(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2022-553389
(P2022-553389A)
(43)公表日　令和4年12月22日(2022.12.22)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/09	１００	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ　5/10　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	5/10		４Ｃ０７６
Ａ６１Ｐ　35/00　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/09	１１０	４Ｃ０８７
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｋ　35/17　(2015.01)		Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全229頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-523995(P2022-523995)
(86)(22)出願日　令和2年10月23日(2020.10.23)
(85)翻訳文提出日　令和4年6月20日(2022.6.20)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/057135
(87)国際公開番号　WO2021/081378
(87)国際公開日　令和3年4月29日(2021.4.29)
(31)優先権主張番号　62/926,147
(32)優先日　令和1年10月25日(2019.10.25)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　519006377
アイオバンス バイオセラピューティクス，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０７０ サン カルロス インダストリアル ロード ８２５ スイート ４００
(74)代理人　100079108
弁理士　稲葉 良幸
(74)代理人　100109346
弁理士　大貫 敏史
(74)代理人　100117189
弁理士　江口 昭彦
(74)代理人　100134120
弁理士　内藤 和彦
(72)発明者　シャルティエークルト，セシル
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　腫瘍浸潤リンパ球の遺伝子編集及び免疫療法におけるその使用

(57)【要約】
本発明は、より短い期間でＴＩＬの改善した有効性、改善した表現型及び増加した代謝的健康をもたらす一方、低減した微生物汚染及び削減されたコストを可能にする、閉鎖系においてＴＩＬ集団を拡大培養するための新規な方法を含む、ＴＩＬを拡大培養し、及び治療用ＴＩＬ集団を生じさせるための改善及び／又は短縮された方法を提供する。この方法は、その治療効果を増強するために、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含み得る。かかるＴＩＬは、治療用処置レジメンでの使用を見出す。

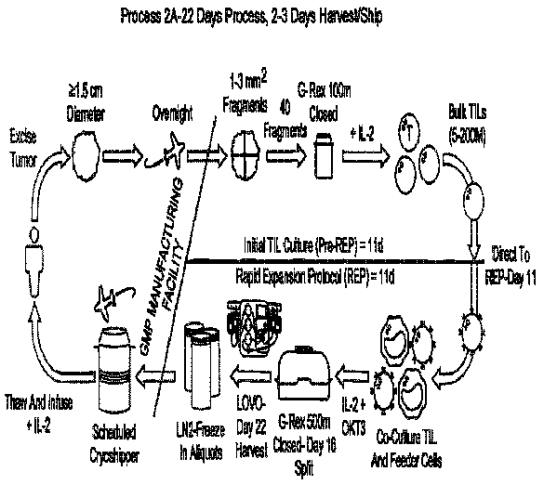


Figure 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法であって、
（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、前記患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加すること、ここで、前記腫瘍断片は、患者から切除された腫瘍からのものである；
（ｃ）ＩＬ－２及び任意選択によりＯＫＴ－３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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を生じさせること、ここで、前記第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、前記第１の拡大培養は、前記第２のＴＩＬ集団を得るために約３～１４日間にわたって実施され、前記第２のＴＩＬ集団は、前記第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；
（ｄ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせること、ここで、前記第２の拡大培養は、前記第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１４日間にわたって実施され、前記第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団であり、前記第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；
（ｅ）ステップ（ｄ）から得られた前記治療用ＴＩＬ集団を回収すること、ここで、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；
（ｆ）ステップ（ｅ）からの前記回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すこと、ここで、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；及び
（ｇ）前記方法中の任意の時点において、前記ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集すること
を含む方法。
【請求項２】
凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）における前記回収されたＴＩＬ集団を含む前記輸注バッグを凍結保存するステップを更に含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
凍結保存プロセスは、回収されたＴＩＬ集団と凍結保存培地との１：１の比率を使用して実施される、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記抗原提示細胞は、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記ＰＢＭＣは、照射され、及び同種異系である、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記ＰＢＭＣは、ステップ（ｄ）において９～１４日目のいずれかに細胞培養物に添加される、請求項４に記載の方法。
【請求項７】
前記抗原提示細胞は、人工抗原提示細胞である、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
ステップ（ｅ）における前記回収は、膜ベースの細胞処理系を使用して実施される、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
ステップ（ｅ）における前記回収は、ＬＯＶＯ細胞処理系を使用して実施される、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】

前記複数の断片は、約４～約５０個の断片を含み、各断片は、約２７ｍｍ^{3}の体積を有する、請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
前記複数の断片は、約１３００ｍｍ^3～約１５００ｍｍ^{3}の総体積を有する約３０～約６０個の断片を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
前記複数の断片は、約１３５０ｍｍ^{3}の総体積を有する約５０個の断片を含む、請求項９に記載の方法。
【請求項１３】
前記複数の断片は、約１グラム～約１．５グラムの総質量を有する約５０個の断片を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１４】
前記細胞培養培地は、Ｇコンテナ及びXuri細胞培養バッグからなる群から選択される容器内に提供される、請求項１に記載の方法。
【請求項１５】
ステップ（ｄ）における前記細胞培養培地は、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１を更に含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１６】
ＩＬ－２濃度は、約１０，０００ＩＵ／ｍＬ～約５，０００ＩＵ／ｍＬである、請求項１～１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
ＩＬ－１５濃度は、約５００ＩＵ／ｍＬ～約１００ＩＵ／ｍＬである、請求項１５に記載の方法。
【請求項１８】
ＩＬ－２１濃度は、約２０ＩＵ／ｍＬ～約０．５ＩＵ／ｍＬである、請求項１に記載の方法。
【請求項１９】
ステップ（ｆ）における前記輸注バッグは、HypoThermosol含有輸注バッグである、請求項１に記載の方法。
【請求項２０】
前記凍結保存培地は、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含む、請求項３に記載の方法。
【請求項２１】
凍結保存培地は、７％～１０％のＤＭＳＯを含む、請求項１７に記載の方法。
【請求項２２】
ステップ（ｃ）における第１の期間及びステップ（ｅ）における第２の期間は、１０日、１１日又は１２日の期間内にそれぞれ個別に実施される、請求項１に記載の方法。
【請求項２３】
ステップ（ｃ）における第１の期間及びステップ（ｅ）における第２の期間は、１１日の期間内にそれぞれ個別に実施される、請求項１に記載の方法。
【請求項２４】
ステップ（ａ）～（ｆ）は、約１０日～約２２日の期間内に実施される、請求項１に記載の方法。
【請求項２５】
ステップ（ａ）～（ｆ）は、約２０日～約２２日の期間内に実施される、請求項１に記載の方法。
【請求項２６】
ステップ（ａ）～（ｆ）は、約１５日～約２０日の期間内に実施される、請求項１に記載の方法。
【請求項２７】

ステップ（ａ）～（ｆ）は、約１０日～約２０日の期間内に実施される、請求項１に記載の方法。
【請求項２８】
ステップ（ａ）～（ｆ）は、約１０日～約１５日の期間内に実施される、請求項１に記載の方法。
【請求項２９】
ステップ（ａ）～（ｆ）は、２２日以下で実施される、請求項１に記載の方法。
【請求項３０】
ステップ（ａ）～（ｆ）は、２０日以下で実施される、請求項１に記載の方法。
【請求項３１】
ステップ（ａ）～（ｆ）は、１５日以下で実施される、請求項１に記載の方法。
【請求項３２】
ステップ（ａ）～（ｆ）は、１０日以下で実施される、請求項１に記載の方法。
【請求項３３】
ステップ（ａ）～（ｆ）及び凍結保存は、２２日以下で実施される、請求項２に記載の方法。
【請求項３４】
ステップ（ｅ）で回収された前記治療用ＴＩＬ集団は、治療有効投与量の前記ＴＩＬのために十分なＴＩＬを含む、請求項１～３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５】
治療有効投与量のために十分なＴＩＬの数は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}個である、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
ステップ（ｂ）～（ｅ）は、単一の容器内で実施され、ステップ（ｂ）～（ｅ）を単一の容器内で実施することは、ステップ（ｂ）～（ｅ）を複数の容器内で実施することと比較して、切除された腫瘍毎のＴＩＬ収率の増加をもたらす、請求項１～３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７】
前記抗原提示細胞は、前記系を開放することなく、ステップ（ｄ）における第２の期間中に前記ＴＩＬに添加される、請求項１～３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３８】
ステップ（ｄ）における前記第３のＴＩＬ集団は、対象に投与されたとき、増加した有効性、増加したインターフェロンγ産生、増加したポリクローナル性、増加した平均ＩＰ－１０及び／又は増加した平均ＭＣＰ－１を提供する、請求項１～３７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９】
ステップ（ｄ）における前記第３のＴＩＬ集団は、対象に投与されたとき、少なくとも５倍以上のインターフェロンγ産生を提供する、請求項１～３８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４０】
ステップ（ｄ）における前記第３のＴＩＬ集団は、前記第２のＴＩＬ集団に対して、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を含む治療用ＴＩＬ集団であり、前記治療用ＴＩＬ集団中の前記エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、前記第２の細胞集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞に対して、ＣＤ２７＋を発現すること、ＣＤ２８＋を発現すること、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈する、請求項１～３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４１】
前記第３のＴＩＬ集団から得られる前記エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、前記第２の細胞集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラ

ルメモリーＴ細胞に対して、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現を呈する、請求項１～４０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２】
微生物汚染のリスクは、開放系と比較して低減される、請求項１～４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３】
ステップ（ｇ）からの前記ＴＩＬは、患者に注入される、請求項１～４２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４】
前記複数の断片は、約４個の断片を含む、請求項１～４３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５】
前記細胞培養培地は、前記第１の拡大培養、前記第２の拡大培養又は両方中、４－１ＢＢアゴニスト及び／又はＯＸ４０アゴニストを更に含む、請求項１～４４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６】
前記遺伝子編集は、前記４－１ＢＢアゴニスト及び／又は前記ＯＸ４０アゴニストが前記細胞培養培地に導入された後に実行される、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記遺伝子編集は、前記４－１ＢＢアゴニスト及び／又は前記ＯＸ４０アゴニストが前記細胞培養培地に導入される前に実行される、請求項４５に記載の方法。
【請求項４８】
前記遺伝子編集は、前記第１の集団、前記第２の集団及び前記第３の集団の１つ以上からのＴＩＬに対して実行される、請求項１～４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９】
前記遺伝子編集は、前記第１の拡大培養からのＴＩＬ若しくは前記第２の拡大培養からのＴＩＬ又は両方に対して実行される、請求項１～４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５０】
前記遺伝子編集は、前記第１の拡大培養後及び前記第２の拡大培養前に実行される、請求項１～４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５１】
前記遺伝子編集は、ステップ（ｃ）前、ステップ（ｄ）前又はステップ（ｅ）前に実行される、請求項１～４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５２】
前記細胞培養培地は、前記第１の拡大培養中及び／又は前記第２の拡大培養中にＯＫＴ－３を含み、及び前記遺伝子編集は、前記ＯＫＴ－３が前記細胞培養培地に導入される前に実行される、請求項１～４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５３】
前記細胞培養培地は、前記第１の拡大培養中及び／又は前記第２の拡大培養中にＯＫＴ－３を含み、及び前記遺伝子編集は、前記ＯＫＴ－３が前記細胞培養培地に導入された後に実行される、請求項１～４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５４】
前記細胞培養培地は、前記第１の拡大培養の開始日に開始してＯＫＴ－３を含み、及び前記遺伝子編集は、前記ＴＩＬが前記ＯＫＴ－３に曝露された後に実行される、請求項１～４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５５】
前記遺伝子編集は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現が前記治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンシング又は低減されることを引き起こす、請求項１～５４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５６】

前記１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＡＮＫＲＤ１１、ＳＯＣＳ１及びＢＣＯＲを含む群から選択される、請求項５５に記載の方法。

【請求項５７】

前記１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ及びＰＫＡを含む群から選択される、請求項５５に記載の方法。

【請求項５８】

前記遺伝子編集は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現が前記治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強されることを引き起こし、前記免疫チェックポイント遺伝子は、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ １／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）及び／又はＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１を含む群から選択される、請求項１～５４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５９】

前記遺伝子編集は、前記１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子における二本鎖又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む、請求項１～５８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６０】

前記遺伝子編集は、ＣＲＩＳＰＲ方法、ＴＡＬＥ方法、ジンクフィンガー方法及びそれらの組み合わせから選択される１つ以上の方法を含む、請求項１～５８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６１】

前記遺伝子編集は、ＣＲＩＳＰＲ方法を含む、請求項１～５８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６２】

前記ＣＲＩＳＰＲ方法は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９方法である、請求項６１に記載の方法。

【請求項６３】

前記遺伝子編集は、ＴＡＬＥ方法を含む、請求項１～５８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６４】

前記遺伝子編集は、ジンクフィンガー方法を含む、請求項１～５８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６５】

癌を有する対象を処置する方法であって、拡大培養された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を投与することであって、

（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、前記患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｂ）前記腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；

（ｃ）ＩＬ－２及び任意選択によりＯＫＴ－３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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を生じさせる

こと、ここで、前記第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、前記第１の拡大培養は、前記第２のＴＩＬ集団を得るために約３～１４日間にわたって実施され、前記第２のＴＩＬ集団は、前記第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；
（ｄ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせること、ここで、前記第２の拡大培養は、前記第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１４日間にわたって実施され、前記第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団であり、前記第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；
（ｅ）ステップ（ｄ）から得られた前記治療用ＴＩＬ集団を回収すること、ここで、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；及び
（ｆ）ステップ（ｅ）からの前記回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すこと、ここで、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；
（ｇ）任意選択により、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）からの前記回収されたＴＩＬ集団を含む前記輸注バッグを凍結保存すること；
（ｈ）ステップ（ｇ）における前記輸注バッグから治療有効投与量の前記第３のＴＩＬ集団を前記患者に投与すること；及び
（ｉ）前記方法ステップ（ａ）～（ｆ）中の任意の時点において、前記ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集すること
を含む、投与することを含む方法。
【請求項６６】
ステップ（ｅ）で回収された前記治療用ＴＩＬ集団は、ステップ（ｈ）において治療有効投与量の前記ＴＩＬを投与するために十分なＴＩＬを含む、請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】
ステップ（ｈ）において治療有効投与量を投与するために十分なＴＩＬの数は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}個である、請求項６６に記載の方法。
【請求項６８】
前記抗原提示細胞（ＡＰＣ）は、ＰＢＭＣである、請求項６７に記載の方法。
【請求項６９】
前記ＰＢＭＣは、ステップ（ｄ）において９～１４日目のいずれかに細胞培養物に添加される、請求項６８に記載の方法。
【請求項７０】
ステップ（ｈ）で治療有効投与量のＴＩＬ細胞を投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、前記患者に投与されている、請求項６５～６９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７１】
前記骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、６０ｍｇ／m^2／日の用量で２日間にわたってシクロホスファミドを投与するステップ、それに続いて２５ｍｇ／m^2／日の用量で５日間にわたってフルダラビンを投与するステップを含む、請求項７０に記載の方法。
【請求項７２】
ステップ（ｈ）で前記患者に前記ＴＩＬ細胞を投与した翌日に開始する高用量ＩＬ－２レジメンで前記患者を処置するステップを更に含む、請求項６５～７１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７３】
前記高用量ＩＬ－２レジメンは、忍容量まで８時間毎に１５分ボーラス静脈内注入として投与される６００，０００又は７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含む、請求項７２に記載の方法。

【請求項７４】
ステップ（ｄ）における前記第３のＴＩＬ集団は、前記第２のＴＩＬ集団に対して、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を含む治療用ＴＩＬ集団であり、前記治療用ＴＩＬ集団中の前記エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、前記第２の細胞集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞に対して、ＣＤ２７＋を発現すること、ＣＤ２８＋を発現すること、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈する、請求項６５～７３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７５】
前記治療用ＴＩＬ集団中の前記エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、前記第２の細胞集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞に対して、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現を呈する、請求項６５～７４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７６】
前記癌は、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされる癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、腎癌及び腎細胞癌からなる群から選択される、請求項６５～７５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７７】
前記癌は、黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌及びＮＳＣＬＣからなる群から選択される、請求項６５～７６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７８】
前記癌は、黒色腫である、請求項６５～７７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７９】
前記癌は、ＨＮＳＣＣである、請求項６５～７８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８０】
前記癌は、子宮頸癌である、請求項６５～７９のいずれか一項に記載の方法
【請求項８１】
前記癌は、ＮＳＣＬＣである、請求項６５～８０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８２】
前記細胞培養培地は、前記第１の拡大培養、前記第２の拡大培養又は両方中、４－１ＢＢアゴニスト及び／又はＯＸ４０アゴニストを更に含む、請求項６５～８１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８３】
前記遺伝子編集は、前記４－１ＢＢアゴニスト及び／又は前記ＯＸ４０アゴニストが前記細胞培養培地に導入された後に実行される、請求項８２に記載の方法。
【請求項８４】
前記遺伝子編集は、前記４－１ＢＢアゴニスト及び／又は前記ＯＸ４０アゴニストが前記細胞培養培地に導入される前に実行される、請求項８２に記載の方法。
【請求項８５】
前記遺伝子編集は、前記第１の集団、前記第２の集団及び前記第３の集団の１つ以上からのＴＩＬに対して実行される、請求項６５～８４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８６】
前記遺伝子編集は、前記第１の拡大培養からのＴＩＬ若しくは前記第２の拡大培養からのＴＩＬ又は両方に対して実行される、請求項６５～８４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８７】
前記遺伝子編集は、前記第１の拡大培養後及び前記第２の拡大培養前に実行される、請求項６５～８４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８８】
前記遺伝子編集は、ステップ（ｃ）前、ステップ（ｄ）前又はステップ（ｅ）前に実行

される、請求項６５～８４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８９】
前記細胞培養培地は、前記第１の拡大培養中及び／又は前記第２の拡大培養中にＯＫＴ－３を含み、及び前記遺伝子編集は、前記ＯＫＴ－３が前記細胞培養培地に導入される前に実行される、請求項６５～８８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９０】
前記細胞培養培地は、前記第１の拡大培養中及び／又は前記第２の拡大培養中にＯＫＴ－３を含み、及び前記遺伝子編集は、前記ＯＫＴ－３が前記細胞培養培地に導入された後に実行される、請求項６５～８８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９１】
前記細胞培養培地は、前記第１の拡大培養の開始日に開始してＯＫＴ－３を含み、及び前記遺伝子編集は、前記ＴＩＬが前記ＯＫＴ－３に曝露された後に実行される、請求項６５～８８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９２】
前記遺伝子編集は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現が前記治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンシング又は低減されることを引き起こす、請求項６５～９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９３】
前記１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＡＮＫＲＤ１１、ＳＯＣＳ１及びＢＣＯＲを含む群から選択される、請求項９２に記載の方法。
【請求項９４】
前記１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ及びＰＫＡを含む群から選択される、請求項９２に記載の方法。
【請求項９５】
前記遺伝子編集は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現が前記治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強されることを引き起こし、前記免疫チェックポイント遺伝子は、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ １／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）及び／又はＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１を含む群から選択される、請求項６５～９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９６】
前記遺伝子編集は、前記１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子における二本鎖又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む、請求項６５～９５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９７】
前記遺伝子編集は、ＣＲＩＳＰＲ方法、ＴＡＬＥ方法、ジンクフィンガー方法及びそれらの組み合わせから選択される１つ以上の方法を含む、請求項６５～９５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９８】
前記遺伝子編集は、ＣＲＩＳＰＲ方法を含む、請求項６５～９５のいずれか一項に記載

の方法。
【請求項９９】
前記ＣＲＩＳＰＲ方法は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９方法である、請求項９８に記載の方法。
【請求項１００】
前記遺伝子編集は、ＴＡＬＥ方法を含む、請求項６５～９５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０１】
前記遺伝子編集は、ジンクフィンガー方法を含む、請求項６５～９５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０２】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法であって、
（ａ）第１のＴＩＬ集団を得るために、患者から切除された腫瘍からの処理された腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；
（ｂ）ＩＬ－２及び任意選択によりＯＫＴ－３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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を生じさせること、ここで、前記第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、前記第１の拡大培養は、前記第２のＴＩＬ集団を得るために約３～１４日間にわたって実施され、前記第２のＴＩＬ集団は、前記第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；
（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせること、ここで、前記第２の拡大培養は、前記第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１４日間にわたって実施され、前記第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団であり、前記第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；
（ｄ）ステップ（ｃ）から得られた前記治療用ＴＩＬ集団を回収すること、ここで、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；
（ｅ）ステップ（ｄ）からの前記回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すこと、ここで、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；及び
（ｆ）前記方法中の任意の時点において、前記ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集すること
を含む方法。
【請求項１０３】
ステップ（ｄ）で回収された前記治療用ＴＩＬ集団は、治療有効投与量の前記ＴＩＬのために十分なＴＩＬを含む、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１０４】
治療有効投与量のために十分なＴＩＬの数は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}個である、請求項１０３に記載の方法。
【請求項１０５】
凍結保存プロセスを使用して、前記回収されたＴＩＬ集団を含む前記輸注バッグを凍結保存するステップを更に含む、請求項１０４に記載の方法。
【請求項１０６】
前記凍結保存プロセスは、回収されたＴＩＬ集団と凍結保存培地との１：１の比率を使用して実施される、請求項１０５に記載の方法。
【請求項１０７】
前記抗原提示細胞は、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１０８】

前記ＰＢＭＣは、照射され、及び同種異系である、請求項１０７に記載の方法。
【請求項１０９】
前記ＰＢＭＣは、ステップ（ｃ）において９～１４日目のいずれかに細胞培養物に添加される、請求項１０８に記載の方法。
【請求項１１０】
前記抗原提示細胞は、人工抗原提示細胞である、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１１１】
ステップ（ｄ）における前記回収は、LOVO細胞処理系を使用して実施される、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１１２】
前記複数の断片は、約４～約５０個の断片を含み、各断片は、約２７mm^3の体積を有する、請求項６２に記載の方法。
【請求項１１３】
前記複数の断片は、約１３００mm^3～約１５００mm^3の総体積を有する約３０～約６０個の断片を含む、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１１４】
前記複数の断片は、約１３５０mm^3の総体積を有する約５０個の断片を含む、請求項１０３に記載の方法。
【請求項１１５】
前記複数の断片は、約１グラム～約１．５グラムの総質量を有する約５０個の断片を含む、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１１６】
前記複数の断片は、約４個の断片を含む、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１１７】
第２の細胞培養培地は、Ｇコンテナ及びXuri細胞培養バッグからなる群から選択される容器内に提供される、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１１８】
ステップ（ｅ）における前記輸注バッグは、HypoThermosol含有輸注バッグである、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１１９】
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の期間は、１０日、１１日又は１２日の期間内にそれぞれ個別に実施される、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１２０】
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の期間は、１１日の期間内にそれぞれ個別に実施される、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１２１】
ステップ（ａ）～（ｅ）は、約１０日～約２２日の期間内に実施される、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１２２】
ステップ（ａ）～（ｅ）は、約１０日～約２０日の期間内に実施される、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１２３】
ステップ（ａ）～（ｅ）は、約１０日～約１５日の期間内に実施される、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１２４】
ステップ（ａ）～（ｅ）は、２２日以下で実施される、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１２５】
ステップ（ａ）～（ｅ）及び凍結保存は、２２日以下で実施される、請求項１０５に記載の方法。
【請求項１２６】

ステップ（ｂ）～（ｅ）は、単一の容器内で実施され、ステップ（ｂ）～（ｅ）を単一の容器内で実施することは、ステップ（ｂ）～（ｅ）を複数の容器内で実施することと比較して、切除された腫瘍毎のＴＩＬ収率の増加をもたらす、請求項１０２～１２５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１２７】

前記抗原提示細胞は、前記系を開放することなく、ステップ（ｃ）における前記第２の期間中に前記ＴＩＬに添加される、請求項１０２～１２６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１２８】

ステップ（ｄ）における前記第３のＴＩＬ集団は、前記第２のＴＩＬ集団に対して、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を含む治療用ＴＩＬ集団であり、前記治療用ＴＩＬ集団中において得られる前記エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、前記第２の細胞集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞に対して、ＣＤ２７＋を発現すること、ＣＤ２８＋を発現すること、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈する、請求項１０２～１２７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１２９】

前記治療用ＴＩＬ集団中において得られる前記エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、前記第２の細胞集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞に対して、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現を呈する、請求項１０２～１２８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３０】

微生物汚染のリスクは、開放系と比較して低減される、請求項１０２～１２９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３１】

ステップ（ｅ）からの前記ＴＩＬは、患者に注入される、請求項１０２～１３０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３２】

前記閉鎖型容器は、単一のバイオリアクターを含む、請求項１０２～１３１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３３】

前記閉鎖型容器は、G-REX-10を含む、請求項１３２に記載の方法。

【請求項１３４】

前記閉鎖型容器は、G-REX-100を含む、請求項１３２に記載の方法。

【請求項１３５】

ステップ（ｄ）において、前記抗原提示細胞（ＡＰＣ）は、２５：１～１００：１のＡＰＣ：ＴＩＬの比率で前記第２のＴＩＬ集団の細胞培養物に添加される、請求項１０２～１３４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３６】

前記細胞培養物は、２．５×10^9個のＡＰＣ対１００×10^6個のＴＩＬの比率を有する、請求項１３５に記載の方法。

【請求項１３７】

ステップ（ｃ）において、前記抗原提示細胞（ＡＰＣ）は、２５：１～１００：１のＡＰＣ：ＴＩＬの比率で前記第２のＴＩＬ集団の細胞培養物に添加される、請求項１０２～１３４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３８】

前記細胞培養物は、２．５×10^9個のＡＰＣ対１００×10^6個のＴＩＬの比率を有する、請求項１３７に記載の方法。

【請求項１３９】

前記細胞培養培地は、前記第１の拡大培養、前記第２の拡大培養又は両方中、４－１Ｂ

Ｂアゴニスト及び／又はＯＸ４０アゴニストを更に含む、請求項１０２～１３８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４０】
前記遺伝子編集は、前記４－１ＢＢアゴニスト及び／又は前記ＯＸ４０アゴニストが前記細胞培養培地に導入された後に実行される、請求項１３９に記載の方法。
【請求項１４１】
前記遺伝子編集は、前記４－１ＢＢアゴニスト及び／又は前記ＯＸ４０アゴニストが前記細胞培養培地に導入される前に実行される、請求項１３９に記載の方法。
【請求項１４２】
前記遺伝子編集は、前記第１の集団、前記第２の集団及び前記第３の集団の１つ以上からのＴＩＬに対して実行される、請求項１０２～１４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４３】
前記遺伝子編集は、前記第１の拡大培養からのＴＩＬ若しくは前記第２の拡大培養からのＴＩＬ又は両方に対して実行される、請求項１０２～１４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４４】
前記遺伝子編集は、前記第１の拡大培養後及び前記第２の拡大培養前に実行される、請求項１０２～１４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４５】
前記遺伝子編集は、ステップ（ｂ）前、ステップ（ｃ）前又はステップ（ｄ）前に実行される、請求項１０２～１４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４６】
前記細胞培養培地は、前記第１の拡大培養中及び／又は前記第２の拡大培養中にＯＫＴ－３を含み、及び前記遺伝子編集は、前記ＯＫＴ－３が前記細胞培養培地に導入される前に実行される、請求項１０２～１４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４７】
前記細胞培養培地は、前記第１の拡大培養中及び／又は前記第２の拡大培養中にＯＫＴ－３を含み、及び前記遺伝子編集は、前記ＯＫＴ－３が前記細胞培養培地に導入された後に実行される、請求項１０２～１４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４８】
前記細胞培養培地は、前記第１の拡大培養の開始日に開始してＯＫＴ－３を含み、及び前記遺伝子編集は、前記ＴＩＬが前記ＯＫＴ－３に曝露された後に実行される、請求項１０２～１４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４９】
前記遺伝子編集は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現が前記治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンシング又は低減されることを引き起こす、請求項１０２～１４８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５０】
前記１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＡＮＫＲＤ１１、ＳＯＣＳ１及びＢＣＯＲを含む群から選択される、請求項１４９に記載の方法。
【請求項１５１】

前記１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ及びＰＫＡを含む群から選択される、請求項１４９に記載の方法。

【請求項１５２】

前記遺伝子編集は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現が前記治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強されることを引き起こし、前記免疫チェックポイント遺伝子は、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ １／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）及び／又はＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１を含む群から選択される、請求項１０２～１４８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５３】

前記遺伝子編集は、前記１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子における二本鎖又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む、請求項１０２～１５２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５４】

前記遺伝子編集は、ＣＲＩＳＰＲ方法、ＴＡＬＥ方法、ジンクフィンガー方法及びそれらの組み合わせから選択される１つ以上の方法を含む、請求項１０２～１５２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５５】

前記遺伝子編集は、ＣＲＩＳＰＲ方法を含む、請求項１０２～１５２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５６】

前記ＣＲＩＳＰＲ方法は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９方法である、請求項１５５に記載の方法。

【請求項１５７】

前記遺伝子編集は、ＴＡＬＥ方法を含む、請求項１０２～１５２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５８】

前記遺伝子編集は、ジンクフィンガー方法を含む、請求項１０２～１５２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５９】

癌を有する対象の処置に使用するための拡大培養ＴＩＬ集団であって、

（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、前記対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｂ）前記腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；

（ｃ）ＩＬ－２及び任意選択によりＯＫＴ－３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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を生じさせること、ここで、前記第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、前記第１の拡大培養は、前記第２のＴＩＬ集団を得るために約３～１４日間にわたって実施され、前記第２のＴＩＬ集団は、前記第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；

（ｄ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせること、ここで、前記第２の拡大培養は、前記第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１４日間にわたって実施され、前記第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団であり、前記第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；

（ｅ）ステップ（ｄ）から得られた前記治療用ＴＩＬ集団を回収すること、ここで、ステ

ップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；
（ｆ）ステップ（ｅ）からの前記回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すこと、ここで、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；
（ｇ）任意選択により、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）からの前記回収されたＴＩＬ集団を含む前記輸注バッグを凍結保存すること；及び
（ｈ）前記方法中の任意の時点において、前記ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集すること
を含む方法によって得ることができる第３のＴＩＬ集団である、拡大培養ＴＩＬ集団。
【請求項１６０】
前記方法は、請求項１～１５８のいずれか一項に記載の特徴の１つ以上を更に含む、請求項１５９に記載の癌を有する対象の処置に使用するためのＴＩＬ集団。
【請求項１６１】
前記細胞培養培地は、前記第１の拡大培養、前記第２の拡大培養又は両方中、４－１ＢＢアゴニスト及び／又はＯＸ４０アゴニストを更に含む、請求項１５９に記載の癌を有する対象の処置に使用するためのＴＩＬ集団。
【請求項１６２】
前記遺伝子編集は、前記第１の集団、前記第２の集団及び前記第３の集団の１つ以上からのＴＩＬに対して実行される、請求項１５９に記載の癌を有する対象の処置に使用するためのＴＩＬ集団。
【請求項１６３】
前記遺伝子編集は、前記第１の拡大培養からのＴＩＬ若しくは前記第２の拡大培養からのＴＩＬ又は両方に対して実行される、請求項１５９に記載の癌を有する対象の処置に使用するためのＴＩＬ集団。
【請求項１６４】
前記遺伝子編集は、前記第１の拡大培養後及び前記第２の拡大培養前に実行される、請求項１５９に記載の癌を有する対象の処置に使用するためのＴＩＬ集団。
【請求項１６５】
前記遺伝子編集は、ステップ（ｃ）前、ステップ（ｄ）前又はステップ（ｅ）前に実行される、請求項１５９に記載の癌を有する対象の処置に使用するためのＴＩＬ集団。
【請求項１６６】
前記遺伝子編集は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現が前記拡大培養ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンシング又は低減されることを引き起こす、請求項１５９に記載の癌を有する対象の処置に使用するためのＴＩＬ集団。
【請求項１６７】
前記１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＡＮＫＲＤ１１、ＳＯＣＳ１及びＢＣＯＲを含む群から選択される、請求項１６６に記載の癌を有する対象の処置に使用するためのＴＩＬ集団。
【請求項１６８】
前記１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ及びＰＫＡを含む群から選択される、請求項１６６に記載の癌を有する対象の処置に使用するためのＴＩＬ集団。
【請求項１６９】

前記遺伝子編集は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現が前記治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強されることを引き起こし、前記免疫チェックポイント遺伝子は、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ １／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）及び／又はＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１を含む群から選択される、請求項１６６に記載の癌を有する対象の処置に使用するためのＴＩＬ集団。

【請求項１７０】

前記遺伝子編集は、前記１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子における二本鎖又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む、請求項１５９に記載の癌を有する対象の処置に使用するためのＴＩＬ集団。

【請求項１７１】

前記遺伝子編集は、ＣＲＩＳＰＲ方法、ＴＡＬＥ方法、ジンクフィンガー方法及びそれらの組み合わせから選択される１つ以上の方法を含む、請求項１５９に記載の癌を有する対象の処置に使用するためのＴＩＬ集団。

【請求項１７２】

請求項１５９に記載の癌を有する対象の処置に使用するためのＴＩＬ集団、ＤＭＳＯを含む凍結保護培地及び電解質溶液を含む凍結保存組成物。

【請求項１７３】

１つ以上の安定剤及び１つ以上のリンパ球成長因子を更に含む、請求項１７２に記載の凍結保存組成物。

【請求項１７４】

前記１つ以上の安定剤は、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）を含み、及び前記１つ以上のリンパ球成長因子は、ＩＬ－２を含む、請求項１７３に記載の凍結保存組成物。

【請求項１７５】

ＤＭＳＯを含む前記凍結保護培地及び前記電解質溶液は、約１．１：１～約１：１．１の比率で存在する、請求項１７４に記載の凍結保存組成物。

【請求項１７６】

約1×10^{6}～約9×10^{14}個の量の前記ＴＩＬ集団、約３０ｍＬ～約７０ｍＬの量の、ＤＭＳＯを含む前記凍結保護培地、約３０ｍＬ～約７０ｍＬの量の前記電解質溶液、約０．１ｇ～約１．０ｇの量のＨＳＡ及び約０．００１ｍｇ～約０．００５ｍｇの量のＩＬ－２を含む、請求項１７４に記載の凍結保存組成物。

【請求項１７７】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法であって、

（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、前記患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｂ）前記腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；

（ｃ）ＩＬ－２を含み、及び任意選択によりＯＫＴ－３及び／又は４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で約２～５日間にわたって前記第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施すること；

（ｄ）任意選択により、ＯＫＴ－３を添加して、第２のＴＩＬ集団を生じさせること、ここで、前記第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、前記第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約１～３日間にわたって実施され、前記第２のＴＩＬ集団は、前記第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；

（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団に対して無菌エレクトロポレーションステップを実施すること、ここで、前記無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移動を媒介する；

（ｆ）前記第２のＴＩＬ集団を約１日間にわたって静置すること；

（ｇ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３抗体、任意選択によりＯＸ４０抗体及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充すること

により、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせること、ここで、前記第２の拡大培養は、前記第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１１日間にわたって実施され、前記第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；
（ｈ）ステップ（ｇ）から得られた前記治療用ＴＩＬ集団を回収して、回収されたＴＩＬ集団を提供すること、ここで、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行は、前記系を開放せずに発生し、前記回収されたＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である；
（ｉ）前記回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すこと、ここで、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；及び
（ｊ）ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地を使用して、前記回収されたＴＩＬ集団を凍結保存すること
を含み、前記エレクトロポレーションステップは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＴＯＸ、ＡＮＫＲＤ１１、ＳＯＣＳ１、ＢＣＯＲ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を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む、方法。

【請求項１７８】

ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び４－１ＢＢアゴニスト抗体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り、前記第１の拡大培養を実施することを含み、前記ＯＫＴ－３及び前記４－１ＢＢアゴニスト抗体は、任意選択により、０日目又は１日目に開始して前記細胞培養培地中に存在する、請求項１７７に記載の方法。

【請求項１７９】

前記エレクトロポレーションステップは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ及びＣＢＬＢ並びに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を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む、請求項１７７又は１７８に記載の方法。

【請求項１８０】

前記エレクトロポレーションステップは、ＰＤ－１の発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む、請求項１７７又は１７８に記載の方法。

【請求項１８１】

前記エレクトロポレーションステップは、ＬＡＧ－３の発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む、請求項１７７又は１７８に記載の方法。

【請求項１８２】

前記エレクトロポレーションステップは、ＴＩＭ－３の発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む、請求項１７７又は１７８に記載の方法。

【請求項１８３】

前記エレクトロポレーションステップは、ＣＩＳＨの発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む、請求項１７７又は１７８に記載の方法。

【請求項１８４】

前記エレクトロポレーションステップは、ＣＢＬＢの発現を阻害するために、クラスタ

ー化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む、請求項１７７又は１７８に記載の方法。

【請求項１８５】

前記エレクトロポレーションステップは、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システムの送達を含む、請求項１７７～１８４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１８６】

前記エレクトロポレーションステップは、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システムの送達を含む、請求項１７７～１８４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１８７】

前記エレクトロポレーションステップは、ジンクフィンガーシステムの送達を含む、請求項１７７～１８４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１８８】

前記ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地は、ＤＭＳＯ、電解質溶液、任意選択によりＨＳＡ及び任意選択によりＩＬ－２を含む、請求項１７７～１８７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１８９】

癌を有する対象を処置する方法であって、

当該方法が、

（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、前記患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｂ）前記腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；

（ｃ）ＩＬ－２を含み、及び任意選択によりＯＫＴ－３及び／又は４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で約２～５日間にわたって前記第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施すること；

（ｄ）任意選択により、ＯＫＴ－３を添加して、第２のＴＩＬ集団を生じさせること、ここで、前記第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、前記第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約１～３日間にわたって実施され、前記第２のＴＩＬ集団は、前記第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、前記系を開放せずに発生する、生じさせること；

（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団に対して無菌エレクトロポレーションステップを実施すること、ここで、前記無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移動を媒介する、実施すること；

（ｆ）前記第２のＴＩＬ集団を約１日間にわたって静置すること；

（ｇ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３抗体、任意選択によりＯＸ４０抗体及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせること、ここで、前記第２の拡大培養は、前記第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１１日間にわたって実施され、前記第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；

（ｈ）ステップ（ｇ）から得られた前記治療用ＴＩＬ集団を回収して、回収されたＴＩＬ集団を提供すること、ここで、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行は、前記系を開放せずに発生し、前記回収されたＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である；

（ｉ）前記回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すこと、ここで、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；

（ｊ）ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地を使用して、前記回収されたＴＩＬ集団を凍結保存すること；及び

（ｋ）前記輸注バッグからの治療有効投与量の前記回収されたＴＩＬ集団を前記患者に投

与すること
を含む、拡大培養された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を投与することを含み、前記エレクトロポレーションステップは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＴＯＸ、ＡＮＫＲＤ１１、ＳＯＣＳ１、ＢＣＯＲ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を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む、方法。

【請求項１９０】

ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び４－１ＢＢアゴニスト抗体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り、前記第１の拡大培養を実施することを含み、前記ＯＫＴ－３及び前記４－１ＢＢアゴニスト抗体は、任意選択により、０日目又は１日目に開始して前記細胞培養培地中に存在する、請求項１８９に記載の方法。

【請求項１９１】

前記エレクトロポレーションステップは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ及びＣＢＬＢ並びに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を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む、請求項１８９又は１９０に記載の方法。

【請求項１９２】

前記エレクトロポレーションステップは、ＰＤ－１の発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む、請求項１８９又は１９０に記載の方法。

【請求項１９３】

前記エレクトロポレーションステップは、ＬＡＧ－３の発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む、請求項１８９又は１９０に記載の方法。

【請求項１９４】

前記エレクトロポレーションステップは、ＴＩＭ－３の発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む、請求項１８９又は１９０に記載の方法。

【請求項１９５】

前記エレクトロポレーションステップは、ＣＩＳＨの発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む、請求項１８９又は１９０に記載の方法。

【請求項１９６】

前記エレクトロポレーションステップは、ＣＢＬＢの発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む、請求項１８９又は１９０に記載の方法。

【請求項１９７】

前記エレクトロポレーションステップは、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システムの送達を含む、請求項１８９～１９６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１９８】

前記エレクトロポレーションステップは、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）

システムの送達を含む、請求項１８９～１９６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９９】
前記エレクトロポレーションステップは、ジンクフィンガーシステムの送達を含む、請求項１８９～１９６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２００】
前記ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地は、ＤＭＳＯ、電解質溶液、任意選択によりＨＳＡ及び任意選択によりＩＬ－２を含む、請求項１８９～１９６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０１】
癌を有する対象の処置に使用するための拡大培養ＴＩＬ集団であって、
（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、前記患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；
（ｂ）前記腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；
（ｃ）ＩＬ－２を含み、及び任意選択によりＯＫＴ－３及び／又は４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で約２～５日間にわたって前記第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施すること；
（ｄ）任意選択により、ＯＫＴ－３を添加して、第２のＴＩＬ集団を生じさせること、ここで、前記第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、前記第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約１～３日間にわたって実施され、前記第２のＴＩＬ集団は、前記第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、前記系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団に対して無菌エレクトロポレーションステップを実施すること、ここで、前記無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移動を媒介する、実施すること；
（ｆ）前記第２のＴＩＬ集団を約１日間にわたって静置すること；
（ｇ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３抗体、任意選択によりＯＸ４０抗体及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせること、ここで、前記第２の拡大培養は、前記第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１１日間にわたって実施され、前記第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；
（ｈ）ステップ（ｇ）から得られた前記治療用ＴＩＬ集団を回収して、回収されたＴＩＬ集団を提供すること、ここで、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行は、前記系を開放せずに発生し、前記回収されたＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である；
（ｉ）前記回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すこと、ここで、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行は、前記系を開放せずに発生する；及び
（ｊ）ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地を使用して、前記回収されたＴＩＬ集団を凍結保存すること
を含む方法によって得ることができる回収されたＴＩＬ集団であり、前記エレクトロポレーションステップは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＴＯＸ、ＡＮＫＲＤ１１、ＳＯＣＳ１、ＢＣＯＲ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を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む、拡大培養ＴＩＬ集団。
【請求項２０２】
ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び４－１ＢＢアゴニスト抗体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り、前記第１の拡大培養を実施することを含み、前記ＯＫＴ－３及び前記４－１ＢＢアゴニスト抗体は、任意選択により、０日目又は１日目に開

始して前記細胞培養培地中に存在する、請求項２０１に記載の拡大培養ＴＩＬ集団。
【請求項２０３】
前記エレクトロポレーションステップは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ及びＣＢＬＢ並びに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を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む、請求項２０１又は２０２に記載の拡大培養ＴＩＬ集団。
【請求項２０４】
前記エレクトロポレーションステップは、ＰＤ－１の発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む、請求項２０１又は２０２に記載の拡大培養ＴＩＬ集団。
【請求項２０５】
前記エレクトロポレーションステップは、ＬＡＧ－３の発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む、請求項２０１又は２０２に記載の拡大培養ＴＩＬ集団。
【請求項２０６】
前記エレクトロポレーションステップは、ＴＩＭ－３の発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む、請求項２０１又は２０２に記載の拡大培養ＴＩＬ集団。
【請求項２０７】
前記エレクトロポレーションステップは、ＣＩＳＨの発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む、請求項２０１又は２０２に記載の拡大培養ＴＩＬ集団。
【請求項２０８】
前記エレクトロポレーションステップは、ＣＢＬＢの発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む、請求項２０１又は２０２に記載の拡大培養ＴＩＬ集団。
【請求項２０９】
前記エレクトロポレーションステップは、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システムの送達を含む、請求項２０１～２０８のいずれか一項に記載の拡大培養ＴＩＬ集団。
【請求項２１０】
前記エレクトロポレーションステップは、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システムの送達を含む、請求項２０１～２０８のいずれか一項に記載の拡大培養ＴＩＬ集団。
【請求項２１１】
前記エレクトロポレーションステップは、ジンクフィンガーシステムの送達を含む、請求項２０１～２０８のいずれか一項に記載の拡大培養ＴＩＬ集団。
【請求項２１２】
前記ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地は、ＤＭＳＯ、電解質溶液、任意選択によりＨＳＡ及び任意選択によりＩＬ－２を含む、請求項２０１～２１１のいずれか一項に記載の拡大培養ＴＩＬ集団。
【請求項２１３】
前記エレクトロポレーションステップは、パルスエレクトロポレーションステップを含む、請求項２０１～２１１のいずれか一項に記載の拡大培養ＴＩＬ集団。

【請求項２１４】
前記遺伝子編集は、ＣＲＩＳＰＲ方法を含み、及び前記ＣＲＩＳＰＲ方法は、高忠実度Ｃａｓ９の使用を含む、請求項１～５８のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
[0001] 本出願は、２０１９年１０月２５日に出願された米国仮特許出願第６２／９２６，１４７号に対する優先権及びその利益を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
発明の分野
[0002] 腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を拡大培養し、及び治療用ＴＩＬ集団を生じさせる方法が本明細書に記載される。更に、ＴＩＬを遺伝子編集する方法及び癌などの疾患の処置における遺伝子編集ＴＩＬの使用が本明細書に開示される。
【背景技術】
【０００３】
発明の背景
[0003] 腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の養子移植を用いたかさ高い抵抗性の癌の処置は、予後不良の患者に対する治療への強力なアプローチとなる。Gattinoni, et al., Nat. Rev. Immunol. 2006, 6, 383-393。免疫療法の成功には多量のＴＩＬが必要であり、商業化に向けてロバストで信頼性のある方法が求められている。これは、細胞拡大培養に伴う技術上、物流上及び規制上の問題に起因して実現が課題となっている。ＩＬ－２ベースのＴＩＬ拡大培養、それに続く「急速拡大培養法」（ＲＥＰ）は、その速さ及び効率から、ＴＩＬ拡大培養に好ましい方法となりつつある。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。ＲＥＰは、１４日の期間でＴＩＬの１，０００倍の拡大をもたらすことができるが、それには、フィーダー細胞として、多くの場合に複数のドナーからの大過剰の（例えば、２００倍の）照射した同種異系末梢血単核球（ＰＢＭＣ、単核球（ＭＮＣ）としても知られる）並びに抗ＣＤ３抗体（ＯＫＴ３）及び高用量のＩＬ－２が必要である。Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42。ＲＥＰ手順を経たＴＩＬは、黒色腫患者において宿主免疫抑制後に養子細胞療法の成功をもたらしている。現行の注入適合パラメータは、ＴＩＬの組成（例えば、ＣＤ２８、ＣＤ８又はＣＤ４陽性）の読み取り並びにＲＥＰ産物の拡大倍数及び生存率に依存するものである。現行の注入適合パラメータは、ＴＩＬの組成（例えば、ＣＤ２８、ＣＤ８又はＣＤ４陽性）の読み取り並びにＲＥＰ産物の拡大倍数及び生存率に依存する。
【０００４】
[0004] 現在のＴＩＬ製造工程は、長さ、経費、無菌性の懸念及び本明細書中に記載される他の要因によって制限されるため、かかる工程を商業化する可能性は、大幅に制限されており、これら及び他の理由により、現時点で利用できる商業工程はない。商業スケールの製造及び複数の臨床センターのヒト患者に使用する規制当局の承認に適したＴＩＬ製造工程と、かかる工程に基づく治療法とを提供する必要性が急務である。更に、患者の応答率及び応答の頑健性を高めることができるより効果的なＴＩＬ療法に対する強い需要が存在する。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００５】
発明の概要

［0005］本発明は、ＴＩＬを拡大培養し、及び治療用ＴＩＬ集団を生じさせる方法を提供する。例示的な実施形態によれば、治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部は、それらの治療効果を増強するように遺伝子編集されている。

【０００６】

［0006］一実施形態において、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法も提供し、この方法は、

（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；

（ｃ）ＩＬ－２及び任意選択により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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３～１４日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；

（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１４日間にわたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団であり、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；

（ｅ）ステップ（ｄ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行は、系を開放せずに発生する、回収すること；

（ｆ）ステップ（ｅ）からの回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行は、系を開放せずに発生する、移すこと；及び

（ｇ）方法中の任意の時点において、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集すること

を含む。

【０００７】

［0007］一部の実施形態において、本方法は、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）における回収されたＴＩＬ集団を含む輸注バッグを凍結保存するステップを更に含む。

【０００８】

［0008］一部の実施形態において、凍結保存プロセスは、回収されたＴＩＬ集団と凍結保存培地との１：１の比率を使用して実施される。

【０００９】

［0009］一部の実施形態において、抗原提示細胞は、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、照射され、及び同種異系である。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、ステップ（ｄ）において９～１４日目のいずれかに細胞培養物に添加される。一部の実施形態において、抗原提示細胞は、人工抗原提示細胞である。

【００１０】

［0010］一部の実施形態において、ステップ（ｅ）における回収は、膜ベースの細胞処理系を使用して実施される。

【００１１】

［0011］一部の実施形態において、ステップ（ｅ）における回収は、ＬＯＶＯ細胞処理系を使用して実施される。

【００１２】

［0012］一部の実施形態において、複数の断片は、約４～約５０個の断片を含み、各断片は、約２７mm^3の体積を有する。

【００１３】

［００１３］　一部の実施形態において、複数の断片は、約１３００ｍｍ^3～約１５００ｍｍ^{3}の総体積を有する約３０～約６０個の断片を含む。

【００１４】

［００１４］　一部の実施形態において、複数の断片は、約１３５０ｍｍ^{3}の総体積を有する約５０個の断片を含む。

【００１５】

［００１５］　一部の実施形態において、複数の断片は、約１グラム～約１．５グラムの総質量を有する約５０個の断片を含む。

【００１６】

［００１６］　一部の実施形態において、細胞培養培地は、Ｇコンテナ及びXuri細胞培養バッグからなる群から選択される容器内に提供される。

【００１７】

［００１７］　一部の実施形態において、ステップ（ｄ）における細胞培養培地は、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１を更に含む。

【００１８】

［００１８］　一部の実施形態において、ＩＬ－２濃度は、約１０，０００ＩＵ／ｍＬ～約５，０００ＩＵ／ｍＬである。

【００１９】

［００１９］　一部の実施形態において、ＩＬ－１５濃度は、約５００ＩＵ／ｍＬ～約１００ＩＵ／ｍＬである。

【００２０】

［００２０］　一部の実施形態において、ＩＬ－２１濃度は、約２０ＩＵ／ｍＬ～約０．５ＩＵ／ｍＬである。

【００２１】

［００２１］　一部の実施形態において、ステップ（ｆ）における輸注バッグは、HypoThermosol含有輸注バッグである。

【００２２】

［００２２］　一部の実施形態において、凍結保存培地は、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含む。一部の実施形態において、凍結保存培地は、７％～１０％のジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含む。

【００２３】

［００２３］　一部の実施形態において、ステップ（ｃ）における第１の期間及びステップ（ｅ）における第２の期間は、１０日、１１日又は１２日の期間内にそれぞれ個別に実施される。

【００２４】

［００２４］　一部の実施形態において、ステップ（ｃ）における第１の期間及びステップ（ｅ）における第２の期間は、１１日の期間内にそれぞれ個別に実施される。

【００２５】

［００２５］　一部の実施形態において、ステップ（ａ）～（ｆ）は、約１０日～約２２日の期間内に実施される。

【００２６】

［００２６］　一部の実施形態において、ステップ（ａ）～（ｆ）は、約２０日～約２２日の期間内に実施される。

【００２７】

［００２７］　一部の実施形態において、ステップ（ａ）～（ｆ）は、約１５日～約２０日の期間内に実施される。

【００２８】

［００２８］　一部の実施形態において、ステップ（ａ）～（ｆ）は、約１０日～約２０日の期間内に実施される。

【００２９】

［0029］一部の実施形態において、ステップ（ａ）～（ｆ）は、約１０日～約１５日の期間内に実施される。
【００３０】
［0030］一部の実施形態において、ステップ（ａ）～（ｆ）は、２２日以下で実施される。
【００３１】
［0031］一部の実施形態において、ステップ（ａ）～（ｆ）は、２０日以下で実施される。
【００３２】
［0032］一部の実施形態において、ステップ（ａ）～（ｆ）は、１５日以下で実施される。
【００３３】
［0033］一部の実施形態において、ステップ（ａ）～（ｆ）は、１０日以下で実施される。
【００３４】
［0034］一部の実施形態において、ステップ（ａ）～（ｆ）及び凍結保存は、２２日以下で実施される。
【００３５】
［0035］一部の実施形態において、ステップ（ｅ）で回収された治療用ＴＩＬ集団は、治療有効投与量のＴＩＬのために十分なＴＩＬを含む。
【００３６】
［0036］一部の実施形態において、治療有効投与量のために十分なＴＩＬの数は、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}個である。
【００３７】
［0037］一部の実施形態において、ステップ（ｂ）～（ｅ）は、単一の容器内で実施され、ステップ（ｂ）～（ｅ）を単一の容器内で実施することは、ステップ（ｂ）～（ｅ）を複数の容器内で実施することと比較して、切除された腫瘍毎のＴＩＬ収率の増加をもたらす。
【００３８】
［0038］一部の実施形態において、抗原提示細胞は、系を開放することなく、ステップ（ｄ）における第２の期間中にＴＩＬに添加される。
【００３９】
［0039］一部の実施形態において、ステップ（ｄ）における第３のＴＩＬ集団は、対象に投与されたとき、増加した有効性、増加したインターフェロンγ産生、増加したポリクローナル性、増加した平均ＩＰ－１０及び／又は増加した平均ＭＣＰ－１を提供する。
【００４０】
［0040］一部の実施形態において、ステップ（ｄ）における第３のＴＩＬ集団は、対象に投与されたとき、少なくとも５倍以上のインターフェロンγ産生を提供する。
【００４１】
［0041］一部の実施形態において、ステップ（ｄ）における第３のＴＩＬ集団は、第２のＴＩＬ集団に対して、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を含む治療用ＴＩＬ集団であり、治療用ＴＩＬ集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第２の細胞集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞に対して、ＣＤ２７＋を発現すること、ＣＤ２８＋を発現すること、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈する。
【００４２】
［0042］一部の実施形態において、第３のＴＩＬ集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第２の細胞集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞に対して、増加したＣＤ５７発現及び減少した

ＣＤ５６発現を呈する。
【００４３】
［0043］一部の実施形態において、微生物汚染のリスクは、開放系と比較して低減される。
【００４４】
［0044］一部の実施形態において、ステップ（ｇ）からのＴＩＬは、患者に注入される。
【００４５】
［0045］一部の実施形態において、複数の断片は、約４個の断片を含む。
【００４６】
［0046］一部の実施形態において、細胞培養培地は、第１の拡大培養、第２の拡大培養又は両方中、４－１ＢＢアゴニスト及び／又はＯＸ４０アゴニストを更に含む。
【００４７】
［0047］一部の実施形態において、遺伝子編集は、４－１ＢＢアゴニスト及び／又はＯＸ４０アゴニストが細胞培養培地に導入された後に実行される。
【００４８】
［0048］一部の実施形態において、遺伝子編集は、４－１ＢＢアゴニスト及び／又はＯＸ４０アゴニストが細胞培養培地に導入される前に実行される。
【００４９】
［0049］一部の実施形態において、遺伝子編集は、第１の集団、第２の集団及び第３の集団の１つ以上からのＴＩＬに対して実行される。
【００５０】
［0050］一部の実施形態において、遺伝子編集は、第１の拡大培養からのＴＩＬ若しくは第２の拡大培養からのＴＩＬ又は両方に対して実行される。
【００５１】
［0051］一部の実施形態において、遺伝子編集は、第１の拡大培養後及び第２の拡大培養前に実行される。
【００５２】
［0052］一部の実施形態において、遺伝子編集は、ステップ（ｃ）前、ステップ（ｄ）前又はステップ（ｅ）前に実行される。
【００５３】
［0053］一部の実施形態において、細胞培養培地は、第１の拡大培養中及び／又は第２の拡大培養中にＯＫＴ－３を含み、及び遺伝子編集は、ＯＫＴ－３が細胞培養培地に導入される前に実行される。
【００５４】
［0054］一部の実施形態において、細胞培養培地は、第１の拡大培養中及び／又は第２の拡大培養中にＯＫＴ－３を含み、及び遺伝子編集は、ＯＫＴ－３が細胞培養培地に導入された後に実行される。
【００５５】
［0055］一部の実施形態において、細胞培養培地は、第１の拡大培養の開始日に開始してＯＫＴ－３を含み、及び遺伝子編集は、ＴＩＬがＯＫＴ－３に曝露された後に実行される。
【００５６】
［0056］一部の実施形態において、遺伝子編集は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現が治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンシング又は低減されることを引き起こす。
【００５７】
［0057］一部の実施形態において、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣ

Ｄ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＡＮＫＲＤ１１、ＳＯＣＳ１及びＢＣＯＲを含む群から選択される。

【００５８】

［0058］ 一部の実施形態において、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ及びＰＫＡを含む群から選択される。

【００５９】

［0059］ 一部の実施形態において、遺伝子編集は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現が治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強されることを引き起こし、免疫チェックポイント遺伝子は、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ １／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）及び／又はＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１を含む群から選択される。

【００６０】

［0060］ 一部の実施形態において、遺伝子編集は、前記１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子における二本鎖又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む。

【００６１】

［0061］ 一部の実施形態において、遺伝子編集は、ＣＲＩＳＰＲ方法、ＴＡＬＥ方法、ジンクフィンガー方法及びそれらの組み合わせから選択される１つ以上の方法を含む。

【００６２】

［0062］ 一部の実施形態において、遺伝子編集は、ＣＲＩＳＰＲ方法を含む。

【００６３】

［0063］ 一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ方法は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９方法である。

【００６４】

［0064］ 一部の実施形態において、遺伝子編集は、ＴＡＬＥ方法を含む。

【００６５】

［0065］ 一部の実施形態において、遺伝子編集は、ジンクフィンガー方法を含む。

【００６６】

［0066］ 別の実施形態において、本発明は、癌を有する対象を処置する方法であって、拡大培養された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を投与することであって、

（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；

（ｃ）ＩＬ－２及び任意選択により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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３～１４日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；

（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３の

ＴＩＬ集団を生じさせることであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１４日間にわたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団であり、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｅ）ステップ（ｄ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行は、系を開放せずに発生する、回収すること；及び
（ｆ）ステップ（ｅ）からの回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行は、系を開放せずに発生する、移すこと；
（ｇ）任意選択により、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）からの回収されたＴＩＬ集団を含む輸注バッグを凍結保存すること；
（ｈ）ステップ（ｇ）における輸注バッグから治療有効投与量の第３のＴＩＬ集団を患者に投与すること；及び
（ｉ）方法ステップ（ａ）～（ｆ）中の任意の時点において、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集すること
を含む、投与することを含む方法を提供する。

【００６７】

［0067］ 一部の実施形態において、ステップ（ｅ）で回収された治療用ＴＩＬ集団は、ステップ（ｈ）において治療有効投与量のＴＩＬを投与するために十分なＴＩＬを含む。

【００６８】

［0068］ 一部の実施形態において、ステップ（ｈ）において治療有効投与量を投与するために十分なＴＩＬの数は、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}個である。

【００６９】

［0069］ 一部の実施形態において、抗原提示細胞（ＡＰＣ）は、ＰＢＭＣである。

【００７０】

［0070］ 一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、ステップ（ｄ）において９～１４日目のいずれかに細胞培養物に添加される。

【００７１】

［0071］ 一部の実施形態において、ステップ（ｈ）で治療有効投与量のＴＩＬ細胞を投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、患者に投与されている。

【００７２】

［0072］ 一部の実施形態において、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間にわたってシクロホスファミドを投与するステップ、それに続いて２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間にわたってフルダラビンを投与するステップを含む。

【００７３】

［0073］ 一部の実施形態において、本方法は、ステップ（ｈ）で患者にＴＩＬ細胞を投与した翌日に開始する高用量ＩＬ－２レジメンで患者を処置するステップを更に含む。

【００７４】

［0074］ 一部の実施形態において、高用量ＩＬ－２レジメンは、忍容量まで８時間毎に１５分ボーラス静脈内注入として投与される６００，０００又は７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含む。

【００７５】

［0075］ 一部の実施形態において、ステップ（ｄ）における第３のＴＩＬ集団は、第２のＴＩＬ集団に対して、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を含む治療用ＴＩＬ集団であり、治療用ＴＩＬ集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第２の細胞集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞に対して、ＣＤ２７＋を発現すること、ＣＤ２８＋を発現すること、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈する。

【００７６】
［0076］一部の実施形態において、治療用ＴＩＬ集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第２の細胞集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞に対して、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現を呈する。
【００７７】
［0077］一部の実施形態において、癌は、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされる癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、腎癌及び腎細胞癌からなる群から選択される。
【００７８】
［0078］一部の実施形態において、癌は、黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌及びＮＳＣＬＣからなる群から選択される。
【００７９】
［0079］一部の実施形態において、癌は、黒色腫である。
【００８０】
［0080］一部の実施形態において、癌は、ＨＮＳＣＣである。
【００８１】
［0081］一部の実施形態において、癌は、子宮頸癌である。
【００８２】
［0082］一部の実施形態において、癌は、ＮＳＣＬＣである。
【００８３】
［0083］一部の実施形態において、細胞培養培地は、第１の拡大培養、第２の拡大培養又は両方中、４－１ＢＢアゴニスト及び／又はＯＸ４０アゴニストを更に含む。
【００８４】
［0084］一部の実施形態において、遺伝子編集は、４－１ＢＢアゴニスト及び／又はＯＸ４０アゴニストが細胞培養培地に導入された後に実行される。
【００８５】
［0085］一部の実施形態において、遺伝子編集は、４－１ＢＢアゴニスト及び／又はＯＸ４０アゴニストが細胞培養培地に導入される前に実行される。
【００８６】
［0086］一部の実施形態において、遺伝子編集は、第１の集団、第２の集団及び第３の集団の１つ以上からのＴＩＬに対して実行される。
【００８７】
［0087］一部の実施形態において、遺伝子編集は、第１の拡大培養からのＴＩＬ若しくは第２の拡大培養からのＴＩＬ又は両方に対して実行される。
【００８８】
［0088］一部の実施形態において、遺伝子編集は、第１の拡大培養後及び第２の拡大培養前に実行される。
【００８９】
［0089］一部の実施形態において、遺伝子編集は、ステップ（ｃ）前、ステップ（ｄ）前又はステップ（ｅ）前に実行される。
【００９０】
［0090］一部の実施形態において、細胞培養培地は、第１の拡大培養中及び／又は第２の拡大培養中にＯＫＴ－３を含み、及び遺伝子編集は、ＯＫＴ－３が細胞培養培地に導入される前に実行される。
【００９１】
［0091］一部の実施形態において、細胞培養培地は、第１の拡大培養中及び／又は第２の拡大培養中にＯＫＴ－３を含み、及び遺伝子編集は、ＯＫＴ－３が細胞培養培地に導入された後に実行される。

【００９２】
［0092］一部の実施形態において、細胞培養培地は、第１の拡大培養の開始日に開始してＯＫＴ－３を含み、及び遺伝子編集は、ＴＩＬがＯＫＴ－３に曝露された後に実行される。
【００９３】
［0093］一部の実施形態において、遺伝子編集は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現が治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンシング又は低減されることを引き起こす。
【００９４】
［0094］一部の実施形態において、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＡＮＫＲＤ１１、ＳＯＣＳ１及びＢＣＯＲを含む群から選択される。
【００９５】
［0095］一部の実施形態において、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ及びＰＫＡを含む群から選択される。
【００９６】
［0096］一部の実施形態において、遺伝子編集は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現が治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強されることを引き起こし、免疫チェックポイント遺伝子は、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ　１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）及び／又はＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１を含む群から選択される。
【００９７】
［0097］一部の実施形態において、遺伝子編集は、前記１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子における二本鎖又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む。
【００９８】
［0098］一部の実施形態において、遺伝子編集は、ＣＲＩＳＰＲ方法、ＴＡＬＥ方法、ジンクフィンガー方法及びそれらの組み合わせから選択される１つ以上の方法を含む。
【００９９】
［0099］一部の実施形態において、遺伝子編集は、ＣＲＩＳＰＲ方法を含む。
【０１００】
［00100］一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ方法は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９方法である。
【０１０１】
［00101］一部の実施形態において、遺伝子編集は、ＴＡＬＥ方法を含む。
【０１０２】
［00102］一部の実施形態において、遺伝子編集は、ジンクフィンガー方法を含む。
【０１０３】
［00103］別の実施形態において、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法を提供し、この方法は、

（ａ）第１のＴＩＬ集団を得るために、患者から切除された腫瘍からの処理された腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；
（ｂ）ＩＬ－２及び任意選択により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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３～１４日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１４日間にわたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団であり、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｄ）ステップ（ｃ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放せずに発生する、回収すること；
（ｅ）ステップ（ｄ）からの回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行は、系を開放せずに発生する、移すこと；及び
（ｆ）方法中の任意の時点において、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集すること
を含む。

【０１０４】

［00104］ 一部の実施形態において、ステップ（ｄ）で回収された治療用ＴＩＬ集団は、治療有効投与量のＴＩＬのために十分なＴＩＬを含む。

【０１０５】

［00105］ 一部の実施形態において、治療有効投与量のために十分なＴＩＬの数は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}個である。

【０１０６】

［00106］ 一部の実施形態において、本方法は、凍結保存プロセスを使用して、回収されたＴＩＬ集団を含む輸注バッグを凍結保存するステップを更に含む。

【０１０７】

［00107］ 一部の実施形態において、凍結保存プロセスは、回収されたＴＩＬ集団と凍結保存培地との１：１の比率を使用して実施される。

【０１０８】

［00108］ 一部の実施形態において、抗原提示細胞は、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である。

【０１０９】

［00109］ 一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、照射され、及び同種異系である。

【０１１０】

［00110］ ＰＢＭＣは、ステップ（ｃ）において９～１４日目のいずれかに細胞培養物に添加される、請求項６８に記載の方法。

【０１１１】

［00111］ 一部の実施形態において、抗原提示細胞は、人工抗原提示細胞である。

【０１１２】

［00112］ 一部の実施形態において、ステップ（ｄ）における回収は、ＬＯＶＯ細胞処理系を使用して実施される。

【０１１３】

［00113］ 一部の実施形態において、複数の断片は、約４～約５０個の断片を含み、各断片は、約２７mm^3の体積を有する。

【０１１４】

［００１１４］　一部の実施形態において、複数の断片は、約１３００ｍｍ^3～約１５００ｍｍ^{3}の総体積を有する約３０～約６０個の断片を含む。

【０１１５】

［００１１５］　一部の実施形態において、複数の断片は、約１３５０ｍｍ^{3}の総体積を有する約５０個の断片を含む。

【０１１６】

［００１１６］　一部の実施形態において、複数の断片は、約１グラム～約１．５グラムの総質量を有する約５０個の断片を含む。

【０１１７】

［００１１７］　一部の実施形態において、複数の断片は、約４個の断片を含む。

【０１１８】

［００１１８］　一部の実施形態において、第２の細胞培養培地は、Ｇコンテナ及びXuri細胞培養バッグからなる群から選択される容器内に提供される。

【０１１９】

［００１１９］　一部の実施形態において、ステップ（ｅ）における輸注バッグは、HypoThermosol含有輸注バッグである。

【０１２０】

［００１２０］　一部の実施形態において、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の期間は、１０日、１１日又は１２日の期間内にそれぞれ個別に実施される。

【０１２１】

［００１２１］　一部の実施形態において、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の期間は、１１日の期間内にそれぞれ個別に実施される。

【０１２２】

［００１２２］　一部の実施形態において、ステップ（ａ）～（ｅ）は、約１０日～約２２日の期間内に実施される。

【０１２３】

［００１２３］　一部の実施形態において、ステップ（ａ）～（ｅ）は、約１０日～約２０日の期間内に実施される。

【０１２４】

［００１２４］　一部の実施形態において、ステップ（ａ）～（ｅ）は、約１０日～約１５日の期間内に実施される。

【０１２５】

［００１２５］　一部の実施形態において、ステップ（ａ）～（ｅ）は、２２日以下で実施される。

【０１２６】

［００１２６］　一部の実施形態において、ステップ（ａ）～（ｅ）及び凍結保存は、２２日以下で実施される。

【０１２７】

［００１２７］　一部の実施形態において、ステップ（ｂ）～（ｅ）は、単一の容器内で実施され、ステップ（ｂ）～（ｅ）を単一の容器内で実施することは、ステップ（ｂ）～（ｅ）を複数の容器内で実施することと比較して、切除された腫瘍毎のＴＩＬ収率の増加をもたらす。

【０１２８】

［００１２８］　一部の実施形態において、抗原提示細胞は、系を開放することなく、ステップ（ｃ）における第２の期間中にＴＩＬに添加される。

【０１２９】

［００１２９］　一部の実施形態において、ステップ（ｄ）における第３のＴＩＬ集団は、第２のＴＩＬ集団に対して、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を含む治療用ＴＩＬ集団であり、治療用ＴＩＬ集団中において得られる

エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第２の細胞集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞に対して、ＣＤ２７＋を発現すること、ＣＤ２８＋を発現すること、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈する。

【０１３０】

［００１３０］ 一部の実施形態において、治療用ＴＩＬ集団中において得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第２の細胞集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞に対して、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現を呈する。

【０１３１】

［００１３１］ 一部の実施形態において、微生物汚染のリスクは、開放系と比較して低減される。

【０１３２】

［００１３２］ 一部の実施形態において、ステップ（ｅ）からのＴＩＬは、患者に注入される。

【０１３３】

［００１３３］ 一部の実施形態において、閉鎖型容器は、単一のバイオリアクターを含む。

【０１３４】

［００１３４］ 一部の実施形態において、閉鎖型容器は、G-REX-10を含む。

【０１３５】

［００１３５］ 一部の実施形態において、閉鎖型容器は、G-REX-100を含む。

【０１３６】

［００１３６］ 一部の実施形態では、ステップ（ｄ）において、抗原提示細胞（ＡＰＣ）は、２５：１～１００：１のＡＰＣ：ＴＩＬの比率で第２のＴＩＬ集団の細胞培養物に添加される。

【０１３７】

［００１３７］ 一部の実施形態において、細胞培養物は、２．５×10^9個のＡＰＣ対１００×10^6個のＴＩＬの比率を有する。

【０１３８】

［００１３８］ 一部の実施形態では、ステップ（ｃ）において、抗原提示細胞（ＡＰＣ）は、２５：１～１００：１のＡＰＣ：ＴＩＬの比率で第２のＴＩＬ集団の細胞培養物に添加される。

【０１３９】

［００１３９］ 一部の実施形態において、細胞培養物は、２．５×10^9個のＡＰＣ対１００×10^6個のＴＩＬの比率を有する。

【０１４０】

［００１４０］ 一部の実施形態において、細胞培養培地は、第１の拡大培養、第２の拡大培養又は両方中、４－１ＢＢアゴニスト及び／又はＯＸ４０アゴニストを更に含む。

【０１４１】

［００１４１］ 一部の実施形態において、遺伝子編集は、４－１ＢＢアゴニスト及び／又はＯＸ４０アゴニストが細胞培養培地に導入された後に実行される。

【０１４２】

［００１４２］ 一部の実施形態において、遺伝子編集は、４－１ＢＢアゴニスト及び／又はＯＸ４０アゴニストが細胞培養培地に導入される前に実行される。

【０１４３】

［００１４３］ 一部の実施形態において、遺伝子編集は、第１の集団、第２の集団及び第３の集団の１つ以上からのＴＩＬに対して実行される。

【０１４４】

［００１４４］ 一部の実施形態において、遺伝子編集は、第１の拡大培養からのＴＩＬ若しくは第２の拡大培養からのＴＩＬ又は両方に対して実行される。

【０１４５】
［００１４５］一部の実施形態において、遺伝子編集は、第１の拡大培養後及び第２の拡大培養前に実行される。
【０１４６】
［００１４６］一部の実施形態において、遺伝子編集は、ステップ（ｂ）前、ステップ（ｃ）前又はステップ（ｄ）前に実行される。
【０１４７】
［００１４７］一部の実施形態において、細胞培養培地は、第１の拡大培養中及び／又は第２の拡大培養中にＯＫＴ－３を含み、及び遺伝子編集は、ＯＫＴ－３が細胞培養培地に導入される前に実行される。
【０１４８】
［００１４８］一部の実施形態において、細胞培養培地は、第１の拡大培養中及び／又は第２の拡大培養中にＯＫＴ－３を含み、及び遺伝子編集は、ＯＫＴ－３が細胞培養培地に導入された後に実行される。
【０１４９】
［００１４９］一部の実施形態において、細胞培養培地は、第１の拡大培養の開始日に開始してＯＫＴ－３を含み、及び遺伝子編集は、ＴＩＬがＯＫＴ－３に曝露された後に実行される。
【０１５０】
［００１５０］一部の実施形態において、遺伝子編集は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現が治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンシング又は低減されることを引き起こす。
【０１５１】
［００１５１］一部の実施形態において、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＡＮＫＲＤ１１、ＳＯＣＳ１及びＢＣＯＲを含む群から選択される。
【０１５２】
［００１５２］一部の実施形態において、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ及びＰＫＡを含む群から選択される。
【０１５３】
［００１５３］一部の実施形態において、遺伝子編集は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現が治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強されることを引き起こし、免疫チェックポイント遺伝子は、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ　１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）及び／又はＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１を含む群から選択される。
【０１５４】
［００１５４］一部の実施形態において、遺伝子編集は、前記１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子における二本鎖又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む。
【０１５５】

［００１５５］　一部の実施形態において、遺伝子編集は、ＣＲＩＳＰＲ方法、ＴＡＬＥ方法、ジンクフィンガー方法及びそれらの組み合わせから選択される１つ以上の方法を含む。

【０１５６】

［００１５６］　一部の実施形態において、遺伝子編集は、ＣＲＩＳＰＲ方法を含む。

【０１５７】

［００１５７］　一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ方法は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９方法である。

【０１５８】

［００１５８］　一部の実施形態において、遺伝子編集は、ＴＡＬＥ方法を含む。

【０１５９】

［００１５９］　一部の実施形態において、遺伝子編集は、ジンクフィンガー方法を含む。

【０１６０】

［００１６０］　別の実施形態において、本発明は、本明細書に記載の拡大培養方法のいずれかに従って拡大培養された治療用ＴＩＬ集団（例えば、対象の癌の処置における使用のためのもの）を提供し、治療用ＴＩＬ集団は、恒久的に遺伝子編集されている。

【０１６１】

［００１６１］　別の実施形態において、本発明は、癌を有する対象の処置に使用するための拡大培養ＴＩＬ集団も提供し、拡大培養ＴＩＬ集団は、方法であって、

（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；

（ｃ）ＩＬ－２及び任意選択により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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３～１４日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；

（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１４日間にわたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団であり、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；

（ｅ）ステップ（ｄ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行は、系を開放せずに発生する、回収すること；

（ｆ）ステップ（ｅ）からの回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行は、系を開放せずに発生する、移すこと；

（ｇ）任意選択により、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）からの回収されたＴＩＬ集団を含む輸注バッグを凍結保存すること；及び

（ｈ）方法中の任意の時点において、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集すること

を含む方法によって得ることができる第３のＴＩＬ集団である。

【０１６２】

［００１６２］　一部の実施形態において、上記の方法は、本明細書に記載の方法及び組成物のいずれかに記載されている１つ以上の特徴を更に含む。

【０１６３】

［００１６３］　一部の実施形態において、細胞培養培地は、第１の拡大培養、第２の拡大培養又は両方中、４－１ＢＢアゴニスト及び／又はＯＸ４０アゴニストを更に含む。

【０１６４】

［００１６４］　一部の実施形態において、遺伝子編集は、４－１ＢＢアゴニスト及び／又はＯＸ４０アゴニストが細胞培養培地に導入された後に実行される。

【０１６５】

［００１６５］　一部の実施形態において、遺伝子編集は、４－１ＢＢアゴニスト及び／又はＯＸ４０アゴニストが細胞培養培地に導入される前に実行される。

【０１６６】

［００１６６］　一部の実施形態において、遺伝子編集は、第１の集団、第２の集団及び第３の集団の１つ以上からのＴＩＬに対して実行される。

【０１６７】

［００１６７］　一部の実施形態において、遺伝子編集は、第１の拡大培養からのＴＩＬ若しくは第２の拡大培養からのＴＩＬ又は両方に対して実行される。

【０１６８】

［００１６８］　一部の実施形態において、遺伝子編集は、第１の拡大培養後及び第２の拡大培養前に実行される。

【０１６９】

［００１６９］　一部の実施形態において、遺伝子編集は、ステップ（ｃ）前、ステップ（ｄ）前又はステップ（ｅ）前に実行される。

【０１７０】

［００１７０］　一部の実施形態において、細胞培養培地は、第１の拡大培養中及び／又は第２の拡大培養中にＯＫＴ－３を含み、及び遺伝子編集は、ＯＫＴ－３が細胞培養培地に導入される前に実行される。

【０１７１】

［００１７１］　一部の実施形態において、細胞培養培地は、第１の拡大培養中及び／又は第２の拡大培養中にＯＫＴ－３を含み、及び遺伝子編集は、ＯＫＴ－３が細胞培養培地に導入された後に実行される。

【０１７２】

［００１７２］　一部の実施形態において、細胞培養培地は、第１の拡大培養の開始日に開始してＯＫＴ－３を含み、及び遺伝子編集は、ＴＩＬがＯＫＴ－３に曝露された後に実行される。

【０１７３】

［００１７３］　一部の実施形態において、遺伝子編集は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現が治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンシング又は低減されることを引き起こす。

【０１７４】

［００１７４］　一部の実施形態において、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＡＮＫＲＤ１１、ＳＯＣＳ１及びＢＣＯＲを含む群から選択される。

【０１７５】

［００１７５］　一部の実施形態において、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ及びＰＫＡを含む群から選択される。

【０１７６】

［００１７６］　一部の実施形態において、遺伝子編集は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現が治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強されることを引き起こし、免疫チェックポイント遺伝子は、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ　１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）及び／又はＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１を含む群から選択される。

【０１７７】

［００１７７］　一部の実施形態において、遺伝子編集は、前記１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子における二本鎖又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む。

【０１７８】

［００１７８］　一部の実施形態において、遺伝子編集は、ＣＲＩＳＰＲ方法、ＴＡＬＥ方法、ジンクフィンガー方法及びそれらの組み合わせから選択される１つ以上の方法を含む。

【０１７９】

［００１７９］　一部の実施形態において、遺伝子編集は、ＣＲＩＳＰＲ方法を含む。

【０１８０】

［００１８０］　一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ方法は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９方法である。

【０１８１】

［００１８１］　一部の実施形態において、遺伝子編集は、ＴＡＬＥ方法を含む。

【０１８２】

［００１８２］　一部の実施形態において、遺伝子編集は、ジンクフィンガー方法を含む。

【０１８３】

［００１８３］　別の実施形態において、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法も提供し、この方法は、

（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；

（ｃ）ＩＬ－２を含み、及び任意選択によりＯＫＴ－３及び／又は４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で約２～５日間にわたって第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施すること；

（ｄ）任意選択により、ＯＫＴ－３を添加して、第２のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約１～３日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；

（ｅ）第２のＴＩＬ集団に対して無菌エレクトロポレーションステップを実施することであって、無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移動を媒介する、実施すること；

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間にわたって静置すること；

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３抗体、任意選択によりＯＸ４０抗体及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１１日間にわたって実施され、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；

（ｈ）ステップ（ｇ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収して、回収されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行は、系を開放せずに発生し、回収されたＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、提供すること；

（ｉ）回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行は、系を開放せずに発生する、移すこと；及び
（ｊ）ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地を使用して、回収されたＴＩＬ集団を凍結保存すること
を含み、エレクトロポレーションステップは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む。

【０１８４】
［００１８４］ 別の実施形態において、癌を有する対象を処置する方法であって、拡大培養された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を投与することを含む方法も提供し、投与することは、
（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；
（ｃ）ＩＬ－２を含み、及び任意選択によりＯＫＴ－３及び／又は４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で約２～５日間にわたって第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施すること；
（ｄ）任意選択により、ＯＫＴ－３を添加して、第２のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約１～３日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｅ）第２のＴＩＬ集団に対して無菌エレクトロポレーションステップを実施することであって、無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移動を媒介する、実施すること；
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間にわたって静置すること；
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３抗体、任意選択によりＯＸ４０抗体及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１１日間にわたって実施され、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｈ）ステップ（ｇ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収して、回収されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行は、系を開放せずに発生し、回収されたＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、提供すること；
（ｉ）回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行は、系を開放せずに発生する、移すこと；
（ｊ）ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地を使用して、回収されたＴＩＬ集団を凍結保存すること；及び
（ｋ）輸注バッグからの治療有効投与量の回収されたＴＩＬ集団を患者に投与すること
を含み、エレクトロポレーションステップは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む。

【０１８５】

［００１８５］ 別の実施形態において、本発明は、癌を有する対象の処置に使用するための拡大培養ＴＩＬの集団を提供し、拡大培養ＴＩＬの集団は、
（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；
（ｃ）ＩＬ－２を含み、及び任意選択によりＯＫＴ－３及び／又は４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で約２～５日間にわたって第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施すること；
（ｄ）任意選択により、ＯＫＴ－３を添加して、第２のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約１～３日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｅ）第２のＴＩＬ集団に対して無菌エレクトロポレーションステップを実施することであって、無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移動を媒介する、実施すること；
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間にわたって静置すること；
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３抗体、任意選択によりＯＸ４０抗体及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１１日間にわたって実施され、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｈ）ステップ（ｇ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収して、回収されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行は、系を開放せずに発生し、回収されたＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、提供すること；
（ｉ）回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行は、系を開放せずに発生する、移すこと；及び
（ｊ）ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地を使用して、回収されたＴＩＬ集団を凍結保存すること
を含む方法によって得ることができる回収されたＴＩＬ集団であり、エレクトロポレーションステップは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む。

【０１８６】

［００１８６］ 一部の実施形態において、方法は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び４－１ＢＢアゴニスト抗体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り、第１の拡大培養を実施することを含み、ＯＫＴ－３及び４－１ＢＢアゴニスト抗体は、任意選択により、０日目又は１日目に開始して細胞培養培地中に存在する。

【０１８７】

［００１８７］ 別の実施形態において、本発明は、癌を有する対象の処置に使用するためのＴＩＬ集団、ＤＭＳＯを含む凍結保護培地及び電解質溶液を含む凍結保存組成物を提供する。

【０１８８】

［００１８８］ 一部の実施形態において、凍結保存組成物は、１つ以上の安定剤（例えば、ＨＳＡ）及び１つ以上のリンパ球成長因子（例えば、ＩＬ－２）を更に含み得る。

【０１８９】

［００１８９］ 一部の実施形態において、ＤＭＳＯを含む凍結保護培地及び電解質溶液は

、約１．１：１～約１：１．１の比率で存在する。
【０１９０】
［００１９０］一部の実施形態において、凍結保存組成物は、約３０ｍＬ～約７０ｍＬの量の、ＤＭＳＯを含む凍結保護培地、約３０ｍＬ～約７０ｍＬの量の電解質溶液、約０．１ｇ～約１．０ｇの量のＨＳＡ及び約０．００１ｍｇ～約０．００５ｍｇの量のＩＬ－２を含む。
【図面の簡単な説明】
【０１９１】
図面の簡単な説明
【図１】[００１９１]プロセス２Ａ、ＴＩＬ製造の２２日間プロセスの実施形態の概略図を示す。
【図２】[００１９２]ＴＩＬ製造のための１Ｃプロセス及び２Ａプロセスの実施形態の比較を示す。
【図３】[００１９３]１Ｃプロセスのタイムラインを示す。
【図４】[００１９４]より高い細胞数のために、投与及び共療法ステップを含む、ＴＩＬ製造のためのプロセス２Ａを使用したＴＩＬ療法の実施形態のプロセスを示す。
【図５】[００１９５]より低い細胞数のために、投与及び共療法ステップを含む、ＴＩＬ製造のためのプロセス２Ａを使用したＴＩＬ療法の実施形態のプロセスを示す。
【図６】[００１９６]２Ａプロセスの実施形態の詳細な概略図を示す。
【図７ａ】[００１９７]凍結保存ステップを含む２Ａプロセスの実施形態の主要なステップを示す。
【図７ｂ】[００１９７]凍結保存ステップを含む２Ａプロセスの実施形態の主要なステップを示す。
【図７ｃ】[００１９７]凍結保存ステップを含む２Ａプロセスの実施形態の主要なステップを示す。
【図８】[００１９８]プロセス１Ｃ及びプロセス２Ａの実施形態で処理されたコホートを含む臨床試験デザインを示す。
【図９】[００１９９]ステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的なプロセス２Ａのチャートである。
【図１０】[００２００]プロセス２Ａデータ収集計画のプロセスフローチャートである。
【図１１】[００２０１]急速拡大培養プロトコル（ＲＥＰ）の例示的な実施形態のスキームである。到着すると、腫瘍は、断片化され、１１日間、ＴＩＬ拡大培養（プレＲＥＰ拡大培養）を行うため、ＩＬ－２を含むG-Rexフラスコに入れられる。トリプルカクテル研究では、プレＲＥＰの開始時にＩＬ－２／ＩＬ－１５／ＩＬ－２１が追加される。急速拡大培養プロトコル（ＲＥＰ）の場合、ＴＩＬは、１１日間のＲＥＰ拡大培養のためにフィーダー及びＯＫＴ３で更に培養される。
【図１２】[００２０２]プロセス２Ａ、ＴＩＬ製造の２２日間プロセスの実施形態の概略図を示す。
【図１３】[００２０３]プロセス１Ｃ及びプロセス２Ａの例示的な実施形態からのステップＡ～Ｆの比較表である。
【図１４】[００２０４]プロセス１Ｃの実施形態とプロセス２Ａの実施形態との詳細な比較である。
【図１５】[００２０５]ＴＩＬ療法プロセスの実施形態の詳細なスキームである。
【図１６】[００２０６]凍結保存ＴＩＬ製造プロセスの実施形態の描写（２２日間）である。
【図１７】[００２０７]Ｇｅｎ　１からＧｅｎ　２へのプロセス改善の表である。
【図１８】[００２０８]本発明のＴＩＬ製造プロセスの実施形態である。
【図１９ａ】[００２０９]プロセス２Ａのプロセスフローチャートである。
【図１９ｂ】[００２０９]プロセス２Ａのプロセスフローチャートである。
【図１９ｃ】[００２０９]プロセス２Ａのプロセスフローチャートである。
【図２０】[００２１０]遺伝子編集プロセスで使用するためのエレクトロポレーションステ

ップを含むＴＩＬ製造プロセスの一実施形態の描写（ＴＡＬＥＮ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ及び本明細書に記載のＣＲＩＳＰＲ方法を含む）である。
【図２１】[00211]遺伝子編集プロセスで使用するためのエレクトロポレーションステップを含むＴＩＬ製造プロセスの実施形態の描写（ＴＡＬＥＮ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ及び本明細書に記載のＣＲＩＳＰＲ方法を含む）である。
【図２２】[00212]構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂの描写において、円柱は、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又は４－１ＢＢに結合する抗体に由来する、３つの直鎖状に連結されたＴＮＦＲＳＦ結合ドメインを含み、これは、折り畳まれて三価タンパク質を形成し、次いでＩｇＧ１－Ｆｃ（ＣＨ３及びＣＨ２ドメインを含む）を介して第２の三価タンパク質に連結され、次いで、これは、ジスルフィド結合（小さい細長い楕円形）を介して２つの三価タンパク質を連結するために使用され、構造を安定化し、６つの受容体の細胞内シグナル伝達ドメイン及びシグナル伝達タンパク質を合わせてシグナル伝達複合体を形成できるアゴニストを提供する。円柱として示されるＴＮＦＲＳＦ結合ドメインは、例えば、親水性残基、並びに柔軟性のためのＧｌｙ及びＳｅｒ配列、並びに溶解性のためのＧｌｕ及びＬｙｓを含み得るリンカーにより接続されたＶＨ及びＶＬ鎖を含むｓｃＦｖドメインであり得る。
【図２３】[00213]Ｐｄｃｄ１遺伝子のエクソン２を標的とするＴＡＬＥＮ構築物の描写である。
【発明を実施するための形態】
【０１９２】
発明の詳細な説明
Ｉ．序論
[00214] 急速拡大培養プロトコル（ＲＥＰ）によってエキソビボで培養したＴＩＬを利用する養子細胞療法は、黒色腫患者において宿主免疫抑制後に養子細胞療法の成功をもたらしている。現行の注入適合パラメータは、ＴＩＬの組成（例えば、ＣＤ２８、ＣＤ８又はＣＤ４陽性）の読み取り並びにＲＥＰ産物の拡大倍数及び生存率の数値に依存している。
【０１９３】
[00215] 現行のＲＥＰプロトコルは、患者に注入されることになるＴＩＬの健康に関して見識をほとんど与えない。Ｔ細胞は、ナイーブＴ細胞からエフェクターＴ細胞へのその成熟の過程で顕著な代謝シフトを起こす（Chang, et al., Nat. Immunol. 2016, 17, 364（本明細書によって全体として明示的に組み込まれる）及び特に嫌気的及び好気的代謝の考察及びマーカーについて参照されたい）。例えば、ナイーブＴ細胞はＡＴＰの産生をミトコンドリア呼吸に依存する一方、ＴＩＬなどの成熟した健康なエフェクターＴ細胞は、高度に解糖性であり、それは、増殖、遊走、活性化及び抗腫瘍有効性に必要とするバイオエナジェティクス基質の供給を好気的解糖に依存する。
【０１９４】
[00216] 先行論文の報告によれば、重度に解糖に頼る細胞は、養子移入時に栄養枯渇を被り、その結果、移入細胞の大部分が死滅することになるため、移入前にＴＩＬの解糖を制限し、ミトコンドリア代謝を促進することが望ましい。従って、当技術分野では、ミトコンドリア代謝を促進すればインビボ寿命が促進される可能性があると教示され、実際、免疫応答の誘導前に解糖の阻害薬を使用することが提案されている。Chang, et al., Nat.Immunol.2016, 17(364)を参照されたい。
【０１９５】
[00217] 本発明は、一部の実施形態において、この代謝的健康の増加を判定及び定量化する方法に更に関する。従って、本発明は、限定はされないが、解糖の速度及び量、酸化的リン酸化、予備呼吸能（ＳＲＣ）及び解糖予備能を含めた１つ以上の一般的な代謝判定を用いてＴＩＬ集団の相対的健康をアッセイする方法を提供する。
【０１９６】
[00218] その上、本発明は、一部の実施形態において、この代謝的健康の増加を判

定及び定量化する方法に更に関する。従って、本発明は、限定はされないが、解糖の速度及び量、酸化的リン酸化、予備呼吸能（ＳＲＣ）及び解糖予備能を含めた１つ以上の一般的な代謝判定を用いてＴＩＬ集団の相対的健康をアッセイする方法を提供する。

【０１９７】

［００２１９］　加えて、任意選択の追加の判定としては、限定はされないが、ＡＴＰ産生、ミトコンドリア質量及びグルコース取込みが挙げられる。

【０１９８】

［００２２０］　本発明は、一部の実施形態において、遺伝子編集技術を使用してＴＩＬの治療効果を増強することを更に対象とする。腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の養子移入は、有望で効果的な療法を提供するが、患者の応答率及び応答の頑健性を高めることができるより効果的なＴＩＬ療法に対する強い需要が存在する。本明細書に記載されるように、本発明の実施形態は、増強された治療効果を提供するように遺伝子編集された治療集団にＴＩＬを拡大培養する方法を提供する。

【０１９９】

ＩＩ．定義

［００２２１］　他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての技術及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書で言及される全ての特許及び刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２００】

［００２２２］　用語「インビボ」は、対象の体内で起こる事象を指す。

【０２０１】

［００２２３］　用語「インビトロ」は、対象の体外で起こる事象を指す。インビトロアッセイは、生細胞又は死細胞を利用した細胞ベースのアッセイを包含し、また、インタクトな細胞を利用しない無細胞アッセイも包含し得る。

【０２０２】

［００２２４］　用語「エキソビボ」は、対象の身体から摘出された細胞、組織及び／又は臓器の処置又は処置の実施を含む事象を指す。適切には、細胞、組織及び／又は臓器は、手術又は処置の方法で対象の身体に戻される。

【０２０３】

［００２２５］　用語「急速拡大培養」は、１週間の期間にわたって少なくとも約３倍（又は４倍、５倍、６倍、７倍、８倍又は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（又は２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍又は９０倍）又は最も好ましくは、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。複数の急速拡大培養プロトコルを以下に概説する。

【０２０４】

［００２２６］　本明細書において「腫瘍浸潤リンパ球」又は「ＴＩＬ」とは、対象の血流を離れて腫瘍中に遊走した、当初白血球細胞として得られた細胞の集団を意味する。ＴＩＬとしては、限定はされないが、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、樹状細胞及びＭ１マクロファージが挙げられる。ＴＩＬは、初代及び二次ＴＩＬの両方を含む。「初代ＴＩＬ」は、本明細書に概説される通り患者組織サンプルから得られるものであり（「新鮮に回収された」と称されることもある）、及び「二次ＴＩＬ」は、限定はされないが、バルクＴＩＬ及び拡大培養ＴＩＬ（「ＲＥＰ　ＴＩＬ」又は「ポストＲＥＰ　ＴＩＬ」）を含め、本明細書で考察する通り拡大培養された又は成長した任意のＴＩＬ細胞集団である。ＴＩＬ細胞集団は、遺伝子修飾ＴＩＬを含み得る。

【０２０５】

［００２２７］　本明細書において「細胞集団」（ＴＩＬを含む）は、共通の形質を共有する多数の細胞を意味する。一般に、集団は、概して数が1×10^{6}～1×10^{10}個の範囲であり、異なるＴＩＬ集団は異なる数を含む。例えば、ＩＬ－２の存在下での初代ＴＩ

Ｌの初期成長は、およそ１×１０^{8}個の細胞のバルクＴＩＬ集団をもたらす。ＲＥＰ拡大培養は、概して１．５×１０^{9}～１．５×１０^{10}個の注入のための細胞集団が提供されるように実施される。

【０２０６】

［００２２８］　本明細書において「凍結保存ＴＩＬ」とは、初代、バルク又は拡大培養（ＲＥＰ　ＴＩＬ）のいずれかのＴＩＬが約－１５０℃～－６０℃の範囲で処理及び保存されることを意味する。一般的な凍結保存方法は、実施例を含め、本明細書の他の部分にも記載される。明確にするために言えば、「凍結保存ＴＩＬ」は、初代ＴＩＬの供給源として用いられ得る凍結組織サンプルと区別可能なものである。

【０２０７】

［００２２９］　本明細書において「解凍した凍結保存ＴＩＬ」とは、かつて凍結保存されていたが、次に処理により、限定はされないが細胞培養温度又はＴＩＬを患者に投与し得る温度を含め、室温以上に戻されたＴＩＬ集団を意味する。

【０２０８】

［００２３０］　ＴＩＬは、一般的に、細胞表面マーカーを使用して生化学的に、又は腫瘍に浸潤し処置に影響を及ぼすそれらの能力によって機能的に定義することができる。ＴＩＬは、一般に、以下のバイオマーカーの１つ以上を発現することによって分類することができる：ＣＤ４、ＣＤ８、ＴＣＲ　αβ、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ５６、ＣＣＲ７、ＣＤ４５Ｒａ、ＣＤ９５、ＰＤ－１及びＣＤ２５。加えて及び代わりに、ＴＩＬは、患者への再導入時に固形腫瘍に浸潤するその能力によって機能的に定義することができる。

【０２０９】

［００２３１］　用語「凍結保存培地（cryopreservation media）」又は「凍結保存培地（cryopreservation medium）」は、細胞の凍結保存に使用できる任意の培地を指す。かかる培地には、７％～１０％のＤＭＳＯを含む培地が含まれ得る。例示的培地には、CryoStor CS10、Hyperthermasol及びそれらの組み合わせが含まれる。用語「ＣＳ１０」は、Stemcell Technologies又はBiolife Solutionsから入手した凍結保存培地を指す。ＣＳ１０倍地は、商品名「CryoStor（登録商標）CS10」と称される場合がある。ＣＳ１０培地は、ＤＭＳＯを含む無血清、無動物成分培地である。

【０２１０】

［００２３２］　用語「セントラルメモリーＴ細胞」は、ヒトではＣＤ４５Ｒ０＋であり、且つＣＣＲ７（ＣＣＲ７ｈｉ）及びＣＤ６２Ｌ（ＣＤ６２ｈｉ）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惹起後に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、血中のＣＤ４区画において優勢であり、ヒトではリンパ節及び扁桃腺において比例的に濃縮されている。

【０２１１】

［００２３３］　用語「エフェクターメモリーＴ細胞」は、セントラルメモリーＴ細胞と同様にＣＤ４５Ｒ０＋であるが、ＣＣＲ７の構成的発現が欠損しており（ＣＣＲ７ｌｏ）、及びＣＤ６２Ｌ発現が不均一であるか又は低い（ＣＤ６２ＬＬｏ）、ヒト又は哺乳類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、抗原刺激後、インターフェロン－γ、ＩＬ－４及びＩＬ－５を含む、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、血中のＣＤ８区画において優勢であり、ヒトでは肺、肝臓及び腸において比例的に濃縮されている。ＣＤ８＋エフェクターメモリーＴ細胞は多量のパーフォリンを有する。用語「閉鎖系」は、外部環境に対して閉鎖されている系を指す。本発明の方法では、細胞培養方法に適切な任意の閉鎖系を用いることができる。閉鎖系としては、例えば、限定はされないが、閉鎖型Ｇコンテナが挙げられる。

閉鎖系に腫瘍セグメントが添加された後、ＴＩＬの患者への投与直前までこの系は、外部環境に対して開放されない。

【０２１２】

［００２３４］　腫瘍を破砕するプロセスを説明するために本明細書で使用される「断片化」、「断片」及び「断片化された」という用語には、腫瘍組織の破砕、スライス、分割及び細切並びに腫瘍組織の物理的構造を破砕する任意の他の方法などの機械的断片化方法が含まれる。

【０２１３】

［００２３５］　用語「末梢血単核球」及び「ＰＢＭＣ」は、リンパ球（Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞）及び単球を含めた、円形の核を有する末梢血細胞を指す。抗原提示細胞（ＰＢＭＣは、抗原提示細胞の一種である）として使用される場合、末梢血単核球は、照射された同種異系末梢血単核球である。

【０２１４】

［００２３６］　用語「末梢血単核球」及び「ＰＢＭＣ」は、リンパ球（Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞）及び単球を含めた、円形の核を有する末梢血細胞を指す。好ましくは、末梢血単核球は、照射された同種異系末梢血単核球である。ＰＢＭＣは、抗原提示細胞の一種である。

【０２１５】

［００２３７］　用語「抗ＣＤ３抗体」は、抗体又はその変異体、例えばモノクローナル抗体であって、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、キメラ又はマウス抗体を含むものを指す。抗ＣＤ３抗体には、ムロモナブとしても知られるＯＫＴ－３が含まれる。抗ＣＤ３抗体には、Ｔ３及びＣＤ３εとしても知られるＵＨＣＴ１クローンも含まれる。他の抗ＣＤ３抗体には、例えば、オテリキシズマブ、テプリズマブ及びビジリズマブが含まれる。

【０２１６】

［００２３８］　用語「ＯＫＴ－３」（本明細書では「ＯＫＴ３」とも称される）は、成熟Ｔ細胞のＴ細胞抗原受容体中のＣＤ３受容体に対して指向されたヒト、ヒト化、キメラ又はマウス抗体を含む、モノクローナル抗体若しくはバイオシミラー又はその変異体を指し、ＯＫＴ－３（３０ｎｇ／ｍＬ、MACS GMP CD3 pure、Miltenyi Biotech, Inc., San Diego, CA, USA）及びムロモナブ又はそれらの変異体、保存的アミノ酸置換、グリコフォーム若しくはバイオシミラーなどの市販の形態を含む。ムロモナブの重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を表１に示す（配列番号１及び配列番号２）。ＯＫＴ－３を産生することができるハイブリドーマは、American Type Culture Collectionに寄託されており、ＡＴＣＣ受託番号ＣＲＬ　８００１が割り当てられている。ＯＫＴ－３を産生することができるハイブリドーマもEuropean Collection of Authenticated Cell Cultures（ＥＣＡＣＣ）に寄託されており、カタログ番号８６０２２７０６が割り当てられている。抗ＣＤ３抗体には、Ｔ３及びＣＤ３εとしても知られるＵＨＣＴ１クローン（Bio Legend, San Diego, CA, USAから市販）も含まれる。

【０２１７】

【表１】

表1. ムロモナブのアミノ酸配列。

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

【０２１８】

［００２３９］用語「ＩＬ－２」（本明細書では「ＩＬ２」とも称される）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、ヒト及び哺乳動物の形態、保存的アミノ酸置換、グリコフォーム、バイオシミラー及びそれらの変異体を含む全ての形態のＩＬ－２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、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明における使用に適した組換えヒト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、１単回使用バイアルあたり２２００万ＩＵで複数の供給元から市販されている）並びにCellGenix, Inc., Portsmouth, NH, USA（CELLGRO GMP）又はProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA（カタログ番号ＣＹＴ－２０９－ｂ）から市販で供給される組換えＩＬ－２の形態及び他の販売業者からの他の市販の同等物などのＩＬ－２のヒト組換え型を包含する。アルデスロイキン（デス－アラニル－１、セリン－１２５ヒトＩＬ－２）は、分子量およそ１５ｋＤａの非グリコシル化ヒト組換え型ＩＬ－２である。本発明における使用に適した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、本明細書に記載されているように、Nektar Therapeutics, South San Francisco, CA, USAから入手可能なペグ化ＩＬ２プロドラッグＮＫＴＲ－２１４も含む、ペグ化形態のＩＬ－２も包含する。本発明での使用に好適なＮＫＴＲ－２１４及びペグ化ＩＬ－２が米国特許出願公開第２０１４／０３２８７９１　Ａ１号及び国際公開第２０１２／０６５０８６　Ａ１号（これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。本発明での使用に適したコンジュゲート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４９０２，５０２号に記載され、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明における使用に適したＩＬ－２の製剤は、米国特許第６，７０６，２８９号に記載されており、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０２１９】

【表２】

表2. インターロイキンのアミノ酸配列。

識別子	配列(1文字のアミノ酸記号)	
配列番号3 組換えヒトIL-2 (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN RWITFCQSII STLT	60 120 134
配列番号4 アルデスロイキン	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFSQSIIST LT	60 120 132
配列番号5 組換えヒトIL-4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI MREKYSKCSS	60 120 130
配列番号6 組換えヒトIL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH	60 120 153
配列番号7 組換えヒトIL-15 (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS	60 115
配列番号8 組換えヒトIL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ HLSSRTHGSE DS	60 120 132

【００２０】

［００２４０］用語「ＩＬ－４」（本明細書では「ＩＬ４」とも称される）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細胞により、且つ好酸球、好塩基球及び肥満細胞により産生される。ＩＬ－４は、ナイーブヘルパーＴ細胞（Ｔｈ０細胞）からＴｈ２　Ｔ細胞への分化を調節する。Steinke and Borish, Respir. Res. 2001, 2, 66-70。ＩＬ－４によって活性化されると、Ｔｈ２　Ｔ細胞は続いてポジティブフィードバックループにおいて、更なるＩＬ－４を産生する。ＩＬ－４はまた、Ｂ細胞拡大培養及びクラスＩＩ　ＭＨＣ発現を刺激し、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。本発明における使用に適した組換えヒト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）を含む複数の供給元から市販されている。本発明における使用に適した組換えヒトＩＬ－４のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号５）。

【００２１】

［００２４１］用語「ＩＬ－７」（本明細書では「ＩＬ７」とも称される）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サイトカインを指し、これは間質及び上皮細胞並びに樹状細胞から入手し得る。Fry and Mackall, Blood 2002, 99, 3892-904。ＩＬ－７は、Ｔ細胞の発生を刺激することができる。ＩＬ－７は、胸腺内のＴ細胞発生及び末梢内での生存に重要な一連のシグナルにおいて、ＩＬ－７受容体α及び一般的なγ鎖受容体からなるヘテロ二量体であるＩＬ－７受容体に結合する。本発明における使用に適した組換えヒト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）を含む複数の供給元から市販されている。本発明における使用に適した組換えヒトＩＬ－７のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号６）。

【００２２】

［００２４２］用語「ＩＬ－１５」（本明細書では「ＩＬ１５」とも称される）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、ヒト及び哺乳動物の形態、保

存的アミノ酸置換、グリコフォーム、バイオシミラー及びそれらの変異体を含む全ての形態のＩＬ－２を含む。ＩＬ－１５は、例えば、Fehniger and Caligiuri, Blood 2001, 97, 14-32に記載され、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、分子量１２．８ｋＤａの１１４個のアミノ酸（及びＮ末端メチオニン）を含有する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）を含む複数の供給元から市販されている。本発明における使用に適した組換えヒトＩＬ－１５のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号７）。

【０２２３】

[00243] 用語「ＩＬ－２１」（本明細書では「ＩＬ２１」とも称される）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、ヒト及び哺乳動物の形態、保存的アミノ酸置換、グリコフォーム、バイオシミラー及びそれらの変異体を含む全ての形態のＩＬ－２１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、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。ＩＬ－２１は、主にナチュラルキラーＴ細胞及び活性化ヒトＣＤ４＋　Ｔ細胞によって産生される。組換えヒトＩＬ－２１は、分子量１５．４ｋＤａの１３２個のアミノ酸を含有する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）を含む複数の供給元から市販されている。本発明における使用に適した組換えヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号８）。

【０２２４】

[00244] 「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」又は「治療量」が指示されるとき、本発明の組成物の正確な投与量は、医師が年齢、体重、腫瘍サイズ、感染又は転移の程度及び患者（対象）の状態の個体差を考慮して決定することができる。概して、本明細書に記載される腫瘍浸潤リンパ球（例えば、二次ＴＩＬ又は遺伝子修飾された細胞傷害性リンパ球）を含む医薬組成物は、10^4～10^{11}細胞／ｋｇ体重（例えば、10^5～10^6、10^5～10^{10}、10^5～10^{11}、10^6～10^{10}、10^6～10^{11}、10^7～10^{11}、10^7～10^{10}、10^8～10^{11}、10^8～10^{10}、10^9～10^{11}又は10^9～10^{10}細胞／ｋｇ体重）（これらの範囲内にある全ての整数値を含む）の投薬量で投与され得ると言うことができる。腫瘍浸潤リンパ球（場合により遺伝子修飾された細胞傷害性リンパ球を含む）組成物はまた、これらの投薬量で複数回投与され得る。腫瘍浸潤リンパ球（ある場合には遺伝子的なものを含む）は、免疫療法で一般に公知の注入技法を用いることにより投与され得る（例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988を参照されたい）。特定の患者に対する最適な投与量及び処置レジメンは、疾患の徴候について患者をモニターし、それに応じて処置を調整することにより、医学の当業者によって容易に決定され得る。

【０２２５】

[00245] 「血液悪性腫瘍」という用語は、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、哺乳動物の癌及び造血系及びリンパ系組織の腫瘍を指す。血液悪性腫瘍は、「液性腫瘍」とも称される。血液悪性腫瘍には、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ性リンパ腫（ＣＬＬ）、小リンパ性リンパ腫（ＳＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、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るが、これらに限定されるものではない。「Ｂ細胞血液悪性腫瘍」という用語は、Ｂ細胞に影響を及ぼす血液悪性腫瘍を指す。

【０２２６】
［００２４６］　用語「固形腫瘍」は、嚢胞又は液体領域を通常含まない異常な組織塊を指す。固形腫瘍は、良性又は悪性であり得る。用語「固形腫瘍癌」は、悪性、新生物性又は癌性の固形腫瘍を指す。固形腫瘍癌としては、肺癌、乳癌、前立腺癌、結腸癌、直腸癌及び膀胱癌などの肉腫、癌腫及びリンパ腫が挙げられるが、これらに限定されるものではない。固形腫瘍の組織構造は、柔組織（癌細胞）を含む相互依存的組織コンパートメント及び癌細胞が分散し支持微小環境を提供し得る支持間質細胞を含む。
【０２２７】
［００２４７］　「液性腫瘍」という用語は、本来流動性である異常な細胞塊を指す。液性腫瘍癌としては、白血病、骨髄腫及びリンパ腫並びに他の血液悪性腫瘍が挙げられるが、これらに限定されるものではない。液性腫瘍から得られたＴＩＬは、本明細書では骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）とも称される。
【０２２８】
［００２４８］　本明細書で使用される「微小環境」という用語は、全体としての固形若しくは血液腫瘍微小環境又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に記載されているように、「新生物性形質転換を促進し、腫瘍の成長及び浸潤をサポートし、腫瘍を宿主の免疫から保護し、治療抵抗性を培い、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」の複合的な混合物を指す。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、免疫系による腫瘍の排除は、微小環境による免疫抑制のため、希少である。
【０２２９】
［００２４９］　一実施形態において、本発明は、ＴＩＬ集団で癌を治療する方法を含み、ここで、患者は、本発明に係るＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前処置される。一部の実施形態において、ＴＩＬ集団が提供され得、ここで、患者は、本発明に係るＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前処置される。一実施形態において、骨髄非破壊的化学療法は、２日間（ＴＩＬ注入の２７日前及び２６日前）のシクロホスファミド６０ｍｇ／ｋｇ／日及び５日間（ＴＩＬ注入の２７～２３日前）のフルダラビン２５ｍｇ／ｍ^2／日である。一実施形態において、骨髄非破壊的化学療法及び本発明に係るＴＩＬ注入（０日目）後、患者は、生理学的忍容量まで８時間毎に静脈内に７２０，０００ＩＵ／ｋｇのＩＬ－２の静脈内注入を受ける。
【０２３０】
［００２５０］　実験的知見は、腫瘍特異的Ｔリンパ球の養子移入前のリンパ球枯渇が、調節性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処置効果を高めるのに重要な役割を果たすことを示す。従って、本発明の一部の実施形態は、本発明のｒＴＩＬ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」とも称される）を利用する。
【０２３１】
［００２５１］　本明細書で使用される「共投与」、「共投与すること」、「～と組み合わせて投与される」、「～と組み合わせて投与すること」、「同時（ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓ）」及び「同時（ｃｏｎｃｕｒｒｅｎｔ）」という用語は、両方の活性医薬成分及び／又はそれらの代謝産物が同時に対象内に存在するための、２つ以上の活性医薬成分（本発明の好ましい実施形態において、例えば複数のＴＩＬと組み合わせた少なくとも１つのカリウムチャネルアゴニスト）の対象への投与を包含する。共投与には、別々の組成物中での同時投与、別々の組成物中での異なる時点における投与又は２つ以上の活性医薬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。
【０２３２】
［００２５２］　用語「有効量」又は「治療有効量」は、疾患処置を含むが、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な、本明細書に記載の化合物又は化合物の組

み合わせの量を指す。治療有効量は、意図される用途（インビトロ又はインビボ）又は処置されている対象及び疾患状態（例えば、対象の体重、年齢及び性別）、疾患状態の重症度又は投与方法によって変動し得る。この用語は、標的細胞において特定の応答（例えば、血小板接着及び／又は細胞遊走の減少）を誘発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、従うべき投与レジメン、化合物が他の化合物と組み合わせて投与されるかどうか、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システムによって変動する。

【０２３３】

[00253] 用語「処置」、「処置している」、「処置する」などは、所望の薬理学的及び／又は生理学的効果を達成することを指す。効果は、疾患又はその症状を完全に又は部分的に防ぐという意味で予防的であり得、及び／又は疾患及び／又は疾患に起因する有害作用を部分的に又は完全に治癒するという意味で治療的であり得る。「処置」は、本明細書で使用されるとき、哺乳類、特にヒトにおける疾患の任意の治療を包含し、（ａ）疾患の素因があり得るが、依然としてそれを有するとは診断されてない対象において疾患の発生を防ぐこと；（ｂ）疾患を阻害すること、即ちその発症又は進行を止めること；及び（ｃ）疾患を軽減すること、即ち疾患の退縮を生じさせること及び／又は１つ以上の疾患症状を軽減することが含まれる。「処置」は、疾患又は病態がない場合でも、薬理学的効果を提供するための薬剤の送達を包含することも意図される。例えば、「処置」は、例えば、ワクチンの場合、疾患状態がない中で免疫応答を誘発し又は免疫を付与することができる組成物の送達を包含する。

【０２３４】

[00254] 核酸又はタンパク質の部分に関して使用される場合の「異種」という用語は、その核酸又はタンパク質が、天然には互いに同じ関係では見出されない２つ以上の部分配列を含むことを示す。例えば、核酸は、典型的には組換え的に産生され、新しい機能性核酸を作成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、例えば１つの供給源からのプロモーター及び別の供給源からのコーディング領域又は異なる供給源からのコーディング領域を有する。同様に、異種タンパク質は、そのタンパク質が、天然に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）。

【０２３５】

[00255] ２つ以上の核酸又はポリペプチドに関連して、「配列同一性」、「パーセント同一性」及び「配列パーセント同一性」（又はそれらの同義語、例えば「９９％同一」）という用語は、配列同一性の一部として保存的アミノ酸置換を考慮せずに、最大限の対応について比較し、整合させた場合に（必要であればギャップを導入する）、同じであるか、同じヌクレオチド又はアミノ酸残基の特定のパーセンテージを有する、２つ以上の配列又は部分配列を指す。同一性パーセントは、配列比較ソフトウェア若しくはアルゴリズムを使用するか、又は目視検査によって測定することができる。アミノ酸又はヌクレオチド配列のアラインメントを入手するために使用することができる様々なアルゴリズム及びソフトウェアが当技術分野において公知である。パーセント配列同一性を決定するための適切なプログラムには、例えば、米国政府の国立バイオテクノロジー情報センター（National Center for Biotechnology Information）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又はＢＬＡＳＴＰアルゴリズムのいずれかを使用して実施することができる。ＢＬＡＳＴＮは核酸配列を比較するために使用される一方、ＢＬＡＳＴＰはアミノ酸配列を比較するために使用される。ALIGN、ALIGN-2（Genentech, South San Francisco, California）又はDNASTARから入手可能なMegAlignは、配列を整合するために使用することができる、公に入手可能な更なるソフトウェアプログラムである。当業者は、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のための適切なパラメータを決定することができる。特定の実施形態において、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。

【０２３６】
［００２５６］本明細書で使用される「変異体」という用語は、参照抗体のアミノ酸配列内又はそれに隣接する特定の位置での１つ以上の置換、欠失及び／又は付加により、参照抗体のアミノ酸配列と異なる、アミノ酸配列を含む抗体又は融合タンパク質を包含するが、これに限定されるものではない。変異体は、参照抗体のアミノ酸配列と比較して、そのアミノ酸配列中に１つ以上の保存的置換を含み得る。保存的置換は、例えば、同様に荷電又は非荷電であるアミノ酸の置換を含み得る。変異体は、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。変異体という用語は、ペグ化抗体又はタンパク質も含む。
【０２３７】
［００２５７］本明細書において「腫瘍浸潤リンパ球」又は「ＴＩＬ」とは、対象の血流を離れて腫瘍中に遊走した、当初白血球細胞として得られた細胞の集団を意味する。ＴＩＬとしては、限定はされないが、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、樹状細胞及びＭ１マクロファージが挙げられる。ＴＩＬは、初代及び二次ＴＩＬの両方を含む。「初代ＴＩＬ」は、本明細書に概説される通り患者組織サンプルから得られるものであり（「新鮮に回収された」と称されることもある）、及び「二次ＴＩＬ」は、限定はされないが、バルクＴＩＬ、拡大培養ＴＩＬ（「ＲＥＰ　ＴＩＬ」）並びに本明細書で考察する通りの「ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬ」を含め、本明細書で考察する通り拡大培養された又は成長した任意のＴＩＬ細胞集団である。ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬは、例えば、第２の拡大培養ＴＩＬ又は第２の追加拡大培養ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬと称されるＴＩＬを含む、図９のステップＤに記載されたものなど）を含み得る。
【０２３８】
［００２５８］ＴＩＬは、一般的に、細胞表面マーカーを使用して生化学的に、又は腫瘍に浸潤し処置に影響を及ぼすそれらの能力によって機能的に定義することができる。ＴＩＬは、一般的に、次のバイオマーカー：ＣＤ４、ＣＤ８、ＴＣＲ　αβ、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ５６、ＣＣＲ７、ＣＤ４５Ｒａ、ＣＤ９５、ＰＤ－１及びＣＤ２５の１つ以上を発現することによって分類することができる。加えて及び代わりに、ＴＩＬは、患者への再導入時に固形腫瘍に浸潤するその能力によって機能的に定義することができる。ＴＩＬは、更に効力によって特徴付けられ得　－　例えば、ＴＩＬは、例えば、インターフェロン（ＩＦＮ）遊離が約５０ｐｇ／ｍＬより高い、約１００ｐｇ／ｍＬより高い、約１５０ｐｇ／ｍＬより高い又は約２００ｐｇ／ｍＬより高い場合に効力があると見なすことができる。
【０２３９】
［００２５９］用語「薬学的に許容される担体」又は「薬学的に許容される賦形剤」は、あらゆる溶媒、分散剤、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤並びに不活性成分を含むものとする。活性医薬成分のためのかかる薬学的に許容される担体又は薬学的に許容される賦形剤の使用は、当技術分野において周知である。任意の従来の薬学的に許容される担体又は薬学的に許容される賦形剤が活性医薬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的な活性医薬成分も記載の組成物及び方法に組み込むことができる。
【０２４０】
［００２６０］用語「約」及び「およそ」は、統計的に意味のある値の範囲内を指す。かかる範囲は、所定の値又は範囲の一桁以内、好ましくは５０％以内、より好ましくは２０％以内、更により好ましくは１０％以内、更により好ましくは５％以内であり得る。用語「約」又は「およそ」に含まれる許容変動は、研究中の特定の系に依存し、当業者に容易に理解できる。更に、本明細書で使用される場合、用語「約」及び「およそ」は、寸法、サイズ、配合、パラメータ、形状及び他の量及び特性が正確ではなく、及び正確である必要がないことを意味するが、近似及び／又はより大きい又はより小さい場合があり、必要に応じて、公差、変換係数、四捨五入、測定誤差など、及び当業者に公知の他の因子を反映する。一般に、寸法、サイズ、製剤、パラメータ、形状又は他の量若しくは特性は、明

示的にそうであると明記されているか否かにかかわらず、「約」又は「およそ」である。大きく異なるサイズ、形状及び寸法の実施形態が、記載された用語を引用する場合があることに留意されたい。

【０２４１】

［００２６１］　添付の特許請求の範囲で使用される場合、「を含む」、「から本質的になる」及び「からなる」という移行用語は、記載されていない追加的な請求要素又はステップがある場合、それらが特許請求の範囲から除外されることに関して、元の形式及び修正された形式で、特許請求の範囲を定義する。用語「を含む」は、包括的又は無制限であることを意図しており、追加的な引用されていない要素、方法、ステップ又は材料を除外するものではない。用語「からなる」は、特許請求の範囲で指定されたもの以外の任意の要素、ステップ又は材料を除外し、後者の場合、指定された材料に関連する通常の不純物を除外する。用語「から本質的になる」は、特許請求の範囲を特定の要素、ステップ又は材料及び請求された発明の基本的及び新規の特性に実質的に影響しないものに限定する。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、代替実施形態において、「を含む」、「から本質的になる」及び「からなる」という移行用語のいずれかによってより具体的に定義され得る。

【０２４２】

ＩＩＩ．遺伝子編集プロセス

Ａ．概要：ＴＩＬ拡大培養＋遺伝子編集

［００２６２］　本発明の実施形態は、ＴＩＬ集団を拡大培養する方法を対象とし、方法は、その治療効果を増強するためにＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集する１つ以上のステップを含む。本明細書で使用される場合、「遺伝子編集（gene-editing）」、「遺伝子編集（gene editing）」及び「ゲノム編集」は、ＤＮＡが細胞のゲノムにおいて恒久的に改変されるタイプの遺伝子改変を指し、例えば、ＤＮＡは、細胞のゲノム内で挿入、欠失、改変又は置換される。一部の実施形態において、遺伝子編集は、ＤＮＡ配列の発現をサイレンシング（遺伝子ノックアウトと称されることもある）又は阻害／低減（遺伝子ノックダウンと称されることもある）する。他の実施形態において、遺伝子編集により、ＤＮＡ配列の発現が増強される（例えば、過剰発現を引き起こすことによる）。本発明の実施形態によれば、遺伝子編集技術は、治療用ＴＩＬ集団の有効性を増強するために使用される。

【０２４３】

［００２６３］　腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａとして知られる例示的なＴＩＬ拡大培養方法が以下に記載される）に従って実施され得、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。追加の実施形態によれば、ＴＩＬを治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１７／０５８６１０号、ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０１２６０５号又はＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０１２６３３号（これらは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載される方法の任意の実施形態に従って実行され、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。従って、本発明の一実施形態は、本明細書に記載の任意の実施形態に従って拡大培養された治療用ＴＩＬ集団を提供し、治療用集団の少なくとも一部は、遺伝子編集されており、例えば、輸注バッグに移される治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部は、恒久的に遺伝子編集されている。

【０２４４】

Ｂ．ＴＩＬ拡大培養中の遺伝子編集のタイミング

［００２６４］　一実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、

（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；

（ｃ）ＩＬ－２及び任意選択によりＯＫＴ－３（例えば、ＯＫＴ－３は、拡大培養プロセスの開始日に開始して培養培地中に存在し得る）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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３～１４日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１４日間にわたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団であり、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｅ）ステップ（ｄ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行は、系を開放せずに発生する、回収すること；
（ｆ）ステップ（ｅ）からの回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行は、系を開放せずに発生する、移すこと；及び
（ｇ）方法中の任意の時点において、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集すること
を含む。

【０２４５】

［００２６５］ 上記の実施形態のステップ（ｇ）で述べたように、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡大培養方法中の任意の時点で実行され得、これは、遺伝子編集が拡大培養方法のいずれかのステップ前、その間又はその後（例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）のいずれかの間又は上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）のいずれかの前又は後）にＴＩＬで実行され得ることを意味する。特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、拡大培養方法中に収集され（例えば、拡大培養方法は、ＴＩＬの少なくとも一部に対して「一時停止」される）、収集されたＴＩＬは、遺伝子編集プロセスに供され、場合により、その後、拡大培養方法に再び導入されて（例えば、培養培地に戻され）、増殖プロセスを継続し、その結果、最終的に輸注バッグに移される治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部が恒久的に遺伝子編集される。一実施形態において、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬを活性化し、活性化されたＴＩＬに対して遺伝子編集ステップを実施し、本明細書に記載のプロセスに従って遺伝子編集ＴＩＬを拡大培養することにより、拡大培養前に実施され得る。

【０２４６】

［００２６６］ 拡大培養プロセスの代替の実施形態は、上に示した方法と異なる場合があることに留意されたい。例えば、代替の実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｇ）を有しない場合があるか、又は異なる数のステップを有する場合がある。特定の実施形態に関わらず、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡大培養方法中の任意の時点で実行され得る。例えば、代替の実施形態は、３つ以上の拡大培養を含み得、遺伝子編集は、第３又は第４の拡大培養などの間にＴＩＬに対して行われ得ることが可能である。

【０２４７】

［００２６７］ 一実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第１の集団、第２の集団及び第３の集団の１つ以上からのＴＩＬに対して実行される。例えば、遺伝子編集は、第１のＴＩＬ集団又は第１の集団から収集されたＴＩＬの一部に対して実行され得、遺伝子編集プロセスに続いて、それらのＴＩＬは、その後、拡大培養プロセスに戻され得る（例えば、培地に戻す）。代わりに、遺伝子編集は、第２若しくは第３の集団からのＴＩＬ又は第２若しくは第３の集団から収集されたＴＩＬの一部に対してそれぞれ実行され得、遺伝子編集プロセスに続いて、それらのＴＩＬは、その後、拡大培養プロセスに戻され得る（例えば、培地に戻す）。別の実施形態によれば、遺伝子編集は、ＴＩＬが依然として培地

中にあり、拡大培養が実施されている間に実施される。即ち、それらは、遺伝子編集を行うために必ずしも拡大培養から「取り出される」とは限らない。

【０２４８】

［００２６８］　別の実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第１の拡大培養からのＴＩＬ若しくは第２の拡大培養からのＴＩＬ又は両方に対して実行される。例えば、第１の拡大培養又は第２の拡大培養中、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬに対して実行され得、遺伝子編集プロセスに続いて、それらのＴＩＬは、その後、例えばそれらを培養培地に再導入することにより、拡大培養方法に戻され得る。

【０２４９】

［００２６９］　別の実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第１の拡大培養後及び第２の拡大培養前にＴＩＬの少なくとも一部に対して実行される。例えば、第１の拡大培養後、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬに対して実行され得、遺伝子編集プロセスに続いて、それらのＴＩＬは、その後、例えばそれらを第２の拡大培養のために培養培地に再導入することにより、拡大培養方法に戻され得る。

【０２５０】

［００２７０］　代替の実施形態によれば、ステップ（ｃ）前（例えば、ステップ（ａ）～（ｂ）のいずれかの前、その間又はその後）、ステップ（ｄ）前（例えば、ステップ（ａ）～（ｃ）のいずれかの前、その間又はその後）、ステップ（ｅ）前（例えば、ステップ（ａ）～（ｄ）のいずれかの前、その間又はその後）又はステップ（ｆ）前（例えば、ステップ（ａ）～（ｅ）のいずれかの前、その間又はその後）に遺伝子編集プロセスが実行される。

【０２５１】

［００２７１］　ＯＫＴ－３に関して、特定の実施形態によれば、０日目及び／又は１日目に細胞培養培地でＯＫＴ－３に曝露された後、ＴＩＬで遺伝子編集が実行されるように、細胞培養培地は、第１の拡大培養の開始日（０日目）又は１日目に開始してＯＫＴ－３を含み得ることに留意されたい。別の実施形態によれば、細胞培養培地は、第１の拡大培養中及び／又は第２の拡大培養中にＯＫＴ－３を含み、及び遺伝子編集は、ＯＫＴ－３が細胞培養培地に導入される前に実行される。代わりに、細胞培養培地は、第１の拡大培養中及び／又は第２の拡大培養中にＯＫＴ－３を含み得、及び遺伝子編集は、ＯＫＴ－３が細胞培養培地に導入された後に実行される。

【０２５２】

［００２７２］　４－１ＢＢアゴニストに関して、特定の実施形態によれば、０日目及び／又は１日目に細胞培養培地で４－１ＢＢアゴニストに曝露された後、ＴＩＬで遺伝子編集が実行されるように、細胞培養培地は、第１の拡大培養の開始日（０日目）又は１日目に開始して４－１ＢＢアゴニストを含み得ることにも留意されたい。別の実施形態によれば、細胞培養培地は、第１の拡大培養中及び／又は第２の拡大培養中に４－１ＢＢアゴニストを含み、及び遺伝子編集は、４－１ＢＢアゴニストが細胞培養培地に導入される前に実行される。代わりに、細胞培養培地は、第１の拡大培養中及び／又は第２の拡大培養中に４－１ＢＢアゴニストを含み得、及び遺伝子編集は、４－１ＢＢアゴニストが細胞培養培地に導入された後に実行される。

【０２５３】

［００２７３］　ＩＬ－２に関して、特定の実施形態によれば、０日目及び／又は１日目に細胞培養培地でＩＬ－２に曝露された後、ＴＩＬで遺伝子編集が実行されるように、細胞培養培地は、第１の拡大培養の開始日（０日目）又は１日目に開始してＩＬ－２を含み得ることにも留意されたい。別の実施形態によれば、細胞培養培地は、第１の拡大培養中及び／又は第２の拡大培養中にＩＬ－２を含み、及び遺伝子編集は、ＩＬ－２が細胞培養培地に導入される前に実行される。代わりに、細胞培養培地は、第１の拡大培養中及び／又は第２の拡大培養中にＩＬ－２を含み得、及び遺伝子編集は、ＩＬ－２が細胞培養培地に導入された後に実行される。

【０２５４】

［００２７４］上記のように、ＯＫＴ－３、４－１ＢＢアゴニスト及びＩＬ－２の１つ以上は、第１の拡大培養の０日目又は１日目に開始して細胞培養培地に含まれ得る。一実施形態によれば、ＯＫＴ－３は、第１の拡大培養の０日目若しくは１日目に開始して細胞培養培地に含まれ、及び／又は４－１ＢＢアゴニストは、第１の拡大培養の０日目若しくは１日目に開始して細胞培養培地に含まれ、及び／又はＩＬ－２は、第１の拡大培養の０日目若しくは１日目に開始して細胞培養培地に含まれる。一例によれば、細胞培養培地は、第１の拡大培養の０日目又は１日目に開始してＯＫＴ－３及び４－１ＢＢアゴニストを含む。別の例によれば、細胞培養培地は、第１の拡大培養の０日目又は１日目に開始してＯＫＴ－３、４－１ＢＢアゴニスト及びＩＬ－２を含む。当然のことながら、本明細書に記載の様々な実施形態に記載されるように、ＯＫＴ－３、４－１ＢＢアゴニスト及びＩＬ－２の１つ以上は、拡大培養プロセス中の更なる１つ以上の時点において細胞培養培地に添加され得る。

【０２５５】

［００２７５］一実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、

（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；

（ｃ）ＩＬ－２を含み、及び任意選択により４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で約２～５日間にわたって第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施すること；

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加して、第２のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約１～３日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；

（ｅ）第２のＴＩＬ集団に対して無菌エレクトロポレーションステップを実施することであって、無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移動を媒介する、実施すること；

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間にわたって静置すること；

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３抗体、任意選択によりＯＸ４０抗体及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１１日間にわたって実施され、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；

（ｈ）ステップ（ｇ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収して、回収されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｇ）への移行は、系を開放せずに発生し、回収されたＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、提供すること；

（ｉ）回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行は、系を開放せずに発生する、移すこと；及び

（ｊ）ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地を使用して、回収されたＴＩＬ集団を凍結保存すること

を含む。

【０２５６】

［００２７６］一実施形態によれば、前述の方法を使用して、癌を有するヒト対象の処置のために自己から回収したＴＩＬ集団が提供され得る。

【０２５７】

Ｃ．免疫チェックポイント

［００２７７］本発明の特定の実施形態によれば、ＴＩＬ集団は、ＴＩＬ集団における１

つ以上の免疫チェックポイント遺伝子を遺伝的に改変することによって遺伝子編集される。換言すれば、ＴＩＬの免疫チェックポイントの１つ以上をコードするＴＩＬ内のＤＮＡ配列は、ＴＩＬのゲノム内で恒久的に改変、例えば挿入、欠失又は置換される。免疫チェックポイントは、阻害性又は刺激性経路を介して免疫応答を調節するリンパ球によって発現される分子である。癌の場合、免疫チェックポイント経路が活性化されて抗腫瘍反応を阻害し、即ち悪性細胞による特定の免疫チェックポイントの発現が抗腫瘍免疫を阻害し、癌細胞の増殖を有利にすることがよくある。例えば、Marin-Acevedo et al., Journal of Hematology & Oncology (2018) 11:39を参照されたい。従って、特定の阻害チェックポイント分子は、本発明の免疫療法の標的として機能する。特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、特定の免疫チェックポイント経路を遮断又は刺激するように遺伝子編集され、それにより腫瘍に対する身体の免疫学的活性を増強する。

【０２５８】

[00278] 本明細書で使用される場合、免疫チェックポイント遺伝子は、免疫チェックポイント分子をコードするＤＮＡ配列を含む。本発明の特定の実施形態によると、ＴＩＬ拡大培養方法中のＴＩＬの遺伝子編集は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現の、治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部におけるサイレンシング又は低下を引き起こす。例えば、遺伝子編集は、免疫反応を増強するために、ＰＤ－１又はＣＴＬＡ－４などの阻害性受容体の発現のサイレンシング又は低減を引き起こし得る。

【０２５９】

[00279] 最も広く研究されているチェックポイントには、プログラム細胞死受容体－１（ＰＤ－１）及び細胞傷害性Ｔリンパ球関連分子－４（ＣＴＬＡ－４）が含まれ、これらは、それらが阻害性リガンドと相互作用する場合に主要なエフェクター機能（例えば、活性化、増殖、サイトカイン放出、細胞傷害性など）を阻害する免疫細胞上の阻害性受容体である。以下でより詳細に説明するように、ＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４に加えて、多数のチェックポイント分子が免疫療法の潜在的な標的として浮上している。

【０２６０】

[00280] 本発明のＴＩＬを恒久的に遺伝子編集することによりサイレンシング又は阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＡＮＫＲＤ１１、ＳＯＣＳ１及びＢＣＯＲが含まれる。例えば、本発明のＴＩＬにおいてサイレンシング又は阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ及びＰＫＡを含む群から選択され得る。ＢＡＦＦ（ＢＲ３）は、Bloom, et al., J. Immunother., 2018（近刊）に記載されている。別の例によれば、本発明のＴＩＬにおいてサイレンシング又は阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）及びそれらの組み合わせを含む群から選択され得る。

【０２６１】

[00281] 一実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、

（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；
（ｃ）ＩＬ－２を含み、及び任意選択により４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で約２～５日間にわたって第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施すること；
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加して、第２のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約１～３日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｅ）第２のＴＩＬ集団に対して無菌エレクトロポレーションステップを実施することであって、無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移動を媒介する、実施すること；
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間にわたって静置すること；
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３抗体、任意選択によりＯＸ４０抗体及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１１日間にわたって実施され、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｈ）ステップ（ｇ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収して、回収されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行は、系を開放せずに発生し、回収されたＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、提供すること；
（ｉ）回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行は、系を開放せずに発生する、移すこと；及び
（ｊ）ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地を使用して、回収されたＴＩＬ集団を凍結保存すること
を含み、エレクトロポレーションステップは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含む。

【０２６２】

１．ＰＤ－１

[00282] チェックポイント遮断の誘導について最も研究されている標的の１つは、Ｔ細胞調節因子のＣＤ２８スーパーファミリーのメンバーである、プログラム死受容体（ＰＤ１又はＰＤ－１、ＰＤＣＤ１としても知られている）である。そのリガンドであるＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２は、黒色腫を含む様々な腫瘍細胞上で発現される。ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１の相互作用は、Ｔ細胞エフェクター機能を阻害し、慢性刺激の場合にＴ細胞の枯渇を引き起こし、腫瘍微小環境でＴ細胞アポトーシスを誘導する。ＰＤ１は、免疫監視からの腫瘍特異的な逃避にも役割を果たし得る。

【０２６３】

[00283] 特定の実施形態によれば、ＴＩＬにおけるＰＤ１の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシング又は低減される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａ又は図２０及び２１に示される方法）に従って実施され得、ここで、方法は、ＰＤ１の発現をサイレンシング又は抑制することによってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に説明されるように、遺伝子編集プロセスは、ＰＤ１などの免疫チェックポイント遺伝子における二本鎖又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に関与し得る。例えば、ＣＲＩＳＰ

Ｒ方法、ＴＡＬＥ方法又はジンクフィンガー方法は、ＴＩＬにおけるＰＤ１の発現をサイレンシング又は低減するために使用され得る。

【０２６４】

２．ＣＴＬＡ－４

［００２８４］　ＣＴＬＡ－４の発現は、活性化されたＴ細胞におけるＴ細胞活性化時に誘導され、抗原提示細胞活性化抗原ＣＤ８０及びＣＤ８６との結合について競合する。ＣＴＬＡ－４とＣＤ８０又はＣＤ８６との相互作用は、Ｔ細胞阻害を引き起こし、免疫応答のバランスを維持するのに役立つ。しかし、ＣＤ８０又はＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４の相互作用を阻害すると、Ｔ細胞活性化が延長され、癌抗原に対する免疫応答のレベルが上昇し得る。

【０２６５】

［００２８５］　特定の実施形態によれば、ＴＩＬにおけるＣＴＬＡ－４の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシング又は低減される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａ又は図２０及び２１に示される方法）に従って実施され得、ここで、方法は、ＣＴＬＡ－４の発現をサイレンシング又は抑制することによってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に説明されるように、遺伝子編集プロセスは、ＣＴＬＡ－４などの免疫チェックポイント遺伝子における二本鎖又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。例えば、ＣＲＩＳＰＲ方法、ＴＡＬＥ方法又はジンクフィンガー方法は、ＴＩＬにおけるＣＴＬＡ－４の発現をサイレンシング又は抑制するために使用され得る。

【０２６６】

３．ＬＡＧ－３

［００２８６］　リンパ球活性化遺伝子－３（ＬＡＧ－３、ＣＤ２２３）は、主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）クラスＩＩライゲーション後、Ｔ細胞及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞によって発現される。そのメカニズムは、不明なままであるが、その調節は、Ｔ細胞機能に対して負の調節効果を引き起こし、組織の損傷及び自己免疫を予防する。ＬＡＧ－３及びＰＤ－１は、ＴＩＬ上で頻繁に共発現及び上方制御され、免疫枯渇及び腫瘍増殖を引き起こす。従って、ＬＡＧ－３遮断は、抗腫瘍反応を改善する。例えば、Marin-Acevedo et al., Journal of Hematology & Oncology (2018) 11:39を参照されたい。

【０２６７】

［００２８７］　特定の実施形態によれば、ＴＩＬにおけるＬＡＧ－３の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシング又は低減される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａ又は図２０及び２１に示される方法）に従って実施され得、ここで、方法は、ＬＡＧ－３の発現をサイレンシング又は抑制することによってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に説明されるように、遺伝子編集プロセスは、ＬＡＧ－３などの免疫チェックポイント遺伝子における二本鎖又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。特定の実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ方法、ＴＡＬＥ方法又はジンクフィンガー方法は、ＴＩＬにおけるＬＡＧ－３の発現をサイレンシング又は抑制するために使用され得る。

【０２６８】

４．ＴＩＭ－３

［００２８８］　Ｔ細胞免疫グロブリン－３（ＴＩＭ－３）は、Ｔ細胞の直接的な負の調節因子であり、ＮＫ細胞及びマクロファージ上に発現する。ＴＩＭ－３は、骨髄由来サプレッサー細胞（ＭＤＳＣ）の拡大培養を誘導することにより、間接的に免疫抑制を促進する。そのレベルは、機能不全及び枯渇Ｔ細胞において特に上昇することが見出されており、悪性腫瘍における重要な役割を示唆している。

【０２６９】

［００２８９］　特定の実施形態によれば、ＴＩＬにおけるＴＩＭ－３の発現は、本発明の

組成物及び方法に従ってサイレンシング又は低減される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａ又は図２０及び２１に示される方法）に従って実施され得、ここで、方法は、ＴＩＭ－３の発現をサイレンシング又は抑制することによってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に説明されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＭ－３などの免疫チェックポイント遺伝子における二本鎖又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。例えば、ＣＲＩＳＰＲ方法、ＴＡＬＥ方法又はジンクフィンガー方法は、ＴＩＬにおけるＴＩＭ－３の発現をサイレンシング又は抑制するために使用され得る。

【０２７０】

５．Ｃｉｓｈ

［００２９０］サイトカインシグナル抑制剤（ＳＯＣＳ）ファミリーのメンバーであるＣｉｓｈは、ＣＤ８＋Ｔ細胞のＴＣＲ刺激によって誘導され、腫瘍に対するその機能的親和性を阻害する。ＣＤ８＋Ｔ細胞におけるＣｉｓｈの遺伝的欠失は、それらの拡大培養、機能的親和性及びサイトカインの多機能性を増強し、確立された腫瘍の顕著で永続的な退縮をもたらし得る。例えば、Palmer et al., Journal of Experimental Medicine, 212 (12):2095 (2015)を参照されたい。

【０２７１】

［００２９１］特定の実施形態によれば、ＴＩＬにおけるＣｉｓｈの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシング又は低減される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａ又は図２０及び２１に示される方法）に従って実施され得、ここで、方法は、Ｃｉｓｈの発現をサイレンシング又は抑制することによってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に説明されるように、遺伝子編集プロセスは、Ｃｉｓｈなどの免疫チェックポイント遺伝子における二本鎖又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。例えば、ＣＲＩＳＰＲ方法、ＴＡＬＥ方法又はジンクフィンガー方法は、ＴＩＬにおけるＣｉｓｈの発現をサイレンシング又は抑制するために使用され得る。

【０２７２】

６．ＴＧＦβ

［００２９２］ＴＧＦβシグナル伝達経路は、細胞の増殖、分化、アポトーシス、運動性及び浸潤、細胞外マトリックス産生、血管新生並びに免疫応答の調節において複数の機能を有する。ＴＧＦβシグナル伝達の制御解除は、腫瘍において頻繁に起こり、腫瘍の開始、発達及び転移に重大な役割を有する。微小環境レベルでは、ＴＧＦβ経路は、発癌全体を通して腫瘍の増殖及び転移に好ましい微小環境の生成に貢献する。例えば、Neuzillet et al., Pharmacology & Therapeutics, Vol. 147, pp. 22-31 (2015)を参照されたい。

【０２７３】

［００２９３］特定の実施形態によれば、ＴＩＬにおけるＴＧＦβの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシング又は低減される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａ又は図２０及び２１に示される方法）に従って実施され得、ここで、方法は、ＴＧＦβの発現をサイレンシング又は低減することによってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に説明されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＧＦβなどの免疫チェックポイント遺伝子における二本鎖又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。例えば、ＣＲＩＳＰＲ方法、ＴＡＬＥ方法又はジンクフィンガー方法は、ＴＩＬにおけるＴＧＦβの発現をサイレンシング又は抑制するために使用され得る。

【０２７４】

［００２９４］一部の実施形態において、ＴＧＦβＲ２（ＴＧＦベータ受容体２）は、Ｃ

ＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９システムを使用してＴＧＦβＲ２をサイレンシングするか、又は当技術分野で公知の方法を使用してＴＧＦβＲ２ドミナントネガティブ細胞外トラップを使用することによって抑制され得る。

【０２７５】

７．ＰＫＡ

［００２９５］ プロテインキナーゼＡ（ＰＫＡ）は、セリン－スレオニンプロテインキナーゼスーパーファミリーの周知のメンバーである。ｃＡＭＰ依存性プロテインキナーゼとしても知られるＰＫＡは、ｃＡＭＰ結合時のその活性化を通して、Ｇタンパク質共役型受容体のシグナル伝達を媒介するマルチユニットプロテインキナーゼである。それは、代謝からイオンチャネル活性化、細胞の増殖及び分化、遺伝子発現及びアポトーシスまで、多様な細胞プロセスの制御に関与している。重要なことに、ＰＫＡは、多くの腫瘍の開始及び進行に関連付けられてきた。例えば、Sapio et al., EXCLI Journal; 2014; 13:843-855を参照されたい。

【０２７６】

［００２９６］ 特定の実施形態によれば、ＴＩＬにおけるＰＫＡの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシング又は低減される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａ又は図２０及び２１に示される方法）に従って実施され得、ここで、方法は、ＰＫＡの発現をサイレンシング又は抑制することによってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に説明されるように、遺伝子編集プロセスは、ＰＫＡなどの免疫チェックポイント遺伝子における二本鎖又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。例えば、ＣＲＩＳＰＲ方法、ＴＡＬＥ方法又はジンクフィンガー方法は、ＴＩＬにおけるＰＫＡの発現をサイレンシング又は抑制するために使用され得る。

【０２７７】

８．ＣＢＬＢ

［００２９７］ ＣＢＬＢ（又はＣＢＬ－Ｂ）は、Ｅ３ユビキチンタンパク質リガーゼであり、Ｔ細胞活性化の負の調節因子である。Bachmaier, et al., Nature, 2000, 403, 211-216；Wallner, et al., Clin. Dev. Immunol. 2012, 692639。更に、その開示が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２０１９／０２８４５３０号（‘５３０公報）において、ＣＢＬＢの発現又は機能の低下は、免疫エフェクター細胞のエフェクター機能を増強することにより免疫療法を改善することが示されている。‘５３０公報の実施例１２、１３、１４及び１６は、ＴＩＬ及び他の細胞におけるＣＢＬＢ調節の様々な実施形態を示す。

【０２７８】

［００２９８］ 特定の実施形態によれば、ＴＩＬにおけるＣＢＬＢの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシング又は低減される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａ又は図２０及び２１に示される方法）に従って実施され得、ここで、方法は、ＣＢＬＢの発現をサイレンシング又は抑制することによってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に説明されるように、遺伝子編集プロセスは、ＣＢＬＢなどの免疫チェックポイント遺伝子における二本鎖又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。例えば、ＣＲＩＳＰＲ方法、ＴＡＬＥ方法又はジンクフィンガー方法は、ＴＩＬにおけるＰＫＡの発現をサイレンシング又は抑制するために使用され得る。一部の実施形態において、ＣＢＬＢは、ＴＡＬＥＮノックアウトを使用してサイレンシングされる。一部の実施形態において、ＣＢＬＢは、ＴＡＬＥ－ＫＲＡＢ転写阻害剤ノックインを使用してサイレンシングされる。これらの方法の詳細は、Boettcher and McManus, Mol. Cell Review, 2015, 58, 575-585に見出すことができる。

【０２７９】

９．ＴＩＧＩＴ

［００２９９］　Ｉｇ及びＩＴＩＭ（免疫受容体チロシンベース阻害モチーフ）ドメインを有するＴ細胞免疫受容体又はＴＩＧＩＴは、その細胞質ドメインにＩｇ様Ｖ型ドメイン及びＩＴＩＭを有する膜貫通糖タンパク質受容体である。Khalil, et al., Advances in Cancer Research, 2015, 128, 1-68；Yu, et al., Nature Immunology, 2009, Vol. 10, No. 1, 48-57。ＴＩＧＩＴは、一部のＴ細胞及びナチュラルキラー細胞によって発現される。更に、ＴＩＧＩＴは、特に黒色腫を有する個体からの抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞及びＣＤ８＋ＴＩＬで過剰発現することが示されている。研究によると、ＴＩＧＩＴ経路は、腫瘍の免疫回避に寄与し、ＴＩＧＩＴ阻害は、ポリクローナル及び抗原特異的刺激に応答してＴ細胞の活性化及び増殖を増加させることが示されている。Khalil, et al., Advances in Cancer Research, 2015, 128, 1-68。更に、ＴＩＧＩＴのＰＤ－１又はＴＩＭ３との共遮断は、マウスモデルの固形腫瘍に対して相乗効果を示している。同文献；The Journal of Clinical Investigation, 2015, Vol. 125, No. 11, 4053-4062も参照されたい。

【０２８０】

［００３００］　特定の実施形態によれば、ＴＩＬにおけるＴＩＧＩＴの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシング又は低減される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａ又は図２０及び２１に示される方法）に従って実施され得、ここで、方法は、ＴＩＧＩＴの発現をサイレンシング又は抑制することによってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に説明されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＧＩＴなどの免疫チェックポイント遺伝子における二本鎖又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。例えば、ＣＲＩＳＰＲ方法、ＴＡＬＥ方法又はジンクフィンガー方法は、ＴＩＬにおけるＴＩＧＩＴの発現をサイレンシング又は抑制するために使用され得る。

【０２８１】

１０．ＴＯＸ

［００３０１］　胸腺細胞選択関連高移動度群（ＨＭＧ）ボックス（ＴＯＸ）は、ＨＭＧボックスＤＮＡ結合ドメインを含む転写因子である。ＴＯＸは、ＨＭＧボックススーパーファミリーのメンバーであり、配列に依存しないが、構造に依存する方法でＤＮＡに結合すると考えられている。

【０２８２】

［００３０２］　例えば、Scott, et al., Nature, 2019, 571, 270-274及びKhan, et al., Nature, 2019, 571, 211-218（これらの両方は、その全体が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、ＴＯＸは、腫瘍特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞機能障害又はＴ細胞枯渇の重要な調節因子として同定され、転写的及び後成的にＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞枯渇をプログラムすることが見出された。ＴＯＸは、その全体が参照により本明細書に組み込まれるAlfei, et al., Nature, 2019, 571, 265-269に記載されるように、慢性感染時のＴ細胞機能障害の進行及び枯渇Ｔ細胞の維持に重要な要因であることも見出された。ＴＯＸは、腫瘍及び慢性ウイルス感染による機能障害又は枯渇Ｔ細胞で高度に発現する。インビトロでのエフェクターＴ細胞におけるＴＯＸの異所性発現は、Ｔ細胞枯渇に関連する転写プログラムを誘導した一方、Ｔ細胞におけるＴＯＸの欠失は、Ｔ枯渇プログラムを無効化した。

【０２８３】

［００３０３］　特定の実施形態によれば、ＴＩＬにおけるＴＯＸの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシング又は低減される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養するための方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａ又は図２０及び２１に示される方法）に従って実施され得、ここで、方法は、ＴＯＸの発現をサイレンシング又は抑制することによってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に説明されるように、遺伝

子編集プロセスは、ＴＯＸなどの免疫チェックポイント遺伝子における二本鎖又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。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法又はジンクフィンガー法は、ＴＩＬにおけるＴＯＸの発現をサイレンシング又は抑制するために使用され得る。

【０２８４】

１１．ＡＮＫＲＤ１１

［００３０４］　ＡＮＫＲＤ１１遺伝子は、アンキリンリピートドメイン１１（ＡＮＫＲＤ１１）と呼ばれるタンパク質をコードし、鼻咽頭癌感受性タンパク質と称されることもある。このタンパク質には、複数のアンキリンドメインが含まれ、これらのドメインは、他のタンパク質が互いに相互作用することを促進する。ＡＮＫＲＤ１１は、乳癌で下方制御され、乳房の腫瘍形成に関連していることが示されている。このＡＮＫＲＤ１１の下方制御は、プロモーターＤＮＡメチル化に関連付けられ得る（Lim, et al, Eur.J. Cancer, 2012, 48(17):3300-3309）。

【０２８５】

［００３０５］　更に、その開示が参照により本明細書に組み込まれる‘５３０公報において、ＡＮＫＲＤ１１の発現又は機能の低下は、免疫エフェクター細胞のエフェクター機能を増強することにより免疫療法を改善することが示されている。‘５３０公報の実施例７、１５、１６、１８～２１、２７及び３０は、ＴＩＬ及び他の細胞におけるＡＮＫＲＤ１１調節の様々な実施形態を示す。

【０２８６】

［００３０６］　特定の実施形態によれば、ＴＩＬにおけるＡＮＫＲＤ１１の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシング又は低減される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養するための方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａ又は図２０及び２１に示される方法）に従って実施され得、ここで、方法は、ＡＮＫＲＤ１１の発現をサイレンシング又は抑制することによってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に説明されるように、遺伝子編集プロセスは、ＡＮＫＲＤ１１などの免疫チェックポイント遺伝子における二本鎖又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。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法又はジンクフィンガー法は、ＴＩＬにおけるＡＮＫＲＤ１１の発現をサイレンシング又は抑制するために使用され得る。

【０２８７】

１２．ＳＯＣＳ１

［００３０７］　ＳＯＣＳ１遺伝子は、サイトカインシグナル伝達１タンパク質のサプレッサーをコードし、これは、負のフィードバックループに関与して、ＪＡＫ－ＳＴＡＴサイトカインシグナル伝達を減衰させ、炎症を阻害する（Sharma, et al., Front.Pharmacol.2019, doi.org/10.3389/fphar.2019.00324）。研究は、このタンパク質がＩＦＮ－γの調節因子であることを示唆している。ＳＯＣＳ１は、様々な癌の腫瘍サプレッサーとしても認識されており、例えばGui et al., Oncogene, 2016, 35(32):4200-4211に記載されるように、ＳＯＣＳ１が癌遺伝子であるというエビデンスが存在する。

【０２８８】

［００３０８］　更に、‘５３０公報において、ＳＯＣＳ１の発現又は機能の低下は、免疫エフェクター細胞のエフェクター機能を増強することにより免疫療法を改善することが示されている。‘５３０公報の実施例７、１４、１６、２３～３２は、ＴＩＬ及び他の細胞におけるＳＯＣＳ１調節の様々な実施形態を示す。

【０２８９】

［００３０９］　特定の実施形態によれば、ＴＩＬにおけるＳＯＣＳ１の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシング又は低減される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養するための方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａ又は図２０及び２１に示される方法）に従って実施

され得、ここで、方法は、ＳＯＣＳ１の発現をサイレンシング又は低減することによってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法又はジンクフィンガー法は、ＴＩＬにおけるＳＯＣＳ１の発現をサイレンシング又は低減するために使用され得る。

【０２９０】

１３．ＢＣＯＲ

［00310］ ＢＣＬ６コリプレッサー（ＢＣＯＲ）は、ＢＣＬ－６コリプレッサータンパク質をコードする遺伝子である。この遺伝子は、遺伝子ファミリーを含むアンキリンリピートドメインのメンバーである。このタンパク質は、胚中心形成に必要なＰＯＺ／ジンクフィンガー転写リプレッサーであり、アポトーシスに影響を与え得る。ＢＣＯＲは、後成的な調節因子であることが知られており、様々なヒトの癌で変異したものとして一層同定されている（Astolfi et al., Epigenomics, 2019, 11(7):835-855）。

【０２９１】

［00311］ 更に、‘５３０公報において、ＢＣＯＲの発現又は機能の低下は、免疫エフェクター細胞のエフェクター機能を増強することにより免疫療法を改善することが示されている。‘５３０公報の実施例１２及び１３は、ＴＩＬ及び他の細胞におけるＢＣＯＲ調節の様々な実施形態を示す。

【０２９２】

［00312］ 特定の実施形態によれば、ＴＩＬにおけるＢＣＯＲの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシング又は低減される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養するための方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａ又は図２０及び２１に示される方法）に従って実施され得、ここで、方法は、ＢＣＯＲの発現をサイレンシング又は抑制することによってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に説明されるように、遺伝子編集プロセスは、ＢＣＯＲなどの免疫チェックポイント遺伝子における二本鎖又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。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法又はジンクフィンガー法は、ＴＩＬにおけるＢＣＯＲの発現をサイレンシング又は抑制するために使用され得る。

【０２９３】

［00313］ 別の実施形態において、本発明は、ＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０２９４】

［00314］ 別の実施形態において、本発明は、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０２９５】

［00315］ 別の実施形態において、本発明は、ＰＤ－１及びＴＩＭ－３の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０２９６】

［00316］ 別の実施形態において、本発明は、ＰＤ－１及びＣｉｓｈの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０２９７】

［00317］ 別の実施形態において、本発明は、ＰＤ－１及びＴＧＦβの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０２９８】

［００３１８］　別の実施形態において、本発明は、ＰＤ－１及びＰＫＡの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０２９９】

［００３１９］　別の実施形態において、本発明は、ＰＤ－１及びＣＢＬＢの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３００】

［００３２０］　別の実施形態において、本発明は、ＰＤ－１及びＴＩＧＩＴの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３０１】

［００３２１］　別の実施形態において、本発明は、ＰＤ－１及びＴＯＸの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３０２】

［００３２２］　別の実施形態において、本発明は、ＰＤ－１及びＡＮＫＲＤ１１の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３０３】

［００３２３］　別の実施形態において、本発明は、ＰＤ－１及びＳＯＣＳ１の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３０４】

［００３２４］　別の実施形態において、本発明は、ＰＤ－１及びＢＣＯＲの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３０５】

［００３２５］　別の実施形態において、本発明は、ＣＴＬＡ－４及びＬＡＧ－３の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３０６】

［００３２６］　別の実施形態において、本発明は、ＣＴＬＡ－４及びＴＩＭ－３の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３０７】

［００３２７］　別の実施形態において、本発明は、ＣＴＬＡ－４及びＣｉｓｈの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３０８】

［００３２８］　別の実施形態において、本発明は、ＣＴＬＡ－４及びＴＧＦβの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３０９】

［００３２９］　別の実施形態において、本発明は、ＣＴＬＡ－４及びＰＫＡの発現をサイ

レンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３１０】

［００３３０］　別の実施形態において、本発明は、ＣＴＬＡ－４及びＣＢＬＢの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３１１】

［００３３１］　別の実施形態において、本発明は、ＣＴＬＡ－４及びＴＩＧＩＴの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３１２】

［００３３２］　別の実施形態において、本発明は、ＣＴＬＡ－４及びＴＯＸの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３１３】

［００３３３］　別の実施形態において、本発明は、ＣＴＬＡ－４及びＡＮＫＲＤ１１の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３１４】

［００３３４］　別の実施形態において、本発明は、ＣＴＬＡ－４及びＳＯＣＳ１の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３１５】

［００３３５］　別の実施形態において、本発明は、ＣＴＬＡ－４及びＢＣＯＲの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３１６】

［００３３６］　別の実施形態において、本発明は、ＬＡＧ－３及びＴＩＭ－３の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３１７】

［００３３７］　別の実施形態において、本発明は、ＬＡＧ－３及びＣｉｓｈの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３１８】

［００３３８］　別の実施形態において、本発明は、ＬＡＧ－３及びＴＧＦβの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３１９】

［００３３９］　別の実施形態において、本発明は、ＬＡＧ－３及びＰＫＡの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３２０】

［００３４０］　別の実施形態において、本発明は、ＬＡＧ－３及びＣＢＬＢの発現をサイ

レンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３２１】
［００３４１］別の実施形態において、本発明は、ＬＡＧ－３及びＴＩＧＩＴの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３２２】
［００３４２］別の実施形態において、本発明は、ＬＡＧ－３及びＴＯＸの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３２３】
［００３４３］別の実施形態において、本発明は、ＬＡＧ－３及びＡＮＫＲＤ１１の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３２４】
［００３４４］別の実施形態において、本発明は、ＬＡＧ－３及びＳＯＣＳ１の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３２５】
［００３４５］別の実施形態において、本発明は、ＬＡＧ－３及びＢＣＯＲの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３２６】
［００３４６］別の実施形態において、本発明は、ＴＩＭ－３及びＣｉｓｈの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３２７】
［００３４７］別の実施形態において、本発明は、ＴＩＭ－３及びＴＧＦβの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３２８】
［００３４８］別の実施形態において、本発明は、ＴＩＭ－３及びＰＫＡの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３２９】
［００３４９］別の実施形態において、本発明は、ＴＩＭ－３及びＣＢＬＢの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３３０】
［００３５０］別の実施形態において、本発明は、ＴＩＭ－３及びＴＩＧＩＴの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３３１】
［００３５１］別の実施形態において、本発明は、ＴＩＭ－３及びＴＯＸの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３３２】
［００３５２］別の実施形態において、本発明は、ＴＩＭ－３及びＡＮＫＲＤ１１の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３３３】
［００３５３］別の実施形態において、本発明は、ＴＩＭ－３及びＳＯＣＳ１の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３３４】
［００３５４］別の実施形態において、本発明は、ＴＩＭ－３及びＢＣＯＲの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３３５】
［００３５５］別の実施形態において、本発明は、Ｃｉｓｈ及びＴＧＦβの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３３６】
［００３５６］別の実施形態において、本発明は、Ｃｉｓｈ及びＰＫＡの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３３７】
［００３５７］別の実施形態において、本発明は、Ｃｉｓｈ及びＣＢＬＢの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３３８】
［００３５８］別の実施形態において、本発明は、Ｃｉｓｈ及びＴＩＧＩＴの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３３９】
［００３５９］別の実施形態において、本発明は、Ｃｉｓｈ及びＴＯＸの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３４０】
［００３６０］別の実施形態において、本発明は、Ｃｉｓｈ及びＡＮＫＲＤ１１の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３４１】
［００３６１］別の実施形態において、本発明は、Ｃｉｓｈ及びＳＯＣＳ１の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３４２】
［００３６２］別の実施形態において、本発明は、Ｃｉｓｈ及びＢＣＯＲの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３４３】
［００３６３］別の実施形態において、本発明は、ＴＧＦβ及びＰＫＡの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むよ

うに変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３４４】
［００３６４］別の実施形態において、本発明は、ＴＧＦβ及びＣＢＬＢの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３４５】
［００３６５］別の実施形態において、本発明は、ＴＧＦβ及びＴＩＧＩＴの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３４６】
［００３６６］別の実施形態において、本発明は、ＴＧＦβ及びＴＯＸの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３４７】
［００３６７］別の実施形態において、本発明は、ＴＧＦβ及びＡＮＫＲＤ１１の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３４８】
［００３６８］別の実施形態において、本発明は、ＴＧＦβ及びＳＯＣＳ１の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３４９】
［００３６９］別の実施形態において、本発明は、ＴＧＦβ及びＢＣＯＲの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３５０】
［００３７０］別の実施形態において、本発明は、ＰＫＡ及びＣＢＬＢの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３５１】
［００３７１］別の実施形態において、本発明は、ＰＫＡ及びＴＩＧＩＴの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３５２】
［００３７２］別の実施形態において、本発明は、ＰＫＡ及びＴＯＸの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３５３】
［００３７３］別の実施形態において、本発明は、ＰＫＡ及びＡＮＫＲＤ１１の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３５４】
［００３７４］別の実施形態において、本発明は、ＰＫＡ及びＳＯＣＳ１の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３５５】
［００３７５］別の実施形態において、本発明は、ＰＫＡ及びＢＣＯＲの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むよ

うに変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３５６】
［００３７６］別の実施形態において、本発明は、ＣＢＬＢ及びＴＩＧＩＴの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３５７】
［００３７７］別の実施形態において、本発明は、ＣＢＬＢ及びＴＯＸの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３５８】
［００３７８］別の実施形態において、本発明は、ＣＢＬＢ及びＡＮＫＲＤ１１の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３５９】
［００３７９］別の実施形態において、本発明は、ＣＢＬＢ及びＳＯＣＳ１の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３６０】
［００３８０］別の実施形態において、本発明は、ＣＢＬＢ及びＢＣＯＲの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３６１】
［００３８１］別の実施形態において、本発明は、ＴＩＧＩＴ及びＴＯＸの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３６２】
［００３８２］別の実施形態において、本発明は、ＴＩＧＩＴ及びＡＮＫＲＤ１１の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３６３】
［００３８３］別の実施形態において、本発明は、ＴＩＧＩＴ及びＳＯＣＳ１の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３６４】
［００３８４］別の実施形態において、本発明は、ＴＩＧＩＴ及びＢＣＯＲの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３６５】
［００３８５］別の実施形態において、本発明は、ＴＯＸ及びＡＮＫＲＤ１１の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３６６】
［００３８６］別の実施形態において、本発明は、ＴＯＸ及びＳＯＣＳ１の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０３６７】

［００３８７］　別の実施形態において、本発明は、ＴＯＸ及びＢＣＯＲの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３６８】

［００３８８］　別の実施形態において、本発明は、ＡＮＫＲＤ１１及びＳＯＣＳ１の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３６９】

［００３８９］　別の実施形態において、本発明は、ＡＮＫＲＤ１１及びＢＣＯＲの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３７０】

［００３９０］　別の実施形態において、本発明は、ＳＯＣＳ１及びＢＣＯＲの発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３７１】

［００３９１］　別の実施形態において、本発明は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＡＮＫＲＤ１１、ＳＯＣＳ１及びＢＣＯＲの１つ以上の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３７２】

［００３９２］　別の実施形態において、本発明は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＴＩＧＩＴ、ＴＯＸ、ＡＮＫＲＤ１１、ＳＯＣＳ１及びＢＣＯＲの１つ以上の発現をサイレンシング又は抑制することにより、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０３７３】

Ｄ．共刺激受容体又は接着分子の過剰発現

［００３９３］　追加の実施形態によると、ＴＩＬ拡大培養方法中のＴＩＬの遺伝子編集は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現が治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強されることを引き起こす。例えば、遺伝子編集により、刺激受容体の発現が増強され得、これは、遺伝子改変されていない刺激受容体の発現と比較して、それが過剰発現されることを意味する。本発明のＴＩＬを恒久的に遺伝子編集することにより発現の増強を示し得る免疫チェックポイント遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ　１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）及び／又はＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１などの特定のケモカイン受容体及びインターロイキンが含まれる。

【０３７４】

１．ＣＣＲ

［００３９４］養子Ｔ細胞免疫療法を有効にするには、Ｔ細胞をケモカインによって腫瘍に適切に輸送する必要がある。腫瘍細胞によって分泌されるケモカイン、末梢に存在するケモカイン及びＴ細胞によって発現されるケモカイン受容体間の一致は、Ｔ細胞の腫瘍床への輸送の成功に重要である。

【０３７５】

［００３９５］特定の実施形態によれば、本発明の遺伝子編集方法は、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３及びＣＸ３ＣＲ１の１つ以上などのＴＩＬにおける特定のケモカイン受容体の発現を増加させるために使用され得る。ＣＣＲの過剰発現は、養子移入後のエフェクター機能及びＴＩＬの増殖を促進するのに役立つ。

【０３７６】

［００３９６］特定の実施形態によれば、ＴＩＬにおけるＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３及びＣＸ３ＣＲ１の１つ以上の発現は、本発明の組成物及び方法に従って増強される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａ又は図２０及び２１に示される方法）に従って実施され得、ここで、方法は、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３及びＣＸ３ＣＲ１の１つ以上の発現を増強させることによってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に説明されるように、遺伝子編集プロセスは、ケモカイン受容体遺伝子における二本鎖又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。例えば、ＣＲＩＳＰＲ方法、ＴＡＬＥ方法又はジンクフィンガー方法は、ＴＩＬにおける特定のケモカイン受容体の発現を増強するために使用され得る。

【０３７７】

［００３９７］一実施形態において、ＣＣＲ４及び／又はＣＣＲ５接着分子は、本明細書に記載のガンマレトロウイルス又はレンチウイルス方法を使用してＴＩＬ集団に挿入される。一実施形態において、ＣＸＣＲ２接着分子は、Forget, et al., Frontiers Immunology 2017, 8, 908又はPeng, et al., Clin. Cancer Res. 2010, 16, 5458に記載のガンマレトロウイルス又はレンチウイルス方法を使用してＴＩＬ集団に挿入され、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０３７８】

［００３９８］一実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、

（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；

（ｃ）ＩＬ－２を含み、及び任意選択により４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で約２～５日間にわたって第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施すること；

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加して、第２のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約１～３日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；

（ｅ）第２のＴＩＬ集団に対して無菌エレクトロポレーションステップを実施することであって、無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移動を媒介する、実施すること；

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間にわたって静置すること；

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３抗体、任意選択によりＯＸ４０抗体及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第２の拡大培

養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１１日間にわたって実施され、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｈ）ステップ（ｇ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収して、回収されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行は、系を開放せずに発生し、回収されたＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、提供すること；
（ｉ）回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行は、系を開放せずに発生する、移すこと；及び
（ｊ）ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地を使用して、回収されたＴＩＬ集団を凍結保存すること
を含み、エレクトロポレーションステップは、ＰＤ－１及び任意選択によりＬＡＧ－３の発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含み、更に、ＣＸＣＲ２接着分子は、ガンマレトロウイルス又はレンチウイルス法により、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団又は回収されたＴＩＬ集団に挿入される。
【０３７９】
［００３９９］一実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、
（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；
（ｃ）ＩＬ－２を含み、及び任意選択により４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で約２～５日間にわたって第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施すること；
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加して、第２のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約１～３日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｅ）第２のＴＩＬ集団に対して無菌エレクトロポレーションステップを実施することであって、無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移動を媒介する、実施すること；
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間にわたって静置すること；
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３抗体、任意選択によりＯＸ４０抗体及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１１日間にわたって実施され、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｈ）ステップ（ｇ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収して、回収されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行は、系を開放せずに発生し、回収されたＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、提供すること；
（ｉ）回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行は、系を開放せずに発生する、移すこと；及び
（ｊ）ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地を使用して、回収されたＴＩＬ集団を凍結保存すること
を含み、エレクトロポレーションステップは、ＰＤ－１及び任意選択によりＬＡＧ－３の発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィ

ンガーシステムの送達を含み、更に、ＣＣＲ４及び／又はＣＣＲ５接着分子は、ガンマレトロウイルス又はレンチウイルス法により、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団又は回収されたＴＩＬ集団に挿入される。

【０３８０】

［００４００］ 一実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、

（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；

（ｃ）ＩＬ－２を含み、及び任意選択により４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で約２～５日間にわたって第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施すること；

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加して、第２のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約１～３日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；

（ｅ）第２のＴＩＬ集団に対して無菌エレクトロポレーションステップを実施することであって、無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移動を媒介する、実施すること；

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間にわたって静置すること；

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３抗体、任意選択によりＯＸ４０抗体及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１１日間にわたって実施され、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；

（ｈ）ステップ（ｇ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収して、回収されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｇ）への移行は、系を開放せずに発生し、回収されたＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、提供すること；

（ｉ）回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行は、系を開放せずに発生する、移すこと；及び

（ｊ）ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地を使用して、回収されたＴＩＬ集団を凍結保存すること

を含み、エレクトロポレーションステップは、ＰＤ－１及び任意選択によりＬＡＧ－３の発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含み、更に、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１及びそれらの組み合わせからなる群から選択される接着分子は、ガンマレトロウイルス又はレンチウイルス法により、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団又は回収されたＴＩＬ集団に挿入される。

【０３８１】

２．インターロイキン

［００４０１］ 追加の実施形態によれば、本発明の遺伝子編集方法は、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の１つ以上などの特定のインターロイキンの発現を増加させるために使用され得る。特定のインターロイキンは、Ｔ細胞のエフェクター機能を増強し、腫瘍制御を媒介することが示されている。

【０３８２】

［００４０２］ 特定の実施形態によれば、ＴＩＬにおけるＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の１つ以上の発現は、本発明の組成物及び方法

に従って増強される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａ又は図２０及び２１に示される方法）に従って実施され得、ここで、方法は、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の１つ以上の発現を増強させることによってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に説明されるように、遺伝子編集プロセスは、インターロイキン遺伝子における二本鎖又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。例えば、ＣＲＩＳＰＲ方法、ＴＡＬＥ方法又はジンクフィンガー方法は、ＴＩＬにおける特定のインターロイキンの発現を増強するために使用され得る。

【０３８３】

［００４０３］ 一実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、

（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；

（ｃ）ＩＬ－２を含み、及び任意選択により４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で約２～５日間にわたって第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施すること；

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加して、第２のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約１～３日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；

（ｅ）第２のＴＩＬ集団に対して無菌エレクトロポレーションステップを実施することであって、無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移動を媒介する、実施すること；

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間にわたって静置すること；

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３抗体、任意選択によりＯＸ４０抗体及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１１日間にわたって実施され、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；

（ｈ）ステップ（ｇ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収して、回収されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行は、系を開放せずに発生し、回収されたＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、提供すること；

（ｉ）回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行は、系を開放せずに発生する、移すこと；及び

（ｊ）ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地を使用して、回収されたＴＩＬ集団を凍結保存すること

を含み、エレクトロポレーションステップは、ＰＤ－１及び任意選択によりＬＡＧ－３の発現を阻害するために、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システム、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）システム又はジンクフィンガーシステムの送達を含み、更に、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、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インターロイキンは、ガンマレトロウイルス又はレンチウイルス法により、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団又は回収されたＴＩＬ集団に挿入される。

【０３８４】

Ｅ．遺伝子編集方法

［００４０４］ 上記のように、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改変されている腫瘍浸潤リンパ球（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並びにそれらの組み合わせの両方のための、ＴＩＬ集団へのヌクレオチド挿入（ＲＮＡ又はＤＮＡ）による遺伝子編集を包含する。本発明の実施形態は、ＴＩＬを治療用集団に拡大培養する方法も提供し、方法は、ＴＩＬを遺伝子編集することを含む。本発明に従う使用に適した、ＴＩＬ集団を遺伝子改変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する。

【０３８５】

[00405] 一部の実施形態において、ＴＩＬ集団を遺伝子改変する方法は、１つ以上のタンパク質の産生のための遺伝子の安定した組み込みのステップを含む。一実施形態において、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、レトロウイルス形質導入のステップを含む。一実施形態において、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、レンチウイルス形質導入のステップを含む。レンチウイルス形質導入システムは、当技術分野で公知であり、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号に記載され、そのそれぞれの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態において、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、ガンマレトロウイルス形質導入のステップを含む。ガンマレトロウイルス形質導入システムは、当技術分野で公知であり、例えばCepko and Pear, Cur. Prot. Mol. Biol. 1996, 9.9.1-9.9.16に記載され、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態において、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入のステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入システムは、当技術分野で公知であり、トランスポサーゼの長期発現がトランスジェニック細胞で発生しないように、トランスポサーゼがＤＮＡ発現ベクターとして又は発現可能なＲＮＡ若しくはタンパク質として提供されるシステム、例えばｍＲＮＡ（例えば、キャップとポリＡテールを含むｍＲＮＡ）として提供されるトランスポサーゼを含む。ＳＢ１０、ＳＢ１１、ＳＢ１００ｘなどのサケ科のＴｅｌ様トランスポサーゼ（ＳＢ又はSleeping Beautyトランスポサーゼ）を含む適切なトランスポゾン媒介遺伝子導入システム及び酵素活性が向上した人工酵素は、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、そのそれぞれの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０３８６】

[00406] 一実施形態において、ＴＩＬ集団を遺伝子改変する方法は、１つ以上のタンパク質の産生又は阻害（例えば、サイレンシング）のための遺伝子の安定した組み込みのステップを含む。一実施形態において、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、エレクトロポレーションのステップを含む。エレクトロポレーション法は、当技術分野で公知であり、例えばTsong, Biophys. J. 1991, 60, 297-306及び米国特許出願公開第２０１４／０２２７２３７　Ａ１号に記載され、そのそれぞれの開示は、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（これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載のものなど、他の当技術分野で公知のエレクトロポレーション法を使用し得る。一実施形態において、エレクトロポレーション法は、無菌エレクトロポレーション法である。一実施形態において、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。一実施形態において、エレクトロポレーション法は、パルス電場でＴＩＬを処置して、ＴＩＬの定義及び制御された恒久的又は一過性の変化を変更、操作又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、これは、１００Ｖ／ｃｍ以上の電場強度を有する、少なくとも３つの単一のオペレーター制御の独立してプログラムされた一連のＤＣ電気パルスをＴＩＬに適用するステップを含み、ここで、一

連の少なくとも３つのＤＣ電気パルスは、以下の特徴の１つ、２つ又は３つを有する；（１）少なくとも３つのパルスの少なくとも２つは、パルス振幅が互いに異なる；（２）少なくとも３つのパルスの少なくとも２つは、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２つの第１のセットの第１のパルス間隔は、少なくとも３つのパルスの２つの第２のセットの第２のパルス間隔と異なる。一実施形態において、エレクトロポレーション法は、パルス電場でＴＩＬを処置して、ＴＩＬの定義及び制御された恒久的又は一過性の変化を変更、操作又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、これは、１００Ｖ／ｃｍ以上の電場強度を有する、少なくとも３つの単一のオペレーター制御の独立してプログラムされた一連のＤＣ電気パルスをＴＩＬに適用するステップを含み、ここで、少なくとも３つのパルスの少なくとも２つは、パルス振幅が互いに異なる。一実施形態において、エレクトロポレーション法は、パルス電場でＴＩＬを処置して、ＴＩＬの定義及び制御された恒久的又は一過性の変化を変更、操作又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、これは、１００Ｖ／ｃｍ以上の電場強度を有する、少なくとも３つの単一のオペレーター制御の独立してプログラムされた一連のＤＣ電気パルスをＴＩＬに適用するステップを含み、ここで、少なくとも３つのパルスの少なくとも２つは、パルス幅が互いに異なる。一実施形態において、エレクトロポレーション法は、パルス電場でＴＩＬを処置して、ＴＩＬの定義及び制御された恒久的又は一過性の変化を変更、操作又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、これは、１００Ｖ／ｃｍ以上の電場強度を有する、少なくとも３つの単一のオペレーター制御の独立してプログラムされた一連のＤＣ電気パルスをＴＩＬに適用するステップを含み、ここで、少なくとも３つのパルスの２つの第１のセットの第１のパルス間隔は、少なくとも３つのパルスの２つの第２のセットの第２のパルス間隔と異なる。一実施形態において、エレクトロポレーション法は、パルス電場でＴＩＬを処置して、ＴＩＬにおける孔形成を誘導するステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、これは、１００Ｖ／ｃｍ以上の電場強度を有する、少なくとも３つの一連のＤＣ電気パルスをＴＩＬに適用するステップを含み、ここで、一連の少なくとも３つのＤＣ電気パルスは、誘導された細孔が比較的長期間持続するように及びＴＩＬの生存率が維持されるように、以下の特徴の１つ、２つ又は３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスの少なくとも２つは、パルス振幅が互いに異なる；（２）少なくとも３つのパルスの少なくとも２つは、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２つの第１のセットの第１のパルス間隔は、少なくとも３つのパルスの２つの第２のセットの第２のパルス間隔と異なる。一実施形態において、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションのステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法（リン酸カルシウムＤＮＡ沈殿、細胞表面コーティング及びエンドサイトーシス）は、当技術分野で公知であり、Graham and van der Eb, Virology 1973, 52, 456-467；Wigler, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1979, 76, 1373-1376；及びChen and Okayarea, Mol. Cell. Biol. 1987, 7, 2745-2752；並びに米国特許第５，５９３，８７５号に記載され、そのそれぞれの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態において、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、リポソームトランスフェクションのステップを含む。濾過水中のカチオン性脂質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ライド（ＤＯＴＭＡ）及びジオレオイルホスフォチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム製剤を使用する方法などのリポソームトランスフェクション法は、当技術分野で公知であり、Rose, et al., Biotechniques 1991, 10, 520-525及びFelgner, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 7413-7417並びに米国特許第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、そのそれぞれの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態において、ＴＩＬ集団を遺伝子改変する方法は、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７，１８

９，７０５号（そのそれぞれの開示は、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たトランスフェクションのステップを含む。

【０３８７】

［００４０７］　一実施形態によると、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における二本鎖又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。そのような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り、正確なゲノム編集を可能にし、即ち、それらは、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ターゲティングし、標的配列での二本鎖切断の生成を媒介する。ＤＮＡにおける二本鎖切断により、その後、内因性修復機構が切断部位に動員されて、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）又は相同性指向修復（ＨＤＲ）によるゲノム編集が媒介される。従って、切断の修復は、標的遺伝子産物を破壊する（例えば、サイレンシング、抑制又は増強する）挿入／欠失変異の導入をもたらし得る。

【０３８８】

［００４０８］　部位特異的な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つのカテゴリに分類できる。ＺＦＮ及びＴＡＬＥＮは、タンパク質－ＤＮＡ相互作用を介して特定のＤＮＡ結合を実現する一方、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鎖ＲＮＡガイド分子及びタンパク質－ＤＮＡ相互作用によって特定のＤＮＡ配列を標的化する。例えば、Cox et al., Nature Medicine, 2015, Vol. 21, No. 2を参照されたい。

【０３８９】

［００４０９］　本発明のＴＩＬ拡大培養方法に従って使用され得る遺伝子編集方法の非限定的な例には、ＣＲＩＳＰＲ方法、ＴＡＬＥ方法及びＺＦＮ方法が含まれ、その実施例は、以下により詳細に記載される。一実施形態によると、ＴＩＬを治療用集団に拡大培養する方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って又はＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１７／０５８６１０号、ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０１２６０５号若しくはＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０１２６３３号に記載されているように実施され得、ここで、方法は、強化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方法、ＴＡＬＥ方法又はＺＦＮ方法の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。一実施形態によると、遺伝子編集されたＴＩＬは、それらを、インビトロで改変されていないＴＩＬと比較することにより、例えばインビトロエフェクター機能、サイトカインプロファイルなどを未改変のＴＩＬと比較して評価することにより、改善された治療効果について評価され得る。

【０３９０】

［００４１０］　本発明の一部の実施形態において、エレクトロポレーションは、ＣＲＩＳＰＲ、ＴＡＬＥＮ及びＺＦＮシステムなどの遺伝子編集システムの送達に使用される。本発明の一部の実施形態において、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。本発明の一部の実施形態での使用に適した適切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。BTX-Harvard Apparatusから入手できるAgilePulseシステム又はECM 830、Cellaxess Elektra（Cellectricon）、Nucleofector（Lonza／Amaxa）、GenePulser MXcell（BIORAD）、iPorator-96（Primax）又はsiPORTer96（Ambion）など、本発明での使用に適する可能性のあるいくつかの代替の市販のエレクトロポレーション機器が存在する。本発明の一部の実施形態において、エレクトロポレーションシステムは、残りのＴＩＬ拡大培養方法により、閉鎖無菌システムを形成する。本発明の一部の実施形態において、エレクトロポレーションシステムは、本明細書に記載されるようなパルスエレク

トロポレーションシステムであり、残りのＴＩＬ拡大培養方法により閉鎖無菌システムを形成する。

【０３９１】

１．ＣＲＩＳＰＲ方法

［００４１１］　ＴＩＬを治療用集団に拡大培養する方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って又はＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１７／０５８６１０号、ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０１２６０５号若しくはＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０１２６３３号に記載されているように実施され得、ここで、方法は、ＣＲＩＳＰＲ方法（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９又は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ると、ＴＩＬ拡大培養プロセス中のＣＲＩＳＰＲ方法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現の、治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部におけるサイレンシング又は低下を引き起こす。代わりに、ＴＩＬ拡大培養プロセス中のＣＲＩＳＰＲ方法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現の、治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部における増強を引き起こす。

【０３９２】

［００４１２］　ＣＲＩＳＰＲは、「クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート」を表す。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方法とも称される。ＣＲＩＳＰＲシステムは、クラス１及びクラス２の２つの主要なクラスに分類でき、これらは、異なるタイプ及びサブタイプに更に分類される。ＣＲＩＳＰＲシステムの分類は、特定の核酸を切断できるエフェクターＣａｓタンパク質に基づいている。クラス１　ＣＲＩＳＰＲシステムでは、エフェクターモジュールは、マルチタンパク質複合体からなるが、クラス２システムは、１つのエフェクタータンパク質のみを使用する。クラス１　ＣＲＩＳＰＲにはタイプＩ、ＩＩＩ及びＩＶが含まれ、クラス２　ＣＲＩＳＰＲにはタイプＩＩ、Ｖ及びＶＩが含まれる。これらのタイプのＣＲＩＳＰＲシステムのいずれかが本発明に従って使用され得るが、本発明による使用に好ましいＲＮＡ及びＣａｓタンパク質を組み込んだ３タイプのＣＲＩＳＰＲシステム：タイプＩ（Ｃａｓ３により例示される）、ＩＩ（Ｃａｓ９により例示される）及びＩＩＩ（Ｃａｓ１０により例示される）が存在する。タイプＩＩ　ＣＲＩＳＰＲは、最もよく特徴付けられたシステムの１つである。

【０３９３】

［００４１３］　ＣＲＩＳＰＲ技術は、細菌及び古細菌（単細胞微生物のドメイン）の天然の防御機構から適応された。これらの生物は、ＣＲＩＳＰＲ由来ＲＮＡ及びＣａｓ９を含む様々なＣａｓタンパク質を使用して、外来の侵入者のＤＮＡを切り刻んで破壊することにより、ウイルス及び他の異物による攻撃を阻止する。ＣＲＩＳＰＲは、ヌクレオチド反復及びスペーサーの存在という２つの別個の特徴を有するＤＮＡの特殊な領域である。ヌクレオチドの反復配列は、反復配列間に散在した外来ＤＮＡ（スペーサー）の短いセグメントを伴い、ＣＲＩＳＰＲ領域全体に分布する。タイプＩＩ　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムでは、スペーサーがＣＲＩＳＰＲゲノム遺伝子座内に組み込まれ、転写され、短鎖ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）に処理される。これらのｃｒＲＮＡは、トランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）にアニーリングし、Ｃａｓタンパク質による病原性ＤＮＡの配列特異的な切断及びサイレンシングを指示する。Ｃａｓ９タンパク質による標的認識には、ｃｒＲＮＡ内の「シード」配列及びｃｒＲＮＡ結合領域の上流の保存されたジヌクレオチド含有プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列を要する。これにより、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、ｃｒＲＮＡを再設計することにより、実質的にあらゆるＤＮＡ配列を切断するために再標的化され得る。従って、特定の実施形態によれば、Ｃａｓ９は、ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡ認識時にＤＮＡを切断するＲＮＡ誘導ＤＮＡエンドヌクレアーゼとして機能する。天然系におけるｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、遺伝子工学での使用のために、およそ１００ヌクレオチドの単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）に単純化できる。ｓｇＲＮＡは、Ｃａｓ結合に必要な足場配列と、修飾するゲノム標

的を定義するユーザー定義のおよそ１７～２０ヌクレオチドのスペーサーとを含む合成ＲＮＡである。従って、ユーザーは、ｓｇＲＮＡに存在する標的配列を変更することにより、Ｃａｓタンパク質のゲノム標的を変更することができる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼとｒＮＡ成分（例えば、ｓｇＲＮＡ）とを発現するプラスミドの共送達により、ヒト細胞へ直接移植できる。ターゲティングの制限を減少させるために、Ｃａｓタンパク質の異なるバリアントを使用し得る（例えば、Ｃｐｆ１などのＣａｓ９のオルソログ）。

【０３９４】

［００４１４］ 一実施形態によれば、操作され、プログラム可能であり、天然に存在しないタイプＩＩ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、Ｃａｓ９タンパク質と、ＴＩＬのＤＮＡ分子の標的配列を標的としハイブリダイズする少なくとも１つのガイドＲＮＡとを含む。ここで、ＤＮＡ分子は、少なくとも１つの免疫チェックポイント分子をコードし、ＴＩＬは、それを発現し、Ｃａｓ９タンパク質は、ＤＮＡ分子を切断し、これにより少なくとも１つの免疫チェックポイント分子の発現が変化する。ここで、Ｃａｓ９タンパク質及びガイドＲＮＡは、自然には一緒に発生しない。一実施形態によれば、２つ以上の免疫チェックポイント分子の発現が変更される。一実施形態によれば、ガイドＲＮＡは、ｔｒａｃｒ配列に融合されたガイド配列を含む。例えば、ガイドＲＮＡは、ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡ又はｓｇＲＮＡを含み得る。本発明の態様によれば、「ガイドＲＮＡ」、「単一ガイドＲＮＡ」及び「合成ガイドＲＮＡ」という用語は、互換的に使用され得、ガイド配列を含むポリヌクレオチド配列を指し、これは、標的部位を特定するガイドＲＮＡ内のおよそ１７～２０ｂｐの配列である。

【０３９５】

［００４１５］ Ｃａｓ９と比較して改善されたオンターゲットの特異性を有するＣａｓ９の変異体も本発明の実施形態に従って使用され得る。このような変異体は、高忠実度Ｃａｓ－９と称され得る。一実施形態によれば、デュアルニッカーゼアプローチを利用することができ、ここで、逆のＤＮＡ鎖を標的とする２つのニッカーゼは、標的ＤＮＡ内にＤＳＢを生成する（多くの場合にダブルニック又はデュアルニッカーゼＣＲＩＳＰＲシステムと称される）。例えば、このアプローチは、２つのＣａｓ９ヌクレアーゼドメインの１つの変異を含み、Ｃａｓ９をヌクレアーゼからニッカーゼに変え得る。高忠実度Ｃａｓ９の非限定的な例には、ｅＳｐＣａｓ９、ＳｐＣａｓ９－ＨＦ１及びＨｙｐａＣａｓ９が含まれる。このような変異体は、非標的ＤＮＡ部位での望まれない変化を低減又は排除し得る。例えば、Slaymaker IM, et al. Science. 2015 Dec 1、Kleinstiver BP, et al. Nature. 2016 Jan 6及びRan et al., Nat Protoc. 2013 Nov; 8(11):2281-2308を参照されたい。これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０３９６】

［００４１６］ 更に、特定の実施形態によれば、細胞へのＣａｓ９の遺伝子送達を改善し、オンターゲットの特異性を改善する、Ｃａｓ９足場（参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２０１６／０１０２３２４号に開示されるものなど）が使用され得る。例えば、Ｃａｓ９足場は、（Ｄ－［Ｉ／Ｌ］－Ｇ－Ｘ－Ｘ－Ｓ－Ｘ－Ｇ－Ｗ－Ａ）によって定義されるＲｕｖＣモチーフ及び／又は（Ｙ－Ｘ－Ｘ－Ｄ－Ｈ－Ｘ－Ｘ－Ｐ－Ｘ－Ｓ－Ｘ－Ｘ－Ｘ－Ｄ－Ｘ－Ｓ）によって定義されるＨＮＨモチーフを含み得、ここで、Ｘは、２０個の天然アミノ酸のいずれか１つを表し、［Ｉ／Ｌ］は、イソロイシン又はロイシンを表す。ＨＮＨドメインは、標的ｄｓＤＮＡの一方の鎖へのニッキングの原因であり、ＲｕｖＣドメインは、ｄｓＤＮＡの他方の鎖の切断に関与する。従って、これらのドメインのそれぞれは、ＰＡＭの直近にあるプロトスペーサー内の標的ＤＮＡの鎖にニックを入れ、ＤＮＡの鈍い切断をもたらす。これらのモチーフを互いに組み合わせて、よりコンパクトな及び／又はより特異的なＣａｓ９足場を作製し得る。更に、モチーフを使用して、２つの別個のＲｕｖＣ及びＨＮＨドメインに分割される分割Ｃａｓ９タンパク質（即ちＲｕｖＣドメイン又はＨＮＨドメインのいずれかを含むＣａｓ９タンパク質又はＣａｓ９変異体の還元型又は短縮型）が作製され得、これは、標的ＤＮＡを一緒に又は別々に処理

することができる。

【０３９７】

［００４１７］特定の実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ方法は、免疫チェックポイント遺伝子の標的ＤＮＡ配列に特異的なおよそ１７～２０ヌクレオチドの配列を含有するＣａｓ９ヌクレアーゼ及びガイドＲＮＡ（例えば、ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡ又はｓｇＲＮＡ）を導入することにより、ＴＩＬにおける１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシング又は低減することを含む。ガイドＲＮＡは、ＲＮＡとして又はプロモーター下のガイドＲＮＡコード配列でプラスミドを形質転換することによって送達され得る。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ酵素は、ｓｇＲＮＡで定義された標的配列に基づき、特定の位置に二本鎖切断（ＤＳＢ）を導入する。ＤＳＢは、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）によって細胞内で修復され得、これは、ＤＮＡにおける挿入又は欠失（インデル）を多くの場合に引き起こすメカニズムである。インデルはフレームシフトを多くの場合に引き起こし、例えば標的遺伝子のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）内に未成熟終止コドンを引き起こすことにより、機能喪失型アレルを生成する。特定の実施形態によれば、結果は、標的の免疫チェックポイント遺伝子内の機能喪失変異である。

【０３９８】

［００４１８］代わりに、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ酵素によって誘導されたＤＳＢは、ＮＨＥＪの代わりに相同性指向修復（ＨＤＲ）によって修復され得る。ＮＨＥＪに媒介されるＤＳＢ修復は、遺伝子のオープンリーディングフレームを多くの場合に破壊するが、相同性指向修復（ＨＤＲ）を使用して、単一ヌクレオチド変化から大きい挿入までの範囲の特定のヌクレオチド変化を生成できる。一実施形態によれば、ＨＤＲは、所望の配列を含有するＤＮＡ修復テンプレートを、ｓｇＲＮＡ及びＣａｓ９又はＣａｓ９ニッカーゼと共にＴＩＬに送達することにより、免疫チェックポイント遺伝子を編集するために使用される。修復テンプレートは、好ましくは、所望の編集並びに標的遺伝子の直接上流及び下流の追加の相同配列（多くの場合に左及び右相同性アームと称される）を含有する。

【０３９９】

［００４１９］特定の実施形態によれば、酵素的に不活性なバージョンのＣａｓ９（死Ｃａｓ９又はｄＣａｓ９）は、開始を遮断することによって転写を抑制するために、転写開始部位を標的とし得る。従って、標的の免疫チェックポイント遺伝子は、ＤＳＢを使用せずに抑制され得る。ｄＣａｓ９分子は、ｓｇＲＮＡ標的配列に基づいて標的ＤＮＡに結合する能力を保持する。本発明の一実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ方法は、標的遺伝子の転写を阻害又は防止することにより、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシング又は低減することを含む。例えば、ＣＲＩＳＰＲ方法は、クルッペル関連ボックス（ＫＲＡＢ）ドメインなどの転写抑制ドメインを酵素的に不活性なバージョンのＣａｓ９に融合し、それにより、例えば、免疫チェックポイント遺伝子の転写開始部位を標的とするｄＣａｓ９－ＫＲＡＢを形成し、遺伝子の転写の阻害又は防止をもたらすことを含み得る。好ましくは、抑制ドメインは、転写開始部位から下流、例えば、約５００ｂｐ下流のウィンドウを標的とする。ＣＲＩＳＰＲ干渉（ＣＲＩＳＰＲｉ）と称され得るこのアプローチは、標的ＲＮＡの転写還元を介して頑健な遺伝子ノックダウンをもたらす。

【０４００】

［００４２０］特定の実施形態によれば、酵素的に不活性なバージョンのＣａｓ９（死Ｃａｓ９又はｄＣａｓ９）は、転写を活性化するために、転写開始部位を標的とし得る。このアプローチは、ＣＲＩＳＰＲ活性化（ＣＲＩＳＰＲａ）と称され得る。一実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ方法は、標的遺伝子の転写を活性化することにより、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を増加させることを含む。そのような実施形態によれば、標的の免疫チェックポイント遺伝子は、ＤＳＢを使用せずに活性化され得る。ＣＲＩＳＰＲ方法は、転写活性化ドメインを転写開始部位に標的化することを含み得る。例えば、ＶＰ６４などの転写活性化因子をｄＣａｓ９に融合させることにより、例えば、免疫チェックポイント遺伝子の転写開始部位を標的とするｄＣａｓ９－ＶＰ６４を形成し、遺伝子の転写の活性化をもたらす。好ましくは、活性化ドメインは、転写開始部位から上流、例え

ば、約５０～４００ｂｐ下流のウィンドウを標的とする。
【０４０１】
［００４２１］本発明の追加の実施形態は、哺乳動物細胞における標的遺伝子の強力な活性化のために開発された活性化戦略を利用し得る。非限定的な例には、ｄＣａｓ９が複数の異なる活性化ドメインに直列に融合された（ｄＣａｓ９－ＶＰＲなど）、エピトープタグ付きｄＣａｓ９と抗体－活性化因子エフェクタータンパク質（例えば、ＳｕｎＴａｇシステム）の共発現又は改変された足場ｇＲＮＡ及び追加のＲＮＡ結合ヘルパー活性化因子（例えば、ＳＡＭ活性化因子）とのｄＣａｓ９－ＶＰ６４の共発現が含まれる。
【０４０２】
［００４２２］他の実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ補助理論的タンパク質工学（ＣＡＲＰＥ）と称されるＣＲＩＳＰＲ媒介ゲノム編集方法は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第９，９８２，２７８号に開示されるように、本発明の実施形態に従って使用され得る。ＣＡＲＰＥには、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）又は二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）編集カセットから導かれた変異を直接的にゲノムに組み込む「ドナー」及び「デスティネーション」ライブラリーの生成が含まれる。ドナーライブラリーの構築には、理論的に設計された編集オリゴヌクレオチドを、標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズするガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を用いて細胞に同時形質転換することが含まれる。編集オリゴヌクレオチドは、ＰＡＭの欠失又は変異を隣接遺伝子における１つ以上の所望のコドンの変異と結び付けるように設計されている。これにより、ドナーライブラリー全体を１回の変換で生成することができる。ドナーライブラリーは、編集オリゴヌクレオチドからの合成的特徴、即ち遺伝子の３’末端に同時に組み込まれる第２のＰＡＭ欠失又は変異を使用する、ＰＣＲ反応などによる組換え染色体の増幅によって検索される。これは、ＰＡＭ欠失に指向するコドン標的変異を共有結合させる。次に、ドナーライブラリーをデスティネーションｇＲＮＡベクターと共に細胞に同時形質転換して、理論的に設計されたタンパク質ライブラリーを発現する細胞集団を作製する。
【０４０３】
［００４２３］他の実施形態によれば、追跡可能ＣＲＩＳＰＲ濃縮リコンビニアリング（ＧＥｎ－ＴｒａＣＥＲ）によるゲノムエンジニアリングと称されるＣＲＩＳＰＲを介したシステムを使用した追跡可能な精密ゲノム編集の方法は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第９，９８２，２７８号に開示されるように、本発明の実施形態に従って使用され得る。ＧＥｎ－ＴｒａＣＥＲの方法及びベクターは、編集カセットと単一ベクター上のｇＲＮＡをコードする遺伝子を組み合わせる。カセットは、所望の変異及びＰＡＭ変異を含有する。Ｃａｓ９もコードし得るベクターは、細胞又は細胞集団に導入される。これにより、細胞又は細胞集団でＣＲＩＳＰＲシステムの発現が活性化され、ｇＲＮＡがＣａｓ９を標的領域に動員し、そこでｄｓＤＮＡ切断が発生し、ＰＡＭ変異の統合が可能になる。
【０４０４】
［００４２４］ＣＲＩＳＰＲ方法を介してＴＩＬを恒久的に遺伝子編集することによりサイレンシング又は阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＡＮＫＲＤ１１、ＳＯＣＳ１及びＢＣＯＲが含まれる。
【０４０５】
［００４２５］ＣＲＩＳＰＲ方法を介してＴＩＬを恒久的に遺伝子編集することにより強

化され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ　１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）及び／又はＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１が含まれる。

【０４０６】

［００４２６］　ＣＲＩＳＰＲ方法により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、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第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号に記載される。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１を発現するためのプラスミドなど、ＣＲＩＳＰＲ方法を実行するための資源は、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔなどの企業から市販されている。

【０４０７】

［００４２７］　一実施形態において、本明細書に記載されているようなＴＩＬ集団の遺伝子改変は、その開示が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第９，７９０，４９０号に記載されているＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１システムを使用して実施され得る。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１システムは、Ｃｐｆ１関連ＣＲＩＳＰＲアレイが追加のｔｒａｃｒＲＮＡを必要とせずに成熟ｃｒＲＮＡに処理されるという点で、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９システムとは機能的に異なる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１システムで使用されるｃｒＲＮＡは、スペーサー又はガイド配列及び直接反復配列を有する。この方法を使用して形成されたＣｐｆ１ｐ－ｃｒＲＮＡ複合体は、それ自体で標的ＤＮＡを切断するのに十分である。

【０４０８】

［００４２８］　一実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、

（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；

（ｃ）ＩＬ－２を含み、及び任意選択により４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で約２～５日間にわたって第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施すること；

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加して、第２のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約１～３日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；

（ｅ）第２のＴＩＬ集団に対して無菌エレクトロポレーションステップを実施することであって、無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移動を媒介する、実施すること；

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間にわたって静置すること；

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３抗体、任意選択によりＯＸ４０抗体及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１１日間にわたって実施され、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；

（ｈ）ステップ（ｇ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収して、回収されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行は、系を開放せずに発生し、回収されたＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、提供すること；

（ｉ）回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行は、系を開放せずに発生する、移すこと；及び
（ｊ）ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地を使用して、回収されたＴＩＬ集団を凍結保存すること
を含み、エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つのタンパク質の発現を調節するための、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）／Ｃａｓ９又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１システムの送達を含む。
【０４０９】
［００４２９］ 一実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、
（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；
（ｃ）ＩＬ－２を含み、及び任意選択により４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で約２～５日間にわたって第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施すること；
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加して、第２のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約１～３日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｅ）第２のＴＩＬ集団に対して無菌エレクトロポレーションステップを実施することであって、無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移動を媒介する、実施すること；
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間にわたって静置すること；
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３抗体、任意選択によりＯＸ４０抗体及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１１日間にわたって実施され、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｈ）ステップ（ｇ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収して、回収されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行は、系を開放せずに発生し、回収されたＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、提供すること；
（ｉ）回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行は、系を開放せずに発生する、提供すること；及び
（ｊ）ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地を使用して、回収されたＴＩＬ集団を凍結保存すること
を含み、エレクトロポレーションステップは、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現を阻害するための、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）／Ｃａｓ９又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１システムの送達を含む。
【０４１０】
２．ＴＡＬＥ方法
［００４３０］ ＴＩＬを治療用集団に拡大培養する方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って又はＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１７／０５８６１０号、ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０１２６０５号若しくはＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０１２６３３号に記載されているように実施され得、ここで、方法は、ＴＡＬＥ方法によってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを更に含む。特定の実施形態によると、ＴＩＬ拡大培養プロセス中のＴＡＬＥ方法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現の、治療用ＴＩＬ集団の少なくとも

一部におけるサイレンシング又は低下を引き起こす。代わりに、ＴＩＬ拡大培養プロセス中のＴＡＬＥ方法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現の、治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部における増強を引き起こす。

【０４１１】

［００４３１］　ＴＡＬＥは、ＴＡＬＥＮ（「転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ」）を含む、「転写活性化因子様エフェクター」タンパク質を表す。遺伝子編集のためにＴＡＬＥシステムを使用する方法は、本明細書ではＴＡＬＥ方法とも称され得る。ＴＡＬＥは、植物病原菌キサントモナス属からの天然に存在するタンパク質であり、それぞれが単一の塩基対を認識する一連の３３～３５アミノ酸の反復ドメインで構成されるＤＮＡ結合ドメインを含有する。ＴＡＬＥの特異性は、反復可変二残基（ＲＶＤ）として知られる２つの超可変アミノ酸によって決定される。モジュラーＴＡＬＥリピートは、隣接するＤＮＡ配列を認識するために一緒に結合される。ＤＮＡ結合ドメインにおける特定のＲＶＤは、標的遺伝子座の塩基を認識し、予測可能なＤＮＡ結合ドメインを組み立てるための構造的特徴を提供する。ＴＡＬＥのＤＮＡ結合ドメインは、タイプＩＩＳ　ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼの触媒ドメインに融合され、ターゲティング可能なＴＡＬＥヌクレアーゼが作製される。部位特異的変異を誘発するために、１４～２０塩基対のスペーサー領域で分離された２つの個々のＴＡＬＥＮアームがＦｏｋＩモノマーを近接させて、二量体化し、標的化された二本鎖切断を生成する。

【０４１２】

［００４３２］　様々な組み立て方法を利用したいくつかの大規模で体系的な研究は、ＴＡＬＥ反復を組み合わせて、実質的に任意のユーザー定義の配列を認識できることを示唆している。カスタムＴＡＬＥアレイの迅速な組み立てを可能にする戦略には、ゴールデンゲート分子クローニング、ハイスループット固相アセンブリ及びライゲーション非依存的クローニング技術が含まれる。カスタム設計のＴＡＬＥアレイは、Cellectis Bioresearch（Paris, France）、Transposagen Biopharmaceuticals（Lexington, KY, USA）及びLife Technologies（Grand Island, NY, USA）からも市販されている。更に、所望の標的のカスタムＴＡＬエフェクターリピートアレイの設計を可能にし、予測されるＴＡＬエフェクター結合部位も提供する、TAL Effector-Nucleotide Target 2.0などのウェブベースのツールが利用可能である。Doyle, et al., Nucleic Acids Research, 2012, Vol. 40, W117-W122を参照されたい。本発明における使用に適したＴＡＬＥ及びＴＡＬＥＮ法の例は、米国特許出願公開第２０１１／０２０１１１８　Ａ１号；同第２０１３／０１１７８６９　Ａ１号；同第２０１３／０３１５８８４　Ａ１号；同第２０１５／０２０３８７１　Ａ１号及び同第２０１６／０１２０９０６　Ａ１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。

【０４１３】

［００４３３］　本発明の一実施形態によれば、ＴＡＬＥ方法は、標的遺伝子の転写を阻害又は防止することにより、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシング又は低減することを含む。例えば、ＴＡＬＥ方法は、ＫＲＡＢ－ＴＡＬＥを利用することを含み得、この方法は、転写クルッペル関連ボックス（ＫＲＡＢ）ドメインを、遺伝子の転写開始部位を標的とするＤＮＡ結合ドメインに融合し、遺伝子の転写の阻害又は防止をもたらすことを含む。

【０４１４】

［００４３４］　別の実施形態によれば、ＴＡＬＥ方法は、標的遺伝子に変異を導入することにより、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシング又は低減することを含む。例えば、ＴＡＬＥ方法は、ＦｏｋｌなどのヌクレアーゼエフェクタードメインをＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメインに融合させて、ＴＡＬＥＮをもたらすことを含み得る。Ｆｏｋｌは二量体として活性であり、従って、この方法は、ＴＡＬＥＮの対を構築してＦＯＫＬヌクレアーゼドメインを隣接するゲノム標的部位に配置することを含み、そこでそれらはＤＮＡ二本鎖切断を導入する。Ｆｏｋｌの正しい配置及び二量体化後、二本鎖切断が完了し得る。二本鎖切断が導入されると、ＤＮＡ修復は２つの異なるメカニズム：高

忠実度の相同組換え対（ＨＲＲ）（相同性指向修復又はＨＤＲとしても知られている）又はエラーが発生しやすい非相同末端結合（ＮＨＥＪ）を介して達成できる。ＮＨＥＪを介した二本鎖切断の修復は、好ましくはＤＮＡ標的部位の欠失、挿入又は置換をもたらす。即ち、ＮＨＥＪは、典型的には、切断部位での小さい挿入及び欠失の導入をもたらし、遺伝子機能をノックアウトするフレームシフトを多くの場合に誘発する。特定の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮ対は、遺伝子の５’エクソンの大半を標的とし、初期フレームシフト変異又は未成熟終止コドンを促進する。ＴＡＬＥＮによって導入された遺伝子変異は、好ましくは恒久的である。従って、一実施形態によれば、この方法は、二量体化したＴＡＬＥＮを利用して、エラーが発生しやすいＮＨＥＪを介して修復される部位特異的な二本鎖切断を誘導し、標的免疫チェックポイント遺伝子に１つ以上の変異をもたらすことにより、免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシング又は低減することを含む。

【０４１５】

［００４３５］追加の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮは、非ランダム点変異、標的化された欠失又はＤＮＡ断片の付加など、ＨＲＲを介した遺伝子変化を導入するために利用される。ＤＮＡ二本鎖切断の導入により、適切なドナーＤＮＡの存在下での相同組換えによる遺伝子編集が可能になる。一実施形態によれば、この方法は、部位特異的二本鎖切断を誘導し、１つ以上の導入遺伝子をＤＮＡに組み込むために、二量体化ＴＡＬＥＮ及び遺伝子座特異的相同性アームを有するドナープラスミドを同時送達することを含む。

【０４１６】

［００４３６］別の実施形態によれば、米国特許出願公開第２０１１／０２０１１１８号で開示されているように、ＦｏｋＩ及びＡｖｒＸａ７に由来するハイブリッドタンパク質であるＴＡＬＥＮは、本発明の実施形態に従って使用され得る。このＴＡＬＥＮは、ＡｖｒＸａ７の標的ヌクレオチドに対する認識特異性とＦｏｋＩの二本鎖ＤＮＡ切断活性を保持する。同じ方法を使用して、異なる認識特異性を有する他のＴＡＬＥＮを調製することができる。例えば、コンパクトなＴＡＬＥＮは、ＤＮＡ結合特異性を変更し、特定の単一のｄｓＤＮＡ標的配列を標的とするために、異なるセットのＲＶＤを有するコアＴＡＬＥ足場を操作することによって生成され得る。米国特許出願公開第２０１３／０１１７８６９号を参照されたい。選択した触媒ドメインを足場に取り付けてＤＮＡ処理をもたらすことができ、これは、コアＴＡＬＥ足場に融合したときに触媒ドメインが単一のｄｓＤＮＡ標的配列の近くで確実にＤＮＡを処理できるように設計され得る。ペプチドリンカーは、触媒ドメインを足場に融合させて、特定の単一のｄｓＤＮＡ配列を標的とするために二量体化を必要としない単一のポリペプチド鎖から作製されるコンパクトなＴＡＬＥＮを作製するようにも操作され得る。コアＴＡＬＥ足場は、この触媒ドメインが別のＴＡＬモノマーに融合した別の触媒ドメインと相互作用し、それにより、標的配列の近傍でＤＮＡを処理する可能性が高い触媒実体を作製し得る可能性を考慮して、ＴＡＬモノマーであり得る触媒ドメインをそのＮ末端に融合することによって改変され得る。米国特許出願公開第２０１５／０２０３８７１号を参照されたい。この構造は、１つのＤＮＡ鎖のみを標的とすることを許容するが、これは従来のＴＡＬＥＮ構造の選択肢ではない。

【０４１７】

［００４３７］本発明の一実施形態によれば、従来型のＲＶＤを使用して、遺伝子発現を有意に減少させることができるＴＡＬＥＮが作製され得る。一実施形態において、４つのＲＶＤ、ＮＩ、ＨＤ、ＮＮ及びＮＧは、それぞれ、アデニン、シトシン、グアニン及びチミンを標的とするために使用される。これらの従来型のＲＶＤは、例えば、ＰＤ－１遺伝子を標的とするＴＡＬＥＮを作製するために使用できる。従来型のＲＶＤを使用するＴＡＬＥＮの例には、Gautron et al., Molecular Therapy: Nucleic Acids Dec. 2017, Vol. 9:312-321 (Gautron)（参照により本明細書に組み込まれる）で開示されるＴ３ｖ１及びＴ１　ＴＡＬＥＮが含まれる。Ｔ３ｖ１及びＴ１　ＴＡＬＥＮは、ＰＤ－Ｌ１結合部位が位置するＰＤＣＤ１遺伝子座の第２のエクソンを標的とし、ＰＤ－１産生を大幅に減少させることができる。一実施形態において、Ｔ１　ＴＡＬＥＮは、標的配列番号１２７を使用することによってそれを行い、Ｔ３ｖ１　ＴＡＬＥＮは、標的配列番号

１２８を使用することによってそれを行う。
【０４１８】
［00438］別の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮは、Gautronに開示されるように、標的遺伝子に対するそれらの活性及び特異性を改善するために、非従来型のＲＶＤを使用して改変される。天然のＲＶＤは、超可変アミノ酸位置の潜在的な多様性レパートリーのごく一部のみを包含している。非従来型のＲＶＤは、天然のＲＶＤの代替を提供し、ＴＡＬＥＮによるオフサイト標的（標的配列と比較していくつかのミスマッチを含有するゲノム内の配列）の標的化を除外するために使用できる新規の固有のターゲティング特異性機能を有する。非従来型ＲＶＤは、参照により本明細書に組み込まれるJuillerat, et al., Scientific Reports 5, Article Number 8150 (2015)に開示されているように、アレイの定義された位置にある２つの超可変アミノ酸位置にアミノ酸の代替的組み合わせを含有するＴＡＬＥＮのコレクションを生成及びスクリーニングすることによって識別され得る。次に、ミスマッチの位置に存在するヌクレオチド同士を区別する非従来型のＲＶＤが選択され得、これにより、標的位置の適切な処理を可能にしながら、オフサイト配列でのＴＡＬＥＮ活性を防止できる。次いで、選択された非従来型のＲＶＤを使用して、ＴＡＬＥＮ内の従来型のＲＶＤを置き換え得る。従来型のＲＶＤが非従来型のＲＶＤに置換えられたＴＡＬＥＮの例には、Gautronによって産生されたＴ３ｖ２及びＴ３ｖ３　ＰＤ－１　ＴＡＬＥＮが含まれる。これらのＴＡＬＥＮは、従来型のＲＶＤを使用したＴＡＬＥＮと比較して、特異性が向上していた。
【０４１９】
［00439］追加の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮは、２つの遺伝子の発現をサイレンシング又は低減するための遺伝子変化を導入するために利用され得る。例えば、２つの異なる遺伝子を標的とするために２つの別個のＴＡＬＥＮを生成して一緒に使用し得る。それぞれの遺伝子座及び潜在的なオフターゲット部位で２つのＴＡＬＥＮによって生成される分子イベントは、ハイスループットＤＮＡシーケンシングによって特徴付け得る。これにより、オフターゲット部位の分析と、両方のＴＡＬＥＮの使用に起因し得る部位の特定とが可能になる。この情報に基づいて、適切な従来型及び非従来型のＲＶＤを選択して、一緒に使用した場合でも特異性及び活性が向上したＴＡＬＥＮが設計され得る。例えば、Gautronは、Ｔ３ｖ４　ＰＤ－１及びＴＲＡＣ　ＴＡＬＥＮを組み合わせて使用し、強力なインビトロ抗腫瘍機能を維持するダブルノックアウトＣＡＲ　Ｔ細胞を生成することを開示している。
【０４２０】
［00440］一実施形態において、Gautronの方法又は本明細書に記載の他の方法を使用してＴＩＬを遺伝的に編集し得、その後、本明細書に記載の手順のいずれかによって拡大培養し得る。一部の実施形態において、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、
（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズ又は抗体を使用して、１～５日間にわたり、患者から切除された腫瘍から得られた第１のＴＩＬ集団を活性化するステップ；
（ｂ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼのエレクトロポレーションを使用して第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第２のＴＩＬ集団を得るステップ；
（ｃ）任意選択により、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップ；
（ｄ）ＩＬ－２及び任意選択によりＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせるステップであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器内で実施され、第１の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約３～１４日間にわたって実施される、ステップ；
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第４のＴＩＬ集団を生じさせるステップであって、第２の拡大培養は、第４のＴＩＬ集団を得るために約７～１

４日間にわたって実施され、第４のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、ステップ；
（ｆ）ステップ（ｅ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収するステップ；
（ｇ）ステップ（ｅ）からの回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行は、系を開放せずに発生する、ステップ
を含み；
（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）の１つ以上は、閉鎖滅菌系で実施される。
【０４２１】
［００４４１］一実施形態において、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、
（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズ又は抗体を使用して、１～５日間にわたり、患者から切除された腫瘍から得られた第１のＴＩＬ集団を活性化するステップ；
（ｂ）サイトポレーション培地中で転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼのエレクトロポレーションを使用して第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第２のＴＩＬ集団を得るステップ；
（ｃ）任意選択により、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップ；
（ｄ）ＩＬ－２及び任意選択によりＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせるステップであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器内で実施され、第１の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約６～９日間にわたって実施される、ステップ；
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第４のＴＩＬ集団を生じさせるステップであって、第２の拡大培養は、第４のＴＩＬ集団を得るために約９～１１日間にわたって実施され、第４のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、ステップ；
（ｆ）ステップ（ｅ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収するステップ；
（ｇ）ステップ（ｅ）からの回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行は、系を開放せずに発生する、ステップ
を含み；
（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）の１つ以上は、閉鎖滅菌系で実施される。
【０４２２】
［００４４２］一実施形態において、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、
（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズ又は抗体を使用して、１～５日間にわたり、患者から切除された腫瘍から得られた第１のＴＩＬ集団を活性化するステップ；
（ｂ）サイトポレーション培地中で転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼのエレクトロポレーションを使用して第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第２のＴＩＬ集団を得るステップ；
（ｃ）任意選択により、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップであって、インキュベーションは、約５％のCO_2と共に約３０～４０℃で実施される、ステップ；
（ｄ）ＩＬ－２及び任意選択によりＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせるステップであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器内で実施され、第１の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約６～９日間にわたって実施される、ステップ；
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第４のＴＩＬ集団を生じさせるステップであって、第２の拡大培養は、第４のＴＩＬ集団を得るために約９～１１日間にわたって実施され、第４のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、ステップ；
（ｆ）ステップ（ｅ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収するステップ；
（ｇ）ステップ（ｅ）からの回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すステップであって

、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行は、系を開放せずに発生する、ステップ
を含み；
（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）の１つ以上は、閉鎖滅菌系で実施される。
【０４２３】
［００４４３］　別の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮは、特異的に設計され得、これにより、特定の選択された遺伝子を標的とすることができる標的細胞内でより高い割合のＤＳＢイベントが可能となる。米国特許出願公開第２０１３／０３１５８８４号を参照されたい。このような希少な切断エンドヌクレアーゼの使用により、トランスフェクトされた細胞で標的遺伝子の二重不活化が得られる可能性が高まり、Ｔ細胞などの操作された細胞の産生が可能になる。更に、追加の触媒ドメインをＴＡＬＥＮと共に導入して、変異原性を増加させ、標的遺伝子の不活化を増強することができる。米国特許出願公開第２０１３／０３１５８８４号に記載のＴＡＬＥＮは、免疫療法に適したＴ細胞を操作するために使用することに成功した。ＴＡＬＥＮは、単一のＴ細胞内の少なくとも２つの遺伝子の不活化を含む、Ｔ細胞内の様々な免疫チェックポイント遺伝子を不活化するためにも使用され得る。米国特許出願公開第２０１６／０１２０９０６号を参照されたい。更に、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２０１８／００２１３７９号に開示されるように、ＴＡＬＥＮを使用して、免疫抑制剤及びＴ細胞受容体の標的をコードする遺伝子が不活化され得る。更に、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２０１９／００１０５１４号に開示されるように、ＴＡＬＥＮは、ベータ２－ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）及び／又はクラスＩＩ主要組織適合性複合体トランス活性化因子（ＣＩＩＴＡ）の発現を阻害するために使用され得る。
【０４２４】
［００４４４］　ＴＡＬＥ方法を介してＴＩＬを恒久的に遺伝子編集することによりサイレンシング又は阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＡＮＫＲＤ１１、ＳＯＣＳ１及びＢＣＯＲが含まれる。
【０４２５】
［００４４５］　ＰＤ－１遺伝子を標的とするＴＡＬＥヌクレアーゼの非限定的な例を次の表に示す。これらの例では、標的化されたゲノム配列は、１５塩基対（ｂｐ）スペーサー（小文字で表示）で区切られた２つの１７ｂｐ長の配列（ハーフ標的と称され、大文字で表示）を含有する。各ハーフ標的は、表に列挙されているハーフＴＡＬＥヌクレアーゼの繰り返しによって認識される。従って、特定の実施形態によれば、本発明によるＴＡＬＥヌクレアーゼは、配列番号１２７及び配列番号１２８からなる群から選択される標的配列を認識し、切断する。ＴＡＬＥＮ配列及び遺伝子編集方法は、前述のGautronにも記載されている。
【０４２６】

【表３】

番号	標的PD-1配列	リピート配列	ハーフTALEヌクレアーゼ
1	TTCTCCCCAGCCCTGCT cgtggtgaccgaagg GGACAACGCCACCTTCA (配列番号127)	リピートPD-1-左 (配列番号129) リピートPD-1-右 (配列番号130)	PD-1-左TALEN (配列番号133) PD-1-右TALEN (配列番号134)
2	TACCTCTGTGGGGCCAT ctccctggcccccaa GGCGCAGATCAAAGAGA (配列番号128)	リピートPD-1-左 (配列番号131) リピートPD-1-右 (配列番号132)	PD-1-左TALEN (配列番号135) PD-1-右TALEN (配列番号136)

【０４２７】

［００４４６］　一実施形態において、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、

（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズ又は抗体を使用して、１～５日間にわたり、患者から切除された腫瘍から得られた第１のＴＩＬ集団を活性化するステップ；

（ｂ）サイトポレーション培地中でＰＤＣＤ１を標的化する転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼのエレクトロポレーションを使用して第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第２のＴＩＬ集団を得るステップ；

（ｃ）任意選択により、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップであって、インキュベーションは、約５％のCO_2と共に約３０～４０℃で実施される、ステップ；

（ｄ）ＩＬ－２及び任意選択によりＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせるステップであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器内で実施され、第１の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約６～９日間にわたって実施される、ステップ；

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第４のＴＩＬ集団を生じさせるステップであって、第２の拡大培養は、第４のＴＩＬ集団を得るために約９～１１日間にわたって実施され、第４のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、ステップ；

（ｆ）ステップ（ｅ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収するステップ；

（ｇ）ステップ（ｅ）からの回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行は、系を開放せずに発生するステップ

を含み；

（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）の１つ以上は、閉鎖滅菌系で実施される。

【０４２８】

［００４４７］　一実施形態において、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、

（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズ又は抗体を使用して、１～５日間にわたり、患者から切除された腫瘍から得られた第１のＴＩＬ集団を活性化するステップ；

（ｂ）サイトポレーション培地中で配列番号１２８を標的化する転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼのエレクトロポレーションを使用して第１のＴＩＬ集団の少なくとも

一部を遺伝子編集して、第２のＴＩＬ集団を得るステップ；
（ｃ）任意選択により、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップであって、インキュベーションは、約５％のCO_2と共に約３０～４０℃で実施される、ステップ；
（ｄ）ＩＬ－２及び任意選択によりＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせるステップであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器内で実施され、第１の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約６～９日間にわたって実施される、ステップ；
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第４のＴＩＬ集団を生じさせるステップであって、第２の拡大培養は、第４のＴＩＬ集団を得るために約９～１１日間にわたって実施され、第４のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、ステップ；
（ｆ）ステップ（ｅ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収するステップ；
（ｇ）ステップ（ｅ）からの回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行は、系を開放せずに発生するステップ
を含み；
（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）の１つ以上は、閉鎖滅菌系で実施される。
【０４２９】
［００４４８］ 一実施形態において、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、
（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズ又は抗体を使用して、１～５日間にわたり、患者から切除された腫瘍から得られた第１のＴＩＬ集団を活性化するステップ；
（ｂ）サイトポレーション培地中で配列番号１３５及び配列番号１３６による転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼｍＲＮＡのエレクトロポレーションを使用して第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第２のＴＩＬ集団を得るステップ；
（ｃ）任意選択により、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップであって、インキュベーションは、約５％のCO_2と共に約３０～４０℃で実施される、ステップ；
（ｄ）ＩＬ－２及び任意選択によりＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせるステップであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器内で実施され、第１の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約６～９日間にわたって実施される、ステップ；
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第４のＴＩＬ集団を生じさせるステップであって、第２の拡大培養は、第４のＴＩＬ集団を得るために約９～１１日間にわたって実施され、第４のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、ステップ；
（ｆ）ステップ（ｅ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収するステップ；
（ｇ）ステップ（ｅ）からの回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行は、系を開放せずに発生するステップ
を含み；
（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）の１つ以上は、閉鎖滅菌系で実施される。
【０４３０】
［００４４９］ ＴＡＬＥ方法を介してＴＩＬを恒久的に遺伝子編集することにより強化され得る遺伝子の非限定的な他の例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ １／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）及び／又はＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１が含まれる。
【０４３１】
［００４５０］ ＴＡＬＥ方法により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、参照により本明細書に

組み込まれる米国特許第８，５８６，５２６号に記載される。これらの開示された例には、リピートＲＶＤ、ＴＡＬＥタンパク質の残基でできたＮ－ｃａｐポリペプチド及びＴＡＬＥタンパク質の全長Ｃ末端領域の断片でできたＣ－ｃａｐポリペプチドを含有する２つ以上のＴＡＬＥリピートユニットを有する非天然のＤＮＡ結合ポリペプチドの使用が含まれる。

【０４３２】

［００４５１］　ＴＡＬＥＮの設計及び設計戦略、活性評価、スクリーニング戦略並びにＴＡＬＥＮを介した遺伝子の組み込み及び不活化を効率的に実施するために使用でき、本発明の実施形態に従って使用され得る方法の例は、Ｖａｌｔｏｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ，２０１４，６９，１５１-１７０に記載され、これは、参照により本明細書に組み込まれる。

【０４３３】

［００４５２］　一実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、

（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；

（ｃ）ＩＬ－２を含み、及び任意選択により４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で約２～５日間にわたって第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施すること；

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加して、第２のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約１～３日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；

（ｅ）第２のＴＩＬ集団に対して無菌エレクトロポレーションステップを実施することであって、無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移動を媒介する、実施すること；

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間にわたって静置すること；

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３抗体、任意選択によりＯＸ４０抗体及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１１日間にわたって実施され、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；

（ｈ）ステップ（ｇ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収して、回収されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行は、系を開放せずに発生し、回収されたＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、提供すること；

（ｉ）回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行は、系を開放せずに発生する、移すこと；及び

（ｊ）ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地を使用して、回収されたＴＩＬ集団を凍結保存すること

を含み、エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つのタンパク質の発現を調節するためのＴＡＬＥヌクレアーゼシステムの送達を含む。

【０４３４】

［００４５３］　一実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、

（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；

（ｃ）ＩＬ－２を含み、及び任意選択により４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培

地中で約２～５日間にわたって第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施すること；
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加して、第２のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約１～３日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｅ）第２のＴＩＬ集団に対して無菌エレクトロポレーションステップを実施することであって、無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移動を媒介する、実施すること；
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間にわたって静置すること；
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３抗体、任意選択によりＯＸ４０抗体及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１１日間にわたって実施され、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｈ）ステップ（ｇ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収して、回収されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行は、系を開放せずに発生し、回収されたＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、提供すること；
（ｉ）回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行は、系を開放せずに発生する、移すこと；及び
（ｊ）ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地を使用して、回収されたＴＩＬ集団を凍結保存すること
を含み、エレクトロポレーションステップは、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現を抑制するためのＴＡＬＥヌクレアーゼシステムの送達を含む。

【０４３５】

３．ジンクフィンガー方法

［００４５４］ ＴＩＬを治療用集団に拡大培養する方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って又はＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１７／０５８６１０号、ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０１２６０５号若しくはＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０１２６３３号に記載されているように実施され得、ここで、方法は、ジンクフィンガー又はジンクフィンガーヌクレアーゼ法によってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを更に含む。特定の実施形態によると、ＴＩＬ拡大培養プロセス中のジンクフィンガー方法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現の、治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部におけるサイレンシング又は低下を引き起こす。代わりに、ＴＩＬ拡大培養プロセス中のジンクフィンガー方法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現の、治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部における増強を引き起こす。

【０４３６】

［００４５５］ 個々のジンクフィンガーは、保存されたββα構造中におよそ３０のアミノ酸を含有する。α－ヘリックスの表面上のいくつかのアミノ酸は、典型的には、様々な選択性のレベルで、ＤＮＡの主要な溝の３ｂｐに接触する。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、真核生物の転写因子を含み、ジンクフィンガーを含有する、ＤＮＡ結合ドメインである。第２のドメインはヌクレアーゼドメインであり、ＦｏｋＩ制限酵素を含み、ＤＮＡの触媒的切断の原因となっている。

【０４３７】

［００４５６］ 個々のＺＦＮのＤＮＡ結合ドメインは、典型的には、３～６個の個々のジンクフィンガー反復を含み、それぞれ９～１８塩基対を認識できる。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１組の３フィン

ガーＺＦＮであっても、理論的には、哺乳動物ゲノムにおける単一の遺伝子座を標的とすることができる。新しいジンクフィンガーアレイを生成する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組み立てプロセスは、３塩基対のＤＮＡ配列をそれぞれ認識できる、３つの別個のジンクフィンガーを組み合わせて、９塩基対の標的部位を認識できる３フィンガーアレイを生成することを含む。代わりに、オリゴマー化プールエンジニアリング（ＯＰＥＮ）などの選択ベースのアプローチを使用して、隣接するフィンガー間の状況依存的な相互作用を考慮した無作為化ライブラリーから新しいジンクフィンガーアレイを選択できる。操作されたジンクフィンガーは市販されている。Sangamo Biosciences（Richmond, CA, USA）は、Sigma-Aldrich（St. Louis, MO, USA）と協力して、ジンクフィンガー構築のための適切なプラットフォーム（CompoZr（登録商標））を開発した。

【０４３８】

［00457］ジンクフィンガー方法を介してＴＩＬを恒久的に遺伝子編集することによりサイレンシング又は阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２及びＧＵＣＹ１Ｂ３が含まれる。

【０４３９】

［00458］ジンクフィンガー方法を介してＴＩＬを恒久的に遺伝子編集することにより強化され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ　１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）及び／又はＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１が含まれる。

【０４４０】

［00459］ジンクフィンガー方法により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、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第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号に記載される。

【０４４１】

［00460］ジンクフィンガー方法により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、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０４４２】

［00461］一実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、

（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；
（ｃ）ＩＬ－２を含み、及び任意選択により４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で約２～５日間にわたって第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施すること；
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加して、第２のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約１～３日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｅ）第２のＴＩＬ集団に対して無菌エレクトロポレーションステップを実施することであって、無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移動を媒介する、実施すること；
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間にわたって静置すること；
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３抗体、任意選択によりＯＸ４０抗体及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１１日間にわたって実施され、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｈ）ステップ（ｇ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収して、回収されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行は、系を開放せずに発生し、回収されたＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、提供すること；
（ｉ）回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行は、系を開放せずに発生する、移すこと；及び
（ｊ）ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地を使用して、回収されたＴＩＬ集団を凍結保存すること
を含み、エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つのタンパク質の発現を調節するためのジンクフィンガーヌクレアーゼシステムの送達を含む。
【０４４３】
［００４６２］ 一実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法は、
（ａ）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ること；
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に添加すること；
（ｃ）ＩＬ－２を含み、及び任意選択により４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で約２～５日間にわたって第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施すること；
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加して、第２のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約１～３日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数において少なくとも５０倍多く、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｅ）第２のＴＩＬ集団に対して無菌エレクトロポレーションステップを実施することであって、無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移動を媒介する、実施すること；
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間にわたって静置すること；
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加的なＩＬ－２、任意選択によりＯＫＴ－３抗体、任意選択によりＯＸ４０抗体及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を生じさせることであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１１日間にわたって実施され、第２の拡大培

養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行は、系を開放せずに発生する、生じさせること；
（ｈ）ステップ（ｇ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収して、回収されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行は、系を開放せずに発生し、回収されたＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、提供すること；
（ｉ）回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行は、系を開放せずに発生する、移すこと；及び
（ｊ）ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地を使用して、回収されたＴＩＬ集団を凍結保存すること
を含み、エレクトロポレーションステップは、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現を抑制するためのジンクフィンガーヌクレアーゼシステムの送達を含む。

【０４４４】

ＩＶ．ＴＩＬの製造方法

［００４６３］ これらの特徴のいくつかを含むプロセス２Ａとして知られるＴＩＬプロセスの例を図１に示し、プロセス１Ｃに対する本発明の本実施形態の利点のいくつかを図１４と同様に図２に示す。プロセス１Ｃを図３に比較のために示す。プロセス２Ａに基づくＴＩＬ治療の２つの代替タイムラインを図４（細胞数が多い）及び図５（細胞数が少ない）に示す。プロセス２Ａの実施形態を図６及び図９に示す。図１３及び図１４は、例示的なプロセス１Ｃと比較した例示的なプロセス２Ａを更に提供する。

【０４４５】

［００４６４］ 本明細書において考察される通り、本発明は、患者への移植前に凍結保存ＴＩＬを再刺激することによりその代謝活性、従って相対的健康を増加させること及び前記代謝的健康の試験方法に関するステップを含み得る。一般的に本明細書に概説される通り、ＴＩＬは、一般的に、患者サンプルから採取し、操作することにより、患者への移植前にその数が拡大される。一部の実施形態において、ＴＩＬは、任意選択により、以下に考察する通り、遺伝的に操作され得る。

【０４４６】

［００４６５］ 一部の実施形態において、ＴＩＬは凍結保存され得る。解凍後、ＴＩＬは、患者への注入前に、その代謝を高めるために再刺激され得る。

【０４４７】

［００４６６］ 一部の実施形態において、以下並びに実施例及び図で詳細に考察する通り、第１の拡大培養（プレＲＥＰと称されるプロセス及び図９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の拡大培養（ＲＥＰと称されるプロセス及び図９にステップＢとして示されるプロセスを含む）は、７～１４日間に短縮される。一部の実施形態において、例で考察され、図４、５及び２７に示す通り、第１の拡大培養（例えば、図９のステップＢとして記載される拡拡大培養）は、１１日間に短縮され、第２の拡大培養（例えば、図９のステップＤに記載される拡大培養）は、１１日間に短縮される。一部の実施形態において、以下並びに実施例及び図で詳細に考察するように、第１の拡大培養及び第２の拡大培養（例えば、図９のステップＢ及びステップＤとして記載される拡大培養）の組み合わせは、２２日間に短縮される。

【０４４８】

［００４６７］ 以下の「ステップ」の名称Ａ、Ｂ、Ｃ等は、図９を参照し、本明細書に記載の特定の実施形態を参照している。以下及び図９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又は順序並びに追加的なステップ、ステップの繰り返し及び／又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。

【０４４９】

Ａ．ステップＡ：患者の腫瘍サンプルを入手

［００４６８］ 一般に、ＴＩＬは、最初に患者腫瘍サンプルから得られ（「初代ＴＩＬ」）、次に本明細書に記載される通りの更なる操作のためにより大きい集団に拡大培養され

、任意選択により凍結保存され、本明細書に概説される通り再刺激され、及び任意選択によりＴＩＬの健康の指標として表現型及び代謝パラメータが判定される。

【０４５０】

［００４６９］患者腫瘍サンプルは、当技術分野において公知の方法を用いて、概して外科的切除又は針生検など、腫瘍とＴＩＬ細胞との混合物を含むサンプルを得るための手段によって入手され得る。一般に、腫瘍サンプルは、原発腫瘍、浸潤性腫瘍又は転移性腫瘍を含めた任意の固形腫瘍からのものであり得る。腫瘍サンプルは、血液悪性腫瘍から得られた腫瘍など、液性腫瘍でもあり得る。固形腫瘍は、限定はされないが、乳癌、膵癌、前立腺癌、結腸直腸癌、肺癌、脳癌、腎癌、胃癌及び皮膚癌（限定はされないが、扁平上皮癌、基底細胞癌及び黒色腫を含む）を含めた任意の癌型のものであり得る。一部の実施形態において、有用なＴＩＬは、特に高レベルのＴＩＬを有すると報告されていることに伴って悪性黒色腫腫瘍から得られる。

【０４５１】

［００４７０］「固形腫瘍」という用語は、嚢胞又は液体領域を通常含まない異常な組織塊を指す。固形腫瘍は、良性又は悪性であり得る。「固形腫瘍癌」という用語は、悪性、新生物性又は癌性の固形腫瘍を指す。固形腫瘍癌としては、限定はされないが、肺癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、前立腺癌、結腸癌、直腸癌及び膀胱癌など、肉腫、癌腫及びリンパ腫が挙げられる。一部の実施形態において、癌は、子宮頸癌、頭頸部癌（例えば、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、膠芽腫、卵巣癌、肉腫、膵癌、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。固形腫瘍の組織構造は、柔組織（癌細胞）を含む相互依存的組織コンパートメント及び癌細胞が分散し支持微小環境を提供し得る支持間質細胞を含む。

【０４５２】

［００４７１］「血液悪性腫瘍」という用語は、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癌及び造血系及びリンパ系組織の腫瘍を指す。血液悪性腫瘍は、「液性腫瘍」とも称される。血液悪性腫瘍には、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ性リンパ腫（ＣＬＬ）、小リンパ性リンパ腫（ＳＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、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るが、これらに限定されるものではない。「Ｂ細胞血液悪性腫瘍」という用語は、Ｂ細胞に影響を及ぼす血液悪性腫瘍を指す。

【０４５３】

［００４７２］入手後、腫瘍サンプルは、一般的に鋭的な切離を用いて１～約８mm^3の小片に断片化され、約２～３mm^3が特に有用である。ＴＩＬは、酵素的腫瘍消化物を使用してこれらの断片から培養される。そのような腫瘍消化物は、酵素培地（例えば、Ｒｏｓｗｅｌｌ Ｐａｒｋ Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＲＰＭＩ）１６４０緩衝液、２ｍＭグルタメート、１０ｍｃｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０単位／ｍＬのＤＮａｓｅ及び１．０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼ）中でのインキュベーション、続いて機械的分離（例えば、組織分離剤を使用）によって産生され得る。腫瘍消化物は、腫瘍を酵素培地中に置き、腫瘍を約１分間機械的に分離した後、続いて５％CO_2下３７℃で３０分間インキュベートし、続いてごく小さい組織片のみが存在するまで前述の条件下で機械的分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り作製され得る。このプロセスの終わりに細胞懸濁液が多数の赤血球又は死細胞を含有する場合、これらの細胞を除去するためにFICOLL分岐親水性多糖を用いた密度勾配分離を行うことができる。米国特許出願公開第２０１２／０２４４１３３Ａ１号に記載されているものなど、当技術分野で公知の代替的方法を使用し得、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。前述の任意の方法は、ＴＩＬを拡大培養する方法又は癌を処置する方法のために、本明細書に記載の任意の実施形態において使用され得る。

【０４５４】

［００４７３］一般に、回収された細胞懸濁液は、「初代細胞集団」又は「新鮮に回収さ

れた」細胞集団と呼ばれる。

【０４５５】

［００４７４］　一部の実施形態において、断片化は、例えば、切離及び消化を含めた物理的断片化を含む。一部の実施形態において、断片化は、物理的断片化である。一部の実施形態において、断片化は、切離である。一部の実施形態において、断片化は、消化による。一部の実施形態において、ＴＩＬは、初めに、患者から得られた酵素的腫瘍消化物及び腫瘍断片から培養することができる。一実施形態において、ＴＩＬは、初めに、患者から得られた酵素的腫瘍消化物及び腫瘍断片から培養することができる。

【０４５６】

［００４７５］　一部の実施形態において、腫瘍が固形腫瘍である場合、例えばステップＡ（図９に提供される）における腫瘍サンプルの入手後、腫瘍は、物理的断片化を受ける。一部の実施形態において、断片化は、凍結保存前に行われる。一部の実施形態において、断片化は、凍結保存後に行われる。一部の実施形態において、断片化は、腫瘍の入手後、いかなる凍結保存もなしに行われる。一部の実施形態において、腫瘍は、断片化され、第１の拡大培養のための各容器に１０、２０、３０、４０個又はそれを超える数の断片又は小片が置かれる。一部の実施形態において、腫瘍は、断片化され、第１の拡大培養のための各容器に３０又は４０個の断片又は小片が置かれる。一部の実施形態において、腫瘍は、断片化され、第１の拡大培養のための各容器に４０個の断片又は小片が置かれる。一部の実施形態において、複数の断片は、約４～約５０個の断片を含み、各断片は、約２７ｍｍ^{3}の体積を有する。一部の実施形態において、複数の断片は、約１３００ｍｍ^3～約１５００ｍｍ^{3}の総体積を有する約３０～約６０個の断片を含む。一部の実施形態において、複数の断片は、約１３５０ｍｍ^{3}の総体積を有する約５０個の断片を含む。一部の実施形態において、複数の断片は、約１グラム～約１．５グラムの総質量を有する約５０個の断片を含む。一部の実施形態において、複数の断片は、約４個の断片を含む。

【０４５７】

［００４７６］　一部の実施形態において、ＴＩＬは、腫瘍断片から得られる。一部の実施形態において、腫瘍断片は、鋭的な切離によって得られる。一部の実施形態において、腫瘍断片は、約１ｍｍ^3～１０ｍｍ^{3}である。一部の実施形態において、腫瘍断片は、約１ｍｍ^3～８ｍｍ^{3}である。一部の実施形態において、腫瘍断片は、約１ｍｍ^{3}である。一部の実施形態において、腫瘍断片は、約２ｍｍ^{3}である。一部の実施形態において、腫瘍断片は、約３ｍｍ^{3}である。一部の実施形態において、腫瘍断片は、約４ｍｍ^{3}である。一部の実施形態において、腫瘍断片は、約５ｍｍ^{3}である。一部の実施形態において、腫瘍断片は、約６ｍｍ^{3}である。一部の実施形態において、腫瘍断片は、約７ｍｍ^{3}である。一部の実施形態において、腫瘍断片は、約８ｍｍ^{3}である。一部の実施形態において、腫瘍断片は、約９ｍｍ^{3}である。一部の実施形態において、腫瘍断片は、約１０ｍｍ^{3}である。

【０４５８】

［００４７７］　一部の実施形態において、ＴＩＬは、腫瘍消化物から入手される。一部の実施形態において、腫瘍消化物は、酵素培地中、例えば、限定はされないが、ＲＰＭＩ１６４０、２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮアーゼ及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ中におけるインキュベーションと、それに続く機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ、Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって作成した。腫瘍を酵素培地に置いた後、腫瘍を約１分間機械的に分離し得る。次に溶液を５％CO_2下３７℃で３０分間インキュベートし、次にそれを再び約１分間機械的に破壊し得る。再び５％CO_2下３７℃で３０分間インキュベートした後、腫瘍を３度目に約１分間機械的に破壊し得る。一部の実施形態において、３度目の機械的破壊後に大型の組織片が存在した場合、５％CO_2下３７℃での更に３０分間のインキュベーションを伴う又は伴わない１回又は２回の更なる機械的分離をサンプルに適用した。一部の実施形態において、最終回のインキュベーションの終了時に細胞懸濁液が多数の赤血球又は死細胞を含有した場合、フィコールを使用した密度勾配分離を実施して、そうした細胞を除去し得る。

【０４５９】
［００４７８］一部の実施形態において、第１の拡大培養ステップ前の回収された細胞懸濁液は、「初代細胞集団」又は「新鮮に回収された」細胞集団と呼ばれる。
【０４６０】
［００４７９］一部の実施形態において、細胞は、以下に更に詳細に記載し、図９に例示する、ステップＢに記載の拡大培養に進む前に、任意選択によりサンプル回収後に凍結され、凍結貯蔵され得る。
【０４６１】
Ｂ．ステップＢ：第１の拡大培養
１．幼若ＴＩＬ
［００４８０］一部の実施形態において、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る幼若ＴＩＬを得ることを提供し、従って成熟ＴＩＬ（即ち被験者／患者への投与前に更に多くの回数の複製を受けたＴＩＬ）を超える追加的な治療上の利点を提供し得る。幼若ＴＩＬの特徴が、文献に記載されている。例えば、Donia, at al., Scandinavian Journal of Immunology, 75:157-167 (2012)；Dudley et al., Clin Cancer Res, 16:6122-6131 (2010)、Huang et al., J Immunother, 28（3）:258-267 (2005)、Besser et al., Clin Cancer Res, 19（17）:OF1-OF9 (2013)、Besser et al., J Immunother 32:415-423 (2009)、Robbins, et al., J Immunol 2004；173:7125-7130、Shen et al., J Immunother, 30:123-129 (2007)、Zhou, et al., J Immunother, 28:53-62 (2005)及びTran, et al., J Immunother, 31:742-751 (2008)であり、これらは、全て全体として参照により本明細書に組み込まれる。
【０４６２】
［００４８１］Ｔ及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られているが多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（結合）及びＣ（定数）の遺伝子セグメントは、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側での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリーの多様性を示し、増加させるＴＩＬを生成する方法を提供する。一部の実施形態において、本方法により得られたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。一部の実施形態において、本方法によって得られたＴＩＬは、新たに回収されたＴＩＬ及び／又は例えば図９に具体化された方法以外の方法を含む、本明細書で提供する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。一部の実施形態において、図１３に例示されているように、本方法によって得られたＴＩＬは、新たに回収されたＴＩＬ及び／又はプロセス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。一部の実施形態において、第１の拡大培養で得られたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。一部の実施形態において、多様性の増加は、免疫グロブリンの多様性及び／又はＴ細胞受容体の多様性の増加である。一部の実施形態において、免疫グロブリンの多様性は、免疫グロブリン重鎖にある。一部の実施形態において、免疫グロブリンの多様性は、免疫グロブリン軽鎖にある。一部の実施形態において、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。一部の実施形態において、多様性は、α、β、γ及びδ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体の１つにある。一部の実施形態において、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α及び／又はβの発現が増加する。一部の実施形態において、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）αの発現が増加する。一部の実施形態において、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）βの発現が増加する。一部の実施形態において、ＴＣＲａｂ（即ちＴＣＲα／β）の発現が増加する。
【０４６３】
［００４８２］腫瘍断片の解剖又は消化（例えば、図９のステップＡに記載されるように）後、得られた細胞は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長に有利な条件下で血清含有ＩＬ－２において培養される。一部の実施形態において、腫瘍消化物は、２ｍＬウェルにおいて、不活性化ヒトＡＢ血清を６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２と共に含む培地中でイン

キュベートされる。この初代細胞集団は、数日、概して３～１４日の期間にわたって培養され、それによりバルクＴＩＬ集団、概して約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞が得られる。一部の実施形態において、この初代細胞集団は、７～１４日の期間にわたって培養され、それによりバルクＴＩＬ集団、概して約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞が得られる。一部の実施形態において、この初代細胞集団は、１０～１４日の期間にわたって培養され、それによりバルクＴＩＬ集団、概して約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞が得られる。一部の実施形態において、この初代細胞集団は、約１１日の期間にわたって培養され、それによりバルクＴＩＬ集団、概して約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞が得られる。

【０４６４】

［００４８３］ 好ましい実施形態において、以下及び本明細書で説明するように、初期バルクＴＩＬ拡大培養ステップ（例えば、プレＲＥＰと称されるプロセスを含み得る図９のステップＢで説明したものなど）、その後の、以下ステップＤの下及び本明細書に記載されているように、第２の拡大培養（ステップＤ、急速拡大培養プロトコル（ＲＥＰ）ステップと称されるプロセスを含む）、その後の、任意選択による凍結保存及びその後の第２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ＴＩＬの拡大培養を実施することができる。このプロセスによって得られたＴＩＬは、任意選択により、本明細書に記載される通り表現型特徴及び代謝パラメータが特徴付けられ得る。

【０４６５】

［００４８４］ 実施形態において、ＴＩＬ培養が２４ウェルプレートで例えばCostar２４ウェル細胞培養クラスター、平底（Corning Incorporated、Corning, NYを使用して開始される場合、各ウェルには、ＩＬ－２（６０００ＩＵ／ｍＬ；Chiron Corp.、Emeryville, CA）を含む２ｍＬの完全培地（ＣＭ）中、１×１０^{6}個の腫瘍消化物細胞又は１個の腫瘍断片を播種することができる。一部の実施形態において、腫瘍断片は、約１ｍｍ^{3}～１０ｍｍ^{3}である。

【０４６６】

［００４８５］ 一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、培養培地の略称である「ＣＭ」と称される。一部の実施形態において、ステップＢのＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭヘペス及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを添加したGlutaMAX含有RPMI1640からなる。培養が４０ｍＬ容量及び１０ｃｍ^{2}ガス透過性シリコン底のガス透過性フラスコ（例えば、G-Rex10；Wilson Wolf Manufacturing、New Brighton, MN）内で開始される実施形態において（図１）、各フラスコに１０～４０ｍＬのＩＬ－２含有ＣＭ中の１０～４０×１０^{6}個の腫瘍消化物生細胞又は５～３０個の腫瘍断片をロードした。G-Rex10及び２４ウェルプレートのいずれも、加湿インキュベーターにおいて５％CO_2下３７℃でインキュベートし、培養開始から５日後に培地の半分を取り出して、新鮮なＣＭ及びＩＬ－２を補充し、５日目以降には２～３日毎に培地の半分を交換した。

【０４６７】

［００４８６］ 腫瘍断片の調製後、得られた細胞（即ち断片）は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長に有利な条件下で血清含有ＩＬ－２において培養される。一部の実施形態において、腫瘍消化物は、２ｍＬウェルにおいて、不活性化ヒトＡＢ血清を６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２と共に含む培地中で（又はある場合には本明細書に概説される通りａＡＰＣ細胞集団の存在下で）インキュベートされる。この初代細胞集団は、数日、概して１０～１４日の期間にわたって培養され、それによりバルクＴＩＬ集団、概して約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞が得られる。一部の実施形態において、第１の拡大培養中の成長培地は、ＩＬ－２又はその変異体を含む。一部の実施形態において、ＩＬは、組換えヒトＩＬ－２（ｒｈＩＬ－２）である。一部の実施形態において、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルについて２０～３０×１０^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。一部の実施形態において、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルについて２０×１０^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。一部の実施形態において、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルについて２５×１０^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。一部の実施形態において、ＩＬ－２

ストック溶液は、１ｍｇバイアルについて３０×１０^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。一部の実施形態において、ＩＬ－２ストック溶液は、４～８×１０^{6}ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。一部の実施形態において、ＩＬ－２ストック溶液は、５～７×１０^{6}ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。一部の実施形態において、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。一部の実施形態において、ＩＬ－２ストック溶液は、実施例４に記載される通り調製される。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、約１０，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２又は約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、細胞培養培地は、ＩＬ－２を更に含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、細胞培養培地は、ＩＬ－２を更に含む。好ましい一実施形態において、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、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又は約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬ、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬ、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ又は約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【０４６８】

［00487］ 一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１６０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１４０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５又は約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一実施形態において、細胞培養培地は、ＩＬ－１５を更に含む。好ましい一実施形態において、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。

【０４６９】

［00488］ 一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約４ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１又は約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、約１２

ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は、約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一実施形態において、細胞培養培地は、ＩＬ－２１を更に含む。好ましい一実施形態において、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。

【０４７０】

［００４８９］一実施形態において、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含む。ＯＫＴ－３抗体は、ＲＥＰの０日目（即ちＲＥＰの開始日）及び／又は第２の拡大培養の０日目（即ち第２の拡大培養の開始日）に開始して細胞培養培地に存在し得る。一部の実施形態において、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。一実施形態において、細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ及び約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。一実施形態において、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇ／ｍＬ、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。一部の実施形態において、細胞培養培地はＯＫＴ－３抗体を含まない。

【０４７１】

［００４９０］一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、培養培地の略称である「ＣＭ」と称される。一部の実施形態において、これはＣＭ１（培養培地１）と称される。一部の実施形態において、ＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭヘペス及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを添加したGlutaMAX含有RPMI1640からなる。培養が４０ｍＬ容量及び１０ｃｍ^{2}ガス透過性シリコン底のガス透過性フラスコ（例えば、G-Rex10；Wilson Wolf Manufacturing、New Brighton, MN）内で開始される実施形態において（図１）、各フラスコに１０～４０ｍＬのＩＬ－２含有ＣＭ中の１０～４０×１０^{6}個の腫瘍消化物生細胞又は５～３０個の腫瘍断片をロードした。G-Rex10及び２４ウェルプレートのいずれも、加湿インキュベーターにおいて５％CO_2下３７℃でインキュベートし、培養開始から５日後に培地の半分を取り出して、新鮮なＣＭ及びＩＬ－２を補充し、５日目以降には２～３日毎に培地の半分を交換した。一部の実施形態において、ＣＭは、実施例に記載されるＣＭ１であり、実施例５を参照されたい。一部の実施形態において、第１の拡大培養は、初期細胞培養培地又は第１の細胞培養培地中で実施される。一部の実施形態において、初期細胞培養培地又は第１の細胞培養培地は、ＩＬ－２を含む。

【０４７２】

［００４９１］一部の実施形態において、実施例及び図で考察されているように、第１の拡大培養（例えば、プレＲＥＰと称されることもあるものを含み得る、図９のステップＢに記載されるプロセスなどを含む）プロセスは、３～１４日間に短縮される。一部の実施形態において、例えば図４及び５並びに例えば図９のステップＢに記載されている実施例を含む実施例で考察されているように、第１の拡大培養（例えば、プレＲＥＰと称されることもある図９のステップＢに記載されるプロセスなどを含み得る）プロセスは、７～１４日間に短縮される。一部の実施形態において、実施例で考察し、図４及び５に示すように、ステップＢの第１の拡大培養は、１０～１４日間に短縮される。一部の実施形態において、実施例で考察し、図４及び５並びに例えば図９のステップＢに記載されている拡大

培養を含む第１の拡大培養は、１１日間に短縮される。

【０４７３】

［００４９２］ 一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、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日又は１４日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、１日～１４日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、２日～１４日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、３日～１４日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、４日～１４日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、５日～１４日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、６日～１４日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、７日～１４日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、８日～１４日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、９日～１４日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、１０日～１４日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、１１日～１４日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、１２日～１４日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、１３日～１４日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、１４日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、１日～１１日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、２日～１１日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、３日～１１日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、４日～１１日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、５日～１１日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、６日～１１日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、７日～１１日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、８日～１１日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、９日～１１日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、１０日～１１日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、１１日間続行され得る。

【０４７４】

［００４９３］ 一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１の組み合わせは、第１の拡大培養中の組み合わせとして用いられる。一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１並びにそれらの任意選択の組み合わせは、例えば、図９による並びに本明細書に記載されている通り、ステップＢプロセス中を含む第１の拡大培養中に含められ得る。一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の組み合わせが、第１の拡大培養中の組み合わせとして用いられる。一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１並びにそれらの任意選択の組み合わせは、例えば、図９による及び本明細書に記載されている通りステップＢプロセス中に含められ得る。一部の実施形態において、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１は、１日目に添加される。一部の実施形態において、コア生検が膵臓腫瘍からのもの（例えば、膵臓起源のもの）である場合、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１は、１日目に添加される。一部の実施形態において、ＩＬ－１５は含まれない。一部の実施形態において、ＩＬ－２１は含まれない。一部の実施形態において、ＩＬ－１５もＩＬ－２１も含まれない。

【０４７５】

［００４９４］ 一部の実施形態において、実施例及び図で考察されているように、第１の拡大培養（例えば、プレＲＥＰと称される図９のステップＢに記載されるプロセスなどを含む）プロセスは、３～１４日間に短縮される。一部の実施形態において、実施例で考察し、図４及び５に示すように、ステップＢの第１の拡大培養は、７～１４日間に短縮される。一部の実施形態において、実施例で考察し、図４、５及び９に示すように、ステップＢの第１の拡大培養は、１０～１４日間に短縮される。一部の実施形態において、実施例

で考察し、図４、５及び９に示すように、ステップＢの第１の拡大培養は、１１日間に短縮される。

【０４７６】

［００４９５］　一部の実施形態において、第１の拡大培養、例えば図９によるステップＢは、閉鎖系バイオリアクターで実施される。一部の実施形態において、本明細書に記載される通り、ＴＩＬ拡大培養のために閉鎖系が用いられる。一部の実施形態において、単一のバイオリアクターが用いられる。一部の実施形態において、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、G-REX-10又はG-REX-100である。一部の実施形態において、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【０４７７】

［００４９６］　一部の実施形態において、第１の拡大培養は、以下に記載される４－１ＢＢアゴニスト抗体のいずれかを使用して、拡大培養の開始時に細胞培養培地に添加される追加の４－１ＢＢアゴニスト抗体を使用して実施される。

【０４７８】

Ｃ．ステップＣ：第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行

［００４９７］　ある場合には、例えば図９に示されるように、例えばステップＢから得られるＴＩＬ集団を含む、第１の拡大培養から得られるバルクＴＩＬ集団は、以下本明細書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。代わりに、第２のＴＩＬ集団と称される第１の拡大培養から得られたＴＩＬ集団は、第２の拡大培養（ＲＥＰと呼ばれることがある拡大培養を含み得る）に供し、その後、以下で考察するように凍結保存することができる。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）又は第２のＴＩＬ集団（一部の実施形態において、ＲＥＰ　ＴＩＬ集団と称される集団を含み得る）は、拡大培養前又は第１の拡大培養後で第２の拡大培養前に適切な処置のために遺伝子修飾に供することができる。

【０４７９】

［００４９８］　一部の実施形態において、第１の拡大培養から（例えば、図９に示される通りのステップＢから）得られたＴＩＬは、選択のためのフェノタイピングまで貯蔵される。一部の実施形態において、第１の拡大培養から（例えば、図９に示される通りのステップＢから）得られたＴＩＬは、貯蔵されず第２の拡大培養に直接進む。一部の実施形態において、第１の拡大培養から得られたＴＩＬは、第１の拡大培養後、第２の拡大培養前に凍結保存されない。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから約３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日又は１４日の時点で発生する。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから約３日～１４日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから約４日～１４日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから約４日～１０日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから約７日～１４日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから約１４日の時点で行われる。

【０４８０】

［００４９９］　一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから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日又は１４日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから１日～１４日で行われる。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は２日～１４日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから３日～１４日で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから４日～１４日で行われる。

一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから５日～１４日で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから６日～１４日で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから７日～１４日で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから８日～１４日で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから９日～１４日で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから１０日～１４日で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから１１日～１４日で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから１２日～１４日で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから１３日～１４日で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから１４日で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから１日～１１日で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから２日～１１日で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから３日～１１日で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから４日～１１日で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから５日～１１日で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから６日～１１日で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから７日～１１日で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから８日～１１日で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから９日～１１日で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから１０日～１１日で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、断片化が行われたときから１１日で行われる。

【０４８１】

［００５００］一部の実施形態において、ＴＩＬは第１の拡大培養後、第２の拡大培養前に貯蔵されず、ＴＩＬは第２の拡大培養に直接進む（例えば、一部の実施形態において、図９に示すように、ステップＢからステップＤへの移行中に貯蔵は行われない）。一部の実施形態において、本明細書に記載される通り、移行は、閉鎖系内で発生する。一部の実施形態において、第１の拡大培養からのＴＩＬは、第２のＴＩＬ集団からのＴＩＬであり、移行期間を伴わず第２の拡大培養に直接進む。

【０４８２】

［００５０１］一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、例えば、図９によるステップＣは、閉鎖系バイオリアクターで実施される。一部の実施形態において、本明細書に記載される通り、ＴＩＬ拡大培養のために閉鎖系が用いられる。一部の実施形態において、単一のバイオリアクターが用いられる。一部の実施形態において、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、G-REX-10又はG-REX-100である。一部の実施形態において、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【０４８３】

Ｄ．ステップＤ：第２の拡大培養

［００５０２］一部の実施形態において、ＴＩＬ細胞集団は、例えば、図９に記載の通り、ステップＡ及びステップＢ並びにステップＣと称される移行後、回収及び初期バルク処

理後、数が増加する。この更なる増加は、本明細書では第２の拡大培養と称され、これは、当技術分野で一般に急速拡大培養法と称される拡大培養プロセス（ＲＥＰ並びに図９のステップＤに示されるプロセス）を含み得る。第２の拡大培養は、概して、フィーダー細胞、サイトカイン源及び抗ＣＤ３抗体を含め、幾つもの成分を含むガス透過性容器内の培養培地を使用して達成することができる。

【０４８４】

［００５０３］一部の実施形態において、ＴＩＬの第２の拡大培養又は第２のＴＩＬ拡大培養（これは、ＲＥＰと称されることもある拡大培養；並びに図９のステップＤに示されるプロセスを含み得る）は、当業者に公知の任意のＴＩＬフラスコ又は容器を使用して実施することができる。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日又は１４日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、約７日～約１４日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、約８日～約１４日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、約９日～約１４日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、約１０日～約１４日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、約１１日～約１４日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、約１２日～約１４日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、約１３日～約１４日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、約１４日間続行し得る。

【０４８５】

［００５０４］一実施形態において、第２の拡大培養は、本開示の方法（例えば、ＲＥＰと称される膨張並びに図９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実施することができる。例えば、ＴＩＬは、インターロイキン－２（ＩＬ－２）又はインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）の存在下で非特異的Ｔ細胞受容体刺激を用いて急速に拡大培養することができる。非特異的Ｔ細胞受容体刺激としては、例えば、約３０ｎｇ／ｍｌのＯＫＴ３などの抗ＣＤ３抗体、マウスモノクローナル抗ＣＤ３抗体（Ortho-McNeil、Raritan, NJ又はMiltenyi Biotech、Auburn, CAから市販されている）又はＵＨＣＴ－１（BioLegend、San Diego, CA, USAから市販されている）を挙げることができる。ＴＩＬは、任意選択により３００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２又はＩＬ－１５など、Ｔ細胞成長因子の存在下において、ヒト白血球抗原Ａ２（ＨＬＡ－Ａ２）結合ペプチド、例えば０．３μＭ　ＭＡＲＴ－１：２６－３５（２７Ｌ）又はｇｐｌ　００：２０９－２１７（２１０Ｍ）など、任意選択によりベクターから発現させることができる、１つ又は複数のエピトープなど、その抗原性部分を含めた癌の１つ以上の抗原を、第２の拡大培養中に誘導することにより、インビトロでのＴＩＬの更なる刺激を誘発するように拡大培養することができる。他の好適な抗原としては、例えば、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、チロシナーゼ癌抗原、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＳＳＸ－２及びＶＥＧＦＲ２又はその抗原性部分を挙げることができる。ＴＩＬは、ＨＬＡ－Ａ２発現抗原提示細胞にパルスした癌の同じ１つ又は複数の抗原による再刺激によっても急速に拡大培養し得る。代わりに、ＴＩＬは、例えば、照射自己リンパ球によるか、又は照射ＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２によって更に再刺激することができる。一部の実施形態において、再刺激は、第２の拡大培養の一部として生じる。一部の実施形態において、照射された自己リンパ球の存在下において、又は照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２と共に第２の拡大培養が発生する。

【０４８６】

［００５０５］一実施形態において、細胞培養培地は、ＩＬ－２を更に含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、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７５００

ＩＵ／ｍＬ又は約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬ、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬ、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ又は８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【０４８７】

［００５０６］　一実施形態において、細胞培養培地は、ＯＫＴ３抗体を含む。ＯＫＴ－３抗体は、ＲＥＰの０日目（即ちＲＥＰの開始日）及び／又は第２の拡大培養の０日目（即ち第２の拡大培養の開始日）に開始して細胞培養培地に存在し得る。一部の実施形態において、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体を含む。一実施形態において、細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ及び約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体を含む。一実施形態において、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇ／ｍＬ、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体を含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含まない。

【０４８８】

［００５０７］　一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１の組み合わせが、第２の拡大培養中の組み合わせとして用いられる。一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１並びにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図９による並びに本明細書に記載されている通り、ステップＤプロセス中を含む第２の拡大培養中に含められ得る。一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の組み合わせが、第２の拡大培養中の組み合わせとして用いられる。一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１並びにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図９による及び本明細書に記載されている通りステップＤプロセス中に含められ得る。

【０４８９】

［００５０８］　一部の実施形態において、第２の拡大培養は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示フィーダー細胞を含む補充細胞培養培地で実施され得る。一部の実施形態において、第２の拡大培養は、補充細胞培養培地中で実施される。一部の実施形態において、補充細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示フィーダー細胞を含む。一部の実施形態において、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。一部の実施形態において、第２の拡大培養は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示フィーダー細胞で生じる（即ち抗原提示細胞）。

【０４９０】

［００５０９］　一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１６０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１４０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５又は約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態に

おいて、第２の拡大培養培地は、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。ある実施形態において、細胞培養培地は、ＩＬ－１５を更に含む。好ましい一実施形態において、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。

【０４９１】

［００５１０］一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約４ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１又は約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は、約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。ある実施形態において、細胞培養培地は、ＩＬ－２１を更に含む。好ましい一実施形態において、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。

【０４９２】

［００５１１］一部の実施形態において、抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）は、ＰＢＭＣである。一実施形態において、急速拡大培養及び／又は第２の拡大培養におけるＴＩＬとＰＢＭＣ及び／又は抗原提示細胞との比は、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又は約１：５００である。一実施形態において、急速拡大培養及び／又は第２の拡大培養におけるＴＩＬとＰＢＭＣとの比は、１対５０～１対３００である。一実施形態において、急速拡大培養及び／又は第２の拡大培養におけるＴＩＬとＰＢＭＣとの比は、１対１００～１対２００である。

【０４９３】

［００５１２］一実施形態において、ＲＥＰ及び／又は第２の拡大培養は、バルクＴＩＬを１５０ｍＬ培地中の１００倍又は２００倍過剰の不活性化フィーダー細胞、３０ｍｇ／ｍＬ　ＯＫＴ３抗ＣＤ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２と混合してフラスコ内で実施される。細胞を別の成長チャンバーに移すまで培地補充が行われる（一般的に新鮮培地による呼吸を介した３分の２の培地補充）。別の成長チャンバーには、以下に更に十分に考察する通りのG-REXフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【０４９４】

［００５１３］一部の実施形態において、第２の拡大培養（ＲＥＰプロセスと称されるプロセスを含み得る）は、実施例及び図で考察されるように、７～１４日間に短縮される。一部の実施形態において、第２の拡大培養は、１１日間に短縮される。

【０４９５】

［００５１４］一実施形態において、ＲＥＰ及び／又は第２の拡大培養は、前述のように（Tran, et al., J. Immunother. 2008, 31, 742-51；Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42）T-175フラスコ及び気体透過性バッグ又はガス透過性培養器具（G-Rexフラスコ）を使用して実施され得る。一部の実施形態において、第２の拡大培養（急速拡大培養と称される拡大培養を含む）は、T-175フラスコで実施され、１５０ｍＬの培地に懸濁した約1×10^{6}個のＴＩＬを各T-175フラスコに加え得る

。ＴＩＬは、ＩＬ－２の１ｍＬあたり３０００ＩＵ及び抗ＣＤ３の１ｍＬあたり３０ｎｇを補充したＣＭ及びAIM-V培地の１：１の混合物で培養され得る。T-175フラスコは５％CO_2下３７℃でインキュベートされ得る。培地の半分は、５日目に、１ｍＬあたり３０００ＩＵのＩＬ－２を含む５０／５０培地を使用して交換され得る。一部の実施形態において、７日目に、２つのT-175フラスコからの細胞を３Ｌバッグに合わせることができ、その３００ｍＬのＴＩＬ懸濁液に、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む３００ｍＬのAIM Vを加えた。毎日又は２日毎に各バッグの細胞数を計数し、新鮮培地を加えて細胞数を０．５～２．０×10^6細胞／ｍＬに保った。

【０４９６】

[00515] 一実施形態において、第２の拡大培養（これはＲＥＰと称される拡大培養；並びに図９のステップＤに参照されるものを含み得る）は、１００ｃｍガス透過性シリコン底の５００ｍＬ容量ガス透過性フラスコ（G-Rex 100、Wilson Wolf Manufacturing Corporation、New Brighton, MN, USAから市販されている）において実施され得、５％ヒトＡＢ血清、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）を補充した４００ｍＬの５０／５０培地中で５×10^6又は１０×10^6個のＴＩＬをＰＢＭＣと培養し得る。G-Rex 100フラスコは５％CO_2下３７℃でインキュベートし得る。５日目、２５０ｍＬの上清を取り出して遠心ボトルに入れ、１５００ｒｐｍ（４９１×ｇ）で１０分間遠心し得る。５％ヒトＡＢ血清、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬの新鮮培地にＴＩＬペレットを再懸濁し、元のG-Rex 100フラスコに戻し加え得る。G-Rex 100フラスコ内でＴＩＬを連続的に拡大培養するときは、７日目に各G-Rex 100のＴＩＬを各フラスコ内に存在する３００ｍＬの培地に懸濁し得、及び細胞懸濁液を３つの１００ｍＬアリコートに分割し得、それらを３つのG-Rex 100フラスコの播種に使用し得る。次に、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのAIM-Vを各フラスコに加え得る。G-Rex 100フラスコは５％CO_2下３７℃でインキュベートし得、４日後、各G-Rex100フラスコに３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのAIM-Vを加え得る。細胞は培養１４日目に回収し得る。

【０４９７】

[00516] 一実施形態において、第２の拡大培養（ＲＥＰと称される拡大培養を含む）は、バルクＴＩＬを１５０ｍｌ培地中の１００倍又は２００倍過剰の不活性化フィーダー細胞、３０ｍｇ／ｍＬ　ＯＫＴ３抗ＣＤ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２と混合してフラスコ内で実施される。一部の実施形態において、細胞が別の成長チャンバーに移されるまで培地交換が行われる。一部の実施形態において、培地の２／３が新鮮培地による呼吸に置き換えられる。一部の実施形態において、別の成長チャンバーには、以下に更に十分に考察する通りのG-REXフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【０４９８】

[00517] 一実施形態において、第２の拡大培養（ＲＥＰと称される拡大培養を含む）が実施され、これは優れた腫瘍応答性に関してＴＩＬを選択するステップを更に含む。当技術分野において公知の任意の選択方法を用いることができる。例えば、その開示が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２０１６／００１００５８Ａ１号に記載されている方法は、優れた腫瘍反応性に関するＴＩＬの選択に使用され得る。

【０４９９】

[00518] 任意選択により、第２の拡大培養（ＲＥＰ拡大培養と称される拡大培養を含む）後、当技術分野において公知の標準アッセイを用いて細胞生存率アッセイを実施することができる。例えば、バルクＴＩＬのサンプルに対してトリパンブルー色素排除アッセイを行うことができ、これは、死細胞を選択的に標識して生存率の評価を可能にするものである。一部の実施形態では、Cellometer K2自動セルカウンター（Nexcelom Bioscience、Lawrence, MA）を使用してＴＩＬサンプルをカウントし、生存率を決定することができる。一部の実施形態では、生存率は、例えば、実施例１５に記載されるCellometer K2 Image Cytometer自動セルカウンタープロトコルに従って決定される。

【０５００】

［００５１９］　一部の実施形態において、ＴＩＬの第２の拡大培養（ＲＥＰと称される拡大培養を含む）は、先述の通りT-175フラスコ及びガス透過性バッグ（Tran KQ, Zhou J, Durflinger KH, et al., 2008, J Immunother., 31:742-751及びDudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, et al. 2003, J Immunother., 26:332-342）又はガス透過性G-Rexフラスコを使用して実施することができる。一部の実施形態において、第２の拡大培養は、フラスコを使用して実施される。一部の実施形態において、第２の拡大培養は、ガス透過性G-Rexフラスコを使用して実施される。一部の実施形態において、T-175フラスコで実施される第２の拡大培養及び約１×１０^{6}個のＴＩＬを約１５０ｍＬの培地中に懸濁し、これを各T-175フラスコに加える。ＴＩＬは、「フィーダー」細胞としての照射（５０Ｇｙ）された同種異系ＰＢＭＣと１：１００の比で培養し、及び細胞は、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３を補充したＣＭとAIM-V培地との１：１混合物（５０／５０培地）で培養した。T-175フラスコは５％ＣＯ$_{2}$下３７℃でインキュベートする。一部の実施形態において、培地は、５日目に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む５０／５０培地を使用して交換される。一部の実施形態において、７日目、２つのT-175フラスコからの細胞を３Ｌバッグに合わせ、その３００ｍＬのＴＩＬ懸濁液に、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む３００ｍＬのAIM-Vを加える。毎日又は２日毎に各バッグの細胞数を計数し得、新鮮培地を加えて細胞数を約０．５～約２．０×１０^{6}細胞／ｍＬに保ち得る。

【０５０１】

［００５２０］　一部の実施形態において、第２の拡大培養（ＲＥＰと称される拡大培養を含む）は、１００ｃｍ^{2}ガス透過性シリコン底の５００ｍＬ容量フラスコ（G-Rex 100、Wilson Wolf）において実施され（図１）、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３を補充した４００ｍＬの５０／５０培地中で約５×１０^{6}又は１０×１０^{6}個のＴＩＬを照射同種異系ＰＢＭＣと１：１００の比で培養する。G-Rex 100フラスコは５％ＣＯ$_{2}$下３７℃でインキュベートされる。一部の実施形態において、５日目に、２５０ｍＬの上清を取り出して遠心ボトルに入れ、１５００ｒｐｍ（４９１ｇ）で１０分間遠心する。次に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬの新鮮５０／５０培地にＴＩＬペレットを再懸濁し、元のG-Rex100フラスコに加え戻し得る。ＴＩＬがG-Rex100フラスコ内で連続的に拡大培養される実施形態において、７日目に各G-Rex100内のＴＩＬを各フラスコ内に存在する３００ｍＬの培地に懸濁し、及び細胞懸濁液を３つの１００ｍＬアリコートに分割しており、それらを３つのG-Rex100フラスコの播種に使用する。次に、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのAIM-Vを各フラスコに加える。G-Rex 100フラスコは５％ＣＯ$_{2}$下３７℃でインキュベートされ、４日後、各G-Rex100フラスコに３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのAIM-Vを加える。細胞は培養１４日目に回収される。

【０５０２】

［００５２１］　Ｔ及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られているが多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（結合）及びＣ（定数）の遺伝子セグメントは、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側での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリーの多様性を示し、増加させるＴＩＬを生成する方法を提供する。一部の実施形態において、本方法により得られたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。一部の実施形態において、第２の拡大培養で得られたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。一部の実施形態において、多様性の増加は、免疫グロブリンの多様性及び／又はＴ細胞受容体の多様性の増加である。一部の実施形態において、免疫グロブリンの多様性は、免疫グロブリン重鎖にある。一部の実施形態において、免疫グロブリンの多様性は、免疫グロブリン軽鎖にある。一部の実施形態において、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。一部の実施形態において、多様性は、α、β、γ及びδ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体の１つにある。一部の実施形態において、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α及び／又はβの発現が増加

する。一部の実施形態において、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）αの発現が増加する。一部の実施形態において、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）βの発現が増加する。一部の実施形態において、ＴＣＲａｂ（即ちＴＣＲα／β）の発現が増加する。

【０５０３】

［００５２２］一部の実施形態において、第２の拡大培養培地（例えば、ＣＭ２又は第２の細胞培養培地と称されることもある）は、以下で更に詳細に考察する通り、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３並びに抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。

【０５０４】

［００５２３］一部の実施形態において、第２の拡大培養、例えば図９によるステップＤは、閉鎖系バイオリアクターで実施される。一部の実施形態において、本明細書に記載される通り、ＴＩＬ拡大培養のために閉鎖系が用いられる。一部の実施形態において、単一のバイオリアクターが用いられる。一部の実施形態において、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、G-REX-10又はG-REX-100である。一部の実施形態において、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【０５０５】

１．フィーダー細胞及び抗原提示細胞

［００５２４］一実施形態において、本明細書に記載の第２の拡大培養手順（例えば、図９のステップＤに記載された拡大培養並びにＲＥＰと称される拡大培養を含む）は、ＲＥＰ　ＴＩＬ拡大培養中及び／又は第２の拡大培養中に過剰量のフィーダー細胞が必要である。多くの実施形態において、フィーダー細胞は、健常供血者からの標準的な全血ユニットから得られる末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ficoll-Paque勾配分離などの標準方法を用いて得られる。

【０５０６】

［００５２５］一般に、同種異系ＰＢＭＣは、照射又は熱処理のいずれかにより不活性化され、同種異系ＰＢＭＣの複製能力を評価するための例示的なプロトコルを提供する実施例、特に実施例１４に記載されるように、ＲＥＰ手順で使用される。

【０５０７】

［００５２６］一部の実施形態において、１４日目の生細胞の総数がＲＥＰの０日目及び／又は第２の拡大培養の０日目に培養（即ち第２の拡大培養の開始日）に移行した初期生細胞数より少ない場合、ＰＢＭＣは、複製不能と見なされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡大培養手順での使用が認められる。例えば、実施例１４を参照されたい。

【０５０８】

［００５２７］一部の実施形態において、ＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、７日目及び１４日目に、ＲＥＰの０日目及び／又は第２の拡大培養の０日目（即ち第２の拡大培養の開始日）に培養に移行した初期生細胞数から増加していない場合、ＰＢＭＣは、複製不能と見なされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡大培養手順での使用が認められる。一部の実施形態において、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。例えば、実施例１３を参照されたい。

【０５０９】

［００５２８］一部の実施形態において、ＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、７日目及び１４日目に、ＲＥＰの０日目及び／又は第２の拡大培養の０日目（即ち第２の拡大培養の開始日）に培養に移行した初期生細胞数から増加していない場合、ＰＢＭＣは、複製不能と見なされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡大培養手順での使用が認められる。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、５～６０ｎｇ／ｍｌのＯＫＴ３抗体及び１０００～６０００ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、１０～５０ｎｇ／ｍｌのＯＫＴ３抗体及び２０００～５０００ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、２０～４０ｎｇ／ｍｌのＯＫＴ３抗体及び２０００～４０００ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、２５～３５ｎｇ／ｍｌのＯＫＴ３抗

体及び２５００～３５００ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２の存在下で培養される。
【０５１０】
［００５２９］一部の実施形態において、抗原提示フィーダー細胞は、ＰＢＭＣである。一部の実施形態において、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。一実施形態において、第２の拡大培養におけるＴＩＬと抗原提示フィーダー細胞との比は、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又は約１：５００である。一実施形態において、第２の拡大培養におけるＴＩＬと抗原提示フィーダー細胞との比は、１：５０～１：３００である。一実施形態において、第２の拡大培養におけるＴＩＬと抗原提示フィーダー細胞との比は、１：１００～１：２００である。
【０５１１】
［００５３０］ある実施形態において、本明細書に記載の第２の拡大培養手順は、約２．５×10^9個のフィーダー細胞と約１００×10^6個のＴＩＬの比を必要とする。別の実施形態において、本明細書に記載の第２の拡大培養手順は、約２．５×10^9個のフィーダー細胞と約５０×10^6個のＴＩＬの比を必要とする。更に別の実施形態において、本明細書に記載の第２の拡大培養手順は、約２．５×10^9個のフィーダー細胞と約２５×10^6個のＴＩＬを必要とする。
【０５１２】
［００５３１］一実施形態において、本明細書に記載の第２の拡大培養手順は、第２の拡大培養中に過剰量のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態において、フィーダー細胞は、健常供血者からの標準的な全血ユニットから得られる末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ficoll-Paque勾配分離などの標準方法を用いて得られる。一実施形態において、ＰＢＭＣの代わりに人工抗原提示（ａＡＰＣ）細胞が使用される。
【０５１３】
［００５３２］一般に、同種異系ＰＢＭＣは、照射又は熱処理のいずれかによって不活性化され、図４、５及び９に記載された例示的な手順を含む、本明細書に記載されたＴＩＬ拡大培養手順で使用される。
【０５１４】
［００５３３］一実施形態において、人工抗原提示細胞は、ＰＢＭＣの代替として又はそれと組み合わせて、第２の拡大培養で使用される。
【０５１５】
２．サイトカイン
［００５３４］本明細書に記載の拡大培養方法は、一般に、当技術分野において公知の通り、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。
【０５１６】
［００５３５］代わりに、ＴＩＬの急速拡大培養及び／又は第２の拡大培養にサイトカインの組み合わせを使用することが更に可能であり、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の２つ以上の組み合わせについては、概して国際公開第２０１５／１８９３５６号及び国際公開第２０１５／１８９３５７号（参照により全体として明示的に本明細書に組み込まれる）に概説される通りである。従って、可能な組み合わせとしては、ＩＬ－２とＩＬ－１５、ＩＬ－２とＩＬ－２１、ＩＬ－１５とＩＬ－２１とＩＬ－２、ＩＬ－１５とＩＬ－２１が挙げられ、後者には多くの実施形態において特定の使用が見出される。これらの明細書に記載される通り、サイトカインの組み合わせを使用することは、特にリンパ球、詳細にはＴ細胞の生成に有利である。
【０５１７】
３．抗ＣＤ３抗体
［００５３６］一部の実施形態において、本明細書に記載の拡大培養方法で使用される培養培地（ＲＥＰと称されるものを含み、例えば図９を参照されたい）は、抗ＣＤ３抗体も含む。抗ＣＤ３抗体をＩＬ－２と併用すると、ＴＩＬ集団においてＴ細胞活性化及び細胞

分裂が誘導される。この効果は、完全長抗体並びにＦａｂ及びＦ（ａｂ’）２断片で見ることができ、前者が概して好ましく；例えばTsoukas et al., J. Immunol. 1985, 135, 1719（参照により全体として本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【０５１８】

[00537] 当業者が理解し得る通り、本発明において使用が見出される好適な抗ヒトＣＤ３抗体は、限定はされないが、ネズミ科動物、ヒト、霊長類、ラット及びイヌ科動物抗体を含めた、様々な哺乳類からの抗ヒトＣＤ３ポリクローナル及びモノクローナル抗体を含め、幾つも存在する。詳細な実施形態において、ＯＫＴ３抗ＣＤ３抗体が使用される（Ortho-McNeil、Raritan, NJ又はMiltenyi Biotech、Auburn, CAから市販されている）。

【０５１９】

[00538] 一部の実施形態において、ＯＫＴ３などの抗ＣＤ３抗体は、エレクトロポレーションステップの２日、３日、４日又は５日前にＴＩＬ培養物に添加され得る。一部の実施形態において、ＯＫＴ３などの抗ＣＤ３抗体は、エレクトロポレーションステップの直前に添加され得る。一部の実施形態において、ＯＫＴ３などの抗ＣＤ３抗体は、エレクトロポレーションステップの直後に添加され得る。一部の実施形態において、ＯＫＴ３などの抗ＣＤ３抗体は、エレクトロポレーションステップの２日、３日、４日又は５日後に添加され得る。

【０５２０】

４．　４－１ＢＢ及びＯＸ４０アゴニスト

[00539] 一実施形態によれば、細胞培養培地は、第１の拡大培養、第２の拡大培養又は両方中、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）アゴニスト及び／又はＯＸ４０アゴニストを更に含む。遺伝子編集は、４－１ＢＢアゴニスト及び／又はＯＸ４０アゴニストが細胞培養培地に導入された後に実行され得る。代わりに、遺伝子編集は、４－１ＢＢアゴニスト及び／又はＯＸ４０アゴニストが細胞培養培地に導入される前に実行され得る。

【０５２１】

[00540] ４－１ＢＢアゴニストは、当技術分野で公知の任意の４－１ＢＢ結合分子であり得る。４－１ＢＢ結合分子は、ヒト又は哺乳類４－１ＢＢに結合できるモノクローナル抗体又は融合タンパク質であり得る。４－１ＢＢアゴニスト又は４－１ＢＢ結合分子は、免疫グロブリン分子の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）又はサブクラスの免疫グロブリン重鎖を含み得る。４－１ＢＢアゴニスト又は４－１ＢＢ結合分子は、重鎖及び軽鎖の両方を有し得る。本明細書で使用される場合、結合分子という用語は、抗体（全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト、ヒト化又はキメラ抗体並びに抗体断片、例えばＦａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）断片、Ｆａｂ発現ライブラリーにより産生される断片、上記のいずれかのエピトープ結合断片及び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。一実施形態において、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。一実施形態において、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。一部の実施形態において、本開示の方法及び組成物における使用のための４－１ＢＢアゴニストは、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、単鎖抗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、コンジュゲート、変異体若しくはバイオシミラーを含む。アゴニスト性抗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。好ましい実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、アゴニスト性、抗４－１ＢＢヒト化又は完全ヒトモノクローナル抗体（即ち単一細胞株に由来する抗体）である。一実施形態において、４－１

ＢＢアゴニストは、ＥＵ－１０１（Eutilex Co. Ltd.）、ウトミルマブ若しくはウレルマブ又はそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、変異体若しくはバイオシミラーである。好ましい一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブ又はウレルマブ又はそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、変異体若しくはバイオシミラーである。

【０５２２】

［００５４１］好ましい実施形態において、４－１ＢＢアゴニスト又は４－１ＢＢ結合分子は、融合タンパク質でもあり得る。好ましい実施形態において、三量体又は六量体４－１ＢＢアゴニスト（３つ又は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、典型的には２つのリガンド結合ドメインを保有するアゴニスト性モノクローナル抗体と比較して、優れた受容体（４－１ＢＢＬ）の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、任意選択によりこれらの融合タンパク質の２つ以上を更に連結する、三量体（三価）又は六量体（又は六価）又はそれより大きい融合タンパク質は、例えば、Gieffers, et al., Mol.Cancer Therapeutics 2013, 12, 2735-47に記載される。

【０５２３】

［００５４２］アゴニスト性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。好ましい実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、毒性を低減するのに十分な方法で４－１ＢＢ抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体又は融合タンパク質である。一部の実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）、例えばＮＫ細胞の細胞傷害性を抑制する、アゴニスト性４－１ＢＢモノクローナル抗体又は融合タンパク質である。一部の実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）を抑制する、アゴニスト性４－１ＢＢモノクローナル抗体又は融合タンパク質である。一部の実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、補体依存性細胞毒性（ＣＤＣ）を抑制する、アゴニスト性４－１ＢＢモノクローナル抗体又は融合タンパク質である。一部の実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、Ｆｃ領域機能性を抑制する、アゴニスト性４－１ＢＢモノクローナル抗体又は融合タンパク質である。

【０５２４】

［００５４３］一部の実施形態において、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９）に結合することを特徴とする。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、ヒト４－１ＢＢ（配列番号９）に結合する結合分子である。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、マウス４－１ＢＢ（配列番号１０）に結合する結合分子である。４－１ＢＢアゴニスト又は結合分子が結合する４－１ＢＢ抗原のアミノ酸配列を表３に概括する。

【０５２５】

【表４】

表3. 4-1BB抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列(1文字のアミノ酸記号)
配列番号9 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 (ヒト(Homo sapiens))	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRFPEEEE GGCEL 255
配列番号10 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 (マウス(Mus musculus))	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 60 CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG 180 GHSLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKTT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGGYEL 256

【０５２６】
［００５４４］一部の実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約１００ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約９０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約８０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約７０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約６０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約５０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約４０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、又は約３０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウス４－１ＢＢに結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。
【０５２７】
［００５４５］一部の実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約７．５×10^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約７．５×10^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約８×10^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約８．５×10^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約９×10^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約９．５×10^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、又は約１×10^6　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。
【０５２８】
［００５４６］一部の実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約２×10^{-5}　１／ｓ以下のk_{dissoc}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約２．１×10^{-5}　１／ｓ以下のk_{dissoc}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約２．２×10^{-5}　１／ｓ以下のk_{dissoc}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約２．３×10^{-5}　１／ｓ以下のk_{dissoc}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約２．４×10^{-5}　１／ｓ以下のk_{dissoc}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約２．５×10^{-5}　１／ｓ以下のk_{dissoc}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約２．６×10^{-5}　１／ｓ以下のk_{dissoc}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、又は約２．７×10^{-5}　１／ｓ以下のk_{dissoc}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約２．８×10^{-5}　１／ｓ以下のk_{dissoc}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約２．９×10^{-5}　１／ｓ以下のk_{dissoc}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、又は約３×10^{-5}　１／ｓ以下のk_{dissoc}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。
【０５２９】
［００５４７］一部の実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約１０ｎＭ以下のIC_{50}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約９ｎＭ以下のIC_{50}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約８ｎＭ以下のIC_{50}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約７ｎＭ以下のIC_{50}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約６ｎＭ以下のIC_{50}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約５ｎＭ以下のIC_{50}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約４ｎＭ以下のIC_{50}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約３ｎＭ以下のIC_{50}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約２ｎＭ以下のIC_{50}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、又は約１ｎＭ以下のIC_{50}でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。
【０５３０】
［００５４８］好ましい実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、ＰＦ－０５０８２５６６又はＭＯＲ－７４８０としても知られるウトミルマブ又はその断片、誘導体、変異体若しくはバイオシミラーである。ウトミルマブはPfizer, Inc.から入手できる。ウトミルマブは、免疫グロブリンＧ２－ラムダ、抗［ヒト（Homo sapiens）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）］、ヒト（Homo sapiens）（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４に示す。ウトミルマブは、Ａｓｎ５９及びＡｓｎ２９２のグリコシル化部位；位置２２－９６（V_H－V_L）、１４３－１９９（C_H1－C_L）、２５６－３１６（C_H2）及び３６２－４２０（C_H3）の重鎖内ジスルフィド架橋；位置２２’－８７’（$_HV$－V_L）及び１３６’－１９５’（$_HC1$－C_L）の軽鎖内ジスルフィド架橋；ＩｇＧ２Ａアイソフォーム位置２１８－２１８、２１９－２１９、２２２－２２２及び２２５－２２５、ＩｇＧ２Ａ／Ｂアイソフォーム位置２１８－１３０、２１９－２１９、２２２－２２２及び２２５－２２５並びにＩｇＧ２Ｂアイソフォーム位置２１９－１３０（２）、２２２－２２２及び２２５－２２５の鎖内重鎖－重鎖ジスルフィド架橋；ＩｇＧ２Ａアイソフォーム位置１３０－２１３’（２）、ＩｇＧ２Ａ／Ｂアイソフォーム位置２１８－２１３’及び１３０－２１３’並びにＩｇＧ２Ｂアイソフォーム位置２１８－２１３’（２）の鎖内重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウトミルマブ並びにその変異体及び断片の調製並びに特性は、米国特許第８，８２１，８６７号；第８，３３７，８５０号；及び第９，４６８，６７８号並びに国際公開第２０１２／０３２４３３　Ａ１号に記載され、これらのそれぞれの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。ウトミルマブの前臨床的特徴は、Fisher, et al., Cancer Immunolog. & Immunother.2012, 61, 1721-33に記載される。様々な血液学的及び固形腫瘍の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Clinicaltrials.gov識別子ＮＣＴ０２４４４７９３、ＮＣＴ０１３０７２６７、ＮＣＴ０２３１５０６６及びＮＣＴ０２５５４８１２が含まれる。

【０５３１】

［００５４９］　一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、配列番号１１で示される重鎖及び配列番号１２で示される軽鎖を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１１及び配列番号１２に示される配列を有する重鎖及び軽鎖又は抗原結合断片、Ｆａｂ断片、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、それらの変異体若しくはコンジュゲートを含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１１及び配列番号１２に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１１及び配列番号１２に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１１及び配列番号１２に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１１及び配列番号１２に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１１及び配列番号１２に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【０５３２】

［００５５０］　一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲ又は可変領域（ＶＲ）を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニスト重鎖可変領域（V_H）は配列番号１３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１４に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１３及び配列番号１４に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１３及び配列番号１４に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１３及び配列番号１４に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１３及び配列番号１４に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１３及び配列番号１４に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴ

ニストは、配列番号１３及び配列番号１４に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含むｓｃＦｖ抗体を含む。

【０５３３】

［００５５１］　一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１５、配列番号１６及び配列番号１７に記載の配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換並びにそれぞれ配列番号１８、配列番号１９及び配列番号２０に記載の配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにそれらの保存的アミノ酸置換を含む。

【０５３４】

［００５５２］　一実施形態において、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。一実施形態において、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤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％又は１００％の配列同一性を有し、参照医薬品又は参照生物学的製剤と比較して１つ以上の翻訳後改変を含む、アミノ酸配列を含む４－１ＢＢ抗体を含み、ここで、参照医薬品又は参照生物学的製剤はウトミルマブである。一部の実施形態において、１つ以上の翻訳後改変は、グリコシル化、酸化、脱アミド化及び切断の１つ以上から選択される。一部の実施形態において、バイオシミラーは、認可された又は認可のために提出された４－１ＢＢアゴニスト抗体であり、４－１ＢＢアゴニスト抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤の製剤と異なる製剤で提供され、参照医薬品又は参照生物学的製剤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／又は欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されていることがあり得る。一部の実施形態において、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、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤はウトミルマブである。一部の実施形態において、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、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤はウトミルマブである。

【０５３５】

【表５】

表4. 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(1文字のアミノ酸記号)	
配列番号11 ウトミルマブの重鎖	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTNY SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G	60 120 180 240 300 360 420 441
配列番号12 ウトミルマブの軽鎖	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS	60 120 180 214
配列番号13 ウトミルマブの 重鎖可変領域	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
配列番号14 ウトミルマブの 軽鎖可変領域	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL	60 108
配列番号15 ウトミルマブの 重鎖CDR1	STYWIS	6
配列番号16 ウトミルマブの 重鎖CDR2	KIYPGDSYTN YSPSFQG	17
配列番号17 ウトミルマブの 重鎖CDR3	RGYGIFDY	8
配列番号18 ウトミルマブの 軽鎖CDR1	SGDNIGDQYA H	11
配列番号19 ウトミルマブの 軽鎖CDR2	QDKNRPS	7
配列番号20 ウトミルマブの 軽鎖CDR3	ATYTGFGSLA V	11

【０５３６】

［００５５３］好ましい実施形態において、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又はその断片、誘導体、変異体若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.から入手できる。ウレルマブは、免疫グロブリンＧ４－カッパ、抗［ヒト（Homo sapiens）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）］、ヒト（Homo sapiens）（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５に示す。ウレルマブは、位置２９８（及び２９８’’）のＮ－グリコシル化部位；位置２２－９５（V_H-V_L）、１４８－２０４（C_H1-C_L）、２６２－３２２（C_H2）及び３６８－４２６（C_H3）（並びに位置２２’’－９５’’、１４８’’－２０４’’、２６２’’－３２２’’及び３６８’’－４２６’’）の重鎖内ジスルフィド架橋；位置２３’－８８’（V_H-V_L）及び１３６’－１９６’（C_H1-C_L）（並びに位置２３’’’－８８’’’及び１３６’’’－１９６’’’）の軽鎖内ジスルフィド架橋；位置２２７－２２７’’及び２３０－２３０’’の鎖内重鎖－重鎖ジスルフィド架橋；並びに位置１３５－２１６’及び１３５’’－２１６’’’の鎖内重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウレルマブ並びにその変異体及び断片の調製及び特性は、米国特許第７，２８８，６３８号及び第８，９６２，８０４号に記載され、その開示は、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的及び臨床的特徴は、http:/dx.doi.org/ 10.1158/1078-0432.CCR-16-1272で入手可能なSegal, et al., Clin.Cancer Res.2016に記載される。様々な血液学的及び

固形腫瘍の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Clinicaltrials.gov識別子ＮＣＴ０１７７５６３１、ＮＣＴ０２１１００８２、ＮＣＴ０２２５３９９２及びＮＣＴ０１４７１２１０が含まれる。

【０５３７】

［００５５４］　一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、配列番号２１で示される重鎖及び配列番号２２で示される軽鎖を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２１及び配列番号２２に示される配列を有する重鎖及び軽鎖又は抗原結合断片、Ｆａｂ断片、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、それらの変異体若しくはコンジュゲートを含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２１及び配列番号２２に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２１及び配列番号２２に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２１及び配列番号２２に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２１及び配列番号２２に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２１及び配列番号２２に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【０５３８】

［００５５５］　一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲ又は可変領域（ＶＲ）を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニスト重鎖可変領域（V_H）は配列番号２３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２４に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２３及び配列番号２４に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２３及び配列番号２４に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２３及び配列番号２４に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２３及び配列番号２４に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２３及び配列番号２４に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、配列番号２３及び配列番号２４に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含むｓｃＦｖ抗体を含む。

【０５３９】

［００５５６］　一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２５、配列番号２６及び配列番号２７に記載の配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換並びにそれぞれ配列番号２８、配列番号２９及び配列番号３０に記載の配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換を含む。

【０５４０】

［００５５７］　一実施形態において、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。一実施形態において、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤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％又は１００％の配列同一性を有し、参照医薬品又は参照生物学的製剤と比較して１つ以上の翻訳後改変を含む、アミノ酸配列を含む４－１ＢＢ抗体を含み、ここで、参照医薬品又は参照生物学的製剤はウレルマブである。一部の実施形態において、１つ以上の翻訳後改変は、グリコシル化、酸化、脱アミド化及び切断の１つ以上から選択される

。一部の実施形態において、バイオシミラーは、認可された又は認可のために提出された４－１ＢＢアゴニスト抗体であり、４－１ＢＢアゴニスト抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤の製剤と異なる製剤で提供され、参照医薬品又は参照生物学的製剤はウレルマブである。４－１ＢＢアゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／又は欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されていることがあり得る。一部の実施形態において、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、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤はウレルマブである。一部の実施形態において、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、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤はウレルマブである。

【０５４１】

【表６】

表5. 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(1文字のアミノ酸記号)	
配列番号21 ウレルマブの重鎖	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN PSLESRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 448
配列番号22 ウレルマブの軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC	60 120 180 216
配列番号23 ウレルマブの 可変重鎖	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP	60 120
配列番号24 ウレルマブの 可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ	60 110
配列番号25 ウレルマブの 重鎖CDR1	GYYWS	5
配列番号26 ウレルマブの 重鎖CDR2	EINHGGYVTY NPSLES	16
配列番号27 ウレルマブの 重鎖CDR3	DYGPGNYDWY FDL	13
配列番号28 ウレルマブの 軽鎖CDR1	RASQSVSSYL A	11
配列番号29 ウレルマブの 軽鎖CDR2	DASNRAT	7
配列番号30 ウレルマブの 軽鎖CDR3	QQRSDWPPAL T	11

【０５４２】

［００５５８］一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、１Ｄ８、３Ｅｌｏｒ、４Ｂ４（BioLegend 309809）、Ｈ４－１ＢＢ－Ｍ１２７（BD Pharmingen 552532）、ＢＢＫ２（Thermo Fisher MS621PABX）、１４５５０１（Leinco Technologies B591）、ＡＴＣＣ番号ＨＢ－１１２４８として寄託され、米国特許第６，９７４，８６３号に開示されている細胞株によって産生される抗体、５Ｆ４（BioLegend 311503）、Ｃ６５－４８５（BD Pharmingen 559446）、米国特許出願公開第２００５／００９５２４４号に開示されている抗体、米国特許第７，２８８，６３８号に開示

されている抗体（２０Ｈ４．９－ＩｇＧｌ（ＢＭＳ－６６３０３１）など）、同第６，８８７，６７３号に開示されている抗体（４Ｅ９又はＢＭＳ－５５４２７１など）、同第７，２１４，４９３号に開示されている抗体、同第６，３０３，１２１号に開示されている抗体、同第６，５６９，９９７号に開示されている抗体、同第６，９０５，６８５号に開示されている抗体（４Ｅ９又はＢＭＳ－５５４２７１など）、同第６，３６２，３２５号に開示されている抗体（１Ｄ８又はＢＭＳ－４６９４９２；３Ｈ３又はＢＭＳ－４６９４９７；又は３Ｅｌなど）、同第６，９７４，８６３号に開示されている抗体（５３Ａ２など）；同第６，２１０，６６９号に開示されている抗体（１Ｄ８、３Ｂ８又は３Ｅ１など）、同第５，９２８，８９３号に記載されている抗体、同第６，３０３，１２１号に開示されている抗体、同第６，５６９，９９７号に開示されている抗体、国際公開第２０１２／１７７７８８号、同第２０１５／１１９９２３号及び同第２０１０／０４２４３３号に開示されている抗体並びにそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、変異体又はバイオシミラー、からなる群から選択され、ここで、前述の特許又は特許出願公開のそれぞれの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０５４３】

［00559］一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、国際公開第２００８／０２５５１６　Ａ１号、同第２００９／００７１２０　Ａ１号、同第２０１０／００３７６６　Ａ１号、同第２０１０／０１００５１　Ａ１号及び同第２０１０／０７８９６６　Ａ１号；米国特許出願公開第２０１１／００２７２１８　Ａ１号、同第２０１５／０１２６７０９　Ａ１号、同第２０１１／０１１１４９４　Ａ１号、同第２０１５／０１１０７３４　Ａ１号及び同第２０１５／０１２６７１０　Ａ１号；並びに米国特許第９，３５９，４２０号、同第９，３４０，５９９号、同第８，９２１，５１９号及び同第８，４５０，４６０号に記載されている４－１ＢＢアゴニスト性融合タンパク質であり、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０５４４】

［00560］一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、図２２の構造Ｉ－Ａ（Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）又は構造Ｉ－Ｂ（Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）に示される４－１ＢＢアゴニスト性融合タンパク質又はその断片、誘導体、コンジュゲート、変異体若しくはバイオシミラーである。

【０５４５】

［00561］図２２の構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂにおいて、円柱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又は４－１ＢＢに結合する抗体に由来する、３つの直鎖状に連結されたＴＮＦＲＳＦ結合ドメインを含み、これは、折り畳まれて三価タンパク質を形成し、次いでＩｇＧ１－Ｆｃ（C_H3及びC_H2ドメインを含む）を介して第２の三価タンパク質に連結され、次いで、これは、ジスルフィド結合（小さい細長い楕円形）を介して２つの三価タンパク質を連結するために使用され、構造を安定化し、６つの受容体の細胞内シグナル伝達ドメイン及びシグナル伝達タンパク質を合わせてシグナル伝達複合体を形成できるアゴニストを提供する。円柱として示されるＴＮＦＲＳＦ結合ドメインは、例えば、親水性残基、並びに柔軟性のためのＧｌｙ及びＳｅｒ配列、並びに溶解性のためのＧｌｕ及びＬｙｓを含み得るリンカーにより接続されたV_H及びV_L鎖を含むｓｃＦｖドメインであり得る。de Marco, Microbial Cell Factories, 2011, 10, 44；Ahmad, et al., Clin. & Dev.Immunol.2012, 980250；Monnier, et al., Antibodies, 2013, 2, 193-208；又は本明細書の別の箇所に組み込まれた参考文献に記載されてい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、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０５４６】

［00562］構造Ｉ－Ａの他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表６に示す。Ｆｃドメインは、好ましくは、完全定常ドメイン（配列番号３１のアミノ酸１７～２３０）

、完全ヒンジドメイン（配列番号３１のアミノ酸１～１６）又はヒンジドメインの一部（例えば、配列番号３１のアミノ酸４～１６）を含む。Ｃ末端Ｆｃ抗体を接続するための好ましいリンカーは、追加的ポリペプチドの融合に適したリンカーを含む、配列番号３２～配列番号４１に示される実施形態から選択され得る。

【０５４７】

【表７】

表6. C末端Fc抗体断片融合タンパク質設計(構造I-A)を伴う、4-1BB融合タンパク質を含むTNFRSF融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列(1文字のアミノ酸記号)	
配列番号31 Fcドメイン	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 230
配列番号32 リンカー	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
配列番号33 リンカー	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
配列番号34 リンカー	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
配列番号35 リンカー	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
配列番号36 リンカー	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
配列番号37 リンカー	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
配列番号38 リンカー	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE	24
配列番号39 リンカー	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE	23
配列番号40 リンカー	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E	21
配列番号41 リンカー	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE	25

【０５４８】

［００５６３］　構造Ｉ－Ｂの他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表７に示す。構造Ｉ－ＢのようにＦｃ抗体断片がＴＮＲＦＳＦ融合タンパク質のＮ末端に融合される場合、Ｆｃモジュールの配列は好ましくは配列番号４２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４３～配列番号４５に示される実施形態から選択される。

【０５４９】

【表８】

表7. N末端Fc抗体断片融合タンパク質設計(構造I-B)を伴う、4-1BB融合タンパク質を含むTNFRSF融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列(1文字のアミノ酸記号)	
配列番号42 Fcドメイン	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	60 120 180 240 246
配列番号43 リンカー	SGSGSGSGSG S	11
配列番号44 リンカー	SSSSSSGSGS GS	12
配列番号45 リンカー	SSSSSSGSGS GSGSGS	16

【０５５０】

［００５６４］　一実施形態において、図２２の構造Ｉ－Ａ又は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８に記載されている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、上記の可変重鎖及び可変軽鎖の任意の組み合わせ並びにそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、変異体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。

【０５５１】

［００５６５］　一実施形態において、図２２の構造Ｉ－Ａ又はＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、４－１ＢＢＬ配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、配列番号４６による配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、可溶性４－１ＢＢＬ配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、配列番号４７による配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。

【０５５２】

［００５６６］　一実施形態において、図２２の構造Ｉ－Ａ又はＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、それぞれ配列番号１３及び配列番号１４に示される配列とそれぞれ少なくとも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４－１ＢＢ結合ドメインを含み、ここで、V_H及びV_Lドメインはリンカーによって接続されている。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、それぞれ配列番号２３及び配列番号２４に示される配列とそれぞれ少なくとも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４－１ＢＢ結合ドメインを含み、ここで、V_H及びV_Lドメインはリンカーによって接続されている。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、表８に示されるV_H及びV_L配列とそれぞれ少なくとも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４－１ＢＢ結合ドメインを含み、ここで、V_H及びV_Lドメインはリンカーによって接続されている。

【０５５３】

【表９】

表8. 融合タンパク質の4-1BB結合ドメインとして、又はscFv 4-1BBアゴニスト抗体として有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列(1文字のアミノ酸記号)	
配列番号46 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE	60 120 180 240 254
配列番号47 4-1BBL可溶性ドメイン	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE	60 120 168
配列番号48 4B4-1-1バージョン1の可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS	60 118
配列番号49 4B4-1-1バージョン1の可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号50 4B4-1-1バージョン2の可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA	60 119
配列番号51 4B4-1-1バージョン2の可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR	60 108
配列番号52 H39E3-2の可変重鎖	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT	60 120
配列番号53 H39E3-2の可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA	60 110

【０５５４】

［００５６７］一実施形態において、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アゴニスト性単鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／又はＣ末端に追加的なドメインを更に含み、ここで、追加的なドメインは、Ｆａｂ又はＦｃ断片ドメインである。一実施形態において、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アゴニスト性単鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／又はＣ末端に追加的なドメインを更に含み、ここで、追加的なドメインは、Ｆａｂ又はＦｃ断片ドメインであり、可溶性４－１ＢＢドメインのそれぞれは、ストーク領域（三量体化に寄与し、細胞膜まで一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。

【０５５５】

［００５６８］一実施形態において、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アゴニスト性単鎖融合ポリペプチドであり、ここで、可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインのそれぞれは、ストーク領域を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは、独立して３～８アミノ酸長を有し、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。
【０５５６】
［00569］一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、前述のV_Lドメインのいずれかに連結された前述のV_Hドメインのいずれかを含む４－１ＢＢアゴニスト性ｓｃＦｖ抗体である。
【０５５７】
［00570］一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、BPS Bioscience４－１ＢＢアゴニスト抗体カタログ番号７９０９７－２であり、これはBPS Bioscience, San Diego, CA, USAから市販されている。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、Creative Biolabs４－１ＢＢアゴニスト抗体カタログ番号ＭＯＭ－１８１７９であり、これはCreative Biolabs, Shirley, NY, USAから市販されている。
【０５５８】
［00571］ＯＸ４０（ＣＤ１３４）アゴニストは、当技術分野で公知の任意のＯＸ４０結合分子であり得る。ＯＸ４０結合分子は、ヒト又は哺乳類ＯＸ４０に結合できるモノクローナル抗体又は融合タンパク質であり得る。ＯＸ４０アゴニスト又はＯＸ４０結合分子は、免疫グロブリン分子の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）又はサブクラスの免疫グロブリン重鎖を含み得る。ＯＸ４０アゴニスト又はＯＸ４０結合分子は、重鎖及び軽鎖の両方を有し得る。本明細書で使用される場合、結合分子という用語は、抗体（全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト、ヒト化又はキメラ抗体並びに抗体断片、例えばＦａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）断片、Ｆａｂ発現ライブラリーにより産生される断片、上記のいずれかのエピトープ結合断片及びＯＸ４０に結合する抗体の操作された形態、例えばｓｃＦｖ分子も含む。一実施形態において、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。一実施形態において、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。一部の実施形態において、本開示の方法及び組成物における使用のためのＯＸ４０アゴニストは、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、単鎖抗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、コンジュゲート、変異体若しくはバイオシミラーを含む。好ましい実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、アゴニスト性、抗ＯＸ４０ヒト化又は完全ヒトモノクローナル抗体（即ち単一細胞株に由来する抗体）である。
【０５５９】
［00572］好ましい実施形態において、ＯＸ４０アゴニスト又はＯＸ４０結合分子は、融合タンパク質でもあり得る。ＯＸ４０Ｌに融合した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。好ましい実施形態において、三量体又は六量体ＯＸ４０アゴニスト（３つ又は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、典型的には２つのリガンド結合ドメインを保有するアゴニスト性モノクローナル抗体と比較して、優れた受容体（ＯＸ４０Ｌ）の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、任意選択によりこれらの融合タンパク質の２つ以上を更に連結する、三量体（三価）又は六量体（又は六価）又はそれより大きい融合タンパク質は、例えば、Gieffers, et al., Mol.Cancer Therapeutics 2013, 12, 2735-47に記載される。
【０５６０】
［00573］アゴニスト性ＯＸ４０抗体及び融合タンパク質は、強い免疫応答を誘発することが知られている。Curti, et al., Cancer Res.2013, 73, 7189-98。好ましい実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、毒性を低減するのに十分な方法でＯＸ４０

抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体又は融合タンパク質である。一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）、例えばＮＫ細胞の細胞傷害性を抑制する、アゴニスト性ＯＸ４０モノクローナル抗体又は融合タンパク質である。一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）を抑制する、アゴニスト性ＯＸ４０モノクローナル抗体又は融合タンパク質である。一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、補体依存性細胞毒性（ＣＤＣ）を抑制する、アゴニスト性ＯＸ４０モノクローナル抗体又は融合タンパク質である。一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、Ｆｃ領域機能性を抑制する、アゴニスト性ＯＸ４０モノクローナル抗体又は融合タンパク質である。

【０５６１】

［００５７４］一部の実施形態において、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５４）に結合することを特徴とする。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、ヒトＯＸ４０（配列番号５４）に結合する結合分子である。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、マウスＯＸ４０（配列番号５５）に結合する結合分子である。ＯＸ４０アゴニスト又は結合分子が結合するＯＸ４０抗原のアミノ酸配列を表９に概括する。

【０５６２】

【表１０】

表9. OX40抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列(1文字のアミノ酸記号)	
配列番号54 ヒトOX40 (ヒト(Homo sapiens))	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI	60 120 180 240 277
配列番号55 マウスOX40 (マウス(Mus musculus))	MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI	60 120 180 240 272

【０５６３】

［００５７５］一部の実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約１００ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約９０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約８０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約７０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約６０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約５０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約４０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、又は約３０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウスＯＸ４０に結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【０５６４】

［００５７６］一部の実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約７．５×10^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約７．５×10^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約８×10^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約８．５×10^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約９×10^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約９．５×10^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、又は約１×10^6　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}でヒト又はマウスＯＸ４０に結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【０５６５】

［００５７７］一部の実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約２

×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約２．１×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約２．２×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約２．３×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約２．４×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約２．５×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約２．６×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、又は約２．７×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約２．８×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約２．９×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、又は約３×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【０５６６】

［００５７８］　一部の実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約１０ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約９ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約８ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約７ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約６ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約５ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約４ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約３ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約２ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、又は約１ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【０５６７】

［００５７９］　一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、ＭＥＤＩ０５６２又はＭＥＤＩ－０５６２としても知られるタボリキシズマブである。タボリキシズマブは、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ，Ｉｎｃの子会社ＭｅｄＩｍｍｕｎｅから入手できる。タボリキシズマブは、免疫グロブリンＧ１－カッパ、抗［ヒト（Ｈｏｍｏ ｓａｐｉｅｎｓ）ＴＮＦＲＳＦ４（腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーメンバー４、ＯＸ４０、ＣＤ１３４）］、ヒト化及びキメラモノクローナル抗体である。タボリキシズマブのアミノ酸配列を表１０に示す。タボリキシズマブは、フコシル化複合二分岐ＣＨＯ型グリカンを伴い位置３０１及び３０１’’のＮ－グリコシル化部位；位置２２－９５（$_{H}$Ｖ－Ｖ$_{L}$）、１４８－２０４（Ｃ$_{H}$１－Ｃ$_{L}$）、２６５－３２５（Ｃ$_{H}$２）及び３７１－４２９（Ｃ$_{H}$３）（並びに位置２２’’－９５’’、１４８’’－２０４’’、２６５’’－３２５’’及び３７１’’－４２９’’）の重スルフィド架橋；位置２３’－８８’（$_{H}$Ｖ－Ｖ$_{L}$）及び１３４’－１９４’（$_{H}$Ｃ１－Ｃ$_{L}$）（並びに位置２３’’’－８８’’’及び１３４’’’－１９４’’’）の軽鎖内ジスルフィド架位置２３０－２３０’及び２３３－２３３’’の鎖内重鎖－重鎖ジスルフィド架橋；並びに位置２２４－２１４’及び２２４’’－２１４’’’の鎖内重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。様々な固形腫瘍の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Ｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０２３１８３９４及びＮＣＴ０２７０５４８２が含まれる。

【０５６８】

［００５８０］　一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号５６で示される重鎖及び配列番号５７で示される軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５６及び配列番号５７に示される配列を有する重鎖及び軽鎖又は抗原結合断片、Ｆａｂ断片、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、それらの変異体若しくはコンジュゲートを含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５６及び配列番号５７に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５６及び配列番号５７に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５６及び配列番号５７に示される配列

とそれぞれ少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５６及び配列番号５７に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５６及び配列番号５７に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【０５６９】

［００５８１］　一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、タボリキシズマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲ又は可変領域（ＶＲ）を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は配列番号５８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５９に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５８及び配列番号５９に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５８及び配列番号５９に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５８及び配列番号５９に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５８及び配列番号５９に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５８及び配列番号５９に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号５８及び配列番号５９に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含むｓｃＦｖ抗体を含む。

【０５７０】

［００５８２］　一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６０、配列番号６１及び配列番号６２に記載の配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換並びにそれぞれ配列番号６３、配列番号６４及び配列番号６５に記載の配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換を含む。

【０５７１】

［００５８３］　一実施形態において、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。一実施形態において、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤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％又は１００％の配列同一性を有し、参照医薬品又は参照生物学的製剤と比較して１つ以上の翻訳後改変を含む、アミノ酸配列を含むＯＸ４０抗体を含み、ここで、参照医薬品又は参照生物学的製剤はタボリキシズマブである。一部の実施形態において、１つ以上の翻訳後改変は、グリコシル化、酸化、脱アミド化及び切断の１つ以上から選択される。一部の実施形態において、バイオシミラーは、認可された又は認可のために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤の製剤と異なる製剤で提供され、参照医薬品又は参照生物学的製剤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／又は欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されていることがあり得る。一部の実施形態において、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、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤はタボリキシズマブである。一部の実施形態において、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、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤はタボリキシズマブである。

【０５７２】

【表１１】

表10. タボリキシズマブに関連するOX40アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(1文字のアミノ酸記号)	
配列番号56 タボリキシズマブの重鎖	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	60 120 180 240 300 360 420 451
配列番号57 タボリキシズマブの軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
配列番号58 タボリキシズマブの 重鎖可変領域	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT	60 118
配列番号59 タボリキシズマブの 軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR	60 108
配列番号60 タボリキシズマブの 重鎖CDR1	GSFSSGYWN	9
配列番号61 タボリキシズマブの 重鎖CDR2	YIGYISYNGI TYH	13
配列番号62 タボリキシズマブの 重鎖CDR3	RYKYDYDGGH AMDY	14
配列番号63 タボリキシズマブの 軽鎖CDR1	QDISNYLN	8
配列番号64 タボリキシズマブの 軽鎖CDR2	LLIYYTSKLH S	11
配列番号65 タボリキシズマブの 軽鎖CDR3	QQGSALPW	8

【０５７３】

［００５８４］一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは１１Ｄ４であり、これはPfizer, Inc.から入手可能な完全ヒト抗体である。１１Ｄ４の調製及び特性は、米国特許第７，９６０，５１５号；同第８，２３６，９３０号；及び同第９，０２８，８２４号に記載され、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。１１Ｄ４のアミノ酸配列を表１１に示す。

【０５７４】

［００５８５］一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号６６で示される重鎖及び配列番号６７で示される軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６６及び配列番号６７に示される配列を有する重鎖及び軽鎖又は抗原結合断片、Ｆａｂ断片、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、それらの変異体若しくはコンジュゲートを含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６６及び配列番号６７に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６６及び配列番号６７に

示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６６及び配列番号６７に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６６及び配列番号６７に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６６及び配列番号６７に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【０５７５】

［００５８６］　一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、１１Ｄ４の重鎖及び軽鎖ＣＤＲ又は可変領域（ＶＲ）を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は配列番号６８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６９に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６８及び配列番号６９に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６８及び配列番号６９に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６８及び配列番号６９に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６８及び配列番号６９に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６８及び配列番号６９に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【０５７６】

［００５８７］　一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７０、配列番号７１及び配列番号７２に記載の配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換並びにそれぞれ配列番号７３、配列番号７４及び配列番号７５に記載の配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換を含む。

【０５７７】

［００５８８］　一実施形態において、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。一実施形態において、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤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％又は１００％の配列同一性を有し、参照医薬品又は参照生物学的製剤と比較して１つ以上の翻訳後改変を含む、アミノ酸配列を含むＯＸ４０抗体を含み、ここで、参照医薬品又は参照生物学的製剤は１１Ｄ４である。一部の実施形態において、１つ以上の翻訳後改変は、グリコシル化、酸化、脱アミド化及び切断の１つ以上から選択される。一部の実施形態において、バイオシミラーは、認可された又は認可のために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤の製剤と異なる製剤で提供され、参照医薬品又は参照生物学的製剤は１１Ｄ４である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／又は欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されていることがあり得る。一部の実施形態において、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、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤は１１Ｄ４である。一部の実施形態において、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、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤は１１Ｄ４である。

【０５７８】

【表１２】

表11. 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(1文字のアミノ酸記号)	
配列番号66 11D4の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPPCPAP PVAGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK	60 120 180 240 300 360 420 444
配列番号67 11D4の軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
配列番号68 11D4の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
配列番号69 11D4の軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK	60 107
配列番号70 11D4の重鎖CDR1	SYSMN	5
配列番号71 11D4の重鎖CDR2	YISSSSSTID YADSVKG	17
配列番号72 11D4の重鎖CDR3	ESGWYLFDY	9
配列番号73 11D4の軽鎖CDR1	RASQGISSWL A	11
配列番号74 11D4の軽鎖CDR2	AASSLQS	7
配列番号75 11D4の軽鎖CDR3	QQYNSYPPT	9

【０５７９】

［００５８９］一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは１８Ｄ８であり、これはPfizer, Inc.から入手可能な完全ヒト抗体である。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、その開示は、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１２に示す。

【０５８０】

［００５９０］一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号７６で示される重鎖及び配列番号７７で示される軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７６及び配列番号７７に示される配列を有する重鎖及び軽鎖又は抗原結合断片、Ｆａｂ断片、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、それらの変異体若しくはコンジュゲートを含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７６及び配列番号７７に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７６及び配列番号７７に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７６及び配列番号７７に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７６及び配列番号７７に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニス

トは、それぞれ配列番号７６及び配列番号７７に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【０５８１】

［００５９１］　一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、１８Ｄ８の重鎖及び軽鎖ＣＤＲ又は可変領域（ＶＲ）を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は配列番号７８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７９に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７８及び配列番号７９に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７８及び配列番号７９に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７８及び配列番号７９に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７８及び配列番号７９に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７８及び配列番号７９に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【０５８２】

［００５９２］　一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号８０、配列番号８１及び配列番号８２に記載の配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換並びにそれぞれ配列番号８３、配列番号８４及び配列番号８５に記載の配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換を含む。

【０５８３】

［００５９３］　一実施形態において、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。一実施形態において、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤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％又は１００％の配列同一性を有し、参照医薬品又は参照生物学的製剤と比較して１つ以上の翻訳後改変を含む、アミノ酸配列を含むＯＸ４０抗体を含み、ここで、参照医薬品又は参照生物学的製剤は１８Ｄ８である。一部の実施形態において、１つ以上の翻訳後改変は、グリコシル化、酸化、脱アミド化及び切断の１つ以上から選択される。一部の実施形態において、バイオシミラーは、認可された又は認可のために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤の製剤と異なる製剤で提供され、参照医薬品又は参照生物学的製剤は１８Ｄ８である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／又は欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されていることがあり得る。一部の実施形態において、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、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤は１８Ｄ８である。一部の実施形態において、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、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤は１８Ｄ８である。

【０５８４】

【表１３】

表12. 18D8に関連するOX40アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(1文字のアミノ酸記号)	
配列番号76 18D8の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
配列番号77 18D8の軽鎖	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	60 120 180 213
配列番号78 18D8の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSS	60 120 124
配列番号79 18D8の軽鎖可変領域	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK	60 106
配列番号80 18D8の重鎖CDR1	DYAMH	5
配列番号81 18D8の重鎖CDR2	GISWNSGSIG YADSVKG	17
配列番号82 18D8の重鎖CDR3	DQSTADYYFY YGMDV	15
配列番号83 18D8の軽鎖CDR1	RASQSVSSYL A	11
配列番号84 18D8の軽鎖CDR2	DASNRAT	7
配列番号85 18D8の軽鎖CDR3	QQRSNWPT	8

【０５８５】

［００５９４］一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストはＨｕ１１９－１２２であり、これはGlaxoSmithKline plc.から入手可能なヒト化抗体である。Ｈｕ１１９－１２２の調製及び特性は、米国特許第９，００６，３９９号及び同第９，１６３，０８５号並びに国際公開第２０１２／０２７３２８号に記載され、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。Ｈｕ１１９－１２２のアミノ酸配列を表１３に示す。

【０５８６】

［００５９５］一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１１９－１２２の重鎖及び軽鎖ＣＤＲ又は可変領域（ＶＲ）を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は配列番号８６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８７に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号８６及び配列番号８７に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号８６及び配列番号８７に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号８６及び配列番号８７に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号８６及び配列番号８７に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニス

トは、それぞれ配列番号８６及び配列番号８７に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【０５８７】

［００５９６］　一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号８８、配列番号８９及び配列番号９０に記載の配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換並びにそれぞれ配列番号９１、配列番号９２及び配列番号９３に記載の配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換を含む。

【０５８８】

［００５９７］　一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１１９－１２２に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。一実施形態において、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤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％又は１００％の配列同一性を有し、参照医薬品又は参照生物学的製剤と比較して１つ以上の翻訳後改変を含む、アミノ酸配列を含むＯＸ４０抗体を含み、ここで、参照医薬品又は参照生物学的製剤はＨｕ１１９－１２２である。一部の実施形態において、１つ以上の翻訳後改変は、グリコシル化、酸化、脱アミド化及び切断の１つ以上から選択される。一部の実施形態において、バイオシミラーは、認可された又は認可のために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤の製剤と異なる製剤で提供され、参照医薬品又は参照生物学的製剤はＨｕ１１９－１２２である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／又は欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されていることがあり得る。一部の実施形態において、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、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤はＨｕ１１９－１２２である。一部の実施形態において、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、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤はＨｕ１１９－１２２である。

【０５８９】

【表１４】

表13. Hu119-122に関連するOX40アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(1文字のアミノ酸記号)	
配列番号86 Hu119-122の 重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
配列番号87 Hu119-122の 軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号88 Hu119-122の 重鎖CDR1	SHDMS	5
配列番号89 Hu119-122の 重鎖CDR2	AINSDGGSTY YPDTMER	17
配列番号90 Hu119-122の 重鎖CDR3	HYDDYYAWFA Y	11
配列番号91 Hu119-122の 軽鎖CDR1	RASKSVSTSG YSYMH	15
配列番号92 Hu119-122の 軽鎖CDR2	LASNLES	7
配列番号93 Hu119-122の 軽鎖CDR3	QHSRELPLT	9

【０５９０】

［００５９８］　一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストはＨｕ１０６－２２２であり、これはGlaxoSmithKline PLC.から入手可能なヒト化抗体である。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号並びに国際公開第２０１２／０２７３２８号に記載され、その開示は、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１４に示す。

【０５９１】

［００５９９］　一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１０６－２２２の重鎖及び軽鎖ＣＤＲ又は可変領域（ＶＲ）を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は配列番号９４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９５に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号９４及び配列番号９５に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号９４及び配列番号９５に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号９４及び配列番号９５に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号９４及び配列番号９５に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号９４及び配列番号９５に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【０５９２】

［００６００］　一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号９６、配列番号９７及び配列番号９８に記載の配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換並びにそれぞれ配列番号９９、配列番号１００及び配列番号１０１に記載の配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換を含む。

【０５９３】

［００６０１］一実施形態において、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。一実施形態において、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤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％又は１００％の配列同一性を有し、参照医薬品又は参照生物学的製剤と比較して１つ以上の翻訳後改変を含む、アミノ酸配列を含むＯＸ４０抗体を含み、ここで、参照医薬品又は参照生物学的製剤はＨｕ１０６－２２２である。一部の実施形態において、１つ以上の翻訳後改変は、グリコシル化、酸化、脱アミド化及び切断の１つ以上から選択される。一部の実施形態において、バイオシミラーは、認可された又は認可のために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤の製剤と異なる製剤で提供され、参照医薬品又は参照生物学的製剤はＨｕ１０６－２２２である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／又は欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されていることがあり得る。一部の実施形態において、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、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤はＨｕ１０６－２２２である。一部の実施形態において、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、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤はＨｕ１０６－２２２である。

【０５９４】

【表１５】

表14. 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(1文字のアミノ酸記号)	
配列番号94 Hu106-222の 重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	60 120 122
配列番号95 Hu106-222の 軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK	60 107
配列番号96 Hu106-222の 重鎖CDR1	DYSMH	5
配列番号97 Hu106-222の 重鎖CDR2	WINTETGEPT YADDFKG	17
配列番号98 Hu106-222の 重鎖CDR3	PYYDYVSYYA MDY	13
配列番号99 Hu106-222の 軽鎖CDR1	KASQDVSTAV A	11
配列番号100 Hu106-222の 軽鎖CDR2	SASYLYT	7
配列番号101 Hu106-222の 軽鎖CDR3	QQHYSTPRT	9

【０５９５】

［００６０２］一部の実施形態において、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。一部の実施形態において、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、９

Ｂ１２ハイブリドーマによって産生される抗体であり、その開示は、参照により全体として本明細書に組み込まれる。一部の実施形態において、抗体は、ＭＥＤＩ６４６９のＣＤＲ配列を含む。一部の実施形態において、抗体は、ＭＥＤＩ６４６９の重鎖可変領域配列及び／又は軽鎖可変領域配列を含む。

【０５９６】

［００６０３］　一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、Ｌ１０６　ＢＤ（Pharmingen Product #340420）である。一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、抗体Ｌ１０６（BD Pharmingen Product #340420）のＣＤＲを含む。一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、抗体Ｌ１０６（BD Pharmingen Product #340420）の重鎖可変領域配列及び／又は軽鎖可変領域配列を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストはＡＣＴ３５（Santa Cruz Biotechnology、カタログ番号２００７３）である。一部の実施形態において、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。一部の実施形態において、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／又は軽鎖可変領域配列を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、マウスモノクローナル抗体抗ｍＣＤ１３４／ｍＯＸ４０（クローンＯＸ８６）であり、InVivoMAb, BioXcell Inc, West Lebanon, NHから市販されている。

【０５９７】

［００６０４］　一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、国際公開第９５／１２６７３号、同第９５／２１９２５号、同第２００６／１２１８１０号、同第２０１２／０２７３２８号、同第２０１３／０２８２３１号、同第２０１３／０３８１９１号及び同第２０１４／１４８８９５号；欧州特許第０６７２１４１号；米国特許出願公開第２０１０／１３６０３０号、同第２０１４／３７７２８４号、同第２０１５／１９０５０６号及び同第２０１５／１３２２８８号；並びに米国特許第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（２０Ｅ５及び１２Ｈ３を含む）に記載されるＯＸ４０アゴニストから選択され、それぞれの開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０５９８】

［００６０５］　一実施形態において、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）又は構造Ｉ－Ｂ（Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）に示されるＯＸ４０アゴニスト性融合タンパク質又はその断片、誘導体、コンジュゲート、変異体若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、上記並びに米国特許第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、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。構造Ｉ－Ａのポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表６に示す。Ｆｃドメインは、好ましくは、完全定常ドメイン（配列番号３１のアミノ酸１７～２３０）、完全ヒンジドメイン（配列番号３１のアミノ酸１～１６）又はヒンジドメインの一部（例えば、配列番号３１のアミノ酸４～１６）を含む。Ｃ末端Ｆｃ抗体を接続するための好ましいリンカーは、追加的ポリペプチドの融合に適したリンカーを含む、配列番号３２～配列番号４１に示される実施形態から選択され得る。同様に、構造Ｉ－Ｂのポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表７に示す。構造Ｉ－ＢのようにＦｃ抗体断片がＴＮＲＦＳＦ融合タンパク質のＮ末端に融合される場合、Ｆｃモジュールの配列は好ましくは配列番号４２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４３～配列番号４５に示される実施形態から選択される。

【０５９９】

［００６０６］　一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又は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１５に記載されている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、上記の可変重鎖及び可変軽鎖の任意の組み合わせ並びにそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、変異体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。

【０６００】

［００６０７］　一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又は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。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１０２による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又は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。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１０３による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１０３による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。

【０６０１】

［００６０８］　一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、それぞれ配列番号５８及び配列番号５９に示される配列とそれぞれ少なくとも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、ここで、V_H及びV_Lドメインはリンカーによって接続されている。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、それぞれ配列番号６８及び配列番号６９に示される配列とそれぞれ少なくとも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、ここで、V_H及びV_Lドメインはリンカーによって接続されている。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、それぞれ配列番号７８及び配列番号７９に示される配列とそれぞれ少なくとも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、ここで、V_H及びV_Lドメインはリンカーによって接続されている。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、それぞれ配列番号８６及び配列番号８７に示される配列とそれぞれ少なくとも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、ここで、V_H及びV_Lドメインはリンカーによって接続されている。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、それぞれ配列番号９４及び配列番号９５に示される配列とそれぞれ少なくとも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、ここで、V_H及びV_Lドメインはリンカーによって接続されている。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、表１５に示されるV_H及びV_L配列とそれぞれ少なくとも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、ここで、V_H及びV_Lドメインはリンカーによって接続されている。

【０６０２】

【表１６】

表15. 融合タンパク質のOX40結合ドメイン(例えば、構造I-A及びI-B)として、又はscFv OX40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(1文字のアミノ酸記号)	
配列番号102 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ	60
	SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ	120
	KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF	180
	CVL	183

【０６０３】

【表１７】

配列番号103 OX40L可溶性ドメイン	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL IHQNPGEFCV L	60 120 131
配列番号104 OX40L可溶性ドメイン (代替)	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ NPGEFCVL	60 120 128
配列番号105 008の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS	60 120
配列番号106 008の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK	60 108
配列番号107 011の可変重鎖	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA	60 120
配列番号108 011の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK	60 108
配列番号109 021の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS	60 120
配列番号110 021の可変軽鎖	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK	60 108
配列番号111 023の可変重鎖	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS	60 120
配列番号112 023の可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR	60 108
配列番号113 重鎖可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS	60 119
配列番号114 軽鎖可変領域	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR	60 108
配列番号115 重鎖可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS P	60 120 121
配列番号116 軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR	60 108
配列番号117 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV SS	60 120 122
配列番号118 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	60 120 122
配列番号119 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号120 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107

【０６０４】

【表１８】

配列番号121 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA	60 120
配列番号122 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
配列番号123 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K	60 111
配列番号124 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号125 重鎖可変領域	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG EVFYFDYWGQ GTTLTVSS	60 120 138
配列番号126 軽鎖可変領域	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG TKLELK	60 120 126

【０６０５】

［００６０９］一実施形態において、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アゴニスト性単鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／又はＣ末端に追加的なドメインを更に含み、ここで、追加的なドメインは、Ｆａｂ又はＦｃ断片ドメインである。一実施形態において、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アゴニスト性単鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／又はＣ末端に追加的なドメインを更に含み、ここで、追加的なドメインは、Ｆａｂ又はＦｃ断片ドメインであり、可溶性ＯＸ４０結合ドメインのそれぞれは、ストーク領域（三量体化に寄与し、細胞膜まで一定の距離を提供するが、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。

【０６０６】

［００６１０］一実施形態において、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アゴニスト性単鎖融合ポリペプチドであり、ここで、可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインのそれぞれは、ストーク領域を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは、独立して３～８アミノ酸長を有し、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。

【０６０７】
［００６１１］一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストはＭＥＤＩ６３８３である。ＭＥＤＩ６３８３はＯＸ４０アゴニスト性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。
【０６０８】
［００６１２］一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、前述のＶ$_{L}$ドメインのいずれかに連結された前述のＶ$_{H}$ドメインのいずれかを含むＯＸ４０アゴニスト性ｓｃＦｖ抗体である。
【０６０９】
［００６１３］一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、Creative BiolabsＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体ＭＯＭ－１８４５５であり、これはCreative Biolabs, Inc., Shirley, NY, USAから市販されている。
【０６１０】
［００６１４］一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、BioLegend, Inc., San Diego, CA, USAから市販されているＯＸ４０アゴニスト性抗体クローンＢｅｒ－ＡＣＴ３５である。
【０６１１】
Ｅ．ステップＥ：ＴＩＬを回収する
［００６１５］第２の拡大培養ステップ後、細胞は回収することができる。一部の実施形態において、ＴＩＬは、例えば、図９に提供される通り、１、２、３、４回又はそれ以上の拡大培養ステップ後に回収される。一部の実施形態において、ＴＩＬは、例えば、図９に提供される通り、２回の拡大培養ステップ後に回収される。
【０６１２】
［００６１６］ＴＩＬは、例えば遠心によることを含め、任意の適切な及び無菌の方法で回収することができる。ＴＩＬ回収方法は当技術分野において周知であり、本プロセスと共に任意のかかる公知の方法を用いることができる。一部の実施形態において、ＴＩＬは自動化系を使用して回収される。
【０６１３】
［００６１７］セルハーベスター及び／又は細胞処理系は、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ハーベスターを本方法で使用することができる。一部の実施形態において、セルハーベスター及び／又は細胞処理系は、膜ベースの細胞ハーベスターである。一部の実施形態において、細胞回収は、LOVO系（Fresenius Kabi製）などの細胞処理系を介して行われる。用語「LOVO細胞処理系」は、滅菌及び／又は閉鎖系環境で、回転膜又は回転フィルターなどの膜又はフィルターを通して細胞を含む溶液を送り出すことができ、ペレット化せず上清又は細胞培養培地を除去する連続フロー及び細胞処理を可能にする、あらゆる販売業者によって製造された機器又は装置も指す。一部の実施形態において、セルハーベスター及び／又は細胞処理系は、閉鎖、無菌系で細胞分離、洗浄、流体交換、濃縮及び／又は他の細胞処理ステップを実施することができる。
【０６１４】
［００６１８］一部の実施形態において、回収、例えば、図９によるステップＥは、閉鎖系バイオリアクターから実施される。一部の実施形態において、本明細書に記載される通り、ＴＩＬ拡大培養のために閉鎖系が用いられる。一部の実施形態において、単一のバイオリアクターが用いられる。一部の実施形態において、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、G-REX-10又はG-REX-100である。一部の実施形態において、閉鎖系バイオリアクターは単一のバイオリアクターである。
【０６１５】
Ｆ．ステップＦ：最終的な製剤化及び輸注バッグへの移動

[00619] 図９に例示的順序で提供される通りの、且つ上記及び本明細書に詳細に概説される通りのステップＡ～Ｅが完了した後、細胞は患者への投与における使用のため容器に移される。一部の実施形態において、上記に記載される拡大培養方法を用いて治療上十分な数のＴＩＬが入手されると、ＴＩＬは患者への投与における使用のため容器に移される。

【０６１６】

[00620] 一実施形態において、本開示のＡＰＣを使用して拡大培養したＴＩＬは、医薬組成物として患者に投与される。一実施形態において、医薬組成物は滅菌緩衝液中のＴＩＬの懸濁液である。本開示のＰＢＭＣを使用して拡大培養したＴＩＬは、当技術分野において公知の通りの任意の好適な経路によって投与され得る。一部の実施形態において、Ｔ細胞は単回動脈内又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分間継続される。他の好適な投与経路としては、腹腔内、髄腔内及びリンパ内が挙げられる。

【０６１７】

Ｇ．医薬組成物、投薬量及び投与レジメン

[00621] 一実施形態において、本開示の方法を使用して拡大培養したＴＩＬは医薬組成物として患者に投与される。一実施形態において、医薬組成物は滅菌緩衝液中のＴＩＬの懸濁液である。本開示のＰＢＭＣを使用して拡大培養したＴＩＬは、当技術分野において公知の通りの任意の好適な経路によって投与され得る。一部の実施形態において、Ｔ細胞は単回動脈内又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分間継続される。他の適切な投与経路には、腹腔内投与、髄腔内投与及びリンパ管内投与が含まれる。

【０６１８】

[00622] 任意の適切な用量のＴＩＬを投与することができる。一部の実施形態において、特に癌が黒色腫である場合、平均が約７．８×１０^{10}のＴＩＬである約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}のＴＩＬが投与される。一実施形態において、約１．２×１０^{10}～約４．３×１０^{10}のＴＩＬが投与される。一部の実施形態において、約３×１０^{10}～約１２×１０^{10}のＴＩＬが投与される。一部の実施形態において、約４×１０^{10}～約１０×１０^{10}のＴＩＬが投与される。一部の実施形態において、約５×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。一部の実施形態において、約６×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。一部の実施形態において、約７×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。一部の実施形態において、治療有効投与量は、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}個である。一部の実施形態において、特に、癌が黒色腫である場合、治療有効投与量は約７．８×１０^{10}のＴＩＬである。一部の実施形態において、治療有効投与量は、約１．２×１０^{10}～約４．３×１０^{10}のＴＩＬである。一部の実施形態において、治療有効投与量は、約３×１０^{10}～約１２×１０^{10}のＴＩＬである。一部の実施形態において、治療有効投与量は、約４×１０^{10}～約１０×１０^{10}のＴＩＬである。一部の実施形態において、治療有効投与量は、約５×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬである。一部の実施形態において、治療有効投与量は、約６×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬである。一部の実施形態において、治療有効投与量は、約７×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬである。

【０６１９】

[00623] 一部の実施形態において、本発明の医薬組成物中に提供される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}及び９×１０^{13}個である。一実施形態において、本発明の医薬組成物中に提供されるＴＩＬの数は、１×１０^{6}～５×１０^{6}、５×１０^{6}～１×１０^{7}、１×１０^{7}～５×１０^{7}、５×１０^{7}～１×１０^{8}、１×１０^{8}～５×１０^{8}、５×１０^{8}～１×１０^{9}、１×１０^{9}～５×１０^{9}、５×１０^{9}～１×１０^{10}、１×１０^{10}～５×１０^{10}、５×１０^{10}～１×１０^{11}、５×１０^{11}～１×１０^{12}、１×１０^{12}～５×１０^{12}及び５×１０^{12}～１×１０^{13}の範囲内である。

【０６２０】

［００６２４］　一部の実施形態において、本発明の医薬組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、例えば、医薬組成物の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％、０．０００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％又は０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ又はｖ／ｖより低い。

【０６２１】

［００６２５］　一部の実施形態において、本発明の医薬組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、医薬組成物の９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９．７５％、１９．５０％、１９．２５％、１９％、１８．７５％、１８．５０％、１８．２５％、１８％、１７．７５％、１７．５０％、１７．２５％、１７％、１６．７５％、１６．５０％、１６．２５％、１６％、１５．７５％、１５．５０％、１５．２５％、１５％、１４．７５％、１４．５０％、１４．２５％、１４％、１３．７５％、１３．５０％、１３．２５％、１３％、１２．７５％、１２．５０％、１２．２５％、１２％、１１．７５％、１１．５０％、１１．２５％、１１％、１０．７５％、１０．５０％、１０．２５％、１０％、９．７５％、９．５０％、９．２５％、９％、８．７５％、８．５０％、８．２５％、８％、７．７５％、７．５０％、７．２５％、７％、６．７５％、６．５０％、６．２５％、６％、５．７５％、５．５０％、５．２５％、５％、４．７５％、４．５０％、４．２５％、４％、３．７５％、３．５０％、３．２５％、３％、２．７５％、２．５０％、２．２５％、２％、１．７５％、１．５０％、１２５％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．０００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％又は０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ又はｖ／ｖより高い。

【０６２２】

［００６２６］　一部の実施形態において、本発明の医薬組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、医薬組成物の約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％又は約１％～約１０％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ又はｖ／ｖの範囲内である。

【０６２３】
［００６２７］一部の実施形態において、本発明の医薬組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、医薬組成物の約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又はｖ／ｖの範囲内である。
【０６２４】
［００６２８］一部の実施形態において、本発明の医薬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又は０．０００１ｇ以下である。
【０６２５】
［００６２９］一部の実施形態において、本発明の医薬組成物中に提供されるＴＩＬの量は、０．０００１ｇ、０．０００２ｇ、０．０００３ｇ、０．０００４ｇ、０．０００５ｇ、０．０００６ｇ、０．０００７ｇ、０．０００８ｇ、０．０００９ｇ、０．００１ｇ、０．００１５ｇ、０．００２ｇ、０．００２５ｇ、０．００３ｇ、０．００３５ｇ、０．００４ｇ、０．００４５ｇ、０．００５ｇ、０．００５５ｇ、０．００６ｇ、０．００６５ｇ、０．００７ｇ、０．００７５ｇ、０．００８ｇ、０．００８５ｇ、０．００９ｇ、０．００９５ｇ、０．０１ｇ、０．０１５ｇ、０．０２ｇ、０．０２５ｇ、０．０３ｇ、０．０３５ｇ、０．０４ｇ、０．０４５ｇ、０．０５ｇ、０．０５５ｇ、０．０６ｇ、０．０６５ｇ、０．０７ｇ、０．０７５ｇ、０．０８ｇ、０．０８５ｇ、０．０９ｇ、０．０９５ｇ、０．１ｇ、０．１５ｇ、０．２ｇ、０．２５ｇ、０．３ｇ、０．３５ｇ、０．４ｇ、０．４５ｇ、０．５ｇ、０．５５ｇ、０．６ｇ、０．６５ｇ、０．７ｇ、０．７５ｇ、０．８ｇ、０．８５ｇ、０．９ｇ、０．９５ｇ、１ｇ、１．５ｇ、２ｇ、２．５、３ｇ、３．５、４ｇ、４．５ｇ、５ｇ、５．５ｇ、６ｇ、６．５ｇ、７ｇ、７．５ｇ、８ｇ、８．５ｇ、９ｇ、９．５ｇ又は１０ｇ超である。
【０６２６】
［００６３０］本発明の医薬組成物において提供される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、処置されるべき対象の性別及び年齢、処置されるべき対象の体重並びに担当医の選好及び経験に依存するであろう。臨床的に確立されたＴＩＬの投与量も適切な場合に使用され得る。ＴＩＬの投与量など、本明細書の方法を使用して投与される医薬組成物の量は、処置されるヒト又は哺乳動物、疾患又は状態の重症度、投与速度、活性医薬成分の性質及び処方医の裁量に依存するであろう。
【０６２７】
［００６３１］一部の実施形態において、ＴＩＬは単回投与で投与され得る。そのような投与は、注射、例えば静脈内注射によるものであり得る。一部の実施形態において、ＴＩＬは複数回投与で投与され得る。投与は、１年に１回、２回、３回、４回、５回、６回又は６回を超え得る。投与は、月に１回、２週間に１回、週に１回又は隔日に１回であり得る。ＴＩＬの投与は必要な限り継続し得る。
【０６２８】
［００６３２］一部の実施形態において、ＴＩＬの有効投与量は、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}、$9\times$

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}個である。一部の実施形態において、ＴＩＬの有効投与量は、１×１０^{6}～５×１０^{6}、５×１０^{6}～１×１０^{7}、１×１０^{7}～５×１０^{7}、５×１０^{7}～１×１０^{8}、１×１０^{8}～５×１０^{8}、５×１０^{8}～１×１０^{9}、１×１０^{9}～５×１０^{9}、５×１０^{9}～１×１０^{10}、１×１０^{10}～５×１０^{10}、５×１０^{10}～１×１０^{11}、５×１０^{11}～１×１０^{12}、１×１０^{12}～５×１０^{12}及び５×１０^{12}～１×１０^{13}の範囲内である。

【０６２９】

［００６３３］　一部の実施形態において、ＴＩＬの有効投与量は、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約４．３ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約３．２ｍｇ／ｋｇ、約０．３５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．３ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約１．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１ｍｇ／ｋｇ、約０．５５ｍｇ／ｋｇ～約０．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．６５ｍｇ／ｋｇ～約０．８ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約０．７５ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．８５ｍｇ／ｋｇ～約２ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約１．８５ｍｇ／ｋｇ、約１．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約１．３ｍｇ／ｋｇ　ｍｇ～約１．６ｍｇ／ｋｇ、約１．３５ｍｇ／ｋｇ～約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約２．３ｍｇ／ｋｇ～約３．４ｍｇ／ｋｇ、約２．４ｍｇ／ｋｇ～約３．３ｍｇ／ｋｇ、約２．６ｍｇ／ｋｇ～約３．１５ｍｇ／ｋｇ、約２．７ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、約２．８ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ又は約２．８５ｍｇ／ｋｇ～約２．９５ｍｇ／ｋｇの範囲内である。

【０６３０】

［００６３４］　一部の実施形態において、ＴＩＬの有効投与量は、約１ｍｇ～約５００ｍｇ、約１０ｍｇ～約３００ｍｇ、約２０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約２５ｍｇ～約２００ｍｇ、約１ｍｇ～約５０ｍｇ、約５ｍｇ～約４５ｍｇ、約１０ｍｇ～約４０ｍｇ、約１５ｍｇ～約３５ｍｇ、約２０ｍｇ～約３０ｍｇ、約２３ｍｇ～約２８ｍｇ、約５０ｍｇ～約１５０ｍｇ、約６０ｍｇ～約１４０ｍｇ、約７０ｍｇ～約１３０ｍｇ、約８０ｍｇ～約１２０ｍｇ、約９０ｍｇ～約１１０ｍｇ又は約９５ｍｇ～約１０５ｍｇ、約９８ｍｇ～約１０２ｍｇ、約１５０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約１６０ｍｇ～約２４０ｍｇ、約１７０ｍｇ～約２３０ｍｇ、約１８０ｍｇ～約２２０ｍｇ、約１９０ｍｇ～約２１０ｍｇ、約１９５ｍｇ～約２０５ｍｇ又は約１９８～約２０７ｍｇの範囲内である。

【０６３１】

［００６３５］　有効量のＴＩＬは、鼻腔内及び経皮経路、動脈内注射によること、静脈内、腹腔内、非経口的、筋肉内、皮下、局所、移植によること又は吸入によることを含め、同様の有用性を有する薬剤について一般に認められている任意の投与方式により、単回用量又は複数回用量のいずれでも投与され得る。

【０６３２】

Ｈ．ＴＩＬ凍結保存

［００６３６］　上記で考察し、及び図９に提供されるステップＡ～Ｅにおいて例示した通

り、ＴＩＬ拡大培養プロセス全体を通して数々の時点で凍結保存を行うことができる。一部の実施形態において、（例えば、図９のステップＤに従って提供される）第２の拡大培養後の拡大培養されたＴＩＬ集団は、凍結保存することができる。凍結保存は、概して、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）中にＴＩＬ集団を置くことにより達成され得る。この溶液中の細胞を極低温バイアルに入れ、－８０℃で２４時間貯蔵し、任意選択により凍結保存のため気体窒素フリーザーに移す。Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-986を参照されたい。一部の実施形態において、ＴＩＬは、５％ＤＭＳＯ中に凍結保存される。一部の実施形態において、ＴＩＬは、細胞培養培地＋５％ＤＭＳＯ中に凍結保存される。一部の実施形態において、ＴＩＬは、実施例８及び９に提供される方法に従って凍結保存される。

【０６３３】

[00637] 適切な場合、細胞をフリーザーから取り出し、３７℃の水浴中で溶液の約５分の４が解凍されるまで解凍する。細胞は、概して完全培地中に再懸濁され、任意選択により１回以上洗浄される。一部の実施形態において、当技術分野において公知の通りに解凍ＴＩＬをカウントし、生存率に関して評価することができる。

【０６３４】

Ｉ．ＴＩＬ製造用閉鎖系

[00638] 本発明は、ＴＩＬ培養プロセス中の閉鎖系の使用を提供する。かかる閉鎖系は、微生物汚染の防止及び／又は削減を可能にし、使用するフラスコの数が少なくなり、コスト削減が可能となる。一部の実施形態において、閉鎖系は、２つの容器を使用する。

【０６３５】

[00639] かかる閉鎖系は、当技術分野で公知であり、例えばhttp://www.fda.gov/cber/guidelines.htm及びhttps://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm.に記載されている。

【０６３６】

[00640] ＦＤＡのウェブサイトで提供されているように、滅菌方法を備えた閉鎖系は、公知であり、詳細に記載されている。https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htmを参照されたい。上記で参照され、以下の関連箇所において提供されている。

【０６３７】

[00641] 滅菌接続装置（ＳＴＣＤ）は、互換性のある２つの配管間に滅菌溶接を産生する。この手順により、様々な直径の容器及びチューブを滅菌接続できる。このガイダンスでは、これらの装置の使用に関する推奨管理基準及び手順について記載する。このガイダンスは、滅菌接続装置の製造業者がマーケティングの承認又は認可を得るためにＦＤＡに提出しなければならないデータ又は情報は取り扱っていない。また、表示方法において許可されていない目的で承認又は認可された滅菌接続装置を使用すると、米連邦食品医薬品化粧品法下で装置が粗悪品及び不正表示品と見なされる可能性があることに注意することも重要である。

【０６３８】

[00642] 一部の実施形態において、閉鎖系は、腫瘍断片が得られた時点から、ＴＩＬが、患者への投与又は凍結保存の準備が整うまで１つの容器を使用する。一部の実施形態において、２つの容器が使用される場合、第１の容器は、閉鎖型Ｇコンテナであり、ＴＩＬ集団は、遠心され、第１の閉鎖型Ｇコンテナを開かずに輸注バッグに移される。一部の実施形態において、２つの容器が使用される場合、輸注バッグは、HypoThermosol含有輸注バッグである。閉鎖系又は閉鎖ＴＩＬ細胞培養系は、腫瘍サンプル及び／又は腫瘍断片が追加されると、系が外側から確実に密閉され、細菌、真菌及び／又は他の微生物汚染がない閉鎖環境を形成する。

【０６３９】
［００６４３］　一部の実施形態において、微生物汚染の減少は、約５％～約１００％である。一部の実施形態において、微生物汚染の減少は、約５％～約９５％である。一部の実施形態において、微生物汚染の減少は、約５％～約９０％である。一部の実施形態において、微生物汚染の減少は、約１０％～約９０％である。一部の実施形態において、微生物汚染の減少は、約１５％～約８５％である。一部の実施形態において、微生物汚染の減少は、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％又は約１００％である。
【０６４０】
［００６４４］　閉鎖系は、微生物汚染の不在下及び／又は大幅に減少させ、ＴＩＬを成長させる。
【０６４１】
［００６４５］　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、細胞が培養されるにつれてそれぞれ変化する。従って、細胞培養に適した培地が流通していても、ＴＩＬ成長に最適な環境として閉鎖環境を常に維持する必要がある。このため、閉鎖環境の培地内のｐＨ、二酸化炭素分圧及び酸素分圧の物理的要因は、センサーによって監視され、そのセンサーの信号は、培養環境の入口に設置されたガス交換器の制御に使用され、閉鎖環境のガス分圧は、細胞培養環境を最適化するため、培地の変化に従ってリアルタイムで調整されることが望ましい。一部の実施形態において、本発明は、閉鎖環境への入口に、閉鎖環境のｐＨ、二酸化炭素分圧及び酸素分圧を測定し、監視装置からの信号に基づいてガス濃度を自動的に調整することにより、細胞培養環境を最適化する監視装置を備えたガス交換器を一体化した閉鎖細胞培養系を提供する。
【０６４２】
［００６４６］　一部の実施形態において、閉鎖環境内の圧力は、連続的又は断続的に制御される。即ち、閉鎖環境内の圧力は、例えば、圧力維持装置によって変化させることができ、即ち空間が陽圧状態のＴＩＬの成長に適していることを保証するか、又は陰圧状態の流体の滲出を促進し、従って細胞成長を促進することを確実にする。更に、断続的に負圧を加えることにより、閉鎖環境の容積の一時的な収縮によって閉鎖環境内の循環液を均一及び効率的に交換することが可能である。
【０６４３】
［００６４７］　一部の実施形態において、ＴＩＬの成長に最適な培養成分を置換又は追加することができ、ＩＬ－２及び／又はＯＫＴ３などの要因並びに組み合わせを追加し得る。
【０６４４】
Ｃ．細胞培養
［００６４８］　ある実施形態において、ＴＩＬの拡大培養方法は、上記で考察され図９で例示されているものを含み、約５，０００ｍＬ～約２５，０００ｍＬの細胞培養培地、約５，０００ｍＬ～約１０，０００ｍＬの細胞培養培地又は約５，８００ｍＬ～約８，７００ｍＬの細胞培養培地を使用することを含み得る。一部の実施形態において、培地は、例えば、無血清培地である。一部の実施形態において、第１の拡大培養の培地は、無血清である。一部の実施形態において、第２の拡大培養の培地は、無血清である。一部の実施形態において、第１及び第２の拡大培養の培地は、両方とも無血清である。ある実施形態において、ＴＩＬ数の拡大には１種類以下の細胞培養培地が使用される。任意の好適な細胞培養培地、例えばＡＩＭ-Ｖ細胞培養培地（Ｌ－グルタミン、５０μＭ硫酸ストレプトマイシン及び１０μＭ硫酸ゲンタマイシン）細胞培養培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ ＣＡ）を使用し得る。この点に関して、本発明の方法では、有利には、ＴＩＬ数の拡大に必要な培地の量及び培地の種類の数が減少する。一実施形態において、ＴＩＬの数を拡大することは、３日又は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

容器内の細胞数を増やすことは、細胞を拡大培養するのに必要なフィード頻度を減らすことによって細胞数を増やすのに必要な手順を単純化する。

【０６４５】

[00649] 一実施形態において、第１及び／又は第２のガス透過性容器内の細胞培養培地は、ろ過されていない。ろ過されていない細胞培養培地の使用は、細胞数を拡大培養させるために必要な手順を単純化し得る。一実施形態において、第１及び／又は第２のガス透過性容器内の細胞培養培地は、β－メルカプトエタノール（ＢＭＥ）を欠いている。

【０６４６】

[00650] ある実施形態において、哺乳類から腫瘍組織サンプルを得ること；細胞培養培地が中に入った第１のガス透過性容器内で腫瘍組織サンプルを培養すること；腫瘍組織サンプルからＴＩＬを得ること；細胞培養培地を含有する第２のガス透過性容器内でＴＩＬ数を約７～１４日間、例えば約１１日間拡大することを含む本方法の所要期間である。一部の実施形態において、プレＲＥＰは、約７～１４日間、例えば約１１日間である。一部の実施形態において、ＲＥＰは、約７～１４日間、例えば約１１日間である。

【０６４７】

[00651] 一実施形態において、ＴＩＬは、ガス透過性容器内で拡大培養する。ガス透過性容器は、米国特許出願公開第２００５／０１０６７１７　Ａ１号（この開示は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものを含め、当技術分野において公知の方法、組成物及び装置を用いたＰＢＭＣを使用したＴＩＬの拡大培養に用いられている。一実施形態において、ＴＩＬは、ガス透過性バッグ内で拡大培養される。一実施形態において、ＴＩＬは、Xuri Cell Expansion System W25（GE Healthcare）など、ガス透過性バッグ内でＴＩＬを拡大培養する細胞拡大培養システムを使用して拡大培養される。一実施形態において、ＴＩＬは、Xuri Cell Expansion System W5（GE Healthcare）としても知られるWAVE Bioreactor Systemなど、ガス透過性バッグ内でＴＩＬを拡大培養する細胞拡大培養システムを使用して拡大培養される。一実施形態において、細胞拡大培養システムは、約１００ｍＬ、約２００ｍＬ、約３００ｍＬ、約４００ｍＬ、約５００ｍＬ、約６００ｍＬ、約７００ｍＬ、約８００ｍＬ、約９００ｍＬ、約１Ｌ、約２Ｌ、約３Ｌ、約４Ｌ、約５Ｌ、約６Ｌ、約７Ｌ、約８Ｌ、約９Ｌ及び約１０Ｌからなる群から選択される容積を有するガス透過性細胞バッグを含む。

【０６４８】

[00652] 一実施形態において、ＴＩＬは、G-Rexフラスコ（Wilson Wolf Manufacturingから市販されている）において拡大培養することができる。そのような実施形態は、細胞集団が約５×１０^{5}細胞／ｃｍ^{2}から１０×１０^{6}～３０×１０^{6}細胞／ｃｍ^{2}に拡大培養することを可能にする。一実施形態において、これは、フィードなしである。一実施形態において、これは、G-Rexフラスコ内に約１０ｃｍの高さの培地がある限りフィードなしである。一実施形態において、これにフィードはないが、１つ以上のサイトカインが加えられる。一実施形態において、サイトカインを培地と混合する必要なく、サイトカインをボーラスとして添加することができる。かかる容器、装置及び方法は、当技術分野において公知であり、ＴＩＬの拡大培養に用いられており、米国特許出願公開第２０１４／０３７７７３９Ａ１号、国際公開第２０１４／２１００３６　Ａ１号、米国特許出願公開第２０１３／０１１５６１７　Ａ１号、国際公開第２０１３／１８８４２７　Ａ１号、米国特許出願公開第２０１１／０１３６２２８　Ａ１号、米国特許第８，８０９，０５０　Ｂ２号、国際公開第２０１１／０７２０８８　Ａ２号、米国特許出願公開第２０１６／０２０８２１６　Ａ１号、米国特許出願公開第２０１２／０２４４１３３　Ａ１号、国際公開第２０１２／１２９２０１　Ａ１号、米国特許出願公開第２０１３／０１０２０７５　Ａ１号、米国特許第８，９５６，８６０　Ｂ２号、国際公開第２０１３／１７３８３５　Ａ１号、米国特許出願公開第２０１５／０１７５９６６　Ａ１号（これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものが含まれる。かかるプロセスは、Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35:283-292にも記載されている。

【０６４９】

Ｄ．任意選択のＴＩＬ凍結保存

［００６５３］　バルクＴＩＬ集団又は拡大培養されたＴＩＬ集団は、任意選択により凍結保存できる。一部の実施形態において、治療用ＴＩＬ集団で凍結保存が行われる。一部の実施形態において、凍結保存は、第２の拡大培養後に回収されたＴＩＬで生じる。一部の実施形態において、図９の例示的ステップＦのＴＩＬで凍結保存が行われる。一部の実施形態において、ＴＩＬは輸注バッグ中に凍結保存される。一部の実施形態において、ＴＩＬは、輸注バッグでの置換前に凍結保存される。一部の実施形態において、ＴＩＬは、凍結保存されるが輸注バッグ中には置かれない。一部の実施形態において、凍結保存は凍結保存培地を使用して実施される。一部の実施形態において、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、概して、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）中にＴＩＬ集団を入れることにより達成される。この溶液中の細胞を極低温バイアルに入れ、－８０℃で２４時間貯蔵し、任意選択により凍結保存のため気体窒素フリーザーに移す。Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-986を参照されたい。

【０６５０】

［００６５４］　適切な場合、細胞をフリーザーから取り出し、３７℃の水浴中で溶液の約５分の４が解凍されるまで解凍する。細胞は、概して完全培地中に再懸濁され、任意選択により１回以上洗浄される。一部の実施形態において、当技術分野において公知の通り解凍ＴＩＬをカウントし、生存率に関して評価することができる。

【０６５１】

［００６５５］　好ましい実施形態において、ＴＩＬの集団はＣＳ１０凍結保存培地（CryoStor 10、BioLife Solutions）を用いて凍結保存される。好ましい実施形態において、ＴＩＬの集団は凍結保存培地（ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含有する）を用いて凍結保存される。好ましい実施形態において、ＴＩＬの集団は、１：１（体積：体積）の比のＣＳ１０及び細胞培養培地を用いて凍結保存される。好ましい実施形態において、ＴＩＬの集団は、約１：１（体積：体積）の比のＣＳ１０及び細胞培養培地を使用し、更に追加的なＩＬ－２を含んで凍結保存される。

【０６５２】

［００６５６］　特定の実施形態によれば、凍結保存組成物（本明細書において「ジメチルスルホキシドベースの凍結保存培地」とも称される）は、本発明に従って調製されたＴＩＬ集団（例えば、１×１０^{６}～９×１０^{１３}の量）、－７０℃～－１９６℃などの低温環境で細胞を保存するのに適したＤＭＳＯを含む凍結保護培地（例えば、CryoStor（登録商標）CS10）及び電解質溶液（例えば、PlasmaLyte（登録商標）Aなどの等張液）を含む。好ましい実施形態において、凍結保護培地及び電解質溶液は、約１．２：１～約１：１．２又は約１．１：１～約１：１．１又は好ましくは約１：１の比率で存在する。一実施形態によれば、電解質溶液は、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、酢酸塩、塩化物及びグルコン酸塩又はそれらの組み合わせの１つ以上を含む。例えば、電解質溶液は、塩化ナトリウム、グルコン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム三水和物、塩化カリウム及び塩化マグネシウムを含み得る。一実施形態によれば、電解質溶液は、約７～約８、好ましくは約７．２～約７．６又は約７．４のｐＨを有する。好ましくは、凍結保存組成物は、１つ以上の安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン）及び／又は１つ以上のリンパ球成長因子（例えば、ＩＬ－２）を更に含む。例えば、凍結保護培地及び電解質溶液のそれぞれは、凍結保存組成物中に、約２０ｍＬ～約１００ｍＬ、又は約３０ｍＬ～約７０ｍＬ、又は約４０ｍＬ～約６０ｍＬ、又は約５０ｍＬの量で存在し得；ヒト血清アルブミンは、約０．０１ｇ～約２．０ｇ、又は約０．１ｇ～約１．０ｇ、又は約０．５ｇの量で存在し得；ＩＬ－２は、約０．００１ｍｇ～約０．００５ｍｇ、又は約０．００１５ｍｇ～約０．００２５ｍｇ、又は約０．００１８ｍｇの量で存在し得る。凍結保存培地は、任意選択により、ｐＨ調整剤、防腐剤などの１つ以上の追加の添加剤又は賦形剤を含み得る。

【０６５３】

［００６５７］　一実施形態によれば、ＴＩＬ集団を含有する凍結保存組成物は、以下から

構成される。

【０６５４】

【表１９】

医薬品の公称組成(%v/V)(100mLベース)

成分	100mL配合あたりの公称量	機能
腫瘍浸潤リンパ球	83×10^{7}～3.0×10^{10}	有効成分
CryoStor® CS10*	50 mL	凍結保存培地
PlasmaLyte A	50 mL	等張剤
ヒト血清アルブミン(HSA)	0.5 g	安定剤
インターロイキン2	0.0018 mg (30,000 IU)	リンパ球成長因子
合計	100 mL	

* CryoStor CS10は、10%ジメチルスルホキシド(DMSO)を含有する

【０６５５】

［００６５８］上記でステップＡ～Ｅにおいて考察した通り、ＴＩＬ拡大培養プロセス全体を通して数々の時点で凍結保存を行うことができる。一部の実施形態において、ステップＢに係る第１の拡大培養後のバルクＴＩＬ集団又はステップＤに係る１回以上の第２の拡大培養後の拡大培養ＴＩＬ集団が凍結保存され得る。凍結保存は、概して、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）の中にＴＩＬ集団を置くことにより達成し得る。この溶液中の細胞を極低温バイアルに入れ、－８０℃で２４時間保管し、任意選択で凍結保存のため気体窒素フリーザーに移す。Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-986を参照されたい。

【０６５６】

［００６５９］適切な場合、細胞をフリーザーから取り出し、３７℃の水浴中で溶液の約５分の４が解凍されるまで解凍する。細胞は、概して完全培地中に再懸濁され、任意選択により１回以上洗浄される。一部の実施形態において、当技術分野において公知の通り解凍ＴＩＬをカウントし、生存率に関して評価することができる。

【０６５７】

［００６６０］ある場合には、ステップＢのＴＩＬ集団は、以下で考察するプロトコルを用いて直ちに凍結保存することができる。代わりに、バルクＴＩＬ集団にステップＣ及びステップＤを施し、ステップＤ後に凍結保存することができる。同様に、遺伝子修飾ＴＩＬを治療に使用する場合、ステップＢ又はステップＤのＴＩＬ集団は、適切な処置のため遺伝子修飾の対象となり得る。

【０６５８】

Ｖ．癌及び他の疾患の処置方法

［００６６１］本明細書に記載の組成物及び方法は、疾患の処置方法で使用することができる。一実施形態において、それらは過剰成長性障害の処置に使用するためのものである。それらは、本明細書及び以下の段落に記載されている通り他の障害の処置にも使用され得る。

【０６５９】

［００６６２］一部の実施形態において、過剰成長性障害は癌である。一部の実施形態において、過剰成長性障害は固形腫瘍癌である。一部の実施形態において、固形腫瘍癌は、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされる癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、腎癌及び腎細胞癌からなる群から選択される。一部の実施形態において、過剰成長性障害は血液学的悪性腫瘍である。一部の実施形態において、固形腫瘍癌は、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。

【０６６０】
［00663］一実施形態において、本発明は、ＴＩＬ集団で癌を処置する方法を含み、ここで患者は本開示に係るＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前処置される。一実施形態において、骨髄非破壊的化学療法は、２日間（ＴＩＬ注入の２７日前及び２６日前）のシクロホスファミド６０ｍｇ／ｋｇ／日及び５日間（ＴＩＬ注入の２７～２３日前）のフルダラビン２５ｍｇ／ｍ^2／日である。一実施形態において、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量まで８時間毎に７２０，０００ＩＵ／ｋｇでＩＬ－２の静脈内注入を受ける。
【０６６１】
［00664］示された疾患又は障害の処置、予防及び／又は管理における本明細書に記載のＴＩＬの有効性は、ヒト疾患の処置のためのガイダンスを提供する当技術分野において公知の様々なモデルを使用して試験することができる。例えば、卵巣癌の処置の有効性を決定するためのモデルは、例えば、Mullany, et al., Endocrinology 2012, 153, 1585-92；及びFong, et al., J. Ovarian Res. 2009, 2, 12に記載がある。膵臓癌の処置の有効性を決定するためのモデルは、Herreros-Villanueva, et al., World J. Gastroenterol. 2012, 18, 1286-1294に記載がある。乳癌の処置の有効性を決定するためのモデルは、例えば、Fantozzi, Breast Cancer Res. 2006, 8, 212に記載がある。黒色腫の処置の有効性を決定するためのモデルは、例えば、Damsky, et al., Pigment Cell & Melanoma Res. 2010, 23, 853-859に記載がある。肺癌の処置の有効性を決定するためのモデルは、例えば、Meuwissen, et al., Genes & Development, 2005, 19, 643-664に記載がある。肺癌処置の有効性を決定するためのモデルは、例えば、Kim, Clin. Exp. Otorhinolaryngol. 2009, 2, 55-60；及びSano, Head Neck Oncol. 2009, 1, 32に記載がある。
【０６６２】
［00665］一部の実施形態において、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）は、過剰成長性傷害の処置有効性の指標である。一部の実施形態において、ＴＩＬで処置された対象の血液中のＩＦＮ－γは、活性ＴＩＬの指標である。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ産生の効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能のもう１つの尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、本発明の方法、例えば図２０又は図２１に例示されるものを含む方法により調製されたＴＩＬで処置された対象の血液中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することにより測定できる。一部の実施形態において、本方法で得られたＴＩＬは、図１３及び本出願全体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で処置された対象と比較して、本方法のＴＩＬで処置された対象の血液中のＩＦＮ－γの増加をもたらす。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γの増加は、本発明の方法により作製されたＴＩＬで処置された患者における処置有効性の指標である。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γは、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば図２０又は図２１で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、１倍、２倍、３倍、４倍又は５倍以上増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば図２０又は図２１で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、１倍増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば図２０又は図２１で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、２倍増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば図２０又は図２１で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、３倍増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば図２０又は図２１で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、４倍増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は、未処置

患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば図２０又は図２１で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、５倍増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γは、Quantikine ELISA kitを使用して測定される。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γは、本発明の方法により作製されたＴＩＬで処置された患者からのＴＩＬエキソビボにおいて測定される。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γは、本発明の方法により作製されたＴＩＬで処置された患者の血液において測定される。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γは、本発明の方法により作製されたＴＩＬで処置された患者の血清において測定される。

【０６６３】

［00666］ 一部の実施形態において、例えば図２０又は図２１に記載されるものを含む本発明の方法により調製されたＴＩＬは、例えば、図２０又は図２１に例示されない、例えばプロセス１Ｃメソッドと称されるものを含む他の方法により作製されるＴＩＬと比較してポリクローナル性の増加を示す。一部の実施形態において、有意に改善されたポリクローナル性及び／又は増加したポリクローナル性は、癌処置の処置有効性及び／又は臨床有効性の増加の指標である。一部の実施形態において、ポリクローナル性とは、Ｔ細胞レパートリーの多様性を指す。一部の実施形態において、ポリクローナル性の増加は、本発明の方法によって作製されたＴＩＬの投与に関する処置有効性の指標である。一部の実施形態において、ポリクローナル性は、例えば、図２０又は図２１に具体化された方法以外の方法を含む、本明細書で提供する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倍又は１０００倍が増加する。一部の実施形態において、ポリクローナル性は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば図９で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、１倍増加する。一部の実施形態において、ポリクローナル性は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば図９で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、２倍増加する。一部の実施形態において、ポリクローナル性は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば図９で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、１０倍増加する。一部の実施形態において、ポリクローナル性は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば図９で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、１００倍増加する。一部の実施形態において、ポリクローナル性は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば図９で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、５００倍増加する。一部の実施形態において、ポリクローナル性は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば図９で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、１０００倍増加する。

【０６６４】

１．共投与方法

［00667］ 一部の実施形態において、本明細書に記載されるように作製されるＴＩＬ（例えば、図２０又は図２１に記載される方法から得られたＴＩＬを含む）は、以下に記載する抗体など、１つ以上の免疫チェックポイント調節因子と併用して投与することができる。例えば、ＰＤ－１を標的とし、及び本発明のＴＩＬと共投与し得る抗体としては、例えば、限定はされないが、ニボルマブ（ＢＭＳ－９３６５５８、Bristol-Myers Squibb；Opdivo（登録商標））、ペンブロリズマブ（ランブロリズマブ、ＭＫ０３４７５又はＭＫ－３４７５、Merck；Keytruda（登録商標））、ヒト化抗ＰＤ－１抗体ＪＳ００１（ShangHai JunShi）、モノクローナル抗ＰＤ－１抗体ＴＳＲ－０４２（Tesaro, Inc.）、ピジリズマブ（抗ＰＤ－１ ｍＡｂ ＣＴ－０１１、Medivation）、抗ＰＤ－１モノクローナル抗体ＢＧＢ－Ａ３１７（BeiGene）及び／又は抗ＰＤ－１抗体ＳＨＲ－１２１０（ShangHai HengRui）、ヒトモノクローナル抗体ＲＥＧＮ２８１０（

Regeneron）、ヒトモノクローナル抗体ＭＤＸ－１１０６（Bristol-Myers Squibb）及び／又はヒト化抗ＰＤ１　ＩｇＧ４抗体ＰＤＲ００１（Novartis）が挙げられる。一部の実施形態において、ＰＤ－１抗体は、クローン：ＲＭＰ１－１４（ラットＩｇＧ）－BioXcellカタログ番号BP0146からのものである。本明細書に記載される通りのステップＡ～Ｆにより作製されるＴＩＬとの共投与方法における使用に好適な他の好適な抗体は、米国特許第８，００８，４４９号（参照により本明細書に組み込まれる）に開示される抗ＰＤ－１抗体である。一部の実施形態において、抗体又はその抗原結合部分はＰＤ－Ｌ１に特異的に結合し、ＰＤ－１とのその相互作用を阻害し、それにより免疫活性を増加させる。ＰＤ－Ｌ１に結合してＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１との間の相互作用を破壊し、及び抗腫瘍免疫応答を刺激する当技術分野において公知の任意の抗体が、本明細書に記載される通りのステップＡ～Ｆにより作製されるＴＩＬとの共投与方法における使用に好適である。例えば、ＰＤ－Ｌ１を標的とする臨床試験中の抗体としては、ＢＭＳ－９３６５５９（Bristol-Myers Squibb）及びＭＰＤＬ３２８０Ａ（Genentech）が挙げられる。ＰＤ－Ｌ１を標的とする他の好適な抗体は、米国特許第７，９４３，７４３号（参照により本明細書に組み込まれる）に開示される。当業者は、ＰＤ－１又はＰＤ－Ｌ１に結合し、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１相互作用を破壊し、及び抗腫瘍免疫応答を刺激する任意の抗体が、本明細書に記載される通りのステップＡ～Ｆにより作製されるＴＩＬとの共投与方法における使用に好適であることを理解するであろう。一部の実施形態において、ステップＡ～Ｆにより作製されるＴＩＬの組み合わせを投与される対象は、患者が抗ＰＤ－１抗体単独の投与に不応性の癌型を有するとき抗ＰＤ－１抗体と共投与される。一部の実施形態において、患者が難治性黒色腫を有するとき、患者はＴＩＬを抗ＰＤ－１と併用して投与される。一部の実施形態において、患者が非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を有するとき、患者はＴＩＬを抗ＰＤ－１と併用して投与される。

【０６６５】

２．任意選択による患者のリンパ球枯渇プレコンディショニング

［00668］ 一実施形態において、本発明は、ＴＩＬ集団で癌を処置する方法を含み、ここで患者は本開示に係るＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前処置される。一実施形態において、本発明は、骨髄非破壊的化学療法で前処置された患者の癌処置に使用するためのＴＩＬの集団を含む。一実施形態において、ＴＩＬの集団は注入による投与用である。一実施形態において、骨髄非破壊的化学療法は、２日間（ＴＩＬ注入の２７日前及び２６日前）のシクロホスファミド６０ｍｇ／ｋｇ／日及び５日間（ＴＩＬ注入の２７～２３日前）のフルダラビン２５ｍｇ／ｍ^2／日である。一実施形態において、骨髄非破壊的化学療法及び本開示に係るＴＩＬ注入（０日目）後、患者は生理学的忍容量まで８時間毎に静脈内に７２０，０００ＩＵ／ｋｇのＩＬ－２（アルデスロイキン、PROLEUKINとして市販）の静脈内注入を受ける。特定の実施形態において、ＴＩＬの集団は、ＩＬ－２と組み合わせて癌を処置するのに使用され、ＩＬ－２はＴＩＬの集団後に投与される。

【０６６６】

［00669］ 実験的知見は、腫瘍特異的Ｔリンパ球の養子移入前のリンパ球枯渇が、調節性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処置効果を高めるのに重要な役割を果たすことを示す。従って、本発明の一部の実施形態は、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」とも称される）を利用する。

【０６６７】

［00670］ 一般的に、リンパ球枯渇はフルダラビン又はシクロホスファミド（活性型はマホスファミドと称される）及びその組み合わせの投与を使用して達成される。かかる方法については、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（これらは、全て参照により全体として本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０６６８】
［００６７１］一部の実施形態において、フルダラビンは、０．５μｇ／ｍＬ～１０μｇ／ｍＬフルダラビンの濃度で投与される。一部の実施形態において、フルダラビンは、１μｇ／ｍＬフルダラビンの濃度で投与される。一部の実施形態において、フルダラビン処置は、１日、２日、３日、４日、５日、６日又は７日以上にわたって実施される。一部の実施形態において、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／日又は４５ｍｇ／ｋｇ／日の投薬量で投与される。一部の実施形態において、フルダラビン処置は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で２～７日間にわたって実施される。一部の実施形態において、フルダラビン処置は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で４～５日間にわたって実施される。一部の実施形態において、フルダラビン処置は、２５ｍｇ／ｋｇ／日で４～５日間にわたって実施される。
【０６６９】
［００６７２］一部の実施形態において、シクロホスファミドの活性型であるマホスファミドは、シクロホスファミドの投与により０．５μｇ／ｍＬ～１０μｇ／ｍＬの濃度で得られる。一部の実施形態において、シクロホスファミドの活性型であるマホスファミドは、シクロホスファミドの投与により１μｇ／ｍＬの濃度で得られる。一部の実施形態において、シクロホスファミド処置は、１日、２日、３日、４日、５日、６日又は７日以上にわたって実施される。一部の実施形態において、シクロホスファミドは、１００ｍｇ／ｍ^2／日、１５０ｍｇ／ｍ^2／日、１７５ｍｇ／ｍ^2／日、２００ｍｇ／ｍ^2／日、２２５ｍｇ／ｍ^2／日、２５０ｍｇ／ｍ^2／日、２７５ｍｇ／ｍ^2／日又は３００ｍｇ／ｍ^2／日の投薬量で投与される。一部の実施形態において、シクロホスファミドは静脈内（即ちｉ．ｖ．）投与される。一部の実施形態において、シクロホスファミド処置は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で２～７日間にわたって実施される。一部の実施形態において、シクロホスファミド処置は、２５０ｍｇ／ｍ^2／日、ｉ．ｖ．で、４～５日間にわたって実施される。一部の実施形態において、シクロホスファミド処置は、２５０ｍｇ／ｍ^2／日、ｉ．ｖ．で、４日間にわたって実施される。
【０６７０】
［００６７３］一部の実施形態において、リンパ球枯渇は、フルダラビン及びシクロホスファミドを共に患者に投与することによって行われる。一部の実施形態において、４日間にわたって、フルダラビンは２５ｍｇ／ｍ^2／日、ｉ．ｖ．で投与され、シクロホスファミドは、２５０ｍｇ／ｍ^2／日、ｉ．ｖ．で投与される。
【０６７１】
［００６７４］一実施形態において、リンパ球枯渇は、６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間のシクロホスファミドの投与ステップと、それに続く２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間のフルダラビンの投与により実施される。
３．ＩＬ－２レジメン
【０６７２】
［００６７５］一実施形態において、ＩＬ－２レジメンは、治療有効部分の投与の翌日から静脈内投与される高用量ＩＬ－２レジメンを含み、治療用ＴＩＬ集団の治療有効部分を投与した１日後から静脈に内投与され始め、高用量ＩＬ－２レジメンはアルデスロイキン又はそのバイオシミラー若しくはそれらの変異体を含み、アルデロイキン又はそのバイオシミラー若しくは変異体が８時間毎に１５分ボーラス静脈内注入を使用して、最大１４用量において０．０３７ｍｇ／ｋｇ又は０．０４４ｍｇ／ｋｇ　ＩＵ／ｋｇ（患者の体重）の用量で投与される。９日間の静置後、このスケジュールを更に１４回、合計で最大２８回まで繰り返し得る。
【０６７３】
［００６７６］一実施形態において、ＩＬ－２レジメンは、漸減性ＩＬ－２レジメンを含む。漸減性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、これらの開示

は、参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態において、漸減性ＩＬ－２レジメンは、１８×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}の６時間にわたる静脈内投、それに続く１８×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}の１２時間にわたる静脈内投与、その後、１８×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}の２４時間にわたる静脈内投与、その後、４．５×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}の７２時間にわたる静脈内投与を含む。この処置サイクルは、最大４サイクル、２８日毎に繰り返し得る。一実施形態において、漸減性ＩＬ－２レジメンは、１日目の１８，０００，０００ＩＵ／ｍ^{2}、２日目の９，０００，０００ＩＵ／ｍ^{2}、３日目及び４日目の４，５００，０００ＩＵ／ｍ^{2}を含む。

【０６７４】

［００６７７］　一実施形態において、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量において１、２、４、６、７、１４又は２１日毎にペグ化ＩＬ－２を投与することを含む。

【０６７５】

４．養子細胞移入

［００６７８］　養子細胞移入（ＡＣＴ）は、非常に有効な形態の免疫療法であり、抗腫瘍活性を有する免疫細胞を癌患者に移入することを含む。ＡＣＴは、抗腫瘍活性を有するリンパ球のインビトロ同定、それらの細胞の数を増やすインビトロ拡大培養及び癌担持宿主へのその注入を伴う治療手法である。養子移入に使用されるリンパ球は、切除された腫瘍の間質に由来し得る（腫瘍浸潤リンパ球又はＴＩＬ）。ＡＣＴのためのＴＩＬは、本明細書に記載される通り調製することができる。一部の実施形態において、ＴＩＬは、例えば、図９に記載される通りの方法により調製される。ＴＩＬは、抗腫瘍Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）又はキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を発現するように遺伝子改変されている場合に血液からも誘導され得るか、混合リンパ球腫瘍細胞培養物（ＭＬＴＣ）でエンリッチされ得るか、又は自己抗原提示細胞及び腫瘍由来ペプチドを使用してクローニングされ得る。注入される癌担持宿主にリンパ球が由来するＡＣＴは、自己ＡＣＴと称される。米国特許出願公開第２０１１／００５２５３０号は、主に転移性黒色腫に罹患している患者の治療に向けた、癌退縮を促進するため養子細胞療法を実施する方法に関する（これらの方法に関して全体として参照により組み込まれる）。一部の実施形態において、ＴＩＬは、本明細書に記載される通り投与することができる。一部の実施形態において、ＴＩＬは単回用量で投与することができる。そのような投与は、注射、例えば静脈内注射によるものであり得る。一部の実施形態において、ＴＩＬ及び／又は細胞傷害性リンパ球は複数回用量で投与され得る。投与は、１年に１回、２回、３回、４回、５回、６回又は６回を超え得る。投与は、月に１回、２週間に１回、週に１回又は隔日に１回であり得る。ＴＩＬ及び／又は細胞傷害性リンパ球の投与は必要な限り継続され得る。

【実施例】

【０６７６】

実施例

［００６７９］　ここで、本明細書に包含される実施形態は、以下の実施例を参照して説明される。これらの実施例は、説明のみを目的として提供され、本明細書に包含される開示は、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、むしろ本明細書に提供される教示の結果として明らかになるあらゆる変形形態を包含すると解釈されるべきである。

【０６７７】

実施例１．凍結保存ＴＩＬ療法の産生

［００６８０］　この例は、現在の優良組織基準及び現在の優良製造基準に従ったG-Rexフラスコでの ＴＩＬ療法のｃＧＭＰ製造を説明する。

【０６７８】

【表２０】

参照プロセス拡大培養計画

推定日 (播種後)	活性	目標基準	所期の容器	推定合計 体積(mL)
0	腫瘍切離	G-Rex100MCS あたり 50 個以下の望ましい腫瘍断片	G-Rex100MCS 1 フラスコ	≤1000
11	REP 播種	G-Rex500MCS あたり 5～200 x 10^6 個の生細胞	G-Rex500MCS 1 フラスコ	≤5000
16	REP 分割	G-Rex500MCS あたり 1 x 10^9 個の生細胞	G-Rex500MCS ≤5 フラスコ	≤25000
22	回収	利用可能な細胞の合計	3-4 CS-750 バッグ	≤530

【０６７９】

【表２１】

フラスコ体積:

フラスコタイプ	実用 体積/フラスコ (mL)
G-Rex100MCS	1000
G-Rex500MCS	5000

【０６８０】

機器

［00681］ 機器リスト：０日目ＣＭ１培地の調製／腫瘍洗浄の準備／腫瘍の解剖：

・マグネヘリックゲージ
・生物学的安全キャビネット（ＢＳＣ）
・インキュベーター
・ＣＯ２アナライザー
・マイクロピペッター（１００～１０００μＬ）
・ピペットエイド
・Baxaリピーターポンプ
・Sebraチューブシーラー
・２～８℃冷蔵庫
・－８０℃冷凍庫
・－２０℃冷凍庫
・タイマー。

【０６８１】

［00682］ 機器リスト：ＣＭ２調製／１１日目ＲＥＰ播種

・マグネヘリックゲージ
・生物学的安全キャビネット（ＢＳＣ）
・インキュベーター
・インキュベーター

・ＣＯ２アナライザー
・ドライバス
・ウォーターバス
・CytoTherm
・溶接機
・Gatherex
・NC200 NucleoCounter
・Baxaリピーターポンプ
・Sebraチューブシーラーバランス
【０６８２】
[00683] 機器リスト：ＣＭ２調製／１１日目ＲＥＰ播種
・遠心分離機
・マイクロピペッター（１００～１０００μＬ）
・ピペットエイド
・タイマー
・２～８℃冷蔵庫
・－８０℃冷凍庫
・制御速度冷凍庫
・ＬＮ２貯蔵冷凍庫（隔離）
・－２０℃冷凍庫。
【０６８３】
[00684] 機器リスト：ＣＭ４調製／１６日目
・マグネヘリックゲージ
・生物学的安全キャビネット（ＢＳＣ）
・インキュベーター
・インキュベーター
・ＣＯ２アナライザー
・溶接機
・溶接機
・Gatherex
・NC200 NucleoCounter
・Baxaリピーターポンプ
・Sebraチューブシーラーバランス
・マイクロピペッター（１００～１０００μＬ）
・ピペットエイド
・２～８℃冷蔵庫
・－８０℃冷凍庫。
【０６８４】
[00685] 機器リスト：２２日目製剤、充填、凍結保存
・マグネヘリックゲージ
・生物学的安全キャビネット（ＢＳＣ）
・インキュベーター
・インキュベーター
・ＣＯ２アナライザー
・溶接機
・Gatherex
・NC200 NucleoCounter
・Baxaリピーターポンプ
・Sebraチューブシーラーバランス
・マイクロピペッター（２０－２００μＬ）ピペットエイド。

【０６８５】
［00686］ 機器リスト：２２日目製剤、充填、凍結保存
・ピペットエイド
・２～８℃冷蔵庫
・－８０℃冷凍庫
・制御速度冷凍庫
・ＬＮ２貯蔵冷凍庫
・ＬＮ２貯蔵冷凍庫（隔離）
・LOVO細胞処理システム。
【０６８６】
７．０ 材料
［00687］ 材料：０日目ＣＭ１培地の調製／腫瘍洗浄の準備／腫瘍
【０６８７】
［00688］ 解剖
・使い捨てメス、滅菌
・５０ｍＬ血清用ピペット、滅菌
・１ｍＬ血清用プラスチックピペット、滅菌
・１０ｍＬ血清用ピペット、滅菌
・遠心分離管、５０ｍＬ、２８×１１４mm、コニカルベース、スクリューキャップ、ＰＰ、滅菌
・２５ｍＬ血清用ピペット、滅菌
・５ｍＬ血清用ピペット、滅菌
・MF75シリーズ、使い捨て組織培養フィルター、１０００ｍＬ、ａＰＥＳフィルター、０．２μm、滅菌
・ピペット、血清用１００ｍＬ
・２－メルカプトエタノール１０００Ｘ、液体、Ｄ－ＰＢＳ中５５ｍＭ
・Hank’s平衡塩溶液（１Ｘ）、液体、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウムなし
・GlutaMAX １～２００ｍＭ（１００Ｘ）、液体
・ARTバリアピペットチップ、１０００μＬ、個包装、滅菌
・１５０mmペトリ皿、特深、滅菌
・６ウェル、超低アタッチメントプレート、９．５ｃｍ^{2}ウェル増殖領域、ＰＳ、滅菌
・Thermo Scientific Samco汎用移送ピペット。７．７ｍＬ、滅菌
・リピーターポンプ流体移送セットオスルアーロックエンド
・長鉗子８インチ、滅菌
・硫酸ゲンタマイシン、５０ｍｇ／ｍＬストック
・使い捨て科学鉗子、４．５インチ、ステンレス鋼、滅菌
・１００mmペトリ皿、滅菌、特深
・Pumpmatic液体分注システム
・硫酸ゲンタマイシン、５０ｍｇ／ｍＬストック
・シリンジキャップ・二機能、赤
・RPMI-1640、１Ｌボトル
・G-Rex 100Mフラスコ閉鎖系
・滅菌定規
・再構成されたＩＬ－２
・ヒト腫瘍サンプル、頭頸部、該当なし
・ヒト腫瘍サンプル、子宮頸部、該当なし
・GemCellヒト血清ＡＢ、熱不活性化、該当なし
・ヒト腫瘍サンプル、黒色腫
・GemCellヒト血清ＡＢ、熱不活性化。

【０６８８】
［00689］ 材料：ＣＭ２調製／１１日目ＲＥＰ播種
・ルアーロックシリンジ、６０ｍＬ、滅菌針、１６Ｇ×１．５インチ、滅菌
・５０ｍＬ血清用ピペット、滅菌
・１ｍＬ血清用プラスチック、ピペット、滅菌
・Nunc雌ネジ式クライオチューブバイアル、滅菌
・１０ｍＬ血清用ピペット、滅菌
・遠心分離管、１５ｍＬ
・遠心分離管、５０ｍＬ
・ピペット、血清用１００ｍＬ
・シリンジ、１ｃｃ、滅菌ルアーロック
・３ｍＬシリンジ、ルアーロックチップ、滅菌
・５ｍＬ血清用ピペット、滅菌
・Nalgene *MF75*シリーズフィルターユニットレシーバー、２５０ｍＬ、滅菌
・Nalgene MF75シリーズフィルターユニットレシーバー、５００ｍＬ、滅菌
・１０００ｍＬ Nalgene Rapid-Flow滅菌使い捨てフィルターユニット、０．２２μｍ、ＰＥＳ
・CryoStor CS-10
・２－メルカプトエタノール１０００Ｘ、液体、Ｄ－ＰＢＳ中５５ｍＭ
・GlutaMAX １～２００ｍＭ（１００Ｘ）、液体
・１，０００μＬ ARTバリア滅菌ピペットチップ、個包装
・VIA1カセット
・移送パック容器、１０００ｍＬ、カプラー付き、滅菌
・移送パック３００ｍＬカプラー付き
・滅菌アルコールパッド
・リピーターポンプ流体移送セットオスルアーロックエンド
・CTS AIM V １Ｌボトル
・MACS GMP CD3純粋（ＯＫＴ－３）
・硫酸ゲンタマイシン、５０ｍｇ／ｍＬストック
・４インチチューブ、穿孔ピン及びシリンジアダプター付き
・シリンジのみルアーロック１０ｍＬ
・チューブ、４スパイク、オスルアー、マニホールド
・重力血液投与セットＹ型、注入サイトなし、１７０μｍ血液フィルター
・Pumpmatic液体分注システム
・１０Ｌ Labtainer ３ポートバッグ
・硫酸ゲンタマイシン、５０ｍｇ／ｍＬストック
・１００ｍＬシリンジ
・３０００ｍＬ培養バッグ
・Origen Cell Connect CC2
・シリンジキャップ・二機能・赤
・RPMI-1640、１Ｌボトル
・G-Rex 500Mフラスコ閉鎖系
・再構成されたＩＬ－２
・同種異系照射フィーダー細胞
・同種異系照射フィーダー細胞
・ヒト血清、タイプＡＢ（ＨＩ）ジェミニ
・ヒト血清、タイプＡＢ（ＨＩ）ジェミニ。
【０６８９】
［00690］ 材料：ＣＭ４調製／１６日目
・ルアーロックシリンジ、６０ｍＬ滅菌

・１ｍＬ血清用プラスチックピペット、滅菌
・Ｎｕｎｃ雌ネジ式クライオチューブバイアル、滅菌
・１０ｍＬ血清用ピペット、滅菌
・遠心分離管、１５ｍＬ
・遠心分離管、５０ｍＬ
・ピペット、血清用１００ｍＬ
・ルアーロック付きシリンジ、滅菌、３ｍＬ
・５ｍＬ血清用ピペット、滅菌
・シリンジのみルアーロック１０ｍＬ
・Ｎａｌｇｅｎｅ *ＭＦ７５*シリーズ
・フィルターユニットレシーバー、２５０ｍＬ、滅菌
・ＧｌｕｔａＭＡＸ　１～２００ｍＭ（１００Ｘ）、液体
・ＡＲＴバリアピペットチップ、１０００μＬ、個包装、滅菌
・ＶＩＡ１カセット。
【０６９０】
［００６９１］　材料：ＣＭ４調製／１６日目
・移送パック容器、１０００ｍＬカプラー付き、滅菌
・滅菌アルコールパッド
・リピーターポンプ流体移送セットオスルアーロックエンド
・ＣＴＳ　ＡＩＭ-Ｖ　１０００ｍＬ、該当なし
・血漿移送セット４インチチューブ、メスルアーアダプター付き
・３０ｍＬルアーロック滅菌シリンジ
・ＣＴＳ　ＡＩＭ　Ｖ　１０Ｌバッグ
・Ｐｕｍｐｍａｔｉｃ液体分注システム
・１０Ｌ　Ｌａｂｔａｉｎｅｒ　３ポートバッグ
・シリンジキャップ・二機能・赤
・Ｇ-Ｒｅｘ５００Ｍフラスコ閉鎖系
・再構成されたＩＬ－２。
【０６９１】
［００６９２］　材料：２２日目製剤、充填、凍結保存
・ルアーロックシリンジ、６０ｍＬ滅菌
・針、１６Ｇ×１．５インチ、滅菌
・５０ｍＬ血清用ピペット、滅菌
・Ｎｕｎｃ雌ネジ式クライオチューブバイアル、滅菌
・１０ｍＬ血清用ピペット、滅菌
・遠心分離管、１５ｍＬ
・遠心分離管、５０ｍＬ
・シリンジ、１ｃｃ、滅菌ルアーロック
・３ｍＬシリンジ、ルアーロックチップ、滅菌
・２５ｍＬ血清用ピペット、滅菌
・５ｍＬ血清用ピペット、滅菌
・シリンジのみルアーロック１０ｍＬ
・ピペット、血清用１００ｍＬ
・ＡＲＴバリア滅菌ピペットチップ、２００μＬ個包装
・ＶＩＡ１－カセット
・Ｐｌａｓｍａ-Ｌｙｔｅ　Ａ注入１Ｌ
・ＬＯＶＯ細胞洗浄使い捨てセット
・ＬＯＶＯ補助バッグキット
・滅菌アルコールパッド
・リピーターポンプ流体移送セットオスルアーロックエンド

・CTS AIM V　１Ｌボトル
・ヒトアルブミン２５％
・血漿移送セット４インチチューブ、メスルアーアダプター付き
・チューブ、４オスルアー、マニホールド
・重力血液投与
・セットＹ型、注入サイトなし、１７０μｍ血液フィルター
・Pumpmatic液体分注システム
・１０Ｌ　Labtainer　３ポートバッグ
・１００ｍＬシリンジ
・クライオバッグCS750
・３Ｌ培地バッグ
・Origen Cell Connect CC2
・シリンジキャップ・二機能・赤
・Cryostor CS10、１００ｍＬバッグ
・分注スパイク、ベント付き
・再構成されたＩＬ－２。

【０６９２】

［00693］ プロセス

８．１　０日目ＣＭ１培地の調製

８．１．１　部屋の衛生化、ラインクリアランス及び材料を確認した。部屋の衛生化を確認した。

８．１．２　前処理表の完了を確認した。

８．１．３　環境モニタリング。処理の前に、前処理環境モニタリングが開始されたことを確認した。

８．１．４　RPMI1640培地を調製した。ＢＳＣ中で、適切なサイズのピペットを使用して、１０００ｍＬ　RPMI 1640培地から１００．０ｍＬを取り出し、「廃棄物」とラベル付けされた適切なサイズの容器に入れた。

８．１．５　ＢＳＣ中で、RPMI 1640培地ボトルに試薬を追加した。表に示すように、RPMI 1640培地ボトルに次の試薬を追加した。追加された体積を記録した。

ボトルごとの追加量：熱不活性化ヒトAB血清（１００．０ｍＬ）；GlutaMax（１０．０ｍＬ）；硫酸ゲンタマイシン、５０ｍｇ／ｍＬ（１．０ｍＬ）；２－メルカプトエタノール（１．０ｍＬ）

８．１．６　培地を混合した。試薬が完全に混合されるように、ステップ８．１．５からのRPMI 1640培地ボトルにキャップを付け、ボトルを回旋した。

８．１．７　ＲＰＭＩ培地をろ過した。ステップ８．１．６から１Ｌ　０．２２－ミクロンフィルターユニットを通してRPMI 1640培地をろ過した。

８．１．８　ろ過された培地とラベル付けした。ろ過された培地に無菌的に蓋をし、以下の情報をラベル付けした。

８．１．９　ＢＳＣから不要な材料を取り出した。セクション８．２の配合された洗浄培地の調製のために、ＢＳＣから培地試薬を移し、硫酸ゲンタマイシン及びＨＢＳＳをＢＳＣ中に残した。

８．１．１０　未使用の消耗品を保管した。いかなる残りの開封／解凍した培地試薬も適切な保管条件に移すか又は廃棄した。

注記：プロセスノート５．９に従って、適切な開封有効期限を培地試薬に割り当て、バッチ記録ロット番号でラベルを付した。

８．１．１１　ＩＬ－２アリコートを解凍した。全ての氷が溶けるまで、１つの１．１ｍＬ　ＩＬ－２アリコート（６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）（ＢＲ７１４２４）を解凍した。ＩＬ－２を記録した。ロット番号及び有効期限（注記：ＩＬ－２ラベルが添付されていることを確認した）。

８．１．１２　ＩＬ－２原料溶液を培地に移した。ＢＳＣ中で、１．０ｍＬのＩＬ－２原

料溶液を、ステップ８．１．８で調製したＣＭ１　０日目培地ボトルに移した。ＣＭ１　０日目培地１ボトル及びＩＬ－２（６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）１．０ｍＬを追加した。
８．１．１３　混合し、ラベルを付け直した。ＩＬ－２を含む培地を混合するために、ボトルに蓋をして回旋した。「完全ＣＭ１　０日目培地」というラベルを付し、新しいロット番号を割り当てた。
８．１．１４　サンプルプランに従うサンプル培地。適切なサイズのピペットを使用して２０．０ｍＬの培地を取り出し、５０ｍＬのコニカルチューブに分注した。
８．１．１５　ラベルを付し、保管した。サンプルをサンプルプラン在庫ラベルとラベル付けし、サンプルプランに従い試験用にログインのために提出するまで、「培地参考品」サンプルを２～８℃で保管した。
８．１．１６　サンプリングのためにサインした。サンプルを取り出すためのＬＩＭＳサンプルプランシートが完成していることを確認した。
８．１．１７　「組織片」コニカルチューブを準備した。ＢＳＣにて、２５．０ｍＬの「完全ＣＭ１　０日目培地」（ステップ８．１．１３で調製した）を５０ｍＬのコニカルチューブに移した。チューブに「組織片」及びバッチ記録ロット番号のラベルを付した。
８．１．１８　G-Rex100MCSをＢＳＣ中に移した。G-Rex100MCS（Ｗ３０１３１３０）を無菌的にＢＳＣに入れた。
８．１．１９　G-Rex100MCSを準備した。ＢＳＣ中で、ベントフィルタークランプを開いたままにしてG-Rex100MCSの全てのクランプを閉じた。
８．１．２０　G-Rex100MCSを準備した。ルアー接続を介して、G-Rex100MCSフラスコの赤い線をリピーターポンプ流体移送セット（Ｗ３００９４９７）の長径端に接続した。
８．１．２１　Baxaポンプを準備した。ＢＳＣに隣接しているBaxaポンプを実行した。ＢＳＣからリピーターポンプ流体移送セットのポンプチューブセクションを取り外し、リピーターポンプに取り付けた。
８．１．２２　培地を汲み上げる準備した。ＢＳＣ内で、Pumpmatic溶液分注システム（ＰＬＤＳ）（Ｗ３０１２７２０）からシリンジを取り外し、廃棄した。
注記：ＰＬＤＳピペットの無菌性を損なわないようにした。
８．１．２３　培地を汲み上げる準備した。ＰＬＤＳピペットを、ルアー接続を介してリピーターポンプ流体移送セットの小径端に接続し、吸引のために「完全ＣＭ１　０日目培地」（ステップ８．１．１３で調製した）にピペットチップを取り付けた。
培地とG-Rex100MCSとの間の全てのクランプを開けた。
８．１．２４　完全ＣＭ１培地をG-Rex100MCSフラスコに送り込んだ。ポンプ速度を「高」及び「９」に設定し、全ての完全ＣＭ１　０日目培地をG-Rex100MCSフラスコに送り込んだ。全ての培地が送り込まれた時点において、ラインをクリアにし、ポンプを停止した。
８．１．２５　フラスコからポンプを取り外した。ベントフィルターを除き、フラスコの全てのクランプが閉じていることを確認した。赤い培地ラインからリピーターポンプ流体移送セットを取り外し、赤い培地ラインに赤いキャップ（Ｗ３０１２８４５）を取り付けた。
８．１．２６　ヒートシールした。ＢＳＣからG-Rex100MCSフラスコを取り出し、ターミナルルアー近くの赤いラインから赤いキャップをヒートシール（プロセスノート５．１２に従う）した。
８．１．２７　G-Rex100MCSにラベルを付した。ＱＡが用意したG-Rex100MCSフラスコにインプロセス「０日目」ラベルを付けた。サンプルに以下の「０日目」ラベルを添付した。
８．１．２８　インキュベーターをモニターした。インキュベーターのパラメータ：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。
８．１．２９　培地を温めた。ステップ８．１．１７で準備した「組織断片」とラベルの

付いた５０ｍＬコニカルチューブ及びステップ８．１．２７で準備したG-Rex100MCSを、３０分以上加温するためにインキュベーターに入れた。
以下の加温時間を記録した。加温時間が３０分以上であったか（はい／いいえ）を記録した。
［組織断片コニカル又はGRex100MCS］
８．１．３０　セクション８．１をレビューした。
８．２　０日目腫瘍洗浄培地の調製
８．２．１　ゲンタマイシンをＨＢＳＳに追加した。ＢＳＣ中で、５．０ｍＬのゲンタマイシン（Ｗ３００９８３２又はＷ３０１２７３５）を１×５００ｍＬ　ＨＢＳＳ培地（Ｗ３０１３１２８）ボトルに追加した。体積を記録した。ボトルごとの追加量：ＨＢＳＳ（５００．０ｍＬ）；硫酸ゲンタマイシン、５０ｍｇ／ｍｌ（５．０ｍＬ）。
８．２．２　ＨＢＳＳボトルに蓋をして、回旋した。ステップ８．２．１で調製したゲンタマイシンを含有するＨＢＳＳにキャップを付け、ボトルを回旋して試薬が完全に混合されていることを確認した。
８．２．３　溶液をろ過した。ステップ８．２．１で調製したゲンタマイシンを含むＨＢＳＳを１Ｌ　０．２２ミクロンフィルタ‐ユニット（Ｗ１２１８８１０）でろ過した。
８．２．４　ろ過された培地に無菌的に蓋をし、ラベルを付した。ろ過された培地に無菌的に蓋をし、以下の情報をラベル付けした。セクション８．３に進んだ。
８．２．５　セクション８．２をレビューした。
８．３　０日目の腫瘍処置
８．３．１　腫瘍を入手した。ＱＡＲから腫瘍標本を入手し、処理のために直ちに２～８℃の部屋に移した。必要な全ての情報が腫瘍輸送バッチ記録に記録されていることを確認した。
８．３．２　腫瘍情報を記録した。
８．３．３　腫瘍ラベルを貼付した。腫瘍アタッチメントを貼付した。以下のQARリリーススステッカー。腫瘍輸送バッチ記録に＃５を添付した。
８．３．４　腫瘍解剖に必要な材料をＢＳＣ中に移した。
８．３．５　材料を開封した。物品の無菌性を損なわないようにして、ＢＳＣ内の全ての材料を開封した。
８．３．６　材料にラベルを付した。３本の５０ｍｌコニカルチューブにラベルを付けた。１つ目は「鉗子」、２つ目は「メス」、３つ目は「新鮮な腫瘍洗浄培地」。５×１００ｍｍのペトリ皿に「洗浄１」、「洗浄２」、「洗浄３」、「保持」及び「良好でない」というラベルを付けた。１つの６ウェルプレートに「好ましい中間断片」というラベルを付けた。
８．３．７　分割された腫瘍洗浄培地。適切なサイズのピペットを使用して、５．０ｍＬのステップ８．２．４で調製された「腫瘍洗浄培地」を１つの６ウェルプレートの各ウェルの良好な中間腫瘍断片を（合計３０．０ｍＬ）に移した。注記：腫瘍の洗浄及び解剖プロセス中に、必要に応じて、鉗子及びメスをそれぞれの腫瘍洗浄培地コニカルに保管した。
８．３．８　分割された腫瘍洗浄培地。適切なサイズのピペットを使用して、ステップ８．２．４で調製した５０．０ｍＬの「腫瘍洗浄培地」を「洗浄１」、「洗浄２」、「洗浄３」、「保持」の各１００ｍｍペトリ皿に移した（合計２００．０ｍＬ）。
８．３．９　分割された腫瘍洗浄培地。適切なサイズのピペットを使用して、ステップ８．２．４で準備した２０．０ｍＬの「腫瘍洗浄培地」を各５０ｍＬコニカル（合計６０．０ｍＬ）に移した。
８．３．１０　腫瘍片用に蓋を準備した。２つの６ウェルプレートから蓋を無菌的に取り外した。蓋は、選択された腫瘍片に利用された。注記：腫瘍処理を通して、開いた組織培養プレート及び蓋の上を横切らなかった。
８．３．１１　腫瘍をＢＳＣ中に移した。無菌的に腫瘍はＢＳＣに移された。処理開始時間が記録された。

８．３．１２　腫瘍洗浄１　８インチ鉗子（Ｗ３００９７７１）を使用し、標本ボトルから腫瘍を取り出し、ステップ８．３．８で準備した「洗浄１」皿に移した。
注記：検体ボトルに溶液を保持した。
８．３．１３　腫瘍洗浄１　鉗子を使用して、以下のタイマーからの時間、腫瘍を穏やかに洗浄した。標本を採取し、３分以上放置した。洗浄時間を記録した（分：秒）。
８．３．１４　サンプルプランに従いバイオバーデンサンプルを準備した。サンプルプランごとに、腫瘍検体ボトルから２０．０ｍＬ（又は利用可能な体積）の溶液を５０ｍＬのコニカルに移した。
８．３．１５　サンプルにラベルを付し、保管した。ステップ８．３．１４で収集したバイオバーデンサンプルにサンプルプラン在庫ラベルでラベルを付し、試験用に提出するまで２～８℃で保管した。
８．３．１６　サンプリングのためにサインした。サンプルを取り出すためのＬＩＭＳサンプルプランシートが完成していることを確認した。
８．３．１７　腫瘍洗浄２。新しい鉗子セットを使用し、「洗浄１」皿から腫瘍を取り出し、ステップ８．３．８で調製された「洗浄２」皿に移した。
８．３．１８　腫瘍洗浄２。ピンセットを使用して、３分以上静かに撹拌して腫瘍標本を洗浄し、その後、静置した。時間を記録した。
８．３．１９　所望の腫瘍片について腫瘍洗浄培地を数滴準備した。移送ピペットを使用して、ステップ８．３．９で準備したコニカルから腫瘍洗浄培地を４滴ずつ、６ウェルプレートの裏返した蓋のそれぞれの６つの円に入れた（２つの蓋）。２つの円に追加で滴下し、合計で５０滴入れた。
８．３．２０　腫瘍洗浄３。鉗子を使用し、「洗浄２」皿から腫瘍を取り出し、ステップ８．３．８で準備した「洗浄３」皿に移した。
８．３．２１　腫瘍洗浄３。鉗子を使用し、静かに撹拌して腫瘍標本を洗浄し、その後、３分以上静置した。時間を記録した。
８．３．２２　腫瘍解剖皿を準備した。１５０ｍｍ皿の蓋の下に定規を置いた。
８．３．２３　腫瘍を解剖皿に移した。ピンセットを使用して、無菌的に腫瘍標本を１５０ｍｍ解剖皿の蓋に移した。
８．３．２４　腫瘍を測定した。腫瘍標本の全ての断片を端から端まで配置し、おおよその全長と断片の数を記録した。各腫瘍標本の鮮明な写真を撮影した。
８．３．２５　腫瘍を評価した。壊死／脂肪組織の腫瘍を評価した。腫瘍領域全体の３０％超が壊死組織及び／又は脂肪組織であると観察されたかどうかを評価した。はいの場合、エリア管理者に連絡して腫瘍全体が適切な大きさであることを確認し、ステップ８．３．２６に進んだ。腫瘍領域全体の３０％未満が壊死組織又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。はいの場合、ステップ８．３．２７に進み、クリーンアップ解剖は実施されなかった。
８．３．２６　該当する場合：クリーンアップ解剖。腫瘍が大きく、組織外部の３０％超が壊死／脂肪質であると観察された場合、メス及び／又は鉗子の組み合わせを用いて、腫瘍の内部構造を保存しつつ、壊死／脂肪組織を取り除くことにより「クリーンアップ解剖」を実施した。注記：腫瘍の内部構造を維持するために、垂直切断圧のみを使用した。メスによる鋸引き運動での切断はしなかった。注記：脂肪組織、壊死組織及び無関係の組織は、好ましくない皿に置いた。
８．３．２７　腫瘍を解剖する。メス及び／又は鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍標本を均一で適切なサイズの断片（最大６個の中間断片）に切断する。注記：腫瘍の内部構造を維持するために、垂直切断圧のみを使用する。メスによる鋸引き運動での切断はしなかった。注記：解剖されていない中間断片が（ステップ８．２．４で準備された）「腫瘍洗浄培地」に完全に沈んだままであることを確認した。
８．３．２８　中間腫瘍断片を移送した。各中間断片をステップ８．３．８からの「保持」皿に移した。
８．３．２９　腫瘍断片を解剖した。一度に１つの中間断片を操作し、解剖皿の腫瘍中間

断片をおよそ３×３×３ｍｍのサイズの断片に解剖し、各断片の出血、壊死及び／又は脂肪組織の量を最小限にした。注記：腫瘍の内部構造を維持するために、垂直切断圧のみを使用した。メスによる鋸引き運動での切断はしなかった。
８．３．３０　腫瘍片を選択した。出血、壊死及び／又は脂肪組織のない最大８個の腫瘍片を選択した。参考として、定規を使用した。８個の良好な断片を得られるまで又は中間断片全体が解剖されるまで解剖を続けた。選択した各断片をステップ８．３．１９で調製した「腫瘍洗浄培地」の１滴に移した。
８．３．３１　乾燥を防ぐために中間断片を保管した。中間断片から最大８個を選択した後、中間断片のレムナントをステップ８．３．７で準備した「好ましい中間断片」の６ウェルプレートの新しいシングルウェルに入れた。注記：脂肪組織又は壊死組織を「好ましくない」皿（ステップ８．３．６で準備した）に入れた。
８．３．３２　中間断片の解剖を繰り返した。次の中間断片に進み、全ての中間断片が処理されるまでステップ８．３．２９～８．３．３１を繰り返し、必要に応じて新しいメス及び鉗子を得た。
８．３．３３　収集した断片数を決定した。望ましい組織が残っている場合、最大５０断片を滴下で充填するために、「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た。作成された解剖断片の総数を記録した。注記：解剖を通して、必要に応じて腫瘍中間断片を洗浄培地で水和させておくようにした。収集した解剖片の総量を記録した。
８．３．３４　インキュベーターからコニカルチューブを取り出した。インキュベーターから「組織片」５０ｍＬコニカルチューブを取り出した。ステップ８．１．２９の時間を記録した。コニカルチューブが３０分以上加温されたことを確認した。
８．３．３５　コニカルチューブを準備した。「組織片」５０ｍＬコニカルをＢＳＣに移し、開放処理表面の無菌性を損なわないようにする。
８．３．３６　腫瘍片を５０ｍＬコニカルチューブに移した。移送ピペット、メス、鉗子又は組み合わせを使用して、良好な皿のふたから選択された５０個の最良の腫瘍断片を「組織片」５０ｍＬコニカルチューブに移した。
注記：移動中に腫瘍片を落とし、望ましい組織が残っている場合、好ましい腫瘍中間断片ウェルから追加の断片が加えられた。断片数を記録した。
８．３．３７　G-REX100MCS用にＢＳＣを準備した。容器に播種するためにＢＳＣから不要な物品を全て取り出し、余分な断片が含まれている場合には好ましい組織プレートを保持した。
８．３．３８　インキュベーターからG-REX100MCSを取り出した。インキュベーターから培地を含むG-Rex100MCSを取り出した。ステップ８．１．２９を完了した。
８．３．３９　フラスコをＢＳＣに移した。G-Rex100MCSを無菌的にＢＳＣに入れた。注記：フラスコを移す時、蓋又は容器の底から手に持たない。両サイドから手に持ち容器を移動した。注記：G-Rexフラスコを取り扱う場合ＩＰＡワイプのみ使用した。
８．３．４０　G-Rex100MCSフラスコに腫瘍断片を追加した。ＢＳＣでは、G-Rex100MCSフラスコキャップを持ち上げて、チューブ内部の無菌性が維持されるようにした。懸濁するために腫瘍片の入ったコニカルチューブを回旋し、内容物を素早くG-Rex100MCSフラスコに注いだ。
８．３．４１　断片を均等に分散させた。腫瘍片がフラスコの膜全体に均一に分布するように確認した。必要に応じてフラスコを前後に静かに傾けて、腫瘍片を均等に配置した。
８．３．４２　血管内の腫瘍断片の総数を記録した。容器の底膜の腫瘍断片の数及び容器内確認できる浮遊物の数を記録した。注記：播種された断片の数がステップ８．３．３６Ｈで収集された数と同等でない場合、エリア管理に連絡し、セクション１０．０の文書を作成した。
８．３．４３　G-Rexフラスコをインキュベートする。以下のパラメータでG-Rex100MCSをインキュベートした：G-Rexフラスコをインキュベートした：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃；ＣＯ２パーセンテージ：５．０±１．５％ＣＯ２。

８．３．４４　インキュベーションウィンドウを計算した。インキュベーション１１日目にG-Rex100MCSを取り出す適切な時間を決定するための計算を実施した。計算：インキュベーション時間；下限＝インキュベーション時間＋２５２時間；上限＝インキュベーション時間＋２７６時間。
８．３．４５　環境モニタリング。処理後、ＢＳＣを検証し、担当者によるモニタリングが実施された。
８．３．４６　材料を廃棄した。残りの非加温培地を２～８℃で保管し、ラベルを付した。プロセスが完了した後、残りの加温培地を廃棄し、ＩＬ－２のアリコートを解凍した。
８．３．４７　サンプルの提出。全ての０日目のサンプルがログインのために送られ、ＬＩＭＳに移送されたことを確認した。
８．３．４８　セクション８．３をレビューする。
８．４　１１日目－培地の調製
８．４．１　部屋、衛生化、ラインクリアランス及び材料を確認した。部屋の衛生化、ラインクリアランス及び材料が有効期限内であることを確認した。
８．４．２　前処理表。機器リスト：ＢＳＣ；バランス；Sebraチューブシーラー；Gatherex（商標）培地取り出し及び細胞回収装置；QA提供のプラカードが適切なＢＳＣに配置されていることを確認する；QA提供のプラカードのロット番号及び患者ＩＤの表示がこのバッチ記録のロット番号及び患者ＩＤと一致していることを確認する。
８．４．３　インキュベーターをモニターした。インキュベーターをモニターした。インキュベーターのパラメータ：
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。注記：セクション８．４はセクション８．５と同時に実行され得る。
８．４．４　培地を温めた。インキュベーターで３０分以上温めた１０００ｍＬ　RPMI 1640培地（Ｗ３０１３１１２）ボトル３本及び１０００ｍＬAIM-V（Ｗ３００９５０１）ボトル３本。時間を記録した。培地：RPMI 1640及びAIM-V。注記：ステップ８．５．３４における使用のために、追加の１×１０００ｍｌボトルのAIM-V培地（Ｗ３００９５０１）を室温に置いた。ボトルに「細胞カウント希釈のみ」及びバッチ記録ロット番号のラベルを付した。
８．４．５　環境モニタリング。処理前に、ＳＯＰ－００３４４に従い前処理環境モニタリングが実施されたことを確認した。
８．４．６　インキュベーターからRPMI 1640培地を取り出した。時間に達した時にRPMI 1640培地を取り出した。ステップ８．４．４でインキュベーション終了時間を記録した。培地が３０分以上加温されたことを確認する。
８．４．７　RPMI1640培地を調製した。ＢＳＣ中で、３本のあらかじめ温めておいた１０００ｍＬ　RPMI 1640培地ボトルのそれぞれから１００．０ｍＬを取り出し、「廃棄物」というラベルが付いた適切なサイズの容器に入れた。
８．４．８　ＢＳＣ中で、RPMI 1640培地ボトルに試薬を追加する。ＢＳＣ中で、３本のRPMI 1640培地ボトルそれぞれに以下の試薬を加えた。各ボトルに追加した体積を記録した。GemCellヒト血清、Heat InactivatedタイプAB（１００．０ｍＬ）、GlutaMax（１０．０ｍＬ）、硫酸ゲンタマイシン５０ｍｇ／ｍＬ（１．０ｍＬ）、２－メルカプトエタノール（１．０ｍＬ）。
８．４．９　培地をろ過した。試薬が完全に混合されるように、ステップ８．４．８からのボトルに蓋をし、回旋した。培地の各ボトルを個別の１Ｌ　０．２２ミクロンフィルターユニットでろ過した。
８．４．１０　ろ過された培地とラベル付けした。ろ過した培地に無菌的に蓋をし、各ボトルにＣＭ１　１１日目培地ラベル付けした。
８．４．１１　ＩＬ－２アリコートを解凍した。全ての氷が溶けるまでＩＬ－２の３×１．１ｍＬアリコート（６×１０６ＩＵ／ｍＬ）（ＢＲ７１４２４）を解凍し、ＩＬ２ロット番号と有効期限を記録した。
注記：ＩＬ－２ラベルが添付されていることを確認する。

８．４．１２　インキュベーターからAIM-V培地を取り出した。インキュベーターから３本のAIM-V培地を取り出した。ステップ８．４．４のインキュベーション終了時間を記録した。３０分以上培地を温めたか確認した。
８．４．１３　AIM-VにＩＬ－２を添加する。ＢＳＣ中で、マイクロピペットを使用して、解凍したＩＬ－２　３．０ｍＬを事前に温めたAIM-V培地の１Ｌボトル１本に加えた。ＩＬ－２を分注した後、マイクロピペットチップを培地で洗浄する。各アリコートに新しい滅菌マイクロピペットチップを使用する。追加された総体積を記録した。「ＩＬ－２含有AIM-V」とボトルにラベルを付けた。
８．４．１４　材料を移した。１０ＬのLabtainerバッグとリピーターポンプ移送セットをＢＳＣに無菌的に移した。
８．４．１５　１０ＬのLabtainer培地バッグを準備した。１０ＬのLabtainerバッグの全てのラインを閉じた。ルアーロック接続を介して、リピーターポンプ移送セットの長径のチューブの端を１０ＬのLabtainerバッグの中央メスポートに取り付けた。
８．４．１６　Baxaポンプを準備する。ＢＳＣに隣接しているBaxaポンプを実行した。ＢＳＣの外側に位置するBaxaポンプに移送セットチュービングを通した。
Baxaポンプを「高」及び「９」に設定する。
８．４．１７　１０ＬのLabtainer培地バッグを準備した。ＢＳＣ内で、Pumpmatic溶液分注システム（ＰＬＤＳ）からシリンジを取り外し、廃棄した。注記：ＰＬＤＳピペットの無菌性を損なわないようにした。
８．４．１８　１０ＬのLabtainer培地バッグを準備した。ルアー接続を介してＰＬＤＳピペットをリピーターポンプ流体移送セットの小径端に接続し、吸引のためＩＬ－２ボトル（ステップ８．４．１３で調製した）を含むAIM-V培地にピペットの先端を入れた。培地ボトルと１０ＬのLabtainer間の全てのクランプを開いた。
８．４．１９　培地を１０ＬのLabtainerに注入した。ＢＳＣ中、ＰＬＤＳを使用して、ステップ８．４．１３で調製したＩＬ－２を含むあらかじめ温めておいたAIM-V培地を２本の追加のAIM-Vボトルと同様に１０ＬのLabtainerバッグに移す。ステップ８．４．１０のろ過されたＣＭ１　１１日目培地の３本のボトルを追加した。最終ボトルの追加後、バッグのラインをクリアにした。注記：培地の各ボトルの追加中にポンプを停止した。
８．４．２０　Labtainerバッグからpumpmaticを取り出した。移送セットからＰＬＤＳを取り出し、ＢＳＣのラインのルアーに赤いキャップを取り付けた。
８．４．２１　培地を混合した。バッグを穏やかにマッサージし混合した。
８．４．２２　培地にラベルを付した。ＢＳＣ中で、以下の情報を培地バッグにラベル付けした。有効期限は調製日から２４時間であった。
８．４．２３　サンプルプランに従うサンプル培地。ＢＳＣ中で、ステップ８．４．２２で準備した「完全ＣＭ２　１１日目培地」バッグの利用可能なメスポートに６０ｍＬシリンジを取り付けた。２０．０ｍＬの培地を取り出し、５０ｍＬのコニカルチューブに入れた。
「完全ＣＭ２　１１日目培地」バッグのメスポートに赤いキャップを取り付けた。
８．４．２４　サンプルにラベルを付し、保管した。サンプルプラン在庫ラベルとラベル付けし、試験用にログインのために提出するまで、培地参考品サンプルを２～８℃で保管した。
８．４．２５　サンプリングのためにサインする。サンプルを取り出すためのＬＩＭＳサンプルプランシートが完成していることを確認した。
８．４．２６　移送セットラインをシールした。ＢＳＣの外で、移送セットラインの赤いキャップを、赤いキャップの近くでヒートシール（プロセスノート５．１２に従う）した。移送セットをバッグに接続したままにした。
８．４．２７　細胞カウント希釈チューブを準備した。ＢＳＣ中で、「細胞カウント希釈用」と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。ロット番号とチューブ番号（１～４）をチューブにラベル付けし

た。４つのクライオバイアル「フィーダー」とバイアル番号（１～４）とラベル付けした。ステップ８．５．３０で使用するためにバイアルをＢＳＣ下に保管した。
８．４．２８　ＢＳＣから２～８℃に試薬を移した。いかなる残りの２－メルカプトエタノール、GlutaMax及びヒト血清もＢＳＣから２～８℃に移した。全ての試薬に、バッチ記録ロット番号及びプロセスノート５．９に従う適切な開封有効期限のラベルが付されていることを確認した。
８．４．２９　１Ｌ移送パックを用意した。ＢＳＣの外で、ステップ８．４．２２で準備した「完全ＣＭ２　１１日目培地」バッグに取り付けられた移送セットに１Ｌ移送パックを溶接（プロセスノート５．１１に従う）した。「フィーダー細胞ＣＭ２」及びロット番号を移送パックにラベル付けした。
８．４．３０　１Ｌ移送パックを用意した。バッグから数インチ離れた場所に１Ｌの移送パックチューブのチューブに、マークを付けた。チューブがマークの位置までスケール上にあるように、空の移送パックをスケールの上に置いた。
８．４．３１　スケールを風袋引きした。スケールを風袋引きし、スケールに空の移送パックを置いた。
８．４．３２　フィーダー細胞移送パックを準備した。Baxaポンプを「中」及び「４」に設定する。ステップ８．４．２２で調製した「完全ＣＭ２　１１日目」培地５００．０±５．０ｍＬを細胞ＣＭ２培地移送パックに注入した。重量で測定し、移送パックに追加された完全ＣＭ２培地の体積を記録した。
８．４．３３　ラインをヒートシールした。充填したら、プロセスノート５．１２に従いラインをヒートシールした。フィーダー細胞培地移送パックから移送セット付きのＣＭ２１１日目の培地バッグを離し、１Ｌ移送パックに溶接したままにした。
８．４．３４　該当する場合：フィーダー細胞培地移送パックをインキュベートした。該当する場合、ステップ８．６．６で使用するまで、「フィーダー細胞ＣＭ２培地」移送パックをインキュベーターに入れた。
８．４．３５　完全ＣＭ２　１１日目培地をインキュベートした。ステップ８．４．２２で調製した「完全ＣＭ２　１１日目培地」をステップ８．７．２で使用するまでインキュベーターに入れた。
８．４．３６　セクション８．４をレビューした。
８．５　１１日目－ＴＩＬ回収
８．５．１　前処理表。インキュベーターをモニターした。インキュベーターのパラメータ：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。
注記：セクション８．５は、セクション８．４及び８．６と同時に実行され得る。
８．５．２　インキュベーターからG-Rex100MCSを取り出した。G-Rex100MCSをインキュベーターから取り外す前に、インキュベーションパラメーターが満たされていることを確認するための以下のチェックを実施した。ステップ８．３．４４Ｂからの下限。ステップ８．３．４４Ｃからの上限。
インキュベーターからの取り出し時間を記録する。以下を決定した：８．３．４４Ｂ≦インキュベーターからの取り出し時間＜ステップ８．３．４４Ｃか？＊いいえの場合、エリア管理者に連絡する。インキュベーターからG-Rex 100MCSを慎重に取り外し、大きいフィルターラインを除く全てのクランプを閉じた。処理開始時間が記録された。
８．５．３　３００ｍＬの移送パックを準備した。３００ｍＬ移送パックに「ＴＩＬ懸濁液」のラベルを付けた。
８．５．４　３００ｍＬの移送パックを準備した。重力血液フィルターのＴＩＬ懸濁液移送（シングルライン）を滅菌溶接（プロセスノート５．１１に従う）した。例えば、参照されたい。
８．５．５　３００ｍＬの移送パックを準備した。３００ｍＬ移送パックを重量計に置き、乾燥重量を記録した。
８．５．６　１Ｌ移送パックを用意した。１Ｌ移送パックに「上清」及びロット番号でラ

ベル付けした。
８．５．７　G-Rex100MCSへ移送パックを溶接した。G-Rex100MCSからの赤い培地取り出しラインを「上清」移送パックに滅菌溶接（プロセスノート５．１１に従う）した。ステップ８．５．４で準備した「ＴＩＬ懸濁液」移送パックに接続された血液フィルターの上部の２つのスパイクラインの１つにG-Rex100MCSからの透明細胞取り出しラインを滅菌溶接した。例えば、参照されたい。
８．５．８　GatheRexのセットアップ。G-Rex100MCSをGatheRexの左側に配置し、「上清」及び「ＴＩＬ懸濁液」移送パックを右側に配置した。
８．５．９　GatheRexのセットアップ。G Rex100MCSから赤い培地取り出しラインをGatheRexのクランプ上部（赤い線でマーク）及びチューブガイドに取り付けた。G-Rex100MCSからのクリアハーベストラインを GatheRexのクランプ底部（青い線でマーク）及びチューブガイドに取り付けた。
８．５．１０　GatheRexのセットアップ。GatheRexからG-Rex100MCSフラスコの滅菌フィルターにガスラインを取り付けた。注記：G-Rex100MCSフラスコから上清を除去する前に、細胞取り出しラインの全てのクランプが閉じていることを確認した。
８．５．１１　G-Rex100MCSの減容。G-Rex100MCSから１Ｌ移送パックに約９００ｍＬの培地上清を移した。フラスコが水平であり、吸引ディップチューブの端まで培地が減少していることを確認するためにG-Rex100MCSフラスコを目視で検査する。注記：Gatherexが途中で停止した場合、右向きの矢印があるボタンを再度押して再起動させた。
８．５．１２　ＴＩＬ回収用にフラスコを準備する。上清を取り除いた後、赤いラインへのクランプを全て閉じた。
８．５．１３　ＴＩＬ回収の開始。ＴＩＬ回収開始時間を記録した。
８．５．１４　ＴＩＬ回収の開始。フラスコを激しく叩いて細胞を遊離させるために培地を回旋した。全ての細胞が離れたことを確認するためにフラスコの検査を実施した。注記：細胞が離れなかった場合、エリア管理に連絡した。
８．５．１５　ＴＩＬ回収の開始。収集チューブから離してフラスコを傾け、腫瘍片を縁に沿って沈降させる。断片がフラスコの反対側に残るように、収集チューブに向かってゆっくりとフラスコを傾けた。注記：細胞収集ストローが壁面及び底膜の接合部にない場合、ストローを適切に配置するには、通常、４５°の角度でフラスコを傾けたまま軽く叩くのみで十分である。
８．５．１６　ＴＩＬを回収した。ＴＩＬ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。
８．５．１７　ＴＩＬを回収した。GatheRexを使用して、血液フィルターから細胞懸濁液を３００ｍＬ移送パックに移した。注記：全ての細胞と培地が収集されるまで、エッジを傾斜し続けることを確認する。
８．５．１８　ＴＩＬを回収した。付着した細胞について膜を検査した。
８．５．１９　フラスコ膜をすすいだ。G-Rex100MCSの底をすすいだ。ガス交換膜の約１／４をリンス培地で覆う。注記：腫瘍片が回収ラインを妨害する場合、細胞収集ラインの「Ｘ」を押して収集を一時停止する。Gatherexの「クランプ解放」ボタンを押し、移送パックを持ち上げ、断片が取り出されるまで圧力を上げながら穏やかに圧迫する。ライン又はバッグが破裂する可能性があるため、バッグを強く圧迫しすぎない。障害物が取り除かれたら、収集を再開する。
８．５．２０　G-Rex100MCSのクランプを閉じた。全てのクランプが閉じていることを確認した。
８．５．２１　ヒートシールした。チューブ全体の長さがほぼ同じになるように、できる限り溶接部の近くでＴＩＬ懸濁液移送パックをヒートシール（プロセスノート５．１２に従う）した。
８．５．２２　ヒートシールした。プロセスノート５．１２に従い、「上清」移送パックをヒートシールした。溶接のための十分なラインを維持した。

８．５．２３　ＴＩＬ懸濁液の体積を計算した。ＴＩＬ懸濁液移送パックの質量記録し、細胞懸濁液の体積を計算した。
８．５．２４　サンプリング用に上清移送パックを準備した。４インチ血漿移送セットを「上清」移送パックに溶接（プロセスノート５．１１に従う）し、４インチ血漿移送セットのルアー接続を保持し、ＢＳＣに移した。
８．５．２５　サンプリング用にＴＩＬ懸濁液移送パックを準備した。４インチ血漿移送セットを３００ｍＬの「ＴＩＬ懸濁液」移送パックに溶接（プロセスノート５．１１に従う）し、４インチ血漿移送セットのルアー接続を保持し、ＢＳＣに移した。
８．５．２６　Bac-Tサンプルを引き上げた。ＢＳＣ中で、適切なサイズのシリンジを使用して、１Ｌの「上清」移送パックからおよそ２０．０ｍＬの上清を吸い上げ、「Bac-T」とラベル付けした滅菌５０ｍＬコニカルチューブに分注する。ステップ８．５．２７で使用するためにＢＳＣ中に保管する。
８．５．２７　サンプルプランごとにBacTを接種した。適切なサイズのシリンジを使用して、ステップ８．５．２６で調製したBacTとラベル付けされた５０ｍＬのコニカルから１．０ｍＬのサンプルを取り出し、嫌気性ボトルに播種した。ボトルのラベルに提供されたスペースを使用して、ボトルに接種された時間を記録した。好気性ボトルについて上記を繰り返した。注記：このステップは、順番通りでなく実施され得る。
８．５．２８　サンプルにラベルを付し、保管した。サンプルプランの在庫ラベルでラベルを付し、サンプルプランに従う試験用にログインのために送信されるまで、Bac-Tサンプルを室温で、光から保護して保管した。注記：ボトルのバーコードをラベルで覆わなかった。
８．５．２９　サンプリングのためにサインした。サンプルを取り出すためのＬＩＭＳサンプルプランシートが完成していることを確認した。
８．５．３０　ＴＩＬ細胞カウントサンプル。バイアル番号（１～４）と４つのクライオバイアルにラベル付けした。
別の３ｍＬシリンジを使用して、ルアー接続を使用してＴＩＬ懸濁液移送パックから４×１．０ｍＬの細胞カウントサンプルを引き出し、それぞれのクライオバイアルに入れた。
８．５．３１　ルアー接続を閉じた。ラインに赤いキャップ（Ｗ３０１２８４５）を取り付けた。
８．５．３２　ＴＩＬをインキュベートした。必要になるまで、ＴＩＬ移送パックをインキュベーターに入れた。
８．５．３３　細胞カウントを実施する。NC-200及びプロセスノート５．１４を使用して、細胞カウント及び計算を実施する。希釈していない初期細胞計数を実施した。
８．５．３４　細胞カウントサンプル体積を記録した。注記：希釈が不要な場合、「サンプル［μＬ］」＝２００、「希釈［μＬ］」＝０。
８．５．３５　増倍係数を決定した。総細胞カウントサンプル体積：８．５．３４Ａ＋８．５．３４Ｂ。増倍係数Ｃ÷８．５．３４Ａ。
８．５．３６　プロトコルを選択し、増倍係数を入力した。「生細胞カウントアッセイ」プロトコルが選択され、全ての増倍係数、サンプル及び希釈液の体積が入力されていることを確認した。注記：希釈が不要な場合、「サンプル［μＬ］」＝２００、「希釈［μＬ］」＝０と入力する。
８．５．３７　Nucleoviewから記録されたファイル名、生存率及び細胞カウント
８．５．３８　生細胞濃度の平均と実施された細胞カウントの生存率を決定した。生存率（８．５．３７Ａ＋８．５．３７Ｂ）÷２。生細胞濃度（８．５．３７Ｃ＋８．５．３７Ｄ）÷２
８．５．３９　カウントの上限及び下限を決定した。下限：８．５．３８Ｆ×０．９。上限：８．５．３８Ｆ×１．１。
８．５．４０　両方のカウントは許容範囲内であったか？下限：８．５．３７Ｃ及びＤ≧８．５．３９Ｇ。上限：８．５．３７Ｃ及びＤ≦８．５．３９Ｈ。＊いずれかの結果が「いいえ」の場合、ステップ８．５．４１～８．５．４８で２番目のカウントのセットを実

施した＊。
８．５．４１　該当する場合：細胞カウントを実施した。NC-200及びプロセスノート５．１４を使用して、細胞カウント及び計算を実施した。注記：希釈は、期待される細胞濃度に基づいて調整された。実施した。
８．５．４２　該当する場合：細胞カウント、サンプル体積を記録した。
８．５．４３　該当する場合：増倍係数を決定した。総細胞カウント
サンプル体積：８．５．４２Ａ＋８．５．４２Ｂ。増倍係数Ｃ÷８．５．４２ＡＤ
８．５．４４　該当する場合：プロトコルを選択し、増倍係数を入力した。「生細胞カウントアッセイ」プロトコルが選択され、全ての増倍係数、サンプル及び希釈液の体積が入力されたことを確認した。注記：希釈が不要な場合、「サンプル［μＬ］」＝２００、「希釈［μＬ］」＝０と入力する。
８．５．４５　該当する場合：Nucleoviewから記録された細胞カウント
８．５．４６　該当する場合：生細胞濃度の平均と実施された細胞カウントの生存率を決定した。平均生細胞濃度を決定した。
８．５．４７　該当する場合：カウントの上限及び下限を決定した。下限：８．５．４６Ｆ×０．９。上限：８．５．４６Ｆ×１．１。
８．５．４８　該当する場合：カウントは許容範囲内であったか？下限：８．５．４５Ｃ及びＤ≧８．５．４７Ｇ。上限：８．５．４５Ｃ及びＤ≦８．５．４７Ｈ。注記：いずれかの結果が「いいえ」の場合、ステップ８．５．４９に進んで平均を決定する。
８．５．４９　該当する場合：実施された４カウント全てから平均生細胞濃度を決定した。平均生細胞濃度（Ａ＋Ｂ＋Ｃ＋Ｄ）÷４＝平均
８．５．５０　ＴＩＬ懸濁液の体積を調整した。細胞カウントサンプルを取り出した後のＴＩＬ懸濁液の調整された体積を計算する。ステップ８．５．２３Ｃ（Ａ）からの総ＴＩＬ細胞体積。
取り出された細胞カウントサンプルの体積（４．０ｍｌ）（Ｂ）、調整された総ＴＩＬ細胞体積Ｃ＝Ａ－Ｂ。
８．５．５１　総生存ＴＩＬ細胞を計算した。平均生細胞濃度＊：８．５．３８　Ｆ＊又は８．５．４６Ｆ＊又は＊８．５．４９Ｅ＊；総体積：８．５．５０；総生細胞：Ｃ＝Ａ×Ｂ。＊生細胞濃度を決定するために循環参照ステップを使用した。注記：総生存ＴＩＬ細胞が5×10^{6}細胞未満である場合、エリア管理者に連絡し、ステップ８．７．１に進む。総生存ＴＩＬ細胞が5×10^{6}を超える場合、ステップ８．５．５２に進む。
８．５．５２　フローサイトメトリーで計算。ステップ８．５．５１Ｃからの総生存ＴＩＬ細胞カウントが4.0×10^{7}以上の場合、フローサイトメトリーサンプル用に1.0×10^{7}個の細胞を得るために体積を計算した。＊細胞が4.0×10^{7}未満である場合、表の残りのフィールドはＮ／Ａとする。ステップ８．７．１に進む。フローサイトメトリーに必要な総生細胞：1.0×10^{7}個の細胞。フローサイトメトリーに必要な細胞の体積：８．５．５１からの生細胞濃度を1.0×10^{7}細胞Ａで割った値。
８．５．５３　該当する場合：インキュベーターからＴＩＬを取り出した。インキュベーターからＴＩＬ懸濁液を取り出し、ステップ８．５．３２のインキュベーション終了時間を記録した。
８．５．５４　該当する場合：サンプルプランに従いフローサイトメトリーサンプルを取り出した。適切なサイズのシリンジを使用して、表現型サンプルの計算された体積（８．５．５２Ｃ）をＴＩＬ懸濁液移送パックから取り出し、５０ｍＬコニカルチューブに入れる。
８．５．５５　該当する場合：フローサイトメトリーサンプルにラベルを付し、保管した。サンプルプラン在庫ラベルとラベル付けし、サンプリングプランに従い試験用にログインのために提出するまで、フローサイトメトリーサンプルを２～８℃で保管した。
８．５．５６　サンプリングのためにサインした。サンプルを取り出すためのＬＩＭＳサンプルプランシートが完成していることを確認する。
８．５．５７　該当する場合：総生細胞及び体積のフローを再計算した。以下のサイトメ

トリーのサンプルを除去した後の残りの総生細胞と残りの体積を計算した。

【０６９３】

【表２２】

パラメータ	式	結果
総生存 TIL	ステップ 8.5.51C	A. 細胞
フローサイトメトリーから取り出された TIL	$1x10^7$ 細胞	B. $1x10^7$ 細胞
残りの総生存 TIL	C = A - B	C. 細胞
TIL の体積	ステップ 8.5.50C	D. mL
取り出された TIL の体積	ステップ 8.5.52 C	E. mL
残りの TIL の体積	F = D - E	F. mL

【０６９４】

８．５．５８　該当する場合：ＴＩＬ体積を計算した。２．０×１０^{8}の生細胞に等しいＴＩＬ懸濁液の体積を計算した。

【０６９５】

【表２３】

必要な総生細胞	ステップ 8.5.51A からの生細胞濃度	$2.0x10^8$ の生細胞を含有する TIL 懸濁液の体積 C=A÷B
A. $2.0x10^8$ 細胞	B. 細胞/mL	C. mL

【０６９６】

８．５．５９　該当する場合：取り出すＴＩＬ体積を計算した。取り出すＴＩＬ細胞の過剰体積を計算する。

【０６９７】

【表２４】

ステップ 8.5.57F からの TIL 懸濁液の総体積	ステップ 8.5.58C からの $2.0x10^8$ の TIL を含有する懸濁液の体積	取り出す過剰 TIL の体積 C=A-B
A. mL	B. mL	C. mL

【０６９８】

８．５．６０　該当する場合：過剰のＴＩＬを取り出した。ＢＳＣ中で、適切なサイズのシリンジを使用して、ＴＩＬ懸濁液移送パックから計算された体積（ステップ８．５．５９Ｃ）を取り出した。注記：シリンジを複数回使用しない。該当する場合、複数のシリンジを使用する。適切なサイズの滅菌容器に入れ、日付及びロット番号のラベルを付す。「

ＴＩＬ懸濁液」移送パックラインに赤いキャップを取り付けた。
８．５．６１　該当する場合：ＴＩＬをインキュベーターに入れた。必要になるまで、ＴＩＬ懸濁液移送パックをインキュベーターに入れた。時間を記録した。
８．５．６２　該当する場合：計算。取り出された総過剰ＴＩＬを計算した。
ステップ８．５．５１Ａステップ８．５．５９Ｃからの取り出すＴＩＬの体積　取り出された総過剰ＴＩＬを計算した。
【０６９９】
【表２５】

ステップ 8.5.51A からの生細胞 濃度	ステップ 8.5.59C からの 取り出す TIL の体積	取り出された 総過剰 TIL C = A x B
A. 細胞/mL	B. mL	C. 細胞

【０７００】
８．５．６３　該当する場合：計算。ステップ８．５．６２Ｃからの過剰のＴＩＬ細胞に添加するCS-10培地の量を計算した。凍結のための目標細胞濃度は１．０×１０^{8}細胞／ｍｌである。
【０７０１】
【表２６】

取り出された 総過剰 TIL ステップ 8.5.62C	凍結する 目標濃度	添加する CS-10 の体積 (mL) C=A÷B
A. 細胞	B. $1.0x10^{8}$ 細胞/mL	C. mL

【０７０２】
８．５．６４　該当する場合：過剰のＴＩＬを遠心分離した。過剰のＴＩＬ細胞懸濁液を遠心分離した。速度：３５０×ｇ。時間：１０：００分。温度：外気
ブレーキ：フル（９）。加速：フル（９）。
８．５．６５　該当する場合：コニカルチューブを観察した。観察を記録した：沈殿物が観察されたか？上清は透明であったか？＊注記：いずれかの答えが「いいえ」の場合、エリア管理者に連絡する。
８．５．６６　該当する場合：ＣＳ－１０を追加した。ＢＳＣにて、無菌的に上清を吸引した。
チューブの底を軽く叩き、残った流体に細胞を再懸濁した。
８．５．６７　該当する場合：ＣＳ－１０を追加した。ステップ８．５．６３Ｃで計算した体積のCS10をゆっくりと添加する。
８．５．６８　該当する場合：バイアルにラベルを付した。バイアルにQA提供のラベルを付した。
サンプルラベルを添付した。
８．５．６９　該当する場合：バイアルを充填した。適切なサイズのクライオバイアルに１．０ｍＬの細胞懸濁液を分注した。注記：１０本を超える過剰ＴＩＬのバイアルを充填しなかった。
８．５．７０　該当する場合：バイアルを充填した。SOP-00242に従い、適切なサイズのクライオバイアルに残りの体積を分注した。体積が０．５ｍＬ以下の場合、体積が０．５ｍＬになるまでCS10をバイアルに追加する。
８．５．７１　該当する場合：バイアルを充填した。１つのバイアルに１．０ｍＬのCS1

0を充填し、「ブランク」のラベルを付す。
８．５．７２　該当する場合：充填されたバイアルの数を記録した。以下に充填されたバイアルの数（ブランクを含まない）を記録した。
８．５．７３　該当する場合：環境モニタリング。処理後、ＢＳＣを検証し、担当者によるモニタリングが実施された。
サンプルのＴＩＬ凍結保存
８．５．７４　該当する場合：凍結保存のための体積を計算した。凍結保存用に１×１０^{7}個の細胞を得るために必要な細胞の体積を計算した。
【０７０３】
【表２７】

凍結保存に必要な総生存 TIL	ステップ 8.5.51A からの生細胞濃度	凍結保存に必要な細胞の体積 C=A÷B
A. 1x10^{7}細胞	B. 細胞/mL	C. mL

【０７０４】
８．５．７５　該当する場合：凍結保存用のサンプルを取り出した。ＢＳＣ中で、適切なサイズのシリンジを使用して、ＴＩＬ懸濁液移送パックから計算された体積（ステップ８．５．７４Ｃ）を取り出した。適切なサイズのコニカルチューブに入れ、「凍結保存サンプル１×１０^{7}細胞」、日付及びロット番号をラベル付けした。ＴＩＬ懸濁液移送パックに赤いキャップ（Ｗ３０１２８４５）を取り付けた。
８．５．７６　該当する場合：ＴＩＬをインキュベーターに入れた。必要になるまで、ＴＩＬ懸濁液移送パックをインキュベーターに入れた。
８．５．７７　該当する場合：凍結保存サンプル。次のパラメータに従って「凍結保存サンプル１×１０^{7}細胞」を遠心分離した。
速度：３５０×ｇ、時間：１０：００分、温度：外気温度、ブレーキ：フル（９）；加速：フル（９）。
注記：遠心分離機の速度及び時間に適切な単位が設定されていることを確認する。
８．５．７８　該当する場合：コニカルチューブを観察した。観察を記録した：沈殿物が観察されたか？上清は透明であるか？＊注記：いずれかの答えが「いいえ」の場合、エリア管理者に連絡する。
８．５．７９　該当する場合：ＣＳ－１０を追加した。ＢＳＣにて、無菌的に上清を吸引した。チューブの底を軽く叩き、残った流体に細胞を再懸濁した。
８．５．８０　該当する場合：ＣＳ－１０を追加した。ゆっくりと添加した。０．５ｍＬのCS10。追加した体積を記録した。
８．５．８１　該当する場合：バイアルにラベルを付した。バイアルにQA発行のラベルを付した。
８．５．８２　該当する場合：バイアルを充填した。再懸濁した体積をラベル付きクライオバイアルに分注した。
８．５．８３　該当する場合：ブランクを充填した。別のバイアルに０．５ｍＬのCS10を充填し、「ブランク」のラベルを付した。
８．５．８４　該当する場合：充填したバイアルの数（「ブランク」を含まない）を記録した。凍結保存サンプルバイアルは、約０．５ｍＬで充填した。
８．５．８５　該当する場合：環境モニタリング。処理後、ＢＳＣを検証し、担当者によるモニタリングが実施された。
８．５．８６　セクション８．５をレビューする。
８．６　１１日目－フィーダー細胞

８．６．１　フィーダー細胞を入手した。ＬＮ２冷凍庫から少なくとも２つの異なるロット番号を有するフィーダー細胞のバッグを３つ入手した。解凍の準備ができるまで、ドライアイス上に細胞を置いた。注記：セクション８．６はセクション８．５と同時に実施することができた。
８．６．２　フィーダー細胞を入手した。フィーダー細胞情報を記録した。少なくとも２つの異なるロッ番号のフィーダー細胞が得られたことを確認した。
８．６．３　ウォーターバス又はCryothermを準備した。フィーダー細胞の解凍のために、ウォーターバス又はCytothermを準備した。
８．６．４　フィーダー細胞を解凍した。フィーダー細胞バッグをロット番号に基づいて個々のジップトップバッグに入れ、３７．０±２．０℃のウォーターバス又はサイトサーモで約３～５分又は氷が消えるまで解凍した。タイマーからの以下の解凍時間を記録した。
８．６．５　フィーダー細胞ハーネスの準備。4S-4M60をCC2セルコネクト（Ｗ３０１２８２０）に溶接（プロセスノート５．１１に従う）し、セルコネクト装置（Ｂ）の単一スパイクを（Ｇ）で4S-4M60マニホールドの４スパイク端に置き換えた。ＨをＧに溶接した。
８．６．６　該当する場合：インキュベーターから培地を取り出した。ステップ８．４．３４で準備したフィーダー細胞CM2培地移送パックをインキュベーターから取り出した。
８．６．７　培地移送パックを添付した。「フィーダー細胞CM2培地」移送パックをCC2ルアーに溶接（プロセスノート５．１１に従う）する。注記：バッグは、ニードレス注入ポートを有するハーネスの側面に取り付けられた。
８．６．８　ハーネスを移す。完全ＣＭ２　１１日目培地を含む部品をＢＳＣに移した。
８．６．９　解凍したフィーダー細胞をプールする。ＢＳＣ内で、１００ｍＬシリンジに１０ｍＬの空気を引き込んだ。これを使用して、CC2の６０ｍＬシリンジを交換した。
８．６．１０　解凍したフィーダー細胞をプールする。カバーを取り外す前に、アルコールパッドでフィーダー細胞バックのポートを拭いた。CC2の３つのスパイクを使用して、３つのフィーダーバッグをスパイクする。注記：スパイクを一方向に回しながら一定の圧力を維持した。ポートの側面に穴を開けないようにする。
８．６．１１　解凍したフィーダー細胞をプールした。フィーダー細胞バッグからのラインが開き、ニードレス注入ポートへのラインが閉じるように、活栓を開いた。
８．６．１２　解凍したフィーダー細胞をプールした。フィーダー細胞バッグの内容物をシリンジに入れた。３つのバッグは全て一度に排水された。シリンジの圧力を維持しながら、フィーダー細胞バッグから排水した時点において、フィーダー細胞バッグのラインを遮断した。
８．６．１３　フィーダー細胞の体積を記録した。下のシリンジを取り外さなかった。ハーネスからのシリンジ。シリンジ内のフィーダー細胞の総体積を記録した。
８．６．１４　移送パックにフィーダー細胞が追加された。フィーダー細胞バッグのラインが閉じ、培地移送パックのラインが開くように、活栓を回した。培地移送パックへのラインがクランプ解除されていることを確認した。
８．６．１５　移送パックにフィーダー細胞を添加した。フィーダー細胞をシリンジから「フィーダー細胞ＣＭ２培地」移送パックに分注した。フィーダー細胞を含む移送パックのラインのクランプを開放し、シリンジはハーネスに取り付けたままにした。
８．６．１６　プールしたフィーダー細胞を混合した。移送パックにプールされたフィーダー細胞を混合するためにバッグをマッサージした。
８．６．１７　移送パックにラベルを付した。「フィーダー細胞懸濁液」及びロット番号をバッグにラベル付けした。
８．６．１８　移送パック中の総体積を計算した。フィーダー細胞懸濁液の総体積を計算した。
８．６．１９　細胞計数サンプルを取り出した。各サンプルに個別の３ｍＬシリンジを使用し、ニードレス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の細胞カウントサンプルを引き出した。ステップ８．４．２７でラベルを付したクライオバイアルに各サンプルを分注した。注記：滅菌アルコールパッド（Ｗ３００９４８８）でニードレス注入ポートを拭き、細胞カウントのための各サンプリング中にフィーダー細胞懸濁液を混合した。

８．６．２０　細胞カウントを実施した。NC-200及びプロセスノート５．１４を使用して、細胞カウント及び計算を実施した。０．５ｍＬの細胞懸濁液を、ロット番号及び「細胞カウント希釈用」でラベル付けされた４．５ｍＬのAIM-V培地に加えることにより、細胞カウントサンプルを希釈した。これにより１：１０希釈となる。必要に応じて調整した。

８．６．２１　細胞カウントを記録した。サンプル体積

８．６．２２　増倍係数を決定した。

【０７０５】

【表２８】

パラメータ	式	結果
総細胞数 サンプル体積	8.6.21A + 8.6.21B	C. μL
増倍 係数	C ÷ 8.6.21A	D.

【０７０６】

８．６．２３　プロトコルを選択し、増倍係数を入力した。「生細胞カウントアッセイ」プロトコルが選択され、全ての増倍係数、サンプル及び希釈液の体積が入力されていることを確認した。

８．６．２４　Nucleoviewからファイル名、生存率及び細胞カウントを記録した。

８．６．２５　生細胞濃度の平均と実施された細胞カウントの生存率を決定した。

【０７０７】

【表２９】

パラメータ	式	結果
生存率	(8.6.24A + 8.6.24B) ÷ 2	E. %
生細胞 濃度	(8.6.24C + 8.6.24D) ÷ 2	F. 細胞/mL

【０７０８】

８．６．２６　カウントの上限及び下限を決定した。

【０７０９】

【表３０】

パラメータ	式	結果
下限	8.6.25F x 0.9	G. 細胞/mL
上限	8.6.25F x 1.1	H. 細胞/mL

【０７１０】

８．６．２７　両方のカウントは、許容範囲内であったか？

【０７１１】

【表３１】

パラメータ	式	結果(はい/いいえ)
下限	8.6.24 C 及び D ≥ 8.6.26G	
上限	8.6.24 C 及び D ≤ 8.6.26H	

【０７１２】
注記：いずれかの結果が「いいえ」の場合、ステップ８．６．２８～８．６．３５で２番目のカウントのセットを実施した。
８．６．２８　該当する場合：細胞カウントを実施した。ＳＯＰ－００３１４に従い、NC-200及びプロセスノート５．１４を使用して、細胞カウント及び計算を実施する。
注記：希釈は、期待される細胞濃度に基づいて調整することができた。
８．６．２９　該当する場合：細胞カウント、サンプル体積を記録した。注記：希釈が不要な場合、「サンプル［μＬ］」＝２００、「希釈［μＬ］」＝０と入力する。
８．６．３０　該当する場合：増倍係数を決定した。
【０７１３】
【表３２】

パラメータ	式	結果
総細胞数 サンプル体積	8.6.29A + 8.6.29B	C. mL
増倍 係数	C ÷ 8.6.29A	D.

【０７１４】
８．６．３１　プロトコルを選択し、増倍係数を入力する。「生細胞カウントアッセイ」プロトコルが選択され、全ての増倍係数、サンプル及び希釈液の体積が入力されたことを確認する。注記：希釈が不要な場合、「サンプル［μＬ］」＝２００、「希釈［μＬ］」＝０と入力する。
８．６．３２　該当する場合：Nucleoviewから記録された細胞カウント
８．６．３３　該当する場合：生細胞濃度の平均と実施された細胞カウントの生存率を決定した。
【０７１５】
【表３３】

パラメータ	式	結果
生存率	(8.6.32A + 8.6.32B) ÷ 2	E. %
生細胞 濃度	(8.6.32C + 8.6.32D) ÷ 2	F. 細胞/mL

【０７１６】
８．６．３４　該当する場合：カウントの上限及び下限を決定した。
【０７１７】

【表３４】

パラメータ	式	結果
下限	8.6.33F x 0.9	G. 細胞/mL
上限	8.6.33F x 1.1	H. 細胞/mL

【０７１８】
８．６．３５　該当する場合：カウントは、許容範囲内であったか？
【０７１９】
【表３５】

パラメータ	式	結果(はい/いいえ)
下限	8.6.32 C 及び D ≥ 8.6.34G	
上限	8.6.32 C 及び D ≤ 8.6.34H	

【０７２０】
注記：いずれかの結果が「いいえ」の場合、ステップ８．６．３６に進んで、平均総生細胞濃度を求め、計算を進めた。
８．６．３６ 該当する場合：実施された４カウント全てから平均生細胞濃度を決定した。
８．６．３７　フィーダー細胞懸濁液の体積を調整した。細胞カウントサンプル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。ステップ８．６．１８Ｃからの総フィーダー細胞体積マイナス４．０ｍｌを取り出した。
８．６．３８　総生存フィーダー細胞を計算した。
【０７２１】
【表３６】

パラメータ	式	結果
平均生細胞濃度*	8.6.25 F* -又は- 8.6.33 F* -又は- 8.6.36 E*	A. 細胞/mL
総体積	8.6.37 C	B. mL
総生細胞	A x B	C. 細胞

【０７２２】
総生細胞が５×１０^{9}未満である場合、ステップ８．６．３９に進む。総生細胞が５×１０^{9}以上である場合、ステップ８．５．７０に進む。
８．６．３９　該当する場合：追加のフィーダー細胞を入手した。ＬＮ２冷凍庫からフィーダー細胞の追加バッグを入手した。解凍の準備ができるまで、ドライアイス上に細胞を置いた。
８．６．４０　該当する場合：追加のフィーダー細胞を入手した。フィーダー細胞情報を記録した。
８．６．４１　該当する場合：追加のフィーダー細胞を解凍した。４番目のフィーダー細

胞バッグをジップトップバッグに入れ、３７．０±２．０℃のウォーターバス又はサイトサーモで約３～５分又は氷が消えるまで解凍した。解凍時間を記録した。
８．６．４２　該当する場合：追加のフィーダー細胞をプールした。ＢＳＣ中で、新しい１００ｍＬシリンジに１０ｍＬの空気を引き込んだ。これを使用してハーネス上のシリンジを交換した。
８．６．４３　該当する場合：追加のフィーダー細胞をプールした。カバーを取り外す前に、アルコールパッドでフィーダー細胞バックのポートを拭いた。ステップ８．６．７で準備したハーネスの残りのスパイクの１つを使用して、フィーダー細胞バッグをスパイクした。注記：スパイクを一方向に回しながら一定の圧力を維持した。ポートの側面に穴を開けないようにした。
８．６．４４　該当する場合：追加のフィーダー細胞をプールした。フィーダー細胞バッグからのラインが開き、ニードレス注入ポートへのラインが閉じるように、活栓を開いた。
８．６．４５　該当する場合：追加のフィーダー細胞をプールした。フィーダー細胞バッグの内容物をシリンジに吸い上げた。体積を記録した。
８．６．４６　該当する場合：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。
【０７２３】
【表３７】

ステップ 8.6.37C からのフィーダー細胞体積	ステップ 8.6.45 からのフィーダー細胞体積	総フィーダー細胞体積 C=A+B
A. mL	B. mL	C. mL

【０７２４】
８．６．４７　該当する場合：移送パックにフィーダー細胞を添加した。活栓を回し、フィーダー細胞バッグのラインを閉じ、「フィーダー細胞懸濁液」移送パックへのラインを開けた。移送パックへのラインのクランプが外されていることを確認した。フィーダー細胞をシリンジから「フィーダー細胞懸濁液」移送パックに分注した。ラインを移送パックにクランプし、シリンジをハーネスに取り付けたままにした。
８．６．４８　該当する場合：移送パックにフィーダー細胞を添加した。フィーダー細胞懸濁液移送パック中のプールされたフィーダー細胞を混合するためにバッグをマッサージした。
８．６．４９　該当する場合：希釈物を調製した。ＢＳＣ中で、「細胞カウント希釈用」と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添加する。ロット番号とチューブ番号（１～４）をチューブにラベル付けをする。４つのクライオバイアルに「追加のフィーダー」及びバイアル番号（１～４）のラベルを付した。
８．６．５０　該当する場合：細胞カウントを準備した。各サンプルに個別の３ｍＬシリンジを使用し、ニードレス注入ポートを使用して、フィーダー細胞懸濁液移送パックから４×１．０ｍＬの細胞カウントサンプルを取り出した。ステップ８．６．４９でラベルを付したクライオバイアルに各サンプルを分注した。注記：滅菌アルコールパッドでニードレス注入ポートを拭き、細胞カウントのための各サンプリング中にフィーダー細胞懸濁液を混合した。
８．６．５１　該当する場合：細胞カウントを実施した。NC-200及びプロセスノート５．１４を使用して、細胞カウント及び計算を実施した。０．５ｍＬの細胞懸濁液を、ロット番号及び「細胞カウント希釈用」でラベル付けされた４．５ｍＬのAIM-V培地に加えることにより、細胞カウントサンプルを希釈した。これにより１：１０希釈となる。必要に応じて調整した。

８．６．５２　該当する場合：細胞カウントサンプル体積を記録した。
８．６．５３　該当する場合：増倍係数を決定した。
【０７２５】
【表３８】

パラメータ	式	結果
総細胞数 サンプル体積	8.6.52A + 8.6.52B	C. μL
増倍 係数	C ÷ 8.6.52A	D.

【０７２６】
８．６．５４　該当する場合：プロトコルを選択し、増倍係数を入力した。「生細胞カウントアッセイ」プロトコルが選択され、全ての増倍係数、サンプル及び希釈液の体積が入力されていることを確認した。
８．６．５５　該当する場合：Nucleoviewからファイル名、生存率及び細胞カウントを記録した。
８．６．５６　該当する場合：実施された細胞カウントの生細胞濃度の平均及び生存率を決定する。
【０７２７】
【表３９】

パラメータ	式	結果
生存率	(8.6.55A + 8.6.55B) ÷ 2	E. %
生細胞 濃度	(8.6.55C + 8.6.55D) ÷ 2	F. 細胞/mL

【０７２８】
８．６．５７　該当する場合：カウントの上限及び下限を決定する。
【０７２９】
【表４０】

パラメータ	式	結果
下限	8.6.56F x 0.9	G. 細胞/mL
上限	8.6.56F x 1.1	H. 細胞/mL

【０７３０】
両方のカウントは許容範囲内であるか？注記：いずれかの結果が「いいえ」の場合、ステップ８．５．５９～８．５．６５で２番目のカウントのセットを実施する。
８．６．５９　該当する場合：細胞カウントを実施した。NC-200及びプロセスノート５．１４を使用して、細胞カウント及び計算を実施した。注記：希釈は、期待される細胞濃度に基づいて調整することができた。
８．６．６０　該当する場合：細胞カウントサンプル体積を記録した。注記：希釈が不要な場合、「サンプル［μＬ］」＝２００、「希釈［μＬ］」＝０と入力した。
８．６．６１　該当する場合：増倍係数を決定した。
【０７３１】

【表４１】

パラメータ	式	結果
総細胞数 サンプル体積	8.6.60A + 8.6.60B	C. μL
増倍 係数	C ÷ 8.6.60A	D.

【０７３２】
８．６．６２　該当する場合：プロトコルを選択し、増倍係数を入力する。「生細胞カウントアッセイ」プロトコルが選択され、全ての増倍係数、サンプル及び希釈液の体積が入力されていることを確認する。
注記：希釈が不要な場合、「サンプル［μＬ］」＝２００、「希釈［μＬ］」＝０と入力した。
８．６．６３　該当する場合：Nucleoviewから記録された細胞カウント。
８．６．６４　該当する場合：生細胞濃度の平均と実施された細胞カウントの生存率を決定した。
【０７３３】
【表４２】

パラメータ	式	結果
生存率	(8.6.63A + 8.6.63B) ÷ 2	E. %
生細胞 濃度	(8.6.63C + 8.6.63D) ÷ 2	F. 細胞/mL

【０７３４】
８．６．６５　該当する場合：カウントの上限及び下限を決定した。
【０７３５】
【表４３】

パラメータ	式	結果
下限	8.6.64F x 0.9	G. 細胞/mL
上限	8.6.64F x 1.1	H. 細胞/mL

【０７３６】
８．６．６６　該当する場合：カウントは、許容範囲内であったか？
【０７３７】
【表４４】

パラメータ	式	結果(はい/いいえ)
下限	8.6.63 C 及び D ≥ 8.6.65G	
上限	8.6.63 C 及び D ≤ 8.6.65H	

【０７３８】
注記：いずれかの結果が「いいえ」の場合、ステップ８．６．６７に進んで、平均総生細胞濃度を求め、計算を進めた。
８．６．６７ 該当する場合：実施された４カウント全てから平均生細胞濃度を決定した。
８．６．６８ 該当する場合：フィーダー細胞懸濁液の体積を調整した。細胞カウントサンプル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。ステップ８．６．４６Ｃからの総フィーダー細胞体積マイナス４．０ｍＬを取り出した。
８．６．６９ 該当する場合：総生存フィーダー細胞を計算した。
【０７３９】
【表４５】

パラメータ	式	結果
平均生細胞濃度*	8.6.56 F* -又は- 8.6.64 F* -又は- 8.6.67 E*	A. 細胞/mL
総体積	8.6.68 C	B. mL
総生細胞	A x B	C. 細胞

【０７４０】
＊生細胞濃度を決定するために循環参照ステップを使用した。
８．６．７０ フィーダー細胞の体積を計算した。生存可能な５×１０^{9}のフィーダー細胞を得るために必要なフィーダー細胞懸濁液の体積を計算した。
【０７４１】
【表４６】

必要なフィーダー細胞数	ステップ 8.6.38A* 又は ステップ 8.6.69A* からの 生細胞濃度	フィーダー細胞の体積=5x10^{9} 生細胞 C=A÷B
A.5x10^{9} 生細胞	B. 細胞/mL	C. mL

【０７４２】
＊該当するステップを循環
８．６．７１ 過剰のフィーダー細胞の体積を計算した。取り出す過剰のフィーダー細胞の体積を計算した。最も近い整数に切り捨て。
【０７４３】

【表４７】

ステップ 8.6.46C* 又は ステップ 8.6.68C* からの 移送パック中のフィーダー細胞の総体積	フィーダー細胞の堆積= ステップ 8.6.70C からの $5x10^9$ 生細胞	取り出す過剰 フィーダー細胞の 体積。生細胞 C=A-B
A. mL	B. mL	C. mL

【０７４４】

＊該当するステップを循環

８．６．７２　過剰のフィーダー細胞を取り出した。新しい１００ｍＬシリンジで、１０ｍＬの空気を吸い上げ、シリンジをハーネスに取り付けた。

８．６．７３　過剰のフィーダー細胞を取り出した。「フィーダー細胞懸濁液」移送パックへのラインを開いた。シリンジを使用して、ステップ８．６．７１Ｃで計算されたフィーダー細胞の体積と移送パックからの追加の１０．０ｍＬを１００ｍＬシリンジに入れた。フィーダー細胞の体積を取り出したら、フィーダー細胞懸濁液移送パックのラインを閉じた。最終シリンジは取り外さなかった。注記：シリンジが満たされたら、新しいシリンジと交換した。複数のシリンジを使用して、総体積を取り出した。新しいシリンジごとに、１０ｍＬの空気を引き込んだ。

８．６．７４　体積を記録した。取り出されたフィーダー細胞の総体積（追加の１０ｍＬを含む）を記録した。

８．６．７５　ＯＫＴ３を加えた。ＢＳＣ中で、１．０ｍＬシリンジと１６Ｇ針を使用して、０．１５ｍＬのＯＫＴ３を吸い上げた。

８．６．７６　ＯＫＴ３を加えた。シリンジから針を無菌的に取り外し、シリンジをニードレス注入ポートに取り付けた。ＯＫＴ３を注入した。

８．６．７７　ＯＫＴ３を加えた。「フィーダー細胞懸濁液」移送パックの活栓を開き、ステップ８．６．７３で取り出したフィーダー細胞１０ｍＬを追加して、ラインを通してＯＫＴ３を洗い流した。

８．６．７８　ＯＫＴ３を加えた。シリンジを逆さまにして、空気を押し通してフィーダー細胞懸濁液移送パックへのラインをクリアにした。

８．６．７９　ＯＫＴ３を加えた。残りのフィーダー細胞懸濁液をシリンジに残した。全てのクランプを閉じ、ハーネスをＢＳＣから取り外した。

８．６．８０　ヒートシールした。溶接に十分なチューブを残し、フィーダー細胞懸濁液移送パックをヒートシール（プロセスノート５．１２に従う）した。ハーネスを廃棄した。

８．６．８１　セクション８．６をレビューする。

８．７　１１日目のG-Rexの充填及び播種

８．７．１　G-Rex500MCSのセットアップ。ＢＳＣの外で、梱包からG-Rex500MCSを取り出し、フラスコに亀裂やチューブにねじれがないか検査した。全てのルアー接続と閉鎖がしっかりしていることを確認した。ベントフィルターラインを除くG-Rex500MCSラインの全てのクランプを閉じた。マーカーを使用して、４．５Ｌグラデーションで線を引き込んだ。

８．７．２　インキュベーターから培地を取り出した。インキュベーターからステップ８．４．３５で調製した「完全ＣＭ２　１１日目培地」を取り出した。

８．７．３　培地を汲み上げる準備。G-Rex500MCSの赤い線を、完全ＣＭ２　１１日目培地に接続されたリピーターポンプ移送セットに溶接（プロセスノート５．１１に従う）した。

８．７．４　培地を汲み上げる準備をする。「完全ＣＭ２　１１日目培地」バッグをIVポールに掛けた。ポンプチュービングをBaxaポンプに通した。
８．７．５　G-Rex500MCSに培地を注入した。Baxaポンプを「高」及び「９」に設定する。４．５Ｌの培地をG-Rex500MCSに注入し、ステップ８．７．１のフラスコにマークされた線まで満たした。
８．７．６　ヒートシールした。ステップ８．７．３で作製した溶接部の近くにあるG-Rex500MCSの赤い線をヒートシール（プロセスノート５．１２に従う）した。
８．７．７　フラスコにラベルを付した。フラスコにサンプルに「１１日目　QA提供のインプロセス「１１日目」ラベルを添付のラベルを付した。
８．７．８　該当する場合：フラスコをインキュベートした。ＴＩＬを播種するのを待つ間、フラスコをインキュベーターで保存した。
８．７．９　フィーダー細胞の溶接：懸濁液移送パックをフラスコへ。G-Rex500MCSの赤い線を「フィーダー細胞懸濁液」移送パックに滅菌溶接（プロセスノート５．１１に従う）した。
８．７．１０　フィーダー細胞をG-Rex500MCSに加えた。フィーダー細胞懸濁液とG-Rex500MCSとの間の全てのクランプを開き、重力供給方式によりフラスコにフィーダー細胞懸濁液を追加した。ラインが完全にクリアされていることを確認した。
８．７．１１　ヒートシールした。ステップ８．７．９で作製された溶接部の近くの赤い線をヒートシール（プロセスノート５．１２に従う）した。
８．７．１２　ＴＩＬ懸濁液移送パックをフラスコに溶接した。G-Rex500MCSの赤い線を「ＴＩＬ懸濁液」移送パックに滅菌溶接（プロセスノート５．１１に従う）する。
８．７．１３　ＴＩＬをG-Rex500MCSに追加した。ＴＩＬ懸濁液とG-Rex500MCSとの間の全てのクランプを開き、重力供給方式によりフラスコにＴＩＬ懸濁液を追加した。ラインが完全にクリアされていることを確認した。
８．７．１４　ヒートシールした。ステップ８．７．１２で作製された溶接部の近くの赤い線をヒートシール（プロセスノート５．１２に従う）して、ＴＩＬ懸濁液バッグを取り外した。
８．７．１５　G-Rex500MCSをインキュベートした。大きいフィルターラインを除き、G-Rex 500MCSの全てのクランプが閉じていることを確認し、インキュベーターに置いた。インキュベーターのパラメータ：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃；ＣＯ２パーセント：５．０±１．５％　ＣＯ２。
８．７．１６　インキュベーションウィンドウを計算した。インキュベーターから１６日目にG-Rex500MCSを取り出す適切な時間を決定するための計算を実施した。インキュベーション時間（ステップ８．７．１５）。下限：インキュベーション時間＋１０８時間。上限：インキュベーション時間＋１３２時間。
８．７．１７　環境モニタリング。処理後、ＢＳＣを検証し、担当者によるモニタリングが実施された。
８．７．１８　サンプルを提出する。ログインのためにサンプルを提出する。
８．７．１９　セクション８．７をレビューする。
８．８　１１日目、過剰ＴＩＬ凍結保存
８．８．１　該当する場合：過剰なＴＩＬバイアルを冷凍した。凍結する前にＣＲＦがセットアップされたことを確認した。凍結保存を実施する。
８．８．２　該当する場合：ＣＲＦを開始した。ＣＲＦに配置されたバイアルの総数（ブランクを含まない）を記録した。ＣＲＦに移送されたバイアルの数が、ステップ８．５．７２又はステップ８．５．８４で準備したバイアルの総数と一致することを確認する。ステップ８．５．７２Ｃ又はステップ８．５．８４
８．８．３　該当する場合：凍結プロファイルの自動化部分を開始した。凍結プロファイルの自動化部分の開始の開始時間を記録した。
８．８．４　該当する場合：バイアルを制御速度冷凍庫から適切な保存場所に移送した。冷却が完了したら、バイアルをＣＲＦから適切な保存容器に移す。

８．８．５　該当する場合：バイアルを適切な保存場所に移した。ＬＮ２中の保存場所を記録した。
８．８．６　セクション８．８をレビューする。
８．９　１６日目培地の調製
８．９．１　事前に温められたAIM-V培地。使用の少なくとも１２時間前までに２～８℃から３つのCTS AIM V　１０Ｌ培地バッグを取り外し、遮光して室温に置いた。各バッグが有効期限内であることを確認する。各バッグに、バッグ番号（１～３）、ロット番号、日付及び「加温開始時間ＨＨＭＭ」のラベルを付した。温め開始時刻と日付の記録。
８．９．２　ステップ８．９．１からの培地が温められる時間を計算した。ステップ８．９．１からの培地バッグ１、２及び３の加温時間を計算した。全てのバッグが１２～２４時間温められていることを確認した。
８．９．３　部屋の衛生化、ラインクリアランス及び材料を確認した。部屋、衛生化、ラインクリアランス及び材料を確認した。
８．９．４　前処理表の完了を確認した。
８．９．５　環境モニタリング。処理前に、前処理環境モニタリングが開始されたことを確認した。
８．９．６　上清用に１０ＬのLabtainerを準備した。ＢＳＣ中、ルアー接続を使用して、１０ＬのLabtainerバッグのメスポートの１つに、リピーターポンプ流体移送セットの長径端を接続した。
８．９．７　上清用に１０ＬのLabtainerを準備した。「上清」及びロット番号のラベルを付した。
８．９．８　上清用に１０ＬのLabtainerを準備した。ＢＳＣから取り外す前に、全てのクランプが閉じられていることを確認する。注記：上清バッグはＴＩＬ回収（セクション８．１０）中に使用され、これは、培地の調製と同時に実施することができた。
８．９．９　ＩＬ－２の解凍。全ての氷が溶けるまで、CTS AIM V倍地の１袋あたりＩＬ－２（６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）（ＢＲ７１４２４）の５×１．１ｍＬアリコートを解凍した。
ＩＬ－２のロット番号及び有効期限を記録した。ＩＬ－２ラベルを貼付した。
８．９．１０　GlutaMaxを分注した。ＢＳＣ中、Glutamax１００．０ｍＬを適切なサイズのレシーバーに分注した。各レシーバーに追加された体積を記録した。
注記：ステップ８．９．１０～ステップ８．９．２８に従い、最初に１つのAIM-V培地バッグを準備した。必要な追加のバッグは、ステップ８．１０．５９で決定された。
８．９．１１　レシーバーにラベルを付した。各レシーバーに「GlutaMax」とラベルを付した。
８．９．１２　ＩＬ－２をGlutaMaxに追加した。マイクロピペットを使用して、各GlutaMaxレシーバーに５．０ｍＬのＩＬ－２を追加した。プロセスノート５．１８ごとにチップをすすぐことを確認し、追加した各ｍＬに新しいピペットチップを使用した。以下の各Glutamaxレシーバーに追加された体積を記録した。
８．９．１３　レシーバーにラベルを付した。各レシーバーに「GlutaMax＋ＩＬ－２」及びレシーバー番号のラベルを付した。
８．９．１４　製剤用にCTS AIM V培地バッグを準備した。CTS AIM V　１０Ｌ培地バッグ（Ｗ３０１２７１７）が室温で温められ、使用前に１２～２４時間遮光されていることを確認した。ステップ８．９．２のインキュベーション終了時間を記録した。
８．９．１５　製剤用にCTS AIM V培地バッグを準備した。ＢＳＣ中で、４インチ血漿移送セットのクランプを閉じ、スパイクポートを使用しバッグと接続した。注記：スパイクを一方向に回しながら一定の圧力を維持した。ポートの側面に穴を開けないようにした。
８．９．１６　製剤用にCTS AIM V培地バッグを準備した。ルアーを通してリピーターポンプ流体移送セットの長径端を４インチ血漿移送セットに接続した。
８．９．１７　Baxaポンプを実施する。ＢＳＣに隣接しているBaxaポンプを実施する。

ＢＳＣからリピーターポンプ流体移送セットのポンプチューブセクションを取り外し、リピーターポンプに取り付けた。
８．９．１８　製剤用培地を準備した。ＢＳＣ内で、Pumpmatic溶液分注システム（ＰＬＤＳ）からシリンジを取り外し、廃棄した。注記：ＰＬＤＳピペットの無菌性を損なわないようにした。
８．９．１９　製剤用培地を準備した。ＰＬＤＳピペットを、ルアー接続を介してリピーターポンプ流体移送セットの小径端に接続し、吸引のためにステップ８．９．１３で準備した「GlutaMax＋ＩＬ－２」にピペットチップを取付けた。
レシーバー及び１０Ｌバッグ間の全てのクランプを開く。
８．９．２０　GlutaMax＋ＩＬ－２をバッグに注入した。ポンプ速度を「中」と「３」に設定し、全ての「GlutaMax＋ＩＬ－２」を１０Ｌ CTS AIM V培地バッグに送った。溶液が残っていない場合、ラインをクリアにし、ポンプを停止する。以下の各AimVバッグに追加されたＩＬ－２を含むGlutaMaxの体積を記録した。記録した／
８．９．２１　ＰＬＤＳを取り外した。全てのクランプが閉じていることを確認し、リピーターポンプ流体移送セットからＰＬＤＳピペットを取り外した。リピーターポンプ流体移送セットを取り外し、４インチの血漿移送セットに赤いキャップを付けた。
８．９．２２　バッグにラベルを付した。調製した「完全ＣＭ４　１６日目培地」の各バッグにラベルを付した。
８．９．２３　サンプルプランごとの培地参考品を取り出した。３０ｍＬシリンジを使用して、シリンジを４インチ血漿移送セットに取り付けて２０．０ｍＬの「完全ＣＭ４　１６日目培地」取り出し、５０ｍＬコニカルチューブにサンプルを分注した。
注記：調製した最初のバッグの培地からのみ、培地参考品サンプルを取り出した。注記：シリンジを取り外した後、４インチ血漿移送セットが固定されているか又は赤いキャップが付いているか確認する。
８．９．２４　新しいリピーターポンプ流体移送セットを取り付けた。「完全ＣＭ４　１６日目培地」バッグに接続された４インチ血漿移送セットに新しいリ流体ポンプ移送セットの長径端を取り付けた。
８．９．２５　サンプルにラベルを付し、保管した。サンプルプラン在庫ラベルとラベル付けし、サンプルプランに従い試験用にログインのために提出するまで、培地参考品サンプルを２～８℃で保管した。
８．９．２６　サンプリングのためにサインした。サンプルを取り出すためのＬＩＭＳサンプルプランシートが完成していることを確認した。
８．９．２７　インキュベーターをモニターする。インキュベーターをモニターした。該当する場合、ステップ８．９．１０に従い、準備された追加のバッグをモニターする。インキュベーターのパラメータ：
温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃；ＣＯ２パーセント：５．０±１．５％ＣＯ２。
８．９．２８　完全ＣＭ４　１６日目培地を温めた。インキュベーター内の完全ＣＭ４　１６日目培地の最初のバッグを、使用準備が整うまで３０分以上温めた。該当する場合、ステップ８．１０．５９に従い、追加のバッグを温めた。
８．９．２９　希釈の準備をした。ＢＳＣ中で、バッチ記録ロット番号及び「細胞カウント希釈用」のラベルを付されたAIM-V培地の４．５ｍＬを各４×１５ｍＬコニカルチューブに加えた。ロット番号とチューブ番号（１～４）をコニカルチューブにラベル付けした。バイアル番号（１～４）と４つのクライオバイアルにラベル付けした。
ステップ８．１０．３１で使用するためにバイアルをＢＳＣ下に保管した。
８．９．３０　セクション８．９をレビューした。
８．１０　１６日目のＲＥＰ流出
８．１０．１　前処理表。
８．１０．２　インキュベーターをモニターした。インキュベーターをモニターした。インキュベーターのパラメータ：

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。
８．１０．３　インキュベーターからG-Rex500MCSを取り出した。G-Rex500MCSをインキュベーターから取り外す前に、インキュベーションパラメーターが満たされていることを確認するための以下のチェックを実施した。
【０７４５】
【表４８】

ステップ 8.7.16B からの下限 (DDMMMYY HHMM)	ステップ 8.7.16C からの上限 (DDMMMYY HHMM)	インキュベーター から 取り出した 時間 (DDMMMYY HHMM)	8.7.16B < インキュベーター から取り出した 時間 < ステップ 8.7.16C か? はい/いいえ*

【０７４６】
インキュベーターからG-Rex500MCSを取り出した。
８．１０．４　１Ｌ移送パックをセットアップした。約１２インチのラインを残し、プロセスノート５．１２に従い、１Ｌの移送パック（Ｗ３００６６４５）をヒートシールした。
８．１０．５　１Ｌ移送パックを用意した。１Ｌ移送パックに「ＴＩＬ懸濁液」のラベルを付けた。
８．１０．６　１Ｌ移送パックを秤量した。ライン全体を含む１Ｌの移送パックを重量計に置き、乾燥重量を記録した。
８．１０．７　GatheRexのセットアップ。G-Rex500MCSからの赤色の培地取り出しラインを、ステップ８．９．８で準備した１０Ｌのlabtainerバッグ「上清」のリピーターポンプ移送セットに滅菌溶接（プロセスノート５．１１に従う）した。G-Rex500MCSからクリア細胞取り出しラインを、ステップ８．１０．５で準備したＴＩＬ懸濁液移送パックに滅菌溶接した。
８．１０．８　GatheRexのセットアップ。G-Rex500MCSフラスコをGatheRexの左側に配置した。上清labtainerバッグを置き、その右側に及びＴＩＬ懸濁液移送パックを配置した。
８．１０．９　GatheRexのセットアップ。G-Rex500MCSからの赤い培地取り出しラインをGatheRexのクランプ上部（赤い線でマーク）及びチューブガイドに取り付けた。G-Rex500MCSからのクリアハーベストラインをクランプ底部（青い線でマーク）及びGatheRexのチューブガイドに取り付けた。
８．１０．１０　GatheRexのセットアップ。GatheRexからガスラインをG-Rex500MCSの滅菌フィルターに取り付けた。注記：G-Rex500MCSから上清を除去する前に、細胞取り出しラインの全てのクランプが閉じていることを確認した。
８．１０．１１　G-Rex500MCSの減容。ＳＯＰ－０１７７７に従って、G-Rex500MCSから１０Ｌのlabtainerに約４．５Ｌの培養上清を移した。フラスコが水平であり、吸引ディップチューブの端まで培地が減少していることを確認するためにG-Rex500MCSを目視で検査した。注記：GatheRexが途中で停止した場合、右向きの矢印があるボタンを再度押して再起動することができた。
８．１０．１２　ＴＩＬ回収用にフラスコを準備した。上清を取り除いた後、赤いラインへのクランプを全て閉じた。
８．１０．１３　ＴＩＬ回収の開始。ＴＩＬ回収開始時間を記録した。
８．１０．１４　ＴＩＬ回収の開始。フラスコを激しく叩き細胞を遊離させるために培地を回旋した。全ての細胞が離れたことを確認するためにフラスコの検査を実施した。注記

：細胞が離れなかった場合、エリア管理者に連絡する。
８．１０．１５　ＴＩＬ回収の開始。フラスコを傾けて、ホースがフラスコの端にくるようにした。注記：細胞収集ストローが壁面及び底膜の接合部にない場合、ストローを適切に配置するには、通常、４５°の角度でフラスコを傾けたまま軽く叩くのみで十分である。
８．１０．１６　ＴＩＬの回収。ＴＩＬ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。
８．１０．１７　ＴＩＬの回収。GatheRexを使用して、細胞懸濁液をＴＩＬ懸濁液移送パックに移した。注記：全ての細胞と培地が収集されるまで、エッジを傾斜し続けることを確認する。
８．１０．１８　ＴＩＬの回収。付着した細胞について膜を検査した。
８．１０．１９　フラスコ膜をすすぐ。G-Rex500MCSの底をすすぐ。ガス交換膜の約１／４をリンス培地で覆う。
８．１０．２０　G-Rex500MCSのクランプを閉じた。G-Rex500MCSの全てのクランプが閉じていることを確認した。
８．１０．２１　ヒートシールした。チューブ全体の長さがほぼ同じになるように、できる限り溶接部の近くでＴＩＬ含有移送パックをヒートシール（プロセスノート５．１２に従う）した。
８．１０．２２　ヒートシールした。上清を含む１０Ｌのlabtainerをヒートシール（プロセスノート５．１２に従う）し、ステップ８．１０．２５でのサンプル収集のためにＢＳＣに移した。
８．１０．２３　ＴＩＬ懸濁液の体積を計算した。細胞懸濁液を含む移送パックの重量を記録し、懸濁液の体積を計算した。
８．１０．２４　サンプル取り出し用の移送パックを準備した。４インチ血漿移送セットを、ステップ８．１０．２１からのＴＩＬ懸濁液移送パックに溶接（プロセスノート５．１１に従う）し、バッグのできる限り近くにメスルアー端を取り付けたままにした。
８．１０．２５　細胞上清から試験サンプルを取り出した。ＢＳＣ中で、メスのルアーポートと適切なサイズのシリンジを使用して、１０Ｌのlabtainerから１０．０ｍＬの上清を取り除く。１５ｍＬのコニカルチューブに入れて「ＢａｃＴ」とラベルを付け、ステップ８．１０．２８のＢａｃＴサンプル用にチューブを保持した。
８．１０．２６　細胞上清から試験サンプルを取り出した。別のシリンジを使用して、１０．０ｍＬの上清を取り出し、１５ｍＬコニカルチューブに入れた。ステップ８．１０．３２で使用するために、マイコプラズマサンプル用のチューブを保持した。チューブに「マイコプラズマ希釈液」とラベルを付した。
８．１０．２７　上清バッグを閉じた。ルアーポートに赤いキャップを付けてバッグを閉じ、ＢＳＣから外した。
８．１０．２８　無菌性及びＢａｃＴ試験サンプリング。ＢＳＣ中で、適切なサイズのシリンジを使用して、ステップ８．１０．２５で調製したＢａｃＴとラベル付けされた１５ｍＬのコニカルから１．０ｍＬのサンプルを取り出し、嫌気性ボトルに播種した。
好気性ボトルについて上記を繰り返す。注記：このステップは、順番通りでなく実施され得る。
８．１０．２９　サンプルにラベルを付し保管した。サンプルプランの在庫ラベルでラベルを付し、サンプルプランに従う試験用にログインのために送信されるまで、Bac-Tサンプルを室温で、光から保護して保管した。注記：ボトルのバーコードをラベルで覆わないようにした。
８．１０．３０　サンプリングのためにサインした。サンプルを取り出すためのＬＩＭＳサンプルプランシートが完成していることを確認する。
８．１０．３１　細胞カウントサンプルを取り出した。ＢＳＣ中で、各サンプルに個別の３ｍＬシリンジを使用して、ルアー接続を使用し「ＴＩＬ懸濁液」移送パックから４×１．０ｍＬ細胞カウントサンプルを取り出した。ステップ８．９．２９で準備したクライオ

バイアルにサンプルを入れた。
８．１０．３２　マイコプラズマサンプルを取り出した。３ｍＬシリンジを使用し、ＴＩＬ懸濁液移送パックから１．０ｍＬ取り出し、ステップ８．１０．２６で調製した「マイコプラズマ希釈液」とラベル付けした１５ｍＬコニカルに入れた。
８．１０．３３　サンプルにラベルを付し保管する。サンプルプラン在庫ラベルとラベル付けし、サンプルプランに従い試験用にログインのために提出するまで、マイコプラズマサンプルを２～８℃で保管した。
８．１０．３４　サンプリングのためにサインした。サンプルを取り出すためのＬＩＭＳサンプルプランシートが完成していることを確認した。
８．１０．３５　播種用の移送パックを準備した。ＢＳＣ中で、リピーターポンプ流体移送セットの長径チューブ端を、ＴＩＬを含む移送パックのルアーアダプターに取り付けた。止血鉗子を使用して、移送パックの近くのラインを遮断した。移送セットの端に赤いキャップをした。
８．１０．３６　ＴＩＬをインキュベーターに入れた。ＢＳＣから細胞懸濁液を取り出し、必要になるまでインキュベーターに入れた。時間を記録した。
８．１０．３７　細胞カウントを実施した。NC-200及びプロセスノート５．１４を使用して、細胞カウント及び計算を実施した。０．５ｍＬの細胞懸濁液をステップ８．９．２９で調製した４．５ｍＬのAIM-V培地に加えて、最初に細胞カウントサンプルを希釈した。これにより、１：１０希釈になった。
８．１０．３８　細胞カウントサンプル体積を記録した。
８．１０．３９　増倍係数を決定した。
【０７４７】
【表４９】

パラメータ	式	結果
総細胞数 サンプル体積	8.10.38A + 8.10.38B	C. μL
増倍 係数	C ÷ 8.10.38A	D.

【０７４８】
８．１０．４０　プロトコルを選択し、増倍係数を入力した。「生細胞カウントアッセイ」プロトコルが選択され、全ての増倍係数、サンプル及び希釈液の体積が入力されていることを確認した。
８．１０．４１　Nucleoviewからファイル名、生存率及び細胞カウントを記録した。
８．１０．４２　生細胞濃度の平均と実施された細胞カウントの生存率を決定した。
【０７４９】
【表５０】

パラメータ	式	結果
生存率	(8.10.41A + 8.10.41B) ÷ 2	E. %
生細胞 濃度	(8.10.41C + 8.10.41D) ÷ 2	F. 細胞/mL

【０７５０】
８．１０．４３　カウントの上限及び下限を決定した。
【０７５１】

【表５１】

パラメータ	式	結果
下限	8.10.42F x 0.9	G. 細胞/mL
上限	8.10.42F x 1.1	H. 細胞/mL

【０７５２】
８．１０．４４　両方のカウントは、許容範囲内であったか？
【０７５３】
【表５２】

パラメータ	式	結果(はい/いいえ)
下限	8.10.41C 及び D ≥ 8.10.43G	
上限	8.10.41 C 及び D ≤ 8.10.43H	

【０７５４】
８．１０．４５　該当する場合：細胞カウントを実施した。NC-200及びプロセスノート５．１４を使用して、細胞カウント及び計算を実施した。注記：希釈は、期待される細胞濃度に基づいて調整され得る。
８．１０．４６　該当する場合：細胞カウントサンプル体積を記録した。注記：希釈が不要な場合、「サンプル［μＬ］」＝２００、「希釈［μＬ］」＝０と入力する。
８．１０．４７　該当する場合：増倍係数を決定した。
【０７５５】
【表５３】

パラメータ	式	結果
総細胞数 サンプル体積	8.10.46A + 8.10.46B	C. mL
増倍 係数	C ÷ 8.10.46A	D.

【０７５６】
８．１０．４８　該当する場合：プロトコルを選択し、増倍係数を入力する。「生細胞カウントアッセイ」プロトコルが選択され、全ての増倍係数、サンプル及び希釈液の体積が入力されていることを確認する。
注記：希釈が不要な場合、「サンプル［μＬ］」＝２００、「希釈［μＬ］」＝０と入力する。
８．１０．４９　該当する場合：Nucleoviewから記録された細胞カウント
８．１０．５０　該当する場合：生細胞濃度の平均と実施された細胞カウントの生存率を決定した。
【０７５７】

【表５４】

パラメータ	式	結果
生存率	(8.10.49A + 8.10.49B) ÷ 2	E. %
生細胞濃度	(8.10.49C + 8.10.49D) ÷ 2	F. 細胞/mL

【０７５８】
８．１０．５１　該当する場合：カウントの上限及び下限を決定した。
【０７５９】
【表５５】

パラメータ	式	結果
下限	8.10.50F x 0.9	G. 細胞/mL
上限	8.10.50F x 1.1	H. 細胞/mL

【０７６０】
８．１０．５２　該当する場合：カウントは、許容範囲内であったか？
【０７６１】
【表５６】

パラメータ	式	結果(はい/いいえ)
下限	8.10.49 C 及び D ≥ 8.10.51G	
上限	8.10.49 C 及び D ≤ 8.10.51H	

【０７６２】
注記：いずれかの結果が「いいえ」の場合、ステップ８．１０．５３に進み、収集された全ての細胞カウントの平均を決定する。
８．１０．５３　該当する場合：実施された４カウント全てから平均生細胞濃度を決定した。
８．１０．５４　ＴＩＬ懸濁液の体積を調整した。細胞カウントサンプルを取り出した後のＴＩＬ懸濁液の調整された体積を計算した。試験のために、ステップ８．１０．２３Ｃからの総ＴＩＬ細胞体積マイナス５．０ｍＬを取り出した。
８．１０．５５　総生存ＴＩＬ細胞を計算した。
【０７６３】

【表５７】

パラメータ	式	結果
平均生細胞濃度*	8.10.42 F* -又は- 8.10.50 F* -又は- 8.10.53E*	A. 細胞/mL
総体積	8.10.54 C	B. mL
総生細胞	A x B	C. 細胞

【０７６４】
８．１０．５６　継代培養のためのフラスコを計算した。播種に必要なフラスコの総数を計算した。注記：G-Rex500MCSフラスコの数を四捨五入して、近い整数に表示した。
【０７６５】
【表５８】

ステップ 8.10.55C からの総生細胞数 A	目標フラスコごとに必要な細胞 B	播種する G-Rex500MCS フラスコの数 C= A÷B
細胞	$1.0x10^9$ 細胞/フラスコ	フラスコ

【０７６６】
注記：播種のためのG-Rex500MCSフラスコの最大数は、５であった。播種するフラスコの計算数が５個を超えた場合、利用可能な全体積の細胞懸濁液を使用して５個のみを播種した。
８．１０．５７　継代培養のためのフラスコの数を計算する。
【０７６７】
【表５９】

基準	はい/いいえ
播種する G-Rex500MCS フラスコの数 ステップ 8.10.56C ≤ 5 はいの場合、ステップ 8.10.58 で計算されたフラスコの播種数。	
播種する G-Rex500MCS フラスコの数 ステップ 8.10.56C > 5 はいの場合、利用可能な全ての細胞を 5 つのフラスコに播種する。	

【０７６８】
８．１０．５８　細胞カウント計算のＱＡレビューは、ステップ８．１０．３８～８．１０．５７で実施された。
８．１０．５９　必要とする追加の培地バッグの数を決定した。ステップ８．９．２８で準備したバッグに加えて必要とする培地バッグの数を計算した。
【０７６９】

【表６０】

播種する G-Rex500MCS フラスコの数 (ステップ 8.10.56C) A	必要な 培地バッグ の数 B=A÷2*	ステップ 8.9.22 で 準備した バッグの数 C	準備する 追加の バッグの数 D=B-C
		1	

【０７７０】

＊必要な培地バッグの数を次の整数に切り上げた。

８．１０．６０　該当する場合：追加の培地を調製した。ステップ８．１０．５９Ｄで計算したG-Rex-500Mフラスコが２つ必要なたびに、「ＣＭ４　１６日目培地」の１０Ｌバッグを１つ準備した。ステップ８．１０．６２に進み、追加の培地を準備し温めながら、最初のGREX-500Mフラスコに播種した。

８．１０．６１　該当する場合：追加の培地バッグを調製した。ステップ８．９．１０～ステップ８．９．２８を繰り返し、ステップ８．１０．５９Ｄで決定した追加の培地バッグの計算された数を準備し、温めた。

８．１０．６２　G-Rex500MCSを満たした。ベンチトップでG-Rex500MCSを開き、容器の亀裂やチューブのねじれを検査した。全てのルアー接続と閉鎖がしっかりしていることを確認した。フラスコの外側の４５００ｍＬラインにマーカーでマークを付けた。大きいフィルターラインを除いて、G-Rex 500MCSの全てのクランプを閉じた。

８．１０．６３　G-Rex500MCSを満たした。G-Rex500MCSの赤い培地ラインを、ステップ８．９．２８で準備した培地バッグの流体移送セットに滅菌溶接（プロセスノート５．１１に従う）した。

８．１０．６４　培地を汲み上げる準備。IVポールに「ＣＭ４　１６日目培地」を掛けた。ポンプチュービングをBaxaポンプに通した。

８．１０．６５　G-Rex500MCSに培地を注入する。Baxaポンプを「高」及び「９」に設定し、４５００ｍＬの培地をフラスコに注入する。４．５Ｌの「ＣＭ４　１６日目培地」をG-Rex500MCSに注入し、ステップ８．１０．６２のフラスコにマークされた線まで満たした。４．５Ｌの培地が移されたら直ちにポンプを停止した。

８．１０．６６　ヒートシールした。G-Rex500MCSの赤い培地ラインを、ステップ８．１０．６３で作製された溶接部の近くでヒートシール（プロセスノート５．１２に従う）し、培地バッグを取り外した。

８．１０．６７　充填の繰り返し。培地が温められ、使用する準備ができたら、ステップ８．１０．５６Ｃで計算された各フラスコについて、ステップ８．１０．６２～８．１０．６６を繰り返す。

注記：重力充填又は複数のポンプを使用して、複数のフラスコに同時に充填し得る。注記：培地１バッグについて２つのフラスコのみを充填する。

８．１０．６８　満たされたフラスコを記録しラベル付けした。充填時に各フラスコにアルファベット順にラベルを付し、QA提供のインプロセス「１６日目」ラベルを付した。

８．１０．６９　サンプルにラベルを付した。サンプルに以下の「１６日目」ラベルを添付した。

８．１０．７０　該当する場合：フラスコをインキュベートした。ＴＩＬを播種するのを待つ間、フラスコをインキュベーターで保存した。

８．１０．７１　充填されたフラスコの数を確認した。充填されたフラスコの総数を記録した。

８．１０．７２　追加する細胞懸濁液の体積を計算した。新しいG-Rex500MCSフラスコに追加するＴＩＬ懸濁液の目標体積を計算した。

【０７７１】

【表６１】

ステップ 8.10.54C からの TIL 懸濁液の総体積 A	ステップ 8.10.71 からの充填したフラスコの数	各フラスコに移す細胞懸濁液の目標体積 C= A÷B
mL		mL

【０７７２】
８．１０．５６　Ｃが５個を超える場合、細胞懸濁液の全量を使用して、５個のみが播種される。
８．１０．７３　播種のためにフラスコを準備した。インキュベーターからステップ８．１０．７０よりG-Rex500MCSを取り出した。
８．１０．７４　ポンピングの準備。大きいフィルターライン以外のG-Rex 500MCSの全てのクランプを閉じた。ポンプチュービングをBaxaポンプに通した。
８．１０．７５　インキュベーターからＴＩＬを取り出した。インキュベーターから「ＴＩＬ懸濁液」移送パックを取り出し、ステップ８．１０．３６のインキュベーション終了時間を記録した。
８．１０．７６　播種のために細胞懸濁液を調製した。ステップ８．１０．７５からの「ＴＩＬ懸濁液」移送パックを、ポンプ入口ラインへ滅菌溶接（プロセスノート５．１１に従う）した。
８．１０．７７　スケールを風袋引きした。スケール上にＴＩＬ懸濁液バッグを置いた。「低」及び「２」に設定されたBaxaポンプを使用して、ＴＩＬ懸濁液バッグから溶接までのラインをプライミングした。スケールを風袋引きした。
８．１０．７８　ＴＩＬ懸濁液をフラスコに播種した。Baxaポンプを「中」及び「５」と設定する。ステップ８．１０．７２Ｃで計算したＴＩＬ懸濁液の体積をフラスコに注入する。各フラスコに加えたＴＩＬ懸濁液の体積を記録する。
８．１０．７９　ヒートシールした。次のフラスコを溶接するのに十分なチューブを残し、「ＴＩＬ懸濁液」移送パックをヒートシール（プロセスノート５．１２に従う）した。ラインストリッパーを使用して、容器へのG-Rexフラスコライン中の残留ＴＩＬ懸濁液をクリアした。
８．１０．８０　残りのフラスコを充填した。播種した各フラスコ間で「ＴＩＬ懸濁液」移送パックを混合したことを確認し、残りの全てのフラスコに播種するためにステップ８．１０．７６～８．１０．７９を繰り返した。フラスコをアルファベット順に充填した。
８．１０．８１　インキュベーターをモニターした。注記：フラスコが２つのインキュベーターに分けて入れられた場合、両方をモニターする。インキュベーターのパラメータ：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃；ＣＯ２パーセント：５．０±１．５％ＣＯ２。
８．１０．８２　フラスコをインキュベートした。各フラスコがインキュベーターに置かれた時間を記録した。
８．１０．８３　インキュベーションウィンドウを計算した。インキュベーターから２２日目にG-Rex500MCSを取り出す時間範囲を決定するために以下の計算を実施した。
【０７７３】

【表６２】

フラスコ	8.10.83A インキュベーション時間 (ステップ 8.10.82) (DDMMMYY HHMM)	8.10.83B 下限: インキュベーション時間 + 132 時間 (DDMMMYY HHMM)	8.10.83C 上限: インキュベーション時間 + 156 時間 (DDMMMYY HHMM)

【０７７４】
８．１０．８４　環境モニタリング。処理後、ＢＳＣを検証し、担当者によるモニタリングが実施された。
８．１０．８５　サンプルの提出。全ての１６日目のサンプルがログインのために送られたことを確認した。
８．１０．８６　セクション８．１０をレビューした。
８．１１　２２日目の洗浄バッファーの調製
８．１１．１　部屋の衛生化、ラインクリアランス及び材料を確認した。
８．１１．２　前処理チェックリストの完了を確認した。
８．１１．３　環境モニタリング。処理前に、前処理環境モニタリングが実施されたことを確認した。
８．１１．４　１０LのLabtainerバッグを準備した。ＢＳＣで、ルアー接続を介して４インチ血漿移送セットを１０LのLabtainerバッグに取り付ける。
８．１１．５　１０LのLabtainerバッグを準備した。「上清」、ロット番号及び開始／日付のラベルを付した。
８．１１．６　１０LのLabtainerバッグを準備した。ＢＳＣから取り出し移す前に、全てのクランプを閉じた。注記：回収するG-Rex500MCSフラスコ２本ごとに１つの１０LのLabtainerバッグを準備した。注記：上清バッグはセクション８．１２で使用され、セクション８．１１と同時に実行することができた。
８．１１．７　流体移送セットを溶接した。ＢＳＣの外側で、4S-4M60の全てのクランプを閉じた。4S-4M60のオスルアーエンドの１つにセットされたリピーター流体移送セットを溶接（プロセスノート５．１１に従う）した。
８．１１．８　材料をＢＳＣ中に移した。Plasmalyte-A及びヒトアルブミンを２５％ＢＳＣに移した。4S-4M60及びリピーター流体移送セットの部品をＢＳＣに移す。
【０７７５】
【表６３】

成分の説明	必要な量
Plasmalyte-A	3000.0 mL
ヒトアルブミン 25%	120.0 mL
リピーター 流体移送セット での 4S-4M60	1 装置 ステップ 8.11.7

【０７７６】
８．１１．９　Plasmalyteを３０００ｍＬバッグに注入した。Plasmalyte-Aの３袋を4S-4M60コネクタセットにスパイクした。注記：取り外す前にアルコール綿棒（Ｗ３００９４８８）でポートカバーを拭いた。注記：スパイクを一方向に回しながら一定の圧力

を維持する。ポートの側面に穴を開けないようにする。
８．１１．１０　Plasmalyteを３０００ｍＬバッグに注入した。Origen ３０００ｍＬ収集バッグを、ルアー接続を介して、リピーターポンプ移送セットの長径端に接続した。
８．１１．１１　Plasmalyteを３０００ｍＬバッグに注入した。３０００ｍＬのOrigenバッグの未使用ラインのクランプを閉じた。
８．１１．１２　Plasmalyteを３０００ｍＬバッグに注入した。ＢＳＣに隣接しているBaxaポンプを実行した。ＢＳＣの外側に位置するBaxaポンプに移送セットチュービングを通した。ポンプを「高」及び「９」に設定した。
８．１１．１３　Plasmalyteを３０００ｍＬバッグに注入した。Plasmalyte-Aの全てを３０００ｍＬ　Origenバッグにポンプで注入した。
８．１１．１４　Plasmalyteを３０００ｍＬバッグに注入する。Plasmalyte-Aから３０００ｍＬ　Origenバッグまでの全てのクランプを開いた。全てのPlasmalyte-Aが移されたら直ちにポンプを停止した。
８．１１．１５　Plasmalyteを３０００ｍＬバッグに注入した。必要に応じて、ポンプを逆転させてバッグの位置を操作することにより、３０００ｍＬ　Origenバッグから空気を取り除いた。
８．１１．１６　Plasmalyteを３０００ｍＬバッグに注入した。全てのクランプを閉じた。
ルアー接続を介してリピーターポンプ流体移送セットから３０００ｍＬバッグを取り外し、バッグへのラインに赤いキャップ（Ｗ３０１２８４５）を取り付けた。
８．１１．１７　３０００ｍＬバッグにヒトアルブミン２５％を追加した。ベント付きミニスパイクを開いた。スパイクの無菌性を損なうことなく、青いキャップを確実に締めた。
８．１１．１８　３０００ｍＬバッグにヒトアルブミン２５％を追加した。ベント付きのミニスパイクで、ヒトアルブミン２５％ボトルのセプタムをスパイクした。注記：スパイクの無菌性を損なわないようにした。
８．１１．１９　３０００ｍＬバッグにヒトアルブミン２５％を追加した。ステップ８．１１．１７～ステップ８．１１．１８を、合計３回スパイクされたヒトアルブミン２５％ボトルで２回繰り返した。
８．１１．２０　３０００ｍＬバッグにヒトアルブミン２５％を追加した。１つのベント付きミニスパイクから青いキャップを取り外し、６０ｍＬシリンジをヒト血清アルブミン２５％ボトルに取り付けた。
８．１１．２１　３０００ｍＬバッグにヒトアルブミン２５％を追加した。２５％のヒト血清アルブミン６０ｍＬを調整する。注記：２５％ヒト血清アルブミンを１本以上使用する必要があり得る。必要に応じて、ベント付きミニスパイクからシリンジを外し、ヒト血清アルブミン２５％ボトルの次のベント付きミニスパイクに接続する。ヒト血清アルブミン２５％ボトルからベント付きミニスパイクを取り外さない。
８．１１．２２　３０００ｍＬバッグにヒトアルブミン２５％を追加した。６０ｍＬが得られたら直ちにベント付きミニスパイクからシリンジを取り外す。
８．１１．２３　３０００ｍＬバッグにヒトアルブミン２５％を追加した。ステップ８．１１．１６のPlasmalyte-Aで満たされた３０００ｍＬ　Origenバッグのニードルレス注入ポートにシリンジを取り付ける。全ての２５％ヒトアルブミンを分注した。注記：使用する前に、毎回アルコールパッドでニードレス注入ポートを拭いた。
８．１１．２４　３０００ｍＬバッグにヒトアルブミン２５％を追加した。ステップ８．１１．２０～ステップ８．１１．２３を繰り返して、最終体積１２０．０ｍＬのヒトアルブミン２５％を得た。
８．１１．２５　バッグを混合した。全ての２５％ヒトアルブミンを追加した後、バッグを静かに混合した。
８．１１．２６　バッグにラベルを付した。「LOVO洗浄バッファー」及びロット番号のラベルを付し、２４時間の有効期限を割り当てた。

８．１１．２７　ＩＬ－２希釈液を調製した。１０ｍＬシリンジを使用し、LOVO洗浄緩衝液バッグのニードルレス注入ポートを使用して、５．０ｍＬのLOVO洗浄バッファーを取り出した。LOVO洗浄バッファーを５０ｍＬコニカルチューブに分注し、「ＩＬ－２希釈液」及びロット番号でラベル付けした。注記：使用する前に、毎回アルコールパッドでニードレス注入ポートを拭いた。
８．１１．２８　ＣＲＦブランクバッグLOVO洗浄バッファーを分注。１００ｍＬシリンジを使用して、ニードルレス注入ポートから７０．０ｍＬのLOVO洗浄バッファーを吸い上げた。注記：使用する前に、毎回アルコールパッドでニードレス注入ポートを拭いた。
８．１１．２９　ＣＲＦブランクバッグLOVO洗浄バッファーを分注。シリンジに赤いキャップをし、「ブランククライオバッグ」及びロット番号とラベル付けした。注記：ステップ８．１４．３で必要になるまで、シリンジを室温で保持した。
８．１１．３０　洗浄バッファーの準備完了。LOVO洗浄バッファーバッグの全てのクランプを閉じた。
８．１１．３１　ＩＬ－２の解凍。全ての氷が溶けるまで、１つの１．１ｍＬのＩＬ－２（６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）を解凍した。ＩＬ－２のロット番号と有効期限を記録した。注記：ＩＬ－２ラベルが添付されていることを確認した。
８．１１．３２　ＩＬ－２調製。「ＩＬ－２希釈液」とラベル付けされた５０ｍＬコニカルチューブに５０μＬ　ＩＬ－２ストック（６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）を追加した。
８．１１．３３　ＩＬ－２調製。「ＩＬ－２　６×１０^{4}」、日付、ロット番号及び２４時間の有効期限としてコニカルのラベルを変更した。２～８℃で蓋をして保管する。
８．１１．３４　凍結保存の準備。最終産物の凍結保存のために、２～８℃で５個の凍結カセットを置き、事前調整した。
８．１１．３５　細胞カウント希釈を準備した。ＢＳＣ中で、ロット番号及び「細胞カウント希釈用」とラベル付けされた４．５ｍＬのAIM-V培地を４本の個別の１５ｍＬコニカルチューブに添加した。チューブにバッチ記録ロット番号及びチューブ番号（１～４）のラベルを付した。ステップ８．１２．３４で使用するために取っておいた。
８．１１．３６　細胞カウントの準備。バイアル番号（１～４）と４つのクライオバイアルにラベル付けした。ステップ８．１２．３３で使用するためにバイアルをＢＳＣ下に保管した。
８．１１．３７　セクション８．１１をレビューした。
８．１２　２２日目－ＴＩＬ回収
８．１２．１　インキュベーターをモニターする。インキュベーターをモニターした。インキュベーターのパラメータ温度ＬＥＤディスプレイ：３７±２．０℃、ＣＯ２パーセンテージ：５％±１．５％。注記：セクション８．１２は、セクション８．１１と同時に実行することができた。
８．１２．２　インキュベーターからG-Rex500MCSフラスコを取り出した。G-Rex500MCSをインキュベーターから取り外す前に、インキュベーションパラメーターが満たされていることを確認するための以下のチェックを実施した。
【０７７７】
【表６４】

フラスコ	棚	ステップ 8.10.83 B からの下限 (DDMMMYY HHMM)	ステップ 8.10.83 C からの上限 (DDMMMYY HHMM)	インキュベーターから取り出した時間 (DDMMMYY HHMM)	8.10.83 B < インキュベーターから取り出した時間 < ステップ 8.10.83 C か? はい/いいえ*

【０７７８】
注記：このステップは、各フラスコがインキュベーターから取り出されるときに実施する必要があった。
８．１２．３　ＴＩＬ収集バッグを準備した。３０００ｍＬ収集バッグに「ＴＩＬ懸濁液」、ロット番号及び開始／日付のラベルを付した。
８．１２．４　余分な接続を封鎖した。プロセスノート５．１２に従い、各接続の端近くにある収集バッグの２つのルアー接続をヒートシールした。
８．１２．５　GatheRexのセットアップ。G-Rex500MCSからの赤い培地取り出しラインをステップ８．１１．５で準備した１０ＬのLabtainerバッグに滅菌溶接（プロセスノート５．１１に従う）した。注記：複数のGatheRexデバイスの使用についてはプロセスノート５．１６を参照されたい。
８．１２．６　GatheRexのセットアップ。G-Rex500MCSからのクリア細胞取り出しラインを、ステップ８．１２．３で準備したＴＩＬ懸濁液収集バッグに滅菌溶接（プロセスノート５．１１に従う）した。注記：複数のGatheRexデバイスの使用についてはプロセスノート５．１６を参照されたい。
８．１２．７　GatheRexのセットアップ。G-Rex500MCSフラスコをGatheRexの左側に配置した。上清Labtainerバッグ及びその右側にプールされたＴＩＬ懸濁液収集バッグを配置した。
８．１２．８　GatheRexのセットアップ。G-Rex500MCSからの赤い培地取り出しラインをGatheRexのクランプ上部（赤い線でマーク）及びチューブガイドに取り付けた。G-Rex500MCSからのクリアハーベストラインをクランプ底部（青い線でマーク）及びGatheRexのチューブガイドに取り付けた。
８．１２．９　GatheRexのセットアップ。GatheRexからのガスラインとG-Rex500MCSの滅菌フィルターを接続した。注記：G-Rex500MCSから上清を除去する前に、細胞取り出しラインの全てのクランプが閉じていることを確認した。
８．１２．１０　減容。G-Rex500MCSから約４．５Ｌの上清を上清バッグに移した。フラスコが水平であり、吸引ディップチューブの端まで培地が減少していることを確認するためにG-Rex500MCSを目視で検査した。必要に応じてステップを繰り返す。注記：GatheRexが途中で停止した場合、右向きの矢印があるボタンを再度押して再起動し得る。
８．１２．１１　ＴＩＬ回収用にフラスコを準備した。上清を取り除いた後、赤いラインへのクランプを全て閉じた。
８．１２．１２　ＴＩＬの収集を開始した。ＴＩＬ回収開始時間を記録した。
８．１２．１３　ＴＩＬの収集を開始した。フラスコを激しく叩き細胞を遊離させるために培地を回旋した。全ての細胞が離れたことを確認するためにフラスコの検査を実施した。「ＴＩＬ懸濁液」３０００ｍＬ収集バッグを平らな表面の乾いたワイプの上に置いた。注記：細胞が離れなかった場合、エリア管理に連絡した。
８．１２．１４　ＴＩＬの収集を開始した。フラスコを傾けて、ホースがフラスコの端にくるようにした。注記：細胞収集ホースが壁面及び底膜の接合部にない場合、ホースを適切に配置するには、通常、４５°の角度でフラスコを傾けたまま軽く叩くのみで十分であった。
８．１２．１５　ＴＩＬの回収。ＴＩＬ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。
８．１２．１６　ＴＩＬの回収。GatheRexを使用して、ＴＩＬ懸濁液を３０００ｍＬ収集バッグに移した。注記：全ての細胞と培地が収集されるまで、エッジを傾斜し続けた。
８．１２．１７　ＴＩＬの回収。付着した細胞について膜を検査した。
８．１２．１８　フラスコ膜をすすいだ。G-Rex500MCSの底をすすいだ。ガス交換膜の約１／４をリンス培地で覆った。
８．１２．１９　G-Rex500MCSのクランプを閉じる。全てのクランプが閉じていることを確認する。

８．１２．２０　ヒートシールした。チューブ全体の長さがほぼ同じになるように、できる限り溶接部の近くでＴＩＬを含む収集バッグをヒートシール（プロセスノート５．１２に従う）する。
８．１２．２１　ヒートシールした。上清バッグをヒートシール（プロセスノート５．１２に従う）した。
８．１２．２２　残りのG-Rex 500 MCSフラスコの回収が完了した。ステップ８．１２．２及び８．１２．５～８．１２．２１の手順を繰り返し、全てのＴＩＬを同じ収集バッグにプールする。
注記：２フラスコごとに、１０Ｌの上清バッグを交換する必要があった。注記：複数のGatheRexデバイスの使用についてはプロセスノート５．１６を参照されたい。
８．１２．２３　LOVO原料バッグを準備した。新しい３０００ｍＬ収集バッグを入手した。「LOVO原料バッグ」、ロット番号及び開始／日付としてラベル付けされた。
８．１２．２４　LOVO原料バッグを準備した。「LOVO原料バッグ」のチューブをヒートシール（プロセスノート５．１２に従う）し、メスルアーを取り外して、溶接に十分なラインを残した。
８．１２．２５　LOVO原料バッグと計量した。適切なサイズのプラスチック容器をスケールの上に置き風袋引きした。ポートとラインを含むLOVO原料バッグをビンに入れ、乾燥重量を記録する。
８．１２．２６　細胞懸濁液をLOVO原料バッグに移した。１７０μｍの重力血液フィルターの全てのクランプを閉じた。
８．１２．２７　細胞懸濁液をLOVO原料バッグに移した。重力血液フィルターの長い終末端をLOVO原料バッグに滅菌溶接（プロセスノート５．１１に従う）した。
８．１２．２８　細胞懸濁液をLOVO原料バッグに移した。「プールされたＴＩＬ懸濁液」収集バッグにフィルターの２つの供給源ラインの１つを滅菌溶接（プロセスノート５．１１に従う）した。
８．１２．２９　細胞懸濁液をLOVO原料バッグに移した。溶接が完了すると、フィルター上の使用していないラインをヒートシール（プロセスノート５．１２に従う）して取り外した。
８．１２．３０　細胞懸濁液をLOVO原料バッグに移した。必要なクランプを全て開き、IVポールに収集バッグをぶら下げてＴＩＬ懸濁液を引き上げ、血液フィルターを介してLOVO原料バッグにＴＩＬの重力フロー移行を開始する。排出中、ＴＩＬを均一な懸濁液に保つために、ＴＩＬ懸濁液バッグを穏やかに回転させるか又は揉んだ。注記：LOVO原料バッグをろ過装置からぶら下がらないようにした。LOVO原料バッグを平面上の乾いたワイプの上に置いた。
８．１２．３１　全てのクランプを閉じた。全てのＴＩＬがLOVO原料バッグに移されたら、全てのクランプを閉じた。
８．１２．３２　ヒートシールした。重力血液フィルターを取り出すために、できる限り溶接の近くでヒートシール（プロセスノート５．１２に従う）した。
８．１２．３３　細胞カウントサンプルを取り出した。ＢＳＣ中で、各サンプルに個別の３ｍＬシリンジを使用して、ニードレス注入ポートを使用しLOVO原料バッグから４×１．０ｍＬ細胞カウントサンプルを取り出した。ステップ８．１１．３６で準備したクライオバイアルにサンプルを入れた。注記：ニードレス注入ポートをアルコールパッドで拭き、各サンプル間のLOVO原料バッグを混合した。
８．１２．３４　細胞カウントを実施した。NC-200及びプロセスノート５．１４を使用して、細胞カウント及び計算を実施した。０．５ｍＬの細胞懸濁液をステップ８．１１．３５で調製した４．５ｍＬのAIM-V培地に加えて、最初に細胞カウントサンプルを希釈した。これにより、１：１０希釈になった。
８．１２．３５　細胞カウントサンプル体積を記録した。
８．１２．３６　増倍係数を決定した。
【０７７９】

【表６５】

パラメータ	式	結果
総細胞数 サンプル体積	8.12.35A + 8.12.35B	C. μL
増倍 係数	C ÷ 8.12.35A	D.

【０７８０】
８．１２．３７　プロトコルを選択し、増倍係数を入力した。「生細胞カウントアッセイ」プロトコルが選択され、全ての増倍係数、サンプル及び希釈液の体積が入力されていることを確認した。注記：希釈が不要な場合、「サンプル［μＬ］」＝２００、「希釈［μＬ］」＝０と入力する。
８．１２．３８　Nucleoviewから細胞カウントを記録する
８．１２．３９　実施された細胞カウントの平均生存率、生細胞濃度及び総有核細胞濃度を決定した。
【０７８１】
【表６６】

パラメータ	式	結果
生存率	(8.12.38A + 8.12.38B) ÷ 2	G.
生細胞 濃度	(8.12.38C + 8.12.38D) ÷ 2	H. 細胞/mL
総有核細胞濃度	(8.12.38E + 8.12.38F) ÷2	I. 細胞/mL

【０７８２】
８．１２．４０　カウントの上限及び下限を決定した。
【０７８３】
【表６７】

パラメータ	式	結果
下限	8.12.39H x 0.9	J. 細胞/mL
上限	8.12.39I x 1.1	K. 細胞/mL

【０７８４】
８．１２．４１　両方のカウントは、許容範囲内であったか？
【０７８５】

【表６８】

パラメータ	式	結果(はい/いいえ)
下限	8.12.38 C 及び D ≥ 8.12.40J	
上限	8.12.38 C 及び D ≤ 8.12.40K	

【０７８６】
注記：いずれかの結果が「いいえ」の場合、ステップ８．１２．４２～８．１２．４９で２番目のカウントのセットを実施した。
８．１２．４２　該当する場合：細胞カウントを実施した。NC-200及びプロセスノート５．１４を使用して、細胞カウント及び計算を実施した。注記：希釈は、期待される細胞濃度に基づいて調整され得る。
８．１２．４３　該当する場合：細胞カウントサンプル体積を記録した。
８．１２．４４　該当する場合：増倍係数を決定した。
【０７８７】
【表６９】

パラメータ	式	結果
総細胞数 サンプル体積	8.12.43A + 8.12.43B	C. μL
増倍 係数	C ÷ 8.12.43A	D.

【０７８８】
８．１２．４５　該当する場合：プロトコルを選択し、増倍係数を入力した。「生細胞カウントアッセイ」プロトコルが選択され、全ての増倍係数、サンプル及び希釈液の体積が入力されていることを確認する。
注記：希釈が不要な場合、「サンプル［μＬ］」＝２００、「希釈［μＬ］」＝０と入力する。
８．１２．４６　該当する場合：Nucleoviewから細胞カウントを記録する
８．１２．４７　該当する場合：実施された細胞カウントの平均生存率、生細胞濃度及び総有核細胞濃度を決定する。
【０７８９】
【表７０】

パラメータ	式	結果
生存率	(8.12.46A + 8.12.46B) ÷ 2	G.
生細胞 濃度	(8.12.46C + 8.12.46D) ÷ 2	H. 細胞/mL
総有核細胞濃度	(8.12.46E + 8.12.46F) ÷ 2	I. 細胞/mL

【０７９０】
８．１２．４８　該当する場合：カウントの上限及び下限を決定した。

【０７９１】
【表７１】

パラメータ	式	結果
下限	8.12.47 H x 0.9	J. 細胞/mL
上限	8.12.47 H x 1.1	K. 細胞/mL

【０７９２】
８．１２．４９　該当する場合：カウントは、許容範囲内であったか？
【０７９３】
【表７２】

パラメータ	式	結果(はい/いいえ)
下限	8.12.46 C 及び D ≥ 8.12.48J	
上限	8.12.46 C 及び D ≤ 8.12.48K	

【０７９４】
注記：いずれかの結果が「いいえ」の場合、ステップ８．１２．５０に進んで平均を決定した。
８．１２．５０　該当する場合：実施された４カウント全てからの平均生細胞濃度及び平均総有核細胞濃度を決定した。
８．１２．５１　細胞カウントのQAレビュー。QA担当者は、ステップ８．１２．３８～８．１２．５０で実施された計算をレビューする。
８．１２．５２　LOVO原料バッグを計量した。適切なサイズのプラスチック容器をスケールの上に置き風袋引きした。充填されたLOVO原料バッグをビンに入れ、重量を記録した。細胞懸濁液の体積を計算した。
８．１２．５３　総生存ＴＩＬ細胞を計算する。
【０７９５】
【表７３】

パラメータ	式	結果
平均生細胞濃度*	8.12.39 H* -又は- 8.12.47 H* -又は- 8.12.50 E*	A. 細胞/mL
総体積	8.12.52 C	B. mL
総生細胞	A x B	C. 細胞
$C \geq 1.5x10^9$?	はい/いいえ**	

【０７９６】
＊生細胞濃度を決定するために循環参照ステップを使用した。
＊＊「はい」の場合、続行した。「いいえ」の場合、エリア管理者に連絡した。
８．１２．５４　総有核細胞の計算。

【０７９７】
【表７４】

パラメータ	式	結果
平均総 有核細胞 濃度*	8.12.39 I* -又は- 8.12.47 I* -又は- 8.12.50 J*	A. 細胞/mL
総体積	8.5.52 C	B. mL
総有核 細胞	A x B	C. 細胞

【０７９８】
＊総有核細胞濃度を決定するために循環参照ステップを使用した。
８．１２．５５　マイコプラズマ希釈液を準備した。ＢＳＣでは、ルアーサンプルポートを介して１つの上清バッグから１０．０ｍＬを取り出し、１５ｍＬコニカルに入れた。１５ｍＬのコニカル「マイコプラズマ希釈液」にラベルを付し、ステップ８．１４．６９で使用するためにＢＳＣに保管する。
８．１２．５６　セクション８．１２をレビューする。
８．１３　ＬＯＶＯ
８．１３．１　機器の左後部にあるスイッチを使用してＬＯＶＯの電源を入れた。注記：ステップ８．１３．１～８．１３．１３はセクション８．１１～８．１２と同時に実施され得る。
８．１３．２　重量計及び圧力センサーを確認した。
８．１３．３　重量計に何も掛かっていないことを確認し、各重量計の測定値をレビューした。ステップ８．１３．５の値を記録した。注記：重量計のいずれかが０＋／－２ｇの範囲外で読み取られた場合、重量計較正を実施した。
８．１３．４　全ての重量計が許容範囲内にあり、重量が掛かっていない場合、各重量計に１ｋｇの重量を掛け（番号１～４）、測定値をレビューした。ステップ８．１３．５の値を記録した。
８．１３．５　スケールをチェックした。各スケールの表示値を記録した。値が範囲内にあった場合、処理を続行する。値が範囲内になかった場合、較正を実施する。
８．１３．６　機器操作プロファイルスクリーンで圧力センサーの読み取り値をレビューし、記録した。圧力読み取り値の許容範囲は０＋／－１０ｍｍＨｇであった。表示された値がこの範囲外である場合、機械の指示に従い、新しい大気圧設定を保存した。
８．１３．７　ステップを繰り返した。新しい重量計の較正が実施された場合又は新しい大気圧設定が保存された場合、ステップ８．１３．３～８．１３．６を繰り返した。
８．１３．８　ドロップダウンメニューから「ＴＩＬ　G-Rex回収」プロトコルを開始した。
８．１３．９　溶液１画面が表示された。バッファータイプの読み取りはPlasmalyteであった。
８．１３．１０～８．１３．１６　ＬＯＶＯタッチスクリーンプロンプトに従った。
８．１３．１７　最終産物目標体積の決定。
注記：ステップ８．１２．５４Ｃからの総有核細胞（ＴＮＣ）値及び以下のチャートを使用して、最終産物の目標体積を決定した。最終産物体積（ｍＬ）を記録した。
【０７９９】

【表７５】

細胞範囲	最終製品 (保持)体積 目標(mL)
0 < 総(生+死)細胞 ≦ 7.1 X10^{10}	165
7.1X10^{10} < 合計(生+死)細胞 ≦ 1.1X10^{11}	215
1.1X10^{11} < 合計(生+死)細胞 ≦ 1.5X10^{11}	265

【０８００】
注記：ステップ８．１２．５３ＣからのＴＶＣが１．５×１０^{11}を超える場合、エリア管理者に連絡した。
８．１３．１８～８．１３．２２　ＬＯＶＯタッチスクリーンプロンプトに従った。
８．１３．２３　使い捨てキットをロードした。使い捨てキットをロードする前に、アルコールワイプ、その後、糸くずの出ないワイプで圧力センサーポートを拭く。使い捨てキットをロードする。使い捨てキットのロードに関する画面の指示に従う。
８．１３．２４　ろ過バッグを取り外した。標準のＬＯＶＯ使い捨てキットがロードされたら、次へボタンに触れた。容器情報及び場所情報画面が表示された。スケールからろ液バッグを取り外した。
８．１３．２５　ろ液容器は新しいこと及び測定限界であることの確認をした。
８．１３．２６　ろ液容量を入力した。既存のろ液バッグのオスルアーにＬＯＶＯ補助バッグを溶接接続した。全てのクランプが開いており、流路が開いていることを確認した。ろ液容器容量入力欄に触れる。テンキーが表示される。新規合計ろ液容量（５，０００ｍＬ）を入力する。ボタンに触れ、入力を受諾する。注記：推定ろ過量は５０００ｍＬを超えてはならない。
８．１３．２７　ベンチトップにろ液容器を置いた。注記：溶接中にチューブがＦクランプから外れた場合、チューブをクランプに戻した。ベンチトップに新規ろ液容器を置いた。重量計＃３にろ液バッグを掛けなかった。手順中に秤量計＃３は空になる。
８．１３．２８　ろ液容器の変更後、ＬＯＶＯタッチスクリーンのプロンプトに従った。
８．１３．２９　キットが正しくロードされたことを確認した。使い捨てキットドライチェックオーバーレイが表示された。キットが適切にロードされ、全てのクランプが開いていることを確認した。全てのチューブにねじれ又は他の障害物がないか確認し、可能であれば直す。キットが正しく取り付けられていることを確認し、全てのロバートクランプを確認した。はいボタンを押した。全てのＬＯＶＯ臨床クランプが自動的に閉じ、使い捨てキット取り付け確認画面が表示される。ＬＯＶＯには、キットを確認するために一連の加圧手順が実施された。
８．１３．３０　キットチェック結果。キットチェックに合格した場合、次の手順に進んだ。＊いいえの場合、チェック完了後に２回目のキットチェックを実行し得た。＊いいえの場合、全てのチューブのねじれ又は他の障害物をチェックして直した。＊いいえの場合、キットが適切に取り付けられていることを確認し、全てのロバートクランプを確認した。２回目のキットチェックに失敗した場合：エリア管理に連絡し、セクション１０．０の新しいキットのインストールの準備をする。必要なステップ８．１３．２３～ステップ８．１３．３０を繰り返す。
８．１３．３１　Plasmalyteの接続解決画面が表示された。洗浄値は常に３０００ｍＬであるはずである。画面にこの値を入力した。Plasmalyteの３０００ｍＬバッグを、プ

ロセスノート５．１１に従い、クランプ１を通過するチューブに滅菌溶接した。ＩＶポールにPlasmalyteのバッグをぶら下げ、バッグの両角のループをフックに取り付けた。
８．１３．３２　PlasmaLyteが接続されていることを確認した。全てのプラスチック製クランプを開けた。溶液量の入力が３０００ｍＬであったことを確認した。次へボタンに触れた。使い捨てキット準備オーバーレイが表示された。PlasmaLyteが取り付けられ、PlasmaLyteバッグにつながるチューブの全ての溶接部及びプラスチック製のクランプが開いていることを確認し、その後、はいボタンに触れた。
８．１３．３３　PlasmaLyteが動いていることが観察された。使い捨てキット準備が開始され、使い捨てキット準備中画面が表示される。PlasmaLyteのバッグに接続されたチューブを介して、PlasmaLyteが移動することを視覚的に観察した。流体が動いていない場合、画面上の一時停止ボタンを押して、クランプ又は溶接が依然として閉じているか否かを確認した。問題が解決したら、画面の再開ボタンを押し、使い捨てキット準備を再開した。使い捨てキット準備が正常に終了すると、原料接続画面が表示された。
８．１３．３４～８．１３．３５　LOVOタッチスクリーンプロンプトに従った。
８．１３．３６　チューブに原料容器を接続した。ステップ８．１２．３１で準備したLOVO原料バッグを、プロセスノート５．１１に従ってクランプＳを通過するチューブに滅菌溶接する。クランプからチューブを取り外す必要がある場合があり得た。注記：取り外す場合、原料チューブをＳクランプに取り変えることを確認する。
８．１３．３７　原料容器をぶら下げた。原料容器をＩＶポールにぶら下げ、バッグの両角のループをフックに取り付けた。原料を重量計＃１にぶら下げなかった。原料バッグへの全てのクランプを開いた。
８．１３．３８　原料容器が取り付けられていることを検証した。次へボタンに触れた。原料準備オーバーレイが表示された。原料が使い捨てキットに取り付けられ、原料につながるチューブの全ての溶接部及びプラスチック製のクランプが開いていることを確認した。はいボタンに触れた。
８．１３．３９　Plasmalyteが動いていたことを確認する。原料準備が開始され、原料準備中画面が表示された。原料バッグに取り付けられたチューブを介して、PlasmaLyteが移動しているのを視覚的に観察した。流体が動いていない場合、画面上の一時停止ボタンを押して、クランプ又は溶接部が依然として閉じているか否かを確認する。問題が解決したら、画面上の再開ボタンを押し、原料準備を再開した。
８．１３．４０　手順画面を開始した。原料の準備が正常に終了すると、手順開始画面が表示される。スタートを押した。スタートを押すと直ちに「前洗浄サイクル１」一時停止画面が表示された。
８．１３．４１　インプロセスバッグ内で反転した。重量計＃２からインプロセスバッグを取り外し（インプロセストップポートチューブガイドからチューブを取り外すこともできる）、それを手動で反転させ、使い捨てキットの準備ステップ中に加えた洗浄バッファーがバッグの全内部表面に塗布されるようにした。重量計＃２のインプロセスバッグを再びぶら下げた（バックのラベルは左側を向いていた）。チューブガイドのトップポートチューブが外れた場合には交換する。
８．１３．４２　原料バッグを反転した。スタートボタンを押す前に、バッグの角を揉み、細胞を静かに撹拌して均質な細胞懸濁液を作成することにより、ＩＶポールからそれを取り外すことなく原料バッグを混合した。再開ボタンを押した。LOVOは原料バッグからの流動を開始し、洗浄サイクル１画面が表示される。
８．１３．４３　原料すすぎ一時停止。原料容器が空になり、LOVOが原料バッグに洗浄バッファーを追加すると、原料すすぎ一時停止画面が表示された。原料バッグをＩＶポールから取り外すことなく、角を揉んでよく混ぜた。再開を押した。
８．１３．４４　インプロセスバッグ混合の一時停止。スピナを通過させる別の細胞を準備するため、インプロセスバッグを洗浄バッファーで希釈した。インプロセスバッグに洗浄バッファーを加えた後、LOVOを自動的に一時停止し、「インプロセスバッグ混合」一時停止画面が表示された。重量計からバッグを取り出さずに、バッグを優しく絞って産物

をよく混ぜた。再開を押した。
８．１３．４５　インプロセスの角を揉むことの一時停止。インプロセスバッグが空になったら、洗浄バッファーをインプロセスバッグの底部ポートに加え、バッグをすすいだ。すすぎ液を追加した後、ＬＯＶＯは自動的に一時停止し、「ＩＰの角を揉む」一時停止画面が表示された。「ＩＰの角を揉む」一時停止画面が表示されたら、重量計＃２からバッグを取り外さないこと。インプロセスバッグを重量計＃２に掛けたまま、バッグの角を揉み、残っている細胞を懸濁液にした。バッグが重量計の上で揺れていないことを確認し、再開ボタンを押した。
８．１３．４６　製品除去画面を待つ。ＬＯＶＯ手順の最後に、産物除去画面が表示された。この画面が表示されると、ＬＯＶＯキットの全てのバッグが操作でき得た。注記：産物除去が表示されるまで、バッグに触れないこと。
８．１３．４７　保持液バッグを取り外した。未透過液バッグのポートに非常に近いチューブに止血剤を入れ、細胞懸濁液がチューブに落ちないようにした。ステップ８．１３．４８で溶接するのに十分なラインを維持するように、止血剤の下にヒートシールした（プロセスノート５．１２に従う）。未透過液バッグを取り外した。
８．１３．４８　製剤用の保持液バッグを準備した。４インチ血漿移送セットのメスルアーロックエンドを保持液バッグに溶接（プロセスノート５．１１に従う）した。ステップ８．１４．１１で使用するために保持液バッグをＢＳＣに移した。
８．１３．４９　産物を取り出した。産物取り出し画面の指示に従った。流体の移動を防ぐため、ＬＯＶＯキットの全てのクランプを閉じた。
８．１３．５０　産物を取り出した。次へボタンに触れた。全てのＬＯＶＯ機械式クランプが開放され、キット取り出し画面が表示された。
８．１３．５１　データを記録した。キット取り出し画面の指示に従った。次へボタンに触れた。全てのＬＯＶＯ機械式クランプが閉鎖され、結果概要画面が表示される。結果概要画面のデータを、表示されている通りに表に記録した。全てのポンプを閉じ、支持剤をろ過した。ＬＯＶＯから要求されたときにキットを取り外した。＊注記：記録された時間の全ては、該当する場合、ＨＨ：ＭＭ：ＳＳ形式及び（ＨＨ：ＭＭ：ＳＳ）形式で、ＬＯＶＯ結果概要画面から直接記録された。
８．１３．５２～８．１３．５４　ＬＯＶＯシャットダウンを通したプロトコル選択。ＬＯＶＯ画面のプロンプトに従う。
８．１３．５５　セクション８．１３をレビューする。
８．１４　最終製剤及び充填
８．１４．１　目標体積／バッグ計算。下の表から、充填するＣＳ７５０バッグの数、バッグごとの目標充填量、バッグごとに参考品として取り出す量及びステップ８．１３．２２のＬＯＶＯ保持液の量に対応するバッグごとの最終目標体積を選択した。
【０８０１】
【表７６】

LOVO製品の体積	産物に添加するCS10の体積	配合産物の最終予測体積	充填されるバッグの数	バッグあたりの目標充填体積	保持のために取り出されたバッグあたりの体積	バッグあたりの最終目標体積
165mL	165mL	330mL	3	107mL	7mL	100mL
215mL	215mL	430mL	4	105mL	5mL	100mL
265mL	265mL	530mL	4	130mL	5mL	125mL

【０８０２】
８．１４．２　ＣＲＦブランクを準備した。空のバッグを作成するためCS-10及びＬＯＶＯ

洗浄バッファーの体積を計算した。
【０８０３】
【表７７】

最終目標 バッグあたりの体積 8.14.1E A	ブランク LOVO 洗浄 バッファー体積 B = A / 2	ブランク CS-10 体積(mL) C = B
mL	mL	mL

【０８０４】
８．１４．３　ＣＲＦブランクを準備した。ＢＳＣの外側で、ステップ８．１１．２９で準備したLOVO洗浄バッファーのシリンジを使用して、ステップ８．１４．２Ｂで計算された体積を、ルアー接続を介して空のＣＳ７５０バッグに追加した。注記：ブランクＣＳ７５０バッグ製剤は、無菌で行う必要はない。
８．１４．４　ＣＲＦブランクを調製した。適切なサイズのシリンジを使用して、ステップ８．１４．２で計算したＣＳ－１０の体積をステップ８．１４．３で準備した同じＣＳ７５０バッグに追加した。ＣＳ７５０バッグに赤いキャップを付けた。
８．１４．５　ＣＲＦブランクを準備した。ＣＳ－７５０バッグから可能な限り多くの空気を取り除いた。ＣＳ７５０バッグをできる限りバッグの近くでヒートシール（プロセスノート５．１２に従う）し、チューブを取り外した。
８．１４．６　ＣＲＦブランクを準備した。ＣＳ７５０バッグに「ＣＲＦブランク」、ロット番号及び開始／日付のラベルを付す。ＣＲＦに置くまで、ＣＲＦブランクをコールドパックの上に置いた。
８．１４．７　ＩＬ－２の必要量を計算した。最終産物に追加するＩＬ－２の量を計算した。
【０８０５】
【表７８】

パラメータ	式	結果
最終保持液の体積	ステップ 8.13.51	A. mL
最終製剤化体積	B = A x 2	B. mL
望ましい最終 IL-2 濃度(IU / mL)	300 IU/mL	C. 300 IU/mL
IU の必要な IL-2	D = B x C	D. IU
ステップ 8.11.33 からの IL-2 作業ストック	6 x 10^4 IU/mL	E. 6 x 10^4 IU/mL
最終製品に添加する IL-2 の体積	F = D ÷ E	F. mL

【０８０６】
８．１４．８　接続装置を組み立てた。4S-4M60をCC2セルコネクトに滅菌溶接（プロセスノート５．１１に従う）し、セルコネクト装置（Ｂ）の単一スパイクを（Ｇ）で4S-4M60マニホールドの４スパイク端に置き換えた。

８．１４．９　接続された装置を組み立てた。ＣＳ７５０クライオバッグをステップ８．１４．８準備したハーネスに滅菌溶接（プロセスノート５．１１に従う）し、４つのオスルアーエンド（Ｅ）の１つを各バッグに置き換えた。ステップ８．１４．１を参照して、必要なバッグの数を決定する。
８．１４．１０　接続された装置を組み立てた。4S-4M60のスパイクにＣＳ－１０バッグを溶接（プロセスノート５．１１に従う）した。２～８℃に調整された２つのコールドパック間にバッグを置くことによりＣＳ－１０を低温に保った。
８．１４．１１　材料をＢＣＳ中に移した。
【０８０７】
【表７９】

品目	品目番号 又は 参照ステップ	数量
4”プラズマ移送セット		1
IL-2(6.0x10^4)アリコート	8.11.33	1
IL2 添加に適切なサイズのシリンジ	8.14.7F	1
LOVO 保持液バッグ	8.13.48	1
赤キャップ		5

【０８０８】
８．１４．１２　ＩＬ－２を保持するＴＩＬを準備した。適切なサイズのシリンジを使用して、「ＩＬ－２　６×１０^4」アリコートからステップ８．１４．７で決定した量のＩＬ－２を取り出した。
８．１４．１３　ＩＬ－２を保持するＴＩＬを準備した。ルアー接続を介してステップ８．１３．４８で準備した保持液バッグにシリンジを接続し、ＩＬ－２を注入する。
８．１４．１４　ＩＬ－２を伴うＴＩＬを準備する。シリンジからラインを通して空気を押してラインをクリアする。
８．１４．１５　製剤化されたＴＩＬバッグをラベル付けした。移送セットのクランプを閉じ、「製剤化ＴＩＬ」としてバッグにラベルを付け、バッグをＢＳＣから取り出した。
８．１４．１６　該当する場合：サンプルプランに従いサンプリングする。ステップ８．１１．３３で調製した「ＩＬ－２　６×１０^4」アリコートが残っている場合、適切なサイズのシリンジを使用してサンプルプランに従い、約５ｍＬのサンプル参考品を取り出し、５０ｍＬのコニカルチューブに分注した。
８．１４．１７　該当する場合：サンプルプランごとにサンプリングした。サンプルプラン在庫ラベルとラベル付けし、サンプルプランに従い試験用にログインのために提出するまで、２～８℃で保管した。
８．１４．１８　該当する場合：サンプルプランごとにサンプリングした。サンプルを取り出すためのＬＩＭＳサンプルプランシートに記入されていることを確認した。
８．１４．１９　製剤化されたＴＩＬバッグを装置に追加した。ＩＬ－２が添加されると、ステップ８．１４．１０で準備した装置における残りのスパイク（Ａ）へ「製剤化されたＴＩＬ」バッグを溶接（プロセスノート５．１１に従う）した。
８．１４．２０　ＣＳ１０を追加した。組み立てられた装置を、付属の製剤化ＴＩＬ、ＣＳ－７５０バッグ及びＣＳ－１０と共にＢＳＣに移した。注記：ＣＳ－１０バッグ及び全てのＣＳ－７５０バッグは、２～８℃で事前調整された２つのコールドパック間に置かれた。製剤化ＴＩＬバッグをコールドパック上に置かなかった。
８．１４．２１　ＣＳ１０を追加した。装置の全てのクランプが閉じていることを確認した。活栓を回し、シリンジを閉じた。

８．１４．２２　シリンジの交換。約１０ｍＬの空気を１００ｍＬシリンジに引き込み、装置の６０ｍＬシリンジと交換した。
８．１４．２３　ＣＳ１０を追加した。ＣＳ７５０バッグへのラインが閉じるように活栓を回した。ＣＳ－１０バッグのクランプを開き、ステップ８．１４．１Ｂで計算した体積をシリンジに引き込んだ。注記：適切な体積のＣＳ－１０を追加するには、複数のシリンジが使用される。注記：ステップ８．１４．２６の各シリンジからの体積を記録する。
８．１４．２４　ＣＳ１０を追加した。CS-10のクランプを閉じ、製剤化ＴＩＬバッグのクランプを開いて、ＣＳ－１０を追加する。注記：およそ１０．０ｍＬ／分で最初の１０．０ｍＬのＣＳ１０を追加する。残りのＣＳ－１０をおよそ１．０ｍＬ／秒の速度で追加する。注記：複数のシリンジを使用して、ＣＳ－１０の適切な量を追加した。一度分注したシリンジは再利用しなかった。
８．１４．２５　ＣＳ１０を追加した。時間を記録した。注記：ＣＳ－１０の最初の添加から凍結の開始までの目標時間は３０である。
８．１４．２６　ＣＳ１０を追加した。各ＣＳ１０追加の体積と追加された総体積を記録した。総体積はステップ８．１４．１Ｂからの計算された体積と一致する。
８．１４．２７　ＣＳ１０を追加した。ＣＳ１０バッグの全てのクランプを閉じた。
８．１４．２８　ＣＳ－７５０バッグを準備した。活栓を回し、シリンジを開けた。製剤化ＴＩＬバッグのクランプを開き、懸濁液が活栓に達する直前に停止させて懸濁液を引き込んだ。
８．１４．２９　ＣＳ－７５０バッグを準備した。製剤化ＴＩＬバッグのクランプを閉じた。空のＣＳ７５０最終産物バッグが開くように活栓を回した。
８．１４．３０　ＣＳ－７５０バッグを準備した。新しいシリンジを使用して、空気を抜いてＣＳ７５０最終産物バッグから可能な限り多くの空気を取り除いた。
シリンジのプランジャーに圧力をかけながら、バッグを締めて閉じた。
８．１４．３１　ＣＳ－７５０バッグを準備した。約２０ｍＬの空気を新しい１００ｍＬシリンジに引き込み、装置に接続する。
注記：製剤化ＴＩＬ懸濁液を低温に保つために、各ＣＳ７５０最終産物バッグは２つのコールドパック間にある必要がある。
８．１４．３２　細胞を分注した。最終産物バッグへのラインが閉じられるように活栓を回した。ステップ８．１４．１で計算された量を、製剤化ＴＩＬバッグからシリンジに引き込んだ。注記：複数のシリンジを使用して、正しい量を得た。
８．１４．３３　細胞を分注した。製剤化されたＴＩＬバッグへのラインが閉じられるように活栓を回した。一度に１つの最終産物バッグで作業し、細胞を最終産物バッグに分注した。ステップ８．１４．３５の各ＣＳ７５０バッグに添加された細胞の量を記録した。
８．１４．３４　細胞を分注した。細胞がスパイクポートの上部に均一であるようにシリンジから空気でラインをクリアした。満たされたバッグのクランプを閉じた。最終産物バッグごとにステップ８．１４．２９～ステップ８．１４．３４を繰り返し、それぞれの間に製剤化ＴＩＬバッグを静かに混合した。
８．１４．３５　細胞を分注した。以下の各最終産物バッグに入れられたＴＩＬの量を記録する。
８．１４．３６　最終産物バッグから空気を取り除き、参考品を保持した。最後の最終産物バッグが満たされた直後に全てのクランプを閉じた。
８．１４．３７　最終産物バッグから空気を取り除き、参考品を保持した。１０ｍＬの空気を新しい１００ｍＬシリンジに引き込み、装置のシリンジと交換する。
８．１４．３８　最終産物バッグから空気を取り除き、参考品を保持した。一度に１つのバッグを操作し、各産物バッグから全ての空気と、ステップ８．１４．１Ｄで決定した参考品の産物の体積を引き出した。注記：サンプル量を取り出したら、シリンジを逆さにし、空気を利用して、産物バッグの上部ポートのラインをクリアにした。保持体積と空気が除去された直後にラインをバッグにクランプした。
８．１４．３９ 取り出された体積を記録した。各バッグからの参考品の体積を記録した。

８．１４．４０　分配された参考品。５０ｍＬのコニカルチューブに参考品を分配し、チューブに「参考品」及びロット番号を表示した。各バッグについてステップ８．１４．３７～ステップ８．１４．３９を繰り返す。
８．１４．４１　凍結保存用の最終産物を準備した。止血剤を使用して、バッグの近くでラインをクランプした。シリンジ及びシリンジが装着されていた装置の赤いキャップのルアー接続を取り除いた。ＢＳＣから装置を移した。
８．１４．４２　凍結保存用の最終産物を準備した。Ｆでヒートシール（プロセスノート５．１２に従う）し、空の保持液バッグ及びＣＳ－１０バッグを取り外した。
注記：装置上のシリンジのルアー接続を保持した。空の保持液及びＣＳ－１０バッグを廃棄した。
８．１４．４３　目視検査を実施した。注記：ステップ８．１４．４３～ステップ８．１４．４６は、ステップ８．１４．４７～ステップ８．１４．６８と同時に実施され得る。
８．１４．４４　最終産物ラベルのサンプル。最終産物バッグをラベル付けした。サンプルに以下の最終産物ラベルを添付した。
８．１４．４５　凍結保存用の最終産物を準備した。凍結保存するまで、コールドパック又は２～８℃でクライオバッグを保持した。
８．１４．４６　外部ラベルを準備した。カセットラベルに添付されるQA発行の外部ラベルが、対応する最終産物ラベルと一致することを確認した。カセットにQA発行の外部ラベルを添付した。サンプルに以下の外部ラベルを添付した。
８．１４．４７　細胞カウントサンプルを取り出した。適切なサイズのピペットを使用して、ステップ８．１４．３８で取り出された参考品２．０ｍＬを取り出し、細胞カウントに使用するために１５ｍＬコニカルチューブに入れる。
８．１４．４８　細胞カウントを実施した。ＳＯＰ－００３１４に従い、NC-200及びプロセスノート５．１４を使用して、細胞カウント及び計算を実施した。注記：１つのサンプルのみを適切な希釈に希釈して、希釈が十分であることを確認する。追加のサンプルを適切な希釈係数に希釈し、カウントを続行する。
８．１４．４９　細胞カウントサンプル体積を記録した。注記：希釈が不要な場合、「サンプル［μＬ］」＝２００、「希釈［μＬ］」＝０。
８．１４．５０　増倍係数を決定した。
【０８０９】
【表８０】

パラメータ	式	結果
総細胞数 サンプル体積	8.14.49A + 8.14.49B	C. μL
増倍 係数	C ÷ 8.14.49A	D.

【０８１０】
８．１４．５１　プロトコルを選択し、増倍係数を入力する。「生細胞カウントアッセイ」プロトコルが選択され、全ての増倍係数、サンプル及び希釈液の体積がＳＯＰ－００３１４に従って入力されていることを確認する。
注記：希釈が不要な場合、「サンプル［μＬ］」＝２００、「希釈［μＬ］」＝０と入力する。
８．１４．５２　Nucleoviewからファイル名、生存率及び細胞カウントを記録した。
８．１４．５３　生細胞濃度の平均と実施された細胞カウントの生存率を決定した。
【０８１１】

【表８１】

パラメータ	式	結果
生存率	(8.14.52A + 8.14.52B) ÷ 2	E. %
生細胞濃度	(8.14.52C + 8.14.52D) ÷ 2	F. 細胞/mL

【０８１２】
８．１４．５４　カウントの上限及び下限を決定した。
【０８１３】
【表８２】

パラメータ	式	結果
下限	8.14.53F x 0.9	G. 細胞/mL
上限	8.14.53F x 1.1	H. 細胞/mL

【０８１４】
８．１４．５５　両方のカウントは、許容範囲内であったか？
【０８１５】
【表８３】

パラメータ	式	結果(はい/いいえ)
下限	8.14.52 C 及び D ≥ 8.14.54G	
上限	8.14.52 C 及び D ≤ 8.14.54H	

【０８１６】
注記：いずれかの結果が「いいえ」の場合、ステップ８．１４．５６～８．１４．６３で２番目のカウントのセットを実施する。
８．１４．５６　該当する場合：細胞カウントを実施した。ＳＯＰ－００３１４に従い、NC-200及びプロセスノート５．１４を使用して、細胞カウント及び計算を実施した。注記：希釈は、期待される細胞濃度に基づいて調整され得る。
８．１４．５７　該当する場合：細胞カウントサンプル体積を記録した。
８．１４．５８　該当する場合：増倍係数を決定した。
【０８１７】
【表８４】

パラメータ	式	結果
総細胞数 サンプル体積	8.14.57A + 8.14.57B	C. mL
増倍 係数	C ÷ 8.14.57A	D.

【０８１８】

８．１４．５９　該当する場合：プロトコルを選択し、増倍係数を入力した。「生細胞カウントアッセイ」プロトコルが選択され、全ての増倍係数、サンプル及び希釈液の体積が入力されていることを確認した。注記：希釈が不要な場合、「サンプル［μＬ］」＝２００、「希釈［μＬ］」＝０と入力する。
８．１４．６０　該当する場合：Nucleoviewから記録された細胞カウント
８．１４．６１　該当する場合：生細胞濃度の平均と実施された細胞カウントの生存率を決定した。
【０８１９】
【表８５】

パラメータ	式	結果
生存率	(8.14.60A + 8.14.60B) ÷ 2	E. %
生細胞濃度	(8.14.60C + 8.14.60D) ÷ 2	F. 細胞/mL

【０８２０】
８．１４．６２　該当する場合：カウントの上限及び下限を決定した。
【０８２１】
【表８６】

パラメータ	式	結果
下限	8.14.61F x 0.9	G. 細胞/mL
上限	8.14.61F x 1.1	H. 細胞/mL

【０８２２】
８．１４．６３　該当する場合：カウントは、許容範囲内であったか？
【０８２３】
【表８７】

パラメータ	式	結果(はい/いいえ)
下限	8.14.60 C 及び D ≥ 8.14.62G	
上限	8.14.60 C 及び D ≤ 8.14.62H	

【０８２４】
注記：いずれかの結果が「いいえ」の場合、ステップ８．１４．６４に進んで平均を決定する。
８．１４．６４　該当する場合：実施された４カウント全てから平均生細胞濃度を決定した。
８．１４．６５　フローを計算した。サイトメトリーサンプル。フローサイトメトリーのサンプリングに十分な細胞濃度を確保するために計算を実施した。
【０８２５】

【表８８】

ステップ 8.14.53 F* 又は ステップ 8.14.61 F* 又は ステップ 8.14.64 E* からの 生細胞濃度 A	**必要な目標体積 $6x10^7$ TVCについて B = $6x10^7$ 細胞/ A**	B≤1.0 mL? **(はい/いいえ**)**
細胞/mL	mL	

【０８２６】
＊生細胞濃度を決定するために循環参照ステップを使用した。＊＊注記：いいえの場合、エリア管理者に連絡する。
８．１４．６６　ＩＦＮ－γを計算した。ＩＦＮ－γサンプリングに十分な細胞濃度を確保するためにサンプルの計算を実施した。
【０８２７】
【表８９】

ステップ 8.14.53 F* 又は ステップ 8.14.61 F* 又は ステップ 8.14.64 E* からの 生細胞濃度 A	**最小 $1.5x10^7$ TVC に 必要な体積 B = $1.5x10^7$ 細胞/ A**	**B≤1.0 mL? (はい/いいえ**)**
細胞/mL	mL	

【０８２８】
＊生細胞濃度を決定するために循環参照ステップを使用した。＊＊注記：いいえの場合、エリア管理者に連絡する。
８．１４．６７　結果を報告した。サンプルを提出するためのフォームに記入した。
８．１４．６８　ヒートシールした。サンプル量が決定されたら、最終産物バッグを可能な限りバッグの近くにヒートシール（プロセスノート５．１２に従う）して、装置から取り出す。
８．１４．６９　サンプルプランに従い、サンプルにラベルを付し、収集した。
【０８２９】

【表９０】

サンプル	容器の数	各容器に追加するサンプル 体積	容器タイプ	目的
*マイコプラズマ	1	1.0 mL	15 mL コニカル	ログイン
エンドトキシン	2	1.0 mL	クライオバイアル 2 mL	ログイン
グラム染色	1	1.0 mL	クライオバイアル 2 mL	ログイン
IFN-g	1	1.0 mL	クライオバイアル 2 mL	ログイン
フローサイトメトリー	1	1.0 mL	クライオバイアル 2 mL	ログイン
**Bac-T 滅菌	2	1.0 mL	Bac-T ボトル	ログイン
QC 保持	4	1.0 mL	クライオバイアル 2 mL	CRF
サテライトバイアル	10	0.5 mL	クライオバイアル 2 mL	CRF

【０８３０】
＊注記：マイコプラズマサンプルについて、ステップ８．１２．５５からの「マイコプラズマ希釈液」とラベル付けされた１５ｍＬのコニカルに製剤化細胞懸濁液の体積を追加する。
＊＊注記：Ｂａｃ－Ｔ接種のためステップ８．１４．７０に進む。
８．１４．７０　無菌及びＢａｃＴ。試験サンプリング。ＢＳＣ中で、適切なサイズのシリンジを使用してステップ８．１４．３８で参考品として収集した細胞懸濁液から１．０ｍＬのサンプルを取り出し、嫌気性ボトルに播種する。好気性ボトルについて上記を繰り返す。注記：Ｂａｃ－Ｔボトルは、室温で、光から保護して保管する。
８．１４．７１　サンプルのラベルを付け及び保管した。全てのサンプルにサンプルプラン在庫ラベルのラベルを付し、ログインのために移送まで適切に保管する。注記：最終産物及びサンプルの凍結保存のため、セクション８．１５に進んだ。
８．１４．７２　サンプリングのためにサインした。サンプルを取り出すためのＬＩＭＳサンプルプランシートが完成していることを確認する。
８．１４．７３　サンプルの提出。２２日目の試験サンプルを全てログインのために提出した。
８．１４．７４　環境モニタリング。処理後、ＢＳＣを検証し、担当者によるモニタリングが実施された。
８．１４．７５　セクション８．１４をレビューする。
８．１５　最終産物の凍結保存
８．１５．１　制御速度冷凍庫を準備した。凍結する前にＣＲＦがセットアップされたことを確認した。ＣＲＦ機器を記録した。凍結保存が実施される。
８．１５．２　ＣＲＦプローブをセットアップする。ＣＲＦブランクバッグのセプタムに

穴を開けた。６ｍＬバイアル温度プローブを挿入した。
８．１５．３　最終産物とサンプルをＣＲＦに入れた。ブランクバッグを事前調整済みカセットに入れ、ＣＲＦラックのおよそ中央に移した。最終産物カセットをＣＲＦラックに移し、バイアルをＣＲＦバイアルラックに移した。
８．１５．４　最終産物とサンプルをＣＲＦに入れた。産物ラック及びバイアルラックをＣＲＦに移した。産物がＣＲＦに移された時間及びステップ８．１５．５のチャンバー温度を記録した。注記：カセット及びバイアルラックをＣＲＦに均等に配置し、各棚間にできるだけ多くのスペースを確保した。
８．１５．５　４℃±１．５℃に達し、ＣＲＦの実行を続行するのに必要な時間を決定した。チャンバーの温度が４℃±１．５℃に達したら、分析を開始した。時間を記録した。
【０８３１】
【表９１】

パラメータ	式	値
最終産物が CRF に送られる時間	(HHMM)	
最終産物が CRF に送られる温度	モニターから	℃
B.CRF 開始時間	(HHMM)	
製剤化から CRF 開始までの経過時間	C = B – ステップ 8.14.25A	分

【０８３２】
８．１５．６　ＣＲＦを完了し、保管した。実施完了後にＣＲＦを停止した。ＣＲＦからカセット及びバイアルを取り出す。カセット及びバイアルを保管のために気相ＬＮ２に移した。保管場所を記録した。
【０８３３】
後処理の概要
・後処理：最終医薬品
○（２２日目）フローサイトメトリーによる２２日目ＲＥＰでのＣＤ３＋細胞の決定
○（２２日目）グラム染色法（ＧＭＰ）
○（２２日目）ゲルクロットＬＡＬアッセイ（ＧＭＰ）による細菌エンドトキシン試験
○（１６日目）ＢａｃＴ無菌アッセイ（ＧＭＰ）
○（１６日目）ＴＤ－ＰＣＲ（ＧＭＰ）によるマイコプラズマＤＮＡ検出
○許容可能な外観属性（ステップ８．１４．４３）
○（２２日目）ＢａｃＴ無菌アッセイ（ＧＭＰ）
○（２２日目）ＩＦＮ－γアッセイ
【０８３４】
実施例２．ＴＡＬＥヌクレアーゼを使用した凍結保存ＴＩＬ療法の遺伝子編集
［００６９４］　この例は、図２０に示すプロセスなどのＴＩＬ製造プロセスと組み合わせた遺伝子編集ステップの使用を説明する。
【０８３５】
［００６９５］　ヒトＴＩＬエレクトロポレーションの最適化は次のように実施される。２５％を超えるＰＤ１を発現する黒色腫由来の４～６個のプレＲＥＰ　ＴＩＬ株が特定される。選択されたＴＩＬ株は、一度に１株ずつ作業し、解凍、静置、活性化される。５００万個の活性化ＴＩＬが、以下の対照又は試験ＲＮＡのそれぞれでエレクトロポレーションされる：エレクトロポレーションなし対照（ＮＥ）；ＲＮＡなし対照；緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）ｍＲＮＡトランスフェクション対照、ＣＤ５２　ＴＡＬＥＮ　ＫＯ対照、ＰＤ１　ＴＡＬＥＮ、ＬＡＧ－３　ＴＡＬＥＮ及びＴＩＭ－３ＴＡＬＥＮ。生細胞をカウントし、トランスフェクション効率測定（ＧＦＰ発現）のためにアリコートを確保する。エ

レクトロポレーションされた細胞はＲＥＰによって拡大培養される。ポストＲＥＰ　ＴＩＬは、細胞の生存率及び拡大倍数（細胞カウンター）並びに標的遺伝子ノックダウン（フロー及びｑＰＣＲ）について評価される。目的の結果は、８０％超の生存率又はＮＥの１０％以内；７０％超のトランスフェクション；ＮＥの３０％以内のＴＩＬの拡大倍数；及び５０％超のノックアウトである。

【０８３６】

［00696］　ＴＩＬ製造プロセスへのＴＡＬＥＮ媒介ＰＤ－１ノックアウトの実装は次のように実施される。黒色腫、肉腫、乳癌及び肺癌を含み得るいくつかの組織学からの最大６つの新鮮な腫瘍が使用される。研究スケールの準備は、図２０及び２１に示すプロセスに従って実施される。先の実験からのエレクトロポレーション条件は、各プロセスのあらかじめ決められた時点で適用される。ポストＲＥＰ　ＴＩＬは、以下：細胞の生存率及び拡大倍数（セルカウンター）；細胞の表現型（フローサイトメトリー）；ＴＣＲ　Ｖβレパートリー（フロー）；Ｔ細胞エフェクター機能（再刺激時のＩＦＮ－γ産生）；標的遺伝子ノックダウン（フロー及びｑＰＣＲ）について評価される。目的の結果は、８０％超の生存率又はＮＥの１０％以内；７０％超のトランスフェクション；ＮＥの３０％以内の拡大倍数；プロセス２Ａによって産生されたＴＩＬと比較して維持されたＴ細胞系統／サブセット；適切なＴＩＬ効力；及びＰＤ－１の５０％超のノックアウトである。この作業に続いて、ＰＤ－１ノックダウンＴＩＬの１つのフルスケールでの調製が実行され、完全に特徴付けられる。

【０８３７】

［00697］　ＰＤ－１に加え、２つの追加の標的遺伝子のサイレンシングの検証も試験される。

【０８３８】

実施例３．ＴＩＬにおけるＴＡＬＥＮを介したＰＤ－１の不活化

［00698］　この例では、図２０又は図２１に示すプロセスなど、本書に記載のＴＩＬ製造プロセスと組み合わせたＴＡＬＥＮを介したＰＤ－１の不活化を説明する。ＴＩＬ製造プロセスは、例えば、図２１の実施形態２に示されるように、細胞培養培地へのＯＫＴ－３及び／又は４－１ＢＢアゴニストの早期添加を含み得る。ＯＫＴ－３及び／又は４－１ＢＢアゴニストは、任意選択により、第１の拡大培養又は第２の拡大培養の０日目又は１日目から追加され得る。

【０８３９】

［00699］　ＴＡＬＥＮの構築及びエレクトロポレーションは、Menger et al., Cancer Res., 2016 Apr 15; 76(8):2087-93、Gautron, et al., et al., Molecular Therapy: Nucleic Acids 2017, 9:312-321又は米国特許第９，４５８，４３９号に記載された方法に従って実行され得、それぞれの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。ＰＤ－１遺伝子を標的とするＴＡＬＥＮは、例えば、参照により本明細書に組み込まれるDaboussi et al., Nat Commun 2014; 5:3831に記載の固相アセンブリ法を使用して産生されるか、又はGautron, et al., et al., Molecular Therapy: Nucleic Acids 2017, 9:312-321に記載のように、Trilink Biotechnologies若しくは他の提供元から商業的に入手され得る。ＴＩＬの活性化について、Gautron, et al., et al., Molecular Therapy: Nucleic Acids 2017, 9:312-321に記載された手順及び本明細書の他の箇所に記載された手順を利用し得、ここで、ＴＩＬは、Dynabeadsヒト Ｔ細胞活性化因子ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズ（Invitrogenから市販）を１：１　ＣＤ３$^{+}$ビーズ：細胞又はImmunocult ＣＤ３／ＣＤ２８活性化因子（StemCell Technologiesから市販）などのヒト Ｔ細胞活性化因子ＣＤ３／ＣＤ２８抗体複合体の比率で使用して活性化される。Agile Pulse BTXシステム（Harvard Apparatus）を使用してエレクトロポレーションを行う前に、合計５×１０^{6}ＴＩＬ／１８０μＬのBTXサイトポレーション培地Ｔを約１０～２０μｇのインビトロ転写ＴＡＬＥＮ　ｍＲＮＡ（mMESSAGE mMACHINE T7キット；Ambion）と混合し得る。エレクトロポレーションされた細胞は、本明細書の他の場所に記載されたプレＲＥＰ及びＲＥＰ法により拡大培養され

得る。ポストＲＥＰ　ＴＩＬは、細胞の生存率及び拡大倍数（細胞カウンター）並びにＰＤ－１ノックダウン（フロー及びｑＰＣＲ）について評価される。目的の結果は、８０％超の生存率又は「エレクトロポレーションなし」（ＮＥ）対照の１０％以内；７０％超のトランスフェクション；ＮＥの３０％以内のＴＩＬの拡大倍数；及び５０％超のＰＤ－１ノックアウトである。米国特許第６，０１０，６１３号及び同第６，０７８，４９０号（これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載のものなど、当技術分野で公知のエレクトロポレーション法を使用し得る。

【０８４０】

［００７００］　パルスエレクトロポレーションの最適化は、本明細書に記載の方法を使用して又は以下のように実施され得る。細胞がトランスフェクトされ得る電圧範囲を決定するために、最初の一連の実験をＴＩＬで実施した。５つの異なるプログラムがテストされた。

【０８４１】

【表９２】

	グループ１				グループ２				グループ３			
プログラム	パルス	V	期間 (ms)	間隔 (ms)	パルス	V	期間 (ms)	間隔 (ms)	パルス	V	期間 (ms)	間隔 (ms)
1	1	600	0.1	0.2	1	600	0.1	100	4	130	0.2	2
2	1	900	0.1	0.2	1	900	0.1	100	4	130	0.2	2
3	1	1200	0.1	0.2	1	1200	0.1	100	4	130	0.2	2
4	1	1200	0.1	10	1	900	0.1	100	4	130	0.2	2
5	1	900	0.1	20	1	600	0,1	100	4	130	0.2	2

【０８４２】

［００７０１］　ＴＩＬは、異なるエレクトロポレーションプログラムを使用して、ＧＦＰをコード化するプラスミド約２０μｇ及び対照プラスミドｐＵＣを含む０．４ｃｍギャップキュベット（約10^6細胞／ｍＬ程度）でエレクトロポレーションされ得る。エレクトロポレーションの約２４時間後、ＧＦＰ発現をフローサイトメトリーによってエレクトロポレーションした細胞で分析し、トランスフェクション効率を決定した。ＴＩＬにおけるプラスミドエレクトロポレーションに必要な最小電圧は、国際特許出願公開第２０１４／１８４７４４号及び米国特許出願公開第２０１３／０３１５８８４　Ａ１号で以前に報告されており、それらの開示は、参照により本明細書に組み込まれ、プログラム３及び４はそれぞれ、ＴＩＬの効率的なＴＡＬＥＮ組み込みプロセスを可能にする。

【０８４３】

［００７０２］　図２３に示すＴＡＬＥＮ構築物は、示されるように、Ｐｄｃｄ１遺伝子のエクソン２を標的とし、ＰＤ１の不活化に使用され得る。

【０８４４】

［００７０３］　上述の実施例は、本発明の組成物、システム及び方法の実施形態を作製及び使用する方法の全面開示及び説明を当業者に与えるために提供され、本発明者らが、その発明と見なす範囲を限定することを意図するものではない。当業者に明らかである本発明を実施するための上述の態様の修正は、以下の特許請求の範囲内であることが意図される。本明細書で言及される全ての特許及び刊行物は、本発明に属する当業者の技能のレベルを示す。

【０８４５】

［００７０４］　全ての見出し及びセクションの指定は、明確化と参照の目的でのみ使用されており、決して限定と見なされるものではない。例えば、当業者は、本明細書に記載される本発明の趣旨及び範囲に従い、異なる見出し及びセクションからの様々な態様を適切に組み合わせることが有用であることを理解するであろう。

【０８４６】

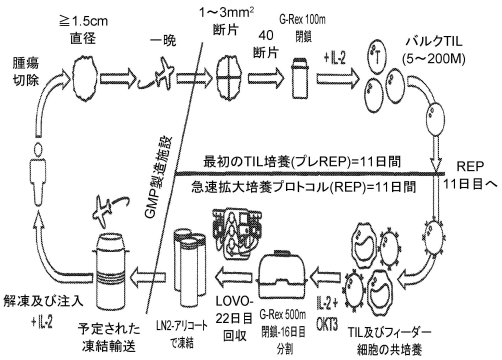
［００７０５］本明細書に引用されている全ての参考文献は、個々の出版物若しくは特許又は特許出願が全ての目的についてその全体が参照により組み込まれることが具体的及び個別に示されている場合と同程度に、その全体があらゆる目的について参照により本明細書に組み込まれる。

【０８４７】

［００７０６］当業者に明らかであるように、本出願の多くの修正形態及び変形形態は、その趣旨及び範囲から逸脱することなくなされ得る。本明細書に記載される特定の実施形態及び実施例は、ごく一実施例としてのみ提供され、本出願は、特許請求の範囲が権利を与えられる均等物の全範囲と共に添付の特許請求の範囲の条項よってのみ限定されるべきである。

【図面】

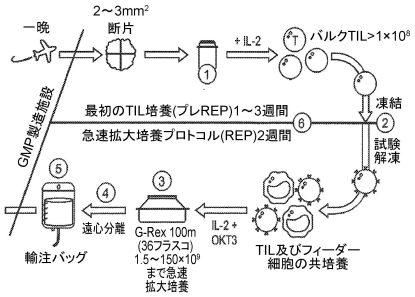
【図１】



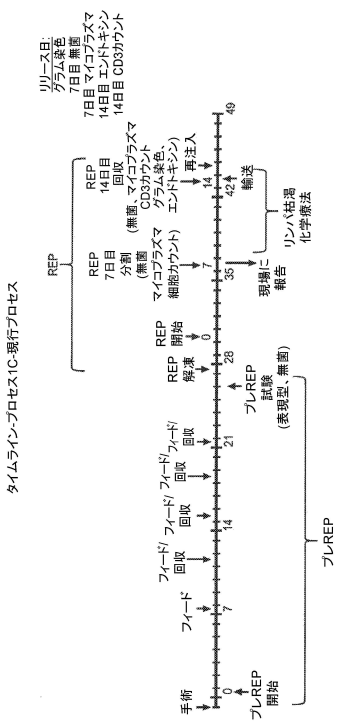
【図２】

プロセス開発

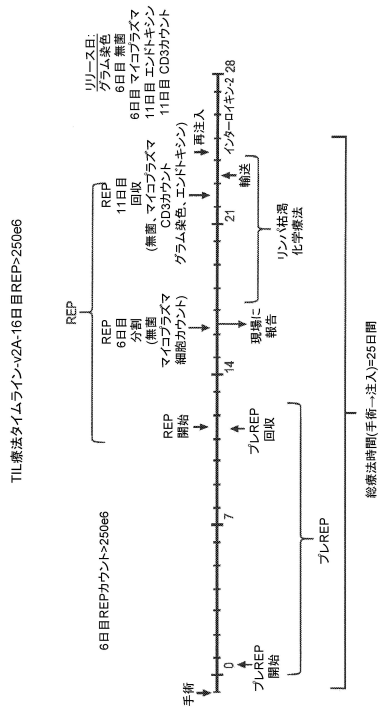
ステップ	現行プロセス-1C	新プロセス-2A	影響
1	4断片/10 G-Rex 10～21日間	40断片/1-G-Rex 100 CS-(×2?) 11日間	腫瘍試料/容器の増加、培養短縮、ステップの削減、閉鎖系に適す
2	プレREP 凍結->試験->解凍-約27日目->40e6TIL	REPへ-11日目以前<200e6	プロセスの短縮、ステップの削減、試験の省略
3	36 G-Rex 100-約30日目>5e6TIL -分割約36日目	4～5G-Rex 500CS -TIL-分割 16日目	ステップの削減、閉鎖系、REPの短縮
4	回収約43日目以降遠心による回収	回収22日目 LOVO-自動細胞洗浄機	ステップの削減、自動閉鎖系
5	新鮮産物-Hypothermosol-シングル輸注バッグ	LN,中で産物-CS10の凍結保存、複数アリコート	輸送の柔軟性、患者のスケジューリング、早期リリース試験、グローバル試験
6	43日間以上のプロセス時間	22日間のプロセス時間	患者への検査所要時間、無菌室完結、COG



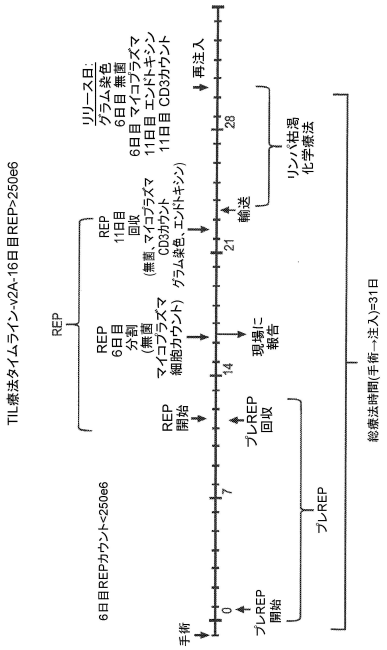
【図３】


タイムライン-プロセス1C-現行プロセス
手術
プレREP開始
フィード
フィード/回収
フィード/回収
フィード/回収
プレREP試験（表現型、無菌）
REP解凍
REP開始
REP 7日目分割（無菌、マイコプラズマ細胞カウント）
REP 14日目回収（無菌、マイコプラズマCD3カウント グラム染色、エンドトキシン）
再注入
輸送
現場に報告
リンパ枯渇化学療法
プレREP
リリース日：グラム染色 7日目 無菌 7日目 マイコプラズマ 14日目 エンドトキシン 14日目 CD3カウント

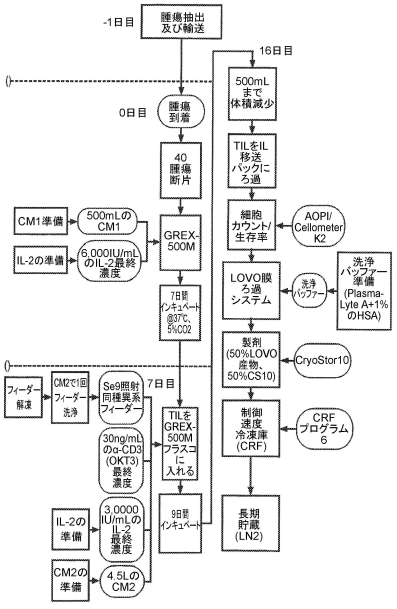
【図４】


TIL療法タイムライン-v2A-16日目REP>250e6
6日目REPカウント>250e6
手術
プレREP開始
REP開始
REP 6日目分割（無菌 マイコプラズマ 細胞カウント）
REP 11日目回収（無菌、マイコプラズマ CD3カウント グラム染色、エンドトキシン）
再注入
インターロイキン-2
輸送
現場に報告
リンパ枯渇化学療法
プレREP回収
プレREP
総療法時間(手術→注入)=25日間
リリース日：グラム染色 6日目 無菌 6日目 マイコプラズマ 11日目 エンドトキシン 11日目 CD3カウント

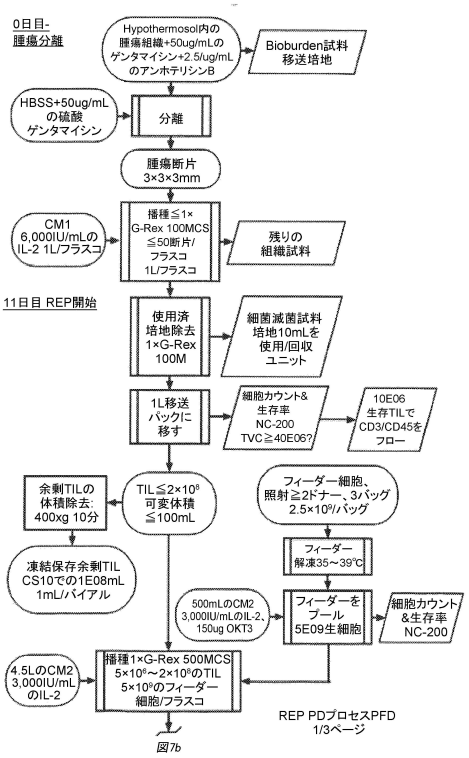
【図５】


TIL療法タイムライン-v2A-16日目REP>250e6
6日目REPカウント<250e6
手術
プレREP開始
REP開始
REP 6日目分割（無菌 マイコプラズマ 細胞カウント）
REP 11日目回収（無菌、マイコプラズマ CD3カウント グラム染色、エンドトキシン）
再注入
プレREP回収
現場に報告
輸送
リンパ枯渇化学療法
プレREP
総療法時間(手術→注入)=31日
リリース日：グラム染色 6日目 無菌 6日目 マイコプラズマ 11日目 エンドトキシン 11日目 CD3カウント

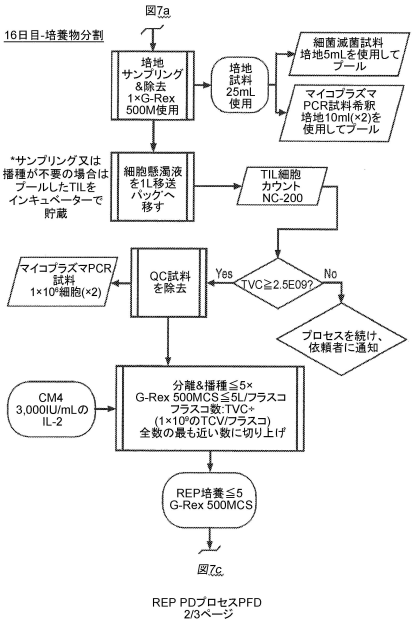
【図６】


-1日目
腫瘍抽出及び輸送
0日目
腫瘍到着
40腫瘍断片
CM1準備
500mLのCM1
IL-2の準備
6,000IU/mLのIL-2最終濃度
GREX-500M
7日間インキュベート@37℃, 5%CO2
フィーダー解凍
CM2で1回フィーダー洗浄
Se9照射同種異系フィーダー
7日目
30ng/mLのα-CD3 (OKT3)最終濃度
TILをGREX-500Mプラスコに入れる
IL-2の準備
3,000IU/mLのIL-2最終濃度
CM2の準備
4.5LのCM2
9日間インキュベート
16日目
500mLまで体積減少
TILをIL移送バッグにろ過
細胞カウント/生存率
AOPI/Cellometer K2
LOVO膜ろ過システム
洗浄バッファー
洗浄バッファー準備 (Plasma-Lyte A+1%のHSA)
製剤(50%LOVO産物、50%CS10)
CryoStor10
制御速度冷凍庫(CRF)
CRFプログラム6
長期貯蔵(LN2)

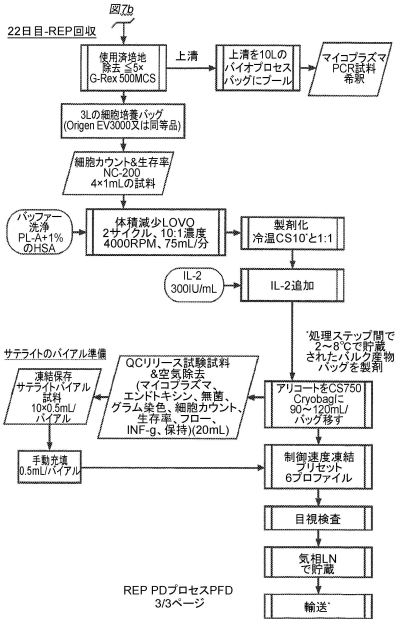
【図７ａ】



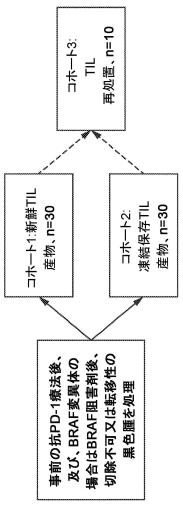
【図７ｂ】



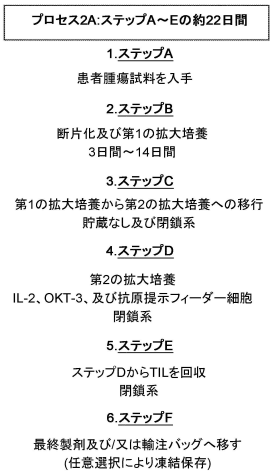
【図７ｃ】



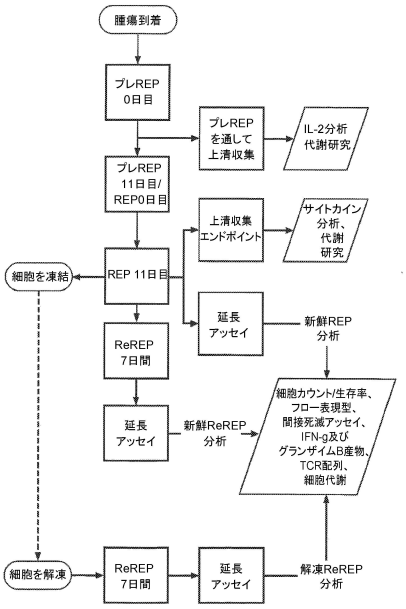
【図８】



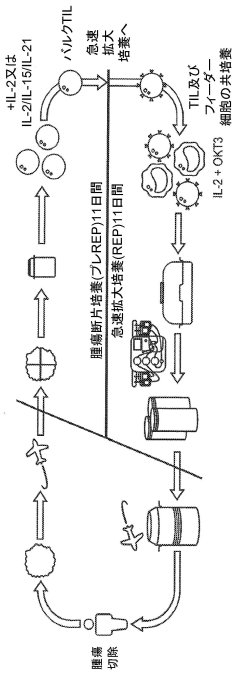
【図９】



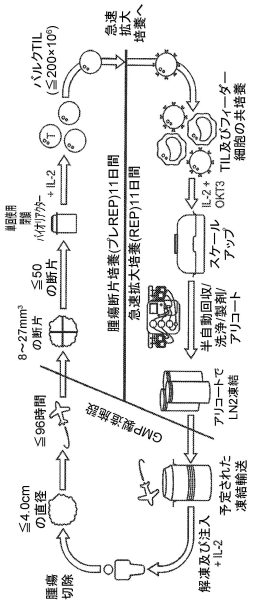
【図１０】



【図１１】



【図１２】



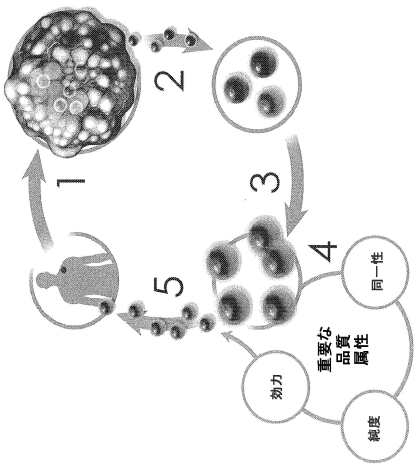
【図１３】

プロセス1C ステップA～Eの43～55日間	プロセス2A ステップA～Eの約22日間
1.ステップA 患者腫瘍試料を入手	2.ステップA 患者腫瘍試料を入手
3.ステップB 断片化及び第1の拡大培養 11日間～21日間	3.ステップB 断片化及び第1の拡大培養 3日間～14日間
3.ステップC 第1の拡大培養から第2の 拡大培養への移行 選択まで任意選択の貯蔵	4.ステップC 第1の拡大培養から第2の 拡大培養への移行 貯蔵なし、閉鎖系
5.ステップD 第2の拡大培養 IL-2、OKT-3、抗原提示フィーダー細胞 任意選択により1度以上反復	5.ステップD 第2の拡大培養 IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞 閉鎖系
6.ステップE ステップDからTILを回収	7.ステップE ステップDからTILを回収 閉鎖系
6.ステップF 最終製剤及び/又は輸注 バッグへ移す	8.ステップF 最終製剤及び/又は輸注 バッグへ移す (任意選択により凍結保存)

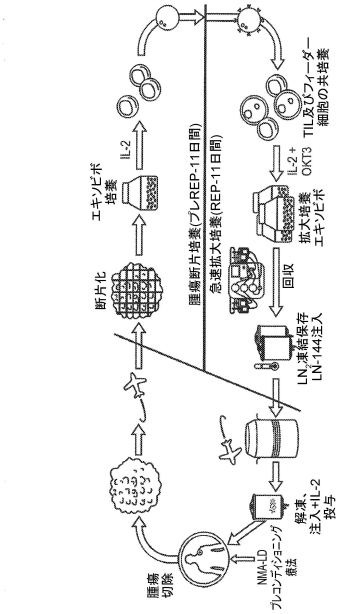
【図１４】

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
プレREP	・GREX-10フラスコ10につき4断片 ・11～21日間継続	・GREX-100Mフラスコ1つにつき40断片 ・11日間継続	・フラスコ毎の腫瘍断片が多い ・培養時間の短縮 ・ステップ数の削減 ・閉鎖系に適す
プレREPからREPへ移行	・プレREP TILは選択のためのフェノタイピングまで凍結し、その後REPへ進むため解凍される(約30日目) ・REPには>40×10^{6}個のTILを要す	・プレREP TILはREP 11日目へ直接移行 ・REPには25～200×10^{6}個のTILを要す	・プレREP～REPプロセスの短縮 ・ステップ数の削減 ・フェノタイピング選択の省略 ・閉鎖系に適す
REP	・REP0日目にGREX-100Mフラスコ6つ ・REP0日目に1フラスコに付き5×10^{6}個のTIL及び5×10^{6}個のPBMCフィーダー ・REP7日目に18～36のフラスコに分割 ・14日間継続	・11日目にGREX-500Mフラスコ1つ ・11日目に25～200×10^{6}個のTIL及び5×10^{8}個のPBMCフィーダー ・16日目に≦6のGREX-500Mフラスコに分割 ・11日間継続	・ステップ数の削減 ・REP継続期間の短縮 ・閉鎖系でフラスコ間のTILの移動 ・閉鎖系で培地交換
回収	・遠心によりTIL回収	・LOVO自動細胞洗浄システムによりTIL回収	・ステップ数の削減 ・自動細胞洗浄 ・閉鎖系 ・洗浄中の産物の損失の削減
最終製剤	・Hypothermosolの新鮮産物 ・単回輸注バッグ ・配送安定性が制限される	・PlasmaLyte-A+1%のHSAで産物を凍結保存及びCS10をLN_2で貯蔵 ・複数のアリコート ・配送安定性がより長い	・配送の柔軟性 ・患者のスケジューリングの柔軟性 ・より適時的なリリース試験
全体の推定プロセス時間	・43～55日間	・22日間	・患者に対するより迅速なターンアラウンド

【図１５】



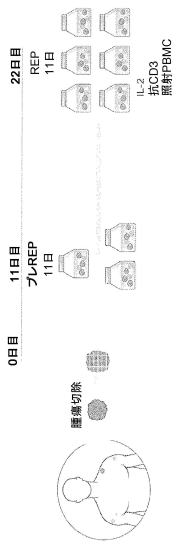
【図１６】



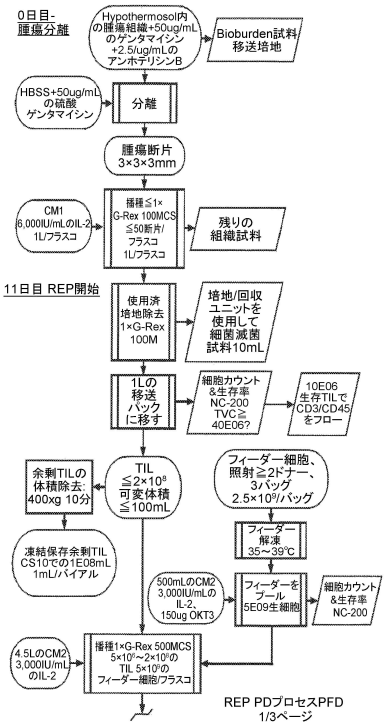
【図１７】

プロセスステップ	GEN 1	GEN 2	影響
断片培養	≦21日間、複数のバイオリアクター、複数の作業者の介在	≦11日間、単一開鎖バイオリアクター、介在なし	培養の短縮、介在の削減
TIL選択	IL-2拡大培養TIL冷凍保存、試験、表現型に基づく選択、解凍、静置、共培養	バルクTIL共培養へ直接移行	ステップの削減、試験の省略、クローナル多様性の増加
回収/洗浄	手動体積減少及び回収。 手動洗浄及び濃縮	閉鎖半自動体積減少及び回収。 自動洗浄及び濃縮	作業者介在の削減、処理時間の削減、機能的な閉鎖系の維持
製剤	新鮮低体温産物(2～8℃)	冷凍保存産物(≦-150℃)	配送及び患者のスケジューリングの柔軟性の向上によるグローバル試験が可能
製造時間	プロセス時間38日	プロセス時間22日	患者に対するターンアラウンド、全てを通して無菌室施設、物品コストが安価

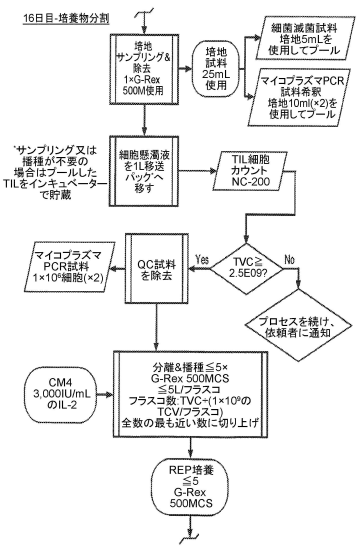
【図１８】



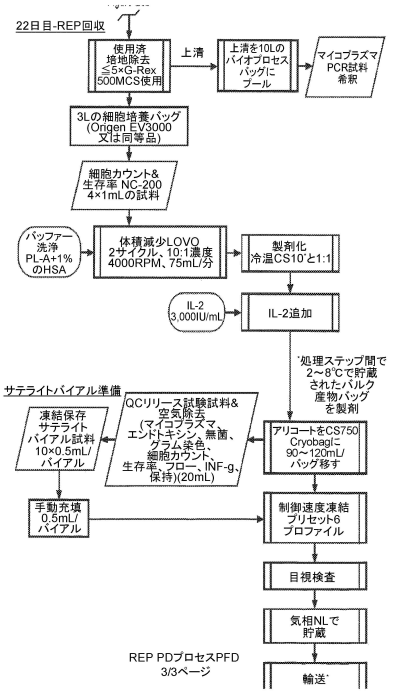
【図１９ａ】



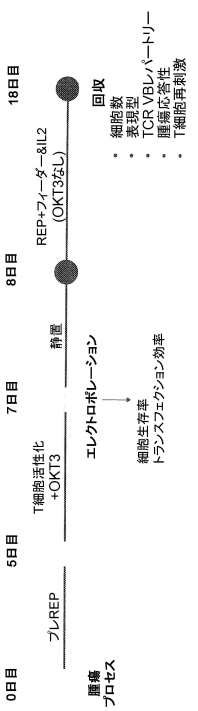
【図１９ｂ】



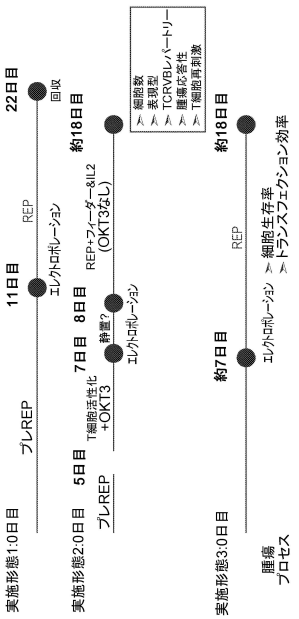
【図１９ｃ】



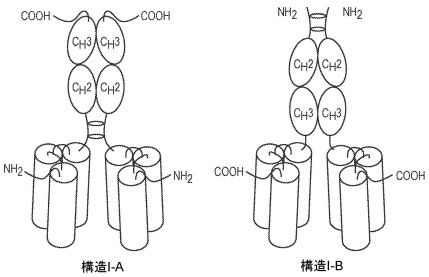
【図２０】



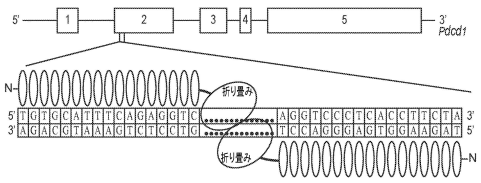
【図２１】



【図２２】



【図２３】



【配列表】
2022553389000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/057135

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K35/17 A61K39/00 C12N5/0783 C12N15/90
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)
A61K C12N

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, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/100023 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 23 May 2019 (2019-05-23) paragraph [0095]; figure 85 paragraph [001021] paragraph [001078] - paragraph [001083] paragraphs [001084], [001091], [001097] -----	1-214
X	WO 2019/136456 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 11 July 2019 (2019-07-11) paragraph [0007]; claim 3 paragraph [0451] -----	1-54, 59-91, 97-148, 154-162, 171-176
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 January 2021	04/02/2021

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Lanzrein, Markus

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/057135

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2018/182817 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]; WARDELL SETH [US] ET AL.) 4 October 2018 (2018-10-04) claim 1	1-214
Y	WO 2018/075664 A1 (UNIV MINNESOTA [US]; INTIMA BIOSCIENCE INC [US]; US HEALTH [US]) 26 April 2018 (2018-04-26) paragraphs [0015], [0134] table 1	1-214
Y	US 2019/284530 A1 (BENSON MICAH [US] ET AL) 19 September 2019 (2019-09-19) paragraph [0647] - paragraph [0648]	1-214
X,P	WO 2019/210131 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 31 October 2019 (2019-10-31) claims 1-214	1-214

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2020/057135

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019100023 A1	23-05-2019	AU 2018368786 A1	18-06-2020
		BR 112020009663 A2	10-11-2020
		CA 3082484 A1	23-05-2019
		CN 111601883 A	28-08-2020
		CR 20200251 A	17-07-2020
		EP 3710576 A1	23-09-2020
		KR 20200100060 A	25-08-2020
		SG 11202004457X A	29-06-2020
		TW 201932594 A	16-08-2019
		US 2020277573 A1	03-09-2020
		WO 2019100023 A1	23-05-2019
WO 2019136456 A1	11-07-2019	AU 2019205823 A1	30-07-2020
		BR 112020013848 A2	01-12-2020
		CA 3087771 A1	11-07-2019
		CN 111836887 A	27-10-2020
		EP 3737743 A1	18-11-2020
		KR 20200119242 A	19-10-2020
		SG 11202006541U A	28-08-2020
		TW 201938177 A	01-10-2019
		WO 2019136456 A1	11-07-2019
WO 2018182817 A1	04-10-2018	AU 2018243355 A1	31-10-2019
		BR 112019020326 A2	28-04-2020
		CA 3057975 A1	04-10-2018
		CL 2019002769 A1	08-05-2020
		CN 110785486 A	11-02-2020
		CO 2019011995 A2	18-02-2020
		CR 20190487 A	17-03-2020
		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
		JP 2020515257 A	28-05-2020
		KR 20190142342 A	26-12-2019
		PE 20191841 A1	31-12-2019
		PH 12019502247 A1	29-06-2020
		SG 11201908994R A	30-10-2019
		TW 201839129 A	01-11-2018
		US 2018207201 A1	26-07-2018
		US 2018280436 A1	04-10-2018
		US 2018282694 A1	04-10-2018
		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

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2020/057135

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2020306306 A1	01-10-2020
		US 2020306307 A1	01-10-2020
		WO 2018182817 A1	04-10-2018
WO 2018075664 A1	26-04-2018	AU 2017346885 A1	16-05-2019
		CA 3041068 A1	26-04-2018
		CN 110520530 A	29-11-2019
		EP 3529359 A1	28-08-2019
		GB 2573406 A	06-11-2019
		JP 2019532080 A	07-11-2019
		US 2019008899 A1	10-01-2019
		US 2020289570 A1	17-09-2020
		US 2020289571 A1	17-09-2020
		US 2020330517 A1	22-10-2020
		WO 2018075664 A1	26-04-2018
US 2019284530 A1	19-09-2019	AU 2019234926 A1	08-10-2020
		BR 112020018620 A2	29-12-2020
		CA 3093915 A1	19-09-2019
		CN 112040986 A	04-12-2020
		EP 3765092 A1	20-01-2021
		KR 20200133219 A	26-11-2020
		US 2019284530 A1	19-09-2019
		WO 2019178420 A1	19-09-2019
WO 2019210131 A1	31-10-2019	AU 2019257749 A1	22-10-2020
		CA 3098303 A1	31-10-2019
		KR 20210005138 A	13-01-2021
		SG 11202010319R A	27-11-2020
		TW 202014195 A	16-04-2020
		WO 2019210131 A1	31-10-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*17/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17	Ｚ	
Ａ６１Ｐ	*15/08*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/00		
Ａ６１Ｐ	*11/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	15/08		
Ａ６１Ｋ	*9/19*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00		
Ａ６１Ｋ	*47/42*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	9/19		
Ａ６１Ｋ	*47/20*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/42		
Ｃ１２Ｎ	*5/0783*	*(2010.01)*	Ａ６１Ｋ	47/20		
			Ｃ１２Ｎ	5/0783		

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４３０１，パロ アルト，クーパー ストリート １３５７
リッチピチャイ，クリット
アメリカ合衆国，フロリダ州 ３３６１３，タンパ，エヌ．４２番 ストリート １４６０５，アパートメント ６０

Ｆターム（参考） 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC20 BA01 BB19 BC50 CA44
4C076 BB11 BB13 CC27 CC29 DD55 EE41Q FF12 FF36 FF63 GG06
4C087 AA01 AA02 AA03 BB43 BB64 MA17 MA44 MA66 NA14 ZA59
ZA81 ZA89 ZB26 ZC02