5 × 1 0 ⁹ 個のフィーダー細胞及び O K T - 3 (3 0 n g / m L) を含有する C M 2 培地中で 1 1 日目に R E P を開始した。細胞が拡大し、プロトコルに従って 1 6 日目に I L - 2 (3 0 0 0 I U / m L) を有する C M 4 培地を含む複数の G - R E X - 5 0 0 M C S フラスコに分割した。その後、培養物を採取し、プロトコルに従って 2 2 日目に凍結保存した。G e n 3 プロセスの場合、R E P の開始は 7 日目に起こり、同じ G - R E X - 1 0 0 M C S を R E P の開始に使用した。簡潔には、I L - 2 (6 0 0 0 I U / m L) 及び 5 × 1 0 ⁸ 個のフィーダー細胞を 3 0 u g の O K T - 3 とともに含有する 5 0 0 m L の C M 2 培地を各フラスコに添加した。9 ~ 1 1 日目に、培養をスケールアップした。G - R E X 1 0 0 M の全体積 (1 L) を G - R E X - 5 0 0 M C S に移し、I L - 2 (3 0 0 0 I U / m L) を含有する 4 L の C M 4 を添加した。フラスコを 5 日間インキュベートした。培養物を採取し、1 6 日目に凍結保存した。

10

【 2 0 0 8 】

比較には、2 つの肺腫瘍 (L 4 0 5 4 及び L 4 0 5 5) と 1 つの黒色腫瘍 (M 1 0 8 5 T) の 3 つの異なる腫瘍を含めた。

【 2 0 0 9 】

L 4 0 5 4 及び L 4 0 5 5 の場合、C M 1 培地 (培養培地 1) 、C M 2 培地 (培養培地 2) 、及び C M 4 培地 (培養培地 4) を事前に調製し、4 ° C で保持した。C M 1 培地及び C M 2 培地を、培地を濾過した場合の細胞増殖と培地を濾過しなかった場合の細胞増殖を比較するために、濾過せずに調製した。

20

【 2 0 1 0 】

L 4 0 5 5 腫瘍の場合、R E P の開始及びスケールアップ時に、培地を事前に 3 7 ° C で最大 2 4 時間温めた。

【 2 0 1 1 】

結果達成された生細胞の総数について、G e n 3 の結果は G e n 2 の 3 0 % 以内であった。G e n 3 最終生成物は、再刺激後により高い I F N - γ 生成を示した。G e n 3 最終生成物は、存在する固有の全 C D R 3 配列によって測定される、増加したクローン多様性を示した。G e n 3 最終生成物は、より長い平均テロメア長を示した。

【 2 0 1 2 】

G e n 2 及び G e n 3 プロセスでの R E P 前及び R E P 拡大は、上記の手順に従った。各腫瘍について、2 つのプールに同数の断片を含めた。腫瘍のサイズが小さいため、1 フラスコ当たりの最大断片数は達成されなかった。総 R E P 前細胞 (T V C) を採取し、G e n 2 プロセスの場合は 1 1 日目に、G e n 3 プロセスの場合は 7 日目に計数した。2 つの R E P 前群を比較するために、細胞数を培養物中に提供された断片の数で割り、1 断片当たりの平均生細胞を計算した。以下の表 5 1 に示されるように、G e n 2 プロセスは、G e n 3 プロセスと比較して、1 断片当たりより多くの細胞を一貫して成長させた。R E P 前 T V C を 7 で割り、その後、1 1 を掛けて計算した、1 1 日目に G e n 3 プロセスで予想される T V C 数の外挿計算。

30

40

50

【表 4 3】

表 5 1. R E P 前の細胞数

腫瘍 I D	L 4 0 5 4		L 4 0 5 5 *		M 1 0 8 5 T	
プロセス	G e n 2	G e n 3	G e n 2	G e n 3	G e n 2	G e n 3
R E P 前 T V C	1. 4 2 E + 0 8	4. 3 2 E + 0 7	2. 6 8 E + 0 7	1. 3 8 E + 0 7	1. 2 3 E + 0 7	3. 5 0 E + 0 6
断片数	2 1	2 1	2 4	2 4	1 6	1 6
R E P 前における 断片当たりの平均 T V C	6. 6 5 E + 0 6	2. 0 6 E + 0 6	1. 1 2 E + 0 6	5. 7 5 E + 0 5	7. 6 6 E + 0 5	2. 1 8 E + 0 5
1 1 日目の R E P 前における G e n 3 外挿値	N / A	6. 7 9 E + 0 7	N / A	2. 1 7 E + 0 7	N / A	5. 4 9 E + 0 6

10

* L 4 0 5 5、濾過されていない培地。

【2 0 1 3】

G e n 2 及び G e n 3 プロセスの場合、T V C をプロセス条件毎に計数し、生細胞パーセントをプロセス日毎に生成した。採取時に、2 2 日目 (G e n 2) 及び 1 6 日目 (G e n 3) の細胞を収集し、T V C 数を確立した。その後、T V C を 0 日目に提供された断片の数で割り、1 断片当たりの平均生細胞を計算した。倍率拡大を、採取した T V C を R E P 開始 T V C で割ることによって計算した。表 5 2 に示されるように、G e n 2 と G e n 3 を比較すると、倍率拡大は L 4 0 5 4 の場合では同様であり、L 4 0 5 5 の場合、倍率拡大は G e n 2 プロセスの方が高かった。具体的には、この場合、培地を R E P 開始日の前に 2 4 温めた。M 1 0 8 5 T の場合の G e n 3 でもより高い倍率拡大が観察された。R E P T V C を 1 6 で割り、その後、2 2 を掛けて計算した、2 2 日目に G e n 3 プロセスで予想される T V C 数の外挿計算。

20

30

40

50

【表 4 4】

表 5 2. T I L 最終生成物の総生細胞数及び倍率拡大。

腫瘍 I D	L 4 0 5 4		L 4 0 5 5		M 1 0 8 5 T	
プロセス	G e n 2	G e n 3	G e n 2	G e n 3	G e n 2	G e n 3
断片数	2 1	2 1	2 4	2 4	1 6	1 6
T V C / 断片 (採取時)	3. 1 8 E + 0 9	8. 7 7 E + 0 8	2. 3 0 E + 0 9	3. 6 5 E + 0 8	7. 0 9 E + 0 8	4. 8 0 E + 0 8
R E P 開始	1. 4 2 E + 0 8	4. 3 2 E + 0 7	2. 6 8 E + 0 7	1. 3 8 E + 0 7	1. 2 3 E + 0 7	3. 5 0 E + 0 6
スケールアップ	3. 3 6 E + 0 9	9. 3 5 E + 0 8	3. 4 9 E + 0 9	8. 4 4 E + 0 8	1. 9 9 E + 0 9	3. 2 5 E + 0 8
採取	6. 6 7 E + 1 0	1. 8 4 E + 1 0	5. 5 2 E + 1 0	8. 7 6 E + 0 9	1. 1 3 E + 1 0	7. 6 8 E + 0 9
倍率拡大 採取 / R E P 開始	4 6 8. 4	4 2 5. 9	2 0 5 6. 8	6 3 4. 6	9 2 5. 0	2 1 9 7. 2
2 2 日目の R E P 採 取における G e n 3 外挿値	N / A	2. 5 3 E + 1 0	N / A	1. 2 0 E + 1 0	N / A	1. 0 6 E + 1 0

* L 4 0 5 5、濾過されていない培地。

【2 0 1 4】

表 5 3 : T I L 最終生成物の生存率 % : 採取時に、最終 T I L R E P 生成物を生存率 % の放出基準と比較した。G e n 2 及び G e n 3 プロセスの全ての条件は、7 0 % の生存率基準を超えており、プロセス及び腫瘍間で同等であった。

【2 0 1 5】

採取時に、最終 T I L R E P 生成物を生存率 % の放出基準と比較した。G e n 2 及び G e n 3 プロセスの全ての条件は、7 0 % の生存率基準を超えており、プロセス及び腫瘍間で同等であった。

【表 4 5】

表 5 3. R E P の生存率 (T I L 最終生成物)

腫瘍 I D	L 4 0 5 4		L 4 0 5 5		M 1 0 8 5 T	
プロセス	G e n 2	G e n 3	G e n 2	G e n 3	G e n 2	G e n 3
R E P 開始	9 8 . 2 3 %	9 7 . 9 7 %	9 7 . 4 3 %	9 2 . 0 3 %	8 1 . 8 5 %	6 8 . 2 7 %
スケールアップ	9 4 . 0 0 %	9 3 . 5 7 %	9 0 . 5 0 %	9 5 . 9 3 %	7 8 . 5 5 %	7 1 . 1 5 %
採取	8 7 . 9 5 %	8 9 . 8 5 %	8 7 . 5 0 %	8 6 . 7 0 %	8 6 . 1 0 %	8 7 . 4 5 %

10

【2 0 1 6】

1 フラスコ当たりの断片の数が必要数未満であったため、採取日の推定細胞数を腫瘍毎に計算した。推定は、臨床腫瘍が 0 日目に 2 つまたは 3 つのフラスコに播種するのに十分な大きさであるという予想に基づいた。

20

【表 4 6】

表 5 4. G e n 3 プロセスでのフルスケール 2 及び 3 フラスコへの外挿推定細胞数計算。

腫瘍 I D	L 4 0 5 4		L 4 0 5 5		M 1 0 8 5 T	
G e n 3 プロセス	2 フラスコ	3 フラスコ	2 フラスコ	3 フラスコ	2 フラスコ	3 フラスコ
推定採取	3 . 6 8 E + 1 0	5 . 5 2 E + 1 0	1 . 7 5 E + 1 0	2 . 6 3 E + 1 0	1 . 5 4 E + 1 0	2 . 3 0 E + 1 0

30

【2 0 1 7】

免疫表現型決定 - T I L 最終生成物の表現型マーカー比較。3 つの腫瘍 L 4 0 5 4、L 4 0 5 5、及び M 1 0 8 5 T は、G e n 2 及び G e n 3 プロセスの両方で T I L 拡大を受けた。採取時に、R E P T I L 最終生成物をフローサイトメトリー分析にかけ、純度、分化、及びメモリーマーカーを試験した。全ての条件で、T C R a / b + 細胞パーセンテージは 9 0 % 超であった。

【2 0 1 8】

G e n 3 プロセスから採取した T I L は、G e n 2 プロセスから採取した T I L と比較して、より高い C D 8 及び C D 2 8 発現を示した。G e n 2 プロセスは、より高い C D 4 + パーセンテージを示した。

40

【2 0 1 9】

G e n 3 プロセスから採取した T I L は、G e n 2 プロセス由来の T I L と比較して、セントラルメモリー区画でより高い発現を示した。

【2 0 2 0】

活性化及び疲弊マーカーを 2 つの腫瘍 L 4 0 5 4 及び L 4 0 5 5 由来の T I L で分析して、G e n 2 及び G e n 3 T I L 拡大プロセス由来の最終 T I L 生成物を比較した。活性化及び疲弊マーカーは、G e n 2 プロセスと G e n 3 プロセスとの間で同等であった。

【2 0 2 1】

50

再刺激時のインターフェロンガンマ分泌採取日、Gen 2の場合は22日目、Gen 3の場合は16日目に、TILは、L4054及びL4055の場合、コーティングした抗CD3プレートで一晩再刺激を受けた。M1085Tでの再刺激は、抗CD3、CD28、及びCD137ビーズを使用して行った。全ての条件で再刺激の24時間後に上清を収集し、上清を凍結させた。ELISAによるIFN γ 分析を、同じELISAプレートを使用して両方のプロセス由来の上清で同時に評価した。分析した3つの腫瘍で、Gen 3プロセス由来のIFN γ のより高い生成が観察された。

【2022】

培養培地中のIL-2レベルの測定Gen 2プロセスとGen 3プロセスとの間のIL-2消費量を比較するために、腫瘍L4054及びL4055で、REPの開始時、スケールアップ時、及び採取日に細胞上清を収集した。細胞培養上清中のIL-2の量を、R&Dの定量ELISAキットによって測定した。一般的な傾向は、IL-2濃度が、Gen 2プロセスと比較して、Gen 3プロセスにおいて高いままであることを示す。これは、プロセス全体を通して培地のキャリーオーバーと相まってGen 3のREP開始時のIL-2濃度がより高い(6000 IU/mL)ことに起因する可能性がある。

10

【2023】

代謝基質及び代謝物分析D-グルコース及びL-グルタミンなどの代謝基質のレベルを、全培地消費量の代わりに測定した。乳酸及びアンモニアなどのそれらの相互代謝物を測定した。グルコースは、ATPの形態でエネルギーを生成するためにミトコンドリアによって利用される培地中の単糖である。グルコースが酸化されると、乳酸が生成される(乳酸塩は乳酸のエステルである)。乳酸塩は、細胞の指数関数的成長期中に強く生成される。高レベルの乳酸塩は、細胞培養プロセスに悪影響を及ぼす。

20

【2024】

L4054及びL4055の使用済み培地を、Gen 2プロセス及びGen 3プロセスの両方で、REP開始時、スケールアップ時、及び採取日に収集した。使用済み培地の収集は、Gen 2の場合は11日目、16日目、及び22日目、Gen 3の場合は7日目、11日目、及び16日目であった。上清を、グルコース、乳酸、グルタミン、GlutaMax(商標)、及びアンモニアの濃度についてCEDEXバイオアナライザーで分析した。

【2025】

L-グルタミンは、細胞培養培地配合物に必要な不安定な必須アミノ酸である。グルタミンにはアミンが含まれており、このアミド構造基は、窒素を細胞に輸送して送達することができる。L-グルタミンが酸化すると、細胞によって有毒なアンモニア副生成物が生成される。L-グルタミンの分解に対抗するために、Gen 2及びGen 3プロセスの培地に、水溶液中でより安定しており、かつ自発的に分解しないGlutaMax(商標)を補充した。2つの腫瘍株では、Gen 3アームは、プロセス中のL-グルタミン及びGlutaMax(商標)の減少、ならびにREP全体でアンモニアの増加を示した。Gen 2アームでは、L-グルタミン及びGlutaMax(商標)の濃度が一定であり、アンモニア生成のわずかな増加が観察された。Gen 2及びGen 3のプロセスは、アンモニアについて採取日に同等であり、L-グルタミン分解にわずかな違いが見られた。

30

40

【2026】

テロメアは、Flow-FISHによって繰り返される。Flow-FISH技術を使用して、Gen 2及びGen 3プロセスでのL4054及びL4055のテロメア反復の平均長を測定した。相対テロメア長(RTL)の決定を、DAKO製のフローサイトメトリ分析用Telomere PNAキット/FITCを使用して計算した。Gen 3は、Gen 2と同等のテロメア長を示した。

【2027】

CD3分析各プロセスで生成された細胞生成物のクローン多様性を決定するために、L4054及びL4055の採取したTIL最終生成物をサンプリングし、T細胞受容体のCDR3部分の配列決定によるクローン多様性分析についてアッセイした。

50

【2028】

表55は、採取したTIL細胞生成物のL4054における共有される固有のCDR3配列パーセンテージに関するGen2とGen3との比較を示す。199個の配列がGen3最終生成物とGen2最終生成物との間で共有され、Gen3最終生成物と共有されるGen2由来の固有のCDR3配列の上位80%の97.07%に相当する。

【表47】

表55. L4054のGen2プロセスとGen3プロセスとの間で共有されるuCDR3配列の比較。

uCDR3の数 (重複%)	全てのuCDR3		uCDR3の上位80%	
	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
Gen2-L4054	8915	4355 (48.85%)	205	199 (97.07%)
Gen3-L4054	—	18130	—	223

10

【2029】

表56は、採取したTIL細胞生成物のL4055における共有される固有のCDR3配列パーセンテージに関するGen2とGen3との比較を示す。1833個の配列がGen3最終生成物とGen2最終生成物との間で共有され、Gen3最終生成物と共有されるGen2由来の固有のCDR3配列の上位80%の99.45%に相当する。

【表48】

表56. L4055のGen2プロセスとGen3プロセスとの間で共有されるuCDR3配列の比較。

uCDR3の数 (重複%)	全てのuCDR3		uCDR3の上位80%	
	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
Gen2-L4055	12996	6599 (50.77%)	1843	1833 (99.45%)
Gen3-L4055	—	27246	—	2616

20

30

【2030】

CM1及びCM2培地は、濾過せずに事前に調製し、腫瘍L4055の場合、Gen2及びGen3プロセスで使用するまで4℃で保持した。

【2031】

Gen2及びGen3プロセスのREP開始日に、腫瘍L4055の場合、培地を37℃で事前に24時間温めた。

【2032】

これらのプロセスで収集した上清中にLDHは測定されなかった。

【2033】

M1085T TIL細胞計数を、K2 cellometer細胞カウンターを使用して実行した。

【2034】

腫瘍M1085Tでは、代謝分析用の上清、活性化及び疲弊マーカー分析用のTIL生成物、テロメア長、及びCD3-TCR α b分析などの試料は入手できなかった。

40

50

【2035】

結論この実施例では、3つの独立したドナー腫瘍組織を、機能的品質属性に加えて、拡大された表現型特徴付け、ならびにGen 2プロセス及びGen 3プロセス間の培地消費に関して比較する。

【2036】

Gen 2とGen 3のREP前及びREP拡大比較を、生成された全生細胞及び全有核細胞集団の生存率に関して評価した。採取日のTV C細胞用量は、Gen 2（22日）とGen 3（16日）との間で同等ではなかった。Gen 3細胞用量は、採取時に収集した全生細胞の約40%であり、Gen 2よりも低かった。

【2037】

REP前採取は、7日目ではなく11日目に起こり、REP採取は、16日目ではなく22日目に起こると仮定して、Gen 3プロセスの外挿細胞数を計算した。どちらの場合も、Gen 3は、Gen 2プロセスと比較してTV Cの数値が近いことを示し、初期活性化により、TILの成長が増強したことを示す。

【2038】

Gen 3プロセスでの追加フラスコ（2つまたは3つ）の外挿値の場合、処理される腫瘍サイズがより大きいと仮定し、記載されるようにプロセス毎に必要な最大断片数に到達する。22日目のGen 2プロセスと比較して、Gen 3プロセスの16日目の採取時にTV Cで同様の用量に到達可能であり得ることが観察された。この観察は重要であり、培養物の早期活性化がTIL処理時間を短縮したことを示す。

【2039】

Gen 2とGen 3のREP前及びREP拡大比較を、生成された全生細胞及び全有核細胞集団の生存率に関して評価した。採取日のTV C細胞用量は、Gen 2（22日）とGen 3（16日）との間で同等ではなかった。Gen 3細胞用量は、採取時に収集した全生細胞の約40%であり、Gen 2よりも低かった。

【2040】

表現型特徴付けに関して、Gen 2プロセスと比較してGen 3プロセスでの3つの腫瘍でより高いCD8+及びCD28+発現が観察された。

【2041】

Gen 3プロセスは、Gen 2プロセスと比較してわずかに高いセントラルメモリー区画を示した。

【2042】

Gen 2プロセス及びGen 3プロセスは、Gen 3プロセスの持続期間がより短いにもかかわらず、同等の活性化及び疲弊マーカーを示した。

【2043】

IFNガンマ（IFN γ ）生成は、分析した3つの腫瘍において、Gen 2と比較してGen 3最終生成物において3倍高かった。このデータは、Gen 3プロセスがGen 2プロセスと比較して高機能でより強力なTIL生成物を生成したことを示し、Gen 3でのCD8及びCD28発現がより高いことに起因する可能性がある。表現型特徴付けは、Gen 2プロセスと比較して3つの腫瘍でCD8+、CD28+発現へのGen 3の肯定的な傾向を示唆した。

【2044】

Gen 2とGen 3との間のTIL最終生成物のテロメア長は同等であった。

【2045】

グルコース及び乳酸塩レベルは、Gen 2最終生成物とGen 3最終生成物との間で同等であり、プロセス日毎に体積低下除去が実行されなかったこと、及びGen 2と比較してプロセスにおける培地全体の体積が少ないことに起因して、Gen 3プロセスの培地の栄養素レベルが影響されなかったことを示唆する。

【2046】

全体として、Gen 3プロセスは、Gen 2プロセスと比較してほぼ2倍の処理時間の

10

20

30

40

50

短縮を示し、これにより、Gen 3 プロセスによって拡大された T I L 生成物の売上原価 (C O G) の有意な削減がもたらされるであろう。

【2047】

I L - 2 消費は、Gen 2 プロセスでの I L - 2 消費の一般的な傾向を示しており、Gen 3 プロセスでは、古い培地が除去されなかったため、I L - 2 が高かった。

【2048】

Gen 3 プロセスは、C D R 3 T C R a b 配列分析によって測定されたより高いクローン多様性を示した。

【2049】

Gen 3 プロセスを使用して、R E P 前の 0 日目のフィーダー及び O K T - 3 の追加により、T I L の初期活性化が可能になり、T I L 成長が可能になった。

10

【2050】

表 5 7 は、現在の Gen 2 プロセスと比較した Gen 3 プロセスの様々な実施形態及び成果を説明する。

20

30

40

50

【表 4 9】

表 5 7. 例示的な Gen 3 プロセス特徴。

ステップ	プロセス Gen 2 の実施形態	プロセス Gen 3 の実施形態
REP 前 - 0 日目	50 個以下の断片 1 X G-REX-100 MCS 1 L 培地 IL-2 (6000 IU/mL) 11 日	240 個以下の断片 60 個以下の断片/フラスコ 4 個以下のフラスコ ≤ 2 L 培地 (500 mL/フラスコ) IL-2 (6000 IU/mL) 2. 5 × 10 ⁸ フィーダー細胞/フラスコ 150 μg の OKT3/フラスコ
REP 開 始	REP に誘導した新鮮な TIL 11 日目 200 e ⁶ 以下の生細胞 5 × 10 ⁹ フィーダー細胞 G-REX-500 MCS 5 L CM2 培地 + IL-2 (3000 IU/mL) 150 μg の OKT3	REP に指向した新鮮な TIL 7 日目 培養物全体を活性化する 5 × 10 ⁸ フィーダー細胞 30 μg の OKT3/フラスコ G-REX-100 MCS 500 mL 培地 + IL-2 (6000 IU/mL)
TIL 継 代培養ま たはスケ ールアッ プ	5 つ以下の G-REX-500 MCS 1 × 10 以下の生細胞/フラスコ 5 L/フラスコ 16 日目	4 つ以下の G-REX-500 MCS 培養物全体をスケールアップする 4 L/フラスコ 10 ~ 11 日目
採取	22 日目に採取 LOVO-自動細胞洗浄機 2 回の洗浄サイクル	16 日目に採取する LOVO-自動細胞洗浄機 5 回の洗浄サイクル
最終配合 物	凍結保存した生成物 LN ₂ 中の 300 IU/mL の IL-2-CS10、複数のアリコート	凍結保存した生成物 LN ₂ 中の 300 IU/mL の IL-2-CS10 複数のアリコート
プロセス 時間	22 日	16 日

【2051】

実施例 10：例示的な Gen 3 プロセス (Gen 3. 1 と称される)

この実施例は、「TIL 拡大のための Gen 2 プロセスと Gen 3 プロセスとの間の比較可能性」に関する更なる研究について説明する。Gen 3 プロセスを、表現型及び機能プロファイルを維持しながら、最終総生細胞 (TVC) 出力を増やすことを目的として、プロセスの初期に活性化ステップを含むように修正した。以下に記載されるように、Gen 3 実施形態を更なる実施形態として修正し、本明細書におけるこの実施例では Gen 3. 1 と称する。

【2052】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、Gen 3.1 TIL 製造プロセスは、以下の4つのオペレーター介入を有する。

1. 腫瘍断片の単離及び活性化：プロセスの0日目に腫瘍を解剖し、最終断片を各々約 $3 \times 3 \text{ mm}$ （合計で最大240個の断片）を生成し、1～4つのG-R EX 100 MCS フラスコ内で培養した。各フラスコは、最大60個の断片、6,000 IUのrhIL-2、 $15 \mu\text{g}$ のOKT3、及び 2.5×10^8 個の照射した同種異系単核細胞を補充した500 mLのCM1またはDM1培地を含んだ。培養物を 37°C で6～8日間インキュベートした。

2. TIL 培養再活性化：7～8日目に、いずれの場合も6,000 IUのrhIL-2、 $30 \mu\text{g}$ のOKT3、及び 5×10^8 個の照射した同種異系単核細胞を補充したCM2またはDM1培地をゆっくり添加することによって、培養物を補充した。フラスコの底にある既存の細胞を乱さないように注意した。培養物を 37°C で3～4日間インキュベートした。

3. 培養のスケールアップ：10～11日目に生じる。培養のスケールアップ中に、G-R EX 100 MCSの全内容物を、いずれの場合も3,000 IU/mLのIL-2を補充した4 LのCM4またはDM2を含むG-R EX 500 MCS フラスコに移した。採取するまでフラスコを 37°C で5～6日間インキュベートした。

4. 採取／洗浄／配合：16～17日目に、フラスコを体積低下させ、プールする。細胞を濃縮し、1% HSAを含有するPlasmaLyte A pH 7.4で洗浄した。洗浄した細胞懸濁液を、CryoStor 10と1:1の比で配合し、300 IU/mLの最終濃度までrhIL-2を補充した。

【2053】

DPを制御速度凍結で凍結保存し、気相液体窒素中に貯蔵した。＊完全標準TIL培地1、2、または4（CM1、CM2、CM4）は、上記のように、合成培地（DM1またはDM2）と称されるCTS（商標）Optmizer（商標）T細胞無血清拡大培地の代用となり得た。

【2054】

プロセスの説明0日目に、腫瘍を3回洗浄し、その後、 $3 \times 3 \times 3$ の最終断片に断片化した。全腫瘍を断片化した時点で、最終断片を均等にランダム化し、3つのプールに分割した。1つのランダム化断片プールを各群に導入し、3つの実験マトリックス毎に同じ数の断片を添加した。

【2055】

全TIL拡大プロセスにわたって、腫瘍L4063拡大を標準培地で行い、腫瘍L4064拡大を合成培地（CTS Optmizer）で行った。培地の成分を本明細書に記載する。

【2056】

CM1完全培地1： 2 mM GlutaMax（商標）、10%ヒトAB血清、ゲンタマイシン（ $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）、2-メルカプトエタノール（ $55 \mu\text{M}$ ）を補充したRPMI+グルタミン。6000 IU/mLのIL-2を補充した最終培地配合物。

【2057】

CM2完全培地2： 50% CM1培地+ 50% AIM-V培地。6000 IU/mLのIL-2を補充した最終培地配合物。

【2058】

CM4完全培地4： 2 mM GlutaMax（商標）を補充したAIM-V。3000 IU/mLのIL-2を補充した最終培地配合物

【2059】

CTS（商標）Optmizer（商標）T-Cell Expansion Supplement（ $26 \text{ mL}/\text{L}$ ）を補充したCTS（商標）Optmizer（商標）T-Cell Expansion Basal Medium。

【2060】

10

20

30

40

50

DM1: CTS (商標) OpTmizer (商標) T-Cell Expansion Supplement (26mL/L)、及びCTS (商標) Immune Cell SR (3%)をGlutaMax (商標) (2mM)とともに補充したCTS (商標) OpTmizer (商標) T-Cell Expansion Basal Medium。6,000IU/mLのIL-2を補充した最終配合物。

【2061】

DM2: CTS (商標) OpTmizer (商標) T-Cell Expansion Supplement (26mL/L)、及びCTS (商標) Immune Cell SR (3%)をGlutaMax (商標) (2mM)とともに補充したCTS (商標) OpTmizer (商標) T-Cell Expansion Basal Medium。3,000IU/mLのIL-2を補充した最終配合物。

10

【2062】

使用した全てのタイプの培地、すなわち、完全培地 (CM) 及び合成培地 (DM) を事前に調製し、使用前日まで4℃で保持し、プロセス日前に事前に最長24時間にわたってインキュベーター内で37℃で温めた。

【2063】

TIL培養再活性化は、両方の腫瘍で7日目に起こった。スケールアップは、L4063では10日目、L4064では11日目に起こった。両方の培養物を採取し、16日目に凍結保存した。

【2064】

達成した結果Gen3.0プロセス及びGen3.1プロセスの細胞数及び生存率%を決定した。全ての条件下での拡大は、この実施例に説明される詳細に従った。

20

【2065】

腫瘍毎に、断片を同数の3つのプールに分割した。腫瘍のサイズが小さいため、1フラスコ当たりの断片の最大数は達成されなかった。3つの異なるプロセスについて、総生細胞及び細胞生存率を条件毎に評価した。細胞数を、7日目の再活性化のTVC、10日目 (L4064) または11日目 (L4063) のスケールアップのTVC、及び16/17日目の採取時のTVCとして決定した。

【2066】

7日目及び10/11日目の細胞数をFIOで測定した。倍率拡大を、16/17日目の採取時のTVCを7日目の再活性化日のTVCで割ることによって計算した。3つの群を比較するために、採取日のTVCを、0日目の培養物中に添加した断片の数で割って、1断片当たりの生細胞の平均を計算した。

30

【2067】

L4063及びL4064について、細胞数及び生存率アッセイを行った。Gen3.1-試験プロセスは、両方の腫瘍でGen3.0プロセスよりも多くの1断片当たりの細胞数をもたらした。

【2068】

総生細胞数及び倍率拡大、プロセス中の生存率%再活性化時に、スケールアップして採取し、全ての条件で生存率%を行った。16/17日目の採取日に、最終TVCを生存率%の放出基準と比較した。評価した全ての条件は、70%の生存率基準を超え、プロセス及び腫瘍全体で同等であった。

40

【2069】

免疫表現型決定-TIL最終生成物の表現型特徴付け。最終生成物をフローサイトメトリ分析にかけ、純度、分化、及びメモリーマーカーを試験した。集団の割合は、全ての条件で、TCRα/β細胞、CD4+細胞、及びCD8+細胞で一貫していた。

【2070】

REP TILの拡大表現型分析を行った。TIL生成物は、両方の腫瘍でGen3.0と比較してGen3.1条件でより高いCD4+細胞パーセンテージを示し、両方の条件でGen3.1条件と比較してGen3.0でより高いCD8+集団由来のCD28+

50

細胞パーセンテージを示した。

【2071】

Gen 3. 0プロセス及びGen 3. 1プロセスから採取したTILは、CD4+細胞及びCD8+細胞でのCD27及びCD56発現、ならびにCD4+ゲート細胞集団での同等のCD28発現と同等の表現型マーカーを示した。TIL最終生成物のメモリーマーカーの比較：

【2072】

16日目に採取したTILの凍結試料を分析のために染色した。TILメモリーステータスは、Gen 3. 0プロセスとGen 3. 1プロセスとの間で同等であった。TIL最終生成物の活性化及び疲弊マーカーの比較：

【2073】

活性化及び疲弊マーカーは、CD4+細胞及びCD8+細胞上でゲートされたGen 3. 0プロセスとGen 3. 1プロセスとの間で同等であった。

【2074】

再刺激時のインターフェロンガンマ分泌採取したTILは、L4063及びL4064用のコーティングされた抗CD3プレートで一晩再刺激を受けた。Gen 3. 0プロセスと比較して、分析した2つの腫瘍で、より高いGen 3. 1プロセスからのIFN γ 生成が観察された。

【2075】

培養培地中のIL-2レベルの測定全ての条件及びプロセス間のIL-2消費レベルを比較するために、細胞上清を、7日目の再活性化の開始時、10日目（L4064）／11日目（L4063）のスケールアップ時、及び16／17日目の採取及び凍結時に収集した。その後、上清を解凍し、分析した。細胞培養上清中のIL-2の量を、製造業者のプロトコルによって測定した。

【2076】

全体的なGen 3プロセス及びGen 3. 1プロセスは、同じ培地条件で評価した全プロセス中のIL-2消費に関して同等であった。L4063及びL4064用に収集した使用済み培地のIL-2濃度（pg/mL）分析。

【2077】

代謝物分析使用済み培地の上清を、L4063及びL4064について、全ての条件で、7日目の再活性化の開始時、10日目（L4064）または11日目（L4063）のスケールアップ時、及び16／17日目の採取時に、L4063及びL4064から収集した。上清をCEDEXバイオアナライザーでグルコース、乳酸塩、グルタミン、Glutamax（商標）、及びアンモニアの濃度について分析した。

【2078】

合成培地は、完全培地（2g/L）と比較してより高いグルコース濃度4.5g/Lを有する。全体として、グルコースの濃度及び消費量は、各培地タイプ内でGen 3. 0プロセス及びGen 3. 1プロセスにおいて同等であった。

【2079】

乳酸塩の増加が観察され、乳酸塩の増加は、Gen 3. 0条件とGen 3. 1条件との間、及び再活性化拡大に使用した2つの培地（完全培地と合成培地）間で同等であった。

【2080】

いくつかの事例では、標準基礎培地は、2mMのL-グルタミンを含有し、培養条件下でL-グルタミンのL-グルタミン酸塩及びアンモニアへの自然分解を補うために、2mMのGlutamax（商標）で補充された。

【2081】

いくつかの事例では、使用した合成（無血清）培地は、基礎培地にL-グルタミンを含有せず、最終濃度が2mMになるまでGlutamax（商標）のみで補充された。Glutamax（商標）は、L-アラニンとL-グルタミンのジペプチドであり、水溶液中でL-グルタミンよりも安定しており、グルタミン酸塩及びアンモニアに自発的に分解し

10

20

30

40

50

ない。代わりに、ジペプチドは、個々のアミノ酸に徐々に解離し、それにより、より低い十分な濃度のL-グルタミンを維持して、強力な細胞成長を維持する。

【2082】

いくつかの事例では、グルタミン濃度及びG l u t a M a x（商標）濃度は、スケールアップ日にわずかに減少したが、採取日には再活性化日と比較して同様またはより近いレベルへの増加を示した。L 4 0 6 4の場合、グルタミン濃度及びG l u t a M a x（商標）濃度は、全プロセス中、異なる条件間で同様の速度でわずかな分解を示した。

【2083】

アンモニア濃度は、2 mMのG l u t a M a x（商標）を含有する合成培地中で成長させた試料よりも、2 mMのグルタミン+2 mMのG l u t a M a x（商標）を含有する標準培地中で成長させた試料で高かった。更に、予想通り、培養の過程にわたってアンモニアの段階的増加または蓄積があった。3つの異なる試験条件間でアンモニア濃度に差はなかった。

【2084】

F l o w - F I S Hによるテロメア反復：F l o w - F I S H技術を使用して、G e n 3プロセス及びG e n 3. 1プロセス下でのL 4 0 6 3及びL 4 0 6 4のテロメア反復の平均長を測定した。相対テロメア長（R T L）の決定を、D A K O製のフローサイトメトリー分析用T e l o m e r e P N Aキット／F I T Cを使用して計算した。テロメアアッセイを行った。試料のテロメア長を、対照細胞株（1301白血病）と比較した。対照細胞株は、長くて安定したテロメアを有する四倍体細胞株であり、相対テロメア長の計算を可能にする。両方の腫瘍で評価したG e n 3プロセス及びG e n 3. 1プロセスは、同等のテロメア長を示した。

【2085】

T C R V β レパートリー分析

各プロセスで生成された細胞生成物のクローン多様性を決定するために、T I L最終生成物をT細胞受容体のC D R 3部分の配列決定によるクローン多様性分析のためにアッセイした。

【2086】

3つのパラメータを3つの条件間で比較した。

●固有のC D R 3（u C D R 3）の多様性指数

●u C D R 3共有%

●u C D R 3の上位80%の場合：

○共有されるu C D R 3コピーの%を比較する

○固有のクローノタイプの頻度を比較する

【2087】

対照及びG e n 3. 1試験、T I Lで採取した細胞生成物で共有される固有のC D R 3配列パーセンテージ：975個の配列がG e n 3試験最終生成物とG e n 3. 1試験最終生成物との間で共有され、G e n 3. 1と共有されるG e n 3由来の固有のC D R 3配列の上位80%の88%に相当する。

【2088】

対照及びG e n 3. 1試験、T I Lで採取した細胞生成物で共有される固有のC D R 3配列パーセンテージ：2163個の配列がG e n 3試験最終生成物とG e n 3. 1試験最終生成物との間で共有され、G e n 3. 1と共有されるG e n 3由来の固有のC D R 3配列の上位80%の87%に相当する。

【2089】

異なるプロセスについて、16日目の採取時に収集した 1×10^6 個の細胞から特定された固有のC D 3配列の数。G e n 3. 1試験条件は、試料内の固有のペプチドC D Rの数に基づいて、G e n 3. 0と比較してわずかに高いクローン多様性を示した。

【2090】

シャノンエントロピー多様性指数は、比較のための信頼性の高い一般的なメトリックで

10

20

30

40

50

あり、両方の腫瘍に対する Gen 3. 1 条件は、Gen 3. 0 プロセスよりもわずかに高い多様性を示し、Gen 3. 1 試験条件の TCR V β レポートリーが Gen 3. 0 プロセスよりもポリクローナルであることを示唆する。

【2091】

加えて、Gen 3. 1 試験条件の TCR V β レポートリーは、腫瘍 L 4063 及び L 4064 の両方で Gen 3. 0 プロセスの対応するレポートリーと 87% を超える重複を示した。

【2092】

再活性化日の Gen 3. 1 試験 L 4064 の使用済み培地の IL-2 濃度の値は、期待値を下回った (Gen 3. 1 対照及び Gen 3. 0 条件と同様であった)。

【2093】

低い値はピペッティングエラーに起因した可能性があったが、最小限の試料しか採取できなかったため、アッセイを繰り返すことができなかった。

【2094】

結論 0 日目のフィーダー及び OKT-3 を含む Gen 3. 1 試験条件は、Gen 3. 0 及び Gen 3. 1 対照と比較して、16 日目の採取時の細胞用量の TVC がより高いことを示した。Gen 3. 1 試験条件の TVC 最終生成物は、Gen 3. 0 よりも約 2.5 倍高かった。

【2095】

試験した腫瘍試料の両方について、0 日目に OKT-3 及びフィーダーを添加した Gen 3. 1 試験条件は、採取時にフラスコの最大容量に達した。これらの条件下で、0 日目に最大 4 つのフラスコを開始した場合、最終細胞用量は、80~100 $\times$ 10⁹ TIL である可能性があった。

【2096】

最終 TIL 生成物の純度、疲弊、活性化、及びメモリーマーカーを含む表現型特徴付けなどの全ての品質属性が、Gen 3. 1 試験と Gen 3. 0 プロセスとの間で維持された。

【2097】

最終 TIL 生成物の IFN- γ 生成は、分析した 2 つの腫瘍において、Gen 3. 0 と比較して、0 日目にフィーダー及び OKT-3 を添加した Gen 3. 1 で 3 倍高く、Gen 3. 1 プロセスが強力な TIL 生成物を生成したことを示唆する。

【2098】

試験条件にわたって、グルコースまたは乳酸塩レベルに差異は観察されなかった。培地条件にわたって、Gen 3. 0 プロセスと Gen 3. 1 プロセスとの間でグルタミン及びアンモニアに差異は観察されなかった。培地上の低レベルのグルタミンは、細胞増殖を制限しておらず、培地への GlutaMax (商標) のみの添加が、細胞を増殖させるのに必要な栄養素を与えるのに十分であることを示唆する。

【2099】

11 日目及び 10 日目のスケールアップは、それぞれ、プロセスの採取日に到達した細胞数に関して大きな差異を示さず、代謝物の消費量は、全プロセスにわたって両方の場合で同等であった。この観察結果は、Gen 3. 0 最適化プロセスが処理日に柔軟性を有し、それにより、製造スケジュールの柔軟性を促進することができることを示唆している。

【2100】

0 日目にフィーダー及び OKT-3 を添加した Gen 3. 1 プロセスは、Gen 3. 0 と比較して、CDR3 TCR α b 配列分析によって測定されたより高いクローン多様性を示した。

【2101】

図 32 は、Gen 3 プロセス (Gen 3 最適化プロセス) の実施形態を説明する。標準培地及び CTS Optimizer 無血清培地を、Gen 3 最適化プロセス TIL 拡大に使用することができる。CTS Optimizer の場合、培地の GlutaMax

10

20

30

40

50

(商標)を最終濃度4 mMに増加させるために無血清培地が推奨される。

【2102】

実施例11: KRAS p. G12C阻害剤と組み合わせたKRAS p. G12C変異型転移性非小細胞肺癌を有する患者における自己腫瘍浸潤リンパ球

この実施例では、TIL及びKRAS p. G12C阻害剤を用いて患者(すなわち、対象)を治療するための方法について説明する。上記の実施例7または9に記載されるようなGen2プロセスを使用して、TIL生成物を患者の腫瘍試料から拡大する。

【2103】

適応症

併用した免疫チェックポイント阻害剤(CPI)+化学療法±ペバシズマブからなる承認された単一の全身療法中の疾患進行またはそれに続く疾患進行を有するKRAS p. G12C変異型転移性非小細胞肺癌(NSCLC)を有する患者:

●コホート1: KRAS p. G12C阻害剤は、ナイーブであり、STK11またはCDKN2A/B+低発現の甲状腺転写因子-1(TTF-1)による共変異を有する: 患者は、TIL切除前に、KRAS p. G12C阻害剤(ソトラシブ 960mg 経口、1日1回またはアダグラシブ 600mg 経口、1日2回)で3~4週間前処置される。患者は、TIL切除後及びNMALDの開始まで、KRAS p. G12C阻害剤を再開する。その後、進行または毒性まで、TIL注入から3~4週間後に、再開する。p.o.qd=経口、1日1回; p.o.bid=経口、1日2回

●コホート2: KRAS p. G12C阻害剤は、前処置され、STK11またはCDKN2A/B+低発現の甲状腺転写因子-1(TTF-1)による共変異を有する: 患者は、進行または毒性まで、TIL注入から3~4週間後に、KRAS p. G12C阻害剤(ソトラシブ 960mg 経口、1日1回またはアダグラシブ 600mg 経口、1日2回)を再開する。

●コホート3: KRAS p. G12C阻害剤は、ナイーブであり、TP53と共変異を有する: 患者は、TIL切除後及びNMALDの開始まで、KRAS p. G12C阻害剤(ソトラシブ 960mg 経口、1日1回またはアダグラシブ 600mg 経口、1日2回)を開始する。その後、進行または毒性まで、TIL注入から3~4週間後に、再開する。

●コホート4: KRAS p. G12C阻害剤は、前処置され、TP53と共変異を有する: 患者は、進行または毒性まで、TIL注入から3~4週間後に、KRAS p. G12C阻害剤(ソトラシブ 960mg 経口、1日1回またはアダグラシブ 600mg 経口、1日2回)を再開する。

【2104】

処置: KRAS p. G12C阻害剤(ソトラシブ 960mg 経口、1日1回またはアダグラシブ 600mg 経口、1日2回)と組み合わせた自己腫瘍浸潤リンパ球(TIL)。

【2105】

主な目的:

RECIST v1.1を使用して、治験責任医師が評価した及び/または独立審査委員会(IRC)が評価した客観的奏効率(ORR)によって決定した、併用した免疫チェックポイント阻害剤(CPI)+化学療法±ペバシズマブからなる承認された単一の全身療法中またはそれに続く疾患進行を有するKRAS p. G12C変異型非小細胞肺癌(NSCLC)患者における、KRAS p. G12C阻害剤(ソトラシブ 960mg 経口、1日1回またはアダグラシブ 600mg 経口、1日2回)と併用したTIL処置の有効性を評価すること。

【2106】

副次的目的:

RECIST v1.1を使用して、ORRによって決定され、治験責任医師によって評価される(コホート1及び2のみ)、KRAS p. G12C阻害剤(ソトラシブ 96

10

20

30

40

50

0 mg 経口、1日1回またはアダグラシブ600 mg 経口、1日2回）と併用したTIL処置の有効性を評価すること。

【2107】

完全奏効率（CR）；奏効期間（DOR）；疾患制御率（DCR）；RECIST v1.1を使用して、IRC（コホート1及び2のみ）ならびに治験責任医師（全てのコホート）によって評価される無増悪生存期間（PFS）；ならびに全生存期間（OS）を使用して、KRAS p. G12C阻害剤（ソトラシブ960 mg 経口、1日1回またはアダグラシブ600 mg 経口、1日2回）と併用したTIL処置の有効性を更に評価すること。

【2108】

グレード3以上の治療に起因する有害事象（TEAE）の発生率によって測定される、NSCLC患者におけるKRAS p. G12C阻害剤（ソトラシブ960 mg 経口、1日1回またはアダグラシブ600 mg 経口、1日2回）と併用したTIL処置の安全性プロファイルを特徴付けること。

【2109】

探索的目的：

TIL処置の持続性を評価し、反応、転帰、及び毒性変数と相関し得る免疫相関を特定すること。

【2110】

それぞれの適応症固有の健康関連生活の質（HRQoL）パラメータを評価すること。

【2111】

一次エンドポイント：

全てのコホート：治験責任医師及び／またはIRCによって評価されたRECIST v1.1に従って評価されたORR。

【2112】

二次エンドポイント：

全てのコホート：重症度、重篤度、研究治療との関係、ならびに重篤な有害事象（SAE）、治療関連有害事象、ならびに早期治療中止または評価期間からの離脱または死亡につながる有害事象を含む、TEAEの特徴。

【2113】

全てのコホート：RECIST v1.1に従って、治験責任医師及び／またはIRCによって評価された、CR率、DOR、DCR、及びPFS。

【2114】

全てのコホート：RECIST v1.1に従って、治験責任医師及び／またはIRCによって評価された、ORR、CR率、DOR、DCR、及びPFS（全てのコホート）。

【2115】

全てのコホート：OS

【2116】

探索的エンドポイント：

TIL生成物を含むT細胞のインビボ持続性は、経時的に各患者の血液中のTIL生成物特異的T細胞受容体-ベータ相補性決定領域3（CDR3）配列の存在を監視することによって評価される。ディープシーケンシングを使用して特定される生成物及び末梢血液試料中に存在するCDR3配列。

【2117】

KRAS p. G12C阻害剤（ソトラシブ960 mg 経口、1日1回またはアダグラシブ600 mg 経口、1日2回）と併用したTIL処置の活性の予測及び薬力学的臨床バイオマーカーの同定を目的とした探索的エンドポイント：

●LN145の表現型及び機能的特徴

●腫瘍組織の免疫プロファイル

10

20

30

40

50

- T I L 生成物、腫瘍組織、及び／または P B M C の遺伝子発現プロファイル
- 腫瘍の変異ランドスケープ
- 循環免疫因子
- P B M C の免疫組成物

【2118】

欧州がん研究治療機関（E O R T C）の生活の質質問票（Q L Q）C 3 0 及び Q L Q L C 1 3 によって評価された H R Q o L。

【2119】

研究設計

K R A S p . G 1 2 C 阻害剤（ソトラシブ 9 6 0 m g 経口、1 日 1 回またはアダグラシブ 6 0 0 m g 経口、1 日 2 回）と併用した T I L 処置による養子細胞療法（A C T）を評価する前向き、非盲検、マルチコホート、非ランダム化、多施設第 2 相研究。

【2120】

全ての患者は、以下のステップからなる T I L 療法を受ける。

1 . T I L 処置の供給源として機能する自己組織を提供するための採取（研究コホートに応じて、外科的切除またはコア生検）。再処置される患者（コホート 4）は、いずれかの採取方法を受けることができる。

2 . 製造施設での T I L の生成

3 . 5 日間または 7 日間、または新規の骨髄非破壊的リンパ球枯渇（N M A - L D）前処置レジメン

4 . T I L 生成物の注入（0 日目）

5 . 6 回以下の用量の I V インターロイキン-2（I L - 2）の投与。

【2121】

K R A S p . G 1 2 C 阻害剤（ソトラシブ 9 6 0 m g 経口、1 日 1 回またはアダグラシブ 6 0 0 m g 経口、1 日 2 回）の併用投与は、様々なコホートについて概説されている通りである：

●コホート 1：K R A S p . G 1 2 C 阻害剤は、ナイーブであり、S T K 1 1 または C D K N 2 A / B + 低発現の甲状腺転写因子-1（T T F - 1）による共変異を有する：患者は、T I L 切除前に、K R A S p . G 1 2 C 阻害剤（ソトラシブ 9 6 0 m g 経口、1 日 1 回またはアダグラシブ 6 0 0 m g 経口、1 日 2 回）で 3 ～ 4 週間前処置される。患者は、T I L 切除後及び N M A L D の開始まで、K R A S p . G 1 2 C 阻害剤を再開する。その後、進行または毒性まで、T I L 注入から 3 ～ 4 週間後に、再開する。

●コホート 2：K R A S p . G 1 2 C 阻害剤は、前処置され、S T K 1 1 または C D K N 2 A / B + 低発現の甲状腺転写因子-1（T T F - 1）による共変異を有する：患者は、進行または毒性まで、T I L 注入から 3 ～ 4 週間後に、K R A S p . G 1 2 C 阻害剤（ソトラシブ 9 6 0 m g 経口、1 日 1 回またはアダグラシブ 6 0 0 m g 経口、1 日 2 回）を再開する。

●コホート 3：K R A S p . G 1 2 C 阻害剤は、ナイーブであり、T P 5 3 と共変異を有する：患者は、T I L 切除後及び N M A L D の開始まで、K R A S p . G 1 2 C 阻害剤（ソトラシブ 9 6 0 m g 経口、1 日 1 回またはアダグラシブ 6 0 0 m g 経口、1 日 2 回）を開始する。その後、進行または毒性まで、T I L 注入から 3 ～ 4 週間後に、再開する。

●コホート 4：K R A S p . G 1 2 C 阻害剤は、前処置され、T P 5 3 と共変異を有する：患者は、進行または毒性まで、T I L 注入から 3 ～ 4 週間後に、K R A S p . G 1 2 C 阻害剤（ソトラシブ 9 6 0 m g 経口、1 日 1 回またはアダグラシブ 6 0 0 m g 経口、1 日 2 回）を再開する。

【2122】

別段の指定がない限り、以下の一般的な連続期間が 4 つのコホート全てで発生する。

1 . スクリーニング期間：インフォームドコンセントフォーム（I C F）の署名から登録まで

10

20

30

40

50

2. 治療前期間：登録から調製NMA-LDレジメンの開始まで。

3. 治療期間：調製NMA-LDの開始から治療終了（EOT）来院まで。これは、NMA-LD（5日目～1日目）、TIL注入（0日目）、続いてIL-2投与（0日目または1日目～3日目または4日目）を含む、8～9日間の治療（用量及び治療スケジュールの表を参照のこと）で構成される。EOTは、0日目のおよそ30日後に起こる。

4. 治療後のフォローアップ期間。これは以下で構成されている。

a. 治療後有効性フォローアップ期間（TEFU）：疾患の進行または新しい抗がん療法の開始のいずれか早い方によって引き起こされる、EOT来院から最終有効性評価来院（有効性評価終了[EAEA]来院）まで。

b. 長期フォローアップ期間（LTFU）：上記のようなEAEAから研究完了まで。

10

【2123】

研究参加者（登録患者）は、早期にLTFUに移行することができる（例えば、同意の部分的撤回、または何らかの理由でTIL療法を受けないと判断された場合）。研究の早期中止は、同意撤回、死亡、フォローアップ不能、または研究終了のいずれかによって促される。

【2124】

用量及び治療スケジュール：TIL療法

患者は、0日目に予定されているTIL注入の前に開始される5日間または7日間のまたは新規の前処置NMA-LDレジメンを受ける。

20

【2125】

5日間のレジメン：NMA-LDレジメンは、-5日目及び4日目のメスナ（現場の標準治療またはUSPI/SmpC毎）を伴う2日間の静脈内（IV）シクロホスファミド（60mg/kg）、及び5日間のフルダラビンIV（25mg/m²、-5日目～1日目）で構成される。

【2126】

7日間のレジメン：NMA-LDレジメンは、-7日目及び6日目のメスナ（現場の標準治療またはUSPI/SmpC毎）を伴う2日間の静脈内（IV）シクロホスファミド（60mg/kg）、及び5日間のフルダラビンIV（25mg/m²、-5日目～1日目）で構成される。

30

【2127】

600,000IU/kgの用量でのIL-2 IV投与は、0日目のTIL注入の完了の3時間後、ただし24時間後までに開始され得る。追加のIL-2用量は、およそ8～12時間毎に、最大6回の合計用量で与えられる。

【2128】

参加期間。全体として、研究参加期間は、治療から完了まで最大5年となる。

【2129】

包含基準

研究に参加する資格を得るためには、患者は、登録前に以下の包含基準を全て満たしていなければならない。

40

1. 保護された健康情報の使用及び開示について、書面によるインフォームドコンセント及び書面による承認を提供する。

2. 同意時に18歳以上である。

3. KRAS p. G12C変異型NSCLC（扁平上皮、非扁平上皮、腺癌、大細胞、または混合組織型）の組織学的または病理学的に確定された診断を受けており、受けたCPI治療（すなわち、最初の治療選択を通知した歴史的TPS）の前に腫瘍割合スコア（TPS）によって決定されたPD-L1発現状態が文書化されていなければならない、TP53、STK11、及びCDKN2A/B+甲状腺転写因子-1（TTF-1）を含む分子プロファイル状態がなければならない。

4. CPI及び化学療法を同時に含む単一の全身療法を受けており、この単一の全身療

50

法では放射線疾患の進行が記録されている。

a. アジュバントまたはネオアジュバント設定における、または決定的な化学放射線療法の一部としての以前の全身療法は、疾患がそのような療法の完了の間または12カ月以内に進行しなかった場合、治療選択として計数されない。このプロトコルのTIL治療前は、コホート4（再治療）患者の治療選択として計数されない。

5. 運動耐性が予想される年齢の正常範囲の85%以上であり、虚血または臨床的に重大な不整脈の兆候または症状はない。

6. 米国東海岸がん臨床試験グループ（Eastern Cooperative Oncology Group、ECOG）のパフォーマンスステータスは0または1であり、治験責任医師の意見において、推定平均余命は6カ月超である。

7. 全てのコホート：TIL生成のために、直径が最小1.5cmの切除可能な病変（または凝集病変）を少なくとも1つ有する。

a. 患者は、単一のRECIST v1.1測定可能な病変を有し、外科的採取のために利用可能な追加の病変がないか、またはTIL生成のために安全に外科的採取を受けることができないが、TIL生成のために十分な放射線学的ガイド付きコア生検を介して安全に腫瘍採取を有することができる場合。

b. 採取を検討した病変が以前に照射された領域内にある場合、病変は、採取前にX線画像による進行を示し、照射は登録の少なくとも3カ月前に完了していなければならない。患者は、プロトコルが必要とする検査に適正な組織病理標本を有していなければならない（セクション5.18を参照）。

8. TIL製造のための腫瘍採取後、全ての患者は、以下の事項を考慮して、RECIST v1.1によって定義されるように、少なくとも1つの残りの測定可能な病変を有していなければならない。

a. 以前に照射された領域内の病変は、それらの病変で進行が示され、照射が登録の少なくとも3カ月前に完了していない限り、標的病変として選択されるべきではない。

b. RECIST v1.1毎に依然として測定可能なTIL生成のために外科的に部分的に切除された病変を、非標的病変として選択することができるが、応答評価の標的病変としては機能することができない。

c. TIL生成のコア生検に他の病変が利用できない場合、単一のRECIST v1.1測定可能病変が、コア生検の採取部位及び応答モニタリングの病変の両方として機能し得る。

9. 検査室での検査の前に、少なくとも5日間、輸血及び／または血液生成物のサポートとは無関係に、以下の血液学的パラメータを有する：

a. 絶対好中球数（ANC） $\geq 1000/mm^3$

b. ヘモグロビン $\geq 9.0g/dL$

c. 血小板数 $\geq 100,000/mm^3$

10. 以下の実験室での値で適正な臓器機能を有する：

a. 血清アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、正常上限の ≤ 3 倍（ $\leq 3 \times ULN$ ）、肝転移が $\leq 5 \times ULN$ の患者。

b. スクリーニング時にコッククロフト・ゴルト式を使用して推定されたクレアチニンクリアランス（eCrCl） $\geq 40mL/分$ 。

c. 総ビリルビン $\leq 2mg/dL$ 、ジルベール症候群の患者は、総ビリルビン $\leq 3mg/dL$ を有しなければならない。

11. $>45\%$ の左心室駆出率（LVEF）を有し、ニューヨーク心臓協会（NYHA）クラス1である。心臓の負荷試験は、全ての患者に必要であり、不可逆的な壁の動きの異常を示さないこと。患者が、治験依頼者の医療モニターの承認を得て、駆出率及び心臓病クリアランスが十分であれば、心臓の負荷試験に異常がある患者を登録し得る。

12. スクリーニング肺機能検査（PFT）は、以下のうちのいずれかを有する患者に必要である。

10

20

30

40

50

- a. 20 パック以上／年の喫煙歴
- b. 過去2年以内に喫煙をやめた、またはまだ喫煙している
- c. 慢性閉塞性肺疾患（COPD）の病歴
- d. 呼吸機能障害の任意の兆候または症状

●気管支拡大剤後の値：強制呼気量（FEV1）／強制肺活量（FVC）が70%超またはFEV1予測正常値が50%超であることが、治験参加に必要である。

●患者が上気道の解剖学的構造の異常（すなわち、気管切開）のために信頼できる肺活量測定を行うことができない場合は、6分間の歩行試験を使用して呼吸機能を評価され得る。年齢及び性別に対して予測される少なくとも80%の距離を歩くことができない患者、または試験中の任意の時点で低酸素症の証拠を示す患者（SpO2<90%）は除外される。

10

13. 登録前に、最低21日間の以前の全身抗がん療法からのウォッシュアウト期間を有する必要がある。

●緩和的放射線療法：脱毛症、皮膚色素沈着の変化、または他の臨床的に重要でない事象、例えば小領域放射線皮膚炎または直腸もしくは尿意切迫感を除いて、全ての放射線関連毒性がグレード1またはベースラインに解決される場合、以前の外部ビーム放射線療法が許可される。

●手術／事前に計画された手順（複数可）：創傷治癒が起こり、全ての合併症が解消され、腫瘍切除の前に少なくとも14日が経過している場合（主要な手術手順の場合）、以前の外科的手順（複数可）が許可される。

20

14. 脱毛症または白斑を除いて、以前の全ての抗がん治療関連有害事象（TRAE）からグレード1以下（有害事象の一般用語基準[CTCAE]、バージョン5.0による）に回復していなければならない。

●以前の抗がん療法から安定したグレード2以上の毒性を有する患者は、医療モニターと相談した後、ケースバイケースで検討され得る。

15. 妊娠可能性のある患者または妊娠可能性のあるパートナーがいる患者は、治療中及び全てのプロトコル関連療法を受けてから12カ月間、承認された非常に効果的な避妊方法を実践しなければならない。承認された避妊方法は、以下の通りである。

a. 排卵の抑制に関連する併用（エストロゲン及びプロゲステロン含有）ホルモン避妊：経口、膈内、経皮

30

b. 排卵の抑制に関連するプロゲステロンのみのホルモン避妊：経口、注射可能、移植可能

c. 子宮内避妊器具（IUD）

d. 子宮内ホルモン放出システム（IUS）

e. 卵管両側閉塞

f. 精管切除パートナー

g. 患者の好ましい通常のライフスタイルに沿った真の絶対的な性的禁欲。定期的な禁欲（例えば、カレンダー排卵、症候性、排卵後の方法）は容認できない。

【2130】

除外基準

40

研究に参加する資格を得るためには、患者は、登録前に以下の基準のうちのいずれも満たさなければならない。

1. 過去20年以内に骨髄非破壊的または骨髄破壊的化学療法レジメンを含む、臓器同種移植または以前の細胞移植療法を受けている。TIL療法で再治療されている患者は、以前のNMA-LDのために除外されない。

2. 標的療法に感受性のあるKRAS p. G12C（例えば、EGFR、ALK、ROS）を除く既知のがん遺伝子ドライバー変異を有する。

3. 以下の事項を考慮して、症候性及び／または未治療の脳転移を有する：

a. 過去に（研究参加に同意する前に）脳転移が根治的に治療された患者は、登録前に患者が2週間以上にわたって臨床的に安定し、スクリーニング磁気共鳴画像法（MRI

50

）による新たな脳病変がなく、患者が継続的なコルチコステロイド治療を必要としない場合、登録が検討される。

b. 最近（登録前の28日以内）に脳転移が根治的に治療された患者は、登録前に転移が無症候性であり、患者が2週間以上にわたって臨床的に安定している場合、医療モニターと話し合った後に登録が検討される。NMA-LDの開始前に、以下のことが必要とされる：新たなまたは増加する脳病変がないことを実証する治療後少なくとも4週間の繰り返し脳MRI、及び患者が2週間以上にわたって臨床的に安定しており、継続的なステロイド治療を必要としないことの確認。

4. 全身ステロイド療法である10mg/日超のプレドニゾンまたは他のステロイド当量を必要とする。10mg/日以下のプレドニゾンまたは別のステロイド等価用量で副腎皮質不全の代替療法としてステロイドを受けている患者は、除外されない。

5. 転移性NSCLCの診断以来、体重減少が10%超である。

6. 以下のうちのいずれかの血清学的証拠を有する：

a. ヒト免疫不全ウイルス（HIV）-1またはHIV-2。

b. 活動性または慢性B型肝炎ウイルス（HBV）またはC型肝炎ウイルス（HCV）感染の血清学的証拠。急性または慢性肝炎感染症の患者は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によるウイルス負荷が活性治療の有無にかかわらず検出できない場合に登録することができる。

c. 梅毒（迅速血漿試験[RPR]試験または性病研究室[VDRL]試験）。

d. サイトメガロウイルス（CMV）免疫グロブリンM（IgM）抗体及びウイルス負荷PCR；ならびに活動性感染を示すエプスタインバーウイルス（EBV）IgM及びウイルス負荷PCR。

e. 単純ヘルペスウイルス（HSV）-1及びHSV-2 IgM血清学及びウイルス負荷PCR。

7. 妊娠中または授乳中である。

8. 治験責任医師の意見では、研究参加のリスクが高い、活動性の医学的疾患（複数可）、例えば、全身性感染症（例えば、梅毒もしくは抗生物質を必要とする他の感染症）、凝固障害、心臓血管系、呼吸器系、もしくは免疫系の他の活動性の主要な医学的疾患、または残存する肺障害を伴うCOVID-19感染症の病歴があり得る。

9. NMA-LD開始前の28日以内に生ワクチン接種または弱毒化ワクチン接種を受けている。

10. 何らかの形態の原発性免疫不全症（例えば、重症複合免疫不全症[SCID]または後天性免疫不全症候群[AIDS]）を有する。

11. 治験薬のいずれかの成分に対する過敏症の病歴を有する。TIL療法は、以下のうちのいずれかを含むがこれらに限定されない、自己TIL生成物配合物のいずれかの成分に対する既知の過敏症を有する患者には投与されるべきではない。

a. NMA-LD（シクロホスファミド、メスナ、及びフルダラビン）

b. Proleukin（登録商標）、アルデスロイキン、IL-2

c. アミノグリコシド系抗生物質（すなわち、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン[ゲンタマイシン過敏症の皮膚検査陰性者を除く]）。

d. ジメチルスルホキシド（DMSO）、ヒト血清アルブミン（HSA）、IL-2、またはデキストラン40を含むTIL生成物の配合物の任意の成分。

12. 過去3年以内に別の原発性悪性腫瘍があった（治療を必要としない、または1年超前に治癒的に治療された腫瘍を除き、治験責任医師の判断では、非黒色腫皮膚癌、上皮内導管癌（DCIS）、上皮内小葉癌（LCIS）、6以下の前立腺癌グリーソンスコア、または表在性膀胱癌を含むが、これらに限定されない重大な再発リスクをもたらさない）。

13. 治療開始から21日以内に治験薬を用いた別の臨床試験への参加。

【2131】

有効性評価

NSCLC患者におけるKRAS p. G12C阻害剤と併用したTIL療法の以下の有効性パラメータを各コホートで調査する：ORR、CR率、DOR、DCR、PFS、及びOS。

【2132】

安全性評価

全ての研究参加者について、AE／SAEは、以下の研究期間中にCTCAE v5.0に従って収集され、格付けされる。スクリーニング、治療前、治療、及び治療後フォローアップ期間（該当する場合）。解析には全ての研究期間が含まれ、各コホート毎に別々に行われる。

【2133】

上記の実施例は、当業者に対して、本発明の組成物、システム及び方法の実施形態の作製方法及び使用方法の完全な開示及び説明を提供するために提示されており、本発明者らが自身の発明とみなすものの範囲を限定することを意図しない。当業者に明らかな、本発明を実施するための上記のモードの修正は、添付の特許請求の範囲内にあることを意図している。本明細書で言及する全ての特許及び刊行物は、本発明が属する分野の当業者のレベルを示す。

【2134】

全ての見出し及びセクションの指定は、明確化及び参照の目的のみのために使用されており、いかなる方法でも限定するものとしてみなされない。例えば、当業者は、本明細書に記載の本発明の趣旨及び範囲に従って異なる見出し及びセクションから様々な態様を適宜組み合わせることの有用性を理解する。

【2135】

本明細書で引用された全ての参考文献は、各個々の刊行物または特許もしくは特許出願が全ての目的のためにその全体が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されているのと同じ程度に全ての目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【2136】

当業者に明らかであるように、本出願の趣旨及び範囲から逸脱することなく、本出願の多くの修正及び変形が加えられてもよい。本明細書に記載の特定の実施形態及び実施例はほんの一例として提供されており、本出願は、特許請求の範囲が権利を与えられる等価物の全範囲に加えて、添付の特許請求の範囲の用語によってのみ限定されるべきである。

10

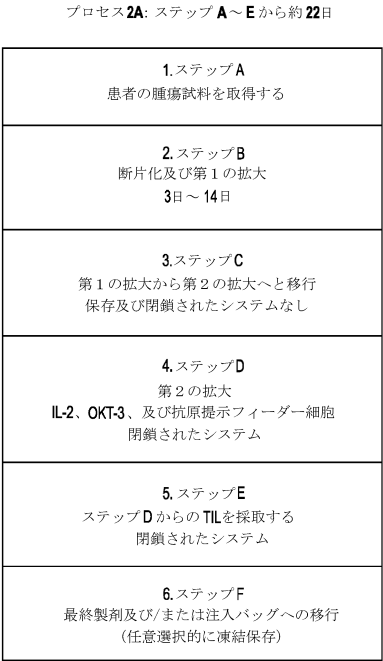
20

30

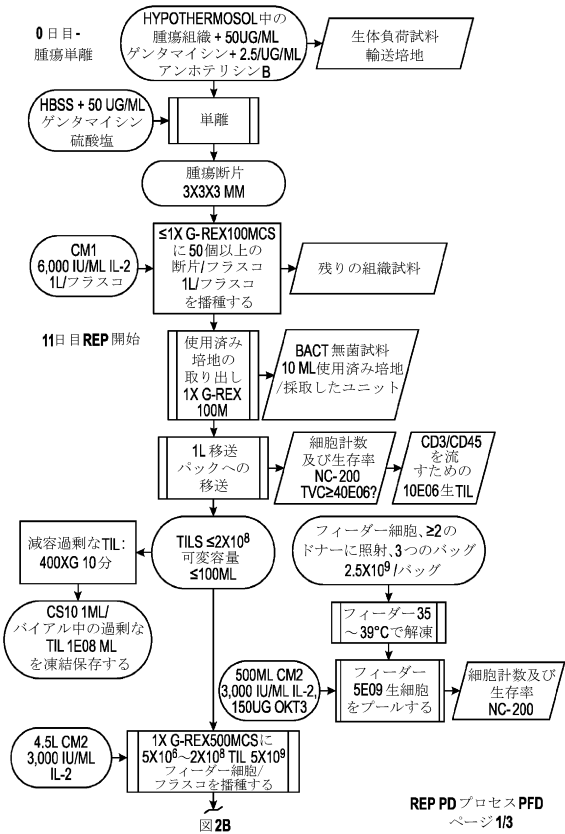
40

50

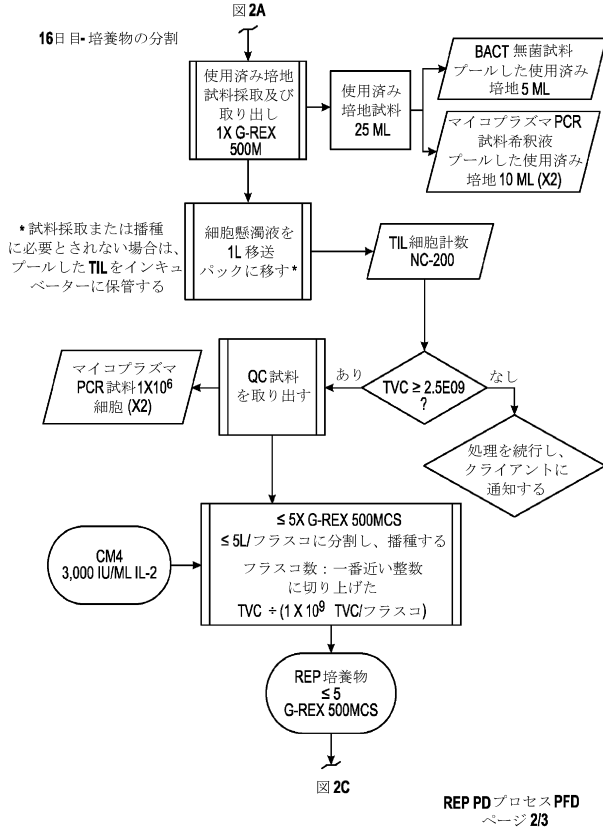
【図面】
【図 1】



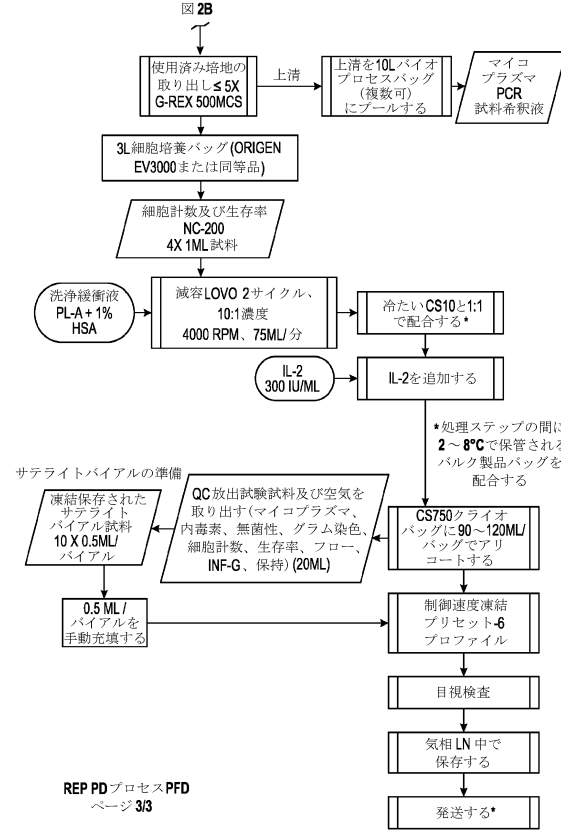
【図 2 A】



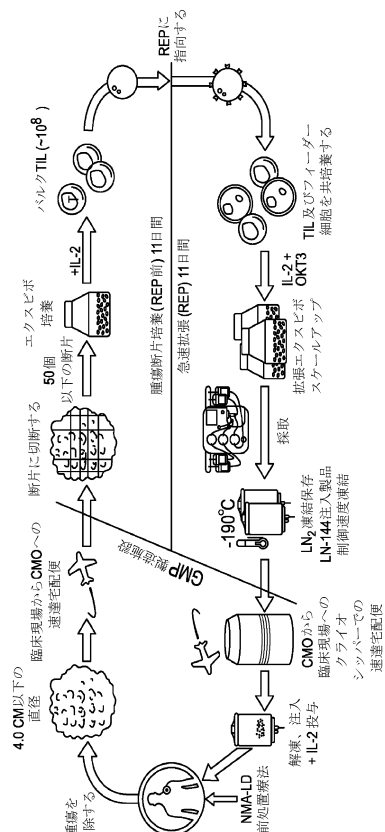
【図 2 B】



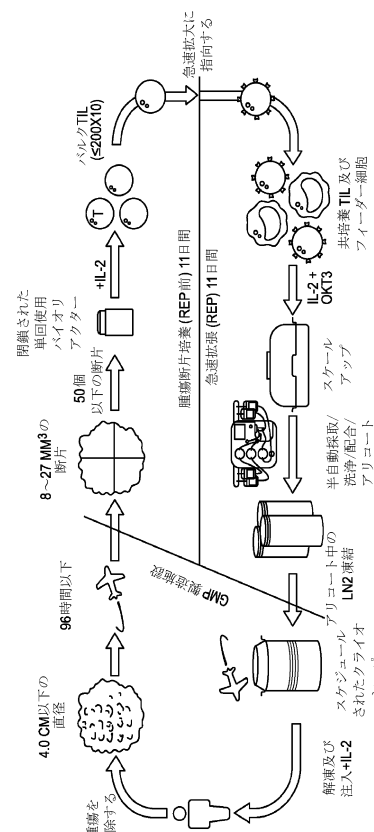
【図 2 C】



【圖 3】



【図 4】



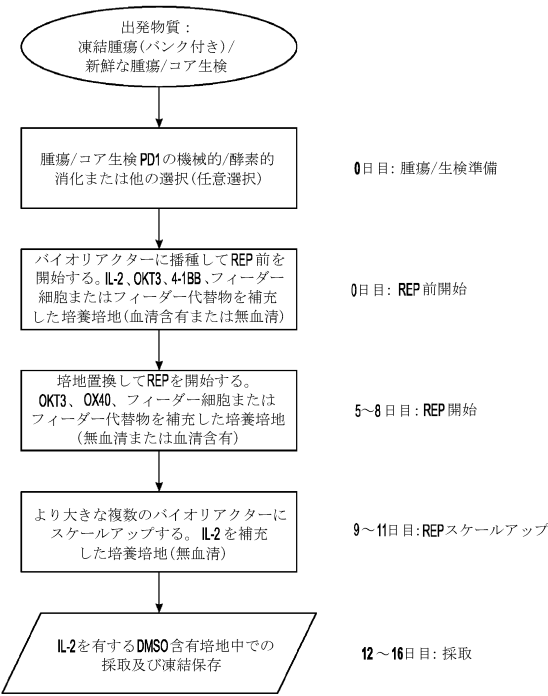
【図 5】

プロセス1C: ステップ A～E について 43～55日	プロセス2A: ステップ A～E から約22日
1.ステップ A 患者の腫瘍試料を取得する	1.ステップ A 患者の腫瘍試料を取得する
2.ステップ B 断片化及び第 1 の拡大 11日～21日	2.ステップ B 断片化及び第 1 の拡大 3日～14日
3.ステップ C 第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行 選択までの任意選択の保存	3.ステップ C 第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行 保存なし及び閉鎖されたシステム
4.ステップ D 第 2 の拡大 IL-2、OKT-3、抗原提示フィーダー細胞 任意選択的に 1 回以上繰り返す	4.ステップ D 第 2 の拡大 IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞 閉鎖されたシステム
5.ステップ E ステップ D からの TIL を採取する	5.ステップ E ステップ D からの TIL を採取する 閉鎖されたシステム
6.ステップ F 最終製剤及び/または注入バッグへの移行	6.ステップ F 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 (任意選択的に凍結保存)

【図 6】

プロセス ステップ	プロセス1Cの 実施形態	プロセス2Aの 実施形態	利点
REP 前	● 10 個の GREX-10 フラスコ当たり 4 個の断片 ● 11～21日間	● 1つの GREX-100 フラスコ当たり 40 個の断片 ● 11日間	● フラスコ当たりの腫瘍断片の 増加 ● 培養時間の短縮 ● ステップ数の削減 ● 閉鎖されたシステムに適し ている
REP 前から REP への 移行	● REP 前 TIL を選択の ために表現型決定 されるまで凍結し、 次いで解凍して REP に進む (約 30 日目) ● REP は、>40x10 ⁶ TIL を必要とする	● REP 前 TIL は、 11日目に直接 REP に移動する ● REP は、25～200 x10 ⁶ TIL を必要とする	● REP 前から REP プロセスの 短縮 ● ステップ数の削減 ● 表現型決定選択の排除 ● 閉鎖されたシステムに適 している
REP	● REP 0 日目に 6 つの GREX-100M フラスコ ● REP 0 日目に 5x10 ⁶ TIL 及び 5x10 ⁶ PBMC フィーダー/ フラスコ ● REP 7 日目に 18～ 36 個のフラスコに 分割する ● 14日間	● 11日目に 1 つの GREX-500M フラスコ ● 11日目に 25～200x 10 ⁶ TIL 及び 5x10 ⁶ PBMC フィーダー ● 18日目に 6 つ以下の GREX-500M フラスコ に分割する ● 11日間	● ステップ数の削減 ● REP 期間の短縮 ● フラスコ間の TIL の閉鎖 されたシステム移送 ● 閉鎖されたシステム培地交換 に分割する
採取	● 遠心分離によって 採取した TIL	● LOVO 自動細胞洗浄 システムを介して 採取した TIL	● ステップ数の削減 ● 自動細胞洗浄 ● 閉鎖されたシステム ● 洗浄中の生成物損失の低減
最終配合	● HYPOTHERMOSOL 中の新鮮な生成物 ● 単回注入バッグ ● 限定された発送 安定性	● LN ₂ 中で保存された PLASMALYTE-A+1% HSA 及び CS10 中の 凍結保存生成物 ● 複数のアリコート ● より長い発送 安定性	● 発送の柔軟性 ● 柔軟な患者スケジューリング ● よりタイムリーな放出試験
全体の推定 プロセス 時間	● 43～55 日	● 22 日	● 患者へのより速い転向

【図 7】



【図 8 A】

プロセス 2A/GEN2: ステップ A～E から約 22 日	プロセス GEN3: ステップ A～E から約 14～18 日
ステップ A 患者の腫瘍試料を取得する (任意選択的に、ステップ B 前に凍結される)	ステップ A 患者の腫瘍試料を取得する (任意選択的に、ステップ B 前に凍結される)
ステップ B 第 1 の拡大 (IL-2 を含む培地を用いて約 3 日～14 日間成長させた容器 当たり少なくとも 40 個の断片への物理的断片化)	ステップ B プライミングによる第 1 の拡大(IL-2、OKT3、及び抗原提示 フィーダー細胞を含む培地を用いて約 1 日～7 日間成長させた 容器当たり最大 60 個の断片の物理的断片化)
ステップ C 第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行 (ステップ B の TIL は、11 日目にステップ D、 任意選択的にステップ B に直接移動)	ステップ C プライミングによる第 1 の拡大から急速な第 2 の拡大への移行 (ステップ B の TIL は、7 日目にステップ D に直接移動)
ステップ D 第 2 の拡大 (閉鎖された容器内に IL-2、OKT3、及び抗原提示フィーダー 細胞を含む成長培地(MEDIUM)において成長した TIL)	ステップ D 急速な第 2 の拡大 (IL-2、OKT3、及び 2 倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長 培地培地(MEDIUM)において成長した TIL; 10～11 日目 にスケールアップし、追加の IL-2 を添加する)
ステップ E ステップ D からの TIL を採取する (閉鎖されたシステムを介して採取された TIL)	ステップ E ステップ D からの TIL を採取する
ステップ F 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 (任意選択的に凍結保存)	ステップ F 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 (任意選択的に凍結保存)

10

20

30

40

50

【図 8 B】

プロセス GEN 3: ステップ A ～ E から約 14 ～ 18 日間
ステップ A 患者の腫瘍試料を取得する (任意選択的に、ステップ B 前に凍結され得る)
ステップ B プライミングによる第 1 の拡大 (IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む培地による約 1 日 ～ 7 日間 成長させた容器当たり最大 60 個の断片の物理的断片化)
ステップ C プライミングによる第 1 の拡大から急速な第 2 の拡大への移行 (ステップ B の TIL は、7 日目にステップ D に直接移動)
ステップ D 急速な第 2 の拡大 (IL-2、OKT-3、及び 2 倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地 (MEDIUM) において成長した TIL ; 10 ～ 11 日目にスケールアップし、 追加の IL-2 を添加する)
ステップ E ステップ D からの TIL を採取する
ステップ F 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 (任意選択的に凍結保存)

【図 8 C - 1】

実施形態 GEN 3.0: ステップ A ～ E から約 14 ～ 18 日	ステップ A 患者の腫瘍試料を取得する (任意選択的に、ステップ B 前に凍結され得る)
	ステップ B プライミングによる第 1 の拡大 (IL-2 を含む培地による約 1 日 ～ 7/8 日間成長させた容器 当たり最大 60 個の断片の物理的断片化)
	ステップ C プライミングによる第 1 の拡大から急速な第 2 の拡大への移行 (ステップ B の TIL は、7/8 日目にステップ D に直接移動)
	ステップ D 急速な第 2 の拡大 (IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む成長 培地培地 (MEDIUM) において成長した TIL ; 10 ～ 11 日 目にスケールアップし、追加の IL-2 を添加する)
	ステップ E ステップ D からの TIL を採取する
	ステップ F 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 (任意選択的に凍結保存)

10

20

【図 8 C - 2】

実施形態 GEN 3.1 対照: ステップ A ～ E から約 14 ～ 18 日	ステップ A 患者の腫瘍試料を取得する (任意選択的に、ステップ B 前に凍結され得る)
	ステップ B プライミングによる第 1 の拡大 (IL-2 及び OKT-3 を含む培地による約 1 日 ～ 7/8 日間成長させた容器 当たり最大 60 個の断片の物理的断片化)
	ステップ C プライミングによる第 1 の拡大から急速な第 2 の拡大への移行 (ステップ B の TIL は、7/8 日目にステップ D に直接移動)
	ステップ D 急速な第 2 の拡大 (IL-2、OKT-3、及び 2 倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長 培地培地 (MEDIUM) において成長した TIL ; 10 ～ 11 日 目にスケールアップし、追加の IL-2 を添加する)
	ステップ E ステップ D からの TIL を採取する
	ステップ F 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 (任意選択的に凍結保存)

【図 8 C - 3】

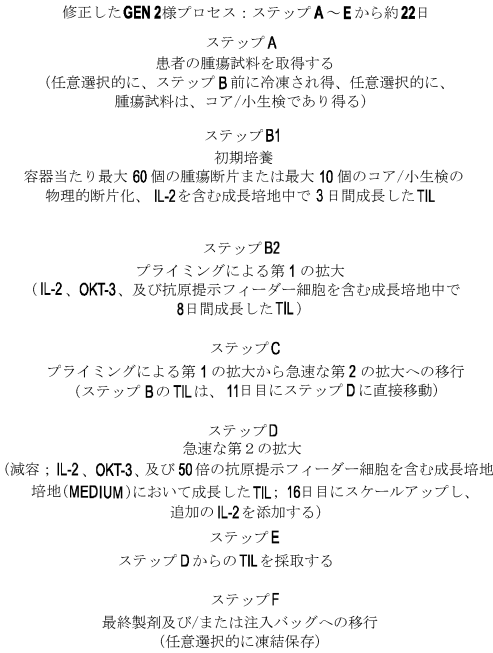
実施形態 GEN 3.1 試験 F: ステップ A ～ E から約 14 ～ 18 日	ステップ A 患者の腫瘍試料を取得する (任意選択的に、ステップ B 前に凍結され得る)
	ステップ B プライミングによる第 1 の拡大 (IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む培地 による約 1 日 ～ 7/8 日間成長させた容器当たり最大 60 個の 断片の物理的断片化)
	ステップ C プライミングによる第 1 の拡大から急速な第 2 の拡大への移行 (ステップ B の TIL は、7/8 日目にステップ D に直接移動)
	ステップ D 急速な第 2 の拡大 (IL-2、OKT-3、及び 2 倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長 培地培地 (MEDIUM) において成長した TIL ; 10 ～ 11 日 目にスケールアップし、追加の IL-2 を添加する)
	ステップ E ステップ D からの TIL を採取する
	ステップ F 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 (任意選択的に凍結保存)

30

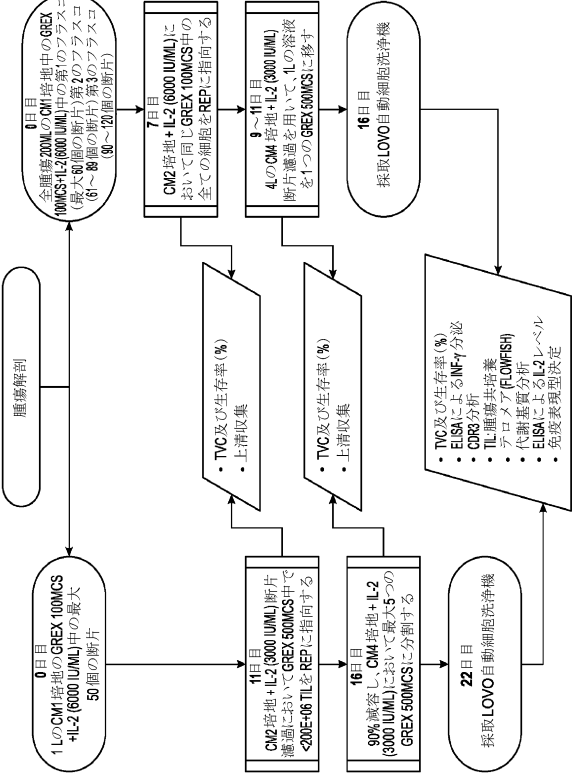
40

50

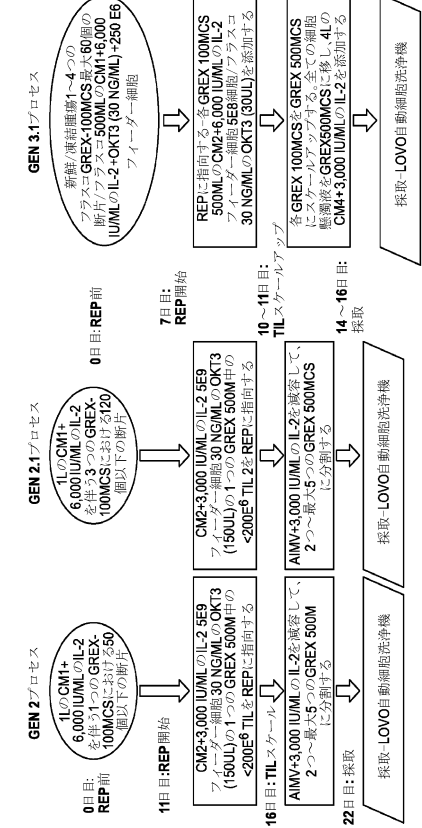
【図 8 D】



【図 9】



【図 10】



【図 11】

ステップ	GEN 2	GEN 2.1	GEN 3.0
REP 前・0 日目	50 個以下の断片 4 つの GREX 100 MCS - 11 日	180 個以下の断片 3 つの GREX、事前配合された CM1 加温培地 100MCS - 11 日	新鮮または凍結腫瘍 1 つの GREX 当たり 30 個以下の断片～最大 60 個の断片を有する全腫瘍 100MCS (最大 4 つの GREX)、事前に配合された加温培地 - 7 日目、フィーダー 2.3 E8 細胞 + OKT3 (30 NG/mL)
REP 開始	REP に指向する - 11 日目 - <200 E6 TIL 1 つの GREX 500MCS	REP に指向する - 11 日目 - 1 つの GREX 500MCS 中の事前配合された CM2 加温培地	REP に指向する - 7 日目 - 全ての細胞 TIL - 同じ GREX 100MCS (100MCS を最大で 4 つの GREX)、標準培地または合成培地 (無血清) フィーダー 5 E8 細胞 + OKT3 (30 NG/mL) の追加
TIL の増殖またはスケールアップ	1 ～ 5 つの GREX 500MCS 16 日目に分割する	2 ～ 5 つの GREX 500MCS 中の事前配合された CM4 加温培地 16 日目に分割する	GREX 100MCS から、TIL 懸濁液を GREX 500MCS、最大 4 つの GREX 500 MCS に移す・標準培地または合成培地 (無血清) 10 または 11 日目にスケールアップする
採取	22 日目に採取する、LOVO 自動細胞洗浄機 (5 回の洗浄サイクル)	22 日目に採取する、LOVO 自動細胞洗浄機 (5 回の洗浄サイクル)	14 または 16 日目に採取する、LOVO 自動細胞洗浄機 (5 回の洗浄サイクル)
最終配合	凍結保存した生成物 LN ₂ 中の 3000 μL の IL-2+CS10、複数のアリコート	凍結保存した生成物 LN ₂ 中の 3000 μL の IL-2+CS10、複数のアリコート	凍結保存した生成物 LN ₂ 中の 3000 μL の IL-2+CS10、複数のアリコート
プロセス時間	22 日	22 日	16 日

10

20

30

40

50

【図 1 2】

プロセス日	0 日目・ REP 前開始	条件	GEN 3.1
		培地CM1	500 ML
		IL-2 (6000 IU/ML)	+
		OKT-3 (30NG/ML)	+
プロセス日	7 日目・ REP 開始	ファイダー(250 E+06)	+
		条件	GEN 3.1
		培地CM2	500 ML
		IL-2 (6000 IU/ML)	+
プロセス日	16 日目・採取	7 日目追加された OKT-3 (30NG/ML)	+
		7 日目に追加されたファイダー	500 E06
		日数での総ファイダー	750 E+06
		条件	GEN 3.1
プロセス比較	9～11 日目 スケールアップ	G-REX 100MCS から、TIL懸濁液を 1 つの G-REX 500MCS (最大 3 つの GREX 500MCS)に移す	ある
		LOVO 自動細胞洗浄機	ある

【図 1 3】

プロセス比較	主なプロセス変化	利点
GEN 2: GEN 2.1	1 つのフラスコの代わりに 2 つのフラスコを用いたプロセスを開始する 2 つの G-REX500MCS フラスコ間の REP 開始のファイダー層に分割する - 使用前に培地を事前に配合し、加温する	- 増加した TIL レバートリーを用いた最終細胞計数(用量)の倍加の可能性 - プロセス中のプロセス冗長性
GEN 2.1: GEN 3.1	- 新鮮または凍結腫瘍 14 ～ 16 日のプロセス(22 日から) - プロセス中の全ファイダー層を低減する 0 日目に存在するファイダー層及び OKT3 - 断片で開始した REP 100MCS スケールから 500MCS - 複数の REP 前のフラスコを計量する - 標準培地及び合成培地(無血清)	- 増加した有効性 - 改善された表現型 - 低下したプロセス時間 - 低減した試験試験 - 低下したプロセス変動 - 合成された試薬 - 増加したレバートリー - 純度を低減する(ファイダー) - 同等またはより高い用量

【図 1 4】

プロセス比較	主なプロセス 変化	所望の改善	成功の判断基準	成果
GEN 2: GEN 3.0	14～16 日 - 最大 4 つの断片を用いて REP を開始する。 100MCS スケールから 500MCS	- 増加した有効性 - 改善された表現型 - 低下したプロセス時間	- INF-Giにより測定されるように有効性を増加する✓ - 同等の表現型✓ - 同等の用量✓ - 同等の純度✓ - クローンの多様性を維持する✓ - 低減したファイダー細胞	- GEN2 を上回って増加した有効性 - CD8 細胞における CD28 の改善した表現型 - GEN 3.1 における 16 日目までに達したフラスコの最大容量 - 使用 - 増加した多様性

【図 1 5】

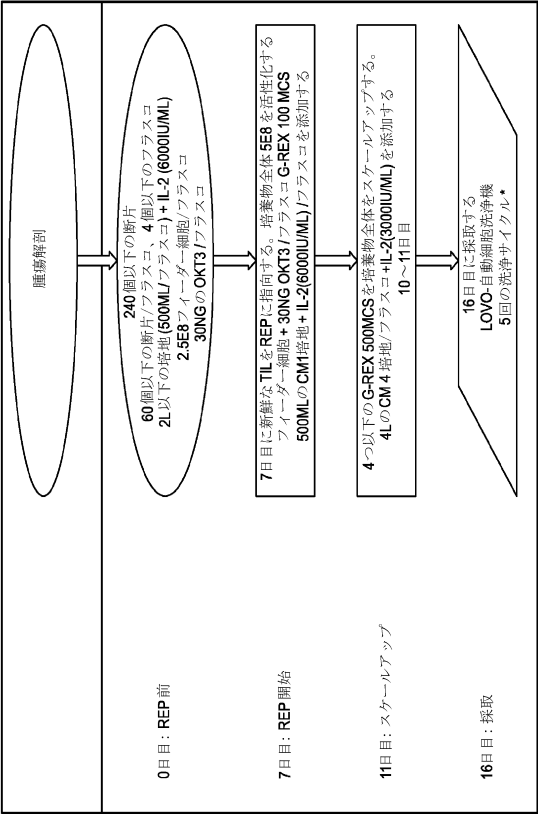
プロセス	GEN 3	GEN 3.1 対照	GEN 3.1
L4063	標準培地	標準培地	標準培地
L4064	合成培地	合成培地	合成培地

合成培地:
プロセスの各日における CTIS OPTIMIZER (無血清培地)

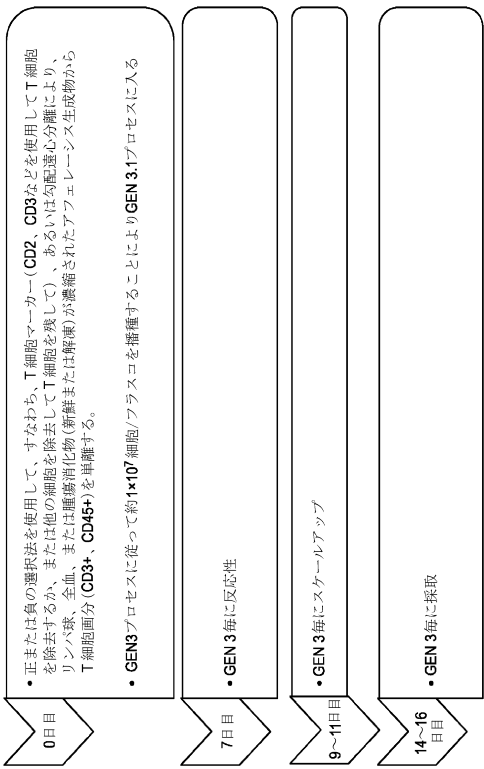
プロセス	GEN 2	GEN 3
L4054	標準培地	標準培地
L4055	標準培地	標準培地
M1085T	標準培地	

標準培地:
REP 前: CM1
REP 開始: CM2
分割またはスケールアップ: CM4

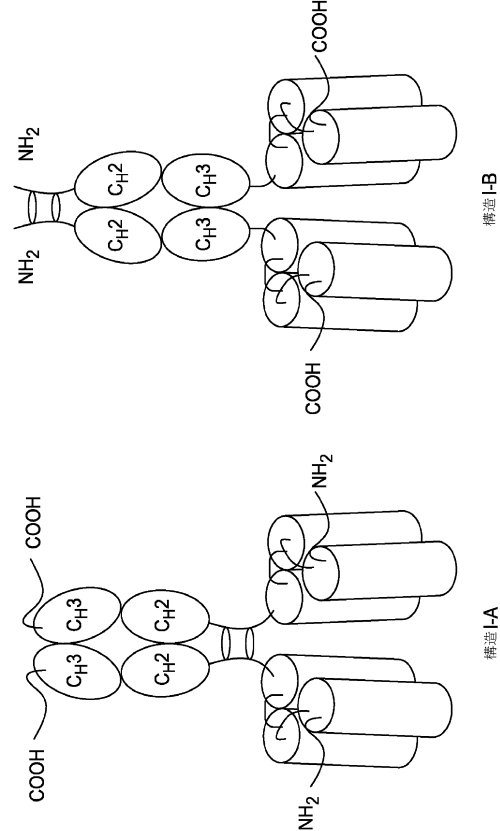
【図 16】



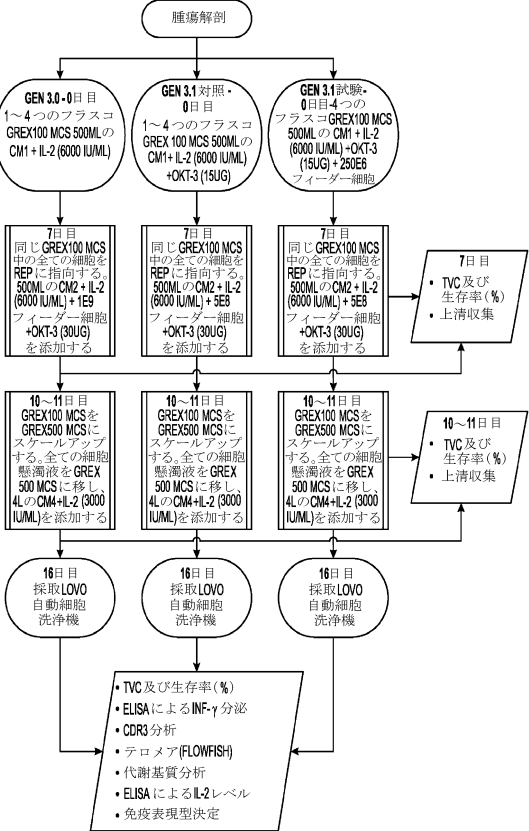
【図 17】



【図 18】



【図 19】



10

20

30

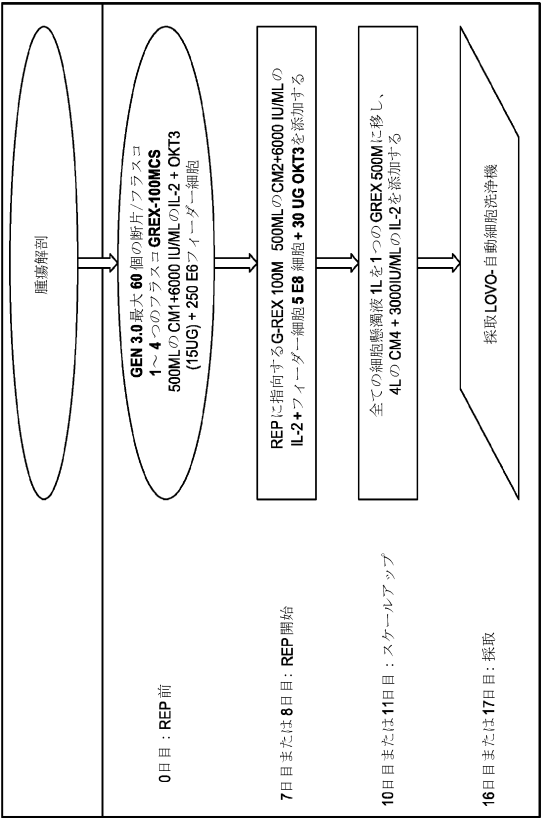
40

50

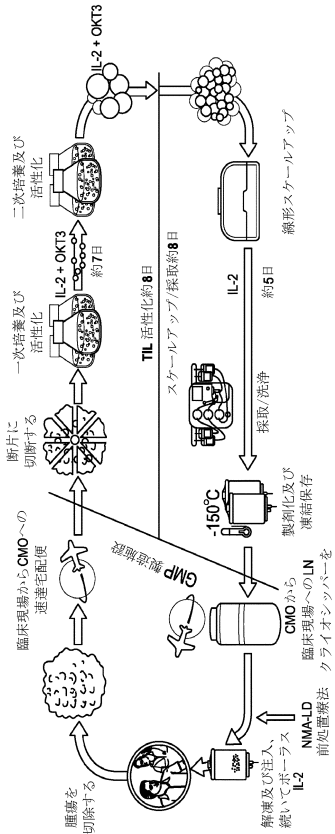
【図 2 0】

プロセス日	条件	GEN 3.1 試験
0 日目・ REP 前開始	培養 CM1	500 ML
	IL-2 (6000 IU/ML)	+
	OKT-3 (15 UG)	+
	ファイダー (250 E+06)	+
プロセス日	条件	GEN 3.1 試験
7 日目・ REP 開始	培養 CM2	500 ML
	IL-2 (6000 IU/ML)	+
	7 日目に追加された OKT-3 (30 UG)	+
	7 日目に追加されたファイダー 日数での総ファイダー	500 E06 750 E+06
プロセス日	条件	GEN 3.1 試験
9~11 日目 スケールアップ	G-REX 100MCS から、TIL 懸濁液を 1 つの G-REX 500MCS (最大 3 つの G-REX 500MCS) に移す	あり
16 日目・採取	LOVO 自動細胞洗浄機	あり

【図 2 1】



【図 2 2】



【図 2 3】

	GEN 2	GEN 3
合計培養時間	22 日	16 ~17 日 (または 16 日)
断片/プラスチック	1 つのプラスチック中の 60 個以下の断片	最大 4 つのプラスチック中の 60 個以下の断片
標的 REP 前細胞数	1L・単一の追加 <200 x 10 ⁶ TIL	1L・2 x 500 ML の追加 全ての細胞は連続的なプロセスを通 じて運ばれた
スクリーニング プラスチックの選択	スクリーニングなし 選択なし	スクリーニングなし BACT-T 無菌性、汚染物質の目視検査
REP/スケールアップ ファイダー		
培養地	HSAB を含む	40% 以上の減容 合成培地
スケールアップ	プールした培養物、5 日目に 500ML に減容 最大 5 つのプラスチック (2500 CM ²) に分注する	プラスチックは線形にスケールアップされ、 サブコンボリューションとして扱われる
OKT3	150µg	180UG 以下
IL-2	高用量 1~5	高用量 1~4
最終ステップ	閉鎖 10:1	閉鎖 10:1
濃縮/洗浄	LOVO 100:1	LOVO 1000:1
配合条件	1:1 CS10 (5% DMSO)	1:1 CS10 (5% DMSO)
発送条件	気相液体要素	気相液体要素
注入	解凍した IV 重カ	解凍した IV 重カ

10

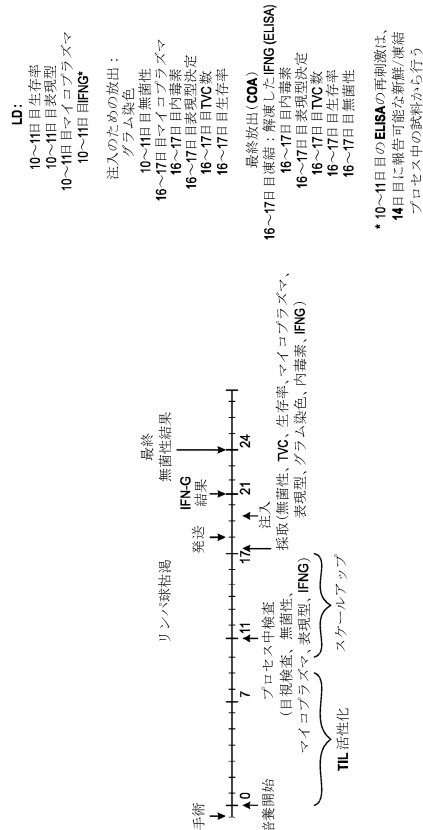
20

30

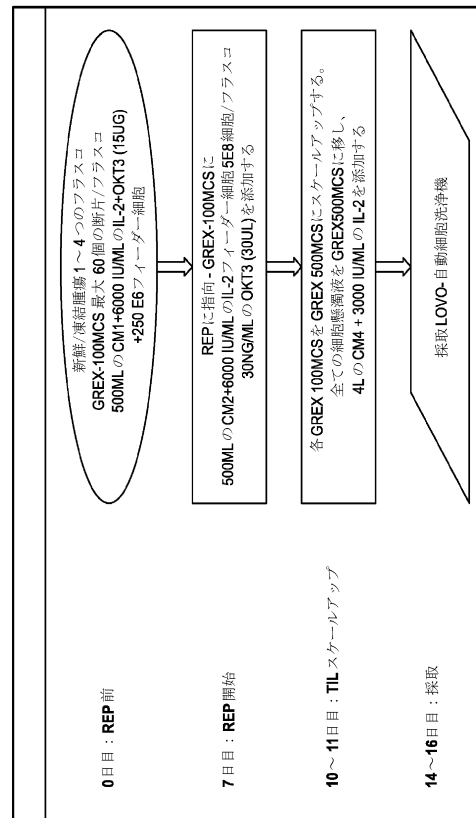
40

50

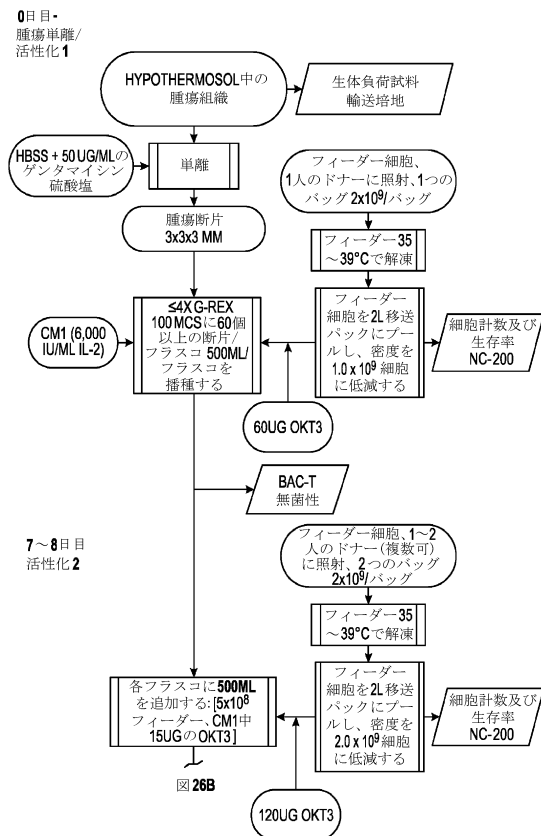
【図 24】



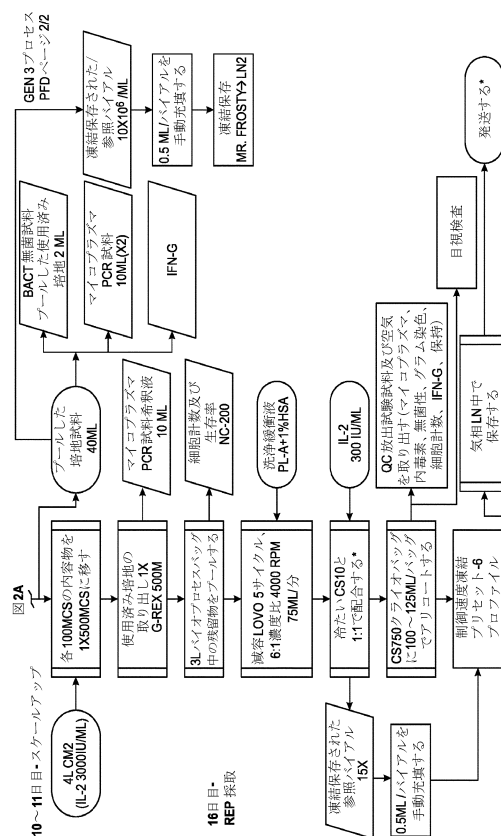
【圖 25】



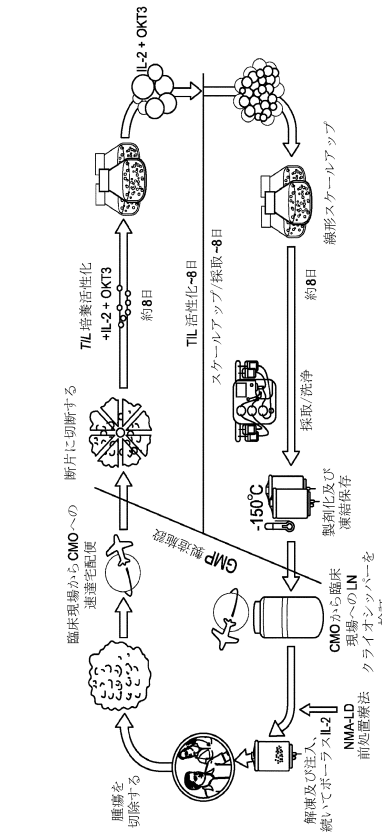
【図 26 A】



【圖 2 6 B】



【図 2 7】



【図 2 9】

プロセス比較	プロセス変更	差異
GEN 2; GEN 2.1	1 つのプラスチックの代わりに 2 つのプラスチックを用いたプロセスを開始する 2 つの G-REX500MCS プラスチック間の REP 開始のフィードバック層に分割する - 使用前に培地を事前に配合し、加温する	- 増加した TIL レバートリーを用いた最終細胞計数(用量)の倍加の可能性 - プロセス中のプロセス冗長性
GEN 2.1; GEN 3.1	- 新鮮または凍結腫瘍 14~16 日のプロセス (22 日から) - プロセス中の全フィードバック層を低減する 0 日目には存在するフィードバック層及び OKT3 - 断片で開始した REP 100MCS スケールから 500MCS - 複数の REP 前のプラスチックを計量する - 標準培地及び合成培地(無血清)	- 増加した有効性 - 改善された表現型 - 低下したプロセス時間 - 低減した試験試験 - 低下したプロセス変動 - 合成された試験薬 - 増加したレバートリー - 純度を低減する (フィードバック) - 同等またはより高い用量

【図 2 8】

ステップ	GEN 2	GEN 2.1	GEN 3.0
REP 前・0 日目	50 個以下の断片/1 つの G-REX 100 MCS - 1 日	180 個以下の断片/3 つの G-REX 事前配合された CM1 加温培地 100MCS - 1 日	新鮮または凍結腫瘍 1 つの G-REX 当たり 30 個以下の断片 ~ 最大 60 個の断片を有する全腫瘍 100MCS (最大 4 つの G-REX)、事前に配合された加温培地 - 7 日。 REP 前、フィードバック細胞 + OKT-3 (15UG)
REP 開始	REP に指向する - 11 日目 - <200 E ⁵ TIL 1 つの G-REX 500MCS	REP に指向する - 11 日目 - <200 E ⁵ TIL 1 つの G-REX 500MCS 中の事前配合された CM2 加温培地 (5 回の洗浄サイクル)	REP に指向する - 7 日目 - 全ての細胞 TIL - 同じ G-REX 100MCS (100MCS を最大で 4 つの G-REX)、標準培地または合成培地(無血清) フィードバック細胞 + OKT-3 (30UG) の追加
TIL の増殖またはスケールアップ	1~5 つの G-REX 500MCS 16 日目に分割する	2~5 つの G-REX 500MCS 中の事前配合された CM4 加温培地 16 日目に分割する	G-REX 100MCS から、TIL 懸濁液を G-REX 500MCS、最大 4 つの G-REX 500 MCS に移す - 標準培地または合成培地(無血清) 10 日または 11 日目にスケールアップする
採取	22 日目に採取する、LOVO 自動細胞洗浄機 (5 回の洗浄サイクル)	22 日目に採取する、LOVO 自動細胞洗浄機 (5 回の洗浄サイクル)	14 日または 16 日目に採取する、LOVO 自動細胞洗浄機 (5 回の洗浄サイクル)
最終配合	凍結保存した生成物 LN ₂ 中の 3000 IUM/L の IL-2-CS10、複数のアリコート	凍結保存した生成物 LN ₂ 中の 3000 IUM/L の IL-2-CS10、複数のアリコート	凍結保存した生成物 LN ₂ 中の 3000 IUM/L の IL-2-CS10、複数のアリコート
プロセス時間	22 日	22 日	16 日

【図 3 0】

プロセス日	条件	GEN 3.0	GEN 3.1 対照	GEN 3.1 試験
0 日目: 腫瘍断片の凍結及び活性化	培養地 (*)	500 ML	500 ML	500 ML
	IL-2	6000 IU/ML	6000 IU/ML	6000 IU/ML
	OKT-3	-	15 UG	15 UG
	フィードバック	-	-	2.5E+06
プロセス日	条件	GEN 3.0	GEN 3.1 対照	GEN 3.1 試験
	培養地 (*)	500 ML	500 ML	500 ML
	IL-2	6000 IU/ML	6000 IU/ML	6000 IU/ML
	OKT-3	30 UG	30 UG	30 UG
	フィードバック	1 E+09	500 E+06	500 E+06
	7 日までに追加されたフィードバックの合計	1 E+09	500 E+06	750 E+06
プロセス日	条件	GEN 3.0	GEN 3.1 対照	GEN 3.1 試験
	GREX 100 から、IL-2 (3000 IU/ML) を含む 4L 培地を含有する 1 つの GREX 500 に、全 TIL 懸濁液を移す			
プロセス日	条件	GEN 3.0	GEN 3.1 対照	GEN 3.1 試験
	LOVO 自動細胞洗浄機及び CS10 による凍結保存。			
16 ~ 17 日目: 採取/洗浄/配合				

(*) 培地は、標準培地または CTS 無血清培地であり得る

10

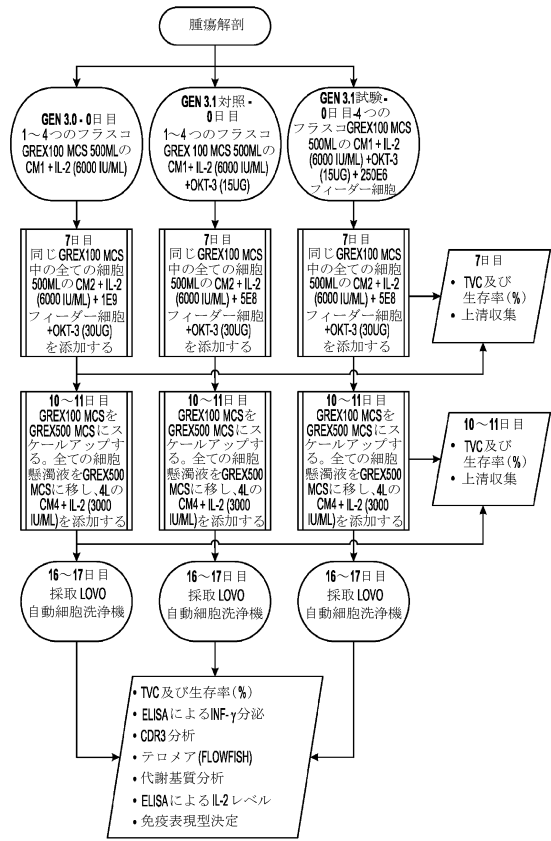
20

30

40

50

【図 3 1】



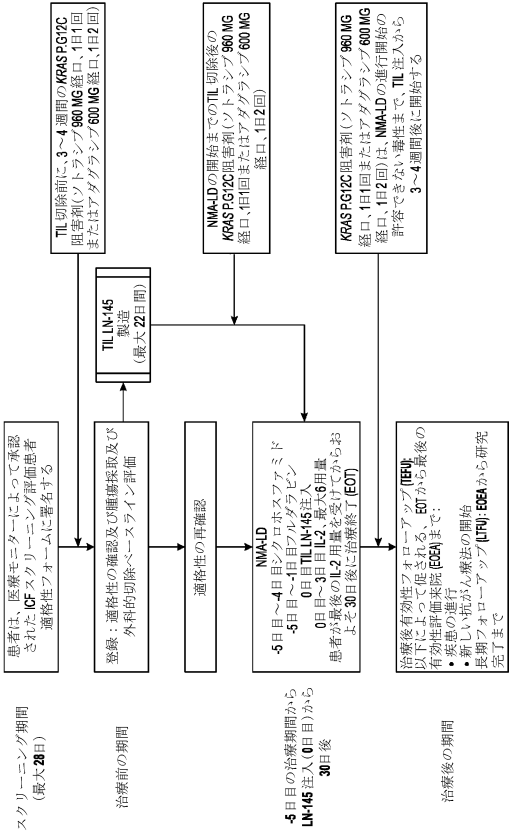
【図 3 2】

GEN 3 プロセス・最適化	
240 個以下の断片 60 個以下の断片/フラスコ 4 個以下の断片/フラスコ 2L 以下の培地 (500ML/フラスコ) IL-2 (6000 IU/ML) 2.5x10 ⁸ フィーダー細胞/フラスコ 15UG の OKT3/フラスコ REPI に指向した新鮮な TIL 培養物全体を活性化させた 5x10 ⁸ フィーダー細胞 30UG の OKT3/フラスコ G-REX 100MCS 500ML の培地 + IL-2 (6000 IU/ML) を添加する	0 日目 腫瘍単離及び活性化
7~8 日目 再活性化	7 日目 TVC 及び 生存率 (%) 上清収集
10~11 日目 TIL 継代培養	10~11 日目 TVC 及び 生存率 (%) 上清収集
16~17 日目 採取	16~17 日目 採取

【図 3 3】

承認基準		GEN 3.1 試験対 GEN 3.0 プロセス
試験		
細胞計数 (TVC)	GEN 3.1 > 30% からプロセス GEN 3.0	満たした
生存率 (%)	70% 以上の生存率	満たした
免疫表現型決定 (%CD3+7%CD45+)	GEN 3.1 > GEN 3.0 プロセスとの間の 5% 以下の差	満たした
IFNγ 分泌	GEN 3.1 > プロセス GEN 3.0	満たした

【図 3 4】



10

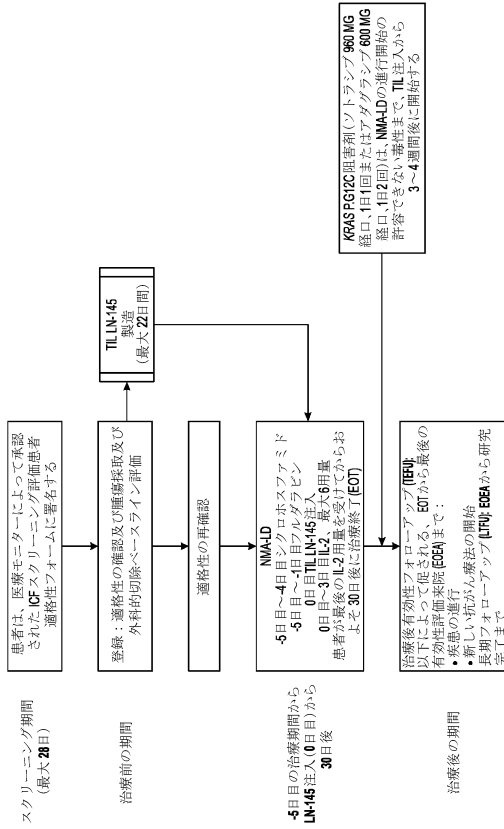
20

30

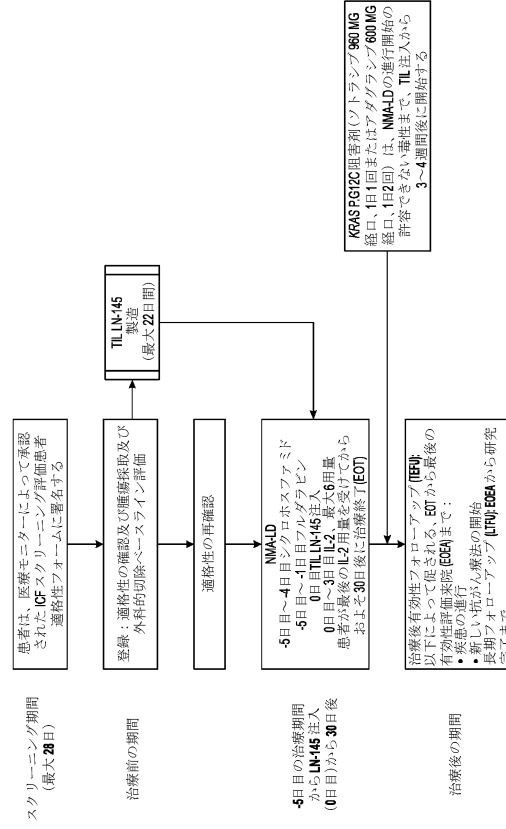
40

50

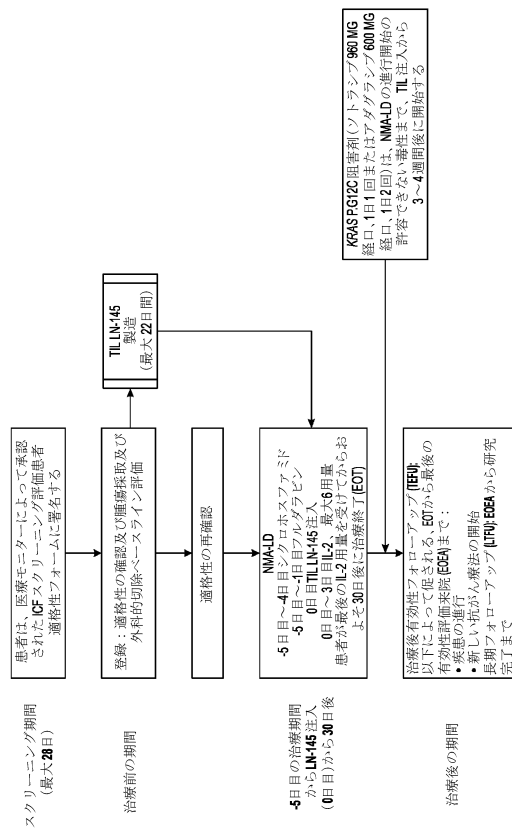
【図 3 5】



【図 3 6】



【図 3 7】



10

20

30

40

50

【配列表】

2024527961000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/038665

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/0783 A61K35/17 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61P A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2020/299644 A1 (FRANK IAN [US] ET AL)	141-212
A	24 September 2020 (2020-09-24)	1-140,
	cited in the application	213-215
	examples	
X	US 10 925 900 B2 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS	141-212
A	INC [US]; LOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC	
	[US]) 23 February 2021 (2021-02-23)	1-140,
	cited in the application	213-215
	examples	
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 November 2022

Date of mailing of the international search report

15/11/2022

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Teyssier, Bertrand

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/038665

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GETTINGER S ET AL: "Phase II, multicenter study of autologous tumor infiltrating lymphocytes (TIL, LN 144/LN-145/LN-145-S1) in patients with solid tumours", JOURNAL OF THORACIC ONCOLOGY, vol. 16, no. 4_Suppl., 187TIP, 1 April 2021 (2021-04-01), pages S799-S800, XP055976887, European Lung Cancer Virtual Congress; 25-27 March 2021 ISSN: 1556-0864, DOI: 10.1016/S1556-0864(21)02029-3 abstract -----	211,212
X	MASSARELLI E ET AL: "A phase II multicenter study of autologous tumor infiltrating lymphocytes (TIL, LN-145) cell therapy in patients with metastatic non-small cell lung cancer (mNSCLC)", JOURNAL OF THORACIC ONCOLOGY, vol. 16, no. 4_Suppl., 188TIP, 1 April 2021 (2021-04-01), page S800, XP055976892, European Lung Cancer Virtual Congress; 25-27 March 2021 ISSN: 1556-0864, DOI: 10.1016/S1556-0864(21)02030-X abstract -----	211,212
X	THOMAS S S ET AL: "Safety and efficacy of lifileucel (LN-144), an autologous, tumor infiltrating lymphocyte cell therapy in combination with pembrolizumab for immune checkpoint inhibitor naïve patients with advanced melanoma.", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 39, no. 15_Suppl., 9537, 20 May 2021 (2021-05-20), XP055976889, Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology; online; 4-8 June 2021 ISSN: 0732-183X, DOI: 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.9537 abstract ----- -/--	211,212

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/038665

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHESNEY J A ET AL: "Abstract CT008: Lifileucel (LN-144), a cryopreserved autologous tumor infiltrating lymphocyte (TIL) therapy in patients with advanced (unresectable or metastatic) melanoma: durable duration of response at 28 month follow up", CANCER RESEARCH, vol. 81, no. 13_Suppl., CT008, 1 July 2021 (2021-07-01), XP055976883, American Association for Cancer Research Annual Meeting; Philadelphia, PA, USA; 17-21 May 2021 ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2021-CT008 abstract -----	211,212
X	GETTINGER S ET AL: "Abstract CT235: A Phase 2, multicenter study of autologous tumor infiltrating lymphocytes (TIL, LN 144/LN-145/LN-145-S1) in patients with solid tumors", CANCER RESEARCH, vol. 81, no. 13_Supplement, CT235, 1 July 2021 (2021-07-01), XP055976871, American Association for Cancer Research Annual Meeting; Philadelphia, PA, USA; 17-21 May 2021 ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2021-CT235 abstract -----	211,212
X	MASSARELLI E ET AL: "Abstract CT246: A phase 2 multicenter study of autologous tumor infiltrating lymphocytes (TIL, LN-145) cell therapy in patients with metastatic non-small cell lung cancer (mNSCLC)", CANCER RESEARCH, vol. 81, no. 13_Supplement, CT246, 1 July 2021 (2021-07-01), XP055977274, American Association for Cancer Research Annual Meeting; Philadelphia, PA, USA; 17-21 May 2021 ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2021-CT246 abstract -----	211,212
1 A	INDINI A ET AL: "Targeting KRAS in Solid Tumors: Current Challenges and Future Opportunities of Novel KRAS Inhibitors", PHARMACEUTICS, vol. 13, no. 5, 653, 4 May 2021 (2021-05-04), XP055977182, DOI: 10.3390/pharmaceutics13050653 -----	1-140, 213-215
2	----- -/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/038665

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MERZ V ET AL: "Targeting KRAS: The Elephant in the Room of Epithelial Cancers", FRONTIERS IN ONCOLOGY, vol. 11, 11 March 2021 (2021-03-11), XP055977189, DOI: 10.3389/fonc.2021.638360 -----	1-140, 213-215
A	CUI S ET AL: "Classifying Non-Small Cell Lung Cancer by Status of Programmed Cell Death Ligand 1 and Tumor-Infiltrating Lymphocytes on Tumor Cells", JOURNAL OF CANCER, vol. 9, no. 1, 1 January 2018 (2018-01-01) , pages 129-134, XP55977343, ISSN: 1837-9664, DOI: 10.7150/jca.21842 -----	1-140, 213-215
A,P	PIRLOG R ET AL: "KRAS G12C mutated lung adenocarcinomas: A morphological and molecular cartography", VIRCHOWS ARCHIV, vol. 479, no. Suppl. 1, PS22-015, August 2021 (2021-08), page 162, XP055977206, 33rd European Congress of Pathology; virtual; 29-31 August 2021 ISSN: 0945-6317, DOI: 10.1007/s00428-021-03157-8 -----	1-140, 213-215
A,P	DORTA SUAREZ M ET AL: "Molecular features of KRAS mutant NSCLC: Weaving a future score for immune-checkpoint inhibitors (ICI)", ANNALS OF ONCOLOGY, vol. 32, 12P, 1 October 2021 (2021-10-01), page S1349, XP055977202, Molecular Analysis for Precision Oncology Virtual Congress 2021; 7-9 October 2021 ISSN: 0923-7534, DOI: 10.1016/j.annonc.2021.08.2007 abstract ----- -/--	1-140, 213-215

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/038665

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	CHESNEY J A ET AL: "Abstract CT130: Trial in progress: A phase 2 multicenter study (IOV-LUN-202) of autologous tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) cell therapy (LN-145) in patients with metastatic non-small cell lung cancer (mNSCLC)", CANCER RESEARCH, vol. 82, no. 12_Suppl., CT130, 15 June 2022 (2022-06-15), XP055976863, American Association for Cancer Research Annual Meeting; New Orleans, LA, USA; 8-13 April 2022 ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2022-CT130 abstract -----	1-215

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/038665

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2020299644 A1	24-09-2020	AU 2017347851 A1	02-05-2019
		BR 112019008305 A2	06-08-2019
		CA 3041678 A1	03-05-2018
		CN 110099998 A	06-08-2019
		EP 3532607 A1	04-09-2019
		IL 266209 A	30-06-2019
		JP 2019532652 A	14-11-2019
		KR 20190066073 A	12-06-2019
		MA 46669 A	04-09-2019
		SG 11201903331Q A	30-05-2019
		US 11058728 B1	13-07-2021
		US 2018228841 A1	16-08-2018
		US 2020299644 A1	24-09-2020
		US 2021252062 A1	19-08-2021
		US 2021252063 A1	19-08-2021
		US 2021260121 A1	26-08-2021
		US 2021401889 A1	30-12-2021
		US 2022000926 A1	06-01-2022
		US 2022000927 A1	06-01-2022
		US 2022000928 A1	06-01-2022
		US 2022000929 A1	06-01-2022
		US 2022008470 A1	13-01-2022
		US 2022088080 A1	24-03-2022
		US 2022088081 A1	24-03-2022
		US 2022096555 A1	31-03-2022
		US 2022133798 A1	05-05-2022
		WO 2018081473 A1	03-05-2018
US 10925900 B2	23-02-2021	AU 2018243355 A1	31-10-2019
		BR 112019020326 A2	28-04-2020
		CA 3057975 A1	04-10-2018
		CL 2019002769 A1	08-05-2020
		CL 2020002737 A1	05-03-2021
		CN 110785486 A	11-02-2020
		CO 2019011995 A2	18-02-2020
		CR 20190487 A	17-03-2020
		DK 3601533 T3	03-05-2021
		EC SP19077884 A	31-01-2020
		EP 3601533 A1	05-02-2020
		EP 3722415 A1	14-10-2020
		EP 3730608 A1	28-10-2020
		EP 3766964 A1	20-01-2021
		EP 3910055 A1	17-11-2021
		ES 2874335 T3	04-11-2021
		HR P20210677 T1	25-06-2021
		HU E054829 T2	28-10-2021
		IL 269543 A	28-11-2019
		JP 2020515257 A	28-05-2020
		JP 2021519582 A	12-08-2021
		KR 20190142342 A	26-12-2019
		LT 3601533 T	10-06-2021
		MD 3601533 T2	31-07-2021
		PE 20191841 A1	31-12-2019
		PH 12019502247 A1	29-06-2020
		PL 3601533 T3	16-08-2021
		PT 3601533 T	24-05-2021
		RS 61863 B1	30-06-2021
		SG 11201908994R A	30-10-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/038665

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		SI 3601533 T1	30-09-2021
		TN 2019000273 A1	07-01-2021
		TW 201839129 A	01-11-2018
		US 11202803 B1	21-12-2021
		US 2018207201 A1	26-07-2018
		US 2018280436 A1	04-10-2018
		US 2018282694 A1	04-10-2018
		US 2018325954 A1	15-11-2018
		US 2019000882 A1	03-01-2019
		US 2019000883 A1	03-01-2019
		US 2019070222 A1	07-03-2019
		US 2019083536 A1	21-03-2019
		US 2019083538 A1	21-03-2019
		US 2019083539 A1	21-03-2019
		US 2019358259 A1	28-11-2019
		US 2019358260 A1	28-11-2019
		US 2019358261 A1	28-11-2019
		US 2020155601 A1	21-05-2020
		US 2020246384 A1	06-08-2020
		US 2020276241 A1	03-09-2020
		US 2020276242 A1	03-09-2020
		US 2020281978 A1	10-09-2020
		US 2020289569 A1	17-09-2020
		US 2020306306 A1	01-10-2020
		US 2020306307 A1	01-10-2020
		US 2021079348 A1	18-03-2021
		US 2021100842 A1	08-04-2021
		US 2021100843 A1	08-04-2021
		US 2021106625 A1	15-04-2021
		US 2021128620 A1	06-05-2021
		US 2021128621 A1	06-05-2021
		US 2021128622 A1	06-05-2021
		US 2021128623 A1	06-05-2021
		US 2021128624 A1	06-05-2021
		US 2021128625 A1	06-05-2021
		US 2021137984 A1	13-05-2021
		US 2021207091 A1	08-07-2021
		US 2021207092 A1	08-07-2021
		US 2021214685 A1	15-07-2021
		US 2021353677 A1	18-11-2021
		US 2021361712 A1	25-11-2021
		US 2021361713 A1	25-11-2021
		US 2021379111 A1	09-12-2021
		US 2022000923 A1	06-01-2022
		US 2022000924 A1	06-01-2022
		US 2022000925 A1	06-01-2022
		US 2022008469 A1	13-01-2022
		WO 2018182817 A1	04-10-2018

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 31/519 (2006.01)
A 6 1 K 31/517 (2006.01)
A 6 1 K 31/64 (2006.01)
A 6 1 K 31/7076 (2006.01)
A 6 1 K 31/185 (2006.01)
A 6 1 K 38/20 (2006.01)
A 6 1 P 35/02 (2006.01)
A 6 1 P 17/00 (2006.01)
A 6 1 P 15/00 (2006.01)
A 6 1 P 11/00 (2006.01)
A 6 1 P 35/04 (2006.01)
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)

A 6 1 P 43/00 1 2 1
A 6 1 K 31/519
A 6 1 K 31/517
A 6 1 K 31/64
A 6 1 K 31/7076
A 6 1 K 31/185
A 6 1 K 38/20
A 6 1 P 35/02
A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 15/00
A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 35/04
C 1 2 N 5/0783

Z N A

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,J
M,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY
,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,T
H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

アメリカ合衆国, テネシー州 3 7 2 2 1 ナッシュビル ポロ クラブ ロード 2 9 4 5

F ターム (参考)

4B065 AA90X AB10 AC20 BA30 BB40 BC50 CA44
4C084 AA02 AA19 BA01 BA44 DA14 MA17 MA65 MA66 NA05 NA14
ZA59 ZA81 ZA89 ZB26 ZB27 ZC75
4C085 AA13 AA14 CC23 DD62 EE03 GG01 GG02
4C086 AA01 AA02 BC50 CB09 DA21 EA18 MA01 MA02 MA04 NA05
NA14 ZA59 ZA81 ZA89 ZB26 ZB27 ZC75
4C087 AA01 AA02 BB37 BB64 MA02 MA17 MA65 MA66 NA05 NA14
ZA59 ZA81 ZA89 ZB26 ZB27 ZC75
4C206 AA01 AA02 JA18 MA02 MA04 NA05 ZB09