202305360

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202305360 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 02 月 01 日

(21)申請案號：111111476 (22)申請日： 中華民國 111 (2022) 年 03 月 25 日

(51)Int. Cl.： *G01N33/50 (2006.01)* *C12N5/0783 (2010.01)*

A61K35/17 (2015.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2021/03/25 美國 63/166,210

2021/05/18 美國 63/189,829

2021/06/21 美國 63/212,933

2021/08/13 美國 63/233,035

2021/09/22 美國 63/246,890

2021/12/06 美國 63/286,145

2022/02/14 美國 63/309,919

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

(72)發明人：辛普森艾貝森 米歇爾 SIMPSON-ABELSON, MICHELLE R. (CA)；佛瑞高特 馬修 FRIGAULT, MATTHEW J. (US)；羅斯包姆 維尼 ROTHBAUM, WAYNE P. (US)；威瑟 麥克 WEISER, MICHAEL (US)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：58 項 圖式數：211 共 1340 頁

(54)名稱

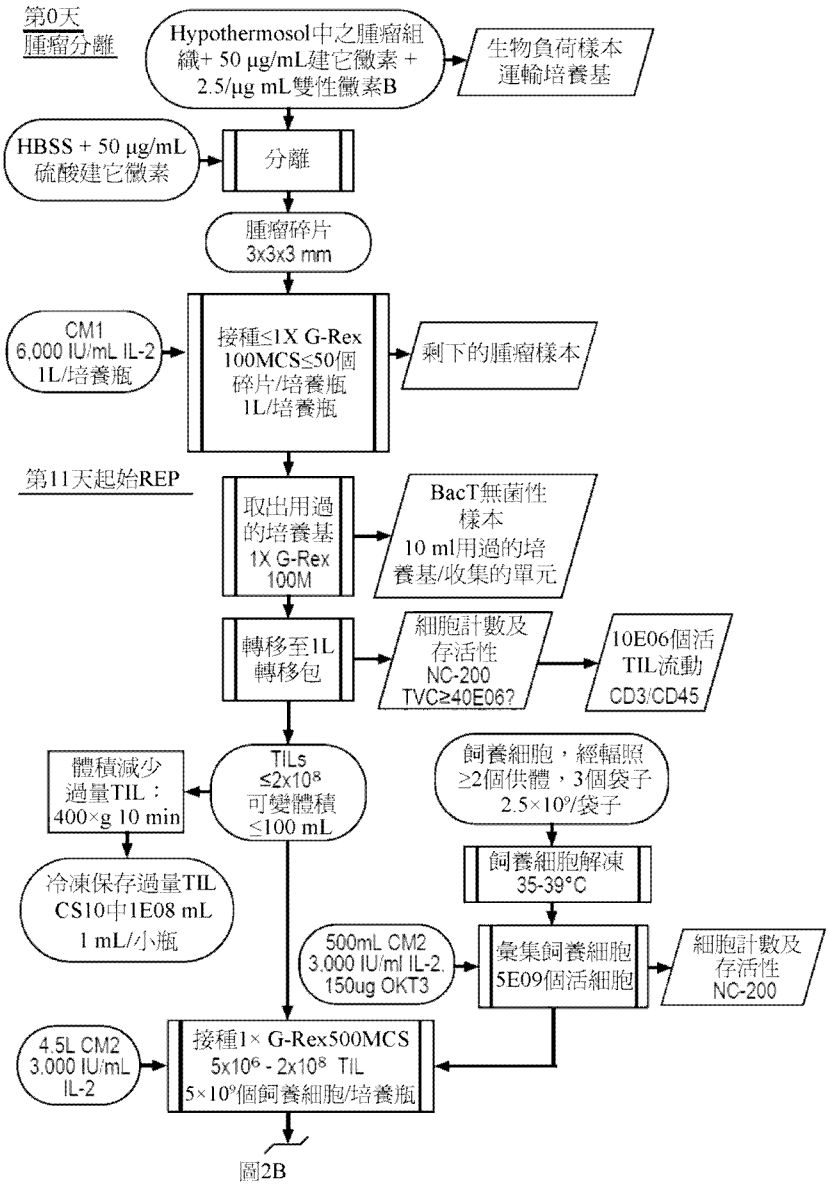
用於T細胞共培養效力測定及配合細胞療法產品使用的方法及組合物

(57)摘要

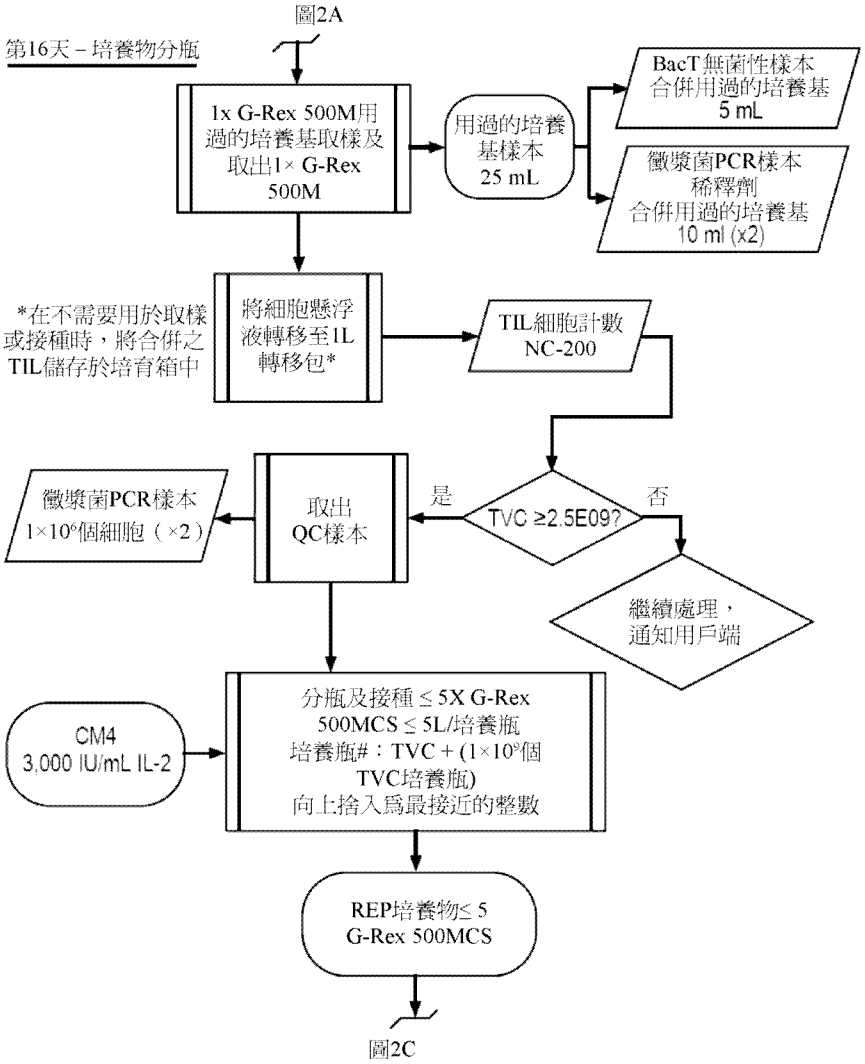
本發明提供用於分析或測定腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)產物用於療法(包含人類癌症療法)中之效力及/或功能性，及分析或測定其他多株產物(諸如骨髓浸潤性淋巴球(MIL)及末梢血液淋巴球(PBL)產物)之效力及/或功能性的新穎過程、組合物及方法。亦提供了使用 TIL、MIL 及 PBL 產物製備及治療癌症之組合物、方法及套組。

The present invention provides novel processes, compositions, and methods for analyzing or assaying the potency and/or functionality of tumor infiltrating lymphocyte (TIL) products for use in therapy, including human cancer therapy, and analyzing or assaying the potency and/or functionality of other polyclonal products, such as marrow infiltrating lymphocyte (MIL) and peripheral blood lymphocyte (PBL) products. Compositions, methods, and kits for preparing and treating cancer using TIL, MIL, and PBL products are also provided.

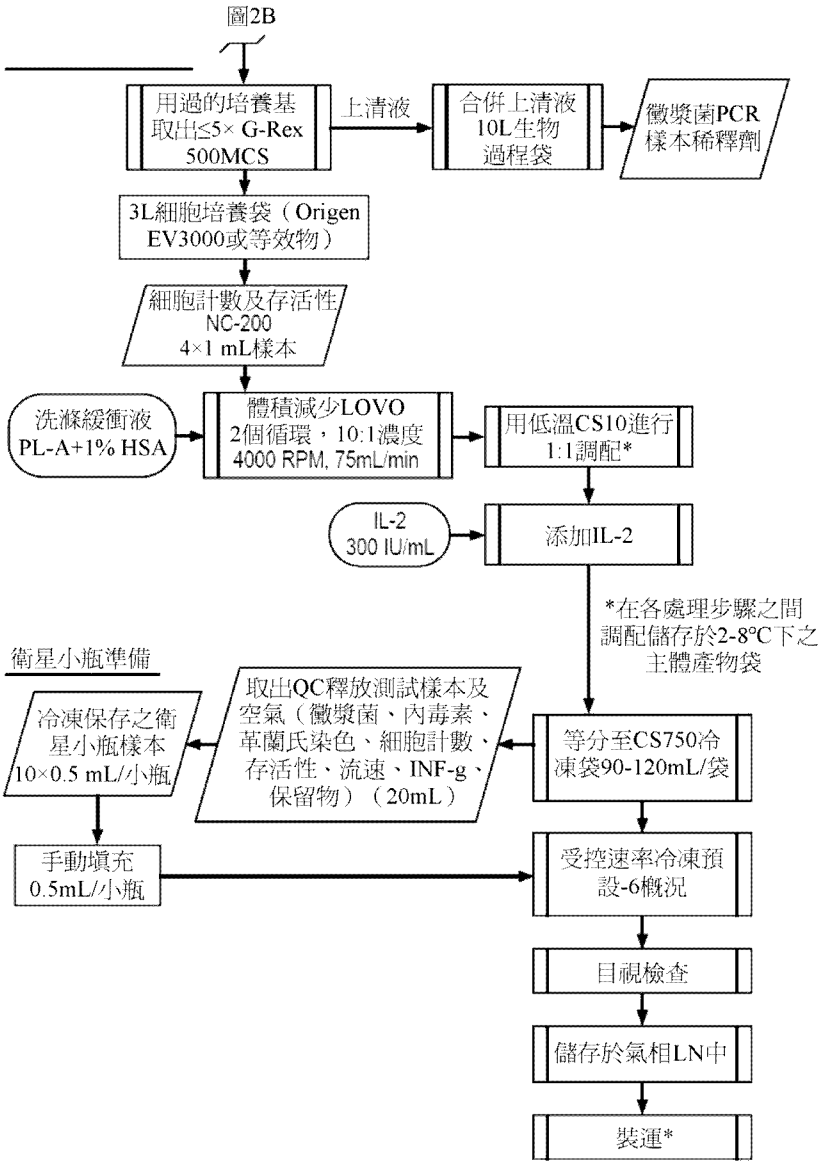
指定代表圖：


第0天
腫瘤分離
Hypothermosol中之腫瘤組織+ 50 µg/mL建它黴素 + 2.5/µg mL雙性黴素B
生物負荷樣本
運輸培養基
HBSS + 50 µg/mL
硫酸建它黴素
分離
腫瘤碎片
3x3x3 mm
CM1
6,000 IU/mL IL-2
1L/培養瓶
接種≤1X G-Rex 100MCS≤50個碎片/培養瓶
1L/培養瓶
剩下的腫瘤樣本
第11天起始REP
取出用過的培養基
1X G-Rex 100M
BacT無菌性樣本
10 ml用過的培養基/收集的單元
轉移至1L
轉移包
細胞計數及存活性
NC-200
TVC≥40E06?
10E06個活TIL流動
CD3/CD45
體積減少過量TIL：
400×g 10 min
TILs
≤2x10⁸
可變體積
≤100 mL
飼養細胞，經輻照
≥2個供體，3個袋子
2.5×10⁹/袋子
冷凍保存過量TIL
CS10中1E08 mL
1 mL/小瓶
飼養細胞解凍
35-39°C
500mL CM2
3,000 IU/ml IL-2.
150ug OKT3
彙集飼養細胞
5E09個活細胞
細胞計數及存活性
NC-200
4.5L CM2
3,000 IU/mL
IL-2
接種1× G-Rex500MCS
5x10⁶ - 2x10⁸ TIL
5×10⁹個飼養細胞/培養瓶
圖2B

【圖 2A】


圖2A
第16天 – 培養物分瓶
1x G-Rex 500M用過的培養基取樣及取出1× G-Rex 500M
用過的培養基樣本 25 mL
BacT無菌性樣本 合併用過的培養基 5 mL
黴漿菌PCR樣本 稀釋劑 合併用過的培養基 10 ml (x2)
*在不需要用於取樣或接種時，將合併之TIL儲存於培育箱中
將細胞懸浮液轉移至1L轉移包*
TIL細胞計數 NC-200
TVC ≥2.5E09?
是
否
取出 QC樣本
黴漿菌PCR樣本 1×10⁶個細胞（×2）
繼續處理，通知用戶端
CM4 3,000 IU/mL IL-2
分瓶及接種 ≤ 5X G-Rex 500MCS ≤ 5L/培養瓶
培養瓶#：TVC + (1×10⁹個TVC培養瓶)
向上捨入爲最接近的整數
REP培養物≤ 5 G-Rex 500MCS
圖2C

【圖 2B】


圖2B
用過的培養基
取出≤5× G-Rex
500MCS
上清液
合併上清液
10L生物
過程袋
微漿菌PCR
樣本稀釋劑
3L細胞培養袋（Origen
EV3000或等效物）
細胞計數及存活性
NC-200
4×1 mL樣本
洗滌緩衝液
PL-A+1% HSA
體積減少LOVO
2個循環，10:1濃度
4000 RPM, 75mL/min
用低溫CS10進行
1:1調配*
IL-2
300 IU/mL
添加IL-2
*在各處理步驟之間
調配儲存於2-8℃下之
主體產物袋
衛星小瓶準備
冷凍保存之衛
星小瓶樣本
10×0.5 mL/小瓶
取出QC釋放測試樣本及
空氣（微漿菌、內毒素、
革蘭氏染色、細胞計數、
存活性、流速、INF-g、
保留物）（20mL）
等分至CS750冷
凍袋90-120mL/袋
手動填充
0.5mL/小瓶
受控速率冷凍預
設-6概況
目視檢查
儲存於氣相LN中
裝運*

【圖 2C】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於T細胞共培養效力測定及配合細胞療法產品使用的方法及組合物

【英文發明名稱】

METHODS AND COMPOSITIONS FOR T-CELL COCULTURE POTENCY ASSAYS AND USE WITH CELL THERAPY PRODUCTS

【中文】

本發明提供用於分析或測定腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)產物用於療法(包含人類癌症療法)中之效力及/或功能性，及分析或測定其他多株產物(諸如骨髓浸潤性淋巴球(MIL)及末梢血液淋巴球(PBL)產物)之效力及/或功能性的新穎過程、組合物及方法。亦提供了使用TIL、MIL及PBL產物製備及治療癌症之組合物、方法及套組。

【英文】

The present invention provides novel processes, compositions, and methods for analyzing or assaying the potency and/or functionality of tumor infiltrating lymphocyte (TIL) products for use in therapy, including human cancer therapy, and analyzing or assaying the potency and/or functionality of other polyclonal products, such as marrow infiltrating lymphocyte (MIL) and peripheral blood lymphocyte (PBL) products. Compositions, methods, and kits for preparing and treating cancer using TIL, MIL, and PBL products are also provided.

【指定代表圖】圖2

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於T細胞共培養效力測定及配合細胞療法產品使用的方法及組合物

【英文發明名稱】

METHODS AND COMPOSITIONS FOR T-CELL COCULTURE POTENCY ASSAYS AND USE WITH CELL THERAPY PRODUCTS

【技術領域】

【0001】本發明係關於用於T細胞共培養效力測定及配合細胞療法產品使用的方法及組合物。

【先前技術】

【0002】使用授受性自體轉移腫瘤浸潤性淋巴球(tumor infiltrating lymphocyte；TIL)治療大型(bulky)、難治性癌症表示對於不良預後患者的一種強大的治療方案。Gattinoni等人，《自然免疫學評論(*Nat. Rev. Immunol.*)》**2006,** *6,* 383-393。TIL係由T細胞主導，且基於IL-2之TIL擴增及隨後的「快速擴增過程」(REP)已因其速度及效率而成為TIL擴增之較佳方法。Dudley等人，《科學(Science)》**2002**，298, 850-54；Dudley等人，《臨床腫瘤學雜誌(*J. Clin. Oncol.*)》**2005,** *23,* 2346-57；Dudley等人，《臨床腫瘤學雜誌》**2008**, *26,* 5233-39；Riddell等

人，《科學》**1992,** *257,* 238-41；Dudley等人，《免疫療法雜誌(*J. Immunother.*)》**2003**, *26,* 332-42。已探究許多改善黑色素瘤對TIL療法的反應且將TIL療法擴展至其他腫瘤類型的方法，但成效有限，該領域仍然具有挑戰性。Goff等人，《臨床腫瘤學雜誌》**2016,** *34,* 2389-97；Dudley等人，《臨床腫瘤學雜誌》**2008**, *26,* 5233-39；Rosenberg等人，《臨床癌症研究(*Clin.Cancer Res.*)》 **2011,** *17,* 4550-57。亦已描述單一免疫檢查點抑制劑之組合研究，但正在進行其他研究且需要額外治療方法(Kverneland等人，《腫瘤標靶(Oncotarget)》, **2020**, *11*(22), 2092-2105)。

【0003】此外，當前的TIL製造及治療過程受到長度、成本、無菌性問題及本文所描述之其他因素的限制，使得對於其他檢查點抑制劑療法難治的患者的治療潛力受到嚴重限制。迫切需要為TIL製造過程及基於此類過程的療法提供品質控制方法，此類過程適合用於治療剩餘極少治療選擇方案或無可行的治療選擇方案的患者。本發明藉由提供用於產生TIL之縮短製造過程來滿足此需要，該縮短製造過程具有提供用於評估經擴增TIL之效力及/或功能性之機制的額外步驟。

【0004】本發明提供用於製備及評估包含TIL之T細胞之效力及/或功能性的經改良方法、方法及組合物，以便例如製備治療功效提高的治療性TIL群體來治療癌症。相較於本領域中已知之測定，此等效力測定能夠提供優良表現、對T細胞產物效力之更好控制及增加之生物相關性以

及其他改良。亦描述了使用效力測定的製造過程、投予方法及醫藥組合物。此等過程及方法可另外用於投與TIL與如本文所描述之CTLA-4抑制劑及PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑的組合。

【發明內容】

【0005】本文提供用於評估經擴增TIL及其他多株T細胞產物(包含骨髓浸潤性淋巴球(MIL)及末梢血液淋巴球(PBL))之效力及/或功能性的方法，其隨後可用於藉由投予由此等方法所評估之TIL、MIL、PBL或其他多株T細胞產物來治療癌症。

【0006】在一個態樣中，本發明提供一種確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力。

【0007】在一些實施例中，該方法包括以下其他步驟：

d. 將包括(i)陰性對照細胞或(ii)人類白血球抗原(HLA)阻斷抗體及目標細胞的陰性對照與T細胞產

物細胞進行持續第二時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估該第二收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；以及

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力。

【0008】在一些實施例中，T細胞產物係選自由以下組成之群組：腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)產物、骨髓浸潤性淋巴球(MIL)產物或末梢血液淋巴球(PBL)產物。

【0009】在一些實施例中，T細胞產物為來自人類之TIL產物，且其中該TIL產物係藉由切除腫瘤或腫瘤碎斷或碎解而獲得，並且係藉由包括快速擴增方案步驟之TIL擴增過程製造。

【0010】在一些實施例中，該方法包括釋放用於治療人類患者之T細胞產物的步驟。

【0011】在一些實施例中，目標細胞為經輻照之Raji細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。

【0012】在一些實施例中，陰性對照細胞缺乏I類MHC或HLA及II類MHC或HLA表現。

【0013】在一些實施例中，陰性對照細胞為經輻照之

K562細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。

【0014】在一些實施例中，HLA阻斷抗體包括HLA-I阻斷抗體、HLA-II阻斷抗體或其組合。

【0015】在一些實施例中，TIL產物細胞之數目與目標細胞之數目之間的比率在5:1與1:5之間。

【0016】在一些實施例中，TIL產物細胞之數目與陰性對照細胞之數目之間的比率在5:1與1:5之間。

【0017】在一些實施例中，TIL產物細胞之數目與目標細胞之數目之間的比率在3:1與1:3之間。

【0018】在一些實施例中，TIL產物細胞之數目與陰性對照細胞之數目之間的比率在3:1與1:3之間。

【0019】在一些實施例中，TIL產物細胞之數目與目標細胞之數目之間的比率在1:2與1:4之間。

【0020】在一些實施例中，TIL產物細胞之數目與陰性對照細胞之數目之間的比率在1:2與1:4之間。

【0021】在一些實施例中，TIL產物細胞之數目與目標細胞之數目之間的比率在1:25與1:35之間。

【0022】在一些實施例中，TIL產物細胞之數目與陰性對照細胞之數目之間的比率在1:25與1:35之間。

【0023】在一些實施例中，TIL產物細胞之數目與目標細胞之數目之間的比率為約1:2。

【0024】在一些實施例中，TIL產物細胞之數目與陰性對照細胞之數目之間的比率為約1:2。

【0025】在一些實施例中，TIL產物細胞之數目與目

標細胞之數目之間的比率為約1:3。

【0026】在一些實施例中，TIL產物細胞之數目與陰性對照細胞之數目之間的比率為約1:3。

【0027】在一些實施例中，TIL產物細胞之數目與目標細胞之數目之間的比率為約1:4。

【0028】在一些實施例中，TIL產物細胞之數目與陰性對照細胞之數目之間的比率為約1:4。

【0029】在一些實施例中，在解凍冷凍保存之TIL產物、MIL產物或PBL產物之後進行共培養，且使解凍之TIL產物、MIL產物或PBL產物在一段選自由以下組成之群組的時間培育下恢復：12小時、24小時、36小時、48小時、60小時及72小時。

【0030】在一些實施例中，第一時段為約6小時至約48小時。

【0031】在一些實施例中，第二時段為約6小時至約48小時。

【0032】在一些實施例中，第一時段選自由以下組成之群組：約12小時、約18小時及約24小時。

【0033】在一些實施例中，第二時段選自由以下組成之群組：約12小時、約18小時及約24小時。

【0034】在一些實施例中，第一時段及第二時段為相同持續時間。

【0035】在一些實施例中，T細胞產物上之一種或多種標記物係選自由以下組成之群組：CD25、CD69、

CD134、CD137、CD150、KLRG1或其組合。

【0036】在一些實施例中，一或多種自T細胞產物分泌之分析物選自由以下組成之群組：IFN-α、IFN-β、IFN-γ、顆粒酶B、穿孔素、TNF-α、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、IL-13、IL-14、IL-16、IL-17、IL-18、IL-22、IL-25、IL-26、MIP-1β及其組合。

【0037】在一些實施例中，一種或多種自TIL產物分泌的分析物選自由以下組成之群組：IFN-α、IFN-β、IFN-γ、顆粒酶B、穿孔素、TNF-α、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、IL-13、IL-14、IL-16、IL-17、IL-18、IL-22、IL-25、IL-26、MIP-1β及其組合，其中對於一種或多種分析物的每一種分析物，以對照值數量標準化觀測值數量，並且其中一種或多種分析物中的每一種分析物的觀測值相對於對照值的增加選自由以下組成之群組：至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少3.5倍、至少4倍、至少4.5倍及至少5倍。

【0038】在一些實施例中，TIL產物係由藉由手術切除、穿刺生檢、核心生檢、小型生檢或其他用於自人類患者獲得含有腫瘤與TIL細胞之混合物之樣本的手段獲得的腫瘤製造而成。

【0039】在另一態樣中，本發明提供一種用腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體治療有需要患者之癌症的方法，該方

法包括以下步驟：

(a) 藉由將獲自患者之腫瘤樣本處理成(i)多個腫瘤碎片或(ii)腫瘤碎解物，獲得及/或接收來自藉由手術切除、穿刺生檢、核心生檢、小型生檢或其他手段自患者切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包括IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3至14天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(d) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7至14天以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之治療性TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(f) 藉由以下確定該治療性TIL群體之效力：

i. 將目標細胞與治療性TIL群體的一部分進行持續第一時段的共培養；

ii. 自該共培養獲得收集物；

iii. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在治療性TIL群體上的表現或(2)自部分治療性TIL群體分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定治療性TIL群體的效力；

iv. 將陰性對照細胞或(i)陰性對照細胞或(ii)人類白血球抗原阻斷抗體與治療性TIL群體的第二部分進行持續第二時段的第二次共培養；

v. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

vi. 評估第二收集物中(1)一種或多種標記物在治療性TIL群體的第二部分上的表現或(2)自治療性TIL群體的第二部分分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；

vii. 將一個或多個觀測值與一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定治療性TIL群體的效力；

(g) 將來自步驟(e)之治療性TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)轉移至步驟(g)係在不開放該系統之情況下進行；

(h) 視情況使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(g)的包括治療性TIL群體的輸注袋；以及

(i) 若確定治療性TIL群體有效，則向患者投予治療

有效劑量的來自步驟(g)或(h)中之輸注袋的治療性TIL群體。

【0040】在一些實施例中，檢查所收集之TIL的效力及/或功能性在冷凍保存之後進行，或視情況在冷凍保存步驟之前及之後進行。

【0041】在一些實施例中，患者具有不可切除、轉移性、耐藥或難以用CTLA-4抑制劑、PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑治療的腫瘤，且視情況其中患者先前已用CTLA-4抑制劑、PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑進行治療。

【0042】在一些實施例中，步驟(c)中的第二TIL群體在數目上比第一TIL群體大至少50倍。

【0043】在一些實施例中，第一次擴增係在約10至約12天之時段內進行。

【0044】在一些實施例中，第二次擴增係在約10至約12天之時段內進行。

【0045】在一些實施例中，第一次擴增係在約11天之時段內進行。

【0046】在一些實施例中，第二次擴增係在約11天之時段內進行。

【0047】在一些實施例中，在第一次擴增中，IL-2係以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在於細胞培養基中。

【0048】在一些實施例中，在第二擴增步驟中，IL-2係以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在且OKT-

3抗體係以約30 ng/mL之初始濃度存在。

【0049】在一些實施例中，該方法進一步包括在向患者投與TIL之前用非骨髓清除式淋巴球耗盡方案治療患者的步驟。

【0050】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱(fludarabine)五天。

【0051】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：持續兩天以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺及以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱三天。

【0052】在一些實施例中，該方法進一步包括以下步驟：始於向患者投予治療性TIL群體之後的第二天，用IL-2方案治療患者。

【0053】在一些實施例中，該方法進一步包括以下步驟：始於向患者投予治療性TIL群體的同一天，用IL-2方案治療患者。

【0054】在一些實施例中，在完成向患者投予治療性TIL群體之後約3至約24小時投予IL-2方案。

【0055】在一些實施例中，IL-2方案為包括600,000或720,000 IU/kg阿地介白素(aldesleukin)或其生物類似物或變體之高劑量IL-2方案，其以每八小時15分鐘的推注靜脈

內輸注形式投予直至耐受為止。

【0056】在一些實施例中，在步驟(a)中將獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物進一步包括在酶素性培養基中培育腫瘤樣本。

【0057】在一些實施例中，在步驟(a)中將獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物進一步包括以機械方式破壞腫瘤樣本以便分解腫瘤樣本。

【0058】在一些實施例中，在步驟(a)中將獲自患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物進一步包括使用密度梯度分離純化分解的腫瘤樣本。

【0059】在一些實施例中，酶素性培養基包括DNase。

【0060】在一些實施例中，酶素性培養基包括約30單位/毫升之DNase。

【0061】在一些實施例中，酶素性培養基包括膠原蛋白酶。

【0062】在一些實施例中，酶素性培養基包括約1.0 mg/mL膠原蛋白酶。

【0063】在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、胰臟癌、子宮內膜癌、甲狀腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、乳癌、頭頸癌、神經膠母細胞瘤、胃腸癌、腎癌、肉瘤及腎細胞癌。

【0064】在一些實施例中，該方法包括向患者投予

PD-1抑制劑、PD-L1抑制劑或CTLA-4抑制劑之步驟。

【0065】在另一態樣中，本發明提供一種確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 在不同目標細胞濃度下進行至少三次目標細胞與T細胞產物細胞的共培養；

b. 在不同目標細胞濃度下進行至少三次目標細胞與T細胞參考標準細胞的共培養；

c. 自每次共培養萃取上清液；以及

d. 評估上清液中自T細胞產物細胞及T細胞參考標準細胞分泌之細胞介素，以獲得劑量濃度來確定T細胞產物之效力；

其中目標細胞為單核球細胞。

【0066】在一些實施例中，T細胞產物為腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)產物、骨髓浸潤性淋巴球(MIL)產物或末梢血液淋巴球(PBL)產物。

【0067】在一些實施例中，單核球細胞為U937或Thp1細胞，或其衍生物、變體、修飾或後代，且其中細胞介素為干擾素-γ。

【0068】在一些實施例中，共培養進行選自由以下組成之群組的時間段：約6小時、約12小時、約18小時、約24小時、約30小時、約36小時、約42小時及約48小時。

【0069】在一些實施例中，T細胞產物為TIL產物，且其中使用約4×10^5、約2×10^5、約1×10^5及約0.5×10^5個目標細胞每孔之四種目標細胞濃度及約1.5×10^6個TIL每孔之單

一TIL細胞濃度。

【0070】在一些實施例中，使用目標細胞與T細胞產物細胞之至少四次共培養及目標細胞與T細胞參考標準細胞之至少四次共培養，進行平行線分析，並且丟棄一個離群值目標細胞劑量濃度。

【0071】在一些實施例中，該方法係效力測定矩陣之組成部分。

【0072】在一些實施例中，效力測定矩陣包括一種或多種選自由以下組成之群組的測定：使用CD3、CD28及/或CD137刺激並報告干擾素γ、顆粒酶B或腫瘤壞死因子-α的基於珠粒或基於培養盤的測定；總活細胞測定；活細胞百分比測定；$CD4^+$細胞含量測定；$CD8^+$細胞含量測定；T_{EM}細胞含量測定；T_{CM}細胞含量測定；$LAG3^+$細胞含量測定；及$KLRG1^+$細胞含量測定；$CD101^+$細胞含量測定；$CD69^+$細胞含量測定；T_{SCM}細胞含量測定；T_{EMRA}細胞含量測定；T_{reg}細胞含量測定；$PD\text{-}1^+$細胞含量測定；$TIM3^+$細胞含量測定；$CD25^+$細胞含量測定；$CD27^+$細胞含量測定；$CD28^+$細胞含量測定；$CD56^+$細胞含量測定；$CTLA\text{-}4^+$細胞含量測定；$TIGIT^+$細胞含量測定；以及$CD57^+$細胞含量測定。

【0073】在另一態樣中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體的方法，該方法包括投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，包括：

(a) 將腫瘤碎解物或腫瘤碎片添加至密閉系統中，其

中該腫瘤碎解物或腫瘤碎片包括第一TIL群體且係獲自自個體切除之腫瘤；

(b) 藉由在包括IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)轉變至步驟(c)係在不開放該系統之情況下進行；

(c) 藉由補充包括IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之額外細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該第二擴增係進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(b)轉變至步驟(c)係在不開放該系統的情況下進行；

(d) 收集自步驟(c)獲得之第三TIL群體，其中自步驟(c)轉變至步驟(d)係在不開放該系統之情況下進行；

(e) 將來自步驟(d)的所收集第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(d)至(e)之轉移係在不開放系統之情況下進行；

(f) 使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(e)的包括所收集TIL群體的輸注袋；以及

(g) 向個體投予治療有效劑量的來自步驟(f)中之輸注

袋的第三TIL群體。

其中APC係選自由以下組成之群組：Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。

【0074】在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤(包含轉移性黑色素瘤及葡萄膜黑色素瘤)、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、小細胞肺癌、膀胱癌、乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、食道癌、食道胃交界處癌症、胃癌、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。

【0075】在一些實施例中，步驟(a)中之第一次擴增及步驟(b)中之第二次擴增各自單獨地在11天之時段內進行。

【0076】在一些實施例中，步驟(a)至(d)係在約10天至約22天內進行。

【0077】在一些實施例中，已使用如本文所描述之方法確定TIL之效力。

【0078】在一些實施例中，已使用如本文所描述之方法確定TIL之效力。

【圖式簡單說明】

【0079】[**圖1**]：例示性Gen 2(過程2A)圖表，其提供步驟A至F之概述。

【0080】[**圖2A至2C**]：用於TIL製造之Gen 2(過程2A)

實施例的過程流程圖。

【0081】[**圖3**]：顯示冷凍保存之TIL例示性製造過程(約22天)的實施例的圖式。

【0082】[**圖4**]：顯示Gen 2(過程2A)之實施例的圖式，此係一個用於TIL製造的22天過程。

【0083】[**圖5**]：過程1C及用於TIL製造之Gen 2(過程2A)的例示性實施例的步驟A至F的比較表。

【0084】[**圖6**]：過程1C之實施例及用於TIL製造之Gen 2(過程2A)之實施例的詳細比較。

【0085】[**圖7**]：例示性Gen 3型TIL製造過程。

【0086】[**圖8A至8D**]：**A)**顯示2A過程(大約22天過程)與用於TIL製造之Gen 3過程(大約14天至16天過程)的實施例之間的比較。**B)**例示性過程Gen 3圖表，其提供步驟A至F之概述(大於14天至16天過程)。**C)**提供三種例示性Gen 3過程之圖表，其中概述了三種過程變化中之每一者的步驟A至F(大約14天或16天過程)。**D)**例示性經修改類Gen 2過程，其提供步驟A至F之概述(大約22天過程)。

【0087】[**圖9**]：提供Gen 2(過程2A)與Gen 3過程之間的可比較性之實驗流程圖。

【0088】[**圖10**]：顯示各種Gen 2(過程2A)與Gen 3.1過程實施例之間的比較。

【0089】[**圖11**]：描述Gen 2、Gen 2.1及Gen 3.0過程之實施例之各種特徵的表。

【0090】[**圖12**]：Gen 3過程(被稱作Gen 3.1)之實施例

之培養基條件的概述。

【0091】[**圖13**]：描述Gen 2、Gen 2.1及Gen 3.0過程之實施例之各種特徵的表。

【0092】[**圖14**]：比較Gen 2及Gen 3.0過程之實施例之各種特徵的表。

【0093】[**圖15**]：提供所描述擴增過程之各種實施例中的培養基用途的表。

【0094】[**圖16**]：Gen 3過程(16天過程)之例示性實施例之示意圖。

【0095】[**圖17**]：使用Gen 3擴增平台擴增來自造血性惡性病之T細胞之方法的例示性實施例的示意圖。

【0096】[**圖18**]：提供結構I-A及I-B。圓柱體係指個別多肽結合域。結構I-A及I-B包括三個線性連接的衍生自例如4-1BBL或結合4-1BB的抗體的TNFRSF結合域，其摺疊形成三價蛋白質，該三價蛋白質接著經由IgG1-Fc(包含CH3及CH2域)與第二三價蛋白質連接，該IgG1-Fc隨後經由雙硫鍵(小長橢圓形)將兩個三價蛋白質連接在一起，從而穩定結構並提供能夠將六個受體之細胞內傳訊域與傳訊蛋白集合在一起以形成傳訊複合物的促效劑。表示為圓柱體之TNFRSF結合域可為包括例如由連接子連接之V_H及V_L鏈的scFv域，該連接子可包括親水性殘基及提供柔性的Gly與Ser序列以及提供溶解性的Glu與Lys。

【0097】[**圖19**]：Gen 3過程(16天過程)之例示性實施例之示意圖。

【0098】[**圖20**]：提供Gen 3.1過程(16天過程)之例示性實施例的過程概述。

【0099】[**圖21**]：Gen 3.1測試過程(16天至17天過程)之例示性實施例之示意圖。

【0100】[**圖22**]：Gen 3過程(16天過程)之例示性實施例之示意圖。

【0101】[**圖23**]：例示性Gen 2及例示性Gen 3過程之比較表。

【0102】[**圖24**]：Gen 3過程(16天至17天過程)製備時刻表之例示性實施例之示意圖。

【0103】[**圖25**]：Gen 3過程(14天至16天過程)之例示性實施例之示意圖。

【0104】[**圖26A至26B**]：Gen 3過程(16天過程)之例示性實施例之示意圖。

【0105】[**圖27**]：Gen 3過程(16天過程)之例示性實施例之示意圖。

【0106】[**圖28**]：Gen 2、Gen 2.1與Gen 3過程(16天過程)之實施例之比較。

【0107】[**圖29**]：Gen 2、Gen 2.1與Gen 3過程(16天過程)之實施例之比較。

【0108】[**圖30**]：Gen 3實施例組成部分。

【0109】[**圖31**]：Gen 3實施例流程圖比較(Gen 3.0、Gen 3.1對照、Gen 3.1測試)。

【0110】[**圖32**]：顯示Gen 3過程(16天至17天過程)之

例示性實施例之組成部分。

【0111】[**圖33**]：接受準則表。

【0112】[**圖34**]：使用TIL-K562陰性對照及MLR(患者匹配之PBMC)以及基於珠粒之陽性對照的TIL-Raji共培養測定之實施例的圖式。

【0113】[**圖35**]：使用TIL-Raji共培養測定，藉由流動式細胞測量術觀測到的不同共培養期的CD25水準(CD3的%)以及針對肺腫瘤(L4224)及黑色素瘤(M1152)的TIL：目標比。

【0114】[**圖36**]：使用TIL-Raji共培養測定，藉由流動式細胞測量術觀測到的不同共培養期的CD69水準(CD3的%)以及針對肺腫瘤(L4224)及黑色素瘤(M1152)的TIL：目標比。

【0115】[**圖37**]：使用TIL-Raji共培養測定，藉由流動式細胞測量術觀測到的不同共培養期的CD137(4-1BB)水準(CD3的%)以及針對肺腫瘤(L4224)及黑色素瘤(M1152)的TIL：目標比。

【0116】[**圖38**]：使用TIL-Raji共培養測定，藉由流動式細胞測量術觀測到的不同共培養期的CD134(OX40)水準(CD3的%)以及針對肺腫瘤(L4224)及黑色素瘤(M1152)的TIL：目標比。

【0117】[**圖39**]：使用TIL-Raji共培養測定，不同共培養期的IFN-γ分泌以及針對肺腫瘤(L4224)及黑色素瘤(M1152)的TIL：目標比。

【0118】[**圖40**]：使用TIL-Raji共培養測定，不同共培養期的CCL4分泌以及針對肺腫瘤(L4224)及黑色素瘤(M1152)的TIL：目標比。

【0119】[**圖41**]：使用TIL-Raji共培養測定，不同共培養期的顆粒酶B分泌及不同共培養期的TIL：目標比以及針對肺腫瘤(L4224)及黑色素瘤(M1152)的TIL：目標比。

【0120】[**圖42**]：使用TIL-K562陰性對照之TIL-Raji共培養測定之實施例的圖式。

【0121】[**圖43**]：基於TIL-Raji細胞之效力測定之例示性實施例的共培養實驗設定。

【0122】[**圖44**]：標記物活化在TIL-Raji共培養測定中之表型表現。

【0123】[**圖45**]：在CD69(Gen 2 TIL：301-001)TIL-Raji共培養中之表型表現。

【0124】[**圖46**]：以pg/mL為單位的IFN-γ分泌水準。

【0125】[**圖47**]：以pg/mL為單位的顆粒酶B分泌水準。

【0126】[**圖48**]：IFN-γ及顆粒酶B分泌水準。

【0127】[**圖49**]：IFN-γ釋放之倍數變化：TIL+細胞株/單獨的TIL。

【0128】[**圖50**]：顆粒酶之倍數變化：TIL+細胞株/單獨的TIL。

【0129】[**圖51**]：細胞介素釋放之倍數變化：TIL+細胞株/單獨的TIL。

【0130】[**圖52**]：IFN-γ釋放之倍數變化：TIL+細胞株/TIL + K562。

【0131】[**圖53**]：顆粒酶B釋放之倍數變化：TIL+細胞株/TIL+K562。

【0132】[**圖54**]：細胞介素釋放之倍數變化：TIL+細胞株/TIL+K562。

【0133】[**圖55**]：IFN-γ及顆粒酶B分泌概述表。

【0134】[**圖56**]：基於TIL-Raji細胞之效力分析之實施例之示意圖，其顯示藉由MHC顯性識別之TIL活化。

【0135】[**圖57**]：基於TIL-Raji細胞之效力測定之例示性實施例的共培養實驗培養盤設定。

【0136】[**圖58**]：使用視情況選用的TIL-K562陰性對照之TIL-Raji共培養測定之實施例的圖式。

【0137】[**圖59**]：TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3之黑色素瘤TIL批次的IFN-γ分泌(pg/mL)。以pg/mL為單位之分泌水準顯示於y軸上，且TIL:目標比顯示於x軸上。

【0138】[**圖60**]：TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3之黑色素瘤TIL批次的IFN-γ分泌(pg/mL)。以pg/mL為單位之分泌水準顯示於y軸上，且TIL:目標比顯示於x軸上。

【0139】[**圖61**]：TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3之黑色素瘤TIL批次的IFN-γ分泌(pg/mL)。以pg/mL為單位之分泌水準顯示於y軸上，且TIL:目標比顯示於x軸

上。

【0140】[**圖62**]：對於TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3的黑色素瘤TIL批次，TIL加Raji或K562細胞之IFN-γ釋放相對於單獨TIL之IFN-γ釋放的倍數變化。y軸上顯示倍數變化且x軸上顯示TIL:目標比。

【0141】[**圖63**]：對於TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3的黑色素瘤TIL批次，TIL加Raji或K562細胞之IFN-γ釋放相對於單獨TIL之IFN-γ釋放的倍數變化。y軸上顯示倍數變化且x軸上顯示TIL:目標比。

【0142】[**圖64**]：對於TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3的黑色素瘤TIL批次，TIL加Raji或K562細胞之IFN-γ釋放相對於單獨TIL之IFN-γ釋放的倍數變化。y軸上顯示倍數變化且x軸上顯示TIL:目標比。

【0143】[**圖65**]：對於TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3的黑色素瘤TIL批次，TIL加Raji或K562細胞之IFN-γ釋放相對於TIL加K562細胞之IFN-γ釋放的倍數變化。y軸上顯示倍數變化且x軸上顯示TIL:目標比。

【0144】[**圖66**]：對於TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3的黑色素瘤TIL批次，TIL加Raji或K562細胞之IFN-γ釋放相對於TIL加K562細胞之IFN-γ釋放的倍數變化。y軸上顯示倍數變化且x軸上顯示TIL:目標比。

【0145】[**圖67**]：對於TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3的黑色素瘤TIL批次，TIL加Raji或K562細胞之IFN-γ釋放相對於TIL加K562細胞之IFN-γ釋放的倍數變

化。y軸上顯示倍數變化且x軸上顯示TIL:目標比。

【0146】[**圖68**]：在12及18小時培育時間的TIL加Raji或K562細胞的IFN-γ釋放相對於單獨的TIL的倍數變化，顯示在1:3 TIL:Raji或TIL:K562細胞比下的累積數據集，其中*表示p值≤0.05；**表示p值≤0.01；且***表示p值≤0.001。

【0147】[**圖69**]：在12及18小時培育時間的TIL加Raji或K562細胞的IFN-γ釋放相對於單獨的TIL或相對於K562細胞的倍數變化，顯示在1:3 TIL:Raji或TIL:K562細胞比下的累積數據集，其中*表示p值≤0.05；**表示p值≤0.01；且***表示p值≤0.001。

【0148】[**圖70**]：在12及18小時的培育時間的TIL加Raji細胞之IFN-γ釋放相對於TIL加K562細胞或相對於TIL的倍數變化，顯示在1:3 TIL:Raji或TIL:K562細胞比下的累積數據集，其中在全標度下，*表示p值≤0.05且NS表示不顯著。

【0149】[**圖71**]：在12及18小時的培育時間的TIL加Raji細胞之IFN-γ釋放相對於TIL加K562細胞或相對於TIL的倍數變化，顯示在1:3 TIL:Raji或TIL:K562細胞比下的累積數據集，其經擴展顯示較低倍數變化水準之詳情。

【0150】[**圖72**]：TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3之黑色素瘤TIL批次的顆粒酶B分泌(pg/mL)。以pg/mL為單位之分泌水準顯示於y軸上，且TIL:目標比顯示於x軸上。

【0151】[**圖73**]：TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3之黑色素瘤TIL批次的顆粒酶B分泌(pg/mL)。以pg/mL為單位之分泌水準顯示於y軸上，且TIL:目標比顯示於x軸上。

【0152】[**圖74**]：TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3之黑色素瘤TIL批次的顆粒酶B分泌(pg/mL)。以pg/mL為單位之分泌水準顯示於y軸上，且TIL:目標比顯示於x軸上。

【0153】[**圖75**]：對於TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3的黑色素瘤TIL批次，TIL加Raji或K562細胞之顆粒酶B釋放相對於單獨TIL之顆粒酶B釋放的倍數變化。y軸上顯示倍數變化且x軸上顯示TIL:目標比。

【0154】[**圖76**]：對於TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3的黑色素瘤TIL批次，TIL加Raji或K562細胞之顆粒酶B釋放相對於單獨TIL之顆粒酶B釋放的倍數變化。y軸上顯示倍數變化且x軸上顯示TIL:目標比。

【0155】[**圖77**]：對於TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3的黑色素瘤TIL批次，TIL加Raji或K562細胞之顆粒酶B釋放相對於單獨TIL之顆粒酶B釋放的倍數變化。y軸上顯示倍數變化且x軸上顯示TIL:目標比。

【0156】[**圖78**]：對於TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3的黑色素瘤TIL批次，TIL加Raji或K562細胞之顆粒酶B釋放相對於TIL加K562細胞之顆粒酶B釋放的倍數變化。y軸上顯示倍數變化且x軸上顯示TIL:目標比。

【0157】[**圖79**]：對於TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3的黑色素瘤TIL批次，TIL加Raji或K562細胞之顆粒酶B釋放相對於TIL加K562細胞之顆粒酶B釋放的倍數變化。y軸上顯示倍數變化且x軸上顯示TIL:目標比。

【0158】[**圖80**]：對於TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3的黑色素瘤TIL批次，TIL加Raji或K562細胞之顆粒酶B釋放相對於TIL加K562細胞之顆粒酶B釋放的倍數變化。y軸上顯示倍數變化且x軸上顯示TIL:目標比。

【0159】[**圖81**]：在12及18小時的培育時間，以pg/mL/TIL為單位之TIL的顆粒酶B釋放。

【0160】[**圖82**]：在12及18小時的培育時間，TIL加Raji或K562細胞相對於單獨TIL的顆粒酶B釋放，顯示在1:3 TIL:Raji或TIL:K562細胞比下的累積數據集，其中***表示p值≤0.001且****表示p值≤0.0001。

【0161】[**圖83**]：在12及18小時的培育時間，TIL加Raji或K562細胞相對於K562細胞的顆粒酶B釋放，顯示在1:3 TIL:Raji或TIL:K562細胞比下的累積數據集，其中****表示p值≤0.0001。

【0162】[**圖84**]：在12及18小時的培育時間，TIL加Raji細胞之顆粒酶B釋放相對於TIL加K562細胞或相對於TIL的倍數變化，顯示在1:3 TIL:Raji或TIL:K562細胞比下的累積數據集，其中**表示p值≤0.01且NS表示不顯著。

【0163】[**圖85**]：TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3之黑色素瘤TIL批次的TNF-α分泌(pg/mL)。以pg/mL為

單位之分泌水準顯示於y軸上，且TIL:目標比顯示於x軸上。

【0164】[**圖86**]：TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3之黑色素瘤TIL批次的TNF-α分泌(pg/mL)。以pg/mL為單位之分泌水準顯示於y軸上，且TIL:目標比顯示於x軸上。

【0165】[**圖87**]：TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3之黑色素瘤TIL批次的TNF-α分泌(pg/mL)。以pg/mL為單位之分泌水準顯示於y軸上，且TIL:目標比顯示於x軸上。

【0166】[**圖88**]：對於TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3的黑色素瘤TIL批次，TIL加Raji或K562細胞之TNF-α釋放相對於單獨TIL之顆粒酶B釋放的倍數變化。y軸上顯示倍數變化且x軸上顯示TIL:目標比。

【0167】[**圖89**]：對於TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3的黑色素瘤TIL批次，TIL加Raji或K562細胞之TNF-α釋放相對於單獨TIL之顆粒酶B釋放的倍數變化。y軸上顯示倍數變化且x軸上顯示TIL:目標比。

【0168】[**圖90**]：對於TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3的黑色素瘤TIL批次，TIL加Raji或K562細胞之TNF-α釋放相對於單獨TIL之顆粒酶B釋放的倍數變化。y軸上顯示倍數變化且x軸上顯示TIL:目標比。

【0169】[**圖91**]：對於TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3的黑色素瘤TIL批次，TIL加Raji或K562細胞之

TNF-α釋放相對於TIL加K562細胞之顆粒酶B釋放的倍數變化。y軸上顯示倍數變化且x軸上顯示TIL:目標比。

【0170】[**圖92**]：對於TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3的黑色素瘤TIL批次，TIL加Raji或K562細胞之TNF-α釋放相對於TIL加K562細胞之顆粒酶B釋放的倍數變化。y軸上顯示倍數變化且x軸上顯示TIL:目標比。

【0171】[**圖93**]：對於TIL:Raji或TIL:K562比為3:1、1:1及1:3的黑色素瘤TIL批次，TIL加Raji或K562細胞之TNF-α釋放相對於TIL加K562細胞之顆粒酶B釋放的倍數變化。y軸上顯示倍數變化且x軸上顯示TIL:目標比。

【0172】[**圖94**]：在18小時的培育時間，TIL加Raji或K562細胞的TNF-α釋放相對於單獨的TIL的倍數變化，顯示在1:3 TIL:Raji或TIL:K562細胞比下的累積數據集，其中****表示p值≤0.0001。

【0173】[**圖95**]：在18小時的培育時間，TIL加Raji或K562細胞的TNF-α釋放相對於K562細胞的倍數變化，顯示在1:3 TIL:Raji或TIL:K562細胞比下的累積數據集，其中****表示p值≤0.0001。

【0174】[**圖96**]：在18小時的培育時間，TIL加Raji細胞的TNF-α釋放相對於單獨的TIL或相對於TIL加K562細胞的倍數變化，顯示在1:3 TIL:Raji或TIL:K562細胞比下的累積數據集，其中****表示p值≤0.0001。

【0175】[**圖97**]：使用Raji細胞共培養測定之實施例測試的22個樣本之顆粒酶B及IFN-γ結果的概述表。

【0176】[**圖98**]：使用視情況選用的TIL-K562陰性對照之TIL-Raji共培養測定之實施例的圖式。

【0177】[**圖99**]：TIL批次M1173之測定結果。

【0178】[**圖100**]：TIL批次M1152之測定結果。

【0179】[**圖101**]：TIL批次M1187之測定結果。

【0180】[**圖102**]：TIL批次M1179之測定結果。

【0181】[**圖103**]：TIL批次M1183之測定結果。

【0182】[**圖104**]：IFN-γ之細胞介素分泌結果，其顯示在不同的解凍後恢復時間，TIL加K562或Raji細胞相對於單獨的TIL的倍數變化。

【0183】[**圖105**]：IFN-γ之細胞介素分泌結果，其顯示在不同的解凍後恢復時間，TIL加K562或Raji細胞相對於TIL加K562細胞的倍數變化。

【0184】[**圖106**]：顆粒酶B之細胞介素分泌結果，其顯示在不同的解凍後恢復時間，TIL加K562或Raji細胞相對於單獨的TIL的倍數變化。

【0185】[**圖107**]：顆粒酶B之細胞介素分泌結果，其顯示在不同的解凍後恢復時間，TIL加K562或Raji細胞相對於TIL加K562細胞的倍數變化。

【0186】[**圖108**]：同種異體識別測定之實施例。

【0187】[**圖109**]：同種異體識別測定偵測方法之實施例。

【0188】[**圖110**]：解凍後條件1之結果(在解凍後靜置隔夜18至24小時)。所測試之效應物目標(E:T)比在35:1至

2.5:1範圍內，且所測試之共培養持續時間為4小時、8小時、16小時及36小時。

【0189】[**圖111**]：解凍後條件2之結果(解凍後不靜置)。所測試之效應物目標(E: T)比在10:1至1:10範圍內且共培養持續時間係隔夜的(16至24小時)。測試由卵巢癌腫瘤(OV8178)及黑色素瘤腫瘤(M1203)產生之TIL。

【0190】[**圖112**]：基於TIL-Raji細胞之效力分析之例示性實施例。

【0191】[**圖113**]：總活細胞(TVC，上圖)及存活性%(下圖)與靜置時間的關係。

【0192】[**圖114**]：在存在及不存在300 IU/mL IL-2的情況下使用兩種TIL細胞株的Raji與K562共培養實驗的結果，其顯示以pg/mL為單位之IFN-γ分泌。

【0193】[**圖115**]：在存在及不存在300 IU/mL IL-2的情況下使用兩種TIL細胞株的Raji與K562共培養實驗的結果，其顯示以倍數變化為單位之IFN-γ分泌。

【0194】[**圖116**]：在不同共培養條件下使用兩種TIL細胞株的Raji與K562共培養實驗的結果，其顯示以pg/mL為單位之IFN-γ分泌。

【0195】[**圖117**]：在不同共培養條件下使用兩種TIL細胞株的Raji與K562共培養實驗的結果，其顯示以倍數變化為單位之IFN-γ分泌。

【0196】[**圖118**]：在不同共培養條件下使用兩種TIL細胞株的Raji與K562共培養實驗的結果，用於評估在TIL

解凍後恢復期延長時的細胞介素分泌作用，顯示以pg/mL為單位之IFN-γ分泌。

【0197】[**圖119**]：在作為本發明之實施例的不同共培養條件下使用兩種TIL細胞株之Raji與K562共培養實驗的結果，用於評估在TIL解凍後恢復期延長時的細胞介素分泌作用，顯示以倍數變化為單位之IFN-γ分泌。

【0198】[**圖120**]：在共培養條件的兩個實施例中，在72小時靜置期對TIL細胞株M1179的親本活群體的殘餘細胞群體的流動式細胞測量分析。

【0199】[**圖121**]：Raji細胞株之增殖圖譜。

【0200】[**圖122**]：K562細胞株之增殖圖譜。

【0201】[**圖123**]：亦作為本發明之實施例的TIL:腫瘤細胞株共培養測定之實驗計劃圖。

【0202】[**圖124**]：作為本發明之實施例的所測試目標(Raji、Ramos、Thp1及U937)細胞株及陰性對照(K562)細胞株在三種TIL:目標細胞比率(3:1、1:1及1:3)下的IFN-γ分泌(pg/mL，絕對值)。

【0203】[**圖125**]：作為本發明之實施例的所測試目標(Raji、Ramos、Thp1及U937)細胞株及陰性對照(K562)細胞株(pg/mL，絕對值)在三種TIL:目標細胞比率(3:1、1:1及1:3)下的IFN-γ分泌([TIL + 目標]/[單獨的TIL]的倍數變化)。

【0204】[**圖126**]：作為本發明之實施例的所測試目標(Raji、Ramos、Thp1及U937)細胞株及陰性對照(K562)

細胞株在三種TIL:目標細胞比率(3:1、1:1及1:3)下的IFN-γ分泌([TIL + 目標]/[TIL+K562]的倍數變化)。

【0205】[**圖127**]：作為本發明之實施例的所測試目標(Raji、Ramos、Thp1及U937)細胞株及陰性對照(K562)細胞株在三種TIL:目標細胞比率(3:1、1:1及1:3)下的TNF-α分泌(pg/mL，絕對值)。

【0206】[**圖128**]：作為本發明之實施例的所測試目標(Raji、Ramos、Thp1及U937)細胞株及陰性對照(K562)細胞株在三種TIL:目標細胞比率(3:1、1:1及1:3)下的TNF-α分泌([TIL + 目標]/[單獨的TIL]的倍數變化)。

【0207】[**圖129**]：作為本發明之實施例的所測試目標(Raji、Ramos、Thp1及U937)細胞株及陰性對照(K562)細胞株在三種TIL:目標細胞比率(3:1、1:1及1:3)下的TNF-α分泌([TIL + 目標]/[TIL+K562]的倍數變化)。

【0208】[**圖130**]：亦作為本發明之實施例的TIL:腫瘤細胞株共培養測定之實驗計劃圖。

【0209】[**圖131**]：作為本發明之實施例的所測試目標及陰性對照(K562)細胞株之IFN-γ分泌(pg/mL)。

【0210】[**圖132**]：作為本發明之實施例的所測試目標及陰性對照(K562)細胞株之IFN-γ分泌([TIL+目標]/[單獨的TIL]的倍數變化)。

【0211】[**圖133**]：作為本發明之實施例的所測試目標及陰性對照(K562)細胞株之IFN-γ分泌([TIL+目標]/[TIL+K562]的倍數變化)。

【0212】[**圖134**]：TIL+目標細胞株(或組合)相對於單獨的TIL的變化倍數的平均值及範圍(左圖)以及TIL+目標細胞株(或組合)相對於TIL+K562的變化倍數的平均值及範圍(右圖)。

【0213】[**圖135**]：對於黑色素瘤TIL細胞株M1152、M1187、M1198及M1200，所測試目標細胞株及陰性對照細胞(包含組合目標細胞株)的TNF-α分泌(pg/mL)。

【0214】[**圖136**]：對於黑色素瘤TIL細胞株M1152、M1187、M1198及M1200，所測試目標細胞株及陰性對照細胞(包含組合目標細胞株)的TNF-α分泌([TIL + 腫瘤細胞株或組合]/[單獨的TIL]的倍數變化)。

【0215】[**圖137**]：對於黑色素瘤TIL細胞株M1152、M1187、M1198及M1200，所測試目標細胞株及陰性對照細胞(包含組合目標細胞株)的TNF-α分泌([TIL + 腫瘤細胞株或組合]/[TIL+K562]的倍數變化)。

【0216】[**圖138**]：對於黑色素瘤TIL細胞株M1152、M1187、M1198及M1200，所測試目標細胞株及陰性對照細胞(包含組合目標細胞株)的顆粒酶B分泌(pg/mL)。

【0217】[**圖139**]：對於黑色素瘤TIL細胞株M1152、M1187、M1198及M1200，所測試目標細胞株及陰性對照細胞(包含組合目標細胞株)的顆粒酶B分泌([TIL + 腫瘤細胞株或組合]/[單獨的TIL]的倍數變化)。

【0218】[**圖140**]：對於黑色素瘤TIL細胞株M1152、M1187、M1198及M1200，所測試目標細胞株及陰性對照

細胞(包含組合目標細胞株)的顆粒酶B分泌([TIL + 腫瘤細胞株或組合]/[TIL+K562]的倍數變化)。

【0219】[**圖141**]：亦作為本發明之實施例的TIL:腫瘤細胞株共培養測定之實驗計劃圖。

【0220】[**圖142**]：對於研究NSCLCTIL細胞株L4253、L4254、L4262及L4270，所測試目標細胞株及陰性對照細胞(包含組合目標細胞株)的IFN-γ分泌(pg/mL)黑色虛綫：單獨的3:1 TIL。灰色虛綫：單獨的1:1 TIL。

【0221】[**圖143**]：對於研究NSCLCTIL細胞株L4253、L4254、L4262及L4270，所測試靶NSCLC細胞株(包含組合目標細胞株)的IFN-γ分泌倍數(TIL+腫瘤細胞株/單獨的TIL)。

【0222】[**圖144**]：對於研究NSCLC TIL細胞株L4253、L4254、L4262及L4270，所測試靶NSCLC細胞株(包含組合目標細胞株)的IFN-γ分泌倍數(TIL+腫瘤細胞株/[TIL+K562])。

【0223】[**圖145**]：對於臨床NSCLC TIL細胞株1013-304、1036-307、1057-304、1004-303、1057-302及1088-303，所測試目標細胞株及陰性對照細胞株(包含組合目標細胞株)的IFN-γ分泌(pg/mL)。黑色虛綫：單獨的TIL。以1:1 TIL:目標比率獲得數據。

【0224】[**圖146**]：對於臨床NSCLC TIL細胞株1013-304、1036-307、1057-304、1004-303、1057-302及1088-303，所測試目標細胞株及陰性對照細胞株(包含組合目標

細胞株)的IFN-γ分泌倍數(TIL+腫瘤細胞株/單獨的TIL)。黑色虛綫：單獨的TIL。以1:1 TIL:目標比率獲得數據。

【0225】[**圖147**]：對於臨床NSCLC TIL細胞株1013-304、1036-307、1057-304、1004-303、1057-302及1088-303，所測試目標細胞株及陰性對照細胞株(包含組合目標細胞株)的IFN-γ分泌倍數(TIL+腫瘤細胞株/[TIL+K562])。黑色虛綫：單獨的TIL。以1:1 TIL:目標比率獲得數據。

【0226】[**圖148**]：對於臨床NSCLC TIL細胞株1013-304、1036-307、1057-304、1004-303、1057-302及1088-303，所測試目標細胞株及陰性對照細胞株的IFN-γ分泌的倍數變化(TIL+腫瘤細胞株/單獨的TIL)的概述。實心紅色符號代表臨床部分反應，而其餘符號代表臨床穩定的疾病反應。

【0227】[**圖149**]：對於臨床NSCLC TIL細胞株1013-304、1036-307、1057-304、1004-303、1057-302及1088-303，所測試目標細胞株及陰性對照細胞株的IFN-γ分泌的倍數變化(TIL+腫瘤細胞株/[TIL+K562])的概述。實心紅色符號代表臨床部分反應，而其餘符號代表臨床穩定的疾病反應。

【0228】[**圖150**]：對於19個研究及臨床黑色素瘤及NSCLC TIL細胞株，所測試目標細胞株及陰性對照細胞株之IFN-γ分泌倍數變化(TIL+腫瘤細胞株/單獨的TIL)的概述。方框代表平均值兩邊的一個標準差，其由一條線表示。

【0229】[**圖151**]：對於19個研究及臨床黑色素瘤及NSCLC TIL細胞株，所測試目標細胞株及陰性對照細胞株之IFN-γ分泌倍數變化(TIL+腫瘤細胞株/[TIL+K562])的概述。方框代表平均值兩邊的一個標準差，其由一條線表示。

【0230】[**圖152**]：在共培養24小時期間輻照對Raji及K562細胞之增殖(總活細胞，TVC)的影響。

【0231】[**圖153**]：兩個子宮頸癌TIL批次在與未經輻照及經輻照之Raji細胞共培養後分泌的IFN-γ的濃度。

【0232】[**圖154**]：針對三種經輻照(「Irr.」)及未經輻照(「Non-irr.」)之標記物藉由流動式細胞測量術測定的在K562及Raji細胞上之表面標記物表現。

【0233】[**圖155**]：對於三個黑色素瘤、兩個子宮頸及一個NSCLC TIL細胞株，相對於使用單獨的TIL的IFN-γ倍數變化(一式三份樣本)與測定共培養時間(小時)的關係。

【0234】[**圖156**]：亦作為本發明之實施例的TIL:腫瘤細胞株共培養測定之實驗計劃圖。

【0235】[**圖157**]：對於12種黑色素瘤TIL細胞株，針對1.0×10^6個TVC/孔，腫瘤細胞株加TIL相對於單獨TIL的IFN-γ平均倍數變化。方框代表平均值兩邊的一個標準差，其由一條線表示。

【0236】[**圖158**]：對於12種黑色素瘤TIL細胞株，針對2.0×10^6個TVC/孔，腫瘤細胞株加TIL相對於單獨TIL的

IFN-γ平均倍數變化。方框代表平均值兩邊的一個標準差，其由一條線表示。

【0237】[**圖159**]：對於12種黑色素瘤TIL細胞株，針對1.0×10^{6}個TVC/孔，腫瘤細胞株加TIL相對於K562陰性對照細胞的IFN-γ平均倍數變化。方框代表平均值兩邊的一個標準差，其由一條線表示。

【0238】[**圖160**]：對於12種黑色素瘤TIL細胞株，針對2.0×10^{6}個TVC/孔，腫瘤細胞株加TIL相對於K562陰性對照細胞的IFN-γ平均倍數變化。方框代表平均值兩邊的一個標準差，其由一條線表示。

【0239】[**圖161**]：亦作為本發明之實施例的用於兩種類型之Thp1(THP-1)單核細胞株(野生型(WT)及經基因修飾)的TIL：腫瘤細胞株共培養測定之實驗計劃圖。

【0240】[**圖162**]：針對WT及經基因修飾之Thp1目標細胞獲得之IFN-γ值(pg/mL)的比較。

【0241】[**圖163**]：針對WT及經基因修飾之Thp1目標細胞獲得的相對於單獨TIL的IFN-γ倍數變化值之比較。

【0242】[**圖164**]：圖示HLA阻斷之圖，HLA阻斷在某些實施例中係用於本發明測定之陰性對照。

【0243】[**圖165**]：HLA-I阻斷在不同抗體濃度下對Thp1(THP1)及U937單核球細胞株之作用，如藉由各種單核球細胞株之存活百分比所量測。

【0244】[**圖166**]：HLA-II阻斷在不同抗體濃度下對Thp1(THP1)及U937單核球細胞株之作用，如藉由每種單

核球細胞株之存活百分比所量測。

【0245】[**圖167**]：HLA-II阻斷在不同抗體濃度下對Raji細胞之作用，如藉由Raji細胞及經基因修飾之Raji細胞(B2M KO)之存活百分比所量測。

【0246】[**圖168**]：HLA-I(aMHC I)及HLA-II(aMHC II)抗體阻斷對TIL細胞株M1213之作用。

【0247】[**圖169**]：HLA-I(aMHC I)及HLA-II(aMHC II)抗體阻斷對TIL細胞株M1214之作用。

【0248】[**圖170**]：HLA-I(aMHC I)及HLA-II(aMHC II)抗體阻斷對TIL細胞株PD-LIM-20-08之作用。

【0249】[**圖171**]：HLA(MHC)I類及II類抗體劑量滴定之結果。使用20 μg/mL HLA-I阻斷抗體及10 μg/mL HLA-II阻斷抗體進行HLA阻斷陰性對照方法之實施例I。使用10 μg/mL HLA-I阻斷抗體及5 μg/mL HLA-II阻斷抗體進行HLA阻斷陰性對照方法之實施例II。

【0250】[**圖172**]：在添加抗HLA-I抗體(表示為αMHC I)及抗HLA-II抗體(表示為αMHC II)之後來自十個TIL細胞株的背景IFN-γ分泌的結果，各自一式三份地進行。實施例I及實施例II分別係指圖173及圖184中所示且本文別處所描述之實驗實施例，包含實施例I中使用20 μg/mL HLA-I阻斷抗體及10 μg/mL HLA-II阻斷抗體及實施例II中使用10 μg/mL HLAI阻斷抗體及5 μg/mL HLA-II阻斷抗體。

【0251】[**圖173**]：使用HLA阻斷抗體作為陰性對照代替陰性對照細胞株之TIL:腫瘤細胞株共培養測定的實驗計

劃圖，該等共培養測定在適用時在本文中統稱為「實施例I」且亦為本發明之實施例。

【0252】[**圖174**]：與目標細胞及作為對照的K562細胞共培養的黑色素瘤TIL細胞株M1152的HLA阻斷陰性對照實驗的結果，報導為pg/mL IFN-γ。

【0253】[**圖175**]：與目標細胞及作為對照的K562細胞共培養的黑色素瘤TIL細胞株M1187的HLA阻斷陰性對照實驗的結果，報導為pg/mL IFN-γ。

【0254】[**圖176**]：與目標細胞及作為對照的K562細胞共培養的黑色素瘤TIL細胞株M1164的HLA阻斷陰性對照實驗的結果，報導為pg/mL IFN-γ。

【0255】[**圖177**]：與目標細胞及作為對照的K562細胞共培養的黑色素瘤TIL細胞株M1213的HLA阻斷陰性對照實驗的結果，報導為pg/mL IFN-γ。

【0256】[**圖178**]：與目標細胞及作為對照的K562細胞共培養的黑色素瘤TIL細胞株M1214的HLA阻斷陰性對照實驗的結果，報導為pg/mL IFN-γ。

【0257】[**圖179**]：與目標細胞及作為對照的K562細胞共培養的黑色素瘤TIL細胞株M1152的HLA阻斷陰性對照實驗的結果，報導為相對於單獨TIL的IFN-γ釋放的倍數增強。

【0258】[**圖180**]：與目標細胞及作為對照的K562細胞共培養的黑色素瘤TIL細胞株M1187的HLA阻斷陰性對照實驗的結果，報導為相對於單獨TIL的IFN-γ釋放的倍數

增強。

【0259】[**圖181**]：與目標細胞及作為對照的K562細胞共培養的黑色素瘤TIL細胞株M1164的HLA阻斷陰性對照實驗的結果，報導為相對於單獨TIL的IFN-γ釋放的倍數增強。

【0260】[**圖182**]：與目標細胞及作為對照的K562細胞共培養的黑色素瘤TIL細胞株M1213的HLA阻斷陰性對照實驗的結果，報導為相對於單獨TIL的IFN-γ釋放的倍數增強。

【0261】[**圖183**]：與目標細胞及作為對照的K562細胞共培養的黑色素瘤TIL細胞株M1214的HLA阻斷陰性對照實驗的結果，報導為相對於單獨TIL的IFN-γ釋放的倍數增強。

【0262】[**圖184**]：使用HLA阻斷抗體作為陰性對照代替陰性對照細胞株之TIL:腫瘤細胞株共培養測定的實驗計劃圖，該等共培養測定在適用時在本文中統稱為「實施例II」且亦為本發明之實施例。

【0263】[**圖185**]：與目標細胞及作為對照的K562細胞共培養的黑色素瘤TIL細胞株M1161的HLA阻斷陰性對照實驗的結果，報導為pg/mL IFN-γ。藉由流動式細胞測量術測定M1161之$CD4^+$及$CD8^+$群體分別為1.4%及97.6%。

【0264】[**圖186**]：與目標細胞及作為對照的K562細胞共培養的黑色素瘤TIL細胞株M1163的HLA阻斷陰性對照實驗的結果，報導為pg/mL IFN-γ。藉由流動式細胞測

量術測定M1163之$CD4^+$及$CD8^+$群體分別為60.6%及34.9%。

【0265】[**圖187**]：與目標細胞及作為對照的K562細胞共培養的黑色素瘤TIL細胞株M1172的HLA阻斷陰性對照實驗的結果，報導為pg/mL IFN-γ。藉由流動式細胞測量術測定M1172之$CD4^+$及$CD8^+$群體分別為71.8%及22.2%。

【0266】[**圖188**]：與目標細胞及作為對照的K562細胞共培養的黑色素瘤TIL細胞株M1173的HLA阻斷陰性對照實驗的結果，報導為pg/mL IFN-γ。藉由流動式細胞測量術測定M1173之$CD4^+$及$CD8^+$群體分別為13.4%及81.6%

【0267】[**圖189**]：與目標細胞及作為對照的K562細胞共培養的黑色素瘤TIL細胞株M1174的HLA阻斷陰性對照實驗的結果，報導為pg/mL IFN-γ。藉由流動式細胞測量術測定M1174之$CD4^+$及$CD8^+$群體分別為92.3%及6.2%。

【0268】[**圖190**]：與目標細胞及作為對照的K562細胞共培養的黑色素瘤TIL細胞株M1161的HLA阻斷陰性對照實驗的結果，報導為相對於單獨TIL的IFN-γ釋放的倍數增強。藉由流動式細胞測量術測定M1161之$CD4^+$及$CD8^+$群體分別為1.4%及97.6%。

【0269】[**圖191**]：與目標細胞及作為對照的K562細胞共培養的黑色素瘤TIL細胞株M1163的HLA阻斷陰性對照實驗的結果，報導為相對於單獨TIL的IFN-γ釋放的倍數增強。藉由流動式細胞測量術測定M1163之$CD4^+$及$CD8^+$群

體分別為60.6%及34.9%。

【0270】[**圖192**]：與目標細胞及作為對照的K562細胞共培養的黑色素瘤TIL細胞株M1172的HLA阻斷陰性對照實驗的結果，報導為相對於單獨TIL的IFN-γ釋放的倍數增強。藉由流動式細胞測量術測定M1172之$CD4^+$及$CD8^+$群體分別為71.8%及22.2%。

【0271】[**圖193**]：與目標細胞及作為對照的K562細胞共培養的黑色素瘤TIL細胞株M1173的HLA阻斷陰性對照實驗的結果，報導為相對於單獨TIL的IFN-γ釋放的倍數增強。藉由流動式細胞測量術測定M1173之$CD4^+$及$CD8^+$群體分別為13.4%及81.6%

【0272】[**圖194**]：與目標細胞及作為對照的K562細胞共培養的黑色素瘤TIL細胞株M1174的HLA阻斷陰性對照實驗的結果，報導為相對於單獨TIL的IFN-γ釋放的倍數增強。藉由流動式細胞測量術測定M1174之$CD4^+$及$CD8^+$群體分別為92.3%及6.2%。

【0273】[**圖195**]：代替陰性對照細胞株或除了單獨TIL對照實驗之外使用HLA阻斷抗體作為陰性對照之TIL:腫瘤細胞株共培養測定之實驗計劃圖，該等共培養測定皆亦為本發明之實施例。使用十五種黑色素瘤細胞株。

【0274】[**圖196**]：與U937目標細胞共培養之15種黑色素瘤TIL細胞株的HLA阻斷陰性對照實驗的結果。

【0275】[**圖197**]：與Thp1(THP-1)目標細胞共培養之15種黑色素瘤TIL細胞株的HLA阻斷陰性對照實驗的結

果。

【0276】[**圖198**]：確定Thp1細胞之有效TIL濃度。星號指示在2×10^6 TVC下TIL:Thp1比率為3:1。

【0277】[**圖199**]：測定U937細胞之有效TIL濃度。星號指示在2×10^6 TVC下TIL:U937比率為3:1。

【0278】[**圖200**]：三個TIL批次(M1164、M1163及M1169)使用Thp1及U937目標細胞之劑量回應曲線。

【0279】[**圖201**]：三個額外TIL批次(M1218、M1174及M1150A)使用Thp1及U937目標細胞之劑量回應曲線。

【0280】[**圖202**]：對使用U937目標細胞的六個TIL批次的平行線分析。所有六個TIL均展現出明確的劑量反應。

【0281】[**圖203**]：對使用Thp1目標細胞的六個TIL批次的平行線分析。TIL M1173及TIL M1213展現出明顯的劑量反應。

【0282】[**圖204**]：在存在及不存在HLA阻斷抗體下，三個TIL批次(M1145、M1161及M1173)在1.5×10^6 TIL濃度下使用U937目標細胞的劑量反應曲線。所有三個TIL批次均展現出明顯的劑量反應，並且亦顯示出用抗體處理完全抑制信號(特異性抑制)。

【0283】[**圖205**]：在存在及不存在HLA阻斷抗體下，三個TIL批次(M1197、M1213及M1214)在1.5×10^6 TIL濃度下使用U937目標細胞的劑量反應曲線。所有三個TIL批次均展現出明顯的劑量反應，並且亦顯示出用抗體處理完全

抑制信號(特異性抑制)。

【0284】[**圖206**]：黑色素瘤TIL臨床樣本藉由流動式細胞測量術得到的LAG3表現的直方圖。

【0285】[**圖207**]：黑色素瘤TIL臨床樣本藉由流動式細胞測量術得到的KLRG1表現的直方圖。

【0286】[**圖208**]：使用U937同種異體反應性共培養測定對28個歷史臨床批次之相對效力直方圖的對數分佈評估。針對各TIL批次計算之相對效力量測值經對數變換，且所得分佈為正態分佈，表明基礎分佈為對數正態分佈。

【0287】[**圖209**]：在REP期間與U937細胞或同種異體PBMC一起培育之TIL的擴增。

【0288】[**圖210**]：在用U937細胞或同種異體PBMC進行REP之後，用抗CD3及抗CD28珠粒刺激之TIL中的IFN-γ分泌。

【0289】[**圖211**]：本發明之同種異體反應性共培養測定(表示為「allo-pMHC-TCR相互作用誘導的T細胞」)之實施例與用於T細胞效力測試之傳統的基於抗體珠粒之測定的比較。

【實施方式】

序列表的簡要說明

【0290】SEQ ID NO:1為莫羅單抗(muromonab)之重鏈之胺基酸序列。

【0291】SEQ ID NO:2為莫羅單抗之輕鏈之胺基酸序

列。

【0292】SEQ ID NO:3為重組人類IL-2蛋白之胺基酸序列。

【0293】SEQ ID NO:4為阿地介白素之胺基酸序列。

【0294】SEQ ID NO:5係一種IL-2形式。

【0295】SEQ ID NO:6係一種IL-2形式。

【0296】SEQ ID NO:7係一種IL-2形式。

【0297】SEQ ID NO:8為黏蛋白域多肽。

【0298】SEQ ID NO:9為重組人類IL-4蛋白之胺基酸序列。

【0299】SEQ ID NO:10為重組人類IL-7蛋白之胺基酸序列。

【0300】SEQ ID NO:11為重組人類IL-15蛋白之胺基酸序列。

【0301】SEQ ID NO:12為重組人類IL-21蛋白之胺基酸序列。

【0302】SEQ ID NO:13為IL-2序列。

【0303】SEQ ID NO:14為IL-2突變蛋白序列。

【0304】SEQ ID NO:15為IL-2突變蛋白序列。

【0305】SEQ ID NO:16為IgG.IL2R67A.H1之HCDR1_IL-2。

【0306】SEQ ID NO:17為IgG.IL2R67A.H1之HCDR2。

【0307】SEQ ID NO:18為IgG.IL2R67A.H1之HCDR3。

【0308】SEQ ID NO:19為IgG.IL2R67A.H1之

HCDR1_IL-2 kabat。

【0309】SEQ ID NO:20為IgG.IL2R67A.H1之HCDR2 kabat。

【0310】SEQ ID NO:21為IgG.IL2R67A.H1之HCDR3 kabat。

【0311】SEQ ID NO:22為IgG.IL2R67A.H1之HCDR1_IL-2 clothia。

【0312】SEQ ID NO:23為IgG.IL2R67A.H1之HCDR2 clothia。

【0313】SEQ ID NO:24為IgG.IL2R67A.H1之HCDR3 clothia。

【0314】SEQ ID NO:25為IgG.IL2R67A.H1之HCDR1_IL-2 IMGT。

【0315】SEQ ID NO:26為IgG.IL2R67A.H1之HCDR2 IMGT。

【0316】SEQ ID NO:27為IgG.IL2R67A.H1之HCDR3 IMGT。

【0317】SEQ ID NO:28為IgG.IL2R67A.H1之V_H鏈。

【0318】SEQ ID NO:29為IgG.IL2R67A.H1之重鏈。

【0319】SEQ ID NO:30為IgG.IL2R67A.H1之LCDR1 kabat。

【0320】SEQ ID NO:31為IgG.IL2R67A.H1之LCDR2 kabat。

【0321】SEQ ID NO:32為IgG.IL2R67A.H1之LCDR3

kabat。

【0322】SEQ ID NO:33為IgG.IL2R67A.H1之LCDR1 chothia。

【0323】SEQ ID NO:34為IgG.IL2R67A.H1之LCDR2 chothia。

【0324】SEQ ID NO:35為IgG.IL2R67A.H1之LCDR3 chothia。

【0325】SEQ ID NO:36為V_L鏈。

【0326】SEQ ID NO:37為輕鏈。

【0327】SEQ ID NO:38為輕鏈。

【0328】SEQ ID NO:39為輕鏈。

【0329】SEQ ID NO:40為人類4-1BB之胺基酸序列。

【0330】SEQ ID NO:41為鼠類4-1BB之胺基酸序列。

【0331】SEQ ID NO:42為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(utomilumab)(PF-05082566)之重鏈。

【0332】SEQ ID NO:43為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈。

【0333】SEQ ID NO:44為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈可變區(V_H)。

【0334】SEQ ID NO:45為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈可變區(V_L)。

【0335】SEQ ID NO:46為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈CDR1。

【0336】SEQ ID NO:47為4-1BB促效劑單株抗體烏圖

木單抗(PF-05082566)之重鏈CDR2。

【0337】SEQ ID NO:48為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈CDR3。

【0338】SEQ ID NO:49為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈CDR1。

【0339】SEQ ID NO:50為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈CDR2。

【0340】SEQ ID NO:51為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈CDR3。

【0341】SEQ ID NO:52為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(urelumab)(BMS-663513)之重鏈。

【0342】SEQ ID NO:53為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈。

【0343】SEQ ID NO:54為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈可變區(V_H)。

【0344】SEQ ID NO:55為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈可變區(V_L)。

【0345】SEQ ID NO:56為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈CDR1。

【0346】SEQ ID NO:57為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈CDR2。

【0347】SEQ ID NO:58為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈CDR3。

【0348】SEQ ID NO:59為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞

魯單抗(BMS-663513)之輕鏈CDR1。

【0349】SEQ ID NO:60為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈CDR2。

【0350】SEQ ID NO:61為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈CDR3。

【0351】SEQ ID NO:62為TNFRSF促效劑融合蛋白之Fc域。

【0352】SEQ ID NO:63為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0353】SEQ ID NO:64為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0354】SEQ ID NO:65為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0355】SEQ ID NO:66為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0356】SEQ ID NO:67為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0357】SEQ ID NO:68為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0358】SEQ ID NO:69為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0359】SEQ ID NO:70為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0360】SEQ ID NO:71為TNFRSF促效劑融合蛋白之

連接子。

【0361】SEQ ID NO:72為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0362】SEQ ID NO:73為TNFRSF促效劑融合蛋白之Fc域。

【0363】SEQ ID NO:74為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0364】SEQ ID NO:75為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0365】SEQ ID NO:76為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0366】SEQ ID NO:77為4-1BB配體(4-1BBL)胺基酸序列。

【0367】SEQ ID NO:78為4-1BBL多肽之可溶部分。

【0368】SEQ ID NO:79為4-1BB促效劑抗體4B4-1-1型式1之重鏈可變區(V_H)。

【0369】SEQ ID NO:80為4-1BB促效劑抗體4B4-1-1型式1之輕鏈可變區(V_L)。

【0370】SEQ ID NO:81為4-1BB促效劑抗體4B4-1-1型式2之重鏈可變區(V_H)。

【0371】SEQ ID NO:82為4-1BB促效劑抗體4B4-1-1型式2之輕鏈可變區(V_L)。

【0372】SEQ ID NO:83為4-1BB促效劑抗體H39E3-2之重鏈可變區(V_H)。

【0373】SEQ ID NO:84為4-1BB促效劑抗體H39E3-2之輕鏈可變區(V_L)。

【0374】SEQ ID NO:85為人類OX40之胺基酸序列。

【0375】SEQ ID NO:86為鼠類OX40之胺基酸序列。

【0376】SEQ ID NO:87為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(tavolixizumab)(MEDI-0562)之重鏈。

【0377】SEQ ID NO:88為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之輕鏈。

【0378】SEQ ID NO:89為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之重鏈可變區(V_H)。

【0379】SEQ ID NO:90為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之輕鏈可變區(V_L)。

【0380】SEQ ID NO:91為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之重鏈CDR1。

【0381】SEQ ID NO:92為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之重鏈CDR2。

【0382】SEQ ID NO:93為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之重鏈CDR3。

【0383】SEQ ID NO:94為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之輕鏈CDR1。

【0384】SEQ ID NO:95為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之輕鏈CDR2。

【0385】SEQ ID NO:96為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之輕鏈CDR3。

【0386】SEQ ID NO:97為OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈。

【0387】SEQ ID NO:98為OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈。

【0388】SEQ ID NO:99為OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈可變區(V_H)。

【0389】SEQ ID NO:100為OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈可變區(V_L)。

【0390】SEQ ID NO:101為OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈CDR1。

【0391】SEQ ID NO:102為OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈CDR2。

【0392】SEQ ID NO:103為OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈CDR3。

【0393】SEQ ID NO:104為OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈CDR1。

【0394】SEQ ID NO:105為OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈CDR2。

【0395】SEQ ID NO:106為OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈CDR3。

【0396】SEQ ID NO:107為OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈。

【0397】SEQ ID NO:108為OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈。

【0398】SEQ ID NO:109為OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈可變區(V_H)。

【0399】SEQ ID NO:110為OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈可變區(V_L)。

【0400】SEQ ID NO:111為OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈CDR1。

【0401】SEQ ID NO:112為OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈CDR2。

【0402】SEQ ID NO:113為OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈CDR3。

【0403】SEQ ID NO:114為OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈CDR1。

【0404】SEQ ID NO:115為OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈CDR2。

【0405】SEQ ID NO:116為OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈CDR3。

【0406】SEQ ID NO:117為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之重鏈可變區(V_H)。

【0407】SEQ ID NO:118為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之輕鏈可變區(V_L)。

【0408】SEQ ID NO:119為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之重鏈CDR1。

【0409】SEQ ID NO:120為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之重鏈CDR2。

【0410】SEQ ID NO:121為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之重鏈CDR3。

【0411】SEQ ID NO:122為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之輕鏈CDR1。

【0412】SEQ ID NO:123為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之輕鏈CDR2。

【0413】SEQ ID NO:124為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之輕鏈CDR3。

【0414】SEQ ID NO:125為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之重鏈可變區(V_H)。

【0415】SEQ ID NO:126為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之輕鏈可變區(V_L)。

【0416】SEQ ID NO:127為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之重鏈CDR1。

【0417】SEQ ID NO:128為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之重鏈CDR2。

【0418】SEQ ID NO:129為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之重鏈CDR3。

【0419】SEQ ID NO:130為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之輕鏈CDR1。

【0420】SEQ ID NO:131為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之輕鏈CDR2。

【0421】SEQ ID NO:132為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之輕鏈CDR3。

【0422】SEQ ID NO:133為OX40配體(OX40L)胺基酸序列。

【0423】SEQ ID NO:134為OX40L多肽之可溶部分。

【0424】SEQ ID NO:135為OX40L多肽之替代性可溶部分。

【0425】SEQ ID NO:136為OX40促效劑單株抗體008之重鏈可變區(V_H)。

【0426】SEQ ID NO:137為OX40促效劑單株抗體008之輕鏈可變區(V_L)。

【0427】SEQ ID NO:138為OX40促效劑單株抗體011之重鏈可變區(V_H)。

【0428】SEQ ID NO:139為OX40促效劑單株抗體011之輕鏈可變區(V_L)。

【0429】SEQ ID NO:140為OX40促效劑單株抗體021之重鏈可變區(V_H)。

【0430】SEQ ID NO:141為OX40促效劑單株抗體021之輕鏈可變區(V_L)。

【0431】SEQ ID NO:142為OX40促效劑單株抗體023之重鏈可變區(V_H)。

【0432】SEQ ID NO:143為OX40促效劑單株抗體023之輕鏈可變區(V_L)。

【0433】SEQ ID NO:144為OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0434】SEQ ID NO:145為OX40促效劑單株抗體之輕

鏈可變區(V_L)。

【0435】SEQ ID NO:146為OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0436】SEQ ID NO:147為OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0437】SEQ ID NO:148為人源化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0438】SEQ ID NO:149為人源化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0439】SEQ ID NO:150為人源化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0440】SEQ ID NO:151為人源化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0441】SEQ ID NO:152為人源化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0442】SEQ ID NO:153為人源化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0443】SEQ ID NO:154為人源化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0444】SEQ ID NO:155為人源化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0445】SEQ ID NO:156為OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0446】SEQ ID NO:157為OX40促效劑單株抗體之輕

鏈可變區(V_L)。

【0447】SEQ ID NO:158為PD-1抑制劑納武單抗(nivolumab)之重鏈胺基酸序列。

【0448】SEQ ID NO:159為PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0449】SEQ ID NO:160為PD-1抑制劑納武單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0450】SEQ ID NO:161為PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0451】SEQ ID NO:162為PD-1抑制劑納武單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0452】SEQ ID NO:163為PD-1抑制劑納武單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0453】SEQ ID NO:164為PD-1抑制劑納武單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0454】SEQ ID NO:165為PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0455】SEQ ID NO:166為PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0456】SEQ ID NO:167為PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0457】SEQ ID NO:168為PD-1抑制劑帕博利珠單抗(pembrolizumab)之重鏈胺基酸序列。

【0458】SEQ ID NO:169為PD-1抑制劑帕博利珠單抗

之輕鏈胺基酸序列。

【0459】SEQ ID NO:170為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0460】SEQ ID NO:171為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0461】SEQ ID NO:172為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0462】SEQ ID NO:173為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0463】SEQ ID NO:174為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0464】SEQ ID NO:175為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0465】SEQ ID NO:176為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0466】SEQ ID NO:177為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0467】SEQ ID NO:178為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗(durvalumab)之重鏈胺基酸序列。

【0468】SEQ ID NO:179為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0469】SEQ ID NO:180為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0470】SEQ ID NO:181為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之

輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0471】SEQ ID NO:182為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0472】SEQ ID NO:183為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0473】SEQ ID NO:184為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0474】SEQ ID NO:185為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0475】SEQ ID NO:186為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0476】SEQ ID NO:187為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0477】SEQ ID NO:188為PD-L1抑制劑阿維魯單抗(avelumab)之重鏈胺基酸序列。

【0478】SEQ ID NO:189為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0479】SEQ ID NO:190為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0480】SEQ ID NO:191為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0481】SEQ ID NO:192為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0482】SEQ ID NO:193為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之

重鏈CDR2胺基酸序列。

【0483】SEQ ID NO:194為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0484】SEQ ID NO:195為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0485】SEQ ID NO:196為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0486】SEQ ID NO:197為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0487】SEQ ID NO:198為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗(atezolizumab)之重鏈胺基酸序列。

【0488】SEQ ID NO:199為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0489】SEQ ID NO:200為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0490】SEQ ID NO:201為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0491】SEQ ID NO:202為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0492】SEQ ID NO:203為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0493】SEQ ID NO:204為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0494】SEQ ID NO:205為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗

之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0495】SEQ ID NO:206為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0496】SEQ ID NO:207為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0497】SEQ ID NO:208為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗(ipilimumab)之重鏈胺基酸序列。

【0498】SEQ ID NO:209為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0499】SEQ ID NO:210為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0500】SEQ ID NO:211為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0501】SEQ ID NO:212為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0502】SEQ ID NO:213為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0503】SEQ ID NO:214為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0504】SEQ ID NO:215為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0505】SEQ ID NO:216為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0506】SEQ ID NO:217為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗

之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0507】SEQ ID NO:218為CTLA-4抑制劑曲美單抗(tremelimumab)之重鏈胺基酸序列。

【0508】SEQ ID NO:219為CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0509】SEQ ID NO:220為CTLA-4抑制劑曲美單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0510】SEQ ID NO:221為CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0511】SEQ ID NO:222為CTLA-4抑制劑曲美單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0512】SEQ ID NO:223為CTLA-4抑制劑曲美單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0513】SEQ ID NO:224為CTLA-4抑制劑曲美單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0514】SEQ ID NO:225為CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0515】SEQ ID NO:226為CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0516】SEQ ID NO:227為CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0517】SEQ ID NO:228為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗(zalifrelimab)之重鏈胺基酸序列。

【0518】SEQ ID NO:229為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗

之輕鏈胺基酸序列。

【0519】SEQ ID NO:230為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0520】SEQ ID NO:231為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0521】SEQ ID NO:232為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0522】SEQ ID NO:233為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0523】SEQ ID NO:234為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0524】SEQ ID NO:235為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0525】SEQ ID NO:236為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0526】SEQ ID NO:237為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

I. 介紹

【0527】利用藉由快速擴增方案(REP)離體培養之TIL的授受性細胞療法已在患有諸如黑色素瘤之癌症的患者的宿主免疫抑制之後產生成功的授受性細胞療法。目前的輸注接受參數依賴於TIL組成的讀數(例如，CD28、CD8或CD4陽性)、各種細胞介素及其他標記物在基於珠粒之效力

測定(例如IFN-γ)中受刺激時的表現，以及REP產物之擴增及存活力的數值倍數。本文描述與本領域中已知之測定相比能夠提供優良表現、對T細胞產物效力之更好控制及提高的生物相關性以及其他改良的效力測定。

II. 定義

【0528】除非另有定義，否則本文所用的所有技術及科學術語具有與本發明所屬領域的技術人員通常所理解的含義相同的含義。本文所提及之所有專利及公開案均以全文引用的方式併入本文中。

【0529】如本文所用，術語「共同投予(co-administration/co-administering)」、「與…組合投予(administered in combination with/administering in combination with)」、「同時(simultaneous/ concurrent)」涵蓋向個體或患者投予兩種或更多種活性醫藥成分(在本發明之一較佳實施例中，例如複數個TIL)，以使得活性醫藥成分及/或其代謝物兩者同時存在於個體或患者中。共同投予包含以分開的組合物同時投給予、以分開的組合物在不同時間投予或以其中存在兩種或更多種活性醫藥成分之組合物之形式投予。以分開的組合物同時投予及以其中存在兩種試劑之組合物之形式投予為較佳的。

【0530】術語「活體內」係指發生於個體體內或患者體內的事件。

【0531】術語「活體外」係指發生於個體體外或患者

體外的事件。活體外測定涵蓋採用活細胞或死細胞的基於細胞之測定，且亦可涵蓋不採用完整細胞的不含細胞之測定。

【0532】術語「離體」係指涉及對已自個體體內或患者體內移除之細胞、組織及/或器官進行治療或進行手術的事件。適當地，細胞、組織及/或器官可利用手術或治療方法返回至個體體內或患者體內。

【0533】術語「快速擴增」意謂抗原特異性TIL之數目在一週時間內增加至少約3倍(或4倍、5倍、6倍、7倍、8倍或9倍)，更佳地在一週時間內增加至少約10倍(或20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍或90倍)，或最佳在一週時間內增加至少約100倍。本文描述多種快速擴增方案。

【0534】本文中「腫瘤浸潤性淋巴球」或「TIL」意謂最初作為已離開個體血流且遷移至腫瘤中的白血球獲得之細胞群體。TIL包含(但不限於)$CD8^+$細胞毒性T細胞(淋巴球)、Th1及Th17 $CD4^+$ T細胞、自然殺手細胞、樹突狀細胞及M1巨噬細胞。TIL包含初代TIL及繼代TIL兩者。「初代TIL」係如本文所概述之獲自患者組織樣本的TIL(有時稱為「新鮮獲得」或「新鮮分離」)，且「繼代TIL」係任何如本文所論述之經擴增或增殖的TIL細胞群體，包含(但不限於)主體TIL(bulk TIL)及經擴增TIL(「REP TIL」或「REP後TIL」)。TIL細胞群體可包含經基因修飾之TIL。

【0535】本文中之「細胞群體」(包含TIL)意指許多具有共同特質之細胞。一般而言，群體數目通常在1×10^{6}至1×10^{10}之範圍內，其中不同的TIL群體包括不同數目。例如，初代TIL在IL-2的存在下的初始生長產生大約1×10^{8}個細胞之主體TIL群體。一般進行REP擴增以提供1.5×10^{9}至1.5×10^{10}個細胞群體用於輸注。

【0536】本文中「冷凍保存之TIL」意謂在約-150℃至-60℃之範圍內處理且儲存TIL，無論係初代的、主體的或經擴增的(REP TIL)。用於冷凍保存之通用方法亦描述於本文別處，包含在實例中描述。為了清楚起見，「冷凍保存之TIL」可與可用作初代TIL來源之冷凍組織樣本區分。

【0537】本文中「解凍之冷凍保存之TIL」意謂先前經冷凍保存且隨後處理以恢復至室溫或更高溫度(包含但不限於細胞培養溫度或可向患者投予TIL之溫度)的TIL群體。

【0538】TIL通常可經生物化學(使用細胞表面標記物)或功能性(根據其浸潤腫瘤及實現治療之能力)定義。TIL通常可藉由表現以下生物標記物中之一或多者分類：CD4、CD8、TCR αβ、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1及CD25。另外及替代地，TIL可藉由重新引入患者中後浸潤實體腫瘤之能力來進行功能性定義。

【0539】術語「冷凍保存培養基(cryopreservation

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

【0540】術語「中央記憶T細胞(central memory T cell/central memory T-cell)」或「T_{CM}」係指在人類中為CD45R0+且組成性表現CCR7(CCR7hi或$CCR7^+$)及CD62L(CD62hi)之T細胞子集。中央記憶T細胞之表面表型亦包含TCR、CD3、CD127(IL-7R)及IL-15R。中央記憶T細胞之轉錄因子包含BCL-6、BCL-6B、MBD2及BMI1。中央記憶T細胞在TCR引發之後主要分泌IL-2及CD40L作為效應分子。中央記憶T細胞主要存在於血液的CD4隔室中，且在人類中按比例富集於淋巴結及扁桃體中。自我更新的幹記憶T細胞或「T_{SCM}」係可以分化為T_{CM}或T_{EM}細胞的子集，並在Gattinoni等人，《自然醫學(*Nature Med*)》**2011,** *17,* 1290-97中進行了描述。

【0541】術語「效應記憶T細胞(effector memory T cell/ effector memory T-cell)」或「T_{EM}」係指人類或哺乳動物T細胞之子集，如中央記憶T細胞，其係CD45R0+，但已經失去對CCR7的組成性表現(CCR7lo或CCR^-)並且對於

CD62L表現而言為異質的或低的(CD62Llo)。中央記憶T細胞之表面表型亦包含TCR、CD3、CD127(IL-7R)及IL-15R。中央記憶T細胞之轉錄因子包含BLIMP1。效應記憶T細胞在抗原刺激之後快速分泌高含量發炎性細胞介素，包含干擾素-γ、IL4-及IL-5。效應記憶T細胞主要存在於血液的CD8隔室中，且在人類中按比例富集於肺、肝臟及腸道中。$CD8^+$效應記憶T細胞攜帶大量的穿孔素。再表現CD45RA標記物之終末分化之TEM細胞稱為「TEMRA」或「TEMRA」小鼠。

【0542】術語「密閉系統」係指對外部環境密閉之系統。適用於細胞培養方法之任何密閉系統均可用於本發明之方法。密閉系統包含例如(但不限於)密閉G容器。一旦將腫瘤區段添加至密閉系統中，該系統不對外部環境開放，直至TIL準備好向患者投予為止。

【0543】如本文所用，術語「碎斷(fragmenting)」、「碎片(fragment)」及「碎斷的(fragmented)」描述將腫瘤破壞之過程，包含機械碎斷方法，諸如壓碎、切片、分割及粉碎腫瘤組織，以及任何其他用於破壞腫瘤組織之物理結構的方法。

【0544】術語「末梢血液單核細胞」及「PBMC」係指具有圓形細胞核之末梢血液細胞，包含淋巴球(T細胞、B細胞、NK細胞)及單核球。當用作抗原呈現細胞(PBMC為一種類型之抗原呈現細胞)時，末梢血液單核細胞較佳地係經輻照之同種異體末梢血液單核細胞。

【0545】術語「末梢血液淋巴球」及「PBL」係指自末梢血液擴增的T細胞。在一些實施例中，PBL係與來自供體之全血或血球分離術產物分離。在一些實施例中，PBL係藉由正向或負向選擇T細胞表型(諸如CD3+ CD45+之T細胞表型)而與來自供體之全血或血球分離術產物分離。

【0546】術語「主要組織相容性複合物」或「MHC」係指脊椎動物DNA上之一個大基因座，該大基因座含有編碼細胞表面蛋白之一組緊密連接之多態性基因(稱為MHC分子)，其對於適應性免疫系統之功能至關重要。MHC基因具有高度多態性，並產生兩種主要產物：MHC I類及MHC II類分子。MHC I類蛋白呈遞源自細胞質的內源性抗原。MHC II類蛋白呈遞自細胞外來源於諸如細菌之異物的外源性抗原。

【0547】術語「MHC顯性識別」係指T細胞之TCR複合物與目標細胞之HLA-肽複合物之同種異體相互作用。MHC顯性識別描述於Felix及Allen，《自然免疫學評論》，**2007,** *7*(12), 942-53；Matzinger及Bevan，《細胞免疫學*(Cell Immunol.)*》，**1977,** *29*(1), 1-5，及Janeway,《主要組織相容性複合物及其在免疫生物學方面的功能：健康與疾病免疫系統(The Major Histocompatibility Complex and Its Functions in Immunobiology: The Immune System in Health and Disease)》，第5版，《加蘭科學(Garland Science)》，2001中，該等文獻中之每一者的揭示內容係以引用之方式併入本文中。在MHC顯性識別中，

同種異體MHC分子可以更好地適應T細胞受體，從而提供較少依賴於與MHC分子結合的肽的緊密結合。

【0548】術語「人類白血球抗原」或「HLA」或「HLA複合物」係指在人類細胞表面上表現之MHC分子。人類白血球抗原由人類中之MHC基因複合物編碼。

【0549】術語「目標細胞」及「目標細胞株」係指作為T細胞(諸如TIL、MIL或PBL)之測定目標的細胞。在一實施例中，目標細胞表現MHC I類及/或II類。在一實施例中，目標細胞包含Raji細胞及其衍生物、變體、修飾及後代，以及表現MHC I類及/或II類之其他細胞。在一實施例中，目標細胞包含Thp1細胞及其衍生物、變體、修飾及後代。在一實施例中，目標細胞包含Ramos細胞及其衍生物、變體、修飾及後代。在一實施例中，目標細胞包含U937細胞及其衍生物、變體、修飾及後代。在一實施例中，目標細胞包含Daudi細胞及其衍生物、變體、修飾及後代。在一實施例中，目標細胞經輻照。在一實施例中，目標細胞未經輻照。在一實施例中，目標細胞株為Raji細胞株、Thp1細胞株、Ramos細胞株、U937細胞株及Daudi細胞株中之任兩者之組合。在一實施例中，目標細胞株為Raji細胞株、Thp1細胞株、Ramos細胞株、U937細胞株及Daudi細胞株中之任三者之組合。在一實施例中，目標細胞株為Raji細胞株、Thp1細胞株、Ramos細胞株、U937細胞株及Daudi細胞株中之任四者之組合。在一實施例中，目標細胞株為Raji細胞株、Thp1細胞株、Ramos細胞株、

U937細胞株及Daudi細胞株之組合。在一實施例中，目標細胞株為混合腫瘤目標細胞株。在一實施例中，目標細胞株為同種異體反應性目標細胞株。在一實施例中，目標細胞株為混合腫瘤同種異體反應性目標細胞株。在一實施例中，目標細胞株為包括以下細胞株中之至少兩者之組合的混合腫瘤同種異體反應性目標細胞株：Raji細胞株、Ramos細胞株、Thp1細胞株、U937細胞株及Daudi細胞株。

【0550】術語「Raji細胞」或「Raji細胞株」意謂具有B細胞特徵之伯基特氏淋巴瘤細胞株(其獲自多個供應商，包含美國菌種保藏中心(American Type Culture Collection)(Manassas, VA, USA))及其衍生物、變體、修飾及後代。Raji細胞描述於Theofilopoulos等人《臨床研究雜誌(*J.Clin.Invest.*)》**1976,** *57,* 169-182；Sobel及Bokisch，《美國實驗生物學聯合會會報(*Fed.Proc.*)》 **1975,** *34,* 965；及Theofilopoulos等人，《實驗醫學雜誌(*J. Exp. Med.*)》**1974,** *140,* 1230-1244；該等文獻中之每一者的揭示內容以引用之方式併入本文中。Raj細胞缺乏膜結合免疫球蛋白，但具有IgG Fc、C3b、C3d及Clq受體。在一實施例中，Raji細胞或其衍生物、變體、修飾或後代為目標細胞。在一實施例中，Raji細胞經基因修飾以表現螢光、磷光、化學發光或生物發光標記，使得當其細胞膜被破壞時，螢光、磷光、化學發光或生物發光標記被釋放至培養基中以便有可能用於偵測中。舉例而言，美國專利第

10,415,015號中描述的用於生物發光偵測之基因修飾方法可用於修飾Raji細胞，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0551】術語「Thp1細胞」或「Thp1細胞株」意謂人類急性單核球性白血病細胞株(亦稱為「THP-1細胞」或「THP-1細胞株」且可購自多個供應商，包含美國菌種保藏中心(Manassas, VA, USA))及其衍生物、變體、修飾及後代。Thp1細胞株描述於Tsuya等人，《國際癌症期刊(*Int. J. Cancer*)》**1980,** *26,* 171-176以及Bosshart及Heinzelmann，《轉化醫學年鑒(*Ann.Transl. Med.*)》**2016,** *4(21),* 438中，該等文獻中之每一者的揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代為目標細胞。在一實施例中，Thp1細胞經基因修飾以表現螢光、磷光、化學發光或生物發光標記，使得當其細胞膜被破壞時，螢光、磷光、化學發光或生物發光標記被釋放至培養基中以便有可能用於偵測中。舉例而言，美國專利第10,415,015號中描述的用於生物發光偵測之基因修飾方法可用於修飾Thp1細胞，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0552】術語「Ramos細胞」或「Ramos細胞株」意謂人類伯基特氏淋巴瘤細胞株(其獲自多個供應商，包含美國菌種保藏中心(Manassas, VA, USA))及其衍生物、變體、修飾及後代。Ramos細胞株描述於Benjamin等人《免疫學雜誌(*J. Immunol.*)》**1982,** 129, 1336-1342，其揭示內

容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，Ramos細胞或其衍生物、變體、修飾或後代為目標細胞。在一實施例中，Ramos細胞經基因修飾以表現螢光、磷光、化學發光或生物發光標記，使得當其細胞膜被破壞時，螢光、磷光、化學發光或生物發光標記被釋放至培養基中以便有可能用於偵測中。舉例而言，美國專利第10,415,015號中描述的用於生物發光偵測之基因修飾方法可用於修飾Ramos細胞，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0553】術語「U937細胞」或「U937細胞株」意謂人類組織細胞淋巴瘤細胞株(其獲自多個供應商，包含美國菌種保藏中心(Manassas, VA, USA))及其衍生物、變體、修飾及後代。U937細胞株描述於Kraus等人,《臨床微生物學雜誌(*J.Clin.Microbiol.*)》**2007,** *45,* 3777-3780中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，U937細胞或其衍生物、變體、修飾或後代為目標細胞。在一實施例中，U937細胞經基因修飾以表現螢光、磷光、化學發光或生物發光標記，使得當其細胞膜被破壞時，螢光、磷光、化學發光或生物發光標記被釋放至培養基中以便有可能用於偵測中。舉例而言，美國專利第10,415,015號中描述的用於生物發光偵測之基因修飾方法可用於修飾U937細胞，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0554】術語「Daudi細胞」或「Ramos細胞株」意謂人類伯基特氏淋巴瘤細胞株(其獲自多個供應商，包含美國菌種保藏中心(Manassas, VA, USA))及其衍生物、變

體、修飾及後代。Daudi細胞株描述於Gao等人，《病毒學雜誌(*J. Virol.*)》**1997,** *71,* 84-94中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，Daudi細胞或其衍生物、變體、修飾或後代為目標細胞。在一實施例中，Daudi細胞經基因修飾以表現螢光、磷光、化學發光或生物發光標記，使得當其細胞膜被破壞時，螢光、磷光、化學發光或生物發光標記被釋放至培養基中以便有可能用於偵測中。舉例而言，美國專利第10,415,015號中描述的用於生物發光偵測之基因修飾方法可用於修飾Daudi細胞，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0555】術語「陰性對照」、「陰性對照細胞」及「陰性對照細胞株」係指用作T細胞測定(包含TIL、MIL或PBL測定)之陰性對照的細胞。在一實施例中，目標細胞缺乏MHC I類及II類表現。在一實施例中，目標細胞缺乏MHC I類表現。在一實施例中，目標細胞缺乏MHC或HLA I類表現。在一實施例中，目標細胞以最低量表現MHC或HLA I類及/或II類。

【0556】術語「K562細胞」或「K562細胞株」係指具有淋巴母細胞形態之人類高加索人慢性髓性白血病細胞株(其可獲自多個供應商，包含美國菌種保藏中心(Manassas, VA, USA))及其衍生物、變體、修飾及後代。K562細胞描述於Lozzio及Lozzio，《血液(Blood)》，**1975,** *45,* 321-34中，在一實施例中，陰性對照細胞包含K562細胞及其衍生物、變體、修飾及後代，以及不表現

MHC或HLA I類或II類之其他細胞。

【0557】術語「抗CD3抗體」係指針對成熟T細胞之T細胞抗原受體中之CD3受體的抗體或其變體，例如單株抗體，且包含人類、人源化、嵌合或鼠類抗體。抗CD3抗體包含OKT-3，亦稱為莫羅單抗。抗CD3抗體亦包含UHCT1選殖株，亦稱為T3及CD3ε。其他抗CD3抗體包含例如奧昔珠單抗(otelixizumab)、替利珠單抗(teplizuma)及維西珠單抗(visilizumab)。

【0558】術語「OKT-3」(在本文中亦被稱作「OKT3」)係指針對成熟T細胞之T細胞抗原受體中之CD3受體的單株抗體或其生物類似物或變體，包含人類、人源化、嵌合或鼠類抗體，且包含市售形式，諸如OKT-3(30 ng/mL，MACS GMP CD3純，美國加利福尼亞州聖地亞哥美天旎生物技術公司(Miltenyi Biotech,Inc , San Diego, CA, USA))及莫羅單抗或其變體、保守胺基酸取代、糖化形式或生物類似物。莫羅單抗之重鏈及輕鏈之胺基酸序列在表1中給出(SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:2)。能夠產生OKT-3之融合瘤寄存於美國菌種保藏中心(美國菌種保藏中心)且所指派之ATCC寄存號為CRL 8001。能夠產生OKT-3之融合瘤亦寄存於歐洲認證細胞培養物保藏中心(European Collection of Authenticated Cell Cultures；ECACC)且所指派之目錄號為86022706。

表1.莫羅單抗之胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:1 莫羅單抗重鏈	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID NO:2 莫羅單抗輕鏈	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

【0559】術語「IL-2」(在本文中亦稱為「IL2」)係指稱為介白素-2之T細胞生長因子，且包含所有形式之IL-2，包含人類及哺乳動物形式、保守胺基酸取代、糖化形式、生物類似物及其變體。IL-2係描述於例如Nelson的《免疫學雜誌(*J. Immunol.*)》**2004,** *172,* 3983-88及Malek,《免疫學年度評論(*Annu. Rev. Immunol.*)》**2008,** *26,* 453-79，其揭示內容以引用之方式併入本文中。適用於本發明之重組人類IL-2之胺基酸序列於表2中給出(SEQ ID NO:3)。舉例而言，術語IL-2涵蓋人類重組形式之IL-2，諸如阿地介白素(PROLEUKIN，可購自多個供應商，每單次使用小瓶含22百萬IU)以及由美國新罕布什爾州次茅斯的CellGenix, Inc.或美國新澤西州東不倫瑞克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目錄號CYT-209-b)供應的重組IL-2形式及來自其他供應商的其他商業等效物。阿地介白素(去丙胺醯基-1，絲胺酸-125人類IL-2)為分子量大約15 kDa之非糖基化人類重組形式的IL-2。適用於本發明之阿地介白素之胺基酸序列於表2中給出(SEQ ID NO:4)。術語IL-2亦涵蓋如本文所描述之IL-2之聚乙二醇化形式，包含可購自美

國加利福尼亞州南舊金山(South San Francisco, CA, USA)的Nektar Therapeutics之聚乙二醇化IL2前藥NKTR-214。適用於本發明之NKTR-214及聚乙二醇化IL-2描述於美國專利申請公開案第US 2014/0328791 A1號及國際專利申請公開案第WO 2012/065086 A1號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。適用於本發明之替代形式的結合IL-2描述於美國專利第4,766,106號、第5,206,344號、第5,089,261號及第4902,502號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。適用於本發明之IL-2調配物描述於美國專利第6,706,289號中，其揭示內容以引用的方式併入本文中。

【0560】在一些實施例中，適合用於本發明之IL-2形式為THOR-707。適用於本發明之IL-2之其他替代形式描述於美國專利申請公開案第US 2020/0181220 A1號及美國專利申請公開案第US 2020/0330601 A1號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，適合用於本發明之IL-2形式為ALKS-4230。適用於本發明之IL-2之其他替代形式亦描述於美國專利申請公開案第US 2021/0038684 A1號及美國專利第10,183,979號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為介白素2(IL-2)結合物，其包括：經分離及純化之IL-2多肽；及在選自以下之胺基酸位置結合至經分離及純化之IL-2多肽的結合部分：K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72及Y107，其中胺基酸殘基之編號對應於美

國專利申請公開案第2020/018120號中之SEQ ID NO: 1。在一些實施例中，胺基酸位置選自T37、R38、T41、F42、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72及Y107。在一些實施例中，胺基酸位置選自T37、R38、T41、F42、F44、Y45、E61、E62、E68、P65、V69、L72及Y107。在一些實施例中，胺基酸位置選自T37、T41、F42、F44、Y45、P65、V69、L72及Y107。在一些實施例中，胺基酸位置選自R38及K64。在一些實施例中，胺基酸位置選自E61、E62及E68。在一些實施例中，胺基酸位置在E62。在一些實施例中，選自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72及Y107之胺基酸殘基進一步突變成離胺酸、半胱胺酸或組胺酸。在一些實施例中，胺基酸殘基突變成半胱胺酸。在一些實施例中，胺基酸殘基突變成離胺酸。在一些實施例中，選自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72及Y107之胺基酸殘基進一步突變成非天然胺基酸。在一些實施例中，非天然胺基酸包括N6-疊氮基乙氧基-L-離胺酸(AzK)、N6-炔丙基乙氧基-L-離胺酸(PraK)、BCN-L-離胺酸、降冰片烯離胺酸、TCO-離胺酸、甲基四嗪離胺酸、烯丙氧基羰基離胺酸、2-胺基-8-側氧基壬酸、2-胺基-8-側氧基辛酸、對乙醯基-L-苯丙胺酸、對疊氮基甲基-L-苯丙胺酸(pAMF)、對碘-L-苯丙胺酸、間乙醯基苯丙胺酸、2-胺基-8-側氧基壬酸、對炔丙基氧基苯丙胺酸、對炔丙基

-苯丙胺酸、3-甲基-苯丙胺酸、L-多巴(L-Dopa)、氟化苯丙胺酸、異丙基-L-苯丙胺酸、對疊氮基-L-苯丙胺酸、對醯基-L-苯丙胺酸、對苯甲醯基-L-苯丙胺酸、對溴苯基丙胺酸、對胺基-L-苯丙胺酸、異丙基-L-苯丙胺酸、O-烯丙基酪胺酸、O-甲基-L-酪胺酸、O-4-烯丙基-L-酪胺酸、4-丙基-L-酪胺酸、膦醯基酪胺酸、三-O-乙醯基-GlcNAcp-絲胺酸、L-磷絲胺酸、膦醯基絲胺酸、L-3-(2-萘基)丙胺酸、2-胺基-3-((2-((3-(苯甲氧基)-3-側氧基丙基)胺基)乙基)硒烷基)丙酸、2-胺基-3-(苯基硒烷基)丙酸或硒半胱胺酸。在一些實施例中，相對於野生型IL-2多肽，IL-2結合物與IL-2受體α(IL-2Rα)次單元之親和力降低。在一些實施例中，相對於野生型IL-2多肽，降低之親和力係與IL-2Rα之結合親和力降低約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或大於99%。在一些實施例中，相對於野生型IL-2多肽，降低之親和力係約1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、30倍、50倍、100倍、200倍、300倍、500倍、1000倍或更大。在一些實施例中，結合部分削弱或阻斷IL-2與IL-2Rα之結合。在一些實施例中，結合部分包括水溶性聚合物。在一些實施例中，另外的結合部分包括水溶性聚合物。在一些實施例中，水溶性聚合物各獨立地包括聚乙二醇(PEG)、聚(丙二醇)(PPG)、乙二醇及丙二醇之共聚物、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯吡咯啶酮)、聚(羥烷基甲基丙烯醯胺)、聚(羥烷基甲基丙烯酸酯)、聚(醣)、

聚(α-羥基酸)、聚(乙烯醇)、聚磷氮烯、聚噁唑啉(POZ)、聚(N-丙烯醯嗎啉)或其組合。在一些實施例中，水溶性聚合物各獨立地包括PEG。在一些實施例中，PEG為線性PEG或分支鏈PEG。在一些實施例中，水溶性聚合物各獨立地包括多醣。在一些實施例中，多醣包括聚葡萄糖、聚唾液酸(PSA)、玻尿酸(HA)、直鏈澱粉、肝素、硫酸乙醯肝素(HS)、糊精或羥乙基澱粉(HES)。在一些實施例中，水溶性聚合物各獨立地包括聚醣。在一些實施例中，水溶性聚合物各獨立地包括多元胺。在一些實施例中，結合部分包括蛋白質。在一些實施例中，另外的結合部分包括蛋白質。在一些實施例中，蛋白質各獨立地包括白蛋白、轉鐵蛋白(transferrin)或運甲狀腺素蛋白(transthyretin)。在一些實施例中，蛋白質各獨立地包括Fc部分。在一些實施例中，蛋白質各獨立地包括IgG之Fc部分。在一些實施例中，結合部分包括多肽。在一些實施例中，另外的結合部分包括多肽。在一些實施例中，多肽各獨立地包括XTEN肽、富甘胺酸高胺基酸聚合物(HAP)、PAS多肽、彈性蛋白樣多肽(ELP)、CTP肽或明膠樣蛋白質(GLK)聚合物。在一些實施例中，經分離及純化之IL-2多肽藉由麩胺醯化修飾。在一些實施例中，結合部分直接結合至經分離及純化之IL-2多肽。在一些實施例中，結合部分經由連接子間接結合至經分離及純化之IL-2多肽。在一些實施例中，連接子包括同型雙官能連接子。在一些實施例中，同型雙官能連接子包括羅曼特氏試劑(Lomant's reagent)二硫代雙(琥珀

醯亞胺基丙酸酯) DSP、3'3'-二硫代雙(丙酸磺基琥珀醯亞胺酯)(DTSSP)、辛二酸二琥珀醯亞胺酯(DSS)、辛二酸雙(磺基琥珀醯亞胺酯)(BS)、酒石酸二琥珀醯亞胺酯(DST)、酒石酸二磺基琥珀醯亞胺酯(磺基DST)、糖基雙(琥珀醯亞胺基丁二酸)伸乙酯(EGS)、戊二酸二琥珀醯亞胺酯(DSG)、碳酸N,N'-二琥珀醯亞胺酯(DSC)、二亞胺代二酸二甲酯(DMA)、庚二亞胺酸二甲酯(DMP)、辛二亞胺酸二甲酯(DMS)、二甲基-3,3'-二硫代雙丙醯亞胺酸酯(DTBP)、1,4-二(3'-(2'-吡啶基二硫基)丙醯胺基)丁烷(DPDPB)、雙順丁烯二醯亞胺基己烷(BMH)、含有芳基鹵化物之化合物(DFDNB)(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯或1,3-二氟-4,6-二硝基苯)、4,4'-二氟-3,3'-二硝基苯基碸(DFDNPS)、雙-[β-(4-疊氮基柳基醯胺基)乙基]二硫化物(BASED)、甲醛、戊二醛、1,4-丁二醇二縮水甘油醚、己二酸二醯肼、碳醯肼、鄰甲苯胺、3,3'-二甲基聯苯胺、聯苯胺、α,α'-對二胺基聯苯、二碘-對二甲苯磺酸、N,N'-伸乙基-雙(碘乙醯胺)或N,N'-六亞甲基-雙(碘乙醯胺)。在一些實施例中，連接子包括異型雙官能連接子。在一些實施例中，異型雙官能連接子包含3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-琥珀醯亞胺酯(sPDP)、長鏈3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-琥珀醯亞胺酯(LC-sPDP)、水溶性長鏈3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-琥珀醯亞胺酯(磺基-LC-sPDP)、琥珀醯亞胺基氧基羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基二硫基)甲苯(sMPT)、磺基琥珀醯亞胺基-6--[α-甲基-α-(2-吡啶基二硫基)甲苯醯胺基]己酸酯

(磺基-LC-sMPT)、琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(sMCC)、磺基琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)、間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基琥珀醯亞胺酯(MBs)、間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-MBs)、(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸N-琥珀醯亞胺酯(sIAB)、(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-sIAB)、琥珀醯亞胺基-4-(對順丁烯二醯亞胺基苯基)丁酸酯(sMPB)、磺基琥珀醯亞胺基-4-(對順丁烯二醯亞胺基苯基)丁酸酯(磺基-sMPB)、N-(γ-順丁烯二醯亞胺基丁醯氧基)琥珀醯亞胺酯(GMBs)、N-(γ-順丁烯二醯亞胺基丁醯氧基)磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-GMBs)、6-((碘乙醯基)胺基)己酸琥珀醯亞胺酯(sIAX)、6-[6-(((碘乙醯基)胺基)己醯基)胺基]己酸琥珀醯亞胺酯(sIAXX)、4-(((碘乙醯基)胺基)甲基)環己烷-1-甲酸琥珀醯亞胺酯(sIAC)、6-(((((4-碘乙醯基)胺基)甲基)環己烷-1-羰基)胺基)己酸琥珀醯亞胺酯(sIACX)、碘乙酸對硝苯酯(NPIA)、羰基反應性及硫氫基反應性交聯劑，諸如4-(4-N-順丁烯二醯亞胺基苯基)丁酸醯肼(MPBH)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-羧基-醯肼-8(M2C2H)、3-(2-吡啶基二硫基)丙醯基醯肼(PDPH)、N-羥基琥珀醯亞胺基-4-迭氮柳酸(NHs-AsA)、N-羥基磺基琥珀醯亞胺基-4-迭氮水楊酸(磺基-NHs-AsA)、磺基琥珀醯亞胺基-(4-迭氮柳基醯胺基己酸酯(磺基-NHs-LC-AsA)、磺基琥珀醯亞胺基-2-(對迭氮柳基醯胺基)乙基-

1,3'-二硫丙酸酯(sAsD)、N-羥基琥珀醯亞胺基-4-迭氮苯甲酸酯(HsAB)、N-羥基磺基琥珀醯亞胺基-4-迭氮苯甲酸酯(磺基-HsAB)、N-琥珀醯亞胺基-6-(4'-疊氮基-2'-硝基苯基胺基)己酸酯(sANPAH)、磺基琥珀醯亞胺基-6-(4'-疊氮基-2'-硝基苯基胺基)己酸酯(磺基-sANPAH)、N-5-疊氮基-2-硝基苯甲醯氧基丁二醯亞胺(ANB-NOs)、磺基琥珀醯亞胺基-2-(間疊氮基-鄰硝基苯甲醯胺基)-乙基-1,3'-二硫丙酸酯(sAND)、N-琥珀醯亞胺基-4(4-迭氮苯基)1,3'-二硫丙酸酯(sADP)、(4-迭氮苯基)-1,3'-二硫丙酸N-磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-sADP)、4-(對迭氮苯基)丁酸磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-sAPB)、2-(7-疊氮基-4-甲基香豆素-3-乙醯胺)乙基-1,3'-二硫丙酸磺基琥珀醯亞胺酯(sAED)、7-疊氮基-4-甲基香豆素-3-乙酸磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-sAMCA)、重氮丙酮酸對硝苯酯(ρNPDP)、對硝苯基-2-重氮-3,3,3-三氟丙酸酯(PNP-DTP)、1-(對疊氮基柳基醯胺基)-4-(碘乙醯胺基)丁烷(AsIB)、N-[4-(對疊氮基柳基醯胺基)丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫基)丙醯胺(APDP)、二苯甲酮-4-碘乙醯胺、對疊氮基苯甲醯基醯肼(ABH)、4-(對疊氮基柳基醯胺基)丁胺(AsBA)或對迭氮苯基乙二醛(APG)。在一些實施例中，連接子包括可裂解連接子，視情況包括二肽連接子。在一些實施例中，二肽連接子包括Val-Cit、Phe-Lys、Val-Ala或Val-Lys。在一些實施例中，連接子包括不可裂解連接子。在一些實施例中，連接子包括順丁烯二醯亞胺基，視情況包括順丁烯二醯亞胺基己醯基(mc)、琥珀醯亞胺基-4-

(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(sMCC)或磺基琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)。在一些實施例中，連接子進一步包括間隔子。在一些實施例中，間隔子包括對胺基苯甲基醇(PAB)、對胺基苯甲氧基羰基(PABC)、其衍生物或類似物。在一些實施例中，結合部分能夠延長IL-2結合物之血清半衰期。在一些實施例中，另外的結合部分能夠延長IL-2結合物之血清半衰期。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為本文所描述之任一種IL-2形式的片段。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式係如美國專利申請公開案第US 2020/0181220 A1號及美國專利申請公開案第US 2020/0330601 A1號中所揭示般聚乙二醇化。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為IL-2結合物，該IL-2結合物包括：IL-2多肽，其包括N6-疊氮基乙氧基-離胺酸(AzK)，其共價連接於包括聚乙二醇(PEG)之結合部分，其中：IL-2多肽包括與美國專利申請公開案第2020/0330601號中的SEQ ID NO: 1(在本文中列出為表2中的SEQ ID NO:5)具有至少80%序列一致性之胺基酸序列；及參照美國專利公開申請案第2020/0330601號中的SEQ ID NO:1(在本文中列出為表2中的SEQ ID NO:5)中的胺基酸位置對於位置K35、F42、F44、K43、E62、P65、R38、T41、E68、Y45、V69或L72處的胺基酸的AzK取代物。在一些實施例中，IL-2多肽包括一個殘基相對於美國專利公開申請案第US 2020/0330601號中之SEQ ID NO: 1(在本文

中列出為表2中的SEQ ID NO: 5)之N端缺失。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式缺乏IL-2R α鏈接合，但保持與中間親和力IL-2R β-γ傳訊複合物的正常結合。在一些實施例中，適合用於本發明之IL-2形式為ALKS-4230。適用於本發明之IL-2形式在美國專利申請公開案第2021/0038684 A1號中描述為SEQ ID NO:1(在本文中列出為表2中之SEQ ID NO:6)。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為一種融合蛋白，其包括美國專利第10,183,979號中之SEQ ID NO:2(美國專利第10,183,979號中之SEQ ID NO:2，本文列出為表2中之SEQ ID NO:7)的胺基酸24-452。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為一種融合蛋白，其包括美國專利第10,183,979號中之SEQ ID NO: 2的胺基酸24-452；或為一種胺基酸序列，其與美國專利第10,183,979號中之SEQ ID NO: 2的胺基酸24-452同源，在美國專利第10,183,979號中之SEQ ID NO:2的胺基酸24-452的全長上具有至少98%胺基酸序列一致性且具有美國專利第10,183,979號中之SEQ ID NO:2的胺基酸24-452的受體拮抗劑活性。視情況，在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為包括第一融合搭配物之融合蛋白，該第一融合搭配物藉由黏蛋白域多肽連接子與第二融合搭配物連接，其中該第一融合搭配物為IL-1Rα或與IL-1Rα具有至少98%胺基酸序列一致性且具有IL-Rα的受體拮抗劑活性的蛋白質，且其中該第二融合搭配物包括全部或部分包括Fc區的免疫球蛋白，其中該黏蛋白域多肽連接子包括美國專

利第10,183,979號中之SEQ ID NO: 14(在本文中列出為表2中之SEQ ID NO:8)或與美國專利第10,183,979號中之SEQ ID NO:14(在本文列出為表2中之SEQ ID NO:8)具有至少90%序列一致性的胺基酸序列，且其中融合蛋白的半衰期與第一融合搭配物在沒有黏蛋白域多肽連接子的情況下與第二融合搭配物的融合相比有所改良。

表2.白介素的胺基酸序列。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:3 重組人類 IL-2 (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN RWITFCQSII STLT	60 120 134
SEQ ID NO:4 阿地介白素	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFSQSIIST LT	60 120 132
SEQ ID NO:5 IL-2 形式	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT	60 120 133
SEQ ID NO:6 IL-2 形式	SKNFHLRPRD LISNINVIVL ELKGSETTFM CEYADETATI VEFLNRWITF SQSIISTLTG GSSSTKKTQL QLEHLLLDLQ MILNGINNYK NPKLTRMLTF KFYMPKKATE LKHLQCLEEE LKPLEEVLNL AQGSGGGSEL CDDDPPEIPH ATFKAMAYKE GTMLNCECKR GFRRIKSGSL YMLCTGNSSH SSWDNQCQCT SSATRNTTKQ VTPQPEEQKE RKTTEMQSPM QPVDQASLPG HCREPPPWEN EATERIYHFV VGQMVYYQCV QGYRALHRGP AESVCKMTHG KTRWTQPQLI CTG	60 120 180 240 300 303
SEQ ID NO:7 IL-2 形式	MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SARRPSGRKS SKMQAFRIWD VNQKTFYLRN NQLVAGYLQG PNVNLEEKID VVPIEPHALF LGIHGGKMCL SCVKSGDETR LQLEAVNITD LSENRKQDKR FAFIRSDSGP TTSFESAACP GWFLCTAMEA DQPVSLTNMP DEGVMVTKFY FQEDESGSGG ASSESSASSD GPHPVITESR ASSESSASSD GPHPVITESR EPKSSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK	60 120 180 240 300 360 420 452
SEQ ID NO:8 黏蛋白域多肽	SESSASSDGP HPVITP	16
SEQ ID NO:9 重組人類 IL-4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI MREKYSKCSS	60 120 130
SEQ ID NO:10 重組人類 IL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH	60 120 153
SEQ ID NO:11 重組人類 IL-15 (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS	60 115
SEQ ID NO:12 重組人類 IL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ HLSSRTHGSE DS	60 120 132

【0561】在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式包含抗體細胞介素移植蛋白，該抗體細胞介素移植蛋白包括：重鏈可變區(V_H)，其包括互補決定區HCDR1、HCDR2、HCDR3；輕鏈可變區(V_L)，其包括LCDR1、LCDR2、LCDR3；及IL-2分子或其片段，其移植至V_H或V_L

之CDR中，其中該抗體細胞介素移植蛋白優先於調節性T細胞擴增T效應細胞。在一實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括重鏈可變區(V_H)，其包括互補決定區HCDR1、HCDR2、HCDR3；輕鏈可變區(V_L)，其包括LCDR1、LCDR2、LCDR3；及IL-2分子或其片段，其移植至V_H或V_L之CDR中，其中IL-2分子為突變蛋白，並且其中該抗體細胞介素移植蛋白優先於調節性T細胞擴增T效應細胞。在一實施例中，IL-2方案包括投予美國專利申請公開案第US 2020/0270334 A1號中所描述之抗體，該公開案之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括重鏈可變區(VH)，其包括互補決定區HCDR1、HCDR2、HCDR3；輕鏈可變區(VL)，其包括LCDR1、LCDR2、LCDR3；及IL-2分子或其片段，其移植至VH或VL之CDR中，其中IL-2分子為突變蛋白，其中該抗體細胞介素移植蛋白優先於調節性T細胞擴增T效應細胞，並且其中抗體進一步包括選自由以下組成之群組的IgG類重鏈及IgG類輕鏈：包括美國專利申請公開案第2020/0270334 A1號中之SEQ ID NO:69的IgG類輕鏈及包括美國專利申請公開案第2020/0270334 A1號中之SEQ ID NO:53的IgG類重鏈；包括美國專利申請公開案第2020/0270334 A1號中之SEQ ID NO:37的IgG類輕鏈及包括美國專利申請公開案第2020/0270334 A1號中之SEQ ID NO:21的IgG類重鏈；包括美國專利申請公開案第2020/0270334 A1號中之SEQ ID NO:69的IgG類輕鏈及包括

美國專利申請公開案第2020/0270334 A1號中之SEQ ID NO:21的IgG類重鏈；及包括SEQ ID NO:37的IgG類輕鏈及包括美國專利申請案公開第2020/0270334 A1號中之SEQ ID NO:53的IgG類重鏈。

【0562】在一實施例中，IL-2分子或其片段移植至VH之HCDR1中，其中IL-2分子為突變蛋白。在一實施例中，IL-2分子或其片段移植至VH之HCDR2中，其中IL-2分子為突變蛋白。在一實施例中，IL-2分子或其片段移植至VH之HCDR3中，其中IL-2分子為突變蛋白。在一實施例中，IL-2分子或其片段移植至VL之LCDR1中，其中IL-2分子為突變蛋白。在一實施例中，IL-2分子或其片段移植至VL之LCDR2中，其中IL-2分子為突變蛋白。在一些實施例中，IL-2分子或其片段移植至VL之LCDR3中，其中IL-2分子為突變蛋白。

【0563】IL-2分子之插入可在CDR之N端區處或附近，在CDR之中間區中，或在CDR之C端區處或附近。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白質包括併入CDR中之IL-2分子，其中IL2序列不會將CDR序列框移。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括併入CDR中之IL-2分子，其中IL-2序列置換CDR序列之全部或一部分。IL-2分子置換可在CDR之N端區處，在CDR之中間區中，或在CDR之C端區處或附近。IL-2分子置換可少至CDR序列或整個CDR序列之一或兩個胺基酸。

【0564】在一些實施例中，IL-2分子直接移植至無肽

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

【0565】在一些實施例中，本文所描述之IL-2分子為IL-2突變蛋白。在一些情況下，IL-2突變蛋白包括R67A取代。在一些實施例中，IL-2突變蛋白包括美國專利申請公開案第2020/0270334 A1號中的胺基酸序列SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6。在一些實施例中，IL-2突變蛋白包括美國專利申請公開案第US 2020/0270334 A1號中表1中的胺基酸序列，該公開案之揭示內容以引用之方式併入本文。

【0566】在一實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括選自由美國專利申請公開案第US 2020/0270334 A1號中之SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:16組成之群組的HCDR1。在一實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括選自由SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:16組成之群組的HCDR1及選自由美國專利申請公開案第2020/0270334 A1號中的SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14及SEQ ID NO:17組成之群組的HCDR2。在一實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括選自由SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:16組成之群組的HCDR1、選自由SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14及SEQ ID NO:17組成之群組的HCDR2以及選自由美國專利申請公開案第

US 2020/0270334 A1號中的SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO: 15及SEQ ID NO:18組成之群組的HCDR3。在一實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括VH區，該VH區包括美國專利申請公開案第US 2020/0270334 A1號中的SEQ ID NO:19之胺基酸序列。在一實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括重鏈，該重鏈包括美國專利申請公開案第US 2020/0270334 A1號中的SEQ ID NO:21之胺基酸序列。在一實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括VL區，該VL區包括美國專利申請公開案第US 2020/0270334 A1號中的SEQ ID NO:35之胺基酸序列。在一實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括輕鏈，該輕鏈包括美國專利申請公開案第US 2020/0270334 A1號中的SEQ ID NO:37之胺基酸序列。在一實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括VH區，其包括SEQ ID NO:19之胺基酸序列；及VL區，其包括美國專利申請公開案第US 2020/0270334 A1號中的SEQ ID NO: 35之胺基酸序列。在一實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括重鏈區，其包括SEQ ID NO:21之胺基酸序列；及輕鏈區，其包括美國專利申請公開案第US 2020/0270334 A1號中的SEQ ID NO:37之胺基酸序列。在一實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包括美國專利申請公開案第2020/0270334 A1號中的IgG.IL2R67A.H1。在一實施例中，本文所描述之抗體細胞介素移植蛋白之抗體組分包括帕利珠單抗(palivizumab)之免疫球蛋白序列、構架序列或CDR序列。

【0567】在一些實施例中，本文所描述之抗體細胞介

素移植蛋白的血清半衰期比野生型IL-2分子(諸如但不限於阿地介白素(Proleukin®)或可比分子)長。

【0568】在一實施例中，本文所描述之抗體細胞介素移植蛋白具有如表3中所闡述之序列。

表3.例示性帕利珠單抗抗體-IL-2移植蛋白之序列

US 2020/0270334 中之識別號	識別號	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:2 IL-2	SEQ ID NO:13 IL-2	MYRMQLLSCI ALSLALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT	60 120 153
SEQ ID NO:4 IL-2 突變蛋白	SEQ ID NO:14 IL-2 突變蛋白	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT	60 120 133
SEQ ID NO:6 IL-2 突變蛋白	SEQ ID NO:15 IL-2 突變蛋白	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TAKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT	60 120 133
SEQ ID NO:7 HCDR1_IL-2	SEQ ID NO:16 HCDR1_IL-2	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMSVG	60 120 145
SEQ ID NO:8 HCDR2	SEQ ID NO:17 HCDR2	DIWWDDKKDY NPSLKS	16
SEQ ID NO:9 HCDR3	SEQ ID NO:18 HCDR3	SMITNWYFDV	10
SEQ ID NO:10 HCDR1_IL-2 kabat	SEQ ID NO:19 HCDR1_IL-2 kabat	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLTSTSGMSV G	60 120 141
SEQ ID NO:11 HCDR2 kabat	SEQ ID NO:20 HCDR2 kabat	DIWWDDKKDY NPSLKS	16
SEQ ID NO:12 HCDR3 kabat	SEQ ID NO:21 HCDR3 kabat	SMITNWYFDV 10	
SEQ ID NO:13 HCDR1_IL-2 clothia	SEQ ID NO:22 HCDR1_IL-2 clothia	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GM	60 120 142
SEQ ID NO:14 HCDR2 clothia	SEQ ID NO:23 HCDR2 clothia	WWDDK	5
SEQ ID NO:15 HCDR3 clothia	SEQ ID NO:24 HCDR3 clothia	SMITNWYFDV	10
SEQ ID NO:16 HCDR1_IL-2 IMGT	SEQ ID NO:25 HCDR1_IL-2 IMGT	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMS	60 120 143
SEQ ID NO:17 HCDR2 IMGT	SEQ ID NO:26 HCDR2 IMGT	IWWDDKK	7
SEQ ID NO:18 HCDR3 IMGT	SEQ ID NO:27 HCDR3 IMGT	ARSMITNWYF DV	12
SEQ ID NO:19 VH	SEQ ID NO:28 VH	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWYF DVWGAGTTVT VSS	60 120 180 240 253
SEQ ID NO:21 重鏈	SEQ ID NO:29 重鏈	QMILNGINNY KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWYF DVWGAGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV	60 120 180 240

		TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV AVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALAAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK	300 360 420 480 533
SEQ ID NO:26 LCDR1 kabat	SEQ ID NO:30 LCDR1 kabat	KAQLSVGYMH	10
SEQ ID NO:27 LCDR2 kabat	SEQ ID NO:31 LCDR2 kabat	DTSKLAS	7
SEQ ID NO:28 LCDR3 kabat	SEQ ID NO:32 LCDR3 kabat	FQGSGYPFT	9
SEQ ID NO:29 LCDR1 chothia	SEQ ID NO:33 LCDR1 chothia	QLSVGY	6
SEQ ID NO:30 LCDR2 chothia	SEQ ID NO:34 LCDR2 chothia	DTS	3
SEQ ID NO:31 LCDR3 chothia	SEQ ID NO:35 LCDR3 chothia	GSGYPF	6
SEQ ID NO:35 VL	SEQ ID NO:36 VL	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIK	60 106
SEQ ID NO:37 輕鏈	SEQ ID NO:37 輕鏈	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	60 120 180 213
SEQ ID NO:53 輕鏈	SEQ ID NO:38 輕鏈	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT AKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWYF DVWGAGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV AVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALAAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK	60 120 180 240 300 360 420 480 540 583
SEQ ID NO:69 輕鏈	SEQ ID NO:39 輕鏈	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	60 120 180 213

【0569】術語「IL-4」(在本文中亦稱「IL4」)係指被稱為介白素4之細胞介素，其由Th2 T細胞及嗜酸性球、嗜鹼性球及肥大細胞產生。IL-4調節初始輔助T細胞(Th0細胞)分化成Th2 T細胞。Steinke及Borish，《呼吸研究(*Respir. Res.*)》**2001,** *2*, 66-70。在由IL-4活化後，Th2 T細胞隨後以正回饋迴路產生另外IL-4。IL-4亦刺激B細胞增殖及II類MHC表現，且誘導來自B細胞之類別轉換至IgE及IgG1表現。適用於本發明之重組人類IL-4可購自多個供應商，包含美國新澤西州東不倫瑞克的ProSpec-Tany

TechnoGene Ltd.(目錄號CYT-211)及美國馬薩諸塞州沃爾瑟姆的賽默飛世爾科技公司(ThermoFisher Scientific，Inc.)(人類IL-15重組蛋白，目錄號Gibco CTP0043)。適用於本發明之重組人類IL-4之胺基酸序列於表2中給出(SEQ ID NO:9)。

【0570】術語「IL-7」(在本文中亦稱為「IL7」)係指稱為介白素7的糖基化的組織衍生性細胞介素，其可獲自基質及上皮細胞以及樹突狀細胞。Fry及Mackall，《血液》**2002**，*99*，*3892-904*。IL-7可以刺激T細胞的發育。IL-7與IL-7受體(一種由IL-7受體α及共同γ鏈受體組成之異二聚體)結合，其屬於對於T細胞在胸腺內之發育及在周邊內之存活而言重要之一系列信號。適用於本發明之重組人類IL-7可購自多個供應商，包含美國新澤西州東不倫瑞克(East Brunswick, NJ, USA)的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目錄號CYT-254)及美國馬薩諸塞州沃爾瑟姆的賽默飛世爾科技公司(ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)(人類IL-15重組蛋白，目錄號Gibco PHC0071)。適用於本發明之重組人類IL-7之胺基酸序列於表2中給出(SEQ ID NO:10)。

【0571】術語「IL-15」(在本文中亦稱為「IL15」)係指稱為介白素-15之T細胞生長因子，且包含所有形式之IL-2，包含人類及哺乳動物形式、保守胺基酸取代、糖化形式、生物類似物及其變體。IL-15描述於例如Fehniger及Caligiuri的《血液》**2001**, 97, 14-32中，其揭示內容以引

用之方式併入本文中。IL-15與IL-2共用β及γ傳訊受體次單位。重組人類IL-15為 分子質量為12.8 kDa的含有114個胺基酸(及N端甲硫胺酸)的單一非糖基化多肽鏈。重組人類IL-15可購自多個供應商，包含美國新澤西州東不倫瑞克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目錄號CYT-230-b)及美國馬薩諸塞州沃爾瑟姆的賽默飛世爾科技公司(人類IL-15重組蛋白，目錄號34-8159-82)。適用於本發明之重組人類IL-15之胺基酸序列於表2中給出(SEQ ID NO:11)。

【0572】術語「IL-21」(在本文中亦稱為「IL21」)係指稱為介白素-21之多效性細胞介素蛋白，且包含所有形式之IL-21，包含人類及哺乳動物形式、保守胺基酸取代、糖化形式、生物類似物及其變體。IL-21描述於例如Spolski及Leonard，《自然綜述：藥物發現(*Nat. Rev. Drug.Disc.*)》**2014,** *13,* 379-95，其揭示內容以引用之方式併入本文中。IL-21主要藉由自然殺手T細胞及經活化之人類$CD4^+$ T細胞產生。重組人類IL-21為分子質量為15.4 kDa之含有132個胺基酸的單一非糖基化多肽鏈。重組人類IL-21可購自多個供應商，包含美國新澤西州東不倫瑞克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目錄號CYT-408-b)及美國馬薩諸塞州沃爾瑟姆的賽默飛世爾科技公司(人類IL-21重組蛋白，目錄號14-8219-80)。適用於本發明之重組人類IL-21之胺基酸序列於表2中給出(SEQ ID NO: 12)。

【0573】當指示「抗腫瘤有效量」、「腫瘤抑制有效量」或「治療量」時，本發明組合物待投予的精確量可由

醫師考慮患者(個體)之年齡、體重、腫瘤大小、感染或轉移程度及病狀的個別差異來確定。通常可說明本文所描述之包括腫瘤浸潤性淋巴球(例如繼代TIL或基因修飾之細胞毒性淋巴球)的醫藥組合物可以10^4至10^{11}個細胞/公斤體重(例如，10^5至10^6、10^5至10^{10}、10^5至10^{11}、10^6至10^{10}、10^6至10^{11}、10^7至10^{11}、10^7至10^{10}、10^8至10^{11}、10^8至10^{10}、10^9至10^{11}或10^9至10^{10}個細胞/公斤體重)的劑量投予，包含在彼等範圍內之所有整數值。腫瘤浸潤性淋巴球(在一些情況下包含經基因修飾之細胞毒性淋巴球)組合物亦可以此等劑量多次投予。腫瘤浸潤性淋巴球(在一些情況下，包含基因上的)可藉由使用免疫療法中通常已知之輸注技術進行投予(參見例如Rosenberg等人，《新英格蘭醫學雜誌(*New Eng. J. of Med.*)》319: 1676, 1988)。特定患者之最佳劑量及治療方案可容易由所屬醫藥領域的技術人員藉由監測患者之疾病病徵且相應地調整治療來確定。

【0574】術語「血液惡性病(hematological malignancy/hematologic malignancy)」或有相關意義之術語係指哺乳動物造血及淋巴組織(包含但不限於血液、骨髓、淋巴結及淋巴系統之組織)的癌症及腫瘤。血液惡性病亦稱為「液體腫瘤」。血液惡性病包含但不限於急性淋巴母細胞白血病(ALL)、慢性淋巴球性淋巴瘤(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤(SLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性單核球性白血病(AMoL)、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)及非霍奇金氏淋巴瘤。術

語「B細胞惡性血液病」係指影響B細胞之血液惡性病。

【0575】術語「液體腫瘤」係指性質上為流體的異常細胞團塊。液體腫瘤癌症包含(但不限於)白血病、骨髓瘤及淋巴瘤，以及其他血液惡性病。獲自液體腫瘤之TIL在本文中亦可稱為骨髓浸潤性淋巴球(MIL)。獲自液體腫瘤(包含在末梢血液中循環之液體腫瘤)之TIL在本文中亦可稱為PBL。術語MIL、TIL及PBL在本文中可互換使用且僅基於衍生細胞之組織類型而有所不同。

【0576】如本文所用，術語「微環境」可指作為整體之實體或血液腫瘤微環境或可指在微環境內之個別細胞子集。如本文所用，腫瘤微環境係指以下之複雜混合物：「促進贅生性轉化、支援腫瘤生長及侵襲、保護腫瘤不受宿主免疫力影響、鼓勵治療抗性且提供顯性轉移茁壯成長之生態棲位(niche)之細胞、可溶因子、傳訊分子、細胞外基質及機械信號」，如Swartz等人，《癌症研究(*Cancer Res.*)》, **2012**, *72*, 2473中所描述。儘管腫瘤表現應由T細胞識別之抗原，但由於微環境之免疫抑制，免疫系統清除腫瘤的情況係罕見的。

【0577】在一實施例中，本發明包含一種用TIL群體治療癌症之方法，其中患者在輸注根據本發明之TIL之前經非骨髓清除式化療預治療。在一些實施例中，可提供TIL群體，其中患者在輸注根據本發明之TIL之前經非骨髓清除式化療預治療。在一實施例中，非骨髓清除式化療為環磷醯胺60 mg/kg/d持續2天(在TIL輸注前第27及26天)及

氟達拉濱25 mg/m2/d持續5天(在TIL輸注前第27至23天)。在一實施例中，在根據本發明之非骨髓清除式化療及TIL輸注之後(第0天)，患者每8小時以720,000 IU/kg靜脈內接受IL-2的靜脈內輸注以達到生理耐受。

【0578】實驗發現表明，在過繼性轉移腫瘤特異性T淋巴球之前，淋巴球耗盡藉由消除調節性T細胞且競爭免疫系統之元件(「細胞介素庫」)在增強治療功效方面發揮關鍵作用。因此，本發明之一些實施例在引入本發明之TIL之前在患者身上採用淋巴球耗盡步驟(有時亦稱為「免疫抑制性調節」)。

【0579】術語「有效量」或「治療有效量」係指如本文所描述之化合物或化合物組合之量，其足以實現所預期應用，包含但不限於疾病治療。治療有效量可視預期應用(活體外或活體內)或所治療之個體及疾病病狀(例如，個體之體重、年齡及性別)、疾病病狀之嚴重程度或投給、予方式而變化。該術語亦適用於將誘發目標細胞中之特定反應(例如血小板黏附及/或細胞遷移減少)之劑量。特定劑量將視以下而變化：所選特定化合物、所依循之給藥方案、化合物係否與其他化合物組合投予、投予時序、其所投予之組織及其中攜帶化合物之物理遞送系統。

【0580】術語「治療(treatment/treating/treat)」及其類似術語係指獲得所要的藥理學及/或生理學效應。該效應就完全或部分預防疾病或其症狀而言可具預防性，且/或就部分或完全治癒疾病及/或可歸因於該疾病之不良影

響而言可具治療性。如本文所用，「治療」涵蓋哺乳動物、尤其人類之疾病之任何治療，且包含：(a)預防可能易患疾病但尚未診斷出患有該疾病之個體中出現該疾病；(b)抑制疾病，亦即遏制其發展或進展；及(c)緩解疾病，亦即促使疾病消退及/或緩解一或多種疾病症狀。「治療」亦意欲涵蓋遞送試劑以便提供藥理學效應，即使在不存在疾病或病狀之情況下亦如此。舉例而言，「治療」涵蓋可在不存在疾病病狀之情況下(例如在疫苗之情況下)引發免疫反應或賦予免疫性的組合物之遞送。

【0581】當參考核酸或蛋白質之部分使用時，術語「異源」指示核酸或蛋白質包括兩個或更多個在自然界中發現彼此之間沒有相同關係的子序列。舉例而言，通常以重組方式產生核酸，其具有兩個或更多個來自無關基因的經佈置以製造新的功能性核酸序列的序列，例如來自一個來源之啟動子及來自另一來源之編碼區或來自不同來源之編碼區。類似地，異源蛋白指示蛋白質包括兩個或更多個在自然界中未發現彼此呈相同關係之子序列(例如融合蛋白)。

【0582】在兩個或更多個核酸或多肽之上下文中，術語「序列一致性(sequence identity)」、「一致性百分比(percent identity)」及「序列一致性百分比(sequence percent identity)」(或其同義詞，例如「99%一致」)係指兩個或更多個序列或子序列在進行比較及排比(需要時引入間隔)以達到最大對應性且不將任何保守胺基酸取代視

為序列一致性之部分時，該兩個或更多個序列或子序列係相同的或具有相同的特定百分比之核苷酸或胺基酸殘基。一致性百分比可使用序列比較軟體或演算法或藉由目視檢查來量測。所屬領域中已知可用於獲得胺基酸或核苷酸序列之排比的各種演算法及軟體。用以判定序列一致性百分比之適合的程式包含例如可購自美國政府的國家生物技術資訊中心(U.S. Government's National Center for Biotechnology Information)BLAST網站之BLAST套裝程式。兩個序列之間的比較可使用BLASTN或BLASTP演算法進行。BLASTN用於比較核酸序列，而BLASTP用於比較胺基酸序列。ALIGN、ALIGN-2(美國加利福尼亞州南舊金山的基因泰克(Genentech))或MegAlign(可購自DNASTAR)係另外的可用於排比序列之可供大眾使用的軟體程式。本領域技術人員可以藉由特定的比對軟體來判定用於最大比對的適當參數。在某些實施例中，使用排比軟體的預設參數。

【0583】如本文所用，術語「變體」涵蓋(但不限於)包括與參考抗體之胺基酸序列不同之胺基酸序列的抗體或融合蛋白，不同之處在於在參考抗體之胺基酸序列之內或相鄰的某些位置有一個或多個取代、缺失及/或添加。與參考抗體之胺基酸序列相比，變體可以在其胺基酸序列中包括一個或多個保守取代。保守取代可涉及例如類似帶電或不帶電胺基酸之取代。變體保留與參考抗體之抗原特異性結合的能力。術語變體亦包含聚乙二醇化抗體或蛋白

質。

【0584】本文中「腫瘤浸潤性淋巴球」或「TIL」意謂最初作為已離開個體血流且遷移至腫瘤中的白血球獲得之細胞群體。TIL包含(但不限於)$CD8^+$細胞毒性T細胞(淋巴球)、Th1及Th17 $CD4^+$ T細胞、自然殺手細胞、樹突狀細胞及M1巨噬細胞。TIL包含初代TIL及繼代TIL兩者。「初代TIL」係自如本文所概述之患者組織樣本獲得(有時稱為「新鮮收集」)的細胞，且「繼代TIL」係如本文所論述的經擴增或增殖之任何TIL細胞群體，包含但不限於主體TIL、經擴增之TIL(「REP TIL」)以及如本文所論述之「reREP TIL」。reREP TIL可包含例如第二次擴增TIL或第二次額外擴增TIL(諸如圖8之步驟D中所描述之TIL，包含稱為reREP TIL之TIL)。

【0585】TIL通常可經生物化學(使用細胞表面標記物)或功能性(根據其浸潤腫瘤及實現治療之能力)定義。TIL通常可藉由表現以下生物標記物中之一或多者分類：CD4、CD8、TCR αβ、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1及CD25。另外及替代地，TIL可藉由其重新引入患者中後浸潤實體腫瘤之能力來進行功能性定義。TIL可進一步藉由效力表徵 - 例如若例如干擾素(IFN)釋放大於約50 pg/mL、大於約100 pg/mL、大於約150 pg/mL或大於約200 pg/mL，則TIL可視為強效的。

【0586】術語「去氧核糖核苷酸」涵蓋天然的及合成的、未經修飾的及經修飾的去氧核糖核苷酸。修飾包含改

變糖部分、鹼基部分及/或寡核苷酸中各去氧核糖核苷酸之間的連接。

【0587】術語「RNA」定義包括至少一個核糖核苷酸殘基的分子。術語「核糖核苷酸」定義在b-D-呋喃核糖部分之2'位具有羥基的核苷酸。術語RNA包含雙股RNA；單股RNA；經分離之RNA，諸如部分純化之RNA、基本上純RNA、合成RNA、以重組方式產生之RNA；以及藉由添加、缺失、取代及/或改變一或多個核苷酸而不同於天然存在之RNA的經改變之RNA。本文所描述之RNA分子中之核苷酸亦可包括非標準核苷酸，諸如非天然存在之核苷酸或化學合成之核苷酸或去氧核苷酸。此等改變之RNA可稱為類似物或天然存在之RNA的類似物。

【0588】術語「醫藥學上可接受之載劑」或「醫藥學上可接受之賦形劑」意欲包含任何及全部溶劑、分散介質、包衣、抗細菌劑及抗真菌劑、等滲劑及吸收延遲劑，以及惰性成分。此類醫藥學上可接受之載劑或醫藥學上可接受之賦形劑用於活性醫藥成分之用途為本領域中所熟知的。除非任何習知醫藥學上可接受之載劑或醫藥學上可接受之賦形劑與活性醫藥成分不相容，否則考慮其在本發明之治療組合物中之用途。諸如其他藥物之另外活性醫藥成分亦可併入所描述之組合物及方法中。

【0589】術語「約」或「大約」意指在值之統計學上有意義的範圍內。此範圍可在既定值或範圍之一數量級內，較佳地50%內，更佳地20%內，再更佳地10%內，且

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

【0590】當以原始及修改形式用於所附申請專利範圍中時，轉變術語「包括(comprising)」、「基本上由…組成(consisting essentially of)」及「由…組成(consisting of)」相對於哪些未敍述之另外的請求項要素或步驟(若存在)被排除在申請專利範圍之範疇之外來定義請求項範疇。術語「包括」意欲為包括性的或開放性的，且不排除任何另外的、未敍述之要素、方法、步驟或材料。術語「由…組成」不包括除申請專利範圍中指定之要素、步驟或材料以外的任何要素、步驟或材料，且在後一情況中排除與指定材料一般相關之雜質。術語「基本上由…組成」將請求項之範疇限於所指定要素、步驟或材料及實質上不影響所主張發明之基礎及新穎特徵的要素、步驟或材料。在替代實施例中，本文所描述之體現本發明之所有組合

物、方法及套組可由任何轉變術語「包括」、「基本上由…組成」及「由…組成」更具體地定義。

【0591】術語「抗體(antibody)」及其複數形式「抗體(antibodies)」係指完整的免疫球蛋白及任何抗原結合片段(「抗原結合部分」)或其單鏈。「抗體」另外係指包括藉由二硫鍵相互連接之至少兩個重(H)鏈及兩個輕(L)鏈之糖蛋白，或其抗原結合部分。各重鏈由重鏈可變區(本文縮寫為V_H)及重鏈恆定區構成。重鏈恆定區由三個域CH1、CH2及CH3構成。各輕鏈由輕鏈可變區(本文縮寫為V_L)及輕鏈恆定區構成。輕鏈恆定區由一個域C_L構成。抗體之V_H及V_L區可進一步細分成高變區，其稱為互補決定區(CDR)或高變區(HVR)，且其可穿插有更保守之區，稱為構架區(FR)。各V_H及V_L由自胺基端至羧基端按以下順序排列之三個CDR及四個FR構成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鏈及輕鏈之可變區含有與一或多個抗原決定基相互作用之結合域。抗體恆定區可介導免疫球蛋白與宿主組織或因子之結合，該等宿主組織或因子包含免疫系統之各種細胞(例如效應細胞)及經典補體系統之第一組分(C1q)。

【0592】術語「抗原」係指誘導免疫反應之物質。在一些實施例中，若藉由主要組織相容性複合物(MHC)分子呈遞，則抗原為能夠與抗體或TCR結合之分子。如本文所用，術語「抗原」亦涵蓋T細胞抗原決定基。抗原另外能夠被免疫系統識別。在一些實施例中，抗原能夠誘導使得

B淋巴球及/或T淋巴球活化的體液免疫反應或細胞免疫反應。在一些情況下，其可能需要抗原含有或連接至Th細胞抗原決定基。抗原亦可具有一或多個抗原決定基(例如，B抗原決定基及T抗原決定基)。在一些實施例中，抗原較佳將通常以高度特異性且選擇性方式與其對應抗體或TCR反應，且不與可由其他抗原誘導之多種其他抗體或TCR反應。

【0593】術語「單株抗體」、「mAb」、「單株抗體組合物」或其複數形式係指單分子組合物之抗體分子之製劑。單株抗體組合物顯示針對特定抗原決定基之單一結合特異性及親和力。對某些受體具有特異性之單株抗體可使用以下技術中之知識及技術製得，即向測試個體注射適合抗原，且接著分離表現具有所需序列或功能特徵之抗體的融合瘤。編碼單株抗體之DNA易於使用習知程序(例如，藉由使用能夠特異性結合於編碼單株抗體之重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針)分離及定序。融合瘤細胞充當此類DNA之較佳來源。分離後，即可將DNA置放於表現載體中，接著將該等表現載體轉染至不另外產生免疫球蛋白之宿主細胞(諸如大腸桿菌(*E. coli*)細胞、猴COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞)中以在重組宿主細胞中合成單株抗體。下文將更詳細地描述抗體的重組生產。

【0594】如本文所用，術語抗體之「抗原結合部分」或「抗原結合片段」(或簡言之「抗體部分」或「片段」)係指保持特異性結合至抗原之能力的抗體之一或多個片

段。已顯示抗體之抗原結合功能可藉由全長抗體之片段執行。術語抗體之「抗原結合部分」範圍內所涵蓋之結合片段的實例包含(i)Fab片段，即由V_L、V_H、C_L及CH1域組成的單價片段；(ii)F(ab')2片段，即一種二價片段，其包括在鉸鏈區藉由二硫橋鍵連接的兩個Fab片段；(iii)由V_H及CH1域組成的Fd片段；(iv)由抗體單臂之V_L及V_H域組成的Fv片段；(v)單域抗體(dAb)片段(Ward等人，《自然》,**1989**, *341*, 544-546)，其可由一個V_H或一個V_L域組成；及(vi)分離之互補決定區(CDR)。此外，儘管Fv片段之兩個域V_L及V_H係由獨立基因編碼，但其可使用重組方法，藉由合成連接子接合，該合成連接子能夠將其製造成V_L與V_H區配對形成單價分子之單一蛋白質鏈，稱為單鏈Fv(scFv)；參見例如Bird等人，《科學(*Science*)》**1988**, *242*, 423-426；及Huston等人，《美國國家科學院院刊(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*)》**1988**, *85*, 5879-5883)。此類scFv抗體亦意欲涵蓋於術語抗體之「抗原結合部分」或「抗原結合片段」內。此等抗體片段係使用熟習此項技術者已知之習知技術來獲得，且以與完整抗體相同之方式來篩選供使用之片段。

【0595】如本文所使用，術語「人類抗體」意欲包含具有可變區之抗體，其中構架區及CDR區皆來源於人類生殖系免疫球蛋白序列。另外，若抗體含有恆定區，則該恆定區亦來源於人類生殖系免疫球蛋白序列。本發明之人類抗體可包含並非由人類生殖系免疫球蛋白序列編碼之胺基

酸殘基(例如藉由在活體外隨機或位點特異性突變誘發或藉由在活體內體細胞突變引入的突變)。如本文所用，術語「人類抗體」並不意欲包含來源於另一哺乳動物種(諸如小鼠)之生殖系的CDR序列已移植於人類構架序列上的抗體。

【0596】術語「人類單株抗體」係指顯示單一結合特異性且具有可變區之抗體，其中構架區與CDR區兩者均來源於人類生殖系免疫球蛋白序列。在一實施例中，人類單株抗體由融合瘤產生，該融合瘤包含與永生化細胞融合的自轉殖基因非人類動物(例如轉殖基因小鼠)獲得的B細胞，其具有包括人類重鏈轉殖基因及人類輕鏈轉殖基因之基因組。

【0597】如本文中所用，術語「重組人類抗體」包含藉由重組方式製備、表現、產生或分離之全部人類抗體，該等人類抗體諸如(a)自對於人類免疫球蛋白基因而言為轉殖基因或轉染色體之動物(諸如小鼠)或由其製備之融合瘤(在下文進一步描述)分離的抗體；(b)自經轉型以表現人類抗體之宿主細胞，例如自轉染瘤分離的抗體；(c)自重組、組合人類抗體庫分離的抗體；及(d)藉由涉及將人類免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列之任何其他方式製備、表現、產生或分離的抗體。此類重組人類抗體具有構架區及CDR區均來源於人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區。然而，在某些實施例中，此類重組人類抗體可經歷活體外突變誘發(或當使用人類Ig序列之轉殖基因動物時為

活體內體細胞突變誘發)，且因此，重組抗體之V_H及V_L區之胺基酸序列係如下序列：該等序列雖然來源於人類生殖系V_H及V_L序列且與其相關，但可能並非在活體內天然存在於人類抗體生殖系譜系內之序列。

【0598】如本文所用，「同型」係指由重鏈恆定區基因編碼之抗體類別(例如IgM或IgG1)。

【0599】片語「識別抗原之抗體」及「對抗原具有特異性之抗體」在本文中可與術語「特異性結合於抗原之抗體」互換使用。

【0600】術語「人類抗體衍生物」係指人類抗體之任何經修飾形式，包含抗體與另一活性醫藥成分或抗體之結合物。術語「結合物」、「抗體-藥物結合物」、「ADC」或「免疫結合物」係指與另一治療部分結合之抗體或其片段，該治療部分可使用本領域中可用之方法與本文所描述之抗體結合。

【0601】術語「人源化抗體(humanized antibody/humanized antibodies)」及「人源化」意指來源於另一哺乳動物種(諸如小鼠)之生殖系的CDR序列已移植至人類構架序列上的抗體。在人類構架序列中可進行其他構架區修飾。非人類(例如鼠類)抗體之「人源化」形式係含有來源於非人類免疫球蛋白之最小序列的嵌合抗體。在極大程度上，人源化抗體係人類免疫球蛋白(受體抗體)，其中來自受體的高變區之殘基經來自具有所需特異性、親和力及能力之諸如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物之

非人類物種(供體抗體)的15個高變區之殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之Fv構架區(FR)殘基經相應非人類殘基置換。此外，人源化抗體可包括在受體抗體或供體抗體中未發現之殘基。進行此等修飾以進一步優化抗體效能。一般而言，人源化抗體將包括實質上全部至少一個且典型地兩個可變域，其中全部或實質上全部高變環對應於非人類免疫球蛋白之高變環且全部或實質上全部FR區為人類免疫球蛋白序列之FR區。人源化抗體視情況亦將包括免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一部分，典型地人類免疫球蛋白恆定區之至少一部分。關於其他細節，參見Jones等人，《自然》**1986,** *321*, 522-525；Riechmann等人，《自然》**1988**, *332*, 323-329；及Presta, 《結構生物學新見(Curr.*Op.Struct.Biol.*)》**1992,** *2*, 593-596。本文所描述之抗體亦可經修飾以採用已知賦予效應功能及/或FcR結合改良(例如降低)之任何Fc變體。Fc變體可包含例如以下所揭示之胺基酸取代中之任一者：國際專利申請公開案第WO 1988/07089 A1號、第WO 1996/14339 A1號、第WO 1998/05787 A1號、第WO 1998/23289 A1號、第WO 1999/51642 A1號、第WO 99/58572 A1號、第WO 2000/09560 A2號、第WO 2000/32767 A1號、第WO 2000/42072 A2號、第WO 2002/44215 A2號、第WO 2002/060919 A2號、第WO 2003/074569 A2號、第WO 2004/016750 A2號、第WO 2004/029207 A2號、第WO 2004/035752 A2號、第WO 2004/063351 A2號、第WO

2004/074455 A2號、第WO 2004/099249 A2號、第WO 2005/040217 A2號、第WO 2005/070963 A1號、第WO 2005/077981 A2號、第WO 2005/092925 A2號、第WO 2005/123780 A2號、第WO 2006/019447 A1號、第WO 2006/047350 A2號及第WO 2006/085967 A2號；及美國專利第5,648,260號；第5,739,277號；第5,834,250號；第5,869,046號；第6,096,871號；第6,121,022號；第6,194,551號；第6,242,195號；第6,277,375號；第6,528,624號；第6,538,124號；第6,737,056號；第6,821,505號；第6,998,253號；及第7,083,784號；其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0602】術語「嵌合抗體」意指可變區序列來源於一個物種且恆定區序列來源於另一物種之抗體，諸如可變區序列來源於小鼠抗體且恆定區序列來源於人類抗體之抗體。

【0603】「雙功能抗體」係具有兩個抗原結合位點之小抗體片段。片段包括連接至同一多肽鏈(VH-VL或VL-VH)中之輕鏈可變域(VL)的重鏈可變域(VH)。藉由使用過短而使得同一鏈上之兩個可變域之間不能配對的連接子，迫使該等可變域與另一條鏈之互補域配對，且產生兩個抗原結合位點。雙功能抗體更完整地描述於例如歐洲專利第EP 404,097號；國際專利公開案第WO 93/11161號；及Bolliger等人，《美國國家科學院院刊》**1993**, *90*, 6444-6448中。

【0604】術語「糖基化」係指抗體之經修飾之衍生物。去糖基化抗體缺乏糖基化。糖基化可經改變以例如提高抗體對抗原之親和力。此類碳水化合物修飾可藉由例如改變抗體序列內之一或多個糖基化位點來完成。舉例而言，可進行一或多個胺基酸取代，以消除一或多個可變區構架糖基化位點，藉此消除該位點之糖基化。去糖基化可提高抗體對抗原之親和力，如美國專利第5,714,350號及第6,350,861號中所描述。另外地或替代地，可產生糖基化類型改變之抗體，諸如岩藻糖基殘基量降低之低岩藻糖基化抗體或等分GlcNac結構增加之抗體。此類經改變之糖基化模式已證明會提高抗體之能力。此類碳水化合物修飾可藉由例如在糖基化機制改變之宿主細胞中表現抗體來實現。糖基化機制改變之細胞在本領域中已有描述且可用作表現本發明之重組抗體以藉此產生糖基化改變之抗體的宿主細胞。舉例而言，細胞株Ms704、Ms705及Ms709缺乏岩藻醣基轉移酶基因、FUT8(α(1,6)岩藻醣基轉移酶)，使得Ms704、Ms705及Ms709細胞株中表現之抗體在其碳水化合物上缺乏岩藻醣。Ms704、Ms705及Ms709 FUT8−/−細胞株係藉由使用兩種置換載體靶向破壞CHO/DG44細胞中之FUT8基因而產生(參見例如美國專利公開案第2004/0110704號或Yamane-Ohnuki等人，《生物技術與生物工程(*Biotechnol. Bioeng.*)》，**2004**, *87*, 614-622)。作為另一實例，歐洲專利第EP 1,176,195描述一種具有功能性破壞之FUT8基因之細胞株，該FUT8基因編碼岩藻糖基轉移酶，

使得此類細胞株中表現之抗體藉由減少或消除α1,6鍵相關酶而展現出低岩藻糖基化，且亦描述如下細胞株，該等細胞株具有用於將岩藻糖添加至結合至抗體Fc區之N-乙醯基葡糖胺的低酶活性或不具有酶活性，該細胞株例如為大鼠骨髓瘤細胞株YB2/0(ATCC CRL 1662)。國際專利公開案WO 03/035835描述一種變異型CHO細胞株，即Lec 13細胞，其具有減弱的將岩藻醣連接至Asn(297)連接之碳水化合物的能力，亦導致該宿主細胞中表現之抗體的低岩藻醣基化(亦參見Shields等人，《生物化學雜誌(*J. Biol. Chem.*)》**2002**, *277*, 26733-26740。國際專利公開案第WO 99/54342號描述如下細胞株，其經工程改造以表現糖蛋白修飾型糖基轉移酶(例如β(1,4)-N-乙醯基葡糖胺轉移酶III(GnTIII))，以使得在經工程改造之細胞株內表現之抗體展現出經增加之等分GlcNac結構，其使抗體之ADCC活性增加(亦參見Umana等人，《自然生物技術(*Nat. Biotech.*)》**1999,** *17*, 176-180)。或者，抗體之岩藻醣殘基可使用岩藻糖苷酶裂解。例如，岩藻糖苷酶α-L-岩藻糖苷酶自抗體中移除岩藻糖基殘基，如Tarentino等人，《生物化學(Biochem.)》**1975,** *14*, 5516-5523中所描述。

【0605】「聚乙二醇化」係指經修飾之抗體或其片段，其通常在使一或多個PEG基團連接至抗體或抗體片段之條件下與聚乙二醇(PEG)，諸如PEG之反應性酯或醛衍生物反應。聚乙二醇化可例如增加抗體之生物學(例如血清)半衰期。較佳地，聚乙二醇化經由與反應性PEG分子

(或類似之反應性水溶聚合物)之醯化反應或烷基化反應來進行。如本文所用，術語「聚乙二醇」意欲涵蓋已用於衍生其他蛋白質之任何PEG形式，諸如單(C_1-C_{10})烷氧基或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-順丁烯二醯亞胺。待聚乙二醇化之抗體可為去糖基化抗體。聚乙二醇化方法係本領域中已知的且可應用於本發明之抗體，如在歐洲專利第EP 0154316號及歐洲專利第EP 0401384號及美國專利第5,824,778號中描述的，其各自之揭示內容以引用的方式併入本文中。

【0606】術語「生物類似物」意謂一種生物產品，包含單株抗體或蛋白質，儘管其無臨床活性組分存在少量差異，但其與美國核准之參考生物產品極其類似，且生物產品與參考產品之間在產品之安全性、純度及效力方面不存在有臨床意義的差異。此外，類似生物或「生物類似」藥物係一種與已被歐洲藥物管理局(European Medicines Agency)授權使用之另一生物藥物類似的生物藥物。術語「生物類似物」亦被其他國家及地區監管機構以同義使用。生物產品或生物藥物係由生物來源(諸如細菌或酵母)製成或衍生的藥物。其可由相對較小分子(諸如人類胰島素或紅血球生成素)或複合分子(諸如單株抗體)組成。舉例而言，若參考IL-2蛋白為阿地介白素(PROLEUKIN)，則由藥物監管機構核准之參考阿地介白素的蛋白質為阿地介白素之「生物類似物」或為阿地介白素「其生物類似物」。在歐洲，類似生物或「生物類似」藥物係一種與已被歐洲

藥物管理局授權使用之另一生物藥物類似的生物藥物。歐洲類似生物應用之相關法律依據係法規(EC)第726/2004號第6條及經修訂的指令2001/83/EC第10(4)條，且因此在歐洲，生物類似物可根據法規(EC)第726/2004號第6條及指令2001/83/EC第10(4)條授權、批准授權或作為授權申請的對象。已授權之原始生物藥品在歐洲可稱為「參考藥品」。CHMP關於類似生物藥品之指南中概述了產品被視為係生物類似物的一些要求。此外，產品特定指南，包含與單株抗體生物類似物相關的指南，由EMA逐項產品提供，且發佈在其網站上。如本文所描述，生物類似物可在品質特徵、生物活性、作用機制、安全概況及/或功效方面與參考藥品類似。另外，生物類似物可用於或意欲用於與參考藥品治療相同病狀。因此，可認為如本文所描述之生物類似物具有與參考藥品類似或高度類似之品質特徵。替代地或另外，可認為如本文中所描述之生物類似物具有與參考藥品類似或高度類似之生物活性。替代地或另外，可認為如本文所描述之生物類似物具有與參考藥品類似或高度類似之品安全概況。替代地或另外，可認為如本文所描述之生物類似物具有與參考藥品類似或高度類似之功效。如本文所描述，歐洲生物類似物與已由EMA授權之參考藥品進行比較。然而，在一些情況下，在某些研究中，可將生物類似物與在歐洲經濟區(European Economic Area)以外獲得授權之生物藥品(非EEA授權之「比較物」)相比較。此類研究包含例如某些臨床及活體內非臨床研究。如

本文所使用，術語「生物類似物」亦關於已與或可與非EEA授權之比較物比較之生物藥品。某些生物類似物係蛋白質，諸如抗體、抗體片段(例如抗原結合部分)及融合蛋白。蛋白質生物類似物可具有在胺基酸結構中具有少量修飾(包含例如胺基酸之缺失、添加及/或取代)之胺基酸序列，該等修飾不會顯著影響多肽之功能。生物類似物可包括與其參考醫藥產品之胺基酸序列具有97%或更高(例如97%、98%、99%或100%)序列一致性之胺基酸序列。生物類似物可包括與參考藥品之轉譯後修飾不同的一或多個轉譯後修飾，例如但不限於糖基化、氧化、去醯胺及/或截短，其限制條件為該等差異不會引起藥品之安全性及/或功效之變化。生物類似物可具有與參考藥品相同或不同的糖基化模式。特定言之，雖然並非排他性的，但若差異解決或意欲解決與參考藥品相關之安全問題，則生物類似物可具有不同糖基化模式。另外，生物類似物可在例如其強度、醫藥形式、調配物、賦形劑及/或呈現方式等方面不同於參考藥品，只要該醫品之安全性及功效不受影響。與參考藥品相比，生物類似物可包括例如藥物動力學(PK)及/或藥效動力學(PD)概況之差異，但仍視為與參考藥品充分類似，從而可被授權或視為適於授權。在某些情況下，生物類似物呈現與參考藥品相比不同之結合特徵，其中監管機構(諸如EMA)未將該等不同結合特徵視為類似生物產品獲得授權的障礙。術語「生物類似物」亦被其他國家及地區監管機構以同義使用。

III. 效力測定方法及組合物

【0607】不受任何特定理論的限制，據信商業上可行的TIL及T細胞效力測定受到新抗原表現目標細胞的不可用、患者與其腫瘤表現的新抗原之間缺乏重疊以及無法及時鑑別所有相關的新抗原來構築測定限制。因此，與使用經轉導嵌合抗原受體的商業及臨床T細胞療法(其在使用基於目標之測定的一些情況下已獲得監管批准)不同，對於多株T細胞產物(例如TIL、MIL或PBL療法或產物)而言，基於目標之測定在有效癌症治療所需的時間尺度上係不可行的。同時，基於珠粒之測定由於無法概括TIL或T細胞的天然活化及殺傷能力而受到限制。舉例而言，在更佳的係結合至TCR本身的情況下，利用抗CD3塗層之基於珠粒或基於培養盤之測定結合至TIL或T細胞上與TCR非共價締合之CD3 ε鏈。因此，採用CD3之基於珠粒之測定的缺點在於其不使用TCR之α及β分量進行相互作用。珠粒上存在其他共刺激分子，諸如CD28或CD137(4-1BB)，亦會導致非天然且次佳的相互作用，至少因為活化此等共刺激分子而得到對腫瘤駐存細胞(諸如TIL)具有較低選擇性的測定。本發明提供了此等問題的解決方案。不受任何特定理論的限制，據信目標細胞上之MHC或HLA與T細胞(包含TIL、MIL或PBL)的TCR之間的相互作用產生分析物，該分析物可與由T細胞(包含TIL、MIL或PBL)產生的分析物進行比較，與MHC陰性對照共培養，以評估T細胞(包含TIL、

MIL或PBL)的一種或多種特性(諸如其效力、身分或其他有用的特徵)，以幫助製造或提供癌症療法。此外，再次不受任何特定理論的限制，據信，由於在腫瘤部位發現了諸如TIL和MIL的T細胞，或者先前已藉由腫瘤暴露活化PBL，因此此類T細胞(包含TIL、MIL及PBL)係已交叉活化的或活化的T細胞，其中CD28及4-1BB已被活化。

【0608】在一實施例中，本發明包含效力測定組合物，其包括在培養基中共培養之Raji細胞及T細胞(諸如TIL)。在一實施例中，本發明包含效力測定組合物，其包括在培養基中共培養之Thp1細胞及T細胞(諸如TIL)。在一實施例中，本發明包含效力測定組合物，其包括在培養基中共培養之Ramos細胞及T細胞(諸如TIL)。在一實施例中，本發明包含效力測定組合物，其包括在培養基中共培養之U937細胞及T細胞(諸如TIL)。在一實施例中，本發明包含效力測定組合物，其包括在培養基中共培養之Daudi細胞及T細胞(諸如TIL)。在一實施例中，效力測定組合物包括在培養基中共培養且用作陰性對照的K562細胞及T細胞(諸如TIL)。在一實施例中，效力測定組合物包括在培養基中共培養且用作混合淋巴球反應(MLR)陽性對照的末梢血液單核細胞(PBMC)及T細胞(諸如TIL)。在一實施例中，前述實施例中之TIL及PBMC來自同一患者。在一實施例中，使用Gen 2或Gen 3過程或如本文中所描述之其他製造過程來製造TIL。在一實施例中，使用至少一個REP步驟製造TIL。在一實施例中，使用利用本文所描述之擴增

或製造過程產生之TIL、MIL或PBL進行效力測定。在一實施例中，在用以下中描述之過程製造之後，用本文所描述之效力測定測試TIL：美國專利申請公開案第US 2018/0282694 A1號或美國專利第10,130,659號、第10,166,257號、第10,272,113號、第10,363,273號、第10,398,734號、第10,420,799號、第10,463,697號、第10,537,595號、第10,646,517號、第10,653,723號、第10,693,330號、第10,695,372號、第10,894,063及第10,905,718號，該等專利中之每一者的揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，在用美國專利第10,918,666號中描述之過程製造之後，用本文所描述之效力測定測試TIL，該專利的揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，在用美國專利申請公開案第US 2020/0277573 A1號中描述之過程製造之後，用本文所描述之效力測定測試TIL，該專利的揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，在用國際專利申請公開案第WO 2019/210131 A1號中描述之過程製造之後，用本文所描述之效力測定測試TIL，該專利的揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，在用國際專利申請公開案第WO 2019/136456 A1號中描述之過程製造之後，用本文所描述之效力測定測試TIL，該專利的揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，在用國際專利申請公開案第WO 2021/123832 A1號中描述之過程製造之後，用本文所描述之效力測定測試TIL，該專利的揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，

在用美國專利申請公開案第US 2020/0224161 A1號中描述之過程製造之後，用本文所描述之效力測定測試MIL及PBL，該專利的揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，在用國際專利申請公開案第2019/145711 A1號中描述之過程製造之後，用本文所描述之效力測定測試TIL，該專利的揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，在用國際專利申請公開案第WO 2020/152451 A1號中描述之過程製造之後，用本文所描述之效力測定測試TIL，該專利的揭示內容以引用之方式併入本文中。

A. 測定方法

【0609】在一實施例中，本發明包含一種用於使用能夠結合至T細胞受體之目標細胞確定T細胞產物之效力的方法。在一實施例中，本發明包含一種基於T細胞或TIL、MIL或PBL TCR複合物與目標細胞的HLA-肽複合物之同種異體相互作用(亦稱為MHC顯性識別)的測定。在一實施例中，本發明包含利用T細胞或TIL、MIL或PBL TCR複合物與目標細胞的MHC顯性識別來產生分析物的測定，該分析物與由T細胞或TIL與MHC陰性對照之共培養產生的分析物進行比較。在一實施例中，T細胞或TIL、MIL或PBL TCR複合物與目標細胞的結合係經由其α(α)及β(β)鏈發生。在一實施例中，目標細胞表現HLA。在一實施例中，目標細胞為B細胞。在一實施例中，目標細胞為B細胞類淋巴母細胞或B類淋巴母細胞。在一實施例中，目標細胞

為伯基特氏淋巴瘤細胞。在一實施例中，目標細胞為骨髓譜系細胞。在一實施例中，目標細胞為單核球。在一實施例中，目標細胞為急性單核球性白血病細胞。在一實施例中，目標細胞為M5亞型急性單核球性白血病細胞。在一實施例中，目標細胞為Raji細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，目標細胞為Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，目標細胞為Ramos細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，目標細胞為U937細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，目標細胞為Daudi細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，目標細胞為黑色素細胞。在一實施例中，目標細胞為HLA-A-02陽性黑色素細胞。在一實施例中，目標細胞為黑色素瘤細胞。在一實施例中，目標細胞為HLA-A-02陽性黑色素瘤細胞。在一實施例中，目標細胞為選自由以下組成之群組的黑色素瘤細胞：Sk-MEL-5、Malme-3M、SK-MEL-28、SK-MEL-3、SH-4、SK-MEL-24、RPMI-7951、SK-MEL-1、A375、G-361及其組合。

【0610】在一實施例中，本發明包含基於在腫瘤細胞與T細胞(諸如使用本文所述之擴增或製造過程產生的TIL、MIL或PBL)之間發生的同種異體反應性TCR或HLA識別的測定。在一實施例中，本發明包含基於在Raji、Thp1、Ramos、U937或Daudi細胞或其衍生物、變體、修飾或後代與T細胞(諸如使用本文所描述之擴增或製造過程

產生之TIL、MIL或PBL)之間發生的同種異體反應性TCR或HLA識別的測定。在一實施例中，本發明包含將前述實施例與如本文所描述之陰性對照組合使用。在一實施例中，陰性對照充當T細胞(諸如TIL、MIL或PBL)之基礎或基線活性水準，用於與基於MHC顯性識別之T細胞測定相比較。在一實施例中，陰性對照為缺乏HLA I類及/或HLA II類表現之細胞株。在一實施例中，陰性對照為缺乏MHC I類及/或MHC II類表現之細胞株。在一實施例中，陰性對照為缺乏HLA或MHC來控測定可變性之細胞株。在一實施例中，陰性對照為缺乏HLA或MHC以證明MHC顯性識別為效力分析之主要變數的細胞株。

【0611】在一實施例中，本發明包含藉由將T細胞產物(諸如TIL、MIL或PBL產物)與K562細胞共培養而使用K562細胞或其衍生物、變體、修飾或後代作為如本文所描述之陰性對照。使用K562細胞作為陰性對可與本文所描述之測定以及珠粒及培養盤結合抗體刺激之生物測定(諸如針對IFN-γ之抗CD3培養盤測定)一起使用。

【0612】在一實施例中，本發明包含藉由將T細胞產物(諸如TIL、MIL或PBL產物)與目標細胞或目標細胞組合共培養而使用如本文所描述之一或多種HLA阻斷抗體或其片段、衍生物、變體或修飾作為陰性對照。使用一種HLA阻斷抗體或多種HLA阻斷抗體作為陰性對照可以與本文所描述之測定一起使用。

【0613】在一些實施例中，檢查藉由本文所描述或本

領域中已知之方法產生的經擴增TIL之效力及/或功能性。檢查經擴增TIL的效力及/或功能性允許表徵臨床TIL產物批次。在一實施例中，TIL效力經定義為視情況與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時的選擇表面標記物之表現增加，表示為標記物陽性細胞百分比或平均螢光強度(MFI)。或者，可單獨培養Raji細胞、K562及TIL。在一些實施例中，使用來自自其獲得TIL或MIL之同一患者的PBMC作為對照。在一些實施例中，基於珠粒之CD3/CD28刺激亦可用作對照。在一些實施例中，基於珠粒之CD3/CD28/CD137刺激亦可用作對照。在一些實施例中，添加針對CD28之小鼠單株抗體用於確保額外共刺激以擴增T細胞反應。在一些實施例中，將PBMC與各TIL批次一起共培養，作為MLR反應之陽性對照。

【0614】在一實施例中，效力測定包含共培養步驟，其中共培養進行選自由以下組成之群組的時段：30分鐘、1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、11小時、12小時、13小時、14小時、15小時、16小時、17小時、18小時、19小時、20小時、21小時、22小時、23小時、24小時、25小時、26小時、27小時、28小時、29小時、30小時、31小時、32小時、33小時、34小時、35小時、36小時、37小時、38小時、39小時、40小時、41小時、42小時、43小時、44小時、45小時、46小時、47小時、48小時、49小時及50小時。在一實施例中，效力分析包含共培養步驟，其中共培

養進行選自由6小時、12小時、18小時、24小時及32小時組成之群組的時段。

【0615】在一實施例中，效力測定包含目標細胞及T細胞(包含TIL、MIL或PBL)共培養步驟，其中共培養進行選自由以下組成之群組的時段：30分鐘、1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、11小時、12小時、13小時、14小時、15小時、16小時、17小時、18小時、19小時、20小時、21小時、22小時、23小時、24小時、25小時、26小時、27小時、28小時、29小時、30小時、31小時、32小時、33小時、34小時、35小時、36小時、37小時、38小時、39小時、40小時、41小時、42小時、43小時、44小時、45小時、46小時、47小時、48小時、49小時及50小時。在一實施例中，效力分析包含共培養步驟，其中共培養進行選自由6小時、12小時、18小時、24小時及32小時組成之群組的時段。

【0616】在一實施例中，效力測定包含陰性對照細胞及T細胞(包含TIL、MIL或PBL)共培養步驟，其中共培養進行持續選自由以下組成之群組的時段：30分鐘、1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、11小時、12小時、13小時、14小時、15小時、16小時、17小時、18小時、19小時、20小時、21小時、22小時、23小時、24小時、25小時、26小時、27小時、28小時、29小時、30小時、31小時、32小

時、33小時、34小時、35小時、36小時、37小時、38小時、39小時、40小時、41小時、42小時、43小時、44小時、45小時、46小時、47小時、48小時、49小時及50小時。在一實施例中，效力分析包含共培養步驟，其中共培養進行選自由6小時、12小時、18小時、24小時及32小時組成之群組的時段。

【0617】在一實施例中，本發明包含用於測定與臨床益處相關之TIL、MIL、PBL或其他T細胞產物之效力的效力測定方法。可以多種方式量測臨床益處，包含但不限於證實活體外細胞功能、疾病控制率、整體反應率、反應持續時間或臨床益處或潛在臨床益處之其他科學量度。

【0618】在一些實施例中，藉由本文所描述之共培養測定來檢驗經擴增或調配之TIL、MIL及PBL之效力。檢查經擴增或調配之TIL、MIL及PBL之效力允許表徵TIL、MIL或PBL產物批次。亦稱為活化之TIL、MIL或PBL之效力經定義為與TIL、MIL或PBL與K562細胞之共培養相比，在TIL、MIL或PBL與Raji細胞或其衍生物、變體、修飾或後代之共培養時，選擇表面標記物之表現增加，表示為標記物陽性細胞百分比或平均螢光強度(MFI)。

【0619】在一實施例中，本發明包含使用能夠結合至T細胞受體之目標細胞來確定T細胞產物之效力的方法，其中用於測定效力之方法為同種異體識別測定。在一實施例中，本發明包含使用能夠結合至T細胞受體之目標細胞來確定T細胞產物之效力的方法，其中用於測定效力之方法

為同種異體識別測定。在一實施例中，本發明包含使用能夠結合至T細胞受體之Raji細胞或其衍生物、變體、修飾或後代來確定T細胞產物之效力的方法，其中用於測定效力之方法為同種異體識別測定。在一實施例中，本發明包含使用能夠結合至T細胞受體之Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代來確定T細胞產物之效力的方法，其中用於測定效力之方法為同種異體識別測定。在一實施例中，本發明包含使用能夠結合至T細胞受體之Ramos細胞或其衍生物、變體、修飾或後代來確定T細胞產物之效力的方法，其中用於測定效力之方法為同種異體識別測定。在一實施例中，本發明包含使用能夠結合至T細胞受體之U937細胞或其衍生物、變體、修飾或後代來確定T細胞產物之效力的方法，其中用於測定效力之方法為同種異體識別測定。在一實施例中，本發明包含使用能夠結合至T細胞受體之Daudi細胞或其衍生物、變體、修飾或後代來確定T細胞產物之效力的方法，其中用於測定效力之方法為同種異體識別測定。

【0620】在一實施例中，本發明包含使用能夠結合至T細胞受體之目標細胞來確定T細胞產物之效力的方法，其中使用酶聯免疫吸附測定(ELISA)偵測方法來偵測蛋白質之分泌或表現。在另一個實施例中，ELISA方法使用自動化或機器人系統自動化，例如ELLA系統(可自美國加利福尼亞州聖荷西BioTechne，Inc.的ProteinSimple部門獲得)、ISOPLEXIS系統(可自美國康乃狄克州布蘭福德

Isoplexis, Inc.獲得，或LUNARIS系統(可自德國科隆AYOXA Biosystems GmbH獲得)。在一實施例中，效力測定偵測係使用多重測定偵測進行的，諸如LUMINEX系統(可自美國明尼蘇達州明尼蘇達州BioTechne, Inc.的R&D Systems部門獲得)。在一實施例中，本發明包含使用流動式細胞測量術偵測方法之效力測定方法。在一實施例中，本發明包含一種用於分泌蛋白之效力測定方法。在一實施例中，本發明包含一種用於細胞表面或結合蛋白之效力測定方法。在一實施例中，本發明包含使用結合測定偵測方法之效力測定方法。在一實施例中，ELLA系統量測活化本文所描述之共培養測定後之IFN-γ濃度，其中篩選自共培養收集的上清液以便在各多孔(諸如72孔)經商業驗證之料筒上產生IFN-γ。在一實施例中，ELLA自動化系統執行包含動態範圍中之四個靈敏度對數的亞皮克級靈敏度。在一實施例中，相較於傳統ELISA方法，藉由使用ELLA系統使程序誤差最小化來增加測定之可重複性及精確性。

【0621】在一實施例中，本發明包含使用能夠結合至T細胞受體之目標細胞來確定T細胞產物之效力的方法，其中使用一種偵測方法來偵測分析物之分泌或表現。在一實施例中，偵測到的分析物係蛋白質。在一實施例中，偵測到的分析物係細胞介素。在一實施例中，偵測到的分析物係干擾素。在一實施例中，偵測到的分析物係干擾素-α，亦稱為IFN-α或IFNα。在一實施例中，偵測到的分析物係干擾素-α，亦稱為IFN-β或IFNβ。在一實施例中，偵測到

的分析物係干擾素-γ，亦稱為IFN-γ或IFNγ。在一實施例中，偵測到的分析物係顆粒酶B，亦稱為GzmB。在一實施例中，偵測到的分析物係穿孔素。在一實施例中，偵測到的分析物係腫瘤壞死因子α，亦稱為TNF-α或TNFα。在一實施例中，偵測到的分析物係介白素。在一實施例中，偵測到的分析物係IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、IL-13、IL-14、IL-16、IL-17、IL-18、IL-22、IL-25或IL-26。在一實施例中，偵測到的分析物係CD25。在一實施例中，偵測到的分析物係CD69。在一實施例中，偵測到的分析物係CD137(4-1BB)。在一實施例中，偵測到的分析物係CD134(OX40)。在一實施例中，偵測到的分析物係CCL4。在一實施例中，偵測到的分析物係CD150，亦稱為SLAM、SLAM F1或傳訊淋巴球性活化分子1。在一實施例中，偵測到的分析物係KLRG1。在一實施例中，偵測到的分析物係KLRG1。在一實施例中，偵測到的分析物係分泌的MIP-1β。

【0622】在一實施例中，本發明包含一種使用能夠結合至T細胞受體之目標細胞確定T細胞產物之效力的方法，其中使用一種偵測方法偵測分析物之分泌或表現，其中T細胞產物為TIL產物，且其中分析物為選自由CD25、CD69、CD134、CD137及CD150組成之群組的細胞表面標記物。

【0623】在一實施例中，本發明包含一種使用能夠同

種異體結合於T細胞受體之細胞確定T細胞產物之效力的方法，其中使用包括缺乏MHC I及MHC II表現之細胞的陰性對照與T細胞產物(諸如TIL、MIL或PBL產物)同目標細胞之共培養物進行比較。在一實施例中，本發明包含一種使用能夠同種異體結合於T細胞受體之Raji細胞確定TIL產物之效力的方法，其中使用包括缺乏MHC I及MHC II表現之K562細胞的陰性對照與TIL產物同Raji細胞之共培養物進行比較。

【0624】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時表示為標記物陽性細胞百分比或平均螢光強度(MFI)之選擇表面標記物的表現增加為至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%之增加。

【0625】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時表示為標記物陽性細胞百分比或平均螢光強度(MFI)之選擇表面標記物的表現增加為至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%之增加。

【0626】在一些實施例中，來自本文所描述之共培養方法的上清液在自共培養物中取出後立即進行測試。在一實施例中，來自本文所描述之共培養方法的上清液在自共培養物取出之後1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6

小時、7小時、8小時、10小時、12小時、18小時、24小時或48小時進行測試。在一實施例中，來自本文所描述之共培養方法之上清液在自共培養物中取出之後冷凍且隨後解凍用於測試。在一些實施例中，評估來自本文所描述之共培養方法之上清液的IFN-γ、顆粒酶B、TNF-α、CCL4及/或MIP-1β分泌。

【0627】在一些實施例中，本發明提供一種確定TIL活性的方法，其包括以下步驟：a)輻照Raji細胞及K562細胞；(b)視情況使用促效性或超促效性抗CD28抗體，將經輻照之Raji細胞及經輻照之K562細胞與TIL在以下一種或多種目標比(50:1、25:1、12.5:1、6.25:1、3:1、1:1、1:3、1:6.25、1:12.5、1:25)下共培養；(c)在6至24小時後自步驟(b)中的共培養細胞中收集上清液；(d)自步驟(b)中收集細胞並量測T細胞活化之表面標記物表現；(e)測定步驟(c)中收集之共培養細胞的上清液中的T細胞活化標記物。

【0628】在一些實施例中，在冷凍保存TIL之前檢查經擴增TIL之效力及/或功能性。在一些實施例中，在冷凍保存之後檢查經擴增之TIL之效力及/或功能性。在一實施例中，作為醫藥產品之釋放測試的一部分，檢查TIL、MIL或PBL產物之效力。在一實施例中，作為醫藥產品之穩定性測試的一部分，例如在解凍冷凍保存之產品之後或在先前解凍或從未冷凍之產品在不同環境條件下儲存明確時段之後檢查TIL、MIL或PBL產物之效力。

【0629】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時表示為標記物陽性細胞百分比或平均螢光強度(MFI)之選擇表面標記物的表現增加為至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%之增加。

【0630】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時表示為標記物陽性細胞百分比或平均螢光強度(MFI)之選擇表面標記物的表現增加為增加至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少3.5倍、至少4倍、至少4.5倍、至少5倍、至少5.5倍、至少6倍、至少6.5倍、至少7倍、至少7.5倍、至少8倍、至少8.5倍、至少9倍、至少9.5倍、至少10倍、至少11倍、至少12倍、至少13倍、至少14倍、至少15倍、至少16倍、至少17倍、至少18倍、至少19倍、至少20倍、至少25倍、至少30倍、至少35倍、至少40倍、至少45倍、至少50倍、至少55倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍或至少100倍。

【0631】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時表示為標記物陽性細胞百分比或平均螢光強度(MFI)之CD25的表現增加為至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%之增加。

【0632】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與

Raji細胞共培養時表示為標記物陽性細胞百分比或平均螢光強度(MFI)之CD25的表現增加為增加至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少3.5倍、至少4倍、至少4.5倍、至少5倍、至少5.5倍、至少6倍、至少6.5倍、至少7倍、至少7.5倍、至少8倍、至少8.5倍、至少9倍、至少9.5倍、至少10倍、至少11倍、至少12倍、至少13倍、至少14倍、至少15倍、至少16倍、至少17倍、至少18倍、至少19倍、至少20倍、至少25倍、至少30倍、至少35倍、至少40倍、至少45倍、至少50倍、至少55倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍或至少100倍。

【0633】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時表示為標記物陽性細胞百分比或平均螢光強度(MFI)之CD69的表現增加為至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%之增加。

【0634】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時表示為標記物陽性細胞百分比或平均螢光強度(MFI)之CD69的表現增加為增加至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少3.5倍、至少4倍、至少4.5倍、至少5倍、至少5.5倍、至少6倍、至少6.5倍、至少7倍、至少7.5倍、至少8倍、至少8.5倍、至少9倍、至少9.5倍、至少10倍、至少11倍、至少12倍、至少13倍、至少14倍、至少15倍、至少16倍、至少17倍、至少18倍、至少19倍、至少20倍、至少25倍、至少30倍、至少

35倍、至少40倍、至少45倍、至少50倍、至少55倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍或至少100倍。

【0635】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時表示為標記物陽性細胞百分比或平均螢光強度(MFI)之CD134的表現增加為至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%之增加。

【0636】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時表示為標記物陽性細胞百分比或平均螢光強度(MFI)之CD134的表現增加為增加至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少3.5倍、至少4倍、至少4.5倍、至少5倍、至少5.5倍、至少6倍、至少6.5倍、至少7倍、至少7.5倍、至少8倍、至少8.5倍、至少9倍、至少9.5倍、至少10倍、至少11倍、至少12倍、至少13倍、至少14倍、至少15倍、至少16倍、至少17倍、至少18倍、至少19倍、至少20倍、至少25倍、至少30倍、至少35倍、至少40倍、至少45倍、至少50倍、至少55倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍或至少100倍。

【0637】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時表示為標記物陽性細胞百分比或平均螢光強度(MFI)之CD137的表現增加為至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%之增加。

【0638】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與

Raji細胞共培養時表示為標記物陽性細胞百分比或平均螢光強度(MFI)之CD137的表現增加為增加至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少3.5倍、至少4倍、至少4.5倍、至少5倍、至少5.5倍、至少6倍、至少6.5倍、至少7倍、至少7.5倍、至少8倍、至少8.5倍、至少9倍、至少9.5倍、至少10倍、至少11倍、至少12倍、至少13倍、至少14倍、至少15倍、至少16倍、至少17倍、至少18倍、至少19倍、至少20倍、至少25倍、至少30倍、至少35倍、至少40倍、至少45倍、至少50倍、至少55倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍或至少100倍。

【0639】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時表示為標記物陽性細胞百分比或平均螢光強度(MFI)之CD150的表現增加為至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%之增加。

【0640】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時表示為標記物陽性細胞百分比或平均螢光強度(MFI)之CD150的表現增加為增加至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少3.5倍、至少4倍、至少4.5倍、至少5倍、至少5.5倍、至少6倍、至少6.5倍、至少7倍、至少7.5倍、至少8倍、至少8.5倍、至少9倍、至少9.5倍、至少10倍、至少11倍、至少12倍、至少13倍、至少14倍、至少15倍、至少16倍、至少17倍、至少18倍、至少19倍、至少20倍、至少25倍、至少30倍、至少

35倍、至少40倍、至少45倍、至少50倍、至少55倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍或至少100倍。

【0641】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時表示或分泌為ELISA偵測的分析物百分比或平均螢光強度(MFI)之顆粒酶B的表現增加為至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%之增加。

【0642】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時以ELISA偵測的分析物百分比或平均螢光強度(MFI)表示或分泌之顆粒酶B的表現增加為增加至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少3.5倍、至少4倍、至少4.5倍、至少5倍、至少5.5倍、至少6倍、至少6.5倍、至少7倍、至少7.5倍、至少8倍、至少8.5倍、至少9倍、至少9.5倍、至少10倍、至少11倍、至少12倍、至少13倍、至少14倍、至少15倍、至少16倍、至少17倍、至少18倍、至少19倍、至少20倍、至少25倍、至少30倍、至少35倍、至少40倍、至少45倍、至少50倍、至少55倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍或至少100倍。

【0643】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時以ELISA偵測的分析物百分比或平均螢光強度(MFI)表示或分泌之IFN-γ的表現增加為至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至

少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%之增加。

【0644】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時以ELISA偵測的分析物百分比或平均螢光強度(MFI)表示或分泌之IFN-γ的表現增加為增加至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少3.5倍、至少4倍、至少4.5倍、至少5倍、至少5.5倍、至少6倍、至少6.5倍、至少7倍、至少7.5倍、至少8倍、至少8.5倍、至少9倍、至少9.5倍、至少10倍、至少11倍、至少12倍、至少13倍、至少14倍、至少15倍、至少16倍、至少17倍、至少18倍、至少19倍、至少20倍、至少25倍、至少30倍、至少35倍、至少40倍、至少45倍、至少50倍、至少55倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍或至少100倍。

【0645】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時以ELISA偵測的分析物百分比或平均螢光強度(MFI)表示或分泌之TNF-α的表現增加為至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%之增加。

【0646】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時以ELISA偵測的分析物百分比或平均螢光強度(MFI)表示或分泌之TNF-α的表現增加為增加至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少3.5

倍、至少4倍、至少4.5倍、至少5倍、至少5.5倍、至少6倍、至少6.5倍、至少7倍、至少7.5倍、至少8倍、至少8.5倍、至少9倍、至少9.5倍、至少10倍、至少11倍、至少12倍、至少13倍、至少14倍、至少15倍、至少16倍、至少17倍、至少18倍、至少19倍、至少20倍、至少25倍、至少30倍、至少35倍、至少40倍、至少45倍、至少50倍、至少55倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍或至少100倍。

【0647】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時以ELISA偵測的分析物百分比或平均螢光強度(MFI)表示或分泌之穿孔素的表現增加為至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%之增加。

【0648】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時以ELISA偵測的分析物百分比或平均螢光強度(MFI)表示或分泌之穿孔素的表現增加為增加至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少3.5倍、至少4倍、至少4.5倍、至少5倍、至少5.5倍、至少6倍、至少6.5倍、至少7倍、至少7.5倍、至少8倍、至少8.5倍、至少9倍、至少9.5倍、至少10倍、至少11倍、至少12倍、至少13倍、至少14倍、至少15倍、至少16倍、至少17倍、至少18倍、至少19倍、至少20倍、至少25倍、至少30倍、至少35倍、至少40倍、至少45倍、至少50倍、至少55

倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍或至少100倍。

【0649】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時以ELISA偵測的分析物百分比或平均螢光強度(MFI)表示或分泌之CCL4的表現增加為至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%之增加。

【0650】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時以ELISA偵測的分析物百分比或平均螢光強度(MFI)表示或分泌之CCL4的表現增加為增加至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少3.5倍、至少4倍、至少4.5倍、至少5倍、至少5.5倍、至少6倍、至少6.5倍、至少7倍、至少7.5倍、至少8倍、至少8.5倍、至少9倍、至少9.5倍、至少10倍、至少11倍、至少12倍、至少13倍、至少14倍、至少15倍、至少16倍、至少17倍、至少18倍、至少19倍、至少20倍、至少25倍、至少30倍、至少35倍、至少40倍、至少45倍、至少50倍、至少55倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍或至少100倍。

【0651】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時以ELISA偵測的分析物百分比或平均螢光強度(MFI)表示或分泌之MIP-1β的表現增加為至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少

50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%之增加。

【0652】在一些實施例中，與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時以ELISA偵測的分析物百分比或平均螢光強度(MFI)表示或分泌之MIP-1β的表現增加為增加至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少3.5倍、至少4倍、至少4.5倍、至少5倍、至少5.5倍、至少6倍、至少6.5倍、至少7倍、至少7.5倍、至少8倍、至少8.5倍、至少9倍、至少9.5倍、至少10倍、至少11倍、至少12倍、至少13倍、至少14倍、至少15倍、至少16倍、至少17倍、至少18倍、至少19倍、至少20倍、至少25倍、至少30倍、至少35倍、至少40倍、至少45倍、至少50倍、至少55倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍或至少100倍。

【0653】在一些實施例中，與Raji細胞共培養時分泌的顆粒酶B之數量為至少20 pg/mL、至少30 pg/mL、至少40 pg/mL、至少50 pg/mL、至少60 pg/mL、至少70 pg/mL、至少80 pg/mL、至少90 pg/mL、至少100 pg/mL、至少150 pg/mL、至少200 pg/mL、至少250 pg/mL、至少300 pg/mL、至少350 pg/mL、至少400 pg/mL、至少450 pg/mL、至少500 pg/mL、至少600 pg/mL、至少700 pg/mL、至少800 pg/mL、至少900 pg/mL、至少1000 pg/mL、至少1100 pg/mL或至少1200 pg/mL，其中每毫升測試物含有1×10^5個TIL、2×10^5個TIL、3×10^5個TIL、

4×10^5個TIL、5×10^5個TIL、6×10^5個TIL、7×10^5個TIL、8×10^5個TIL、9×10^5個TIL或10×10^5個TIL。

【0654】在一些實施例中，與Raji細胞共培養時分泌的IFN-γ之數量為至少20 pg/mL、至少30 pg/mL、至少40 pg/mL、至少50 pg/mL、至少60 pg/mL、至少70 pg/mL、至少80 pg/mL、至少90 pg/mL、至少100 pg/mL、至少150 pg/mL、至少200 pg/mL、至少250 pg/mL、至少300 pg/mL、至少350 pg/mL、至少400 pg/mL、至少450 pg/mL、至少500 pg/mL、至少600 pg/mL、至少700 pg/mL、至少800 pg/mL、至少900 pg/mL、至少1000 pg/mL、至少1100 pg/mL或至少1200 pg/mL，其中每毫升測試物含有1×10^5個TIL、2×10^5個TIL、3×10^5個TIL、4×10^5個TIL、5×10^5個TIL、6×10^5個TIL、7×10^5個TIL、8×10^5個TIL、9×10^5個TIL或10×10^5個TIL。

【0655】在一些實施例中，與Raji細胞共培養時分泌的TNF-α之數量為至少20 pg/mL、至少30 pg/mL、至少40 pg/mL、至少50 pg/mL、至少60 pg/mL、至少70 pg/mL、至少80 pg/mL、至少90 pg/mL、至少100 pg/mL、至少150 pg/mL、至少200 pg/mL、至少250 pg/mL、至少300 pg/mL、至少350 pg/mL、至少400 pg/mL、至少450 pg/mL、至少500 pg/mL、至少600 pg/mL、至少700 pg/mL、至少800 pg/mL、至少900 pg/mL、至少1000 pg/mL、至少1100 pg/mL或至少1200 pg/mL，其中每毫升測試物含有1×10^5個TIL、2×10^5個TIL、3×10^5個TIL、

4×10^5個TIL、5×10^5個TIL、6×10^5個TIL、7×10^5個TIL、8×10^5個TIL、9×10^5個TIL或10×10^5個TIL。

【0656】在一些實施例中，與Raji細胞共培養時分泌的穿孔素之數量為至少20 pg/mL、至少30 pg/mL、至少40 pg/mL、至少50 pg/mL、至少60 pg/mL、至少70 pg/mL、至少80 pg/mL、至少90 pg/mL、至少100 pg/mL、至少150 pg/mL、至少200 pg/mL、至少250 pg/mL、至少300 pg/mL、至少350 pg/mL、至少400 pg/mL、至少450 pg/mL、至少500 pg/mL、至少600 pg/mL、至少700 pg/mL、至少800 pg/mL、至少900 pg/mL、至少1000 pg/mL、至少1100 pg/mL或至少1200 pg/mL，其中每毫升測試物含有1×10^5個TIL、2×10^5個TIL、3×10^5個TIL、4×10^5個TIL、5×10^5個TIL、6×10^5個TIL、7×10^5個TIL、8×10^5個TIL、9×10^5個TIL或10×10^5個TIL。

【0657】在一些實施例中，與Raji細胞共培養時分泌的CCL4之數量為至少20 pg/mL、至少30 pg/mL、至少40 pg/mL、至少50 pg/mL、至少60 pg/mL、至少70 pg/mL、至少80 pg/mL、至少90 pg/mL、至少100 pg/mL、至少150 pg/mL、至少200 pg/mL、至少250 pg/mL、至少300 pg/mL、至少350 pg/mL、至少400 pg/mL、至少450 pg/mL、至少500 pg/mL、至少600 pg/mL、至少700 pg/mL、至少800 pg/mL、至少900 pg/mL、至少1000 pg/mL、至少1100 pg/mL或至少1200 pg/mL，其中每毫升測試物含有1×10^5個TIL、2×10^5個TIL、3×10^5個TIL、

4×10^5個TIL、5×10^5個TIL、6×10^5個TIL、7×10^5個TIL、8×10^5個TIL、9×10^5個TIL或10×10^5個TIL。

【0658】在一些實施例中，與Raji細胞共培養時分泌的MIP-1β之數量為至少20 pg/mL、至少30 pg/mL、至少40 pg/mL、至少50 pg/mL、至少60 pg/mL、至少70 pg/mL、至少80 pg/mL、至少90 pg/mL、至少100 pg/mL、至少150 pg/mL、至少200 pg/mL、至少250 pg/mL、至少300 pg/mL、至少350 pg/mL、至少400 pg/mL、至少450 pg/mL、至少500 pg/mL、至少600 pg/mL、至少700 pg/mL、至少800 pg/mL、至少900 pg/mL、至少1000 pg/mL、至少1100 pg/mL或至少1200 pg/mL，其中每毫升測試物含有1×10^5個TIL、2×10^5個TIL、3×10^5個TIL、4×10^5個TIL、5×10^5個TIL、6×10^5個TIL、7×10^5個TIL、8×10^5個TIL、9×10^5個TIL或10×10^5個TIL。

【0659】在一實施例中，目標細胞與T細胞(包含TIL、MIL或PBL)的比率選自由以下組成之群組：約1:1.1、約1:1.2、約1:1.3、約1:1.4、約1:1.5、約1:1.6、約1:1.7、約1:1.8、約1:1.9、約1:2、約1:2.1、約1:2.2、約1:2.3、約1:2.4、約1:2.5、約1:2.6、約1:2.7、約1:2.8、約1:2.9、約1:3、約1:3.1、約1:3.2、約1:3.3、約1:3.4、約1:3.5、約1:3.6、約1:3.7、約1:3.8、約1:3.9、約1:4、約1:4.1、約1:4.2、約1:4.3、約1:4.4、約1:4.5、約1:4.6、約1:4.7、約1:4.8、約1:4.9、約1:5、約1:5.1、約1:5.2、約1:5.3、約1:5.4、約1:5.5、約1:5.6、約1:5.7、約1:5.8、約

1:5.9、約1:6、約1:6.1、約1:6.2、約1:6.25、約1:6.3、約1:6.4、約1:6.5、約1:6.6、約1:6.7、約1:6.8、約1:6.9、約1:7、約1:7.1、約1:7.2、約1:7.3、約1:7.4、約1:7.5、約1:7.6、約1:7.7、約1:7.8、約1:7.9、約1:8、約1:8.1、約1:8.2、約1:8.3、約1:8.4、約1:8.5、約1:8.6、約1:8.7、約1:8.8、約1:8.9、約1:9、約1:9.1、約1:9.2、約1:9.3、約1:9.4、約1:9.5、約1:9.6、約1:9.7、約1:9.8、約1:9.9、約1:10、約1:11、約1:12、約1:12.5、約1:13、約1:14、約1:15、約1:16、約1:17、約1:18、約1:19、約1:20、約1:25、約1:30、約1:35、約1:40、約1:45、約1:50、約1:60、約1:70、約1:80、約1:90或約1:100。

【0660】在一實施例中，T細胞(包含TIL、MIL或PBL)與目標細胞的比率選自由以下組成之群組：約1:1.1、約1:1.2、約1:1.3、約1:1.4、約1:1.5、約1:1.6、約1:1.7、約1:1.8、約1:1.9、約1:2、約1:2.1、約1:2.2、約1:2.3、約1:2.4、約1:2.5、約1:2.6、約1:2.7、約1:2.8、約1:2.9、約1:3、約1:3.1、約1:3.2、約1:3.3、約1:3.4、約1:3.5、約1:3.6、約1:3.7、約1:3.8、約1:3.9、約1:4、約1:4.1、約1:4.2、約1:4.3、約1:4.4、約1:4.5、約1:4.6、約1:4.7、約1:4.8、約1:4.9、約1:5、約1:5.1、約1:5.2、約1:5.3、約1:5.4、約1:5.5、約1:5.6、約1:5.7、約1:5.8、約1:5.9、約1:6、約1:6.1、約1:6.2、約1:6.25、約1:6.3、約1:6.4、約1:6.5、約1:6.6、約1:6.7、約1:6.8、約1:6.9、約1:7、約1:7.1、約1:7.2、約1:7.3、約1:7.4、約1:7.5、約

1:7.6、約1:7.7、約1:7.8、約1:7.9、約1:8、約1:8.1、約1:8.2、約1:8.3、約1:8.4、約1:8.5、約1:8.6、約1:8.7、約1:8.8、約1:8.9、約1:9、約1:9.1、約1:9.2、約1:9.3、約1:9.4、約1:9.5、約1:9.6、約1:9.7、約1:9.8、約1:9.9、約1:10、約1:11、約1:12、約1:12.5、約1:13、約1:14、約1:15、約1:16、約1:17、約1:18、約1:19、約1:20、約1:25、約1:30、約1:35、約1:40、約1:45、約1:50、約1:60、約1:70、約1:80、約1:90或約1:100。

【0661】在一實施例中，Raji細胞與T細胞(包含TIL、MIL或PBL)的比率選自由以下組成之群組：約1:1.1、約1:1.2、約1:1.3、約1:1.4、約1:1.5、約1:1.6、約1:1.7、約1:1.8、約1:1.9、約1:2、約1:2.1、約1:2.2、約1:2.3、約1:2.4、約1:2.5、約1:2.6、約1:2.7、約1:2.8、約1:2.9、約1:3、約1:3.1、約1:3.2、約1:3.3、約1:3.4、約1:3.5、約1:3.6、約1:3.7、約1:3.8、約1:3.9、約1:4、約1:4.1、約1:4.2、約1:4.3、約1:4.4、約1:4.5、約1:4.6、約1:4.7、約1:4.8、約1:4.9、約1:5、約1:5.1、約1:5.2、約1:5.3、約1:5.4、約1:5.5、約1:5.6、約1:5.7、約1:5.8、約1:5.9、約1:6、約1:6.1、約1:6.2、約1:6.25、約1:6.3、約1:6.4、約1:6.5、約1:6.6、約1:6.7、約1:6.8、約1:6.9、約1:7、約1:7.1、約1:7.2、約1:7.3、約1:7.4、約1:7.5、約1:7.6、約1:7.7、約1:7.8、約1:7.9、約1:8、約1:8.1、約1:8.2、約1:8.3、約1:8.4、約1:8.5、約1:8.6、約1:8.7、約1:8.8、約1:8.9、約1:9、約1:9.1、約1:9.2、約1:9.3、約

1:9.4、約1:9.5、約1:9.6、約1:9.7、約1:9.8、約1:9.9、約1:10、約1:11、約1:12、約1:12.5、約1:13、約1:14、約1:15、約1:16、約1:17、約1:18、約1:19、約1:20、約1:25、約1:30、約1:35、約1:40、約1:45、約1:50、約1:60、約1:70、約1:80、約1:90或約1:100。

【0662】在一實施例中，T細胞(包含TIL、MIL或PBL)與Raji細胞的比率選自由以下組成之群組：約1:1.1、約1:1.2、約1:1.3、約1:1.4、約1:1.5、約1:1.6、約1:1.7、約1:1.8、約1:1.9、約1:2、約1:2.1、約1:2.2、約1:2.3、約1:2.4、約1:2.5、約1:2.6、約1:2.7、約1:2.8、約1:2.9、約1:3、約1:3.1、約1:3.2、約1:3.3、約1:3.4、約1:3.5、約1:3.6、約1:3.7、約1:3.8、約1:3.9、約1:4、約1:4.1、約1:4.2、約1:4.3、約1:4.4、約1:4.5、約1:4.6、約1:4.7、約1:4.8、約1:4.9、約1:5、約1:5.1、約1:5.2、約1:5.3、約1:5.4、約1:5.5、約1:5.6、約1:5.7、約1:5.8、約1:5.9、約1:6、約1:6.1、約1:6.2、約1:6.25、約1:6.3、約1:6.4、約1:6.5、約1:6.6、約1:6.7、約1:6.8、約1:6.9、約1:7、約1:7.1、約1:7.2、約1:7.3、約1:7.4、約1:7.5、約1:7.6、約1:7.7、約1:7.8、約1:7.9、約1:8、約1:8.1、約1:8.2、約1:8.3、約1:8.4、約1:8.5、約1:8.6、約1:8.7、約1:8.8、約1:8.9、約1:9、約1:9.1、約1:9.2、約1:9.3、約1:9.4、約1:9.5、約1:9.6、約1:9.7、約1:9.8、約1:9.9、約1:10、約1:11、約1:12、約1:12.5、約1:13、約1:14、約1:15、約1:16、約1:17、約1:18、約1:19、約1:20、約1:25、約

1:30、約1:35、約1:40、約1:45、約1:50、約1:60、約1:70、約1:80、約1:90或約1:100。

【0663】在一實施例中，陰性對照細胞與T細胞(包含TIL、MIL或PBL)的比率選自由以下組成之群組：約1:1.1、約1:1.2、約1:1.3、約1:1.4、約1:1.5、約1:1.6、約1:1.7、約1:1.8、約1:1.9、約1:2、約1:2.1、約1:2.2、約1:2.3、約1:2.4、約1:2.5、約1:2.6、約1:2.7、約1:2.8、約1:2.9、約1:3、約1:3.1、約1:3.2、約1:3.3、約1:3.4、約1:3.5、約1:3.6、約1:3.7、約1:3.8、約1:3.9、約1:4、約1:4.1、約1:4.2、約1:4.3、約1:4.4、約1:4.5、約1:4.6、約1:4.7、約1:4.8、約1:4.9、約1:5、約1:5.1、約1:5.2、約1:5.3、約1:5.4、約1:5.5、約1:5.6、約1:5.7、約1:5.8、約1:5.9、約1:6、約1:6.1、約1:6.2、約1:6.25、約1:6.3、約1:6.4、約1:6.5、約1:6.6、約1:6.7、約1:6.8、約1:6.9、約1:7、約1:7.1、約1:7.2、約1:7.3、約1:7.4、約1:7.5、約1:7.6、約1:7.7、約1:7.8、約1:7.9、約1:8、約1:8.1、約1:8.2、約1:8.3、約1:8.4、約1:8.5、約1:8.6、約1:8.7、約1:8.8、約1:8.9、約1:9、約1:9.1、約1:9.2、約1:9.3、約1:9.4、約1:9.5、約1:9.6、約1:9.7、約1:9.8、約1:9.9、約1:10、約1:11、約1:12、約1:12.5、約1:13、約1:14、約1:15、約1:16、約1:17、約1:18、約1:19、約1:20、約1:25、約1:30、約1:35、約1:40、約1:45、約1:50、約1:60、約1:70、約1:80、約1:90或約1:100。

【0664】在一實施例中，陰性對照細胞與T細胞(包含

TIL、MIL或PBL)的比率選自由以下組成之群組：約1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.1、1:2.2、1:2.3、1:2.4、1:2.5、1:2.6、1:2.7、1:2.8、1:2.9、1:3、1:3.1、1:3.2、1:3.3、1:3.4、1:3.5、1:3.6、1:3.7、1:3.8、1:3.9、1:4、1:4.1、1:4.2、1:4.3、1:4.4、1:4.5、1:4.6、1:4.7、1:4.8、1:4.9、1:5、1:5.1、1:5.2、1:5.3、1:5.4、1:5.5、1:5.6、1:5.7、1:5.8、1:5.9、1:6、1:6.1、1:6.2、1:6.25、1:6.3、1:6.4、1:6.5、1:6.6、1:6.7、1:6.8、1:6.9、1:7、1:7.1、1:7.2、1:7.3、1:7.4、1:7.5、1:7.6、1:7.7、1:7.8、1:7.9、1:8、1:8.1、1:8.2、1:8.3、1:8.4、1:8.5、1:8.6、1:8.7、1:8.8、1:8.9、1:9、1:9.1、1:9.2、1:9.3、1:9.4、1:9.5、1:9.6、1:9.7、1:9.8、1:9.9、1:10、1:11、1:12、1:12.5、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:60、1:70、1:80、1:90或1:100。

【0665】在一實施例中，K562細胞與T細胞(包含TIL、MIL或PBL)的比率選自由以下組成之群組：約1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.1、1:2.2、1:2.3、1:2.4、1:2.5、1:2.6、1:2.7、1:2.8、1:2.9、1:3、1:3.1、1:3.2、1:3.3、1:3.4、1:3.5、1:3.6、1:3.7、1:3.8、1:3.9、1:4、1:4.1、1:4.2、1:4.3、1:4.4、1:4.5、1:4.6、1:4.7、1:4.8、1:4.9、1:5、1:5.1、1:5.2、1:5.3、1:5.4、1:5.5、1:5.6、1:5.7、1:5.8、

1:5.9、1:6、1:6.1、1:6.2、1:6.25、1:6.3、1:6.4、1:6.5、1:6.6、1:6.7、1:6.8、1:6.9、1:7、1:7.1、1:7.2、1:7.3、1:7.4、1:7.5、1:7.6、1:7.7、1:7.8、1:7.9、1:8、1:8.1、1:8.2、1:8.3、1:8.4、1:8.5、1:8.6、1:8.7、1:8.8、1:8.9、1:9、1:9.1、1:9.2、1:9.3、1:9.4、1:9.5、1:9.6、1:9.7、1:9.8、1:9.9、1:10、1:11、1:12、1:12.5、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:60、1:70、1:80、1:90或1:100。

【0666】在一實施例中，T細胞(包含TIL、MIL或PBL)與K562細胞的比率選自由以下組成之群組：約1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.1、1:2.2、1:2.3、1:2.4、1:2.5、1:2.6、1:2.7、1:2.8、1:2.9、1:3、1:3.1、1:3.2、1:3.3、1:3.4、1:3.5、1:3.6、1:3.7、1:3.8、1:3.9、1:4、1:4.1、1:4.2、1:4.3、1:4.4、1:4.5、1:4.6、1:4.7、1:4.8、1:4.9、1:5、1:5.1、1:5.2、1:5.3、1:5.4、1:5.5、1:5.6、1:5.7、1:5.8、1:5.9、1:6、1:6.1、1:6.2、1:6.25、1:6.3、1:6.4、1:6.5、1:6.6、1:6.7、1:6.8、1:6.9、1:7、1:7.1、1:7.2、1:7.3、1:7.4、1:7.5、1:7.6、1:7.7、1:7.8、1:7.9、1:8、1:8.1、1:8.2、1:8.3、1:8.4、1:8.5、1:8.6、1:8.7、1:8.8、1:8.9、1:9、1:9.1、1:9.2、1:9.3、1:9.4、1:9.5、1:9.6、1:9.7、1:9.8、1:9.9、1:10、1:11、1:12、1:12.5、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:25、1:30、

1:35、1:40、1:45、1:50、1:60、1:70、1:80、1:90或1:100。

【0667】在一實施例中，目標細胞與T細胞(包含TIL、MIL或PBL)的比率介於1:1與1:2之間、介於1:2與1:3之間、介於1:3與1:4之間、介於1:4與1:5之間、介於1:5與1:6之間、介於1:6與1:7之間、介於1:7與1:8之間、介於1:8與1:9之間、介於1:9與1:10之間、介於1:10與1:11之間、介於1:11與1:12之間、介於1:12與1:13之間、介於1:13與1:14之間、介於1:14與1:15之間、介於1:15與1:16之間、介於1:16與1:17之間、介於1:17與1:18之間、介於1:18與1:19之間、介於1:19與1:20之間、介於1:20與1:25之間、介於1:25與1:30之間、介於1:30與1:35之間、介於1:35與1:40之間、介於1:40與1:45之間、介於1:45與1:50之間、介於1:50與1:55之間、介於1:55與1:60之間、介於1:60與1:70之間、介於1:70與1:80之間、介於1:80與1:90、或介於1:90與1:100、或替代地介於1:0.5與1:100之間、介於1:0.5與1:50之間、介於1:0.5與1:40之間、介於1:0.5與1:30之間、介於1:0.5與1:25之間、介於1:0.5與1:20之間、介於1:0.5與1:15之間、介於1:0.5與1:10之間、介於1:0.5與1:5之間、介於1:0.75與1:50之間、介於1:0.75與1:40之間、介於1:0.75與1:30之間、介於1:0.75與1:25之間、介於1:0.75與1:20之間、介於1:0.75與1:15之間、介於1:0.75與1:10之間、介於1:0.75與1:5之間、介於1:0.5與1:2.5之間、介於1:1與1:20之間、介於1:1與1:10之間、介於1:1與1:5之間、介於1:1與

1:2.5之間、介於1:2與1:5之間、介於1:2.5與1:5、或介於1:3與1:5之間。

【0668】在一實施例中，T細胞(包含TIL、MIL或PBL)與目標細胞的比率介於1:1與1:2之間、介於1:2與1:3之間、介於1:3與1:4之間、介於1:4與1:5之間、介於1:5與1:6之間、介於1:6與1:7之間、介於1:7與1:8之間、介於1:8與1:9之間、介於1:9與1:10之間、介於1:10與1:11之間、介於1:11與1:12之間、介於1:12與1:13之間、介於1:13與1:14之間、介於1:14與1:15之間、介於1:15與1:16之間、介於1:16與1:17之間、介於1:17與1:18之間、介於1:18與1:19之間、介於1:19與1:20之間、介於1:20與1:25之間、介於1:25與1:30之間、介於1:30與1:35之間、介於1:35與1:40之間、介於1:40與1:45之間、介於1:45與1:50之間、介於1:50與1:55之間、介於1:55與1:60之間、介於1:60與1:70之間、介於1:70與1:80之間、介於1:80與1:90、或介於1:90與1:100、或替代地介於1:0.5與1:100之間、介於1:0.5與1:50之間、介於1:0.5與1:40之間、介於1:0.5與1:30之間、介於1:0.5與1:25之間、介於1:0.5與1:20之間、介於1:0.5與1:15之間、介於1:0.5與1:10之間、介於1:0.5與1:5之間、介於1:0.75與1:50之間、介於1:0.75與1:40之間、介於1:0.75與1:30之間、介於1:0.75與1:25之間、介於1:0.75與1:20之間、介於1:0.75與1:15之間、介於1:0.75與1:10之間、介於1:0.75與1:5之間、介於1:0.5與1:2.5之間、介於1:1與1:20之間、介於1:1與1:10之間、介於1:1與1:5之間、介於1:1與

1:2.5之間、介於1:2與1:5之間、介於1:2.5與1:5、或介於1:3與1:5之間。

【0669】在一實施例中，Raji細胞與T細胞(包含TIL、MIL或PBL)的比率介於介於1:1與1:2之間、介於1:2與1:3之間、介於1:3與1:4之間、介於1:4與1:5之間、介於1:5與1:6之間、介於1:6與1:7之間、介於1:7與1:8之間、介於1:8與1:9之間、介於1:9與1:10之間、介於1:10與1:11之間、介於1:11與1:12之間、介於1:12與1:13之間、介於1:13與1:14之間、介於1:14與1:15之間、介於1:15與1:16之間、介於1:16與1:17之間、介於1:17與1:18之間、介於1:18與1:19之間、介於1:19與1:20之間、介於1:20與1:25之間、介於1:25與1:30之間、介於1:30與1:35之間、介於1:35與1:40之間、介於1:40與1:45之間、介於1:45與1:50之間、介於1:50與1:55之間、介於1:55與1:60之間、介於1:60與1:70之間、介於1:70與1:80之間、介於1:80與1:90、或介於1:90與1:100、或替代地介於1:0.5與1:100之間、介於1:0.5與1:50之間、介於1:0.5與1:40之間、介於1:0.5與1:30之間、介於1:0.5與1:25之間、介於1:0.5與1:20之間、介於1:0.5與1:15之間、介於1:0.5與1:10之間、介於1:0.5與1:5之間、介於1:0.75與1:50之間、介於1:0.75與1:40之間、介於1:0.75與1:30之間、介於1:0.75與1:25之間、介於1:0.75與1:20之間、介於1:0.75與1:15之間、介於1:0.75與1:10之間、介於1:0.75與1:5之間、介於1:0.5與1:2.5之間、介於1:1與1:20之間、介於1:1與1:10之間、介於1:1與1:5之間、介於1:1與

1:2.5之間、介於1:2與1:5之間、介於1:2.5與1:5、或介於1:3與1:5之間。

【0670】在一實施例中，T細胞(包含TIL、MIL或PBL)與Raji細胞的比率介於1:1與1:2之間、介於1:2與1:3之間、介於1:3與1:4之間、介於1:4與1:5之間、介於1:5與1:6之間、介於1:6與1:7之間、介於1:7與1:8之間、介於1:8與1:9之間、介於1:9與1:10之間、介於1:10與1:11之間、介於1:11與1:12之間、介於1:12與1:13之間、介於1:13與1:14之間、介於1:14與1:15之間、介於1:15與1:16之間、介於1:16與1:17之間、介於1:17與1:18之間、介於1:18與1:19之間、介於1:19與1:20之間、介於1:20與1:25之間、介於1:25與1:30之間、介於1:30與1:35之間、介於1:35與1:40之間、介於1:40與1:45之間、介於1:45與1:50之間、介於1:50與1:55之間、介於1:55與1:60之間、介於1:60與1:70之間、介於1:70與1:80之間、介於1:80與1:90、或介於1:90與1:100、或替代地介於1:0.5與1:100之間、介於1:0.5與1:50之間、介於1:0.5與1:40之間、介於1:0.5與1:30之間、介於1:0.5與1:25之間、介於1:0.5與1:20之間、介於1:0.5與1:15之間、介於1:0.5與1:10之間、介於1:0.5與1:5之間、介於1:0.75與1:50之間、介於1:0.75與1:40之間、介於1:0.75與1:30之間、介於1:0.75與1:25之間、介於1:0.75與1:20之間、介於1:0.75與1:15之間、介於1:0.75與1:10之間、介於1:0.75與1:5之間、介於1:0.5與1:2.5之間、介於1:1與1:20之間、介於1:1與1:10之間、介於1:1與1:5之間、介於1:1與1:2.5之

間、介於1:2與1:5之間、介於1:2.5與1:5、或介於1:3與1:5之間。

【0671】在一實施例中，陰性對照細胞與T細胞(包含TIL、MIL或PBL)的比率介於介於1:1與1:2之間、介於1:2與1:3之間、介於1:3與1:4之間、介於1:4與1:5之間、介於1:5與1:6之間、介於1:6與1:7之間、介於1:7與1:8之間、介於1:8與1:9之間、介於1:9與1:10之間、介於1:10與1:11之間、介於1:11與1:12之間、介於1:12與1:13之間、介於1:13與1:14之間、介於1:14與1:15之間、介於1:15與1:16之間、介於1:16與1:17之間、介於1:17與1:18之間、介於1:18與1:19之間、介於1:19與1:20之間、介於1:20與1:25之間、介於1:25與1:30之間、介於1:30與1:35之間、介於1:35與1:40之間、介於1:40與1:45之間、介於1:45與1:50之間、介於1:50與1:55之間、介於1:55與1:60之間、介於1:60與1:70之間、介於1:70與1:80之間、介於1:80與1:90、或介於1:90與1:100、或替代地介於1:0.5與1:100之間、介於1:0.5與1:50之間、介於1:0.5與1:40之間、介於1:0.5與1:30之間、介於1:0.5與1:25之間、介於1:0.5與1:20之間、介於1:0.5與1:15之間、介於1:0.5與1:10之間、介於1:0.5與1:5之間、介於1:0.75與1:50之間、介於1:0.75與1:40之間、介於1:0.75與1:30之間、介於1:0.75與1:25之間、介於1:0.75與1:20之間、介於1:0.75與1:15之間、介於1:0.75與1:10之間、介於1:0.75與1:5之間、介於1:0.5與1:2.5之間、介於1:1與1:20之間、介於1:1與1:10之間、介於1:1與1:5之間、介於1:1與

1:2.5之間、介於1:2與1:5之間、介於1:2.5與1:5、或介於1:3與1:5之間。

【0672】在一實施例中，T細胞(包含TIL、MIL或PBL)與陰性對照細胞的比率介於1:1與1:2之間、介於1:2與1:3之間、介於1:3與1:4之間、介於1:4與1:5之間、介於1:5與1:6之間、介於1:6與1:7之間、介於1:7與1:8之間、介於1:8與1:9之間、介於1:9與1:10之間、介於1:10與1:11之間、介於1:11與1:12之間、介於1:12與1:13之間、介於1:13與1:14之間、介於1:14與1:15之間、介於1:15與1:16之間、介於1:16與1:17之間、介於1:17與1:18之間、介於1:18與1:19之間、介於1:19與1:20之間、介於1:20與1:25之間、介於1:25與1:30之間、介於1:30與1:35之間、介於1:35與1:40之間、介於1:40與1:45之間、介於1:45與1:50之間、介於1:50與1:55之間、介於1:55與1:60之間、介於1:60與1:70之間、介於1:70與1:80之間、介於1:80與1:90、或介於1:90與1:100、或替代地介於1:0.5與1:100之間、介於1:0.5與1:50之間、介於1:0.5與1:40之間、介於1:0.5與1:30之間、介於1:0.5與1:25之間、介於1:0.5與1:20之間、介於1:0.5與1:15之間、介於1:0.5與1:10之間、介於1:0.5與1:5之間、介於1:0.75與1:50之間、介於1:0.75與1:40之間、介於1:0.75與1:30之間、介於1:0.75與1:25之間、介於1:0.75與1:20之間、介於1:0.75與1:15之間、介於1:0.75與1:10之間、介於1:0.75與1:5之間、介於1:0.5與1:2.5之間、介於1:1與1:20之間、介於1:1與1:10之間、介於1:1與1:5之間、介於1:1與

1:2.5之間、介於1:2與1:5之間、介於1:2.5與1:5、或介於1:3與1:5之間。

【0673】在一實施例中，K562細胞與T細胞(包含TIL、MIL或PBL)的比率介於介於1:1與1:2之間、介於1:2與1:3之間、介於1:3與1:4之間、介於1:4與1:5之間、介於1:5與1:6之間、介於1:6與1:7之間、介於1:7與1:8之間、介於1:8與1:9之間、介於1:9與1:10之間、介於1:10與1:11之間、介於1:11與1:12之間、介於1:12與1:13之間、介於1:13與1:14之間、介於1:14與1:15之間、介於1:15與1:16之間、介於1:16與1:17之間、介於1:17與1:18之間、介於1:18與1:19之間、介於1:19與1:20之間、介於1:20與1:25之間、介於1:25與1:30之間、介於1:30與1:35之間、介於1:35與1:40之間、介於1:40與1:45之間、介於1:45與1:50之間、介於1:50與1:55之間、介於1:55與1:60之間、介於1:60與1:70之間、介於1:70與1:80之間、介於1:80與1:90、或介於1:90與1:100、或替代地介於1:0.5與1:100之間、介於1:0.5與1:50之間、介於1:0.5與1:40之間、介於1:0.5與1:30之間、介於1:0.5與1:25之間、介於1:0.5與1:20之間、介於1:0.5與1:15之間、介於1:0.5與1:10之間、介於1:0.5與1:5之間、介於1:0.75與1:50之間、介於1:0.75與1:40之間、介於1:0.75與1:30之間、介於1:0.75與1:25之間、介於1:0.75與1:20之間、介於1:0.75與1:15之間、介於1:0.75與1:10之間、介於1:0.75與1:5之間、介於1:0.5與1:2.5之間、介於1:1與1:20之間、介於1:1與1:10之間、介於1:1與1:5之間、介於1:1與

1:2.5之間、介於1:2與1:5之間、介於1:2.5與1:5、或介於1:3與1:5之間。

【0674】在一實施例中，T細胞(包含TIL、MIL或PBL)與K562細胞的比率介於1:1與1:2之間、介於1:2與1:3之間、介於1:3與1:4之間、介於1:4與1:5之間、介於1:5與1:6之間、介於1:6與1:7之間、介於1:7與1:8之間、介於1:8與1:9之間、介於1:9與1:10之間、介於1:10與1:11之間、介於1:11與1:12之間、介於1:12與1:13之間、介於1:13與1:14之間、介於1:14與1:15之間、介於1:15與1:16之間、介於1:16與1:17之間、介於1:17與1:18之間、介於1:18與1:19之間、介於1:19與1:20之間、介於1:20與1:25之間、介於1:25與1:30之間、介於1:30與1:35之間、介於1:35與1:40之間、介於1:40與1:45之間、介於1:45與1:50之間、介於1:50與1:55之間、介於1:55與1:60之間、介於1:60與1:70之間、介於1:70與1:80之間、介於1:80與1:90、或介於1:90與1:100、或替代地介於1:0.5與1:100之間、介於1:0.5與1:50之間、介於1:0.5與1:40之間、介於1:0.5與1:30之間、介於1:0.5與1:25之間、介於1:0.5與1:20之間、介於1:0.5與1:15之間、介於1:0.5與1:10之間、介於1:0.5與1:5之間、介於1:0.75與1:50之間、介於1:0.75與1:40之間、介於1:0.75與1:30之間、介於1:0.75與1:25之間、介於1:0.75與1:20之間、介於1:0.75與1:15之間、介於1:0.75與1:10之間、介於1:0.75與1:5之間、介於1:0.5與1:2.5之間、介於1:1與1:20之間、介於1:1與1:10之間、介於1:1與1:5之間、介於1:1與

1:2.5之間、介於1:2與1:5之間、介於1:2.5與1:5、或介於1:3與1:5之間。

【0675】在一實施例中，目標細胞共培養中的TIL與Raji細胞的比率選自由以下組成之群組：約15:1、約14:1、約13:1、約12:1、約11:1、約10:1、約9:1、約8:1、約7:1、約6:1、約5:1、約4.5:1、約4:1、約3.5:1、約3:1、約2.5:1、約2:1、約1.5:1、約1:1、約1:1.5、約1:2、約1:2.5、約1:3、約1:3.5、約1:4、約1:4.5、約1:5、約1:6、約1.7、約1:8、約1:9、約1:10、約1:11、約1:12、約1:13、約1:14及約1:15。

【0676】在一實施例中，目標細胞共培養中的TIL與K562細胞的比率選自由以下組成之群組：約15:1、約14:1、約13:1、約12:1、約11:1、約10:1、約9:1、約8:1、約7:1、約6:1、約5:1、約4.5:1、約4:1、約3.5:1、約3:1、約2.5:1、約2:1、約1.5:1、約1:1、約1:1.5、約1:2、約1:2.5、約1:3、約1:3.5、約1:4、約1:4.5、約1:5、約1:6、約1.7、約1:8、約1:9、約1:10、約1:11、約1:12、約1:13、約1:14及約1:15。

【0677】在一實施例中，約1×10^5至10×10^5個TIL與約1×10^5至10×10^5個Raji細胞共培養。在一實施例中，約3×10^5至7×10^5個TIL與約1×10^5至3×10^5個Raji細胞共培養。在一實施例中，約5×10^5至6×10^5個TIL與約3×10^5至7×10^5個Raji細胞共培養。在一實施例中，約4×10^5個TIL與約5×10^5個Raji細胞共培養。在一實施例中，約5×10^5個TIL與約

5×10^5個Raji細胞共培養。在一實施例中，約5×10^5個TIL與約4×10^5個Raji細胞共培養。在一實施例中，約3×10^5至7×10^5個TIL與約7×10^5至20×10^5個Raji細胞共培養。在一實施例中，約4×10^5至4×10^5個TIL與約10×10^5至15×10^5個Raji細胞共培養。在一實施例中，約5×10^5個TIL與約15×10^5個Raji細胞共培養。

【0678】在一些實施例中，本發明提供一種確定TIL活性的方法，其包括以下步驟：(a)輻照Raji細胞及K562細胞；(b)將經輻照之Raji細胞及經輻照之K562細胞與TIL在選自由以下組成之群組的目標比下共培養：50:1、25:1、12.5:1、6.25:1、1:1、1:6.25、1:12.5及1:25，此類共培養視情況係使用抗CD28抗體進行；(c)在6至24小時後自步驟(b)中的共培養細胞中收集上清液；(d)自步驟(b)中收集細胞並量測T細胞活化之表面標記物表現；(e)測定步驟(c)中收集之共培養細胞的上清液中的T細胞活化標記物。

【0679】在一實施例中，效力測定包含恢復步驟，其中將TIL、MIL或PBL冷凍保存產物解凍並使其在環境或冷藏溫度下恢復選自由以下組成之群組的時段：4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、11小時、12小時、13小時、14小時、15小時、16小時、17小時、18小時、19小時、20小時、21小時、22小時、23小時、24小時、25小時、26小時、27小時、28小時、29小時、30小時、31小時、32小時、33小時、34小時、35小時、36小時、37小時、38小時、39小時、40小時、41小時、42小

時、43小時、44小時、45小時、46小時、47小時、48小時、49小時、50小時、51小時、52小時、53小時、54小時、55小時、56小時、57小時、58小時、59小時、60小時、61小時、62小時、63小時、64小時、65小時、66小時、67小時、68小時、69小時、70小時、71小時、72小時、73小時、74小時、75小時、76小時、77小時、78小時、79小時、80小時、85小時、90小時、95小時、100小時、110小時及120小時。在一實施例中，效力測定包含恢復步驟，其中將TIL、MIL或PBL冷凍保存產物解凍且使其在環境或冷藏溫度下恢復選自由約12小時、約24小時、約48小時、約72小時及約96小時組成之群組的時段。前述持續時間可自解凍過程完成或解凍過程開始量測。

【0680】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力。

【0681】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段

的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力，

其中前述方法係效力測定矩陣的組成部分，該效力測定矩陣包括至少一種其他選自由以下組成之群組的測定：使用CD3、CD28及/或CD137刺激並報告干擾素γ、顆粒酶B或腫瘤壞死因子-α的基於珠粒或基於培養盤的測定；總活細胞測定；活細胞百分比測定；$CD4^+$細胞含量測定；$CD8^+$細胞含量測定；T_{EM}細胞含量測定；T_{CM}細胞含量測定；$LAG3^+$細胞含量測定；及$KLRG1^+$細胞含量測定；$CD101^+$細胞含量測定；$CD69^+$細胞含量測定；T_{SCM}細胞含量測定；T_{EMRA}細胞含量測定；T_{reg}細胞含量測定；$PD\text{-}1^+$細胞含量測定；$TIM3^+$細胞含量測定；$CD25^+$細胞含量測定；$CD27^+$細胞含量測定；$CD28^+$細胞含量測定；$CD56^+$細胞含量測定；$CTLA\text{-}4^+$細胞含量測定；$TIGIT^+$細胞含量測定；以及$CD57^+$細胞含量測定。在一實施例中，前述測定為流動式細胞測量術測定。

【0682】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力；

d. 將陰性對照細胞與T細胞產物細胞進行持續第二時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估第二次收集物的(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；及

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力。

【0683】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定

T細胞產物的效力；

d. 將陰性對照細胞與T細胞產物細胞進行持續第二時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估該第二收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；以及

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力，

其中T細胞產物係選自由以下組成之群組：腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)產物、骨髓浸潤性淋巴球(MIL)產物或末梢血液淋巴球(PBL)產物。

【0684】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力；

d. 將陰性對照細胞與T細胞產物細胞進行持續第二時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估該第二收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；以及

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力，

其中T細胞產物為來自人類之TIL產物，且其中該TIL產物係藉由切除腫瘤或腫瘤碎斷或碎解而獲得的，並且係藉由包括快速擴增方案步驟之TIL擴增過程製造的。

【0685】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力；

d. 將陰性對照細胞與T細胞產物細胞進行持續第二

時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估該第二收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力；以及

h. 釋放用於治療人類患者之T細胞產物。

其中T細胞產物為來自人類之TIL產物，且其中該TIL產物係藉由切除腫瘤或腫瘤碎斷或碎解而獲得的，並且係藉由包括快速擴增方案步驟之TIL擴增過程製造的。

【0686】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力；

d. 將陰性對照細胞與T細胞產物細胞進行持續第二

時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估該第二收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力；以及

h. 釋放用於治療人類患者之T細胞產物。

其中T細胞產物為來自人類之TIL產物，且其中該TIL產物係藉由切除腫瘤或腫瘤碎斷或碎解而獲得的，並且係藉由包括快速擴增方案步驟之TIL擴增過程製造的，且其中目標細胞為經輻照Raji細胞、Ramos細胞、Daudi細胞、U937細胞或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。

【0687】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定

T細胞產物的效力；

d. 將陰性對照細胞與T細胞產物細胞進行持續第二時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估該第二收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力；以及

h. 釋放用於治療人類患者之T細胞產物。

其中T細胞產物為來自人類之TIL產物，且其中該TIL產物係藉由切除腫瘤或腫瘤碎斷或碎解而獲得的，並且係藉由包括快速擴增方案步驟之TIL擴增過程製造的，其中目標細胞為經輻照Raji細胞、Ramos細胞、Daudi細胞、U937細胞或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，且其中陰性對照細胞缺乏MHC I類及MHC II類表現。

【0688】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力；

d. 將陰性對照細胞與T細胞產物細胞進行持續第二時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估該第二收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力；以及

h. 釋放用於治療人類患者之T細胞產物。

其中T細胞產物為來自人類之TIL產物，且其中該TIL產物係藉由切除腫瘤或腫瘤碎斷或碎解而獲得的，並且係藉由包括快速擴增方案步驟之TIL擴增過程製造的，其中目標細胞為經輻照Raji細胞、Ramos細胞、Daudi細胞、U937細胞或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，且其中陰性對照細胞為經輻照K562細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。

【0689】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物

效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力；

d. 將陰性對照細胞與T細胞產物細胞進行持續第二時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估該第二收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力；以及

h. 釋放用於治療人類患者之T細胞產物。

其中T細胞產物為來自人類之TIL產物，且其中該TIL產物係藉由切除腫瘤或腫瘤碎斷或碎解而獲得的，並且係藉由包括快速擴增方案步驟之TIL擴增過程製造的，其中目標細胞為經輻照Raji細胞、Ramos細胞、Daudi細胞、

U937細胞或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中陰性對照細胞為經輻照K562細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，且其中TIL產物細胞之數目與目標細胞之數目之間的比率介於5:1與1:5之間。

【0690】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力；

d. 將陰性對照細胞與T細胞產物細胞進行持續第二時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估該第二收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力；以及

h. 釋放用於治療人類患者之T細胞產物。

其中T細胞產物為來自人類之TIL產物，且其中該TIL產物係藉由切除腫瘤或腫瘤碎斷或碎解而獲得的，並且係藉由包括快速擴增方案步驟之TIL擴增過程製造的，其中目標細胞為經輻照Raji細胞、Ramos細胞、Daudi細胞、U937細胞或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中陰性對照細胞為經輻照K562細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中TIL產物細胞之數目與目標細胞之數目之間的比率介於5:1與1:5之間，並且其中TIL產物細胞之數目與陰性對照細胞之數目之間的比率介於5:1與1:5之間。

【0691】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力；

d. 將陰性對照細胞與T細胞產物細胞進行持續第二時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估該第二收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌

的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力；以及

h. 釋放用於治療人類患者之T細胞產物。

其中T細胞產物為來自人類之TIL產物，且其中該TIL產物係藉由切除腫瘤或腫瘤碎斷或碎解而獲得的，並且係藉由包括快速擴增方案步驟之TIL擴增過程製造的，其中目標細胞為經輻照Raji細胞、Ramos細胞、Daudi細胞、U937細胞或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中陰性對照細胞為經輻照K562細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中第一時段為約6小時至約48小時，且第二時段為約6小時至約48小時。

【0692】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力；

d. 將陰性對照細胞與T細胞產物細胞進行持續第二時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估該第二收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力；以及

h. 釋放用於治療人類患者之T細胞產物。

其中T細胞產物為來自人類之TIL產物，且其中該TIL產物係藉由切除腫瘤或腫瘤碎斷或碎解而獲得的，並且係藉由包括快速擴增方案步驟之TIL擴增過程製造的，且其中目標細胞為經輻照Raji細胞、Ramos細胞、Daudi細胞、U937細胞或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中陰性對照細胞為經輻照K562細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中第一時段係選自由約12小時、約18小時及約24小時組成之群組且其中第二時段係選自由約12小時、約18小時及約24小時組成之群組。

【0693】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段

的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力；

d. 將陰性對照細胞與T細胞產物細胞進行持續第二時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估該第二收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力；以及

h. 釋放用於治療人類患者之T細胞產物。

其中T細胞產物為來自人類之TIL產物，且其中該TIL產物係藉由切除腫瘤或腫瘤碎斷或碎解而獲得的，並且係藉由包括快速擴增方案步驟之TIL擴增過程製造的，其中目標細胞為經輻照Raji細胞、Ramos細胞、Daudi細胞、U937細胞或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中陰性對照細胞為經輻照K562細胞或其衍生物、變體、

修飾或後代，其中T細胞產物上之一或多個標記物選自由以下組成之群組：CD25、CD69、CD134、CD137、CD150、KLRG1或其組合。

【0694】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力；

d. 將陰性對照細胞與T細胞產物細胞進行持續第二時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估該第二收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力；以及

h. 釋放用於治療人類患者之T細胞產物。

其中T細胞產物為來自人類之TIL產物，且其中該TIL產物係藉由切除腫瘤或腫瘤碎斷或碎解而獲得的，並且係藉由包括快速擴增方案步驟之TIL擴增過程製造的，其中目標細胞為經輻照Raji細胞、Ramos細胞、Daudi細胞、U937細胞或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中陰性對照細胞為經輻照K562細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中一種或多種自T細胞產物分泌之分析物選自由以下組成之群組：IFN-α、IFN-β、IFN-γ、顆粒酶B、穿孔素、TNF-α、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、IL-13、IL-14、IL-16、IL-17、IL-18、IL-22、IL-25、IL-26、MIP-1β及其組合。

【0695】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力；

d. 將陰性對照細胞與T細胞產物細胞進行持續第二時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估該第二收集物中(1)一種或多種標記物在T細

胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力；以及

h. 釋放用於治療人類患者之T細胞產物。

其中T細胞產物為來自人類之TIL產物，且其中該TIL產物係藉由切除腫瘤或腫瘤碎斷或碎解而獲得的，並且係藉由包括快速擴增方案步驟之TIL擴增過程製造的，其中目標細胞為經輻照Raji細胞、Ramos細胞、Daudi細胞、U937細胞或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中陰性對照細胞為經輻照K562細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中一種或多種自T細胞產物分泌之分析物選自由以下組成之群組：IFN-α、IFN-β、IFN-γ、顆粒酶B、穿孔素、TNF-α、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、IL-13、IL-14、IL-16、IL-17、IL-18、IL-22、IL-25、IL-26、MIP-1β及其組合，其中一種或多種自TIL產物分泌之分析物選自由以下組成之群組：IFN-α、IFN-β、IFN-γ、顆粒酶B、穿孔素、TNF-α、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、IL-13、IL-14、IL-16、IL-17、IL-18、IL-22、IL-25、IL-26、MIP-1β及其組合，其中對於一種或多

種分析物的每一種分析物，以對照值數量標準化觀測值數量，並且其中一種或多種分析物中的每一種分析物的觀測值相對於對照值的增加選自由以下組成之群組：至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少3.5倍、至少4倍、至少4.5倍及至少5倍。

【0696】在任何前述實施例中，腫瘤碎解可藉由本文所描述或本領域中已知之方法進行。在任何前述實施例中，腫瘤碎解係根據國際專利公開案第WO 2021/123832 A1中描述的方法或使用其中描述之組合物或裝置進行的，該專利公開之揭示內容係以引用之方式併入本文中。

【0697】在一些實施例中，本發明提供一種用於確定TIL多官能活性以評估經擴增TIL及其他多株T細胞產物(包含MIL及PBL)之效力及/或功能性的方法，其可隨後可用於藉由投與所評估之TIL、MIL、PBL或其他多株T細胞產物治療癌症，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的兩種或更多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力。

【0698】在一些實施例中，該方法包括以下其他步驟：

d. 將陰性對照細胞與T細胞產物細胞進行持續第二時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估該第二收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的兩種或更多種分析物，以獲得一個或多個對照值；以及

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力，

其中兩種或更多種自TIL產物分泌之分析物選自由以下組成之群組：IFN-α、IFN-β、IFN-γ、顆粒酶B、穿孔素、TNF-α、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、IL-13、IL-14、IL-16、IL-17、IL-18、IL-22、IL-25、IL-26、MIP-1β及其組合，其中對於兩種或更多種分析物中的每一種分析物，以對照值數量標準化觀測值數量，並且其中兩種或更多種分析物中的每一種分析物的觀測值相對於對照值的增加選自由以下組成之群組：至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少3.5倍、至少4倍、至少4.5倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍及至少10倍。

【0699】在一些實施例中，本發明提供一種用於確定TIL多官能活性以評估經擴增TIL及其他多株T細胞產物(包

含MIL及PBL)之效力及/或功能性的方法，其可隨後可用於藉由投與所評估之TIL、MIL、PBL或其他多株T細胞產物治療癌症，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的三種或更多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力。

【0700】在一些實施例中，該方法包括以下其他步驟：

d. 將陰性對照細胞與T細胞產物細胞進行持續第二時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估該第二收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的三種或更多種分析物，以獲得一個或多個對照值；以及

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力，

其中三種或更多種自TIL產物分泌之分析物選自由以

下組成之群組：IFN-α、IFN-β、IFN-γ、顆粒酶B、穿孔素、TNF-α、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、IL-13、IL-14、IL-16、IL-17、IL-18、IL-22、IL-25、IL-26、MIP-1β及其組合，其中對於三種或更多種分析物中的每一種分析物，以對照值數量標準化觀測值數量，並且其中三種或更多種分析物中的每一種分析物的觀測值相對於對照值的增加選自由以下組成之群組：至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少3.5倍、至少4倍、至少4.5倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍及至少10倍。

【0701】在一些實施例中，本發明提供一種用於確定TIL多官能活性以評估經擴增TIL及其他多株T細胞產物(包含MIL及PBL)之效力及/或功能性的方法，其可隨後可用於藉由投與所評估之TIL、MIL、PBL或其他多株T細胞產物治療癌症，該方法包括以下步驟：

a. 將複數個目標細胞與複數個T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物之效力。

【0702】在一些實施例中，該方法包括以下其他步驟：

d. 將複數個陰性對照細胞與T細胞產物細胞進行持續第二時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估第二收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；以及

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力，

其中一種或更多種自TIL產物分泌之分析物選自由以下組成之群組：IFN-α、IFN-β、IFN-γ、顆粒酶B、穿孔素、TNF-α、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、IL-13、IL-14、IL-16、IL-17、IL-18、IL-22、IL-25、IL-26、MIP-1β及其組合，其中對於一種或更多種分析物中的每一種分析物，以對照值數量標準化觀測值數量，並且其中一種或更多種分析物中的每一種分析物的觀測值相對於對照值的增加選自由以下組成之群組：至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少3.5倍、至少4倍、至少4.5倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍及至少10倍。

【0703】在一實施例中，本發明包含前述方法，其中目標細胞係選自由以下組成之群組：Raji細胞、Thp1細

胞、Ramos細胞、U937細胞、Daudi細胞及其組合。在一實施例中，目標細胞係兩種或更多種細胞株之組合。在一實施例中，目標細胞係兩種或更多種細胞株之1:1組合。在一實施例中，目標細胞係兩種或更多種細胞株之1:1組合，其中兩種或更多種細胞株不同且各自獨立地選自由以下組成之群組：Raji細胞、Thp1細胞、Ramos細胞、U937細胞及Daudi細胞。在一實施例中，目標細胞係三種或更多種細胞株之1:1:1組合，其中三種或更多種細胞株不同且各自獨立地選自由以下組成之群組：Raji細胞、Thp1細胞、Ramos細胞、U937細胞及Daudi細胞。在一實施例中，目標細胞係四種或更多種細胞株之1:1:1:1組合，其中四種或更多種細胞株不同且各自獨立地選自由以下組成之群組：Raji細胞、Thp1細胞、Ramos細胞、U937細胞及Daudi細胞。在一實施例中，目標細胞係兩種或更多種細胞株之1:1:1:1:1組合，其中兩種或更多種細胞株不同且各自獨立地選自由以下組成之群組：Raji細胞、Thp1細胞、Ramos細胞、U937細胞及Daudi細胞。

【0704】在一實施例中，目標細胞為Raji細胞與Thp1細胞之組合，其中Raji細胞與Thp1細胞之比率選自由以下組成之群組：5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4及1:5。在一實施例中，目標細胞為Raji細胞與Ramos細胞之組合，其中Raji細胞與Ramos細胞之比率選自由以下組成之群組：5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4及1:5。在一實施例中，目標細胞為Raji細胞與U937細胞之組合，

其中Raji細胞與U937細胞之比率選自由以下組成之群組：5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4及1:5。在一實施例中，目標細胞為Raji細胞與Daudi細胞之組合，其中Raji細胞與Daudi細胞之比率選自由以下組成之群組：5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4及1:5。

【0705】在一實施例中，本發明包含前述方法，其中共培養物包括細胞培養基。在一實施例中，本發明包含前述方法，其中共培養物包括CM1培養基。在一實施例中，本發明包含前述方法，其中共培養物包括AIM-V培養基(L-麩醯胺酸、50 μM硫酸鏈黴素及10 μM硫酸慶大黴素)，亦稱為AIM V培養基，其可購自英傑生命技術有限公司(Invitrogen)(加利福尼亞州卡爾斯巴德)。在一實施例中，本發明包含前述方法，其中共培養物及第二共培養物包括細胞培養基。在一實施例中，本發明包含前述方法，其中共培養物及第二共培養物各自包括CM1培養基。在一實施例中，本發明包含前述方法，其中共培養物及第二共培養物各自包括AIM-V培養基。在一實施例中，共培養物包括IL-2，其中在共培養期間不斷添加IL-2，且其中在共培養期間將IL-2的濃度保持在50 IU/mL與1000 IU/mL之間。在一實施例中，共培養物包括IL-2，其中在共培養期間不斷添加IL-2，且其中在共培養期間將IL-2的濃度保持在100 IU/mL與500 IU/mL之間。在一實施例中，共培養物包括IL-2，其中在共培養期間不斷添加IL-2，且其中在共培養期間將IL-2的濃度保持在200 IU/mL與400 IU/mL之間。在

一實施例中，共培養物包括IL-2，其中在共培養期間不斷添加IL-2，且其中將IL-2的濃度保持在選自由以下組成之群組：約50 IU/mL、約100 IU/mL、約150 IU/mL、約200 IU/mL、約250 IU/mL、約300 IU/mL、約350 IU/mL、約400 IU/mL、約450 IU/mL及約500 IU/mL。

【0706】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力，

其中在共培養期間不斷添加IL-2，且其中在共培養時將IL-2的濃度保持在選自由以下組成之群組：約50 IU/mL、約100 IU/mL、約150 IU/mL、約200 IU/mL、約250 IU/mL、約300 IU/mL、約350 IU/mL、約400 IU/mL、約450 IU/mL及約500 IU/mL。

【0707】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力；

d. 將陰性對照細胞與T細胞產物細胞進行持續第二時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估該第二收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；以及

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力，

其中在共培養及第二次共培養期間不斷添加IL-2，且其中在共培養及第二次共培養中之每一者中將IL-2的濃度保持在選自由以下組成之群組：約50 IU/mL、約100 IU/mL、約150 IU/mL、約200 IU/mL、約250 IU/mL、約300 IU/mL、約350 IU/mL、約400 IU/mL、約450 IU/mL及約500 IU/mL。

【0708】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段

的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力，

其中在共培養期間不斷添加IL-2，且其中在共培養中將IL-2的濃度保持在50 IU/mL與1000 IU/mL之間。

【0709】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力；

d. 將陰性對照細胞與T細胞產物細胞進行持續第二時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估該第二收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；以及

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力，

其中在共培養及第二次共培養期間不斷添加IL-2，且其中在共培養及第二次共培養中之每一者中將IL-2的濃度保持在50 IU/mL與1000 IU/mL之間。

【0710】在一些實施例中，本發明提供一種用於確定TIL、MIL或PBL活性之方法，其中使用殺傷測定。在一些實施例中，本發明提供一種用於確定TIL、MIL或PBL活性之方法，其中使用殺傷測定，並且其中偵測到細胞溶解終點。在一些實施例中，本發明提供一種用於確定TIL、MIL或PBL活性之方法，其中使用殺傷測定。在一些實施例中，本發明提供一種用於確定TIL、MIL或PBL活性之方法，其中使用殺傷測定，並且經由對目標細胞株進行基因修飾以在溶解時表現螢光、化學發光或生物發光蛋白質而偵測到細胞溶解終點。適合的基因修飾及測定包含螢光素酶測定，諸如美國專利第9,631,225號中所描述之彼等測定，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。舉例而言，美國專利第10,415,015號中描述的用於生物發光偵測之基因修飾方法可用於修飾目標細胞，諸如Raji細胞、K562細胞、Daudi細胞、Ramos細胞、U937細胞或Thp1細胞，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0711】在一實施例中，本發明提供一種用於確定T

細胞產物之效力的方法，該方法進一步包括預先輻照目標細胞以遏制增殖的步驟。在一實施例中，本發明提供一種用於確定T細胞產物之效力的方法，該方法包括使用未經輻照之目標細胞以遏制增殖。在一實施例中，本發明提供一種用於確定T細胞產物之效力的方法，該方法進一步包括以化學方式或生物方式處理目標細胞以遏制增殖之步驟。

【0712】在一實施例中，本發明提供一種用於確定T細胞產物之效力的方法，該方法進一步包括預先輻照陰性對照細胞以遏制增殖的步驟。在一實施例中，本發明提供一種用於確定T細胞產物之效力的方法，該方法包括使用未經照射之陰性對照細胞以遏制增殖。在一實施例中，本發明提供一種用於確定T細胞產物之效力的方法，該方法進一步包括以化學方式或生物方式處理陰性對照細胞以遏制增殖之步驟。

【0713】在一實施例中，使用X射線或γ射線將目標細胞輻照至以下總輻照吸收劑量：約5 Gy、10 Gy、15 Gy、20 Gy、25 Gy、30 Gy、35 Gy、40 Gy、45 Gy、50 Gy、55 Gy、60 Gy、65 Gy、70 Gy、75 Gy、80 Gy、85 Gy、90 Gy、95 Gy、100 Gy、105 Gy、110 Gy、115 Gy、120 Gy、125 Gy、130 Gy、135 Gy、140 Gy、145 Gy、150 Gy、155 Gy、160 Gy、165 Gy、170 Gy、175 Gy、180 Gy、185 Gy、190 Gy或200 Gy。

【0714】在一實施例中，使用X射線或γ射線將目標細

胞輻照至以下總輻照吸收劑量：約100 rads、200 rads、300 rads、400 rads、500 rads、600 rads、700 rads、800 rads、900 rads、1000 rads、1100 rads、1200 rads、1300 rads、1400 rads、1500 rads、1600 rads、1700 rads、1800 rads、1900 rads、2000 rads、2100 rads、2200 rads、2300 rads、2400 rads、2500 rads、2600 rads、2700 rads、2800 rads、2900 rads、3000 rads、3100 rads、3200 rads、3300 rads、3400 rads、3500 rads、3600 rads、3700 rads、3800 rads、3900 rads、4000 rads、4100 rads、4200 rads、4300 rads、4400 rads、4500 rads、4600 rads、4700 rads、4800 rads、4900 rads、5000 rads、5100 rads、5200 rads、5300 rads、5400 rads、5500 rads、5600 rads、5700 rads、5800 rads、5900 rads、6000 rads、6100 rads、6200 rads、6300 rads、6400 rads、6500 rads、6600 rads、6700 rads、6800 rads、6900 rads、7000 rads、7500 rads、8000 rads、8500 rads、9000 rads、9500 rads或10000 rads。

【0715】在一實施例中，使用X射線或γ射線按以下輻照吸收劑量速率輻照目標細胞：約20 rads/min、40 rads/min、60 rads/min、80 rads/min、100 rads/min、120 rads/min、140 rads/min、160 rads/min、180 rads/min、200 rads/min、220 rads/min、240 rads/min、260 rads/min、280 rads/min、300 rads/min、320 rads/min、340 rads/min、360 rads/min、380 rads/min、400 rads/min、420 rads/min、440 rads/min、460 rads/min、480 rads/min、500 rads/min、520

rads/min、540 rads/min、560 rads/min、580 rads/min、600 rads/min、620 rads/min、640 rads/min、660 rads/min、680 rads/min或700 rads/min。在一實施例中，使用X射線或γ射線按以下輻照吸收劑量速率輻照目標細胞：約50 rads/min、100 rads/min、150 rads/min、200 rads/min、250 rads/min、300 rads/min、350 rads/min、400 rads/min、450 rads/min、500 rads/min、550 rads/min、600 rads/min、650 rads/min、700 rads/min、750 rads/min、800 rads/min、850 rads/min、900 rads/min、950 rads/min、1000 rads/min、1050 rads/min、1100 rads/min、1150 rads/min、1200 rads/min、1250 rads/min、1300 rads/min、1350 rads/min、1400 rads/min、1450 rads/min、1500 rads/min、1550 rads/min、1600 rads/min、1650 rads/min、1700 rads/min、1750 rads/min、1800 rads/min、1850 rads/min、1900 rads/min、1950 rads/min或2000 rads/min

【0716】在一實施例中，本發明包含一種用於進行混合腫瘤同種異體反應性測定方法揭示內容以確定T細胞產物(諸如TIL、MIL或PBL產物)之效力的方法。在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將混合腫瘤同種異體反應性細胞株與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物

細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力，

其中在共培養期間不斷添加IL-2，且其中在共培養時將IL-2的濃度保持在選自由以下組成之群組：約50 IU/mL、約100 IU/mL、約150 IU/mL、約200 IU/mL、約250 IU/mL、約300 IU/mL、約350 IU/mL、約400 IU/mL、約450 IU/mL及約500 IU/mL。

【0717】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將混合腫瘤同種異體反應性細胞株與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養，其中該混合腫瘤同種異體反應性細胞株為混合腫瘤細胞株；

b. 自該共培養獲得收集物；

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力；

d. 將陰性對照細胞與T細胞產物細胞進行持續第二時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估該第二收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照

值；以及

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力，

其中在共培養及第二次共培養期間不斷添加IL-2，且其中在共培養及第二次共培養中之每一者中將IL-2的濃度保持在選自由以下組成之群組：約50 IU/mL、約100 IU/mL、約150 IU/mL、約200 IU/mL、約250 IU/mL、約300 IU/mL、約350 IU/mL、約400 IU/mL、約450 IU/mL及約500 IU/mL。

【0718】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將混合腫瘤同種異體反應性細胞株與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力，

其中在共培養期間不斷添加IL-2，且其中在共培養中將IL-2的濃度保持在50 IU/mL與1000 IU/mL之間。

【0719】在一實施例中，本發明包含確定T細胞產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將混合腫瘤同種異體反應性細胞株與T細胞產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定T細胞產物的效力；

d. 將陰性對照細胞與T細胞產物細胞進行持續第二時段的第二次共培養；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物；

f. 評估該第二收集物中(1)一種或多種標記物在T細胞產物細胞上的表現或(2)自T細胞產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；以及

g. 將來自步驟c的一個或多個觀測值與來自步驟f的一個或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定T細胞產物的效力，

其中在共培養及第二次共培養期間不斷添加IL-2，且其中在共培養及第二次共培養中之每一者中將IL-2的濃度保持在50 IU/mL與1000 IU/mL之間。

【0720】在一實施例中，本發明包含一種用於進行效力測定之方法，其中目標細胞株或目標細胞株之組合經最佳化以獲得最大HLA多樣性。在一實施例中，本發明包含

一種用於進行效力測定之方法，其中目標細胞株或目標細胞株之組合經最佳化以獲得最大異型接合性。在一實施例中，本發明包含一種用於進行效力測定之方法，其中目標細胞株或目標細胞株之組合經最佳化以獲得最大免疫原性。在一實施例中，本發明包含一種用於進行效力測定之方法，其中目標細胞株或目標細胞株之組合經最佳化以獲得最大HLA-A2免疫原性。在一實施例中，本發明包含一種用於進行效力測定之方法，其中基於HLA特性選擇目標細胞株或目標細胞株之組合。在一實施例中，本發明包含一種用於進行效力測定之方法，其中目標細胞株或目標細胞株之組合表現HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DQ(A1)、HLA-DQ(A2)、HLA-DR(B1)、HLA-DP(B1)、HLA-DP(B2)或其組合。在一實施例中，本發明包含一種用於進行效力測定之方法，其中目標細胞株或目標細胞株之組合經最佳化以獲得最大同種異體HLA-TCR相互作用。在一實施例中，本發明包含一種用於進行效力測定之方法，其中目標細胞株或目標細胞株之組合經最佳化以獲得最大非抗原特異性HLA-TCR相互作用。

【0721】在一實施例中，本發明包含一種用於進行效力測定之方法，其中每瓶或每孔之TIL及目標細胞之總數為約1×10^5、2×10^5、3×10^5、4×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、1.5×10^6、2×10^6、2.5×10^6、3×10^6、3.5×10^6、4×10^6、4.5×10^6或5×10^6。在一實施例中，小瓶或孔之體積為約0.5 mL、1 mL、1.5 mL、

2 mL、2.5 mL、3 mL、3.5 mL、4 mL、4.5 mL或5 mL。

【0722】在一些實施例中，HLA-I阻斷抗體係以下列濃度用作陰性對照：約0.1 μg/mL、約0.2 μg/mL、約0.3 μg/mL、約0.4 μg/mL、約0.5 μg/mL、約0.6 μg/mL、約0.7 μg/mL、約0.8 μg/mL、約0.9 μg/mL、約1 μg/mL、約2 μg/mL、約3 μg/mL、約4 μg/mL、約5 μg/mL、約6 μg/mL、約7 μg/mL、約8 μg/mL、約9 μg/mL、約10 μg/mL、約11 μg/mL、約12 μg/mL、約13 μg/mL、約14 μg/mL、約15 μg/mL、約16 μg/mL、約17 μg/mL、約18 μg/mL、約19 μg/mL、約20 μg/mL、約21 μg/mL、約22 μg/mL、約23 μg/mL、約24 μg/mL、約25 μg/mL、約26 μg/mL、約27 μg/mL、約28 μg/mL、約29 μg/mL、約30 μg/mL、約35 μg/mL、約40 μg/mL、約45 μg/mL或約50 μg/mL。在任何前述實施例中，HLA-I阻斷抗體為購自Biolegend, Inc.(美國加利福尼亞州聖地亞哥)之選殖株W6/32(抗HLA-ABC)。

【0723】在一些實施例中，HLA-II阻斷抗體係以下列濃度用作陰性對照：約0.1 μg/mL、約0.2 μg/mL、約0.3 μg/mL、約0.4 μg/mL、約0.5 μg/mL、約0.6 μg/mL、約0.7 μg/mL、約0.8 μg/mL、約0.9 μg/mL、約1 μg/mL、約2 μg/mL、約3 μg/mL、約4 μg/mL、約5 μg/mL、約6 μg/mL、約7 μg/mL、約8 μg/mL、約9 μg/mL、約10 μg/mL、約11 μg/mL、約12 μg/mL、約13 μg/mL、約14 μg/mL、約15 μg/mL、約16 μg/mL、約17 μg/mL、約18

μg/mL、約19 μg/mL、約20 μg/mL、約21 μg/mL、約22 μg/mL、約23 μg/mL、約24 μg/mL、約25 μg/mL、約26 μg/mL、約27 μg/mL、約28 μg/mL、約29 μg/mL、約30 μg/mL、約35 μg/mL、約40 μg/mL、約45 μg/mL或約50 μg/mL。在任一前述實施例中，HLA-I阻斷抗體為購自BD Biosciences, Inc.(美國新澤西州富蘭克林湖)之選殖株TU39(HLA-DR、DP、DQ)。

【0724】在一實施例中，本發明包括確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物或萃取上清液；以及

c. 評估(1)收集物中一種或多種標記物在TIL細胞上的表現或(2)上清液中自TIL細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定TIL產物的效力，

其中TIL與目標細胞的比率為約3:1，其中該目標細胞係單核球細胞，且其中步驟(a)之共培養物中之總細胞為約1×10^6/mL。

【0725】在一實施例中，本發明包括確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物或萃取上清液；以及

c. 評估(1)收集物中一種或多種標記物在TIL細胞上的表現或(2)上清液中自TIL細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定TIL產物的效力，

其中TIL與目標細胞的比率為約3:1，其中該目標細胞係單核球細胞，其中步驟(a)之共培養物中之總細胞為約1×10^6/mL，並且其中前述方法係效力測定矩陣之組成部分，該效力測定矩陣包括至少一種其他選自由以下組成之群組的測定：基於珠粒或基於培養盤的細胞介素測定；總活細胞測定；活細胞百分比測定；$CD4^+$細胞含量測定；$CD8^+$細胞含量測定；T_{EM}細胞含量測定；T_{CM}細胞含量測定；$LAG3^+$細胞含量測定；及$KLRG1^+$細胞含量測定；$CD101^+$細胞含量測定；$CD69^+$細胞含量測定；T_{SCM}細胞含量測定；T_{EMRA}細胞含量測定；T_{reg}細胞含量測定；$PD\text{-}1^+$細胞含量測定；$TIM3^+$細胞含量測定；$CD25^+$細胞含量測定；$CD27^+$細胞含量測定；$CD28^+$細胞含量測定；$CD56^+$細胞含量測定；$CTLA\text{-}4^+$細胞含量測定；$TIGIT^+$細胞含量測定；以及$CD57^+$細胞含量測定。在一實施例中，前述測定為流動式細胞測量術測定。

【0726】在一實施例中，本發明包括確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物或萃取上清液；以及

c. 評估(1)收集物中一種或多種標記物在TIL細胞上的表現或(2)上清液中自TIL細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定TIL產物的效力，

其中TIL與目標細胞的比率為約3:1，其中該目標細胞係單核球細胞，且其中步驟(a)之共培養物中之總細胞為約2×10^6/mL。

【0727】在一實施例中，本發明包括確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物或萃取上清液；以及

c. 評估(1)收集物中一種或多種標記物在TIL細胞上的表現或(2)上清液中自TIL細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定TIL產物的效力，

其中TIL與目標細胞的比率為約3:1，其中該目標細胞係單核球細胞，其中步驟(a)之共培養物中之總細胞為約2×10^6/mL，並且其中前述方法係效力測定矩陣之組成部分，該效力測定矩陣包括至少一種其他選自由以下組成之群組的測定：使用CD3、CD28及/或CD137刺激並報告干擾素γ、顆粒酶B或腫瘤壞死因子-α的基於珠粒或基於培養盤的測定；總活細胞測定；活細胞百分比測定；$CD4^+$細胞含量測定；$CD8^+$細胞含量測定；T_{EM}細胞含量測定；T_{CM}

細胞含量測定；LAG3$^+$細胞含量測定；及KLRG1$^+$細胞含量測定；CD101$^+$細胞含量測定；CD69$^+$細胞含量測定；T_{SCM}細胞含量測定；T_{EMRA}細胞含量測定；T_{reg}細胞含量測定；PD-1$^+$細胞含量測定；TIM3$^+$細胞含量測定；CD25$^+$細胞含量測定；CD27$^+$細胞含量測定；CD28$^+$細胞含量測定；CD56$^+$細胞含量測定；CTLA-4$^+$細胞含量測定；TIGIT$^+$細胞含量測定；以及CD57$^+$細胞含量測定。在一實施例中，前述測定為流動式細胞測量術測定。

【0728】在一實施例中，本發明包括確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物或萃取上清液；以及

c. 評估(1)收集物中一種或多種標記物在TIL細胞上的表現或(2)上清液中自TIL細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定TIL產物的效力，

其中TIL與目標細胞的比率為約1:1，其中該目標細胞係單核球細胞，且其中步驟(a)之共培養物中之總細胞為約1×10^6/mL。

【0729】在一實施例中，本發明包括確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物或萃取上清液；以及

c. 評估(1)收集物中一種或多種標記物在TIL細胞上的表現或(2)上清液中自TIL細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定TIL產物的效力，

其中該目標細胞係單核球細胞，其中步驟(a)之共培養物中之總細胞為約1×10^6/mL，並且其中前述方法係效力測定矩陣之組成部分，該效力測定矩陣包括至少一種其他選自由以下組成之群組的測定：使用CD3、CD28及/或CD137刺激並報告干擾素γ、顆粒酶B或腫瘤壞死因子-α的基於珠粒或基於培養盤的測定；總活細胞測定；活細胞百分比測定；$CD4^+$細胞含量測定；$CD8^+$細胞含量測定；T_{EM}細胞含量測定；T_{CM}細胞含量測定；$LAG3^+$細胞含量測定；及$KLRG1^+$細胞含量測定；$CD101^+$細胞含量測定；$CD69^+$細胞含量測定；T_{SCM}細胞含量測定；T_{EMRA}細胞含量測定；T_{reg}細胞含量測定；$PD\text{-}1^+$細胞含量測定；$TIM3^+$細胞含量測定；$CD25^+$細胞含量測定；$CD27^+$細胞含量測定；$CD28^+$細胞含量測定；$CD56^+$細胞含量測定；$CTLA\text{-}4^+$細胞含量測定；$TIGIT^+$細胞含量測定；以及$CD57^+$細胞含量測定。在一實施例中，前述測定為流動式細胞測量術測定。

【0730】在一實施例中，本發明包括確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL細胞進行持續第一時段的共培

養；

b. 自該共培養獲得收集物或萃取上清液；以及

c. 評估(1)收集物中一種或多種標記物在TIL細胞上的表現或(2)上清液中自TIL細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定TIL產物的效力，

其中TIL與目標細胞的比率為約1:1，其中該目標細胞係單核球細胞，且其中步驟(a)之共培養物中之總細胞為約2×10^6/mL。

【0731】在一實施例中，本發明包括確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物或萃取上清液；以及

c. 評估(1)收集物中一種或多種標記物在TIL細胞上的表現或(2)上清液中自TIL細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定TIL產物的效力，

d. 將包括人類白血球抗原(HLA)阻斷抗體之陰性對照與TIL細胞及目標細胞進行持續第二時段的第二次共培養，此第二時段視情況與第一時段同時發生；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物或萃取第二上清液；

f. 評估(1)第二收集物中一種或多種標記物在TIL細胞上的表現或(2)第二上清液中自TIL細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；以及

g. 將來自步驟c之一或多個觀測值與來自步驟f之一或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其相應的對照值進行比較，以確定TIL產物之效力，

其中TIL與目標細胞的比率介於3:1與1:1之間，其中該目標細胞係單核球細胞，其中步驟(a)之共培養物及步驟(d)之第二共培養物中的總細胞係在0.5×10^6/mL與3×10^6/mL之間，且其中該HLA阻斷抗體係選自由HLA-I阻斷抗體、HLA-II阻斷抗體及其組合組成之群組。

【0732】在一實施例中，本發明包括確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物或萃取上清液；以及

c. 評估(1)收集物中一種或多種標記物在TIL細胞上的表現或(2)上清液中自TIL細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定TIL產物的效力，

d. 將包括人類白血球抗原(HLA)阻斷抗體之陰性對照與TIL細胞及目標細胞進行持續第二時段的第

二次共培養，此第二時段視情況與第一時段同時發生；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物或萃取第二上清液；

f. 評估(1)第二收集物中一種或多種標記物在TIL細胞上的表現或(2)第二上清液中自TIL細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；以及

g. 將來自步驟c之一或多個觀測值與來自步驟f之一或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其相應的對照值進行比較，以確定TIL產物之效力，

其中TIL與目標細胞之比率介於3:1與1:1之間，其中目標細胞為Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中步驟(a)之共培養物及步驟(d)之第二共培養物中之總細胞在0.5×10^6/mL與3×10^6/mL之間，且其中HLA阻斷抗體係選自由HLA-I阻斷抗體、HLA-II阻斷抗體及其組合組成之群組。

【0733】在一實施例中，本發明包括確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物或萃取上清液；以及

c. 評估(1)收集物中一種或多種標記物在TIL細胞上

的表現或(2)上清液中自TIL細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定TIL產物的效力，

d. 將包括人類白血球抗原(HLA)阻斷抗體之陰性對照與TIL細胞及目標細胞進行持續第二時段的第二次共培養，此第二時段視情況與第一時段同時發生；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物或萃取第二上清液；

f. 評估(1)第二收集物中一種或多種標記物在TIL細胞上的表現或(2)第二上清液中自TIL細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；以及

g. 將來自步驟c之一或多個觀測值與來自步驟f之一或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其相應的對照值進行比較，以確定TIL之效力，

其中TIL與目標細胞之比率介於3:1與1:1之間，其中目標細胞為U937細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中步驟(a)之共培養物及步驟(d)之第二共培養物中之總細胞在0.5×10^6/mL與3×10^6/mL之間，且其中HLA阻斷抗體係選自由HLA-I阻斷抗體、HLA-II阻斷抗體及其組合組成之群組。

【0734】在一實施例中，本發明包括確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物或萃取上清液；以及

c. 評估(1)收集物中一種或多種標記物在TIL細胞上的表現或(2)上清液中自TIL細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定TIL產物的效力，

d. 將包括人類白血球抗原I級(HLA-I)阻斷抗體及人類白血球抗原II級(HLA-II)阻斷抗體之陰性對照與TIL細胞及目標細胞進行持續第二時段的第二次共培養，此第二時段視情況與第一時段同時發生；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物或萃取第二上清液；

f. 評估(1)第二收集物中一種或多種標記物在TIL細胞上的表現或(2)第二上清液中自TIL細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；以及

g. 將來自步驟c之一或多個觀測值與來自步驟f之一或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其相應的對照值進行比較，以確定TIL產物之效力，

其中TIL與目標細胞之比率介於3:1與1:1之間，其中目標細胞為Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中

步驟(a)之共培養物及步驟(d)之第二共培養物中之總細胞在0.5×10^6/mL與3×10^6/mL之間，且其中HLA-I阻斷抗體之濃度介於5 μg/mL與20 μg/mL之間且HLA-II阻斷抗體之濃度介於5 μg/mL與10 μg/mL之間。

【0735】在一實施例中，本發明包括確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物或萃取上清液；以及

c. 評估(1)收集物中一種或多種標記物在TIL細胞上的表現或(2)上清液中自TIL細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定TIL產物的效力，

d. 將包括人類白血球抗原I級(HLA-I)阻斷抗體及人類白血球抗原II級(HLA-II)阻斷抗體之陰性對照與TIL細胞及目標細胞進行持續第二時段的第二次共培養，此第二時段視情況與第一時段同時發生；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物或萃取第二上清液；

f. 評估(1)第二收集物中一種或多種標記物在TIL細胞上的表現或(2)第二上清液中自TIL細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；以及

g. 將來自步驟c之一或多個觀測值與來自步驟f之一或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其相應的對照值進行比較，以確定TIL產物之效力，

其中TIL與目標細胞之比率介於3:1與1:1之間，其中目標細胞為Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中步驟(a)之共培養物及步驟(d)之第二共培養物中之總細胞在0.5×10^6/mL與3×10^6/mL之間，且其中HLA-I阻斷抗體之濃度介於5 μg/mL與20 μg/mL之間且HLA-II阻斷抗體之濃度介於5 μg/mL與10 μg/mL之間。

【0736】在一實施例中，本發明包括確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物或萃取上清液；以及

c. 評估(1)收集物中一種或多種標記物在TIL細胞上的表現或(2)上清液中自TIL細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定TIL產物的效力，

d. 將包括人類白血球抗原I級(HLA-I)阻斷抗體及人類白血球抗原II級(HLA-II)阻斷抗體之陰性對照與TIL細胞及目標細胞進行持續第二時段的第二次共培養，此第二時段視情況與第一時段同時發生；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物或萃取第二上清液；

f. 評估(1)第二收集物中一種或多種標記物在TIL細胞上的表現或(2)第二上清液中自TIL細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；以及

g. 將來自步驟c之一或多個觀測值與來自步驟f之一或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其相應的對照值進行比較，以確定TIL產物之效力，

其中TIL與目標細胞之比率介於3:1與1:1之間，其中目標細胞為Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中步驟(a)之共培養物及步驟(d)之第二共培養物中之總細胞在0.5×10^6/mL與3×10^6/mL之間，其中HLA-I阻斷抗體之濃度介於5 μg/mL與20 μg/mL之間且HLA-II阻斷抗體之濃度介於5 μg/mL與10 μg/mL之間，並且其中自TIL細胞分泌之一種或多種分析物包括干擾素-γ。

【0737】在一實施例中，本發明包括確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物或萃取上清液；以及

c. 評估(1)收集物中一種或多種標記物在TIL細胞上的表現或(2)上清液中自TIL細胞分泌的一種或多

種分析物，以獲得一個或多個觀測值以確定TIL產物的效力，

d. 將包括人類白血球抗原I級(HLA-I)阻斷抗體及人類白血球抗原II級(HLA-II)阻斷抗體之陰性對照與TIL細胞及目標細胞進行持續第二時段的第二次共培養，此第二時段視情況與第一時段同時發生；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物或萃取第二上清液；

f. 評估(1)第二收集物中一種或多種標記物在TIL細胞上的表現或(2)第二上清液中自TIL細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個對照值；以及

g. 將來自步驟c之一或多個觀測值與來自步驟f之一或多個對照值進行比較，其中將每個觀測值與其相應的對照值進行比較，以確定TIL產物之效力，

其中TIL與目標細胞之比率介於3:1與1:1之間，其中目標細胞為Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中步驟(a)之共培養物及步驟(d)之第二共培養物中之總細胞在0.5×10^6/mL與3×10^6/mL之間，其中HLA-I阻斷抗體之濃度介於5 μg/mL與20 μg/mL之間且HLA-II阻斷抗體之濃度介於5 μg/mL與10 μg/mL之間，並且其中自TIL細胞分泌之一種或多種分析物包括干擾素-γ。

【0738】在一實施例中，本發明包括確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與來自TIL產物之TIL細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養萃取上清液；及

c. 評估上清液中自TIL細胞分泌之干擾素γ以獲得觀測值，

d. 將包括人類白血球抗原I級(HLA-I)阻斷抗體及人類白血球抗原II級(HLA-II)阻斷抗體之陰性對照與來自TIL產物之TIL細胞及目標細胞進行持續第二時段的第二次共培養，此第二時段視情況與第一時段同時發生；

e. 自該第二次共培養萃取第二上清液；

f. 評估第二上清液中自TIL細胞分泌之干擾素-γ以獲得對照值；以及

g. 將來自步驟c之觀測值與來自步驟f之對照值進行比較，其中計算倍數增強，以確定TIL產物之效力，

其中TIL與目標細胞之比率介於3:1與1:1之間，其中目標細胞為Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中步驟(a)之共培養物及步驟(d)之第二共培養物中之總細胞在0.5×10^6/mL與3×10^6/mL之間，且其中HLA-I阻斷抗體之濃度介於5 μg/mL與20 μg/mL之間且HLA-II阻斷抗體之濃度介於5 μg/mL與10 μg/mL之間。

【0739】在一實施例中，本發明包括確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與來自TIL產物之TIL細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養萃取上清液；及

c. 評估上清液中自TIL細胞分泌之干擾素γ以獲得觀測值，

d. 將包括人類白血球抗原I級(HLA-I)阻斷抗體及人類白血球抗原II級(HLA-II)阻斷抗體之陰性對照與來自TIL產物之TIL細胞及目標細胞進行持續第二時段的第二次共培養，此第二時段視情況與第一時段同時發生；

e. 自該第二次共培養萃取第二上清液；

f. 評估第二上清液中自TIL細胞分泌之干擾素-γ以獲得對照值；以及

g. 將來自步驟c之觀測值與來自步驟f之對照值進行比較，其中計算倍數增強，以確定TIL產物之效力，

其中TIL與目標細胞之比率介於3:1與1:1之間，其中目標細胞為U937細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中步驟(a)之共培養物及步驟(d)之第二共培養物中之總細胞在0.5×10^6/mL與3×10^6/mL之間，且其中HLA-I阻斷抗體之濃度介於5 μg/mL與20 μg/mL之間且HLA-II阻斷抗體之濃度介於5 μg/mL與10 μg/mL之間。

【0740】在一實施例中，本發明包括確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與來自TIL產物之TIL細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養萃取上清液；及

c. 評估上清液中自TIL細胞分泌之干擾素-γ以獲得觀測值，

d. 將包括人類白血球抗原I級(HLA-I)阻斷抗體及人類白血球抗原II級(HLA-II)阻斷抗體之陰性對照與來自TIL產物之TIL細胞及目標細胞進行持續第二時段的第二次共培養，此第二時段視情況與第一時段同時發生；

e. 自該第二次共培養萃取第二上清液；

f. 評估第二上清液中自TIL細胞分泌之干擾素-γ以獲得對照值；以及

g. 將來自步驟c之觀測值與來自步驟f之對照值進行比較，其中計算倍數增強，以確定TIL產物之效力，

其中TIL與目標細胞之比率介於3:1與1:1之間，其中目標細胞為Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中步驟(a)之共培養及步驟(d)之第二共培養中之總細胞在1×10^6/mL與3×10^6/mL之間，其中HLA-I阻斷抗體之濃度介於5 μg/mL與20 μg/mL之間且HLA-II阻斷抗體之濃度介於5 μg/mL與10 μg/mL之間，其中在共培養及第二次共培養期

間不斷添加IL-2，其中在共培養及第二次共培養中之每一者中將IL-2的濃度保持在100 IU/mL與500 IU/mL之間，且其中使用AIM-V培養基進行共培養及第二次共培養。

【0741】在一實施例中，本發明包括確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與來自TIL產物之TIL細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養萃取上清液；及

c. 評估上清液中自TIL細胞分泌之干擾素-γ以獲得觀測值，

d. 將包括人類白血球抗原I級(HLA-I)阻斷抗體及人類白血球抗原II級(HLA-II)阻斷抗體之陰性對照與來自TIL產物之TIL細胞及目標細胞進行持續第二時段的第二次共培養，此第二時段視情況與第一時段同時發生；

e. 自該第二次共培養萃取第二上清液；

f. 評估第二上清液中自TIL細胞分泌之干擾素-γ以獲得對照值；以及

g. 將來自步驟c之觀測值與來自步驟f之對照值進行比較，其中計算倍數增強，以確定TIL產物之效力，

其中TIL與目標細胞之比率介於3:1與1:1之間，其中目標細胞為U937細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中步驟(a)之共培養及步驟(d)之第二共培養中之總細胞在

1×10^6/mL與3×10^6/mL之間，其中HLA-I阻斷抗體之濃度介於5 μg/mL與20 μg/mL之間且HLA-II阻斷抗體之濃度介於5 μg/mL與10 μg/mL之間，其中在共培養及第二次共培養期間不斷添加IL-2，其中在共培養及第二次共培養中之每一者中將IL-2的濃度保持在100 IU/mL與500 IU/mL之間，且其中使用AIM-V培養基進行共培養及第二次共培養。

【0742】在一實施例中，本發明包括確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與來自TIL產物之TIL細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養萃取上清液；及

c. 評估上清液中自TIL細胞分泌之干擾素-γ以獲得觀測值，

d. 將包括人類白血球抗原I級(HLA-I)阻斷抗體及人類白血球抗原II級(HLA-II)阻斷抗體之陰性對照與來自TIL產物之TIL細胞及目標細胞進行持續第二時段的第二次共培養，此第二時段視情況與第一時段同時發生；

e. 自該第二次共培養萃取第二上清液；

f. 評估第二上清液中自TIL細胞分泌之干擾素-γ以獲得對照值；以及

g. 將來自步驟c之觀測值與來自步驟f之對照值進行比較，其中計算倍數增強，以確定TIL產物之效力，

其中TIL與目標細胞之比率介於3:1與1:1之間，其中目標細胞為U937細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中步驟(a)之共培養及步驟(d)之第二共培養中之總細胞在1×10^6/mL與3×10^6/mL之間，其中HLA-I阻斷抗體之濃度介於5 μg/mL與20 μg/mL之間且HLA-II阻斷抗體之濃度介於5 μg/mL與10 μg/mL之間，其中在共培養及第二次共培養期間不斷添加IL-2，其中在共培養及第二次共培養中之每一者中將IL-2的濃度保持在100 IU/mL與500 IU/mL之間，其中使用AIM-V培養基進行共培養及第二次共培養，並且其中前述方法係效力測定矩陣之組成部分，該效力測定矩陣包括至少一種其他選自由以下組成之群組的測定：使用CD3、CD28及/或CD137刺激並報告干擾素γ、顆粒酶B或腫瘤壞死因子-α的基於珠粒或基於培養盤的測定；總活細胞測定；活細胞百分比測定；$CD4^+$細胞含量測定；$CD8^+$細胞含量測定；T_{EM}細胞含量測定；T_{CM}細胞含量測定；$LAG3^+$細胞含量測定；及$KLRG1^+$細胞含量測定；$CD101^+$細胞含量測定；$CD69^+$細胞含量測定；T_{SCM}細胞含量測定；T_{EMRA}細胞含量測定；T_{reg}細胞含量測定；$PD\text{-}1^+$細胞含量測定；$TIM3^+$細胞含量測定；$CD25^+$細胞含量測定；$CD27^+$細胞含量測定；$CD28^+$細胞含量測定；$CD56^+$細胞含量測定；$CTLA\text{-}4^+$細胞含量測定；$TIGIT^+$細胞含量測定；以及$CD57^+$細胞含量測定。在一實施例中，前述測定為流動式細胞測量術測定。

【0743】在一些實施例中，目標細胞株係由傳代不超

過兩次、不超過三次、不超過四次、不超過五次、不超過六次、不超過七次、不超過八次、不超過九次或不超過十次之主細胞庫製備。在前述實施例之另一實施例中，總傳代次數可藉由與目標細胞株之提供者報告之傳代次數相比較來確定。

【0744】在一些實施例中，Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1細胞株或其組合係由傳代不超過兩次、不超過三次、不超過四次、不超過五次、不超過六次、不超過七次、不超過八次、不超過九次或不超過十次之主細胞庫製備。在前述實施例之另一實施例中，總傳代次數可藉由與Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1細胞株或其組合之一或多個提供者報告之傳代次數相比較來確定。

【0745】在一些實施例中，陰性對照細胞株係由傳代不超過兩次、不超過三次、不超過四次、不超過五次、不超過六次、不超過七次、不超過八次、不超過九次或不超過十次之主細胞庫製備。在前述實施例之另一實施例中，總傳代次數可藉由與陰性對照細胞株之提供者報告之傳代次數相比較來確定。

【0746】在一些實施例中，K562細胞株係由傳代不超過兩次、不超過三次、不超過四次、不超過五次、不超過六次、不超過七次、不超過八次、不超過九次或不超過十次之主細胞庫製備。在前述實施例之另一實施例中，總傳代次數可藉由與K562細胞株之提供者報告之傳代次數相比較來確定。

【0747】在一些實施例中，目標細胞株係由傳代不超過兩次、不超過三次、不超過四次、不超過五次、不超過六次、不超過七次、不超過八次、不超過九次或不超過十次之工作細胞庫製備。在前述實施例之另一實施例中，總傳代次數可藉由與由目標細胞株之提供者報告之傳代次數相比較來確定。

【0748】在一些實施例中，Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1細胞株或其組合係由傳代不超過兩次、不超過三次、不超過四次、不超過五次、不超過六次、不超過七次、不超過八次、不超過九次或不超過十次之工作細胞庫製備。在前述實施例之另一實施例中，總傳代次數可藉由與由Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1細胞株或其組合之一或多個提供者報告之傳代次數相比較來確定。

【0749】在一些實施例中，陰性對照細胞株係由傳代不超過兩次、不超過三次、不超過四次、不超過五次、不超過六次、不超過七次、不超過八次、不超過九次或不超過十次之工作細胞庫製備。在前述實施例之另一實施例中，總傳代次數可藉由與由陰性對照細胞株之提供者報告之傳代次數相比較來確定。

【0750】在一些實施例中，K562細胞株係由傳代不超過兩次、不超過三次、不超過四次、不超過五次、不超過六次、不超過七次、不超過八次、不超過九次或不超過十次之工作細胞庫製備。在前述實施例之另一實施例中，總傳代次數可藉由與K562細胞株之提供者報告之傳代次數相

比較來確定。

【0751】在一些實施例中，陰性對照細胞株係在與目標細胞株(諸如單核球細胞株或Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1細胞株)共培養所用之條件下培養之後測試蛋白質(諸如IFN-γ或顆粒酶B)之分泌或表現的TIL細胞株，不同之處在於目標細胞株不包含於TIL細胞株中。在一些情況下，此等陰性對照實驗在本文中稱為「單獨的TIL」對照實驗。倍數增強及平行線分析計算可與單獨的TIL陰性對照實驗結合使用。舉例而言，TIL細胞株之共培養可根據本文所描述之方法用單核球目標細胞株進行，並且在相同條件下同時運行的單獨實驗中，TIL細胞株可以單獨培養。然後可以分析兩個實驗的IFN-γ表現，並進行比較以計算倍數增強或用於計算平行線分析斜率或其他分析準則。

【0752】在一些前述實施例中，亦包含陽性對照TIL細胞株，其使用本文所描述之方法(例如相關前述實施例中之步驟(a)至(c))來量測以確保在實驗之間、每日之間、分析之間或實驗室之間基礎上之再現性。

【0753】在一些實施例中，前述方法與數據分析步驟一起使用。在一些實施例中，數據分析步驟係倍數增強計算，如本文別處詳細描述的。在一些實施例中，數據分析步驟係平行線分析計算，如本文別處詳細描述的。用於統計分析及通過/失敗釋放或穩定性確定的平行線分析方法可以與任何前述測定實施例一起使用，包含結合針對單個

TIL批次濃度的兩個、三個、四個或五個目標細胞濃度的量測以判定劑量反應，視情況去除一個或兩個離群值(例如，去除了一個離群值的四個目標細胞濃度)。USP第<1032>章《生物測定的設計及開發(Design and Development of Biological Assays)》亦描述了平行線分析。USP藥典公約：馬里蘭州羅克維爾，2013； USP第<111>章《生物測定的設計及分析(Design and Analysis of Biological Assays)》。美國藥典公約：馬里蘭州羅克維爾，2014；USP第<1033>章《生物測定驗證(Biological Assay Validation)》。USP藥典公約：馬里蘭州羅克維爾，2013；USP第<1034>章《生物測定分析(Analysis of Biological Assays)》。美國藥典公約：馬里蘭州羅克維爾，2013；Hauck等人，*PDA*《醫藥科學與技術雜誌(*J. Pharma.Sci. Technol.*)》**2005,** 59(2), 127-137; Callahan及Sajjadi，《生物過程雜誌(*BioProcessing J.*)》**2003,** 2(2), 71-77; Findlay等人，《藥學與生物分析期刊(*J. Pharm.Biomed.Anal.*)》**2000,** 21, 1249- 1273;及Gottschalk及Dunn，《生物醫藥統計期刊(*J. Biopharm.Stat.*)》**2005,** 26, 453-79，該等文獻中之每一者的揭示內容以引用之方式併入本文中

【0754】在一些實施例中，前述方法與根據USP<1032>《生物測定的設計及開發》進行的數據分析步驟一起使用，該文獻之揭示內容係以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，前述方法與數據分析步驟一起使用，其

中根據USP <1032>《生物測定的設計及開發》及USP <1033>《生物測定驗證》對數據進行對數轉換，以滿足在效力範圍內量測的對稱性、正態分佈及變異性均一性的要求，該等文獻中之每一者的揭示內容以引用的方式併入本文中。在一些實施例中，前述方法與數據分析步驟一起使用，其中評估離群值且自分析中省略，如USP<1034>《生物測定分析》中所描述，該文獻之揭示內容以引用的方式併入本文中。在一些實施例中，前述方法與數據分析步驟一起使用，其中線性回歸在四點劑量曲線上進行，其中由於曲線飽和而掩蔽最高或最低濃度(若需要)。在一些實施例中，前述方法與數據分析步驟一起使用，其中使用至少三種及較佳四種相鄰[劑量]濃度。在一些實施例中，前述方法與數據分析步驟一起使用，其中要求線性區段的斜率足夠陡峭。在一些實施例中，上述方法與數據分析步驟一起使用，其中要求符合標準的線和測試樣本是直的並且線是平行的。在一些實施例中，前述方法與數據分析步驟一起使用，其中根據USP<1032>《生物測定的設計及開發》，在TIL測試製與參考標準之間進行平行線分析，該文獻之揭示內容以引用的方式併入本文中。在一些實施例中，前述方法與數據分析步驟一起使用，其中藉由平行度所量測的參考標準與TIL測試物之間的統計相似性證明了TIL測試物與參考標準之生物相似性。在一些實施例中，前述方法與數據分析步驟一起使用，其中計算並報告平行度斜率比、線性比、回歸(R^2)以及均方根誤差(RMSE)。在

一些實施例中，前述方法與數據分析步驟一起使用，其中，對平行度及線性的測定適用性及有效性進行排名並判定「通過」抑或「未通過」根據USP<1033>《生物分析驗證》之限制內的有效性標準，該文獻之揭示內容以引用的方式併入本文中。在一些實施例中，前述方法與數據分析步驟一起使用，其中作為耐受百分比範圍的95%置信區間內的相對效力被判定為「可報告的」或「非決定性的」。雖然不受理論束縛，但根據USP<1032>《生物測定的設計及開發》，相對效力優於源自絕對值的效力，因為相對效力係一種消除生物樣本固有的可變性及細胞行為隨時間推移的影響的校準因子。

【0755】在一些實施例中，本發明包含用於確定TIL、MIL或PBL產物效力之前述方法中之一者，且進一步包含將前述方法之一與其他效力測定及/或一致性測定結合使用以形成效力測定(或效力及一致性測定)矩陣。此類矩陣包含用於確定TIL、MIL或PBL產物之效力(或效力及一致性)的多個步驟。效力測定矩陣描述於美國食品及藥物管理局的《工業指南：細胞及基因療法產物之效力測定(*Guidance for Industry: Potency Tests for Cellular and Gene Therapy Products*)》，2011, 76，《聯邦公報(Fed.Reg.)》9028，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，本發明包含一種矩陣，其包括同種異體共培養測定，諸如使用Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1目標細胞之同種異體共培養測定，以及至少一種另外的測定。在一

些實施例中，本發明包含一種矩陣，其包括同種異體共培養測定，諸如使用Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1目標細胞之同種異體共培養測定，以及至少兩種另外的測定。在一些實施例中，本發明包含一種矩陣，其包括同種異體共培養測定，諸如使用Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1目標細胞之同種異體共培養測定，以及至少三種另外的測定。在一些實施例中，本發明包含一種矩陣，其包括同種異體共培養測定，諸如使用Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1目標細胞之同種異體共培養測定，以及至少四種另外的測定。在一些實施例中，本發明包含一種矩陣，其包括同種異體共培養測定，諸如使用Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1目標細胞之同種異體共培養測定，以及至少五種另外的測定。在一些實施例中，本發明包含一種矩陣，其包括同種異體共培養測定，諸如使用Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1目標細胞之同種異體共培養測定，以及至少六種另外的測定。在一些實施例中，本發明包含一種矩陣，其包括同種異體共培養測定，諸如使用Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1目標細胞之同種異體共培養測定，以及至少七種另外的測定。在一些實施例中，本發明包含一種矩陣，其包括同種異體共培養測定，諸如使用Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1目標細胞之同種異體共培養測定，以及至少八種另外的測定。在一些實施例中，本發明包含一種矩陣，其包括同種異體共培養測定，諸如使用Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1目標細胞之同

種異體共培養測定，以及至少九種另外的測定。在一些實施例中，本發明包含一種矩陣，其包括同種異體共培養測定，諸如使用Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1目標細胞之同種異體共培養測定，以及至少十種另外的測定。在一些實施例中，本發明包含一種矩陣，其包括同種異體共培養測定，諸如使用Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1目標細胞之同種異體共培養測定，以及至少十一種另外的測定。在一些實施例中，本發明包含一種矩陣，其包括同種異體共培養測定，諸如使用Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1目標細胞之同種異體共培養測定，以及至少十二種另外的測定。

【0756】在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物之效力的方法，其中IFN-γ、顆粒酶B或TNF-α之水準係藉由基於珠粒或培養盤之刺激方法量測，包含藉由抗CD3、抗CD28及/或抗CD137抗體刺激。此類方法與本文所描述之同種異體共培養測定正交，因為其經由不同機制偵測TIL、MIL或PBL活化且進一步報告TIL、MIL或PBL治療性產物之功能性或活性。因此，此類方法可單獨或與本文所描述之同種異體共培養測定組合包含於如本文所描述之效力測定矩陣中。適合的基於珠粒及培養盤之方法描述於美國專利第10,130,659號、第11,083,752號、第10,918,666號、第11,168,303號及第11,026,974號及美國專利申請公開案第US 2019/0276802 A1號中，其揭示內容以引用的方式併入本文中。

【0757】在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物之效力的方法，其中量測T_{CM}細胞之數目或百分比。在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物之效力的方法，其中量測T_{EM}細胞之數目或百分比。在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物之效力的方法，其中量測T_{SCM}細胞之數目或百分比。在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物之效力的方法，其中量測T_{EMRA}細胞之數目或百分比。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術經由$CD45RA^{-}CCR7^{-}$表現細胞的百分比量測T_{EM}細胞來判確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到$CD45RA^{-}CCR7^{-}$在大於5%、大於10%、大於15%、大於20%、大於25%、大於30%、大於35%、大於40%、大於45%、大於50%、大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%或大於95%的$CD3^{+}$細胞或TCRαβ陽性細胞上的表現。在一些實施例中，係藉由流動式細胞測量術經由$CD45RA^{-}CCR7^{+}$表現細胞的百分比量測TCM細胞來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到$CD45RA^{-}CCR7^{+}$在大於5%、大於10%、大於15%、大於20%、大於25%、大於30%、大於35%、大於40%、大於45%、大於50%、大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%或大於95%的$CD3^{+}$細胞或TCRαβ陽性細胞上的表現。在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物之效力的方法，其中總T_{EM}及T_{CM}細胞群體大於100×10^{6}、大於

150×10^6、大於200×10^6、大於250×10^6、大於300×10^6、大於350×10^6、大於400×10^6、大於450×10^6、大於500×10^6、大於550×10^6、大於600×10^6、大於650×10^6、大於700×10^6、大於750×10^6、大於800×10^6、大於850×10^6、大於900×10^6、大於950×10^6、大於1×10^9、大於1.5×10^9、大於2.0×10^9、大於2.5×10^9、大於3.0×10^9、大於3.5×10^9、大於4.0×10^9、大於5.0×10^9、大於6.0×10^9、大於7.0×10^9、大於8.0×10^9、大於9.0×10^{9}或大於10×10^{9}個細胞。

【0758】在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物之效力的方法，其中量測CD8之表現百分比。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD8。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD8來確定TIL、MIL或PBL產物效力。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD8來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD8來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分，且另外其中該測定矩陣亦包括如本文別處所描述之同種異體反應性共培養測定。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD8來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到CD8在大於5%、大於10%、大於15%、大於20%、大於25%、大於30%、大於35%、大於40%、大於45%、大於50%、大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%或大於

95%的$CD3^+$細胞或TCRαβ陽性細胞上的表現。

【0759】在一些實施例中，本發明包含一種用於確定T細胞產物之效力的方法，其中量測CD8之表現百分比。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD8。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD8來確定TIL、MIL或PBL產物效力。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD8來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD8來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分，且另外其中該測定矩陣亦包括如本文別處所描述之同種異體反應性共培養測定。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD8來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到CD8在大於2%、大於3%、大於4%、大於5%、大於10%、大於15%、大於20%、大於25%、大於30%、大於35%、大於40%、大於45%、大於50%、大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%或大於95%的$CD3^+$細胞或TCRαβ陽性細胞上的表現。

【0760】在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物效力之方法，其中量測CD4之表現百分比。在一些實施例中，藉由流式動細胞測量術量測CD4。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD4來確定TIL、MIL或PBL產物效力。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術

量測CD8來確定TIL、MIL或PBL產品效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD4來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分，且另外其中該測定矩陣亦包括如本文別處所描述之同種異體反應性共培養測定。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD4來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到CD4在大於2%、大於3%、大於4%、大於5%、大於10%、大於15%、大於20%、大於25%、大於30%、大於35%、大於40%、大於45%、大於50%、大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%或大於95%的$CD3^+$細胞或TCRαβ陽性細胞上的表現。

【0761】在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物之效力的方法，其中量測CD4及CD8兩者之表現百分比。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD4及CD8兩者。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD4及CD8兩者來確定TIL、MIL或PBL產物效力。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD4及CD8兩者來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD4及CD8兩者來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分，且另外其中該測定矩陣亦包括如本文別處

所述之同種異體反應性共培養測定。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD4及CD8兩者來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到CD4加CD8在大於50%、大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%或大於95%的$CD3^+$細胞或TCRαβ陽性細胞上的表現。

【0762】在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物之效力的方法，其中包含單陽性CD4、單陽性CD8及雙陽性亞群的總$CD4^+$及$CD8^+$細胞群體大於100×10^6、大於150×10^6、大於200×10^6、大於250×10^6、大於300×10^6、大於350×10^6、大於400×10^6、大於450×10^6、大於500×10^6、大於550×10^6、大於600×10^6、大於650×10^6、大於700×10^6、大於750×10^6、大於800×10^6、大於850×10^6、大於900×10^6、大於950×10^6、大於1×10^9、大於1.5×10^9、大於2.0×10^9、大於2.5×10^9、大於3.0×10^9、大於3.5×10^9、大於4.0×10^9、大於5.0×10^9、大於6.0×10^9、大於7.0×10^9、大於8.0×10^9、大於9.0×10^9或大於10×10^9個細胞。

【0763】在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物之效力的方法，其中量測LAG3之表現百分比。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測LAG3。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測LAG3來確定TIL、MIL或PBL產物效力。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測LAG3來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分。

在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測LAG3來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分，且另外其中該測定矩陣亦包括如本文別處所描述之同種異體反應性共培養測定。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測LAG3來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到LAG3在小於5%、小於10%、小於15%、小於20%、小於25%、小於30%、小於35%、小於40%、小於45%、小於50%、小於55%、小於60%、小於65%、小於70%、小於75%、小於80%、小於85%、小於90%或小於95%的$CD3^+$細胞或TCRαβ陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測LAG3來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到LAG3在大於5%、大於10%、大於15%、大於20%、大於25%、大於30%、大於35%、大於40%、大於45%、大於50%、大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%或大於95%的$CD3^+$細胞或TCRαβ陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由量測$LAG3^+$細胞之總數來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中$LAG3^+$細胞之總數大於50×10^6、大於100×10^6、大於150×10^6、大於200×10^6、大於250×10^6、大於300×10^6、大於350×10^6、大於400×10^6、大於450×10^6、大於500×10^6、大於550×10^6、大於600×10^6、大於650×10^6、大於700×10^6、大於750×10^6、大於800×10^6、大於850×10^6、大於900×10^6、大於950×10^6、大於1×10^9、大於1.5×10^9、大於2.0×10^9、大

於2.5×10^9、大於3.0×10^9、大於3.5×10^9、大於4.0×10^9、大於5.0×10^9、大於6.0×10^9、大於7.0×10^9、大於8.0×10^9、大於9.0×10^9或大於10×10^9個細胞。

【0764】在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物之效力的方法，其中量測KLRG1之表現百分比。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測KLRG1。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測KLRG1來確定TIL、MIL或PBL產物效力。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測KLRG1來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測KLRG1來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分，且另外其中該測定矩陣亦包括如本文別處所描述之同種異體反應性共培養測定。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測KLRG1來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到KLRG1在小於5%、小於10%、小於15%、小於20%、小於25%、小於30%、小於35%、小於40%、小於45%、小於50%、小於55%、小於60%、小於65%、小於70%、小於75%、小於80%、小於85%、小於90%或小於95%的$CD3^+$細胞或$TCR_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測KLRG1來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到KLRG1在大於5%、大於10%、大於15%、大於20%、大於25%、大於30%、大於35%、大於40%、大於45%、大

於50%、大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%或大於95%的$CD3^+$細胞或$TCR_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由量測$KLRG1^+$細胞之總數來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中$KLRG1^+$細胞之總數大於50×10^6、大於100×10^6、大於150×10^6、大於200×10^6、大於250×10^6、大於300×10^6、大於350×10^6、大於400×10^6、大於450×10^6、大於500×10^6、大於550×10^6、大於600×10^6、大於650×10^6、大於700×10^6、大於750×10^6、大於800×10^6、大於850×10^6、大於900×10^6、大於950×10^6、大於1×10^9、大於1.5×10^9、大於2.0×10^9、大於2.5×10^9、大於3.0×10^9、大於3.5×10^9、大於4.0×10^9、大於5.0×10^9、大於6.0×10^9、大於7.0×10^9、大於8.0×10^9、大於9.0×10^9或大於10×10^9個細胞。

【0765】在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物效力之方法，其中量測CD101之表現百分比。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD101。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD101來確定TIL、MIL或PBL產物效力。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD101來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD101來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分，且另外其中該測定矩陣亦包括如本文別處所描述之同種異體反應性共培養測定。在一

些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD101來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到CD101在小於5%、小於10%、小於15%、小於20%、小於25%、小於30%、小於35%、小於40%、小於45%、小於50%、小於55%、小於60%、小於65%、小於70%、小於75%、小於80%、小於85%、小於90%或小於95%的$CD3^+$細胞或$TCR_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD101來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到CD101在大於5%、大於10%、大於15%、大於20%、大於25%、大於30%、大於35%、大於40%、大於45%、大於50%、大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%或大於95%的$CD3^+$細胞或$TCR_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由量測$CD101^+$細胞之總數來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中$CD101^+$細胞之總數大於50×10^6、大於100×10^6、大於150×10^6、大於200×10^6、大於250×10^6、大於300×10^6、大於350×10^6、大於400×10^6、大於450×10^6、大於500×10^6、大於550×10^6、大於600×10^6、大於650×10^6、大於700×10^6、大於750×10^6、大於800×10^6、大於850×10^6、大於900×10^6、大於950×10^6、大於1×10^9、大於1.5×10^9、大於2.0×10^9、大於2.5×10^9、大於3.0×10^9、大於3.5×10^9、大於4.0×10^9、大於5.0×10^9、大於6.0×10^9、大於7.0×10^9、大於8.0×10^9、大於9.0×10^9或大於10×10^9個細胞。

【0766】在一些實施例中，本發明包含一種確定T細

胞產物之效力的方法，其中量測CD69之表現百分比。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD69。在一些實施例中，藉由流動式細胞量測術量測CD69來確定TIL、MIL或PBL產物效力。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD69來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD69來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分，且另外其中該測定矩陣亦包括如本文別處所描述之同種異體反應性共培養測定。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD69來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到CD69在小於5%、小於10%、小於15%、小於20%、小於25%、小於30%、小於35%、小於40%、小於45%、小於50%、小於55%、小於60%、小於65%、小於70%、小於75%、小於80%、小於85%、小於90%或小於95%的$CD3^+$細胞或$TCR_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD69來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到CD69在大於5%、大於10%、大於15%、大於20%、大於25%、大於30%、大於35%、大於40%、大於45%、大於50%、大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%或大於95%的$CD3^+$細胞或$TCR_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由量測$CD69^+$細胞之總數來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中$CD69^+$細

胞之總數大於50×10^6、大於100×10^6、大於150×10^6、大於200×10^6、大於250×10^6、大於300×10^6、大於350×10^6、大於400×10^6、大於450×10^6、大於500×10^6、大於550×10^6、大於600×10^6、大於650×10^6、大於700×10^6、大於750×10^6、大於800×10^6、大於850×10^6、大於900×10^6、大於950×10^6、大於1×10^9、大於1.5×10^9、大於2.0×10^9、大於2.5×10^9、大於3.0×10^9、大於3.5×10^9、大於4.0×10^9、大於5.0×10^9、大於6.0×10^9、大於7.0×10^9、大於8.0×10^9、大於9.0×10^9或大於10×10^9個細胞。

【0767】在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物之效力的方法，其中量測PD-1之表現百分比。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測PD-1。在一些實施例中，藉由流動式細胞量測術量測PD-1來確定TIL、MIL或PBL產物效力。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測PD-1來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測PD-1來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分，且另外其中該測定矩陣亦包括如本文別處所描述之同種異體反應性共培養測定。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測PD-1來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到PD-1在小於5%、小於10%、小於15%、小於20%、小於25%、小於30%、小於35%、小於40%、小於45%、小於50%、小於55%、小於60%、小於

65%、小於70%、小於75%、小於80%、小於85%、小於90%或小於95%的$CD3^+$細胞或$TCR_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測PD-1來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到PD-1在大於5%、大於10%、大於15%、大於20%、大於25%、大於30%、大於35%、大於40%、大於45%、大於50%、大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%或大於95%的$CD3^+$細胞或$TCR_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由量測$PD\text{-}1^+$細胞之總數來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中$PD\text{-}1^+$細胞之總數大於50×10^6、大於100×10^6、大於150×10^6、大於200×10^6、大於250×10^6、大於300×10^6、大於350×10^6、大於400×10^6、大於450×10^6、大於500×10^6、大於550×10^6、大於600×10^6、大於650×10^6、大於700×10^6、大於750×10^6、大於800×10^6、大於850×10^6、大於900×10^6、大於950×10^6、大於1×10^9、大於1.5×10^9、大於2.0×10^9、大於2.5×10^9、大於3.0×10^9、大於3.5×10^9、大於4.0×10^9、大於5.0×10^9、大於6.0×10^9、大於7.0×10^9、大於8.0×10^9、大於9.0×10^9或大於10×10^9個細胞。

【0768】在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物之效力的方法，其中量測TIM3之表現百分比。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測TIM3。在一些實施例中，藉由流動式細胞量測術量測TIM3來確定TIL、MIL或PBL產物效力。在一些實施例中，藉由流動式

細胞測量術量測TIM3來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測TIM3來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分，且另外其中該測定矩陣亦包括如本文別處所描述之同種異體反應性共培養測定。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測TIM3來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到TIM3在小於5%、小於10%、小於15%、小於20%、小於25%、小於30%、小於35%、小於40%、小於45%、小於50%、小於55%、小於60%、小於65%、小於70%、小於75%、小於80%、小於85%、小於90%或小於95%的$CD3^+$細胞或$TCR_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測TIM3來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到TIM3在大於5%、大於10%、大於15%、大於20%、大於25%、大於30%、大於35%、大於40%、大於45%、大於50%、大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%或大於95%的$CD3^+$細胞或$TCR_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由量測$TIM3^+$細胞之總數來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中$TIM3^+$細胞之總數大於50×10^6、大於100×10^6、大於150×10^6、大於200×10^6、大於250×10^6、大於300×10^6、大於350×10^6、大於400×10^6、大於450×10^6、大於500×10^6、大於550×10^6、大於600×10^6、大於650×10^6、大於700×10^6、大於

750×10^6、大於800×10^6、大於850×10^6、大於900×10^6、大於950×10^6、大於1×10^9、大於1.5×10^9、大於2.0×10^9、大於2.5×10^9、大於3.0×10^9、大於3.5×10^9、大於4.0×10^9、大於5.0×10^9、大於6.0×10^9、大於7.0×10^9、大於8.0×10^9、大於9.0×10^{9}或大於10×10^{9}個細胞。

【0769】在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物之效力的方法，其中量測CD25之表現百分比。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD25。在一些實施例中，藉由流動式細胞量測術量測CD25來確定TIL、MIL或PBL產物效力。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD25來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD25來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分，且另外其中該測定矩陣亦包括如本文別處所描述之同種異體反應性共培養測定。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD25來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到CD25在小於5%、小於10%、小於15%、小於20%、小於25%、小於30%、小於35%、小於40%、小於45%、小於50%、小於55%、小於60%、小於65%、小於70%、小於75%、小於80%、小於85%、小於90%或小於95%的CD3$^+$細胞或TCR$_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD25來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到CD25

在大於5%、大於10%、大於15%、大於20%、大於25%、大於30%、大於35%、大於40%、大於45%、大於50%、大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%或大於95%的$CD3^+$細胞或TCRαβ陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由量測$CD25^+$細胞之總數來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中$CD25^+$細胞之總數大於50×10^6、大於100×10^6、大於150×10^6、大於200×10^6、大於250×10^6、大於300×10^6、大於350×10^6、大於400×10^6、大於450×10^6、大於500×10^6、大於550×10^6、大於600×10^6、大於650×10^6、大於700×10^6、大於750×10^6、大於800×10^6、大於850×10^6、大於900×10^6、大於950×10^6、大於1×10^9、大於1.5×10^9、大於2.0×10^9、大於2.5×10^9、大於3.0×10^9、大於3.5×10^9、大於4.0×10^9、大於5.0×10^9、大於6.0×10^9、大於7.0×10^9、大於8.0×10^9、大於9.0×10^9或大於10×10^9個細胞。

【0770】在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物之效力的方法，其中量測CD27之百分比表現。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD27。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD27來確定TIL、MIL或PBL產物效力。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD27來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD27來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣

進行之一系列量測之一部分，且另外其中該測定矩陣亦包括如本文別處所描述之同種異體反應性共培養測定。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD27來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到CD27在小於5%、小於10%、小於15%、小於20%、小於25%、小於30%、小於35%、小於40%、小於45%、小於50%、小於55%、小於60%、小於65%、小於70%、小於75%、小於80%、小於85%、小於90%或小於95%的$CD3^+$細胞或$TCR_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD27來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到CD27在大於5%、大於10%、大於15%、大於20%、大於25%、大於30%、大於35%、大於40%、大於45%、大於50%、大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%或大於95%的$CD3^+$細胞或$TCR_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由量測$CD27^+$細胞之總數來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中$CD27^+$細胞之總數大於50×10^6、大於100×10^6、大於150×10^6、大於200×10^6、大於250×10^6、大於300×10^6、大於350×10^6、大於400×10^6、大於450×10^6、大於500×10^6、大於550×10^6、大於600×10^6、大於650×10^6、大於700×10^6、大於750×10^6、大於800×10^6、大於850×10^6、大於900×10^6、大於950×10^6、大於1×10^9、大於1.5×10^9、大於2.0×10^9、大於2.5×10^9、大於3.0×10^9、大於3.5×10^9、大於4.0×10^9、大於5.0×10^9、大於6.0×10^9、大於7.0×10^9、大於8.0×10^9、大

於9.0×10^9或大於10×10^9個細胞。

【0771】在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物之效力的方法，其中量測CD28之表現百分比。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD28。在一些實施例中，藉由流動式細胞量測術量測CD28來確定TIL、MIL或PBL產物效力。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD28來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD28來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分，且另外其中該測定矩陣亦包括如本文別處所描述之同種異體反應性共培養測定。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD28來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到CD28在小於5%、小於10%、小於15%、小於20%、小於25%、小於30%、小於35%、小於40%、小於45%、小於50%、小於55%、小於60%、小於65%、小於70%、小於75%、小於80%、小於85%、小於90%或小於95%的$CD3^+$細胞或$TCR_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD28來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到CD28在大於5%、大於10%、大於15%、大於20%、大於25%、大於30%、大於35%、大於40%、大於45%、大於50%、大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%或大於95%的$CD3^+$細胞或$TCR_{\alpha\beta}$

陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由量測$CD28^+$細胞之總數來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中$CD28^+$細胞之總數大於50×10^6、大於100×10^6、大於150×10^6、大於200×10^6、大於250×10^6、大於300×10^6、大於350×10^6、大於400×10^6、大於450×10^6、大於500×10^6、大於550×10^6、大於600×10^6、大於650×10^6、大於700×10^6、大於750×10^6、大於800×10^6、大於850×10^6、大於900×10^6、大於950×10^6、大於1×10^9、大於1.5×10^9、大於2.0×10^9、大於2.5×10^9、大於3.0×10^9、大於3.5×10^9、大於4.0×10^9、大於5.0×10^9、大於6.0×10^9、大於7.0×10^9、大於8.0×10^9、大於9.0×10^9或大於10×10^9個細胞。

【0772】在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物效力之方法，其中量測CD56之表現百分比。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD56。在一些實施例中，藉由流動式細胞量測術量測CD56來確定TIL、MIL或PBL產物效力。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD56來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD56來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分，且另外其中該測定矩陣亦包括如本文別處所描述之同種異體反應性共培養測定。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD56來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到CD56在小於5%、小於

10%、小於15%、小於20%、小於25%、小於30%、小於35%、小於40%、小於45%、小於50%、小於55%、小於60%、小於65%、小於70%、小於75%、小於80%、小於85%、小於90%或小於95%的$CD3^+$細胞或$TCR_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD56來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到CD56在大於5%、大於10%、大於15%、大於20%、大於25%、大於30%、大於35%、大於40%、大於45%、大於50%、大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%或大於95%的$CD3^+$細胞或$TCR_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由量測$CD56^+$細胞之總數來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中$CD56^+$細胞之總數大於50×10^6、大於100×10^6、大於150×10^6、大於200×10^6、大於250×10^6、大於300×10^6、大於350×10^6、大於400×10^6、大於450×10^6、大於500×10^6、大於550×10^6、大於600×10^6、大於650×10^6、大於700×10^6、大於750×10^6、大於800×10^6、大於850×10^6、大於900×10^6、大於950×10^6、大於1×10^9、大於1.5×10^9、大於2.0×10^9、大於2.5×10^9、大於3.0×10^9、大於3.5×10^9、大於4.0×10^9、大於5.0×10^9、大於6.0×10^9、大於7.0×10^9、大於8.0×10^9、大於9.0×10^9或大於10×10^9個細胞。

【0773】在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物之效力的方法，其中量測CD57之表現百分比。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD57。在一

些實施例中，藉由流動式細胞量測術量測CD57來確定TIL、MIL或PBL產物效力。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD57來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD57來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分，且另外其中該測定矩陣亦包括如本文別處所描述之同種異體反應性共培養測定。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD57來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到CD57在小於5%、小於10%、小於15%、小於20%、小於25%、小於30%、小於35%、小於40%、小於45%、小於50%、小於55%、小於60%、小於65%、小於70%、小於75%、小於80%、小於85%、小於90%或小於95%的$CD3^+$細胞或$TCR_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CD57來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到CD57在大於5%、大於10%、大於15%、大於20%、大於25%、大於30%、大於35%、大於40%、大於45%、大於50%、大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%或大於95%的$CD3^+$細胞或$TCR_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由量測$CD57^+$細胞之總數來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中$CD57^+$細胞之總數大於50×10^6、大於100×10^6、大於150×10^6、大於200×10^6、大於250×10^6、大於300×10^6、大於350×10^6、大

於400×10^6、大於450×10^6、大於500×10^6、大於550×10^6、大於600×10^6、大於650×10^6、大於700×10^6、大於750×10^6、大於800×10^6、大於850×10^6、大於900×10^6、大於950×10^6、大於1×10^9、大於1.5×10^9、大於2.0×10^9、大於2.5×10^9、大於3.0×10^9、大於3.5×10^9、大於4.0×10^9、大於5.0×10^9、大於6.0×10^9、大於7.0×10^9、大於8.0×10^9、大於9.0×10^9或大於10×10^9個細胞。

【0774】在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物之效力的方法，其中量測CTLA-4之表現百分比。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CTLA-4。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CTLA-4來確定TIL、MIL或PBL產物效力。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CTLA-4來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CTLA-4來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分，且另外其中該測定矩陣亦包括如本文別處所描述之同種異體反應性共培養測定。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CTLA-4來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到CTLA-4在小於5%、小於10%、小於15%、小於20%、小於25%、小於30%、小於35%、小於40%、小於45%、小於50%、小於55%、小於60%、小於65%、小於70%、小於75%、小於80%、小於85%、小於90%或小於95%的$CD3^+$細

胞或$TCR_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測CTLA-4來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到CTLA-4在大於5%、大於10%、大於15%、大於20%、大於25%、大於30%、大於35%、大於40%、大於45%、大於50%、大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%或大於95%的$CD3^+$細胞或$TCR_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由量測$CTLA\text{-}4^+$細胞之總數來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中$CTLA\text{-}4^+$細胞之總數大於50×10^6、大於100×10^6、大於150×10^6、大於200×10^6、大於250×10^6、大於300×10^6、大於350×10^6、大於400×10^6、大於450×10^6、大於500×10^6、大於550×10^6、大於600×10^6、大於650×10^6、大於700×10^6、大於750×10^6、大於800×10^6、大於850×10^6、大於900×10^6、大於950×10^6、大於1×10^9、大於1.5×10^9、大於2.0×10^9、大於2.5×10^9、大於3.0×10^9、大於3.5×10^9、大於4.0×10^9、大於5.0×10^9、大於6.0×10^9、大於7.0×10^9、大於8.0×10^9、大於9.0×10^9或大於10×10^9個細胞。

【0775】在一些實施例中，本發明包含一種確定T細胞產物之效力的方法，其中量測TIGIT之表現百分比。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測TIGIT。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測TIGIT來確定TIL、MIL或PBL產物效力。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測TIGIT來確定TIL、MIL或PBL產物效力，

其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測TIGIT來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中該量測為根據測定矩陣進行之一系列量測之一部分，且另外其中該測定矩陣亦包括如本文別處所描述之同種異體反應性共培養測定。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測TIGIT來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到TIGIT在小於5%、小於10%、小於15%、小於20%、小於25%、小於30%、小於35%、小於40%、小於45%、小於50%、小於55%、小於60%、小於65%、小於70%、小於75%、小於80%、小於85%、小於90%或小於95%的$CD3^+$細胞或$TCR_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由流動式細胞測量術量測TIGIT來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中偵測到TIGIT在大於5%、大於10%、大於15%、大於20%、大於25%、大於30%、大於35%、大於40%、大於45%、大於50%、大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%或大於95%的$CD3^+$細胞或$TCR_{\alpha\beta}$陽性細胞上的表現。在一些實施例中，藉由量測$TIGIT^+$細胞之總數來確定TIL、MIL或PBL產物效力，其中$TIGIT^+$細胞之總數大於50×10^6、大於100×10^6、大於150×10^6、大於200×10^6、大於250×10^6、大於300×10^6、大於350×10^6、大於400×10^6、大於450×10^6、大於500×10^6、大於550×10^6、大於600×10^6、大於650×10^6、大於700×10^6、大於750×10^6、大於800×10^6、大於850×10^6、大

於900×10^6、大於950×10^6、大於1×10^9、大於1.5×10^9、大於2.0×10^9、大於2.5×10^9、大於3.0×10^9、大於3.5×10^9、大於4.0×10^9、大於5.0×10^9、大於6.0×10^9、大於7.0×10^9、大於8.0×10^9、大於9.0×10^9或大於10×10^9個細胞。

【0776】在一些實施例中，本發明包含一種效力或一致性測定矩陣，其包含量測T_{reg}細胞之含量的測定，包含藉由如本領域中已知的用於FoxP3+細胞之細胞內染色流動式細胞測量術測定進行測量。

【0777】在一實施例中，本發明包含一種使用能夠結合至T細胞受體之目標細胞確定T細胞產物之效力的方法，其中該方法用於包括至少一種其他效力測定之效力測定矩陣中。在一實施例中，本發明包含一種基於T細胞或TIL、MIL或PBL TCR複合物與目標細胞的HLA-肽複合物之同種異體相互作用(亦稱為MHC顯性識別)的測定，其中該測定用於包括至少一種其他效力測定之效力測定矩陣中。

【0778】在一實施例中，本發明包括一種確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與來自TIL產物的TIL細胞在不同目標細胞濃度下進行至少三次持續12至48小時之時段的共培養；

b. 自每次共培養萃取上清液；以及

c. 評估上清液中自TIL細胞分泌之干擾素-γ以獲得劑量濃度以確定TIL產物之效力；

其中目標細胞為Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1細

胞或其衍生物、變體、修飾或後代。

【0779】在一實施例中，本發明包括確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與來自TIL產物的TIL細胞在不同目標細胞濃度下進行至少三次持續12至48小時之時段的共培養；

b. 自每次共培養萃取上清液；以及

c. 評估上清液中自TIL細胞分泌之干擾素-γ以獲得劑量濃度以確定TIL產物之效力；

其中目標細胞為單核球譜系細胞。

【0780】在一實施例中，本發明包括確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 使用至少三種不同目標細胞濃度將目標細胞與來自TIL產物的TIL細胞進行至少三次持續約24小時之時段的共培養；

b. 自每次共培養中萃取上清液；以及

c. 評估上清液中自TIL細胞分泌之干擾素-γ以獲得劑量濃度以確定TIL產物之效力；

其中目標細胞為Thp1細胞或U937細胞，或其衍生物、變體、修飾或後代，且其中藉由平行線分析，使用TIL參考標準確定相對效力。

【0781】在一實施例中，本發明包括一種確定TIL產物之效力的方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與來自TIL產物的TIL細胞在四種不同

的目標細胞濃度下進行至少四次持續12至48小時之時段的共培養；

b. 自每次共培養中萃取上清液；以及

c. 評估上清液中自TIL細胞分泌之干擾素-γ以獲得劑量濃度以確定TIL產物之效力；

其中目標細胞為Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中藉由平行線分析，在單獨的一系列重複步驟a至c之實驗中使用TIL參考標準來確定相對效力。

【0782】在一實施例中，本發明包括一種確定TIL產物之效力的方法，該方法包括以下步驟：

d. 將目標細胞與來自TIL產物的TIL細胞在四種不同的目標細胞濃度下進行至少四次持續12至48小時之時段的共培養；

e. 自每次共培養中萃取上清液；以及

f. 評估上清液中自TIL細胞分泌之干擾素-γ以獲得劑量濃度以確定TIL產物之效力；

其中目標細胞為Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中藉由平行線分析，在單獨的一系列重複步驟a至c之實驗中使用TIL參考標準來確定相對效力，並且其中使用每孔4×10^5、2×10^5、1×10^5及0.5×10^5個細胞的四種目標細胞劑量濃度及每孔1.5×10^6個TIL的單一TIL細胞濃度。

【0783】在一實施例中，本發明包括一種確定TIL產

物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與來自TIL產物的TIL細胞在四種不同的目標細胞濃度下進行至少四次持續12至48小時之時段的共培養；

b. 自每次共培養中萃取上清液；以及

c. 評估上清液中自TIL細胞分泌之干擾素-γ以獲得劑量濃度以確定TIL產物之效力；

其中目標細胞為Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中藉由平行線分析，在單獨的一系列重複步驟a至c之實驗中使用TIL參考標準來確定相對效力，其中使用每孔4×10^5、2×10^5、1×10^5及0.5×10^5個細胞的四種目標細胞劑量濃度及每孔1.5×10^6個TIL的單一TIL細胞濃度，且其中前述方法係效力測定矩陣的組成部分，該效力測定矩陣包括至少一種其他選自由以下組成之群組的測定：基於珠粒或基於培養盤的細胞介素測定；總活細胞測定；活細胞百分比測定；$CD4^+$細胞含量測定；$CD8^+$細胞含量測定；T_{EM}細胞含量測定；T_{CM}細胞含量測定；$LAG3^+$細胞含量測定；及$KLRG1^+$細胞含量測定；$CD101^+$細胞含量測定；$CD69^+$細胞含量測定；T_{SCM}細胞含量測定；T_{EMRA}細胞含量測定；T_{reg}細胞含量測定；$PD\text{-}1^+$細胞含量測定；$TIM3^+$細胞含量測定；$CD25^+$細胞含量測定；$CD27^+$細胞含量測定；$CD28^+$細胞含量測定；$CD56^+$細胞含量測定；$CTLA\text{-}4^+$細胞含量測定；$TIGIT^+$細胞含量測定；以及$CD57^+$細胞含量測定。

【0784】在一實施例中，本發明包括一種確定TIL產物效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與來自TIL產物的TIL細胞在四種不同的目標細胞濃度下進行至少四次持續12至48小時之時段的共培養；

b. 自每次共培養中萃取上清液；以及

c. 評估上清液中自TIL細胞分泌之干擾素-γ以獲得劑量濃度以確定TIL產物之效力；

其中目標細胞為Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中藉由平行線分析，在單獨的一系列重複步驟a至c之實驗中使用TIL參考標準來確定相對效力，其中使用每孔4×10^5、2×10^5、1×10^5及0.5×10^5個細胞的四種目標細胞劑量濃度及每孔1.5×10^6個TIL的單一TIL細胞濃度，且其中前述方法係效力測定矩陣的組成部分，該效力測定矩陣包括至少一種其他選自由以下組成之群組的測定：使用CD3、CD28及/或CD137刺激並報告干擾素-γ、顆粒酶B或腫瘤壞死因子-α的基於珠粒或基於培養盤的測定；總活細胞測定；活細胞百分比測定；$CD4^+$細胞含量測定；$CD8^+$細胞含量測定；T_{EM}細胞含量測定；T_{CM}細胞含量測定；$LAG3^+$細胞含量測定；及$KLRG1^+$細胞含量測定；$CD101^+$細胞含量測定；$CD69^+$細胞含量測定；T_{SCM}細胞含量測定；T_{EMRA}細胞含量測定；T_{reg}細胞含量測定；$PD\text{-}1^+$細胞含量測定；$TIM3^+$細胞含量測定；$CD25^+$細胞含量測定；$CD27^+$細胞含量測

定；$CD28^+$細胞含量測定；$CD56^+$細胞含量測定；$CTLA\text{-}4^+$細胞含量測定；$TIGIT^+$細胞含量測定；以及$CD57^+$細胞含量測定。

【0785】在一實施例中，本發明包括一種確定TIL產物之效力的方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與來自TIL產物的TIL細胞在四種不同的目標細胞濃度下進行至少四次持續約24小時之時段的共培養；

b. 自每次共培養中萃取上清液；以及

c. 評估上清液中自TIL細胞分泌之干擾素-γ以獲得劑量濃度以確定TIL產物之效力；

其中目標細胞為Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中藉由平行線分析，在單獨的一系列重複步驟a至c之實驗中使用TIL參考標準來確定相對效力，其中使用每孔4×10^5、2×10^5、1×10^5及0.5×10^5個細胞的四種目標細胞劑量濃度及每孔1.5×10^6個TIL的單一TIL細胞濃度，其中可以丟棄一個離群值劑量濃度，且其中前述方法係效力測定矩陣的組成部分，該效力測定矩陣包括至少一種其他選自由以下組成之群組的測定：使用CD3、CD28及/或CD137刺激並報告干擾素-γ、顆粒酶B或腫瘤壞死因子-α的基於珠粒或基於培養盤的測定；總活細胞測定；活細胞百分比測定；$CD4^+$細胞含量測定；$CD8^+$細胞含量測定；T_{EM}細胞含量測定；T_{CM}細胞含量測定；$LAG3^+$細胞含量測定；及$KLRG1^+$細胞

含量測定；$CD101^+$細胞含量測定；$CD69^+$細胞含量測定；T_{SCM}細胞含量測定；T_{EMRA}細胞含量測定；T_{reg}細胞含量測定；$PD\text{-}1^+$細胞含量測定；$TIM3^+$細胞含量測定；$CD25^+$細胞含量測定；$CD27^+$細胞含量測定；$CD28^+$細胞含量測定；$CD56^+$細胞含量測定；$CTLA\text{-}4^+$細胞含量測定；$TIGIT^+$細胞含量測定；以及$CD57^+$細胞含量測定。

【0786】在一實施例中，本發明包括一種確定TIL產物之效力的方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與來自TIL產物的TIL細胞在不同目標細胞濃度下進行至少三次持續12至48小時之時段的共培養；

b. 自每次共培養中萃取上清液；以及

c. 評估上清液中自TIL細胞分泌之干擾素-γ以獲得劑量濃度以確定TIL產物之效力；

其中目標細胞為單核球譜系細胞，其中藉由平行線分析，在單獨的一系列重複步驟a至c之實驗中使用TIL參考標準來確定相對效力，其中使用每孔4×10^5、2×10^5、1×10^5及0.5×10^5個細胞的四種目標細胞劑量濃度及每孔1.5×10^6個TIL的單一TIL細胞濃度，其中可以丟棄一個離群值劑量濃度，且其中前述方法係效力測定矩陣的組成部分，該效力測定矩陣包括至少一種其他選自由以下組成之群組的測定：使用CD3、CD28及/或CD137刺激並報告干擾素-γ、顆粒酶B或腫瘤壞死因子-α的基於珠粒或基於培養盤的測定；總活細胞測定；活細胞百分比測定；$CD4^+$細

胞含量測定；$CD8^+$細胞含量測定；T_{EM}細胞含量測定；T_{CM}細胞含量測定；$LAG3^+$細胞含量測定；及$KLRG1^+$細胞含量測定；$CD101^+$細胞含量測定；$CD69^+$細胞含量測定；T_{SCM}細胞含量測定；T_{EMRA}細胞含量測定；T_{reg}細胞含量測定；$PD\text{-}1^+$細胞含量測定；$TIM3^+$細胞含量測定；$CD25^+$細胞含量測定；$CD27^+$細胞含量測定；$CD28^+$細胞含量測定；$CD56^+$細胞含量測定；$CTLA\text{-}4^+$細胞含量測定；$TIGIT^+$細胞含量測定；以及$CD57^+$細胞含量測定。

【0787】在一實施例中，本發明包括一種確定TIL產物之效力的方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL產物細胞在不同目標細胞或TIL產物細胞濃度下進行多次共培養；

b. 將目標細胞與TIL參考標準細胞在不同目標細胞或TIL參考標準細胞濃度下進行多次共培養；

c. 自每次共培養中萃取上清液；以及

d. 評估上清液中自TIL產物細胞及TIL參考標準細胞分泌的細胞介素，以獲得劑量濃度，從而確定TIL產物之效力；

其中目標細胞為單核球譜系細胞。

【0788】在一實施例中，本發明包括一種確定TIL產物之效力的方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL產物細胞在不同目標細胞濃度下進行多次共培養；

b. 將目標細胞與TIL參考標準細胞在不同目標細胞

下進行多次共培養；

c. 自每次共培養中萃取上清液；以及

d. 評估上清液中自TIL產物細胞及TIL參考標準細胞分泌的細胞介素，以獲得劑量濃度，從而確定TIL產物之效力；

其中目標細胞為單核球譜系細胞。

【0789】在一實施例中，本發明包括一種確定TIL產物之效力的方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL產物細胞在不同的目標細胞濃度下進行多次持續12至48小時之時段的共培養；

b. 將目標細胞與TIL參考標準細胞在不同的目標細胞濃度下進行多次持續12至48小時之時段的共培養；

c. 自每次共培養中萃取上清液；以及

d. 評估上清液中自TIL產物細胞及TIL參考標準細胞分泌的細胞介素，以獲得劑量濃度，從而確定TIL產物之效力；

其中目標細胞為單核球譜系細胞。

【0790】在一實施例中，本發明包括一種確定TIL產物之效力的方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL產物細胞在不同的目標細胞濃度下進行多次持續12至48小時之時段的共培養；

b. 將目標細胞與TIL參考標準細胞在不同的目標細胞濃度下進行多次持續12至48小時之時段的共培

養；

c. 自每次共培養中萃取上清液；以及

d. 評估上清液中自TIL產物細胞及TIL參考標準細胞分泌的干擾素-γ，以獲得劑量濃度，從而確定TIL產物之效力；

其中目標細胞為U937或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。

【0791】在一實施例中，本發明包括一種確定TIL產物之效力的方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL產物細胞在不同的目標細胞濃度下進行多次持續12至48小時之時段的共培養；

b. 將目標細胞與TIL參考標準細胞在不同的目標細胞濃度下進行多次持續12至48小時之時段的共培養；

c. 自每次共培養中萃取上清液；以及

d. 評估上清液中自TIL產物細胞及TIL參考標準細胞分泌的干擾素-γ，以獲得劑量濃度，從而確定TIL產物之效力；

其中目標細胞為單核球譜系細胞，且其中前述方法為包括至少一種其他測定之效力測定分析矩陣的組成部分。

【0792】在一實施例中，本發明包括一種確定TIL產物之效力的方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL產物細胞在不同的目標細胞濃度下進行多次持續12至48小時之時段的共培養；

b. 將目標細胞與TIL參考標準細胞在不同的目標細胞濃度下進行多次持續12至48小時之時段的共培養；

c. 自每次共培養中萃取上清液；以及

d. 評估上清液中自TIL產物細胞及TIL參考標準細胞分泌的干擾素-γ，以獲得劑量濃度，從而確定TIL產物之效力；

其中目標細胞為U937或Thp1細胞，或其衍生物、變體、修飾或後代，且其中前述方法為包括至少一種其他測定之效力測定分析矩陣的組成部分。

【0793】在一實施例中，本發明包括一種確定TIL產物之效力的方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL產物細胞在不同目標細胞濃度下進行至少三次持續12至48小時之時段的共培養；

b. 將目標細胞與TIL參考標準細胞在不同的目標細胞濃度下進行至少三次持續12至48小時之時段的共培養；

c. 自每次共培養中萃取上清液；以及

d. 評估上清液中自TIL產物細胞及TIL參考標準細胞分泌的干擾素-γ，以獲得劑量濃度，從而確定TIL產物之效力；

其中目標細胞為U937或Thp1細胞，或其衍生物、變體、修飾或後代，且其中前述方法為包括至少一種其他測

定之效力測定分析矩陣的組成部分。

【0794】在一實施例中，本發明包括一種確定TIL產物之效力的方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL產物細胞在不同目標細胞濃度下進行至少三次持續約24小時之時段的共培養；

b. 將目標細胞與TIL參考標準細胞在不同的目標細胞濃度下進行至少三次持續約24小時之時段的共培養；

c. 自每次共培養中萃取上清液；以及

d. 評估上清液中自TIL產物細胞及TIL參考標準細胞分泌的干擾素-γ，以獲得劑量濃度，從而確定TIL產物之效力；

其中目標細胞為U937或Thp1細胞，或其衍生物、變體、修飾或後代，且其中前述方法為包括至少一種其他測定之效力測定分析矩陣的組成部分。

【0795】在一實施例中，本發明包括一種確定TIL產物之效力的方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL產物細胞在不同目標細胞濃度下進行至少三次持續約24小時之時段的共培養；

b. 將目標細胞與TIL參考標準細胞在不同的目標細胞濃度下進行至少三次持續約24小時之時段的共培養；

c. 自每次共培養中萃取上清液；以及

d. 評估上清液中自TIL產物細胞及TIL參考標準細胞

分泌的干擾素-γ，以獲得劑量濃度，從而確定TIL產物之效力；

其中目標細胞為U937或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中使用每孔4×10^5、2×10^5、1×10^5及0.5×10^5個細胞的四種目標細胞劑量濃度及每孔1.5×10^6個TIL的單一TIL細胞濃度，其中可以丟棄一個離群值劑量濃度，且其中前述方法係效力測定矩陣的組成部分，該效力測定矩陣包括至少一種其他選自由以下組成之群組的測定：使用CD3、CD28及/或CD137刺激及報告干擾素-γ、顆粒酶B或腫瘤壞死因子-α的基於珠粒或基於培養盤的測定；總活細胞測定；活細胞百分比測定；$CD4^+$細胞含量測定；$CD8^+$細胞含量測定；T_{EM}細胞含量測定；T_{CM}細胞含量測定；$LAG3^+$細胞含量測定；及$KLRG1^+$細胞含量測定；$CD101^+$細胞含量測定；$CD69^+$細胞含量測定；T_{SCM}細胞含量測定；T_{EMRA}細胞含量測定；T_{reg}細胞含量測定；$PD\text{-}1^+$細胞含量測定；$TIM3^+$細胞含量測定；$CD25^+$細胞含量測定；$CD27^+$細胞含量測定；$CD28^+$細胞含量測定；$CD56^+$細胞含量測定；$CTLA\text{-}4^+$細胞含量測定；$TIGIT^+$細胞含量測定；以及$CD57^+$細胞含量測定。

【0796】在一實施例中，本發明包括一種確定TIL產物之效力的方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL產物細胞在不同目標細胞濃度下進行至少三次持續約24小時之時段的共培養；

b. 將目標細胞與TIL參考標準細胞在不同目標細胞

濃度下進行至少三次持續約24小時之時段的共培養；

c. 自每次共培養中萃取上清液；以及

d. 評估上清液中自TIL產物細胞及TIL參考標準細胞分泌的干擾素-γ，以獲得劑量濃度，從而確定TIL產物之效力；

其中目標細胞為U937或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中使用每孔4×10^5、2×10^5、1×10^5及0.5×10^5個細胞的四種目標細胞劑量濃度及每孔1.5×10^6個TIL的單一TIL細胞濃度，其中每一者係用至少兩個複製品進行，其中可以丟棄一個離群值劑量濃度，且其中前述方法係效力測定矩陣的組成部分，該效力測定矩陣包括至少一種其他選自由以下組成之群組的測定：使用CD3、CD28及/或CD137刺激及報告干擾素-γ、顆粒酶B或腫瘤壞死因子-α的基於珠粒或基於培養盤的測定；總活細胞測定；活細胞百分比測定；$CD4^+$細胞含量測定；$CD8^+$細胞含量測定；T_{EM}細胞含量測定；T_{CM}細胞含量測定；$LAG3^+$細胞含量測定；及$KLRG1^+$細胞含量測定；$CD101^+$細胞含量測定；$CD69^+$細胞含量測定；T_{SCM}細胞含量測定；T_{EMRA}細胞含量測定；T_{reg}細胞含量測定；$PD\text{-}1^+$細胞含量測定；$TIM3^+$細胞含量測定；$CD25^+$細胞含量測定；$CD27^+$細胞含量測定；$CD28^+$細胞含量測定；$CD56^+$細胞含量測定；$CTLA\text{-}4^+$細胞含量測定；$TIGIT^+$細胞含量測定；以及$CD57^+$細胞含量測定。

【0797】在一實施例中，本發明包括一種確定TIL產物之效力的方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL產物細胞在不同目標細胞濃度下進行至少三次持續約24小時之時段的共培養；

b. 將目標細胞與TIL參考標準細胞在不同的目標細胞濃度下進行至少三次持續約24小時之時段的共培養；

c. 自每次共培養中萃取上清液；以及

d. 評估上清液中自TIL產物細胞及TIL參考標準細胞分泌的干擾素-γ，以獲得劑量濃度，從而確定TIL產物之效力；

其中目標細胞為U937或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中使用每孔4×10^5、2×10^5、1×10^5及0.5×10^5個細胞的四種目標細胞劑量濃度及每孔1.5×10^6個TIL的單一TIL細胞濃度，其中每一者係用至少兩個複製品進行，其中可以丟棄一個離群值劑量濃度，且其中前述方法係效力測定矩陣的組成部分，該效力測定矩陣包括至少三種其他選自由以下組成之群組的測定：使用CD3、CD28及/或CD137刺激及報告干擾素-γ、顆粒酶B或腫瘤壞死因子-α的基於珠粒或基於培養盤的測定；總活細胞測定；活細胞百分比測定；$CD4^+$細胞含量測定；$CD8^+$細胞含量測定；T_{EM}細胞含量測定；T_{CM}細胞含量測定；$LAG3^+$細胞含量測定；及$KLRG1^+$細胞含量測定；$CD101^+$細胞含量測定；$CD69^+$細胞含量測定；T_{SCM}細胞含量測定；T_{EMRA}細胞

含量測定；T_{reg}細胞含量測定；PD-1$^+$細胞含量測定；TIM3$^+$細胞含量測定；CD25$^+$細胞含量測定；CD27$^+$細胞含量測定；CD28$^+$細胞含量測定；CD56$^+$細胞含量測定；CTLA-4$^+$細胞含量測定；TIGIT$^+$細胞含量測定；以及CD57$^+$細胞含量測定。

【0798】在一實施例中，本發明包括一種確定TIL產物之效力的方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL產物細胞在不同目標細胞濃度下進行至少三次持續約24小時之時段的共培養；

b. 將目標細胞與TIL參考標準細胞在不同的目標細胞濃度下進行至少三次持續約24小時之時段的共培養；

c. 自每次共培養中萃取上清液；以及

d. 評估上清液中自TIL產物細胞及TIL參考標準細胞分泌的干擾素-γ，以獲得劑量濃度，從而確定TIL產物之效力；

其中目標細胞為U937或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中使用每孔4×10^5、2×10^5、1×10^5及0.5×10^5個細胞的四種目標細胞劑量濃度及每孔1.5×10^6個TIL的單一TIL細胞濃度，其中每一者係用至少兩個複製品進行，其中可以丟棄一個離群值劑量濃度，且其中前述方法係效力測定矩陣的組成部分，該效力測定矩陣包括至少五種其他選自由以下組成之群組的測定：使用CD3、CD28及/或CD137刺激及報告干擾素-γ、顆粒酶B或腫瘤壞死因

子-α的基於珠粒或基於培養盤的測定；總活細胞測定；活細胞百分比測定；$CD4^+$細胞含量測定；$CD8^+$細胞含量測定；T_{EM}細胞含量測定；T_{CM}細胞含量測定；$LAG3^+$細胞含量測定；及$KLRG1^+$細胞含量測定；$CD101^+$細胞含量測定；$CD69^+$細胞含量測定；T_{SCM}細胞含量測定；T_{EMRA}細胞含量測定；T_{reg}細胞含量測定；$PD\text{-}1^+$細胞含量測定；$TIM3^+$細胞含量測定；$CD25^+$細胞含量測定；$CD27^+$細胞含量測定；$CD28^+$細胞含量測定；$CD56^+$細胞含量測定；$CTLA\text{-}4^+$細胞含量測定；$TIGIT^+$細胞含量測定；以及$CD57^+$細胞含量測定。

【0799】在一些實施例中，本發明包括一種確定TIL產物之效力的方法，該方法包括以下步驟：使用流式細胞儀(包含包通道及多色彩流式細胞儀)進行流動式細胞測量分析。合適的流式細胞儀及方法在本領域中有所描述，包含在美國專利9,645,010號；第10,816,550號；第10,137,479號；第9,453,791號；第10,935,482號；第10,648,900號；第9,341,562號；第9,677,989號；第4,710,635號；第4,662,742號；第4,660,971號；第4,818,103號；第5,057,413號；第5,641,457號；第5,620,842號；第5,985,216號；第6,079,836號；第6,495,333號；第6,256,096號；第6,482,652號；第6,700,130號；第7,855,078號；第7,990,525號；及第10,436,698號；以及美國專利申請公開案第US 2001/0006416 A1及第US 2002/0186375 A1號，其揭示內容

以引用的方式併入本文。在一些實施例中，前述流動式細胞測量術方法與如本文所秒之同種異體共培養物測定相結合。在一些實施例中，前述流動式細胞測量術方法與使用CD3、CD28及/或CD137刺激及藉由基於ELISA之方法報告干擾素γ、顆粒酶B或腫瘤壞死因子α的基於珠粒或培養盤之測定相結合。

【0800】在一些實施例中，前述共培養係在培育箱中進行。在一些實施例中，前述共培養係在約40℃之培育箱中進行。在一些實施例中，前述共培養係在約35℃之培育箱中進行。在一些實施例中，前述共培養係在約37℃之培育箱中進行。在一些實施例中，前述共培養係在具有約5% CO_2氣體之培育箱中進行。在一些實施例中，前述共培養係在具有約10% CO_2氣體之培育箱中進行。在一些實施例中，前述共培養係在具有約15% CO_2氣體之培育箱中進行。在一些實施例中，前述共培養係在具有約20% CO_2氣體之培育箱中進行。在一些實施例中，前述共培養係在加濕之培育箱中進行。

B. 測定組合物

【0801】在一些實施例中，本發明包含包括TIL(諸如TIL、MIL或PBL產物)及目標細胞之組合物。在一些實施例中，本發明包含在培養基中包括TIL(諸如TIL、MIL或PBL產物)及目標細胞的組合物。在一些實施例中，本發明包含包括TIL(諸如TIL、MIL或PBL產物)及目標細胞之組

合物，其中目標細胞為Raji細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一些實施例中，本發明包含包括TIL(諸如TIL、MIL或PBL產物)及陰性對照細胞之組合物。在一些實施例中，本發明包含在培養基中包括TIL(諸如TIL、MIL或PBL產物)及陰性對照細胞的組合物。在一些實施例中，本發明包含包括TIL(諸如TIL、MIL或PBL產物)及目標細胞之組合物，其中陰性對照細胞為K562細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，本發明包含包括自如本文所描述之共培養測定獲得的視情況含有分泌蛋白的上清液的組合物。

【0802】在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括培養基(諸如AIM-V培養基)、至少一種來自選自由Raji細胞株、Thp1細胞株、Ramos細胞株、U937細胞株、Daudi細胞株及其組合組成之群組的細胞株之細胞以及IL-2。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括AIM-V培養基、至少一種來自選自由Raji細胞株、Thp1細胞株、Ramos細胞株、U937細胞株、Daudi細胞株及其組合組成之群組的細胞株之細胞以及IL-2，其中在共培養期間不斷添加IL-2。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括AIM-V培養基、至少一種來自選自由Raji細胞株、Thp1細胞株、Ramos細胞株、U937細胞株、Daudi細胞株及其組合組成之群組的細胞株之細胞以及IL-2，其中在共培養期間不斷添加IL-2，並且其中在共培養期間將IL-2的濃度保持在50 IU/mL與1000 IU/mL之間。在一實施例中，

本發明包含一種組合物，其包括AIM-V培養基、至少一種來自選自由Raji細胞株、Thp1細胞株、Ramos細胞株、U937細胞株、Daudi細胞株及其組合組成之群組的細胞株之細胞以及IL-2，其中在共培養期間不斷添加IL-2，並且其中在共培養期間將IL-2的濃度保持在100 IU/mL與500 IU/mL之間。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括AIM-V培養基、至少一種來自選自由Raji細胞株、Thp1細胞株、Ramos細胞株、U937細胞株、Daudi細胞株及其組合組成之群組的細胞株之細胞以及IL-2，其中在共培養期間不斷添加IL-2，並且其中在共培養期間將IL-2的濃度保持在200 IU/mL與400 IU/mL之間。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括AIM-V培養基、至少一種來自選自由Raji細胞株、Thp1細胞株、Ramos細胞株、U937細胞株、Daudi細胞株及其組合組成之群組的細胞株之細胞以及濃度為選自由以下組成之群組的IL-2：約50 IU/mL、約100 IU/mL、約150 IU/mL、約200 IU/mL、約250 IU/mL、約300 IU/mL、約350 IU/mL、約400 IU/mL、約450 IU/mL及約500 IU/mL。在一實施例中，本發明包含一種包括目標細胞之組合物，其中目標細胞為Raji細胞與Thp1細胞之組合，其中Raji細胞與Thp1細胞之比率係選自由以下組成之群組：5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4及1:5。在一實施例中，本發明包含一種包括目標細胞之組合物，其中目標細胞為Raji細胞與Ramos細胞之組合，其中Raji細胞與Ramos細胞之比率係選自由以下組

成之群組：5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4及1:5。在一實施例中，本發明包含一種包括目標細胞之組合物，其中目標細胞為Raji細胞與U937細胞之組合，其中Raji細胞與U937細胞之比率係選自由以下組成之群組：5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4及1:5。在一實施例中，本發明包含一種包括目標細胞之組合物，其中目標細胞為Raji細胞與Daudi細胞之組合，其中Raji細胞與Daudi細胞之比率係選自由以下組成之群組：5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4及1:5。

【0803】在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括培養基(諸如AIM-V培養基)；至少一種來自選自由以下組成之群組的細胞株的細胞：B細胞株、B細胞類淋巴母細胞株、伯基特氏淋巴瘤細胞株、骨髓譜系細胞株、單核球細胞株、急性單核球性白血病細胞、M5亞型急性單核球性白血病細胞、黑色素細胞株、黑色素瘤細胞株及其組合；以及IL-2。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括AIM-V培養基；至少一種來自選自由以下組成之群組的細胞株的細胞：B細胞株、B細胞類淋巴母細胞株、伯基特氏淋巴瘤細胞株、骨髓譜系細胞株、單核球細胞株、急性單核球性白血病細胞、M5亞型急性單核球性白血病細胞、黑色素細胞株、黑色素瘤細胞株及其組合；以及IL-2，其中在共培養期間不斷添加IL-2。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括AIM-V培養基；至少一種來自選自由以下組成之群組的細胞株的細胞：B細胞

株、B細胞類淋巴母細胞株、伯基特氏淋巴瘤細胞株、骨髓譜系細胞株、單核球細胞株、急性單核球性白血病細胞、M5亞型急性單核球性白血病細胞、黑色素細胞株、黑色素瘤細胞株及其組合；以及IL-2，其中在共培養期間不斷添加IL-2，並且其中在共培養期間將IL-2的濃度保持在50 IU/mL與1000 IU/mL之間。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括AIM-V培養基；至少一種來自選自由以下組成之群組的細胞株的細胞：B細胞株、B細胞類淋巴母細胞株、伯基特氏淋巴瘤細胞株、骨髓譜系細胞株、單核球細胞株、急性單核球性白血病細胞、M5亞型急性單核球性白血病細胞、黑色素細胞株、黑色素瘤細胞株及其組合；以及IL-2，其中在共培養期間不斷添加IL-2，並且其中在共培養期間將IL-2的濃度保持在100 IU/mL與500 IU/mL之間。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括AIM-V培養基；至少一種來自選自由以下組成之群組的細胞株的細胞：B細胞株、B細胞類淋巴母細胞株、伯基特氏淋巴瘤細胞株、骨髓譜系細胞株、單核球細胞株、急性單核球性白血病細胞、M5亞型急性單核球性白血病細胞、黑色素細胞株、黑色素瘤細胞株及其組合；以及IL-2，其中在共培養期間不斷添加IL-2，並且其中在共培養期間將IL-2的濃度保持在200 IU/mL與400 IU/mL之間。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括AIM-V培養基；至少一種來自選自由以下組成之群組的細胞株的細胞：B細胞株、B細胞類淋巴母細胞株、伯基特

氏淋巴瘤細胞株、骨髓譜系細胞株、單核球細胞株、急性單核球性白血病細胞、M5亞型急性單核球性白血病細胞、黑色素細胞株、黑色素瘤細胞株及其組合；以及濃度為選自由以下組成之群組的IL-2：約50 IU/mL、約100 IU/mL、約150 IU/mL、約200 IU/mL、約250 IU/mL、約300 IU/mL、約350 IU/mL、約400 IU/mL、約450 IU/mL及約500 IU/mL。

【0804】在一實施例中，目標細胞之任何先前實施例包括經輻照目標細胞。在一實施例中，目標細胞之任何先前實施例包括未經輻照之目標細胞。在一實施例中，陰性對照細胞之任何先前實施例包括經輻照之陰性對照細胞。在一實施例中，陰性對照細胞之任何先前實施例包括未經輻照之陰性對照細胞。

【0805】在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括表現HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DQ(A1)、HLA-DQ(A2)、HLA-DR(B1)、HLA-DP(B1)、HLA-DP(B2)或其組合的目標細胞株或目標細胞株組合。在一實施例中，本發明包含一種進行效力測定的方法，其中目標細胞株或目標細胞株組合表現HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DQ(A1)、HLA-DQ(A2)、HLA-DR(B1)、HLA-DP(B1)、HLA-DP(B2)或其組合，並進一步包括藉由本文所描述之方法製備的TIL、MIL或PBL群體。在一些實施例中，本發明包含一種進行效力測定的方法，其中目標細胞株或目標細胞株組合表現HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-

DQ(A1)、HLA-DQ(A2)、HLA-DR(B1)、HLA-DP(B1)、HLA-DP(B2)或其組合，並進一步包括藉由本文所描述之Gen 2過程製備的TIL、MIL或PBL群體。在一些實施例中，本發明包含一種進行效力測定的方法，其中目標細胞株或目標細胞株組合表現HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DQ(A1)、HLA-DQ(A2)、HLA-DR(B1)、HLA-DP(B1)、HLA-DP(B2)或其組合，並進一步包括藉由本文所描述之Gen 3過程製備的TIL、MIL或PBL群體。在一實施例中，本發明包含一種進行效力測定的方法，其中目標細胞株或目標細胞株組合表現HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DQ(A1)、HLA-DQ(A2)、HLA-DR(B1)、HLA-DP(B1)、HLA-DP(B2)或其組合，並進一步包括根據美國專利第10,894,063號、第10,398,734號、第10,537,595號、第10,695,372號及第10,653,723號中所揭示或主張的組合物的TIL、MIL或PBL群體，該等專利之揭示內容係以引用之方式併入本文中。

【0806】在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括目標細胞株或包含B細胞之目標細胞株組合。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括目標細胞株或包含B細胞類淋巴母細胞之目標細胞株組合。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括目標細胞株或包含伯基特氏淋巴瘤細胞之目標細胞株組合。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括目標細胞株或包含骨髓譜系細胞之目標細胞株組合。在一實施例中，本發明包含一種

組合物，其包括目標細胞株或包含單核球之目標細胞株組合。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括目標細胞株或包含急性單核球性白血病細胞之目標細胞株組合。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括目標細胞株或包含M5亞型急性單核球性白血病細胞之目標細胞株組合。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括目標細胞株或目標細胞株組合，該目標細胞株組合包含Raji細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，包含Raji B2M細胞。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括目標細胞株或目標細胞株組合，該目標細胞株組合包含Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，包含適合於殺傷測定的經基因修飾之Thp1細胞。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括目標細胞株或目標細胞株組合，該目標細胞株組合包含Ramos細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，包含適合於殺傷測定的經基因修飾之Ramos細胞。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括目標細胞株或目標細胞株組合，該目標細胞株組合包含U937細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，包含適合於殺傷測定的經基因修飾之U937細胞。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括目標細胞株或目標細胞株組合，該目標細胞株組合包含Daudi細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，包含適合於殺傷測定的經基因修飾之Daudi細胞。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括目標細胞株或包含黑色素細胞之目標細胞株組合。在一實施例中，本發明

包含一種組合物，其包括目標細胞株或包含HLA-A-02陽性黑色素細胞之目標細胞株組合。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括目標細胞株或包含黑色素瘤細胞之目標細胞株組合。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括目標細胞株或包含HLA-A-02陽性黑色素瘤細胞之目標細胞株組合。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括目標細胞株或目標細胞株組合，該目標細胞株組合包含選自由以下組成之群組的黑色素瘤細胞：Sk-MEL-5、Malme-3M、SK-MEL-28、SK-MEL-3、SH-4、SK-MEL-24、RPMI-7951、SK-MEL-1、A375、G-361及其組合。

【0807】在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括培養基、目標細胞及HLA-I阻斷抗體。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括培養基、目標細胞及HLA-II阻斷抗體。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括培養基、HLA-I阻斷抗體及HLA-II阻斷抗體。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括培養基、IL-2、目標細胞及HLA-I阻斷抗體。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括培養基、IL-2、目標細胞及HLA-II阻斷抗體。在一實施例中，本發明包含一種組合物，其包括培養基、IL-2、目標細胞、HLA-I阻斷抗體及HLA-II阻斷抗體。在任何前述實施例中，組合物進一步包括分泌的細胞介素，其水準可與在不存在HLA-I及/或HLA-II阻斷抗體時獲得之水準進行比較。在任何前述實施

例中，HLA-I阻斷抗體係以1 μg/mL與50 μg/mL之間的濃度存在。在任何前述實施例中，HLA-I阻斷抗體係以5 μg/mL與20 μg/mL之間的濃度存在。在任何前述實施例中，HLA-II阻斷抗體係以1 μg/mL與50 μg/mL之間的濃度存在。在任何前述實施例中，HLA-II阻斷抗體係以5 μg/mL與20 μg/mL之間的濃度存在。

【0808】在一些實施例中，本文所描述之效力測定可用於確定T細胞組合物(包含TIL、MIL及PBL組合物)之效力，該等組合物描述於美國專利申請公開案第US 2018/0282694 A1號；第US 2020/0224161 A1號；及第US 2020/0277573 A1號；國際專利申請公開案第WO 2019/210131 A1號；第WO 2019/136456 A1號；第WO 2019/145711 A1號；第WO 2019/210131 A1號；第WO 2020/152451 A1號；及第WO 2021/123832 A1號；及美國專利第10,130,659號、第10,166,257號、第10,272,113號、第10,363,273號、第10,398,734號、第10,420,799號、第10,463,697號、第10,537,595號、第10,646,517號、第10,653,723號、第10,693,330號、第10,695,372號、第10,894,063號、第10,905,718號、第10,918,666號中，該等專利中之每一者的揭示內容以引用的方式併入本文中。

【0809】在一些前述實施例中，用於效力測定的目標細胞被製備為工作細胞庫。在一些前述實施例中，用於效力測定的目標細胞被製備為主細胞庫。

C. 測定套組

【0810】在一實施例中，本發明包含用於測試TIL(諸如TIL、MIL或PBL產物)之效力的套組。在一些實施例中，套組包含如本文所描述之目標細胞。在一實施例中，套組包含Raji細胞、Thp1細胞、Ramos細胞、U937細胞、Daudi細胞、其組合或其衍生物、變體、修飾或後代。在一些實施例中，套組包含如本文所描述之陰性對照細胞。在一實施例中，套組包含K562細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一些實施例中，套組包含培養基、免疫測定試劑、ELISA或自動ELISA系統、包括分泌蛋白之上清液、PBMC、如本文所描述之陽性對照或其他測試組分。

【0811】在一些實施例中，本發明包含用於測試TIL(諸如TIL、MIL或PBL產物)之效力的套組，其中套組包括一個至三個目標細胞、培養基及共培養容器。在一些實施例中，一個至三個目標細胞係選自由以下組成之群組：Raji細胞、Thp1細胞、Ramos細胞、U937細胞、Daudi細胞及其組合、衍生物、變體、修飾及後代。在一些實施例中，培養基包括AIM-V培養基。在一些實施例中，培養基包括IL-2。

【0812】在一些實施例中，套組包括單核球性目標細胞株。在一些實施例中，套組包括骨髓譜系目標細胞株。在一些實施例中，套組包括B細胞目標細胞株。在一些實施例中，套組包括B細胞類淋巴母細胞目標細胞株。在一些實施例中，套組包括伯基特氏淋巴瘤細胞目標細胞株。

在一些實施例中，套組包括急性單核球性白血病細胞株。在一些實施例中，套組包括M5亞型急性單核球性白血病細胞株。

【0813】在一實施例中，套組之任何先前實施例包括經輻照目標細胞。在一實施例中，套組之任何先前實施例包括未經輻照之目標細胞。在一實施例中，套組之任何先前實施例包括經輻照之陰性對照細胞。在一實施例中，套組之任何先前實施例包括未經輻照之陰性對照細胞。在一實施例中，套組之任何先前實施例包括未經輻照之K562陰性對照細胞。在一實施例中，套組之任何先前實施例包括經輻照之K562陰性對照細胞。

【0814】所提出的用以確定T細胞(包含TIL、MIL及PBL)之效力或功能性的方法之例示性實施例亦可見於本文所包含之實例及圖式中。

【0815】在任何前述實施例中，套組亦包含HLA-I阻斷抗體。在任何前述實施例中，套組亦包含HLA-II阻斷抗體。

【0816】在任何前述實施例中，套組亦包含陽性對照TIL細胞株。適合的陽性對照TIL細胞株包含已充分表徵、擴增至較大細胞計數、顯示為可再現地在本發明之效力測定中作出反應且小心地在冷凍條件下儲存以供後續使用的陽性對照TIL細胞株。

IV. Gen 2 TIL製造過程

【0817】圖1及圖2中描繪含有一些此等特徵的例示性TIL過程系列，稱為Gen 2(又稱為過程2A)。Gen 2之一個實施例顯示於圖2中。本發明之此實施例優於過程1C的一些優點描述於國際專利公開案第WO 2018/081473 A1中，其以引用的方式併入本文。

【0818】如本文所論述，本發明可包含與再刺激冷凍保存之TIL以增加其代謝活性且因此在移植至患者體內之前增加相對健康相關的步驟，及測試該代謝健康之方法。如本文大體上概述，TIL一般係獲自患者樣本且在移植至患者體內之前進行操作以擴增其數目。在一些實施例中，TIL可視情況如下文所論述經基因操作。

【0819】在一些實施例中，TIL可經冷凍保存。解凍後，其亦可經再刺激以在輸注至患者中之前增加其代謝。

【0820】在一些實施例中，將第一擴增(包含稱為預REP之過程以及圖1中顯示為步驟A之過程)縮短至3至14天，且將第二擴增(包含稱為REP之過程以及圖1中顯示為步驟B之過程)縮短至7至14天，如下文以及實例及圖式中所詳細論述。在一些實施例中，將第一擴增(例如圖1中步驟B所描述之擴增)縮短至11天，且將第二次擴增(例如圖1中步驟D中所描述之擴增)縮短至11天。在一些實施例中，將第一擴增及第二擴增(例如，在圖1中描述為步驟B及步驟D之擴增)之組合縮短至22天，如下文及實施例及圖式中所詳細論述。

【0821】以下「步驟」名稱A、B、C等參照圖1且參

照本文所描述之某些實施例。以下及圖1中的步驟次序為例示性的，且本申請案及本文中所揭示之方法涵蓋步驟之任何組合或次序，以及另外的步驟、步驟重複及/或步驟省略。

A. 步驟A：獲得患者腫瘤樣本

【0822】一般而言，TIL最初係獲自患者腫瘤樣本(「初代TIL」)，且接著擴增成較大群體以進行如本文所描述之進一步操作，視情況經冷凍保存，如本文所概述進行再刺激並且視情況評估表型及作為TIL健康指標之代謝參數。

【0823】患者腫瘤樣本可使用本領域中已知之方法獲得，通常經由手術切除、穿刺生檢、核心生檢、小型生檢或其他用於獲得含有腫瘤與TIL細胞之混合物之樣本的方式獲得。在一些實施例中，使用多病灶取樣。在一些實施例中，手術切除、穿刺生檢、核心生檢、小型生檢或其他用於獲得含有腫瘤與TIL細胞之混合物的樣本的手段包含多病灶取樣(亦即，自患者中的一個或多個腫瘤部位及/或位置以及同一位置或附近的一個或多個腫瘤獲得樣本)。一般而言，腫瘤樣本可來自任何實體腫瘤，包含原發性腫瘤、侵襲性腫瘤或轉移性腫瘤。腫瘤樣本亦可為液體腫瘤，諸如獲自血液惡性病之腫瘤。實體腫瘤可具有皮膚組織。在一些實施例中，有用的TIL係自黑色素瘤中獲得。

【0824】一旦獲得，腫瘤樣本通常使用銳器分割碎斷

成1 mm^3至約8 mm^3之間的塊，其中約2 mm^3至3 mm^3為尤其適用的。TIL係自此等碎片使用酶素性腫瘤碎解物培養。此類腫瘤碎解物可藉由在酶素性培養基(例如羅斯威爾公園癌症研究所(Roswell Park Memorial Institute；RPMI)1640緩衝液、2 mM麩胺酸、10 mcg/mL建它黴素(gentamicine)、30單位/mL DNA酶及1.0 mg/mL膠原蛋白酶)中培育，接著進行機械解離(例如使用組織解離器)來產生。腫瘤碎解物可藉由以下產生：將腫瘤置放於酶素性培養基中且機械解離腫瘤大約1分鐘，隨後在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘，隨後在前述條件下重複機械解離及培育循環，直至僅存在小組織片。在此過程結束時，若細胞懸浮液含有大量紅血球或死細胞，則可進行使用FICOLL分支鏈親水性多醣之密度梯度分離以移除此等細胞。可使用本領域中已知之替代方法，諸如美國專利申請公開案第2012/0244133 A1號中所描述之方法，該公開案之揭示內容以引用之方式併入本文中。任何前述方法可用於本文所描述之任何實施例中擴增TIL之方法或治療癌症之方法。在一些實施例中，根據國際專利公開案第WO 2021/123832 A1中描述的方法或組合物的形式碎解腫瘤，該公開案之揭示內容係以引用的方式併入本文中。

【0825】如上文所指出，在一些實施例中，TIL係衍生自實體腫瘤。在一些實施例中，實體腫瘤未經碎斷。在一些實施例中，實體腫瘤未經碎斷且以全腫瘤進行酶素性碎解。在一些實施例中，腫瘤係在包括膠原蛋白酶、DNA

酶及玻尿酸酶之酶混合物中碎解。在一些實施例中，腫瘤係在包括膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中碎解1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2下在包括膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中碎解1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2、旋轉下在包括膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中碎解1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在恆定旋轉下碎解隔夜。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2、恆定旋轉下碎解隔夜。在一些實施例中，整個腫瘤與酶組合以形成腫瘤碎解反應混合物。

【0826】在一些實施例中，在無菌緩衝液中用凍乾酶重構腫瘤。在一些實施例中，緩衝液為無菌HBSS。

【0827】在一些實施例中，酶混合物包括膠原蛋白酶。在一些實施例中，膠原蛋白酶為膠原蛋白酶IV。在一些實施例中，膠原蛋白酶之工作儲備溶液為100 mg/mL 10×工作儲備溶液。

【0828】在一些實施例中，酶混合物包括DNA酶。在一些實施例中，DNA酶之工作儲備溶液為10,000 IU/mL 10×工作儲備溶液。

【0829】在一些實施例中，酶混合物包括玻尿酸酶。在一些實施例中，玻尿酸酶之工作儲備溶液為10 mg/mL 10×工作儲備溶液。

【0830】在一些實施例中，酶混合物包括10 mg/mL膠原蛋白酶、1000 IU/mL DNA酶及1 mg/mL玻尿酸酶。

【0831】在一些實施例中，酶混合物包括10 mg/mL膠原蛋白酶、500 IU/mL DNA酶及1 mg/mL玻尿酸酶。

【0832】一般而言，經收集之細胞懸浮液被稱為「初代細胞群體」或「新鮮收集的」細胞群體。

【0833】在一些實施例中，碎斷包含物理碎斷，包含例如分割以及碎解。在一些實施例中，碎斷為物理碎斷。在一些實施例中，碎斷為分割。在一些實施例中，藉由碎解進行碎斷。在一些實施例中，TIL最初可自獲自患者之酶素性腫瘤碎解物及腫瘤碎片培養。在一實施例中，TIL最初可自獲自患者之酶素性腫瘤碎解物及腫瘤碎片培養。

【0834】在一些實施例中，當腫瘤為實體腫瘤時，在例如步驟A(如圖1中所提供)中獲得腫瘤樣本之後，對腫瘤進行物理碎段。在一些實施例中，碎斷發生在冷凍保存之前。在一些實施例中，碎斷發生在冷凍保存之後。在一些實施例中，碎斷在獲得腫瘤之後並且在不進行任何冷凍保存的情況下發生。在一些實施例中，將腫瘤碎斷且將10、20、30、40或更多個碎片或片置於各容器中進行第一次擴增。在一些實施例中，將腫瘤碎斷且將30或40個碎片或片置於各容器中進行第一次擴增。在一些實施例中，將腫瘤碎斷且將40個碎片或片置於各容器中進行第一次擴增。在一些實施例中，多個碎片包括約4個至約50個碎片，其中各碎片之體積為約27 mm^3。在一些實施例中，多個碎片包括約30個至約60個碎片，其總體積為約1300 mm^3至約1500 mm^3。在一些實施例中，多個碎片包括約50個碎片，其總

體積為約1350 mm^3。在一些實施例中，多個碎片包括約50個碎片，其總質量為約1公克至約1.5公克。在一些實施例中，多個碎片包括約4個碎片。

【0835】在一些實施例中，TIL係獲自腫瘤碎片。在一些實施例中，腫瘤碎片係藉由銳器分割獲得。在一些實施例中，腫瘤碎片在約1 mm^3與10 mm^3之間。在一些實施例中，腫瘤碎片在約1 mm^3與8 mm^3之間。在一些實施例中，腫瘤碎片為約1 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約2 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約3 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約4 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約5 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約6 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約7 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約8 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約9 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約10 mm^3。在一些實施例中，腫瘤為1-4 mm × 1-4 mm × 1-4 mm。在一些實施例中，腫瘤為1 mm × 1 mm × 1 mm。在一些實施例中，腫瘤為2 mm × 2 mm × 2 mm。在一些實施例中，腫瘤為3 mm × 3 mm × 3 mm。在一些實施例中，腫瘤為4 mm × 4 mm × 4 mm。

【0836】在一些實施例中，切除腫瘤以使各片上出血性、壞死及/或脂肪組織之量減至最小。在一些實施例中，切除腫瘤以使各片上出血性組織之量減至最小。在一些實施例中，切除腫瘤以使各片上壞死組織之量減至最小。在一些實施例中，切除腫瘤以使各片上脂肪組織的量

減至最小。

【0837】在一些實施例中，進行腫瘤碎斷以便維持腫瘤內部結構。在一些實施例中，在不使用解剖刀進行鋸切動作的情況下進行腫瘤碎斷。在一些實施例中，TIL係獲自腫瘤碎解物。在一些實施例中，藉由在酶培養基(例如但不限於RPMI 1640、2 mM GlutaMAX、10 mg/mL建它黴素、30 U/mL DNA酶及1.0 mg/mL膠原蛋白酶)中培育，隨後進行機械解離(加利福尼亞州奧本美天旎生物技術的GentleMACS)來產生腫瘤碎解物。在將腫瘤置於酶培養基中之後，可以機械方式將腫瘤解離大約1分鐘。隨後可將溶液在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘，且接著再次機械破壞大約1分鐘。在37℃下在5% CO_2中再培育30分鐘之後，可將腫瘤第三次機械破壞大約1分鐘。在一些實施例中，在第三次機械破壞後若大片組織仍存在，則施加1或2次另外機械解離至樣本，不論是否再在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘。在一些實施例中，在最終培育結束時，若細胞懸浮液含有大量紅血球或死細胞，則可進行使用Ficoll之密度梯度分離以移除此等細胞。

【0838】在一些實施例中，將在第一次擴增步驟之前收集的細胞懸浮液稱為「初代細胞群體」或「新鮮獲得的」細胞群體。

【0839】在一些實施例中，細胞可視情況在樣本收集之後冷凍且在進入步驟B(其在下文進一步詳細描述以及圖1以及圖8中所例示)中所描述之擴增之前冷凍儲存。

1. 胸膜滲出液TIL

【0840】在一些實施例中，樣本為胸膜液樣本。在一些實施例中，根據本文所描述之過程的用於擴增之TIL的來源為胸膜液樣本。在一些實施例中，樣本為源於胸膜滲出液之樣本。在一些實施例中，根據本文所描述之過程的用於擴增之TIL的來源為源於胸膜滲出液之樣本。參見例如美國專利公開案US 2014/0295426中所描述之方法，其出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

【0841】在一些實施例中，可以採用疑似及/或含有TIL之任何胸膜液或胸膜滲出液。此類樣本可來源於原發性或轉移性肺癌，諸如NSCLC或SCLC。在一些實施例中，樣本可為來源於另一器官(例如乳房、卵巢、結腸或前列腺)之繼發轉移性癌細胞。在一些實施例中，用於本文所描述之擴增方法中之樣本為胸膜滲出物(pleural exudate)。在一些實施例中，用於本文所描述之擴增方法中之樣本為胸膜溢出物(pleural transudate)。其他生物樣本可包含含有TIL之其他漿液，包含例如來自腹部之腹水液或胰囊腫液。腹水液及胸膜液涉及非常類似的化學系統；腹部及肺兩者在相同的惡性腫瘤事件中於胸腔及腹腔中皆具有間皮細胞株及流體形式，且在一些實施例中，此類流體含有TIL。在本發明例示胸膜液的一些實施例中，可以使用含有TIL之腹水或其他囊腫液進行相同的方法以得到類似結果。

【0842】在一些實施例中，胸膜液呈未經處理之形式直接自患者移除。在一些實施例中，在接觸步驟之前，將未經處理之胸膜液置於標準血液收集管(諸如EDTA或肝素管)中。在一些實施例中，在接觸步驟之前，將未經處理之胸膜液置於標準CellSave®管(Veridex)中。在一些實施例中，在自患者收集之後立即將樣本置於CellSave管中，以避免活TIL之數目減少。若保留在未經處理之胸膜液中，即使在4℃下，活TIL之數目可能在24小時內顯著降低。在一些實施例中，樣本係在自患者移除之後1小時、5小時、10小時、15小時或至多24小時內置於適當收集管中。在一些實施例中，樣本係在4℃下自患者移除之後1小時、5小時、10小時、15小時或至多24小時內置於適當收集管中。

【0843】在一些實施例中，可以稀釋來自所選個體之胸膜液樣本。在一個實施例中，稀釋度為1:10胸膜液比稀釋劑。在另一實施例中，稀釋度為1:9胸膜液比稀釋劑。在另一實施例中，稀釋度為1:8胸膜液比稀釋劑。在另一實施例中，稀釋度為1:5胸膜液比稀釋劑。在另一實施例中，稀釋度為1:2胸膜液比稀釋劑。在另一實施例中，稀釋度為1:1胸膜液比稀釋劑。在一些實施例中，稀釋劑包含鹽水、磷酸鹽緩衝鹽水、另一緩衝液或生理學上可接受之稀釋劑。在一些實施例中，樣本係在自患者收集及稀釋之後立即置於CellSave管中，以避免活TIL減少，若保留在未經處理之胸膜液中，則即使在4℃下，活TIL可能在24

至48小時內顯著減少。在一些實施例中，胸膜液樣本係在自患者移除且稀釋之後1小時、5小時、10小時、15小時、24小時、36小時、至多48小時內置於適當收集管中。在一些實施例中，胸膜液樣本係在自患者移除且在4℃下稀釋之後1小時、5小時、10小時、15小時、24小時、36小時、至多48小時內置於適當收集管中。

【0844】在又一實施例中，在進一步的處理步驟之前，藉由習知手段濃縮胸膜液樣本。在一些實施例中，在胸膜液必須冷凍保存以便運送至進行該方法之實驗室或用於後續分析(例如，在收集後24至48小時之後)之情形下，此胸膜液之預處理較佳。在一些實施例中，藉由在將胸膜液樣本自個體中取出後將其離心並將離心液或沈澱物再懸浮於緩衝液中來製備胸膜液樣本。在一些實施例中，對胸膜液樣本進行多次離心及再懸浮，隨後將其冷凍保存以用於運輸或以後的分析及/或處理。

【0845】在一些實施例中，在進一步的處理步驟之前，藉由使用過濾方法濃縮胸膜液樣本。在一些實施例中，在接觸步驟中使用之胸膜液樣本係藉由將流體經由含有已知且基本均勻的孔徑的過濾器過濾而製備的，該孔徑允許胸膜液通過膜但保留腫瘤細胞。在一些實施例中，膜中的孔之直徑可為至少4 μM。在另一實施例中，孔徑可為5 μM或更大，且在其他實施例中，可為6 μM、7 μM、8 μM、9 μM或10 μM中之任一者。過濾之後，可將被膜保留之細胞(包含TIL)自膜上衝出至適合的生理學上可接受之

緩衝液中。然後可以將以此方式濃縮之細胞(包含TIL)用於該方法之接觸步驟中。

【0846】在一些實施例中，使胸膜液樣本(包含例如未經處理之胸膜液)、經稀釋之胸膜液或再懸浮之細胞沈澱物與溶解試劑接觸，該溶解試劑係差異性地溶解樣本中存在之無核紅血球。在一些實施例中，在胸膜液含有大量RBC之情形下，此步驟係在進一步的處理步驟之前進行。適合的溶解試劑包含單一溶解試劑或溶解試劑及淬滅試劑，或溶解試劑、淬滅試劑及固定試劑。適合的溶解系統為市售的，且包含BD Pharm Lyse™系統(碧迪醫療公司(Becton Dickenson))。其他溶解系統包含Versalyse™系統、FACSlyse™系統(碧迪醫療公司)、Immunoprep™系統或Erythrolyse II系統(貝克曼庫爾特公司(Beckman Coulter, Inc.))或氯化銨系統。在一些實施例中，溶解試劑可隨主要需求而變化，該等需求為紅血球之有效溶解及TIL之保守性及胸膜液中TIL之表型特性。除採用單一試劑用於溶解之外，適用於本文所描述之方法的溶解系統可包含第二試劑，例如在該方法之剩餘步驟期間淬滅或延遲溶解試劑之效應的試劑，例如Stabilyse™試劑(貝克曼庫爾特公司)。視溶解試劑之選擇或該方法之較佳實施而定，亦可採用習知固定試劑。

【0847】在一些實施例中，在約-140℃之溫度下冷凍保存如上文所描述之未經處理、稀釋或多次離心或處理的胸膜液樣本，隨後如本文所提供進行進一步處理及/或擴

增。

B. 步驟B：第一次擴增

【0848】在一些實施例中，本發明方法實現獲得年輕TIL，其能夠在投予個體/患者時增加複製循環且因此可提供優於較老TIL(亦即，在投予個體/患者之前進一步經歷更多輪複製之TIL)之額外治療益處。年輕TIL之特徵已在文獻中描述，例如Donia等人，《斯堪的納維亞免疫學雜誌(*Scandinavian Journal of Immunology*)》，75:157-167 (2012)；Dudley等人，《臨床癌症研究(*Clin Cancer Res*)》，16:6122-6131 (2010)；Huang等人，《免疫療法雜誌》，28(3):258-267 (2005)；Besser等人，《臨床癌症研究》，19(17):OF1-OF9 (2013)；Besser等人，《免疫療法雜誌》 32:415-423 (2009)；Robbins等人，《免疫學雜誌(*J Immunol*)》 2004; 173:7125-7130；Shen等人，《免疫療法雜誌》，30:123-129 (2007)；Zhou等人，《免疫療法雜誌》，28:53-62 (2005)；及Tran等人，《免疫療法雜誌》，31:742-751 (2008)，其皆以全文引用之方式併入本文中。

【0849】T及B淋巴球之多樣抗原受體係藉由有限但大量的基因區段之體細胞重組產生。此等基因區段：V(可變區)、D(多樣區)、J(聯結區)及C(恆定區)決定免疫球蛋白及T細胞受體(TCR)之結合特異性及下游應用。本發明提供一種產生展現且增加T細胞組庫多樣性之TIL的方法。在一些實施例中，藉由本發明方法獲得之TIL展現T細胞組庫

多樣性之增加。在一些實施例中，相較於新鮮收集的TIL及/或使用除本文中提供之方法以外之其他方法製備的TIL，藉由本發明方法獲得的TIL展現增加的T細胞組庫多樣性，該等其他方法包含例如除圖1中實施之方法以外的方法。在一些實施例中，相較於新鮮收集的TIL及/或使用如圖5及/或圖6中例示之稱為過程1C之方法製備的TIL，藉由本發明方法獲得的TIL展現增加的T細胞組庫多樣性。在一些實施例中，在第一次擴增中獲得之TIL展現T細胞組庫多樣性增加。在一些實施例中，多樣性增加係免疫球蛋白多樣性及/或T細胞受體多樣性的增加。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白重鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白輕鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於T細胞受體中。在一些實施例中，多樣性存在於選自由α、β、γ及δ受體組成之群組的T細胞受體中之一者中。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α及/或β之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)β之表現增加。在一些實施例中，TCRab(亦即，TCRα/β)之表現增加。

【0850】在例如圖1之步驟A中所描述將腫瘤碎片解剖或碎解之後，將所得細胞在含有IL-2之血清中在促進TIL生長超過腫瘤及其他細胞之條件下培養。在一些實施例中，在2 mL孔中在包含具有6000 IU/mL IL-2之去活化人類AB血清之培養基中培育腫瘤碎解物。將此初代細胞群體

培養數天之時段，通常3至14天，產生通常約1 × 10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，將此初代細胞群體培養7至14天之時段，產生通常約1 × 10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，將此初代細胞群體培養10至14天之時段，產生通常約1 × 10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，將此初代細胞群體培養約11天之時段，產生通常約1 × 10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。

【0851】在較佳實施例中，TIL之擴增可使用如下文及本文所描述之初始主體TIL擴增步驟(例如圖1之步驟B中所描述之擴增，其可包含稱為預REP之過程)進行，接著進行如下文步驟D及本文所描述之第二次擴增(步驟D，包含稱為快速擴增方案(REP)步驟之過程)，隨後進行視情況選用之冷凍保存，且接著進行如下文及本文所描述之第二步驟D(包含稱為再刺激REP步驟之過程)。自此過程獲得之TIL可視情況針對如本文所描述之表型特徵及代謝參數進行表徵。

【0852】在TIL培養在24孔盤中開始的實施例中，例如，使用平底Costar 24孔細胞培養簇(康寧公司(Corning Incorporated)，Corning，NY)，在具有IL-2(6000 IU/mL；加利福尼亞州的愛莫利維爾Chiron Corp.)的2 mL完全培養基(CM)中，每個孔可以接種1 × 10^6個腫瘤碎解物細胞或一個腫瘤碎片。在一些實施例中，腫瘤碎片在約1 mm^3與10 mm^3之間。

【0853】在一些實施例中，第一擴增培養基稱為「CM」(培養基之縮寫)。在一些實施例中，步驟B之CM由補充有10%人類AB血清、25 mM Hepes及10 mg/mL建它黴素的含GlutaMAX之RPMI 1640組成。在具有40 mL容量及10 cm^2透氣矽底的透氣培養瓶(例如G-Rex 10；明尼蘇達州新布萊頓市的Wilson Wolf Manufacturing)中起始培養之實施例中，各培養瓶裝載有在10-40 mL含IL-2之CM中的10-40×10^6個活腫瘤碎解物細胞或5至30個腫瘤碎片。G-Rex 10及24孔盤均在含濕氣培育箱中在37℃及5% CO_2下培育且在培養起始後5天，移除一半培養基且更換為新鮮的CM及IL-2，且在第5天之後，每2至3天更換一半培養基。

【0854】在製備腫瘤碎片後，將所得細胞(亦即碎片)在含有IL-2之血清中在促進TIL生長超過腫瘤及其他細胞之條件下培養。在一些實施例中，將腫瘤碎解物在2 mL孔中，在包括去活化人類AB血清(或在一些情況下，如本文所概述，在存在aAPC細胞群體之情況下)及6000 IU/mL IL-2的培養基中培育。將此初代細胞群體培養數天之時段，通常10至14天，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，在第一擴增期間的生長培養基包括IL-2或其變體。在一些實施例中，IL為重組人類IL-2(rhIL-2)。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備溶液具有20至30×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備溶液具有20×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備溶液具有25×10^6 IU/mg之比

活性。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備溶液具有30×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，IL-2儲備溶液具有4至8×10^6 IU/mg IL-2之最終濃度。在一些實施例中，IL-2儲備溶液具有5至7×10^6 IU/mg IL-2之最終濃度。在一些實施例中，IL-2儲備溶液具有6×10^6 IU/mg IL-2之最終濃度。在一些實施例中，如實例5中所描述製備IL-2儲備溶液。在一些實施例中，第一擴增培養基包括約10,000 IU/mL IL-2、約9,000 IU/mL IL-2、約8,000 IU/mL IL-2、約7,000 IU/mL IL-2、約6000 IU/mL IL-2或約5,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，第一擴增培養基包括約9,000 IU/mL IL-2至約5,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，第一擴增培養基包括約8,000 IU/mL IL-2至約6,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，第一擴增培養基包括約7,000 IU/mL IL-2至約6,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，第一擴增培養基包括約6,000 IU/mL IL-2。在一實施例中，細胞培養基進一步包括IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包括約3000 IU/mL IL-2。在一實施例中，細胞培養基進一步包括IL-2。在較佳實施例中，細胞培養基包括約3000 IU/mL IL-2。在一實施例中，細胞培養基包括約1000 IU/mL、約1500 IU/mL、約2000 IU/mL、約2500 IU/mL、約3000 IU/mL、約3500 IU/mL、約4000 IU/mL、約4500 IU/mL、約5000 IU/mL、約5500 IU/mL、約6000 IU/mL、約6500 IU/mL、約7000 IU/mL、約7500 IU/mL或約8000 IU/mL IL-2。在一實施例中，細胞培養基包括1000與2000

IU/mL之間、2000與3000 IU/mL之間、3000與4000 IU/mL之間、4000與5000 IU/mL之間、5000與6000 IU/mL之間、6000與7000 IU/mL之間、7000與8000 IU/mL之間或約8000 IU/mL的IL-2。

【0855】在一些實施例中，第一擴增培養基包括約500 IU/mL IL-15、約400 IU/mL IL-15、約300 IU/mL IL-15、約200 IU/mL IL-15、約180 IU/mL IL-15、約160 IU/mL IL-15、約140 IU/mL IL-15、約120 IU/mL IL-15或約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第一擴增培養基包括約500 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第一擴增培養基包括約400 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第一擴增培養基包括約300 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第一擴增培養基包括約200 IU/mL IL-15。在一些實施例中，細胞培養基包括約180 IU/mL IL-15。在一實施例中，細胞培養基進一步包括IL-15。在較佳實施例中，細胞培養基包括約180 IU/mL IL-15。

【0856】在一些實施例中，第一擴增培養基包括約20 IU/mL IL-21、約15 IU/mL IL-21、約12 IU/mL IL-21、約10 IU/mL IL-21、約5 IU/mL IL-21、約4 IU/mL IL-21、約3 IU/mL IL-21、約2 IU/mL IL-21、約1 IU/mL IL-21或約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包括約20 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包括約15 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-

21。在一些實施例中，第一擴增培養基包括約12 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包括約10 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包括約5 IU/mL IL-21至約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包括約2 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包括約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包括約0.5 IU/mL IL-21。在一實施例中，細胞培養基進一步包括IL-21。在較佳實施例中，細胞培養基包括約1 IU/mL IL-21。

【0857】在一實施例中，細胞培養基包括OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包括約30 ng/mL OKT-3抗體。在一實施例中，細胞培養基包括約0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL及約1 μg/mL OKT-3抗體。在一實施例中，細胞培養基包括0.1 ng/mL與1 ng/mL之間、1 ng/mL與5 ng/mL之間、5 ng/mL與10 ng/mL之間、10 ng/mL與20 ng/mL之間、20 ng/mL與30 ng/mL之間、30 ng/mL與40 ng/mL之間、40 ng/mL與50 ng/mL之間及50 ng/mL與100 ng/mL之間的OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基不包括OKT-3抗體。在一些實施例中，OKT-3抗體為莫羅單抗。

【0858】在一些實施例中，細胞培養基包括一種或多種TNFRSF促效劑於細胞培養基中。在一些實施例中，TNFRSF促效劑包括4-1BB促效劑。在一些實施例中，TNFRSF促效劑為4-1BB促效劑，且該4-1BB促效劑選自由以下組成之群組：烏瑞魯單抗、烏圖木單抗、EU-101、融合蛋白及其片段、衍生物、變體、生物類似物及組合。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成0.1 μg/mL至100 μg/mL之濃度。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成20 μg/mL至40 μg/mL之濃度。

【0859】在一些實施例中，除了一種或多種TNFRSF促效劑之外，細胞培養基進一步包括初始濃度約3000 IU/mL之IL-2及初始濃度約30 ng/mL之OKT-3抗體，且其中該一種或多種TNFRSF促效劑包括4-1BB促效劑。

【0860】在一些實施例中，第一擴增培養基稱為「CM」(培養基之縮寫)。在一些實施例中，其稱為CM1(培養基1)。在一些實施例中，CM由補充有10%人類AB血清、25 mM Hepes及10 mg/mL建它黴素的含GlutaMAX之RPMI 1640組成。在具有40 mL容量及10 cm^2透氣矽底的透氣培養瓶(例如G-Rex 10；明尼蘇達州新布萊頓市的Wilson Wolf Manufacturing)中起始培養之實施例中，各培養瓶裝載有在10-40 mL含IL-2之CM中的10-40×10^6個活腫瘤碎解物細胞或5至30個腫瘤碎片。G-Rex 10及24孔盤均在含濕氣培育箱中在37℃及5% CO_2下培育且在培養起始後5天，

移除一半培養基且更換為新鮮的CM及IL-2，且在第5天之後，每2至3天更換一半培養基。在一些實施例中，CM為實例中所描述之CM1，參見實例1。在一些實施例中，第一次擴增在初始細胞培養基或第一細胞培養基中進行。在一些實施例中，初始細胞培養基或第一細胞培養基包括IL-2。

【0861】在一些實施例中，第一次擴增過程(包含諸如描述於圖1之步驟B中之過程，其可包含有時稱為預REP之過程)縮短至3至14天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，第一擴增(包含諸如圖1之步驟B中所描述之過程，其可包含有時稱為預REP之過程)縮短至7至14天，如實例中所論述及圖4及5中所示，以及包含例如圖1之步驟B中所描述之擴增。在一些實施例中，步驟B之第一次擴增縮短至10至14天。在一些實施例中，如例如圖1之步驟B中所描述之擴增中所論述，第一次擴增縮短至11天。

【0862】在一些實施例中，第一次TIL擴增可進行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行1天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行2天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行3天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行4天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行5天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行6天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行7天至14天。在一些實施例

中，第一TIL擴增可進行8天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行9天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行10天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行11天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行12天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行13天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行1天至11天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行2天至11天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行3天至11天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行4天至11天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行5天至11天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行6天至11天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行7天至11天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行8天至11天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行9天至11天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行10天至11天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行11天。

【0863】在一些實施例中，採用IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21之組合作為在第一擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21以及其任何組合可包含在第一擴增期間，包含例如在根據圖1以及本文所描述之步驟B過程期間。在一些實施例中，採用IL-2、IL-15及IL-21之組合作為在第一擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-15及IL-21以及其任何組合可包含在根據圖1以及如本文所描述之步驟B過程期間。

【0864】在一些實施例中，第一次擴增(包含稱為預REP的過程；例如，根據圖1的步驟B)過程被縮短至3至14天，如實施例和附圖中所討論的。在一些實施例中，步驟B之第一次擴增縮短至7至14天。在一些實施例中，步驟B之第一次擴增縮短至10至14天。在一些實施例中，第一次擴增縮短至11天。

【0865】在一些實施例中，第一次擴增，例如根據圖1之步驟B，係在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用單一生物反應器。在一些實施例中，所採用的單一生物反應器為例如G-Rex 10或G-Rex 100。在一些實施例中，密閉系統生物反應器為單一生物反應器。

C. 步驟C：第一次擴增至第二次擴增之轉變

【0866】在一些情況下，自第一次擴增獲得的主體TIL群體，包含例如自例如圖1中所示之步驟B獲得的TIL群體，可使用下文所論述之方案立即冷凍保存。或者，自第一擴增獲得的TIL群體，稱為第二TIL群體，可經歷第二次擴增(其可包含有時稱為REP之擴增)且接著如下文所論述冷凍保存。類似地，在將經基因修飾之TIL用於療法的情況下，第一TIL群體(有時稱為主體TIL群體)或第二TIL群體(在一些實施例中，其可包含稱為REP TIL群體之群體)可在擴增之前或在第一次擴增之後且在第二次擴增之前進行基因修飾以用於適合的治療。

【0867】在一些實施例中，儲存自第一次擴增(例如自如圖1中所指示之步驟B)獲得的TIL直至進行表型分析以供選擇。在一些實施例中，自第一次擴增(例如自如圖1中所指示之步驟B)獲得的TIL未經儲存且直接進行至第二次擴增。在一些實施例中，獲自第一擴增之TIL在第一擴增之後且在第二擴增之前不經冷凍保存。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後約3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後約3天至14天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後約4天至14天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後約4天至10天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後約7天至14天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後約14天發生。

【0868】在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後1天至14天發生。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行2天至14天。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後3天至14天發生。

在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後4天至14天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後5天至14天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後6天至14天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後7天至14天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後8天至14天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後9天至14天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後10天至14天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後11天至14天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後12天到14天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後13天至14天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後14天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後1天至11天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後2天至11天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後3天至11天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後4天至11天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴

增之轉變係在碎斷發生後5天至11天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後6天至11天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後7天至11天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後8天至11天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後9天至11天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後10天至11天發生。在一些實施例中，自第一次擴增至第二次擴增之轉變係在碎斷發生後11天發生。

【0869】在一些實施例中，TIL在第一擴增之後且在第二擴增之前不進行儲存，且TIL直接進行第二擴增(例如在一些實施例中，在如圖1中所顯示的步驟B至步驟D之轉變期間不進行儲存)。在一些實施例中，轉變在如本文所描述之密閉系統中發生。在一些實施例中，來自第一擴增之TIL(第二TIL群體)直接進行第二擴增而無轉變期。

【0870】在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變(例如根據圖1之步驟C)在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用單一生物反應器。在一些實施例中，所採用的單一生物反應器為例如G-Rex 10或G-Rex 100。在一些實施例中，密閉系統生物反應器為單一生物反應器。

1. 細胞介素

【0871】本文所描述之擴增方法通常使用具有高劑量細胞介素(特別是IL-2)之培養基，如本領域中所已知。

【0872】或者，使用細胞介素之組合用於TIL的快速擴增及/或第二次擴增亦是有可能的，其中IL-2、IL-15及IL-21中之兩者或更多者的組合描述於美國專利申請公開案第2017/0107490 A1及國際專利申請公開案第WO 2015/189357號中，該等專利中之每一者以全文引用之方式明確併入本文。因此，可能組合包含IL-2及IL-15、IL-2及IL-21、IL-15及IL-21以及IL-2、IL-15及IL-21，其中後者在許多實施例中具有特定用途。使用細胞介素之組合特別有利於產生淋巴球，特別是如其中所描述的T細胞。

D. 步驟D：第二次擴增

【0873】在一些實施例中，TIL細胞群體在收集及初始批量處理之後(例如在步驟A及步驟B之後以及稱為步驟C的轉變之後)在數目上有所擴增，如圖1中所指示。此進一步擴增在本文中稱為第二次擴增，其可包含在本領域中一般稱為快速擴增過程(REP；以及如圖1之步驟D中所指示之過程)之擴增過程。第二擴增通常使用包括多種組分(包含飼養細胞、細胞介素來源及抗CD3抗體)之培養基在透氣容器中完成。

【0874】在一些實施例中，TIL之第二擴增或第二TIL擴增(其可包含有時稱為REP之擴增；以及如圖1之步驟D

中所指示之過程)可使用本領域中熟習此項技術者已知之任何TIL培養瓶或容器進行。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約7天至約14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約8天至約14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約9天至約14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約10天至約14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約11天至約14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約12天至約14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約13天至約14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約14天。

【0875】在一實施例中，第二擴增可在透氣容器中使用本揭示案之方法(包含例如稱為REP之擴增；以及如圖1之步驟D中所指示之過程)進行。舉例而言，TIL可在介白素-2(IL-2)或介白素-15(IL-15)存在下使用非特異性T細胞受體刺激而快速擴增。非特異性T細胞受體刺激物可包含例如抗CD3抗體，諸如約30 ng/ml OKT3、小鼠單株抗CD3抗體(可購自新澤西州拉里坦市的Ortho-McNeil或加利福尼亞州奧本市的美天旎生物技術公司)或UHCT-1(可購自美國加利福尼亞州聖地亞哥市的BioLegend)。TIL可藉由在第二擴增期間包含一種或多種癌症之抗原(包含其抗原性部分，諸如抗原決定基)來擴增以誘導進一步TIL活體外刺激，該等抗原可視情況在T細胞生長因子(諸如300 IU/mL IL-2或IL-15)存在下視情況自載體表現，該載體諸如人類

白血球抗原A2(HLA-A2)結合肽，例如0.3 μM MART-1:26-35(27 L)或gpl 00:209-217(210M)。其他適合抗原可包含例如NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、酪胺酸酶癌症抗原、MAGE-A3、SSX-2及VEGFR2或其抗原部分。TIL亦可藉由用脈衝至表現HLA-A2之抗原呈現細胞上的相同癌症抗原再刺激而快速擴增。替代地，TIL可進一步用例如實例經照射之自體淋巴球或用經照射之HLA-A2+同種異體淋巴球及IL-2再刺激。在一些實施例中，再刺激作為第二擴增之部分發生。在一些實施例中，第二擴增在經照射之自體淋巴球或經照射之HLA-A2+同種異體淋巴球及IL-2存在下發生。

【0876】在一實施例中，細胞培養基進一步包括IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包括約3000 IU/mL IL-2。在一實施例中，細胞培養基包括約1000 IU/mL、約1500 IU/mL、約2000 IU/mL、約2500 IU/mL、約3000 IU/mL、約3500 IU/mL、約4000 IU/mL、約4500 IU/mL、約5000 IU/mL、約5500 IU/mL、約6000 IU/mL、約6500 IU/mL、約7000 IU/mL、約7500 IU/mL或約8000 IU/mL IL-2。在一實施例中，細胞培養基包括1000與2000 IU/mL之間、2000與3000 IU/mL之間、3000與4000 IU/mL之間、4000與5000 IU/mL之間、5000與6000 IU/mL之間、6000與7000 IU/mL之間、7000與8000 IU/mL之間或8000 IU/mL之間的IL-2。

【0877】在一實施例中，細胞培養基包括OKT-3抗

體。在一些實施例中，細胞培養基包括約30 ng/mL OKT-3抗體。在一實施例中，細胞培養基包括約0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL及約1 μg/mL OKT-3抗體。在一實施例中，細胞培養基包括0.1 ng/mL與1 ng/mL之間、1 ng/mL與5 ng/mL之間、5 ng/mL與10 ng/mL之間、10 ng/mL與20 ng/mL之間、20 ng/mL與30 ng/mL之間、30 ng/mL與40 ng/mL之間、40 ng/mL與50 ng/mL之間及50 ng/mL與100 ng/mL之間的OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基不包括OKT-3抗體。在一些實施例中，OKT-3抗體為莫羅單抗。

【0878】在一些實施例中，細胞培養基包括一種或多種TNFRSF促效劑於細胞培養基中。在一些實施例中，TNFRSF促效劑包括4-1BB促效劑。在一些實施例中，TNFRSF促效劑為4-1BB促效劑，且該4-1BB促效劑選自由以下組成之群組：烏瑞魯單抗、烏圖木單抗、EU-101、融合蛋白及其片段、衍生物、變體、生物類似物及組合。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成0.1 μg/mL至100 μg/mL之濃度。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成20 μg/mL至40 μg/mL之濃度。

【0879】在一些實施例中，除了一種或多種TNFRSF促效劑之外，細胞培養基進一步包括初始濃度約3000 IU/mL之IL-2及初始濃度約30 ng/mL之OKT-3抗體，且其中該一種或多種TNFRSF促效劑包括4-1BB促效劑。

【0880】在一些實施例中，採用IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21之組合作為在第二擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21以及其任何組合可包含在第二擴增期間，包含例如在根據圖1以及本文所描述之步驟D過程期間。在一些實施例中，採用IL-2、IL-15及IL-21之組合作為在第二擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-15及IL-21以及其任何組合可包含在根據圖1及如本文所描述之步驟D過程期間。

【0881】在一些實施例中，第二擴增可在包括IL-2、OKT-3、抗原呈現飼養細胞且視情況包括TNFRSF促效劑之補充細胞培養基中進行。在一些實施例中，第二擴增在補充細胞培養基中發生。在一些實施例中，補充細胞培養基包括IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，第二細胞培養基包括IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC；亦稱為抗原呈現飼養細胞)。在一些實施例中，第二擴增在包括IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞(亦即抗原呈現細胞)之細胞培養基中進行。

【0882】在一些實施例中，第二擴增培養基包括約500 IU/mL IL-15、約400 IU/mL IL-15、約300 IU/mL IL-15、約200 IU/mL IL-15、約180 IU/mL IL-15、約160

IU/mL IL-15、約140 IU/mL IL-15、約120 IU/mL IL-15或約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約500 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約400 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約300 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約200 IU/mL IL-15。在一些實施例中，細胞培養基包括約180 IU/mL IL-15。在一實施例中，細胞培養基進一步包括IL-15。在較佳實施例中，細胞培養基包括約180 IU/mL IL-15。

【0883】在一些實施例中，第二擴增培養基包括約20 IU/mL IL-21、約15 IU/mL IL-21、約12 IU/mL IL-21、約10 IU/mL IL-21、約5 IU/mL IL-21、約4 IU/mL IL-21、約3 IU/mL IL-21、約2 IU/mL IL-21、約1 IU/mL IL-21或約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約20 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約15 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約12 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約10 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約5 IU/mL IL-21至約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約2 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包括約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包括約0.5

IU/mL IL-21。在一實施例中，細胞培養基進一步包括IL-21。在較佳實施例中，細胞培養基包括約1 IU/mL IL-21。

【0884】在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞(APC)為PBMC。在一實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中TIL與PBMC及/或抗原呈現細胞之比率為約1比25、約1比50、約1比100、約1比125、約1比150、約1比175、約1比200、約1比225、約1比250、約1比275、約1比300、約1比325、約1比350、約1比375、約1比400或約1比500。在一實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中TIL與PBMC之比率介於1比50與1比300之間。在一實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中TIL與PBMC之比率介於1比100與1比200之間。

【0885】在一實施例中，REP及/或第二擴增係在培養瓶中進行，其中主體TIL在150 mL培養基中與100或200倍過量之去活化飼養細胞、30 mg/mL OKT3抗CD3抗體及3000 IU/mL IL-2混合。替換培養基(通常經由抽吸用新鮮培養基替換2/3培養基)，直至細胞轉移至替代生長箱室。替代生長箱室包含G-Rex培養瓶及透氣容器，如下文更充分論述。

【0886】在一些實施例中，第二擴增(其可包含稱為REP過程之過程)縮短至7至14天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，第二次擴增縮短至11天。

【0887】在一些實施例中，REP及/或第二擴增可使用如先前所述的T-175瓶及透氣袋(Tran等人，《免疫療法雜

誌》**2008,** *31,* 742-51；Dudley等人，《免疫療法雜誌》**2003,** *26,* 332-42)或透氣性培養皿(G-Rex培養瓶)進行。在一些實施例中，第二擴增(包含稱為快速擴增之擴增)在T-175培養瓶中進行，且可以將懸浮於150 mL培養基中的約1×10^{6}個TIL添加至各T-175培養瓶中。TIL可在補充有3000 IU/mL IL-2及30 ng/ml抗CD3的CM與AIM-V培養基之1比1混合物中培養。可以將T-175培養瓶在37℃下在5% CO_2中培育。可在第5天使用具有3000 IU/mL IL-2的50/50培養基更換一半培養基。在一些實施例中，在第7天，可將來自兩個T-175培養瓶之細胞組合在一個3 L袋中，並將300 mL含5%人類AB血清及3000 IU/mL IL-2之AIM-V添加至300 mL TIL懸浮液中。每天或每兩天對每個袋中之細胞數目計數，並添加新鮮培養基以使細胞計數保持在0.5與2.0×106個細胞/毫升之間。

【0888】在一些實施例中，第二擴增(其可包含稱為REP之擴增，以及在圖1之步驟D中提及之擴增)可在500 mL容量的具有100 cm透氣矽底之透氣培養瓶(G-Rex 100，可購自美國明尼蘇達州新布萊頓市的Wilson Wolf Manufacturing Corporation)中進行，5 × 10^{6}或10 × 10^{6}個TIL可與PBMC在400 mL的補充有5%人類AB血清、3000 IU/mL IL-2及30 ng/mL抗CD3(OKT3)之50/50培養基中培養。G-Rex 100培養瓶可在37℃下在5% CO_2中培育。在第5天，可將250 mL上清液移除並放入離心瓶中且以1500 rpm (491 × g)離心10分鐘。可以用150 mL的含有5%人類AB血

清、3000 IU/mL IL-2之新鮮培養基使TIL沈澱物再懸浮，且添加回原來的G-Rex 100培養瓶中。當TIL在G-Rex 100培養瓶中連續擴增時，在第7天，各G-Rex 100中之TIL可懸浮於各培養瓶中存在之300 mL培養基中，且細胞懸浮液可分成可用於接種3個G-Rex 100培養瓶之3個100 mL等分試樣。隨後可將150 mL具有5%人類AB血清及3000 IU/mL IL-2之AIM-V添加至各培養瓶中。可將G-Rex 100培養瓶在37℃下在5% CO_2中培育且在4天之後，可將具有3000 IU/mL IL-2的150 mL AIM-V添加至各G-Rex 100培養瓶中。細胞可在培養的第14天收集。

【0889】在一實施例中，第二擴增(包含稱為REP之擴增)係在培養瓶中進行，其中主體TIL在150 mL培養基中與100或200倍過量之去活化飼養細胞、30 mg/mL OKT3抗CD3抗體及3000 IU/mL IL-2混合。在一些實施例中，替換培養基直至細胞轉移至替代生長箱室。在一些實施例中，藉由抽吸用新鮮培養基更換2/3的培養基。在一些實施例中，替代生長箱室包含G-REX培養瓶及透氣容器，如下文更充分論述。

【0890】在一實施例中，進行第二擴增(包含稱為REP之擴增)，且其進一步包括其中選擇具有優異腫瘤反應性之TIL之步驟。可使用本領域中已知之任何選擇方法。舉例而言，美國專利申請公開案第2016/0010058 A1號(其揭示內容以引用之方式併入本文中)中所描述之方法可用於選擇具有優異腫瘤反應性之TIL。

【0891】視情況，可在第二擴增(包含稱為REP擴增之擴增)之後使用本領域中已知之標準測定來進行細胞存活性測定。舉例而言，可在主體TIL樣本上進行台盼藍排除測定，其選擇性標記死細胞且允許存活性評估。在一些實施例中，TIL樣本可使用Cellometer K2自動化細胞計數器(馬薩諸塞州勞倫斯市的Nexcelom Bioscience)計算及判定存活性。在一些實施例中，存活性係根據標準Cellometer K2 Image Cytometer自動化細胞計數器方案判定。

【0892】在一些實施例中，TIL之第二擴增(包含稱為REP之擴增)可使用如先前所述的T-175培養瓶及透氣袋(Tran KQ、Zhou J、Durflinger KH等人，**2008**, 《免疫療法雜誌》，31:742-751，及Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE等人 2003, 《免疫療法雜誌》26:332-342)或透氣的G-Rex培養瓶進行。在一些實施例中，使用培養瓶進行第二擴增。在一些實施例中，使用透氣的G-Rex培養瓶進行第二擴增。在一些實施例中，在T-175培養瓶中進行第二擴增，且將約1×10^6個TIL懸浮於約150 mL培養基中且將其添加至各T-175培養瓶中。將TIL與作為「飼養」細胞的經輻照(50 Gy)同種異體PBMC以1比100之比率一起培養，且在補充有3000 IU/mL IL-2及30 ng/mL抗CD3的CM與AIM-V培養基(50/50培養基)之1比1混合物中培養細胞。將T-175培養瓶在37℃下在5% CO_2中培育。在一些實施例中，在第5天使用具有3000 IU/mL IL-2的50/50培養基更換一半培養基。在一些實施例中，在第7天，將來自2個T-

175培養瓶之細胞在3 L袋中合併且將具有5%人類AB血清及3000 IU/mL IL-2之300 mL AIM-V添加至300 mL TIL懸浮液中。可每天或每兩天對各袋中之細胞數目進行計數，或可添加新鮮培養基以保持細胞計數在約0.5與約2.0×10^6個細胞/毫升之間。

【0893】在一些實施例中，在具有100 cm^2透氣矽底的500 mL容量培養瓶(G-Rex 100，Wilson Wolf)中進行第二擴增(包含稱為REP之擴增)，將約5×10^6或10×10^6個TIL與所輻照之同種異體PBMC以1比100之比率在補充有3000 IU/mL的IL-2及30 ng/mL的抗CD3的400 mL 50/50培養基中一起培養。將G-Rex 100培養瓶在37℃下在5% CO_2中培育。在一些實施例中，在第5天，取出250 mL上清液並放入離心瓶中且以1500 rpm(491g)離心10分鐘。隨後可以用150 mL含3000 IU/mL IL-2之新鮮50/50培養基使TIL沈澱物再懸浮且添加回原來的G-Rex 100培養瓶中。在TIL在G-Rex 100培養瓶中連續擴增之實施例中，在第7天，使各G-Rex 100中之TIL懸浮於各培養瓶中存在之300 mL培養基中，且將細胞懸浮液分成三個用於接種3個G-Rex 100培養瓶的100 mL等分試樣。隨後將150 mL具有5%人類AB血清及3000 IU/mL IL-2之AIM-V添加至各培養瓶中。將G-Rex 100培養瓶在37℃下於5% CO_2中培育且在4天之後，將150 mL含3000 IU/mL IL-2之AIM-V添加至各G-Rex 100培養瓶中。在培養的第14天收集細胞。

【0894】T及B淋巴球之多樣抗原受體係藉由有限但

大量的基因區段之體細胞重組產生。此等基因區段：V(可變區)、D(多樣區)、J(聯結區)及C(恆定區)決定免疫球蛋白及T細胞受體(TCR)之結合特異性及下游應用。本發明提供一種用於產生展現且增加T細胞組庫多樣性之TIL的方法。在一些實施例中，藉由本發明方法獲得之TIL展現T細胞組庫多樣性的增加。在一些實施例中，在第二擴增中獲得之TIL展現T細胞組庫多樣性的增加。在一些實施例中，多樣性增加係免疫球蛋白多樣性及/或T細胞受體多樣性增加。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白重鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白輕鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於T細胞受體中。在一些實施例中，多樣性存在於選自由α、β、γ及δ受體組成之群組的T細胞受體中之一者中。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α及/或β之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)β之表現增加。在一些實施例中，TCRab(亦即，TCRα/β)之表現增加。

【0895】在一些實施例中，第二擴增培養基(例如有時稱為CM2或第二細胞培養基)包括IL-2、OKT-3以及如下文更詳細論述之抗原呈現飼養細胞(APC)。

【0896】在一些實施例中，第二擴增，例如根據圖1之步驟D，在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用單一生物反應器。在一些實施例中，所採

用的單一生物反應器為例如G-Rex 10或G-Rex 100。在一些實施例中，密閉系統生物反應器為單一生物反應器。

1. 飼養細胞及抗原呈現細胞

【0897】在一實施例中，本文所描述之第二擴增程序(例如包含諸如圖1之步驟D中所述之擴增，以及稱為REP之擴增)在REP TIL擴增期間及/或在第二擴增期間需要過量飼養細胞。在許多實施例中，飼養細胞係獲自健康血液供體之標準全血單位的末梢血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。

【0898】一般而言，同種異體PBMC係經由輻照抑或熱處理去活化，且如實例中所描述用於REP程序，其提供用於評估經輻照同種異體PBMC之複製非勝任之例示性方案。

【0899】在一些實施例中，若第14天活細胞總數小於在REP第0天及/或第二擴增第0天(亦即第二擴增之起始日)放入培養的初始活細胞數目，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。

【0900】在一些實施例中，若第7天及第14天在OKT3及IL-2存在下培養的活細胞總數與在REP第0天及/或第二擴增第0天(亦即第二擴增之起始日)放入培養的初始活細胞數目相比並未增加，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。在一些實施例中，PBMC在30 ng/mL OKT3抗體及3000 IU/mL IL-2存在下

培養。

【0901】在一些實施例中，若第7天及第14天在OKT3及IL-2存在下培養的活細胞總數與在REP第0天及/或第二擴增第0天(亦即第二擴增之起始日)放入培養的初始活細胞數目相比並未增加，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。在一些實施例中，PBMC在5至60 ng/mL OKT3抗體及1000至6000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在10至50 ng/mL OKT3抗體及2000至5000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在20至40 ng/mL OKT3抗體及2000至4000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在25至35 ng/mL OKT3抗體及2500至3500 IU/mL IL-2存在下培養。

【0902】在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為PBMC。在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為人工抗原呈現飼養細胞。在一實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率為約1比25、約1比50、約1比100、約1比125、約1比150、約1比175、約1比200、約1比225、約1比250、約1比275、約1比300、約1比325、約1比350、約1比375、約1比400或約1比500。在一實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比50與1比300之間。在一實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比100與1比200之間。

【0903】在一實施例中，本文所描述之第二次擴增程

序需要約2.5×10^9個飼養細胞與約100×10^6個TIL的比率。在另一實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約2.5×10^9個飼養細胞與約50×10^6個TIL之比率。在另一實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約2.5×10^9個飼養細胞至約25×10^6個TIL。

【0904】在一實施例中，本文所描述之第二擴增程序在第二擴增期間需要過量飼養細胞。在許多實施例中，飼養細胞係獲自健康血液供體之標準全血單位的末梢血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。在一實施例中，使用人工抗原呈現細胞(aAPC)代替PBMC。

【0905】一般而言，同種異體PBMC係經由輻照或熱處理去活化，且用於本文所描述之TIL擴增程序，包含圖式及實例中所描述之例示性程序。

【0906】在一實施例中，aAPC在第二次擴增中用作PBMC之替代物或與PBMC組合使用。

【0907】在一實施例中，Gen 2過程之第二次擴增中所用之抗原呈現細胞為單核球細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為B細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為B細胞類淋巴母細胞或B類淋巴母細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為伯基特氏淋巴瘤細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為骨髓譜系細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為單核球。在一實施例中，抗原呈現細胞為HLA-A-02陽性單核球。在一實施例中，抗原呈現細胞為急性單核球性白

血病細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為M5亞型急性單核球性白血病細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為Raji細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，抗原呈現細胞為Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，抗原呈現細胞為Ramos細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，抗原呈現細胞為U937細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，抗原呈現細胞為Daudi細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，抗原呈現細胞為黑色素細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為HLA-A-02陽性黑色素細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為黑色素瘤細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為HLA-A-02陽性黑色素瘤細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞係選自由以下組成之群組：Sk-MEL-5、Malme-3M、SK-MEL-28、SK-MEL-3、SH-4、SK-MEL-24、RPMI-7951、SK-MEL-1、A375、G-361及其組合，或其衍生物、變體、修飾或後代。在任何前述實施例中，抗原呈現細胞可如本文中別處所描述經輻照或未經輻照。

【0908】在一實施例中，aAPC用於Gen 2過程之第二次擴增。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之單核球細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之B細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之B細胞類淋巴母細胞或B類淋巴母細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之伯基特氏淋巴瘤細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之

骨髓譜系細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之單核球。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之HLA-A-02陽性單核球細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之急性單核球性白血病細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之M5亞型急性單核球性白血病細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之Raji細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之Ramos細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之U937細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之Daudi細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之黑色素細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之HLA-A-02陽性黑色素細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之黑色素瘤細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之HLA-A-02陽性黑色素瘤細胞。在一實施例中，aAPC係選自由以下組成之群組的經基因修飾之抗原呈現細胞：Sk-MEL-5、Malme-3M、SK-MEL-28、SK-MEL-3、SH-4、SK-MEL-24、RPMI-7951、SK-MEL-1、A375、G-361及其組合，或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，經基因修飾之細胞經修飾以表現CD86、OX40L、4-1BBL、OX-40促效抗體、4-1BB促效抗體、能夠結合OKT-3之Fc鏈之抗體及/或ICOS-L，如美國專利第10,415,015號中所描述，其揭

示內容以引用之方式併入本文中。在任何前述實施例中，經基因修飾之aAPC可如本文中別處所描述經輻照或未經輻照。

2. 細胞介素

【0909】本文所描述之擴增方法通常使用具有高劑量細胞介素(特別是IL-2)之培養基，如本領域中所已知。

【0910】或者，使用細胞介素組合用於TIL之快速擴增及/或第二次擴增亦是可能的，其中IL-2、IL-15及IL-21中之兩者或更兩者之組合描述於美國專利申請公開案第US 2017/0107490 A1號及國際專利申請公開案第WO 2015/189357號中，該等專利中之每一者係以全文引用之方式明確併入本文中。因此，可能的組合包含IL-2及IL-15、IL-2及IL-21、IL-15及IL-21以及IL-2、IL-15及IL-21，其中後者在許多實施例中具有特定用途。使用細胞介素之組合特別有利於產生淋巴球，特別是如其中所描述的T細胞。

E. 步驟E：收集TIL

【0911】在第二次擴增步驟之後，可收集細胞。在一些實施例中，在例如如圖1中所提供之一個、兩個、三個、四個或更多個擴增步驟之後收集TIL。在一些實施例中，在例如如圖1中所提供的兩個擴增步驟之後收集TIL。

【0912】TIL可以任何適當且無菌之方式收集，包含

例如離心。收集TIL之方法為本領域中熟知的且任何此類已知方法均可與本發明過程一起使用。在一些實施例中，使用自動化系統收集TIL。

【0913】細胞收集器及/或細胞處理系統可購自各種來源，包含例如費森尤斯卡比(Fresenius Kabi)、Tomtec Life Science、珀金埃爾默(Perkin Elmer)及Inotech Biosystems International, Inc.。本發明方法可採用任何基於細胞之收集器。在一些實施例中，細胞收集器及/或細胞處理系統為基於膜之細胞收集器。在一些實施例中，細胞收集係經由細胞處理系統，諸如LOVO系統(由費森尤斯卡比製造)進行。術語「LOVO細胞處理系統」亦係指由任何供應商製造之任何可在無菌及/或密閉系統環境中將包括細胞之溶液泵送通過膜或過濾器(諸如旋轉膜或旋轉過濾器)的儀器或裝置，從而允許連續流動及細胞處理以移除上清液或細胞培養基而不發生團塊化。在一些實施例中，細胞收集器及/或細胞處理系統可在密閉無菌系統中進行細胞分離、洗滌、流體交換、濃縮及/或其他細胞處理步驟。

【0914】在一些實施例中，收集，例如根據圖1之步驟E，係在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用單一生物反應器。在一些實施例中，所採用的單一生物反應器為例如G-Rex 10或G-Rex 100。在一些實施例中，密閉系統生物反應器為單一生物反應器。

【0915】在一些實施例中，根據圖1之步驟E係根據實例14中描述之過程進行。在一些實施例中，密閉系統係在無菌條件下經由注射器進入以維持系統之無菌性及密閉性質。在一些實施例中，採用如實例14中所描述之密閉系統。

【0916】在一些實施例中，根據實例14中所描述之方法收集TIL。在一些實施例中，使用如本文所描述之方法(在實例14中稱作第11天TIL收集)收集第1天與第11天之間的TIL。在一些實施例中，使用如本文所描述之方法(在實例14中稱作第22天TIL收集)收集第12天與第22天之間的TIL。

F. 步驟F：經擴增TIL之測定

【0917】在一些實施例中，使用本文所描述之測定方法中之一者檢查來自上文提供之步驟的經擴增TIL的效力及/或功能性。

【0918】在一實施例中，本發明包含一種確定如本文所描述之Gen 2 TIL產物之效力的方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與Gen 2 TIL產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在Gen 2 TIL產物上的表現或(2)自Gen 2 TIL產物細胞分泌的

一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值，從而確定Gen 2 TIL產物的效力。

【0919】或者，在一些實施例中，使用組合測定分析經擴增TIL，該組合測定包括基於CD3或CD3/CD28珠粒的刺激以及對至少兩種分析物的ELISA或自動ELISA(例如，ELLA)偵測，該至少兩種分析物選自由IFN-γ、顆粒酶B、穿孔素及TNF-α組成之群組。在一實施例中，此類組合測定的規格為：對於至少兩種所選擇的分析物係至少500 pg/mL；對於至少兩種所選擇的分析物係至少600 pg/mL；對於至少兩種所選擇的分析物係至少700 pg/mL；對於至少兩種所選擇的分析物係至少800 pg/mL；對於至少兩種所選擇的分析物係至少900 pg/mL；對於至少兩種所選擇的分析物係至少1000 pg/mL；對於至少兩種所選擇的分析物係至少1100 pg/mL；或對於至少兩種所選擇的分析物係至少1200 pg/mL；其中每毫升測試物含有1×10^5個TIL、2×10^5個TIL、3×10^5個TIL、4 $\times10^5$個TIL、5×10^5個TIL、6×10^5個TIL、7×10^5個TIL、8×10^5個TIL、9×10^5個TIL或10×10^5個TIL。

G. 步驟G：最終調配及轉移至輸注容器

【0920】在如圖1中以例示性次序提供且如上文及本文中所概述之步驟F完成之後，將細胞轉移至容器以用於向患者投予。在一些實施例中，一旦使用上文所描述之擴增方法獲得治療充足數目之TIL，則將其轉移至可包含輸

注袋或無菌小瓶之容器中以用於以醫藥組合物(包含本文所描述之醫藥組合物)的形式向患者投予。可在轉移至此容器之後評估TIL的效力，其可緊接在轉移之後或在容器已儲存一段時間之後進行，諸如用於穩定性測試。

【0921】在一實施例中，醫藥組合物為TIL於無菌緩衝液中之懸浮液。使用本揭示案之PBMC擴增的TIL可藉由本領域中已知的任何適合途徑投予。在一些實施例中，T細胞係以單一動脈內或靜脈內輸注之形式投與，其較佳持續大約30至60分鐘。其他適合之投予途徑包含腹膜內、鞘內及淋巴管內投予。

V. Gen 3 TIL製造過程

【0922】在不受任何特定理論限制的情況下，咸信如本發明方法中所描述之起動T細胞活化的初始第一擴增及隨後的加強T細胞活化的快速第二擴增，允許製備保留「較年輕」表型之經擴增T細胞，且因此預期本發明之經擴增T細胞相較於藉由其他方法擴增之T細胞可對癌細胞展現較高細胞毒性。特定言之，咸信如本發明方法所教示之藉由暴露於抗CD3抗體(例如OKT-3)、IL-2及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)來起動T細胞之活化且接著藉由後續暴露於另外的抗CD-3抗體(例如OKT-3)、IL-2及APC來加強，其限制或避免培養基中之T細胞的成熟，從而產生具有較不成熟表型之T細胞群體，該等T細胞因培養擴增而耗竭較少且對癌細胞展現較高細胞毒性。例示性過程顯示於

圖8中。在一些實施例中，快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下達成培養規模縱向擴大(scaling up)：(a)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中的小規模培養中培養T細胞約3天至4天之時段來進行快速第二擴增；且接著(b)實現將小規模培養中的T細胞轉移至比第一容器大的第二容器(例如G-Rex 500MCS容器)且在第二容器中的較大規模培養中培養來自小規模培養的T細胞約4天至7天之時段。在一些實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大(scaling out)：(a)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中的第一小規模培養中培養T細胞約3天至4天之時段來進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自第一小規模培養的T細胞轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小與第一容器相等的第二容器之中，其中在各第二容器中，經轉移至此類第二容器的來自第一小規模培養的T細胞部分係在第二小規模培養中培養約4天至7天之時段。在一些實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中的小規模培養中培養T細胞約3天至4天之時段來進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養中的T細胞轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大的第二容器(例如G-REX 500MCS容器)之中，其中在各

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

【0923】在一些實施例中，快速第二擴增係在藉由初始第一擴增所實現之T細胞活化開始降低、趨緩、衰退或消退之後進行。

【0924】在一些情況下，快速第二擴增係在藉由初始第一擴增實現之T細胞活化已降低剛好或大約(at or about)1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、

98、99或100%之後進行。

【0925】在一些實施例中，快速第二擴增係在藉由初始第一擴增所實現之T細胞活化已降低剛好或大約1%至100%之範圍中的百分比之後進行。

【0926】在一些實施例中，快速第二擴增係在藉由初始第一擴增實現之T細胞活化已降低剛好或大約1%至10%、10%至20%、20%至30%、30%至40%、40%至50%、50%至60%、60%至70%、70%至80%、80%至90%或90%至100%之範圍中之百分比之後進行。

【0927】在一些實施例中，快速第二擴增係在藉由初始第一擴增實現之T細胞活化已降低在至少或約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%之後進行。

【0928】在一些情況下，快速第二擴增係在藉由初始第一擴增實現之T細胞活化已降低剛好或大約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、

42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%之後進行。

【0929】在一些實施例中，藉由初始第一擴增實現之T細胞活化之降低係藉由T細胞回應於抗原刺激而釋放之干擾素γ之量的減少來判定。

【0930】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係於至多剛好或大約7天或大約8天之時段內進行。

【0931】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係於至多剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天之時段內進行。

【0932】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係在1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天之時段內進行。

【0933】在一些實施例中，T細胞之快速第二擴增係於至多剛好或大約11天之時段內進行。

【0934】在一些實施例中，T細胞之快速第二擴增係於至多剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天之時段內進行。

【0935】在一些實施例中，T細胞之快速第二擴增係在1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10

天或11天之時段內進行。

【0936】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係於在剛好或大約1天至剛好或大約7天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係在剛好或大約1天至剛好或大約11天之時段內進行。

【0937】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係於至多剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係於至多剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天之時段內進行。

【0938】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係於在剛好或大約1天至剛好或大約8天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係在剛好或大約1天至剛好或大約9天之時段內進行。

【0939】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係在8天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係在9天之時段內進行。

【0940】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係於在剛好或大約1天至處於或約7天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係在處於或約1天至處於或約9天之時段內進行。

【0941】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係在7天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係在9天之時段內進行。

【0942】在一些實施例中，T細胞為腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)。

【0943】在一些實施例中，T細胞為骨髓浸潤性淋巴球(MIL)。

【0944】在一些實施例中，T細胞為末梢血液淋巴球(PBL)。

【0945】在一些實施例中，T細胞獲自罹患癌症之供體。

【0946】在一些實施例中，T細胞為獲自罹患癌症之患者所切除之腫瘤的TIL。

【0947】在一些實施例中，T細胞為獲自罹患黑色素瘤之患者所切除之腫瘤的TIL。

【0948】在一些實施例中，T細胞為獲自罹患血液惡性病之患者之骨髓的MIL。

【0949】在一些實施例中，T細胞為獲自供體之末梢血液單核細胞(PBMC)的PBL。在一些實施例中，供體罹患癌症。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮內膜癌、甲狀腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引

起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。在一些實施例中，供體罹患腫瘤。在一些實施例中，腫瘤為液體腫瘤。在一些實施例中，腫瘤為實體腫瘤。在一些實施例中，供體罹患血液惡性病。

【0950】在本發明之某些態樣中，免疫效應細胞(例如T細胞)可使用本領域技術人員已知之任何數目之技術(諸如FICOLL分離)自收集自個體之血液單元獲得。在一個較佳態樣中，藉由血球分離術獲得來自個體之循環血液的細胞。血球分離術產物通常含有淋巴球，包含T細胞、單核球、顆粒球、B細胞、其他成核白血球、紅血球及血小板。在一個態樣中，藉由血球分離術收集之細胞可經洗滌以移除血漿級份且視情況將細胞置於適當緩衝液或培養基中以用於後續處理步驟。在一個實施例中，細胞係用磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)洗滌。在一替代實施例中，洗滌溶液缺乏鈣，且可能缺乏鎂或可能缺乏許多(若並非全部)二價陽離子。在一個態樣中，藉由溶解紅血球及例如藉由經由PERCOLL梯度離心或藉由逆流離心淘析耗盡單核球，自末梢血液淋巴球分離T細胞。

【0951】在一些實施例中，T細胞為自供體之全血或富含淋巴球之血球分離術產物分離的PBL。在一些實施例中，供體罹患癌症。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮內膜癌、甲狀腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、

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

【0952】含有一些此等特徵的稱為過程3(在本文中亦稱為Gen 3)之例示性TIL過程描繪於圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)中，且本發明之此實施例相對於過程2A的一些優勢描述於圖1、圖2、圖8、圖30及圖31(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中。過程3(Gen 3)之實施例顯示於圖8及圖30(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C

及/或圖8D)中。過程2A或Gen 2描述於美國專利公開案第2018/0280436號中，其以全文引用之方式併入本文中。Gen 3過程亦描述於國際專利公開案WO 2020/096988中。

【0953】如本文中所論述及大體上概述，TIL係取自患者樣本，並且使用本文所描述且稱為Gen 3之TIL擴增過程操作以在移植至患者中之前擴增其數目。在一些實施例中，TIL可視情況如下文所論述經基因操作。在一些實施例中，TIL可在擴增之前或之後冷凍保存。解凍後，其亦可經再刺激以在輸注至患者中之前增加其代謝。

【0954】在一些實施例中，初始第一擴增(包含本文中稱為預快速擴增(預REP)的過程，以及圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中示為步驟B之過程)縮短為1至8天，且快速第二擴增(包含在本文中稱為快速擴增方案(REP)的過程以及圖1(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中示為步驟D的過程)縮短為1至9天，如以下及實例及圖式中所詳細論述。在一些實施例中，初始第一擴增(包含本文中稱為預快速擴增(預REP)的過程，以及圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中示為步驟B之過程)縮短為1至8天，且快速第二擴增(包含在本文中稱為快速擴增方案(REP)的過程以及圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中示為步驟D的過程)縮短為1至8天，如以下及實例及圖式中所詳細論述。在一些實施例中，初始第一擴增(包含本文中稱為預快速擴增(預REP)的過程，以及圖8(特別是例如圖8A

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

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

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

【0955】以下的「步驟」標識A、B、C等參考圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中之非限制性實例且參考本文所描述之某些非限制性實施例。以下及圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D {2)中的步驟次序為例示性的，且本申請案及本文中所揭示之方法涵蓋步驟之任何組合或次序，以及另外的步驟、步驟重複及/或步驟省略。

A. 步驟A：獲得患者腫瘤樣本

【0956】一般而言，TIL最初係獲自患者腫瘤樣本(「初代TIL」)或獲自循環淋巴球，諸如末梢血液淋巴球，包含具有TIL樣特徵之末梢血液淋巴球，且接著將其擴增成較大群體以進行如本文中所描述之進一步操作，視情況經冷凍保存且視情況評估表型及作為TIL健康指標之代謝參數。

【0957】患者腫瘤樣本可使用本領域中已知之方法獲得，通常經由手術切除、穿刺生檢或其他用於獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物之樣本的手段獲得。一般而言，腫瘤樣本可來自任何實體腫瘤，包含原發性腫瘤、侵襲性腫瘤或轉移性腫瘤。腫瘤樣本亦可為液體腫瘤，諸如獲自血液惡性病之腫瘤。實體腫瘤可為任何癌症類型，包含但不限於皮膚癌(包含但不限於鱗狀細胞癌、基底細胞癌及黑色素瘤)。在一些實施例中，癌症為黑色素瘤。在一些實施例中，適用的TIL係獲自惡性黑色素瘤腫瘤，因為報告指出此等腫瘤具有特別高含量之TIL。

【0958】一旦獲得，腫瘤樣本通常使用銳器分割碎斷成1 mm^3至約8 mm^3之間的塊，其中約2 mm^3至3 mm^3為尤其適用的。TIL係自此等碎片使用酶素性腫瘤碎解物培養。此類腫瘤碎解物可藉由在酶素性培養基(例如羅斯威爾公園癌症研究所(Roswell Park Memorial Institute；RPMI)1640緩衝液、2 mM麩胺酸、10 mcg/mL建它黴素、30單位/毫升的DNA酶及1.0 mg/mL膠原蛋白酶)中培育，接著(例如使用組織解離器)進行機械解離來產生。腫瘤碎解

物可藉由以下產生：將腫瘤置放於酶素性培養基中且機械解離腫瘤大約1分鐘，隨後在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘，隨後在前述條件下重複機械解離及培育循環，直至僅存在小組織片。在此過程結束時，若細胞懸浮液含有大量紅血球或死細胞，則可進行使用FICOLL分支鏈親水性多醣之密度梯度分離以移除此等細胞。可使用本領域中已知之替代方法，諸如美國專利申請公開案第2012/0244133A1號中所描述之方法，該公開案之揭示內容以引用之方式併入本文中。任何前述方法可用於本文所描述之任何實施例中擴增TIL之方法或治療癌症之方法。

【0959】腫瘤解離酶混合物可包含一或多種解離(消化)酶，諸如但不限於膠原蛋白酶(包含任何摻合或類型之膠原蛋白酶)、Accutase™、Accumax™、玻尿酸酶(hyaluronidase)、中性蛋白酶(分散酶)、胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)、木瓜凝乳蛋白酶(chymopapain)、胰蛋白酶(trypsin)、酪蛋白酶(caseinase)、彈性蛋白酶(elastase)、木瓜酶(papain)、XIV型蛋白酶(鏈蛋白酶(pronase))、去氧核糖核酸酶I(DNA酶)、胰蛋白酶抑制劑、任何其他解離或蛋白分解酶，及其任何組合。

【0960】在一些實施例中，解離酶係自凍乾酶重構。在一些實施例中，凍乾酶係在一定量之無菌緩衝液(諸如HBSS)中重構。

【0961】在一些情況下，膠原蛋白酶(諸如無動物源1型膠原蛋白酶)係在10 mL無菌HBSS或另一緩衝液中重

構。凍乾儲備酶之濃度可為每小瓶2892 PZ U。在一些實施例中，膠原蛋白酶係在5 mL至15 mL緩衝液中重構。在一些實施例中，在重構後，膠原蛋白酶儲備液的範圍為約100 PZ U/mL至約400 PZ U/mL，例如，約100 PZ U/mL至約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL至約350 PZ U/mL、約100 PZ U/mL至約300 PZ U/mL、約150 PZ U/mL至約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL、約150 PZ U/mL、約200 PZ U/mL、約210 PZ U/mL、約220 PZ U/mL、約230 PZ U/mL、約240 PZ U/mL、約250 PZ U/mL、約260 PZ U/mL、約270 PZ U/mL、約280 PZ U/mL、約289.2 PZ U/mL、約300 PZ U/mL、約350 PZ U/mL或約400 PZ U/mL。

【0962】在一些實施例中，中性蛋白酶係在1 mL無菌HBSS或另一緩衝液中重構。凍乾儲備酶之濃度可為每小瓶175 DMC U。凍乾儲備酶之濃度可為175 DMC/mL。在一些實施例中，在重構後，中性蛋白酶儲備液之範圍為約100 DMC/mL至約400 DMC/mL，例如約100 DMC/mL至約400 DMC/mL、約100 DMC/mL至約350 DMC/mL、約100 DMC/mL至約300 DMC/mL、約150 DMC/mL至約400 DMC/mL、約100 DMC/mL、約110 DMC/mL、約120 DMC/mL、約130 DMC/mL、約140 DMC/mL、約150 DMC/mL、約160 DMC/mL、約170 DMC/mL、約175 DMC/mL、約180 DMC/mL、約190 DMC/mL、約200 DMC/mL、約250 DMC/mL、約300 DMC/mL、約

350 DMC/mL或約400 DMC/mL。

【0963】在一些實施例中，DNA酶I係在1 mL無菌HBSS或另一緩衝液中重構。凍乾儲備酶之濃度為每小瓶4 KU。在一些實施例中，在重構後，DNA酶I儲備液的範圍為約1 KU/mL至10 KU/mL，例如約1 KU/mL、約2 KU/mL、約3 KU/mL、約4 KU/mL、約5 KU/mL、約6 KU/mL、約7 KU/mL、約8 KU/mL、約9 KU/mL或約10 KU/mL。

【0964】在一些實施例中，酶儲備溶液會發生變化，因此請驗證凍乾儲備溶液之濃度，並相應地修改添加至碎解混合物中的酶之最終量。

【0965】在一些實施例中，酶混合物包含約4.7 mL無菌HBSS中的約10.2 μl中性蛋白酶(0.36 DMC U/mL)、21.3 μl膠原蛋白酶(1.2 PZ/mL)及250 μl DNA酶I(200 U/mL)。

【0966】如上文所指出，在一些實施例中，TIL係衍生自實體腫瘤。在一些實施例中，實體腫瘤未經碎斷。在一些實施例中，實體腫瘤未經碎斷且以全腫瘤進行酶素性碎解。在一些實施例中，腫瘤係在包括膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中碎解。在一些實施例中，腫瘤係在包括膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中碎解1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2下在包括膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中碎解1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2、旋轉下在包括膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中

碎解1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在恆定旋轉下碎解隔夜。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2、恆定旋轉下碎解隔夜。在一些實施例中，整個腫瘤與酶組合以形成腫瘤碎解反應混合物。

【0967】在一些實施例中，在無菌緩衝液中用凍乾酶重構腫瘤。在一些實施例中，緩衝液為無菌HBSS。

【0968】在一些實施例中，酶混合物包括膠原蛋白酶。在一些實施例中，膠原蛋白酶為膠原蛋白酶IV。在一些實施例中，膠原蛋白酶之工作儲備液為100 mg/mL 10×工作儲備液。

【0969】在一些實施例中，酶混合物包括DNA酶。在一些實施例中，DNA酶之工作儲備液為10,000IU/mL 10×工作儲備液。

【0970】在一些實施例中，酶混合物包括玻尿酸酶。在一些實施例中，玻尿酸酶之工作儲備液為10 mg/mL 10×工作儲備液。

【0971】在一些實施例中，酶混合物包括10 mg/mL膠原蛋白酶、1000 IU/mL DNA酶及1 mg/mL玻尿酸酶。

【0972】在一些實施例中，酶混合物包括10 mg/mL膠原蛋白酶、500 IU/mL DNA酶及1 mg/mL玻尿酸酶。

【0973】一般而言，獲自腫瘤之細胞懸浮液稱為「初代細胞群體」或「新鮮獲得的」或「新鮮分離的」細胞群體。在某些實施例中，新鮮獲得之TIL細胞群體暴露於包括抗原呈現細胞、IL-12及OKT-3之細胞培養基。

【0974】在一些實施例中，碎斷包含物理碎斷，包含例如分割以及碎解。在一些實施例中，碎斷為物理碎斷。在一些實施例中，碎斷為分割。在一些實施例中，藉由碎解進行碎斷。在一些實施例中，TIL最初可自獲自患者之酶素性腫瘤碎解物及腫瘤碎片培養。在一實施例中，TIL最初可自獲自患者之酶素性腫瘤碎解物及腫瘤碎片培養。

【0975】在一些實施例中，當腫瘤為實體腫瘤時，在例如步驟A(如圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)中所提供)中獲得腫瘤樣本之後，腫瘤進行物理碎段。在一些實施例中，碎斷發生在冷凍保存之前。在一些實施例中，碎斷發生在冷凍保存之後。在一些實施例中，碎斷在獲得腫瘤之後並且在不進行任何冷凍保存的情況下發生。在一些實施例中，碎斷步驟係活體外或離體過程。在一些實施例中，將腫瘤碎斷且將10、20、30、40或更多個碎片或塊置於各容器中進行初始第一擴增。在一些實施例中，將腫瘤碎斷且將30或40個碎片或塊置於各容器中進行初始第一擴增。在一些實施例中，將腫瘤碎斷且將40個碎片或塊置於各容器中進行初始第一擴增。在一些實施例中，多個碎片包括約4個至約50個碎片，其中各碎片之體積為約27 mm^3。在一些實施例中，多個碎片包括約30個至約60個碎片，其總體積為約1300 mm^3至約1500 mm^3。在一些實施例中，多個碎片包括約50個碎片，其總體積為約1350 mm^3。在一些實施例中，多個碎片包括約50個碎片，其總質量為約1公克至約1.5公克。在一些實施例中，多個碎片包括約4個碎

片。

【0976】在一些實施例中，TIL係獲自腫瘤碎片。在一些實施例中，腫瘤碎片係藉由銳器分割獲得。在一些實施例中，腫瘤碎片在約1 mm^3與10 mm^3之間。在一些實施例中，腫瘤碎片在約1 mm^3與8 mm^3之間。在一些實施例中，腫瘤碎片為約1 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約2 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約3 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約4 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約5 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約6 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約7 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約8 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約9 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約10 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為1至4 mm×1至4 mm×1至4 mm。在一些實施例中，腫瘤碎片為1 mm×1 mm×1 mm。在一些實施例中，腫瘤碎片為2 mm×2 mm×2 mm。在一些實施例中，腫瘤碎片為3 mm×3 mm×3 mm。在一些實施例中，腫瘤碎片為4 mm×4 mm×4 mm。

【0977】在一些實施例中，腫瘤經碎斷以使各塊上出血性、壞死及/或脂肪組織之量減至最小。在一些實施例中，腫瘤經碎斷以使各塊上出血性組織之量減至最小。在一些實施例中，腫瘤經碎斷以使各塊上壞死組織之量減至最小。在一些實施例中，腫瘤經碎斷以使各塊上脂肪組織之量減至最小。在某些實施例中，腫瘤碎斷步驟係活體外或離體方法。

【0978】在一些實施例中，進行腫瘤碎斷以便維持腫瘤內部結構。在一些實施例中，在不使用解剖刀進行鋸切動作的情況下進行腫瘤碎斷。在一些實施例中，TIL係獲自腫瘤碎解物。在一些實施例中，藉由在酶培養基(例如但不限於RPMI 1640、2 mM GlutaMAX、10 mg/mL建它黴素、30 U/mL DNA酶及1.0 mg/mL膠原蛋白酶)中培育，隨後進行機械解離(加利福尼亞州奧本美天旎生物技術的GentleMACS)來產生腫瘤碎解物。在將腫瘤置於酶培養基中之後，可以機械方式將腫瘤解離大約1分鐘。隨後可將溶液在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘，且接著再次機械破壞大約1分鐘。在37℃下在5% CO_2中再培育30分鐘之後，可將腫瘤第三次機械破壞大約1分鐘。在一些實施例中，在第三次機械破壞後若大片組織仍存在，則施加1或2次另外機械解離至樣本，不論是否再在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘。在一些實施例中，在最終培育結束時，若細胞懸浮液含有大量紅血球或死細胞，則可進行使用Ficoll之密度梯度分離以移除此等細胞。

【0979】在一些實施例中，將初始第一擴增步驟之前的細胞懸浮液稱為「初代細胞群體」或「新鮮獲得的」或「新鮮分離的」細胞群體。

【0980】在一些實施例中，細胞可視情況在樣本分離之後(例如在獲得腫瘤樣本後及/或在自腫瘤樣本獲得細胞懸浮液後)冷凍，且在進入步驟B中所描述之擴增之前冷凍儲存，該步驟B進一步詳細描述於下文且例示於圖8(特別

是例如圖8B)中。

1. 粗針/小型生檢衍生之TIL

【0981】在一些實施例中，TIL最初係獲自藉由核心生檢或類似程序獲得之患者腫瘤樣本(「初代TIL」)且隨後擴增成較大群體以進行如本文所描述之進一步操作，視情況經冷凍保存且視情況評估表型及代謝參數。

【0982】在一些實施例中，患者腫瘤樣本可使用本領域中已知之方法獲得，通常經由小型生檢、核心生檢、穿刺生檢或其他用於獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物之樣本的手段獲得。一般而言，腫瘤樣本可來自任何實體腫瘤，包含原發性腫瘤、侵襲性腫瘤或轉移性腫瘤。腫瘤樣本亦可為液體腫瘤，諸如獲自血液惡性病之腫瘤。在一些實施例中，樣本可來自多個小腫瘤樣本或生檢體。在一些實施例中，樣本可包括來自同一患者之單一腫瘤的多個腫瘤樣本。在一些實施例中，樣本可包括來自同一患者之一個、兩個、三個或四個腫瘤的多個腫瘤樣本。在一些實施例中，樣本可包括來自同一患者之多個腫瘤的多個腫瘤樣本。實體腫瘤係黑色素瘤。

【0983】一般而言，獲自腫瘤核心或碎片之細胞懸浮液稱為「初代細胞群體」或「新鮮獲得的」或「新鮮分離的」細胞群體。在某些實施例中，新鮮獲得之TIL細胞群體暴露於包括抗原呈現細胞、IL-2及OKT-3之細胞培養基。

【0984】在一些實施例中，若腫瘤為轉移性腫瘤且在過去已有效治療/移除原發性病灶，則可能需要移除一個轉移性病灶。在一些實施例中，若可用，微創方法係移除皮膚病灶或頸部或腋窩區域上的淋巴結。在一些實施例中，移除皮膚病灶或移除其小型生檢。在一些實施例中，移除淋巴結或其小型生檢。在一些實施例中，腫瘤為黑色素瘤。在一些實施例中，黑色素瘤之小型生檢體包括黑痣或其一部分。

【0985】在一些實施例中，小型生檢體為穿孔生檢體。在一些實施例中，穿孔生檢體係以圓形刀片壓入皮膚中獲得。在一些實施例中，穿孔生檢體係以圓形刀片壓入可疑黑痣周圍的皮膚中獲得。在一些實施例中，穿孔生檢體係以圓形刀片壓入皮膚中獲得，並且移除一塊圓形皮膚。在一些實施例中，小型生檢為穿孔生檢且移除圓形部分的腫瘤。

【0986】在一些實施例中，小型生檢為切除式生檢。在一些實施例中，小型生檢為切除式生檢且移除整個黑痣或生長物。在一些實施例中，小型生檢為切除式生檢且連同小邊緣之正常外觀皮膚移除整個黑痣或生長物。

【0987】在一些實施例中，小型生檢為切開式生檢。在一些實施例中，小型生檢為切開式生檢且僅採集最不規則部分之黑痣或生長物。在一些實施例中，小型生檢為切開式生檢，且該切開式生檢係在其他技術無法完成時使用，諸如當可疑黑痣非常大時使用。

【0988】術語「實體腫瘤」係指通常不含囊腫或液體區域的異常組織團塊。實體腫瘤可為良性或惡性的。術語「實體腫瘤癌症」係指惡性、贅生性或癌性實體腫瘤。在一些實施例中，癌症為黑色素瘤。實體腫瘤之組織結構包含相互相依組織隔室，包含實質(癌細胞)及有癌細胞分散其中且可提供支援性微環境之支援性基質細胞。

【0989】在一些實施例中，來自腫瘤之樣本係以細針抽吸物(FNA)、核心生檢、小型生檢(包含例如穿孔生檢)形式獲得。在一些實施例中，首先將樣本置於G-Rex 10中。在一些實施例中，當有1個或2個核心生檢及/或小型生檢樣本時，首先將樣本置於G-Rex 10中。在一些實施例中，當有3個、4個、5個、6個、8個、9個或10個或更多個核心生檢及/或小型生檢樣本時，首先將樣本置於G-Rex 100中。在一些實施例中，當有3個、4個、5個、6個、8個、9個或10個或更多個核心生檢及/或小型生檢樣本時，首先將樣本置於G-Rex 500中。

【0990】FNA可獲自皮膚腫瘤，包含例如黑色素瘤。在一些情況下，黑色素瘤患者先前已經受手術治療。

【0991】本文所描述之TIL可獲自FNA樣本。在一些情況下，FNA樣本係使用在18號針頭至25號針頭範圍中的細號規針頭自患者獲得或分離。細號規針頭可為18號、19號、20號、21號、22號、23號、24號或25號。在一些實施例中，來自患者之FNA樣本可含有至少400,000個TIL，例如400,000個TIL、450,000個TIL、500,000個TIL、550,000

個TIL、600,000個TIL、650,000個TIL、700,000個TIL、750,000個TIL、800,000個TIL、850,000個TIL、900,000個TIL、950,000個TIL或更多。

【0992】在一些情況下，本文所描述之TIL係獲自核心生檢樣本。在一些情況下，核心生檢樣本係使用在11號針頭至16號針頭範圍中的外科或醫用針頭自患者獲得或分離。針頭可為11號、12號、13號、14號、15號或16號。在一些實施例中，來自患者之核心生檢樣本可含有至少400,000個TIL，例如400,000個TIL、450,000個TIL、500,000個TIL、550,000個TIL、600,000個TIL、650,000個TIL、700,000個TIL、750,000個TIL、800,000個TIL、850,000個TIL、900,000個TIL、950,000個TIL或更多。

【0993】一般而言，經收集之細胞懸浮液被稱為「初代細胞群體」或「新鮮收集的」細胞群體。

【0994】在一些實施例中，TIL並非獲自腫瘤碎解物。在一些實施例中，實體腫瘤核心未經碎斷。

【0995】在一些實施例中，TIL係獲自腫瘤碎解物。在一些實施例中，藉由在酶培養基(例如但不限於RPMI 1640、2 mM GlutaMAX、10 mg/mL建它黴素、30 U/mL DNA酶及1.0 mg/mL膠原蛋白酶)中培育，隨後進行機械解離(加利福尼亞州奧本美天旎生物技術的GentleMACS)來產生腫瘤碎解物。在將腫瘤置於酶培養基中之後，可以機械方式將腫瘤解離大約1分鐘。隨後可將溶液在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘，且接著再次機械破壞大約1分鐘。在37

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

【0996】在一些實施例中，獲得第一TIL群體包括多病灶取樣方法。

【0997】腫瘤解離酶混合物可包含一或多種解離(消化)酶，諸如但不限於膠原蛋白酶(包含任何摻合或類型之膠原蛋白酶)、Accutase™、Accumax™、玻尿酸酶、中性蛋白酶(分散酶)、胰凝乳蛋白酶、木瓜凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、酪蛋白酶、彈性蛋白酶、木瓜酶、XIV型蛋白酶(鏈蛋白酶)、去氧核糖核酸酶I(DNA酶)、胰蛋白酶抑制劑、任何其他解離或蛋白分解酶，及其任何組合。

【0998】在一些實施例中，解離酶係自凍乾酶重構。在一些實施例中，凍乾酶係在一定量之無菌緩衝液(諸如HBSS)中重構。

【0999】在一些情況下，膠原蛋白酶(諸如無動物源1型膠原蛋白酶)係在10 mL無菌HBSS或另一緩衝液中重構。凍乾儲備酶之濃度可為每小瓶2892 PZ U。在一些實施例中，膠原蛋白酶係在5 mL至15 mL緩衝液中重構。在一些實施例中，在重構後，膠原蛋白酶儲備液的範圍為約

100 PZ U/mL至約400 PZ U/mL，例如，約100 PZ U/mL至約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL至約350 PZ U/mL、約100 PZ U/mL至約300 PZ U/mL、約150 PZ U/mL至約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL、約150 PZ U/mL、約200 PZ U/mL、約210 PZ U/mL、約220 PZ U/mL、約230 PZ U/mL、約240 PZ U/mL、約250 PZ U/mL、約260 PZ U/mL、約270 PZ U/mL、約280 PZ U/mL、約289.2 PZ U/mL、約300 PZ U/mL、約350 PZ U/mL或約400 PZ U/mL。

【1000】在一些實施例中，中性蛋白酶係在1 mL無菌HBSS或另一緩衝液中重構。凍乾儲備酶之濃度可為每小瓶175 DMC U。凍乾儲備酶之濃度可為175 DMC/mL。在一些實施例中，在重構後，中性蛋白酶儲備液之範圍為約100 DMC/mL至約400 DMC/mL，例如，約100 DMC/mL至約400 DMC/mL、約100 DMC/mL至約350 DMC/mL、約100 DMC/mL至約300 DMC/mL、約150 DMC/mL至約400 DMC/mL、約100 DMC/mL、約110 DMC/mL、約120 DMC/mL、約130 DMC/mL、約140 DMC/mL、約150 DMC/mL、約160 DMC/mL、約170 DMC/mL、約175 DMC/mL、約180 DMC/mL、約190 DMC/mL、約200 DMC/mL、約250 DMC/mL、約300 DMC/mL、約350 DMC/mL或約400 DMC/mL。

【1001】在一些實施例中，DNA酶I係在1 mL無菌HBSS或另一緩衝液中重構。凍乾儲備酶之濃度為每小瓶4

KU。在一些實施例中，在重構後，DNA酶I儲備液的範圍為約1 KU/mL至10 KU/mL，例如約1 KU/mL、約2 KU/mL、約3 KU/mL、約4 KU/mL、約5 KU/mL、約6 KU/mL、約7 KU/mL、約8 KU/mL、約9 KU/mL或約10 KU/mL。

【1002】在一些實施例中，酶儲備溶液會發生變化，因此請驗證凍乾儲備溶液之濃度，並相應地修改添加至碎解混合物中的酶之最終量。

【1003】在一些實施例中，酶混合物包含約4.7 mL無菌HBSS中的約10.2 μl中性蛋白酶(0.36 DMC U/mL)、21.3 μl膠原蛋白酶(1.2 PZ/mL)及250 μl DNA酶I(200 U/mL)。

2. 胸膜滲出液TIL

【1004】在一些實施例中，樣本為胸膜液樣本。在一些實施例中，根據本文所描述之過程的用於擴增之TIL的來源為胸膜液樣本。在一些實施例中，樣本為源於胸膜滲出液之樣本。在一些實施例中，根據本文所描述之過程的用於擴增之TIL的來源為源於胸膜滲出液之樣本。參見例如美國專利公開案US 2014/0295426中所描述之方法，其出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

【1005】在一些實施例中，可以採用疑似及/或含有TIL之任何胸膜液或胸膜滲出液。此類樣本可來源於原發性或轉移性肺癌，諸如NSCLC或SCLC。在一些實施例中，樣本可為來源於另一器官(例如乳房、卵巢、結腸或

前列腺)之繼發轉移性癌細胞。在一些實施例中，用於本文所描述之擴增方法中之樣本為胸膜滲出物(pleural exudate)。在一些實施例中，用於本文所描述之擴增方法中之樣本為胸膜溢出物(pleural transudate)。其他生物樣本可包含含有TIL之其他漿液，包含例如來自腹部之腹水液或胰囊腫液。腹水液及胸膜液涉及非常類似的化學系統；腹部及肺兩者在相同的惡性腫瘤事件中於胸腔及腹腔中皆具有間皮細胞株及流體形式，且在一些實施例中，此類流體含有TIL。在本發明例示胸膜液的一些實施例中，可以使用含有TIL之腹水或其他囊腫液進行相同的方法以得到類似結果。

【1006】在一些實施例中，胸膜液呈未經處理之形式直接自患者移除。在一些實施例中，在接觸步驟之前，將未經處理之胸膜液置於標準血液收集管(諸如EDTA或肝素管)中。在一些實施例中，在接觸步驟之前，將未經處理之胸膜液置於標準CellSave®管(Veridex)中。在一些實施例中，在自患者收集之後立即將樣本置於CellSave管中，以避免活TIL之數目減少。若保留在未經處理之胸膜液中，即使在4℃下，活TIL之數目可能在24小時內顯著降低。在一些實施例中，樣本係在自患者移除之後1小時、5小時、10小時、15小時或至多24小時內置於適當收集管中。在一些實施例中，樣本係在4℃下自患者移除之後1小時、5小時、10小時、15小時或至多24小時內置於適當收集管中。

【1007】在一些實施例中，可以稀釋來自所選個體之胸膜液樣本。在一個實施例中，稀釋度為1:10胸膜液比稀釋劑。在另一實施例中，稀釋度為1:9胸膜液比稀釋劑。在另一實施例中，稀釋度為1:8胸膜液比稀釋劑。在另一實施例中，稀釋度為1:5胸膜液比稀釋劑。在另一實施例中，稀釋度為1:2胸膜液比稀釋劑。在另一實施例中，稀釋度為1:1胸膜液比稀釋劑。在一些實施例中，稀釋劑包含鹽水、磷酸鹽緩衝鹽水、另一緩衝液或生理學上可接受之稀釋劑。在一些實施例中，樣本係在自患者收集及稀釋之後立即置於CellSave管中，以避免活TIL減少，若保留在未經處理之胸膜液中，則即使在4℃下，活TIL可能在24至48小時內顯著減少。在一些實施例中，胸膜液樣本係在自患者移除且稀釋之後1小時、5小時、10小時、15小時、24小時、36小時、至多48小時內置於適當收集管中。在一些實施例中，胸膜液樣本係在自患者移除且在4℃下稀釋之後1小時、5小時、10小時、15小時、24小時、36小時、至多48小時內置於適當收集管中。

【1008】在又一實施例中，在進一步的處理步驟之前，藉由習知手段濃縮胸膜液樣本。在一些實施例中，在胸膜液必須冷凍保存以便運送至進行該方法之實驗室或用於後續分析(例如，在收集後24至48小時之後)之情形下，此胸膜液之預處理較佳。在一些實施例中，藉由在將胸膜液樣本自個體中取出後將其離心並將離心液或沈澱物再懸浮於緩衝液中來製備胸膜液樣本。在一些實施例中，對胸

膜液樣本進行多次離心及再懸浮，隨後將其冷凍保存以用於運輸或以後的分析及/或處理。

【1009】在一些實施例中，在進一步的處理步驟之前，藉由使用過濾方法濃縮胸膜液樣本。在一些實施例中，在接觸步驟中使用之胸膜液樣本係藉由將流體經由含有已知且基本均勻的孔徑的過濾器過濾而製備的，該孔徑允許胸膜液通過膜但保留腫瘤細胞。在一些實施例中，膜中的孔之直徑可為至少4 μM。在另一實施例中，孔徑可為5 μM或更大，且在其他實施例中，可為6 μM、7 μM、8 μM、9 μM或10 μM中之任一者。過濾之後，可將被膜保留之細胞(包含TIL)自膜上衝出至適合的生理學上可接受之緩衝液中。然後可以將以此方式濃縮之細胞(包含TIL)用於該方法之接觸步驟中。

【1010】在一些實施例中，使胸膜液樣本(包含例如未經處理之胸膜液)、經稀釋之胸膜液或再懸浮之細胞沈澱物與溶解試劑接觸，該溶解試劑係差異性地溶解樣本中存在之無核紅血球。在一些實施例中，在胸膜液含有大量RBC之情形下，此步驟係在進一步的處理步驟之前進行。適合的溶解試劑包含單一溶解試劑或溶解試劑及淬滅試劑，或溶解試劑、淬滅試劑及固定試劑。適合的溶解系統為市售的，且包含BD Pharm Lyse™系統(碧迪醫療公司(Becton Dickenson))。其他溶解系統包含Versalyse™系統、FACSlyse™系統(碧迪醫療公司)、Immunoprep™系統或Erythrolyse II系統(貝克曼庫爾特公司(Beckman Coulter,

Inc.))或氯化銨系統。在一些實施例中，溶解試劑可隨主要需求而變化，該等需求為紅血球之有效溶解及TIL之保守性及胸膜液中TIL之表型特性。除採用單一試劑用於溶解之外，適用於本文所描述之方法的溶解系統可包含第二試劑，例如在該方法之剩餘步驟期間淬滅或延遲溶解試劑之效應的第二試劑，例如Stabilyse™試劑(貝克曼庫爾特公司)。視溶解試劑之選擇或該方法之較佳實施而定，亦可採用習知固定試劑。

【1011】在一些實施例中，在約-140℃之溫度下冷凍保存如上文所描述之未經處理、稀釋或多次離心或處理的胸膜液樣本，隨後如本文所提供進行進一步處理及/或擴增。

3. 擴增來自末梢血液之末梢血液淋巴球(PBL)之方法

【1012】PBL方法1。在本發明之一實施例中，PBL係使用本文所描述之過程擴增。在本發明之一實施例中，該方法包括獲得來自全血之PBMC樣本。在一實施例中，該方法包括藉由使用非CD19+級份之負向選擇以自PBMC中分離純T細胞來富集T細胞。在一實施例中，該方法包括藉由使用非CD19+級份之基於磁珠之負向選擇以自PBMC中分離純T細胞來富集T細胞。

【1013】在本發明之一實施例中，PBL方法1如下進行：在第0天，將冷凍保存之PBMC樣本解凍且計算PBMC之數目。使用人類泛T細胞分離套組與LS管柱(美天旎生物

技術)分離T細胞。

【1014】PBL方法2。在本發明之一實施例中，PBL係使用PBL方法2擴增，該方法包括獲得來自全血之PBMC樣本。藉由在37℃下培育PBMC至少三小時且接著分離非附著細胞來富集來自PBMC之T細胞。

【1015】在本發明之一實施例中，PBL方法2如下進行：在第0天，將經冷凍保存之PMBC樣本解凍，且將PBMC細胞以每孔6百萬個細胞接種於CM-2培養基中之6孔盤中並且在37℃下培育3小時。3小時後，移除非附著細胞(其係PBL)且計算其數目。

【1016】PBL方法3。在本發明之一實施例中，PBL係使用PBL方法3擴增，該方法包括獲得來自末梢血液之PBMC樣本。B細胞係使用CD19+選擇分離且T細胞係使用負向選擇PBMC樣本之非CD19+級份來選擇。

【1017】在本發明之一實施例中，PBL方法3如下進行：在第0天，將來源於末梢血液的冷凍保存之PBMC解凍且計算其數目。使用CD19多分選人類套組(美天旎生物技術)分選CD19+ B細胞。在非CD19+細胞級份中，使用人類泛T細胞分離套組及LS管柱(美天旎生物技術)純化T細胞。

【1018】在一實施例中，PBMC係自全血樣本分離。在一實施例中，使用PBMC樣本作為擴增PBL之起始物質。在一實施例中，樣本在擴增過程之前經冷凍保存。在另一實施例中，使用新鮮樣本作為擴增PBL之起始物質。在本發明之一實施例中，使用本領域中已知之方法自

PBMC分離T細胞。在一實施例中，使用人類泛T細胞分離套組及LS管柱分離T細胞。在本發明之一實施例中，使用本領域中已知之抗體選擇方法(例如CD19負向選擇)自PBMC分離T細胞。

【1019】在本發明之一實施例中，PBMC樣本係在有效鑑別非附著細胞之所需溫度下培育一段時間。在本發明之一實施例中，培育時間為約3小時。在本發明之一實施例中，溫度為約37℃。接著使用上述過程擴增非附著細胞。

【1020】在一些實施例中，PBMC樣本係來自視情況已經用包括激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療之個體或患者。在一些實施例中，腫瘤樣本係來自已經用包括激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療之個體或患者。在一些實施例中，PBMC樣本係來自已經用包括激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療之個體或患者，其已進行治療至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少4個月、至少5個月、至少6個月或1年或更長。在另一實施例中，PBMC係來源於當前進行ITK抑制劑方案(諸如伊布替尼(ibrutinib))之患者。

【1021】在一些實施例中，PBMC樣本係來自已用包括激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療且難以用激酶抑制劑或ITK抑制劑(諸如伊布替尼)治療之個體或患者。

【1022】在一些實施例中，PBMC樣本係來自已經用

包括激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療但不再進行激酶抑制劑或ITK抑制劑治療之個體或患者。在一些實施例中，PBMC樣本係來自已經用包括激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療但不再進行激酶抑制劑或ITK抑制劑治療並且尚未進行治療達至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少4個月、至少5個月、至少6個月或至少1年或更長之個體或患者。在另一實施例中，PBMC來源於先前暴露於ITK抑制劑但在至少3個月、至少6個月、至少9個月或至少1年內尚未經治療之患者。

【1023】在本發明之一實施例中，在第0天，針對CD19+選擇細胞且據此分選。在本發明之一實施例中，使用抗體結合珠粒進行選擇。在本發明之一實施例中，在第0天自PBMC分離純T細胞。

【1024】在本發明之一實施例中，對於未經伊布替尼或其他ITK抑制劑預治療之患者，10 mL至15 mL白血球層將產生約5×10^9個PBMC，其又將產生約5.5×10^7個PBL。

【1025】在本發明之一實施例中，對於經伊布替尼或其他ITK抑制劑預治療之患者，擴增過程將產生約20×10^9個PBL。在本發明之一實施例中，40.3×10^6個PBMC將產生約4.7×10^5個PBL。

【1026】在任何前述實施例中，PBMC可來源於全血樣本，藉由血球分離術獲得，來源於白血球層，或自本領域中已知用於獲得PBMC之任何其他方法獲得。

4. 擴增來自骨髓源性PBMC之骨髓浸潤性淋巴球(MIL)的方法

【1027】MIL方法3。在本發明之一實施例中，該方法包括獲得來自骨髓之PBMC。在第0天，針對CD3+/CD33+/CD20+/CD14+選擇PBMC且分選，且將非CD3+/CD33+/CD20+/CD14+細胞級份進行音波處理且將一部分經音波處理之細胞級份添加回至所選細胞級份中。

【1028】在本發明之一實施例中，MIL方法3如下進行：在第0天，將冷凍保存之PBMC樣本解凍且計算PBMC之數目。將細胞用CD3、CD33、CD20及CD14抗體染色且使用S3e細胞分選器(Bio-Rad)分選。將細胞分選成兩種級份：免疫細胞級份(MIL部分)(CD3+CD33+CD20+CD14+)及AML胚細胞級份(非CD3+CD33+CD20+CD14+)。

【1029】在本發明之一實施例中，PBMC係獲自骨髓。在一實施例中，PBMC係經由血球分離術、抽吸、穿刺生檢或本領域中已知之其他類似手段自骨髓獲得。在一實施例中，PBMC係新鮮的。在另一實施例中，PBMC經冷凍保存。

【1030】在本發明之一實施例中，MIL係自10 mL至50 mL骨髓抽吸物擴增。在本發明之一實施例中，自患者獲得10 mL骨髓抽吸物。在另一實施例中，自患者獲得20 mL骨髓抽吸物。在另一實施例中，自患者獲得30 mL骨髓抽吸物。在另一實施例中，自患者獲得40 mL骨髓抽吸物。在另一實施例中，自患者獲得50 mL骨髓抽吸物。

【1031】在本發明之一實施例中，自約10 mL至50 mL骨髓抽吸物產生之PBMC的數目為約5×10^7至約10×10^7個PBMC。在另一實施例中，產生之PMBC之數目為約7×10^7個PBMC。

【1032】在本發明之一實施例中，約5×10^7至約10×10^7個PBMC產生約0.5×10^6至約1.5×10^6個MIL。在本發明之一實施例中，產生約1×10^6個MIL。

【1033】在本發明之一實施例中，來源於骨髓抽吸物之12×10^6個PBMC產生大約1.4×10^5個MIL。

【1034】在任何前述實施例中，PBMC可來源於全血樣本、骨髓、藉由血球分離術獲得，來源於白血球層，或自本領域中已知之用於獲得PBMC之任何其他方法獲得。

B. 步驟B：初始第一擴增

【1035】在一些實施例中，本發明方法提供較年輕TIL，該等較年輕TIL相較於較老TIL(亦即，在向個體/患者投予之前已進一步進行更多次複製的TIL)可能提供額外治療益處。年輕TIL之特徵已在文獻中描述，例如Donia等人，《斯堪的納維亞免疫學雜誌(*Scandinavian Journal of Immunology*)》，75:157-167 (2012)；Dudley等人，《臨床癌症研究(*Clin Cancer Res*)》，16:6122-6131 (2010)；Huang等人，《免疫療法雜誌》，28(3):258-267 (2005)；Besser等人，《臨床癌症研究》，19(17):OF1-OF9 (2013)；Besser等人，《免疫療法雜誌》 32:415-423 (2009)；

Robbins等人，《免疫學雜誌(*J Immunol*)》 2004; 173:7125-7130；Shen等人，《免疫療法雜誌》，30:123-129 (2007)；Zhou等人，《免疫療法雜誌》，28:53-62 (2005)；及Tran等人，《免疫療法雜誌》，31:742-751 (2008)，其皆以全文引用之方式併入本文中。

【1036】在例如圖1(特別是例如圖1B及/或圖8C)之步驟A中所描述進行腫瘤碎片分割及/或腫瘤碎片碎解之後，將所得細胞在含有IL-2、OKT-3及飼養細胞(例如抗原呈現飼養細胞)的血清中在促進TIL生長超過腫瘤及其他細胞之條件下培養。在一些實施例中，IL-2、OKT-3及飼養細胞在培養起始時(例如在第0天)與腫瘤碎解物及/或腫瘤碎片一起添加。在一些實施例中，腫瘤碎解物及/或腫瘤碎片以每容器至多60個碎片及6000 IU/mL IL-2培育於容器中。在一些實施例中，將此初代細胞群體培養數天之時段，通常1至8天，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，將此初代細胞群體培養數天之時段，通常1至7天，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，初始第一擴增發生1至8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，初始第一擴增發生1至7天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生5至8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生5至7天之時段，產生通常約1 ×

10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約6至8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約6至7天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約7至8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約7天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。

【1037】在較佳實施例中，TIL之擴增可使用如下文及本文所描述之初始第一擴增步驟(例如圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)之步驟B中所描述之彼等者，其可包含稱為預REP或初始REP之過程且其自第0天及/或自培養起始含有飼養細胞)進行，接著進行如下文步驟D及本文所描述之快速第二擴增(步驟D，包含稱為快速擴增方案(REP)步驟之過程)，隨後進行視情況冷凍保存，且接著進行如下文及本文所描述之第二步驟D(包含稱為再刺激REP步驟之過程)。自此過程獲得之TIL可視情況針對如本文所描述之表型特徵及代謝參數進行表徵。在一些實施例中，腫瘤碎片在約1 mm^3與10 mm^3之間。

【1038】在一些實施例中，第一擴增培養基稱為「CM」(培養基之縮寫)。在一些實施例中，步驟B之CM由補充有10%人類AB血清、25 mM Hepes及10 mg/mL建它

黴素的含GlutaMAX之RPMI 1640組成。

【1039】在一些實施例中，有少於或等於240個腫瘤碎片。在一些實施例中，有少於或等於240個腫瘤碎片被放入少於或等於4個容器中。在一些實施例中，容器為G-Rex 100 MCS培養瓶。在一些實施例中，少於或等於60個腫瘤碎片被放入1個容器中。在一些實施例中，各容器包括每容器少於或等於500 mL培養基。在一些實施例中，培養基包括IL-2。在一些實施例中，培養基包括6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，培養基包括抗原呈現飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)。在一些實施例中，培養基包括每容器2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包括OKT-3。在一些實施例中，培養基包括每容器30 ng/mL OKT-3。在一些實施例中，容器為G-Rex 100 MCS培養瓶。在一些實施例中，培養基包括6000 IU/mL IL-2、30 ng OKT-3及2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包括每容器6000 IU/mL IL-2、30 ng/mL OKT-3及2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。

【1040】在製備腫瘤碎片之後，將所得細胞(亦即，為初代細胞群體之碎片)在有利TIL但不利腫瘤及其他細胞生長的條件下培養於含有IL-2、抗原呈現飼養細胞及OKT-3之培養基中，且其允許自第0天培養起始開始TIL起動及加速生長。在一些實施例中，腫瘤碎解物及/或腫瘤碎片與6000 IU/mL IL-2以及抗原呈現飼養細胞及OKT-3一起培育。將此初代細胞群體培養數天之時段，通常1至8天，產

生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，在初始第一擴增期間的生長培養基包括IL-2或其變體以及抗原呈現飼養細胞及OKT-3。在一些實施例中，將此初代細胞群體培養數天之時段，通常1至7天，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，在初始第一擴增期間的生長培養基包括IL-2或其變體以及抗原呈現飼養細胞及OKT-3。在一些實施例中，IL-2為重組人類IL-2(rhIL-2)。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備溶液具有20至30×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備溶液具有20×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備溶液具有25×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備溶液具有30×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，IL-2儲備溶液具有4至8×10^6 IU/mg IL-2之最終濃度。在一些實施例中，IL-2儲備溶液具有5至7×10^6 IU/mg IL-2之最終濃度。在一些實施例中，IL-2儲備溶液具有6×10^6 IU/mg IL-2之最終濃度。在一些實施例中，IL-2儲備溶液如實例C中所描述製備。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約10,000 IU/mL IL-2、約9,000 IU/mL IL-2、約8,000 IU/mL IL-2、約7,000 IU/mL IL-2、約6000 IU/mL IL-2或約5,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約9,000 IU/mL IL-2至約5,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約8,000 IU/mL IL-2至約6,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，初始第一擴

增培養基包括約7,000 IU/mL IL-2至約6,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約6,000 IU/mL IL-2。在一實施例中，細胞培養基進一步包括IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括約3000 IU/mL IL-2。在一實施例中，初始第一擴增細胞培養基進一步包括IL-2。在較佳實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括約3000 IU/mL IL-2。在一實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括約1000 IU/mL、約1500 IU/mL、約2000 IU/mL、約2500 IU/mL、約3000 IU/mL、約3500 IU/mL、約4000 IU/mL、約4500 IU/mL、約5000 IU/mL、約5500 IU/mL、約6000 IU/mL、約6500 IU/mL、約7000 IU/mL、約7500 IU/mL或約8000 IU/mL IL-2。在一實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括1000與2000 IU/mL之間、2000與3000 IU/mL之間、3000與4000 IU/mL之間、4000與5000 IU/mL之間、5000與6000 IU/mL之間、6000與7000 IU/mL之間、7000與8000 IU/mL之間或約8000 IU/mL的IL-2。

【1041】在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約500 IU/mL IL-15、約400 IU/mL IL-15、約300 IU/mL IL-15、約200 IU/mL IL-15、約180 IU/mL IL-15、約160 IU/mL IL-15、約140 IU/mL IL-15、約120 IU/mL IL-15或約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約500 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約400 IU/mL IL-15至約

100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約300 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約200 IU/mL IL-15。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括約180 IU/mL IL-15。在一實施例中，初始第一擴增細胞培養基進一步包括IL-15。在較佳實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括約180 IU/mL IL-15。

【1042】在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約20 IU/mL IL-21、約15 IU/mL IL-21、約12 IU/mL IL-21、約10 IU/mL IL-21、約5 IU/mL IL-21、約4 IU/mL IL-21、約3 IU/mL IL-21、約2 IU/mL IL-21、約1 IU/mL IL-21或約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約20 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約15 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約12 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約10 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約5 IU/mL IL-21至約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包括約2 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括約0.5 IU/mL IL-21。在一實施例中，細胞培養基進一步包括IL-21。在較佳實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括約1

IU/mL IL-21。

【1043】在一實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括OKT-3抗體。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括約30 ng/mL OKT-3抗體。在一實施例中，初始第一擴增細胞培養基包括約0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL及約1 μg/mL OKT-3抗體。在一實施例中，細胞培養基包括0.1 ng/mL與1 ng/mL之間、1 ng/mL與5 ng/mL之間、5 ng/mL與10 ng/mL之間、10 ng/mL與20 ng/mL之間、20 ng/mL與30 ng/mL之間、30 ng/mL與40 ng/mL之間、40 ng/mL與50 ng/mL之間、及50 ng/mL與100 ng/mL之間的OKT-3抗體。在一實施例中，細胞培養基包括15 ng/mL與30 ng/mL之間的OKT-3抗體。在一實施例中，細胞培養基包括30 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，OKT-3抗體為莫羅單抗。

【1044】在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基在細胞培養基中包括一種或多種TNFRSF促效劑。在一些實施例中，TNFRSF促效劑包括4-1BB促效劑。在一些實施例中，TNFRSF促效劑為4-1BB促效劑，且該4-1BB促效劑選自由以下組成之群組：烏瑞魯單抗、烏圖木單抗、EU-101、融合蛋白及其片段、衍生物、變體、生物類似物及

組合。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成0.1 μg/mL至100 μg/mL之濃度。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成20 μg/mL至40 μg/mL之濃度。

【1045】在一些實施例中，除了一種或多種TNFRSF促效劑之外，初始第一擴增細胞培養基進一步包括初始濃度約3000 IU/mL之IL-2及初始濃度約30 ng/mL之OKT-3抗體，且其中該一種或多種TNFRSF促效劑包括4-1BB促效劑。在一些實施例中，除了一種或多種TNFRSF促效劑之外，初始第一擴增細胞培養基進一步包括初始濃度約6000 IU/mL之IL-2及初始濃度約30 ng/mL之OKT-3抗體，且其中該一種或多種TNFRSF促效劑包括4-1BB促效劑。

【1046】在一些實施例中，初始第一擴增培養基稱為「CM」(培養基之縮寫)。在一些實施例中，其稱為CM1(培養基1)。在一些實施例中，CM由補充有10%人類AB血清、25 mM Hepes及10 mg/mL建它黴素的含GlutaMAX之RPMI 1640組成。在一些實施例中，CM為實例(參見實例A)中所描述之CM1。在一些實施例中，初始第一擴增在初始細胞培養基或第一細胞培養基中發生。在一些實施例中，初始第一擴增培養基或初始細胞培養基或第一細胞培養基包括IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞(在本文中亦稱為飼養細胞)。

【1047】在一些實施例中，本文揭示之擴增過程中使用的培養基為無血清培養基或成分確定培養基。在一些實

施例中，無血清或成分確定培養基包括基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，無血清或成分確定培養基用於防止及/或減少部分因含血清培養基之批次間變化所致之實驗變化。

【1048】在一些實施例中，無血清或成分確定培養基包括基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，基礎細胞培養基包含但不限於CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CTS™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium；DMEM)、最低必需培養基(Minimal Essential Medium；MEM)、伊格爾氏基礎培養基(Basal Medium Eagle；BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(Glasgow's Minimal Essential Medium；G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)。

【1049】在一些實施例中，血清補充劑或血清替代物包含但不限於以下中之一者或多者：CTS™ OpTmizer T細胞擴增血清補充劑、CTS™免疫細胞血清替代物、一種或多種白蛋白或白蛋白取代物、一種或多種胺基酸、一種或多種維生素、一種或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一種或多種抗氧化劑、一種或多種胰島素或胰島素取代物、

一種或多種膠原蛋白前驅物、一種或多種抗生素及一種或多種微量元素。在一些實施例中，成分確定培養基包括白蛋白及一種或多種選自由以下組成之群組的成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Br、T、Mn^{2+}、P、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}及Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，成分確定培養基進一步包括L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或2-巰基乙醇。

【1050】在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞免疫細胞血清替代物與習知生長培養基一起使用，該習知生長培養基包含但不限於CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CST™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【1051】在一些實施例中，以無血清或成分確定培養基之總體積計，無血清或成分確定培養基中之總血清替代物濃度(vol%)為約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、

8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或成分確定培養基之總體積的約3%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或成分確定培養基之總體積的約5%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或成分確定培養基之總體積的約10%。

【1052】在一些實施例中，無血清或成分確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基及26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑在使用前混合在一起之組合。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)，且2-巰基乙醇於培養基中之最終濃度為55 μM。

【1053】在一些實施例中，成分確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養

基及26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑在使用前混合在一起之組合。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM的2-巰基乙醇及2 mM的L-麩醯胺酸。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包括約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包括約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包括約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包括約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包括約3000 IU/mL IL-2。在

一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包括約1000 IU/mL至約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包括約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包括約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包括約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)，且2-巰基乙醇於培養基中之最終濃度為55 μM。

【1054】在一些實施例中，無血清培養基或成分確定培養基補充有濃度為約0.1 mM至約10 mM、0.5 mM至約9 mM、1 mM至約8 mM、2 mM至約7 mM、3 mM至約6 mM或4 mM至約5 mM的麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。在一些實施例中，無血清培養基或成分確定培養基補充有濃度約2 mM之麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。

【1055】在一些實施例中，無血清培養基或成分確定培養基補充有濃度為約5 mM至約150 mM、10 mM至約140

mM、15 mM至約130 mM、20 mM至約120 mM、25 mM至約110 mM、30 mM至約100 mM、35 mM至約95 mM、40 mM至約90 mM、45 mM至約85 mM、50 mM至約80 mM、55 mM至約75 mM、60 mM至約70 mM，或約65 mM的2-巰基乙醇。在一些實施例中，無血清培養基或成分確定培養基補充有濃度約55 mM之2-巰基乙醇。在一些實施例中，2-巰基乙醇於培養基中之最終濃度為55 μM。

【1056】在一些實施例中，以引用之方式併入本文中的國際PCT公開案第WO/1998/030679號中所描述之成分確定培養基可用於本發明。在該公開案中，描述無血清真核細胞培養基。無血清真核細胞培養基包含補充有能夠支持細胞在無血清培養中生長之無血清補充劑的基礎細胞培養基。無血清真核細胞培養基補充劑包括一種或多種選自由以下組成之群組的成分，或藉由組合一種或多種選自由以下組成之群組的成分而獲得：一種或多種白蛋白或白蛋白取代物、一種或多種胺基酸、一種或多種維生素、一種或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一種或多種抗氧化劑、一種或多種胰島素或胰島素取代物、一種或多種膠原蛋白前驅物、一種或多種微量元素及一種或多種抗生素。在一些實施例中，成分確定培養基進一步包括L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或β-巰基乙醇。在一些實施例中，成分確定培養基包括白蛋白或白蛋白取代物及一種或多種選自由以下組成之群組的成分：一種或多種胺基酸、一種或多種維生素、一種或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一種或多種

抗氧化劑、一種或多種胰島素或胰島素取代物、一種或多種膠原蛋白前驅物及一種或多種微量元素。在一些實施例中，成分確定培養基包括白蛋白及一種或多種選自由以下組成之群組的成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Br、T、Mn^{2+}、P、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}及Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，基礎細胞培養基選自由以下組成之群組：達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【1057】在一些實施例中，成分確定培養基中甘胺酸之濃度在約5至200 mg/L之範圍內，L-組胺酸之濃度為約5至250 mg/L，L-異白胺酸之濃度為約5至300 mg/L，L-甲硫胺酸之濃度為約5至200 mg/L，L-苯丙胺酸之濃度為約5至400 mg/L，L-脯胺酸之濃度為約1至1000 mg/L，L-羥基脯胺酸之濃度為約1至45 mg/L，L-絲胺酸之濃度為約1至250 mg/L，L-蘇胺酸之濃度為約10至500 mg/L，L-色胺酸之濃度為約2至110 mg/L，L-酪胺酸之濃度為約3至175 mg/L，

L-纈胺酸之濃度為約5至500 mg/L，硫胺素之濃度為約1至20 mg/L，還原麩胱甘肽之濃度為約1至20 mg/L，L-抗壞血酸-2-磷酸鹽之濃度為約1至200 mg/L，鐵飽和運鐵蛋白之濃度為約1至50 mg/L，胰島素之濃度為約1至100 mg/L，亞硒酸鈉之濃度為約0.000001至0.0001 mg/L，且白蛋白(例如AlbuMAX® I)之濃度為約5000至50,000 mg/L。

【1058】在一些實施例中，成分確定培養基中之非微量元素部分成分係以下文表4中標題「1X培養基中之濃度範圍」欄中列出之濃度範圍存在。在其他實施例中，成分確定培養基中之非微量元素部分成分係以下文表3中標題「1X培養基之較佳實施例」欄中列出之最終濃度存在。在其他實施例中，成分確定培養基為包括無血清補充劑之基礎細胞培養基。在一些此等實施例中，無血清補充劑包括下文表4中的類型及標題「補充劑之較佳實施例」欄中列出之濃度的非微量部分成分。

表4.非微量元素部分成分之濃度

成分	補充劑之較佳實施例（mg/L）（約）	1X培養基中之濃度範圍（mg/L）（約）	1X培養基之較佳實施例（mg/L）（約）
甘胺酸	150	5-200	53
L-組胺酸	940	5-250	183
L-異白胺酸	3400	5-300	615
L-甲硫胺酸	90	5-200	44
L-苯丙胺酸	1800	5-400	336
L-脯胺酸	4000	1-1000	600
L-羥基脯胺酸	100	1-45	15
L-絲胺酸	800	1-250	162
L-蘇胺酸	2200	10-500	425
L-色胺酸	440	2-110	82
L-酪胺酸	77	3-175	84
L-纈胺酸	2400	5-500	454
硫胺素	33	1-20	9
還原麩胱甘肽	10	1-20	1.5
抗壞血酸-2-PO_4（Mg鹽）	330	1-200	50
運鐵蛋白（鐵飽和）	55	1-50	8
胰島素	100	1-100	10
亞硒酸鈉	0.07	0.000001-0.0001	0.00001
AlbuMAX®I	83.000	5000-50,000	12.500

【1059】在一些實施例中，成分確定培養基之滲透壓介於約260與350 mOsmol之間。在一些實施例中，滲透壓介於約280與310 mOsmol之間。在一些實施例中，成分確定培養基補充有至多約3.7 g/L或約2.2 g/L碳酸氫鈉。成分確定培養基可進一步補充有L-麩醯胺酸(最終濃度為約2 mM)、一種或多種抗生素、非必需胺基酸(NEAA；最終濃度為約100 μM)、2-巰基乙醇(最終濃度為約100 μM)。

【1060】在一些實施例中，Smith等人，「使用新穎無Xeno CTS免疫細胞血清替代物離體擴增人類T細胞以用

於授受免疫療法(Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement)」，《臨床轉化免疫學》，4(1) 2015 (doi: 10.1038/cti.2014.31)中所描述之成分確定培養基可用於本發明。簡言之，RPMI或CTS™ OpTmizer™用作基礎細胞培養基且補充有0、2%、5%或10% CTS™免疫細胞血清替代物。

【1061】在一實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基為未經過濾的。使用未經過濾之細胞培養基可簡化擴增細胞數目所需之程序。在一實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基缺乏β-巰基乙醇(BME或βME；亦稱為2-巰基乙醇，CAS 60-24-2)。

【1062】在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為1至8天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為2至8天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為3至8天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖8(特別是例如圖

8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為4至8天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為1至7天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為2至8天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為2至7天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為3至8天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為3至7天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為4至8天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸

如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為4至7天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為5至8天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為5至7天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為6至8天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為6至7天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖1及/或圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所提供之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為7至8天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所提供之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為8天。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包含諸如圖8(特別是例如圖

8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所提供之彼等過程，其可包含有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為7天。

【1063】在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行1天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行1天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行2天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行2天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行3天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行3天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行4天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行4天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行5天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行5天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行6天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進

行6天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行7至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行7天。

【1064】在一些實施例中，TIL之初始第一擴增可進行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行1天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行1天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行2天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行2天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行3天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行3天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行4天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行4天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行5天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行5天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行6天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行6天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行7天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行7天。

【1065】在一些實施例中，採用IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21之組合作為在初始第一擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21以及其任何組合

可包含在初始第一擴增期間，包含例如在根據圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)以及本文所描述之步驟B過程期間。在一些實施例中，採用IL-2、IL-15及IL-21之組合作為在初始第一擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-15及IL-21以及其任何組合可包含在根據圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)以及如本文所描述之步驟B過程期間。

【1066】在一些實施例中，初始第一擴增(例如根據圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B)係在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用生物反應器。在一些實施例中，採用生物反應器作為容器。在一些實施例中，所採用的生物反應器為例如G-Rex-10或G-Rex-100。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-Rex-100。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-Rex-10。

1. 飼養細胞及抗原呈現細胞

【1067】在一實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序(例如包含如下擴增：諸如圖1(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而是在初始第一擴增期間添加。在一實施例中，本文所描述之

初始第一擴增程序(例如包含如下擴增：諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而是在初始第一擴增期間第4至8天期間的任何時間添加。在一實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序(例如包含如下擴增：諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而是在初始第一擴增期間第4至7天期間的任何時間添加。在一實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序(例如包含如下擴增：諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而是在初始第一擴增期間第5至8天期間的任何時間添加。在一實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序(例如包含如下擴增：諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而是在初始第一擴增期間第5至7天期間的任何時間添加。在一實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序(例如包含如下擴增：諸如圖8(特別是例如

圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而是在初始第一擴增期間第6至8天期間的任何時間添加。在一實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序(例如包含如下擴增：諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而是在初始第一擴增期間第6至7天期間的任何時間添加。在一實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序(例如包含如下擴增：諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而是在初始第一擴增期間第7或8天期間的任何時間添加。在一實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序(例如包含如下擴增：諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而是在初始第一擴增期間第7天期間的任何時間添加。在一實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序(例如包含如下擴增：諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等擴增以及

稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而是在初始第一擴增期間第8天期間的任何時間添加。

【1068】在一實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序(例如包含如下擴增：諸如圖8(特別是例如圖8B)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時及初始第一擴增期間需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)。在許多實施例中，飼養細胞係獲自同種異體健康血液供體之標準全血單位的末梢血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。在一些實施例中，初始第一擴增期間使用2.5×10^8個飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增期間使用每容器2.5×10^8個飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增期間使用每GREX-10 2.5×10^8個飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增期間使用每GREX-100 2.5×10^8個飼養細胞。

【1069】一般而言，同種異體PBMC經由輻照或熱處理去活化，且如實例中所描述用於REP程序，其提供用於評估經輻照同種異體PBMC之複製非勝任之例示性方案。

【1070】在一些實施例中，若第14天活細胞總數小於在初始第一擴增第0天放入培養的初始活細胞數目，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。

【1071】在一些實施例中，若第7天在OKT3及IL-2存

在下培養的活細胞總數與在初始第一擴增第0天放入培養的初始活細胞數目相比並未增加，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。在一些實施例中，PBMC在30 ng/mL OKT3抗體及3000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30 ng/mL OKT3抗體及6000 IU/mL IL-2存在下培養。

【1072】在一些實施例中，若第7天在OKT3及IL-2存在下培養的活細胞總數與在初始第一擴增第0天放入培養的初始活細胞數目相比並未增加，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。在一些實施例中，PBMC在5至60 ng/mL OKT3抗體及1000至6000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在10至50 ng/mL OKT3抗體及2000至5000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在20至40 ng/mL OKT3抗體及2000至4000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在25至35 ng/mL OKT3抗體及2500至3500 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30 ng/mL OKT3抗體及6000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在15 ng/mL OKT3抗體及3000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在15 ng/mL OKT3抗體及6000 IU/mL IL-2存在下培養。

【1073】在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為PBMC。在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為人工抗原呈現飼養細胞。在一實施例中，在第二擴增中TIL與抗原

呈現飼養細胞之比率為約1比25、約1比50、約1比100、約1比125、約1比150、約1比175、約1比200、約1比225、約1比250、約1比275、約1比300、約1比325、約1比350、約1比375、約1比400或約1比500。在一實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比50與1比300之間。在一實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比100與1比200之間。

【1074】在一實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序需要約2.5×10^8個飼養細胞與約100×10^6個TIL之比率。在另一實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序需要約2.5×10^8個飼養細胞與約50×10^6個TIL之比率。在又一實施例中，本文所描述之初始第一擴增需要約2.5×10^8個飼養細胞與約25×10^6個TIL。在又一實施例中，本文所描述之初始第一擴增需要約2.5×10^8個飼養細胞。在又一實施例中，初始第一擴增需要四分之一、三分之一、十二分之五或二分之一的用於快速第二擴增之飼養細胞數目。

【1075】在一些實施例中，初始第一擴增中之培養基包括IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增中之培養基包括6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增中之培養基包括抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增中之培養基包括每容器2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增中之培養基包括OKT-3。在一些實施例中，培養基包括每容器30 ng OKT-3。在一些實施例中，容器為G-Rex 100 MCS培養瓶。在一

些實施例中，培養基包括6000 IU/mL IL-2、30 ng/mL OKT-3及2.5 × 10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包括每容器6000 IU/mL IL-2、30 ng/mL OKT-3及2.5 × 10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包括每容器每2.5 × 10^8個抗原呈現飼養細胞500 mL培養基及15 μg OKT-3。在一些實施例中，培養基包括每容器500 mL培養基及15 μg OKT-3。在一些實施例中，容器為G-Rex 100 MCS培養瓶。在一些實施例中，培養基包括500 mL培養基及6000 IU/mL IL-2、30 ng/mL OKT-3及2.5 × 10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包括每容器500 mL培養基、6000 IU/mL IL-2、15 μg OKT-3及2.5 × 10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包括每容器每2.5 × 10^8個抗原呈現飼養細胞500 mL培養基及15 μg OKT-3。

【1076】在一實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序在第二擴增期間需要多於TIL的過量飼養細胞。在許多實施例中，飼養細胞係獲自同種異體健康血液供體之標準全血單位的末梢血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。在一實施例中，使用人工抗原呈現細胞(aAPC)代替PBMC。

【1077】一般而言，同種異體PBMC經由輻照或熱處理去活化，且用於本文所描述之TIL擴增程序，包含圖式及實例中所描述之例示性程序。

【1078】在一實施例中，在初始第一擴增中使用人工

抗原呈現細胞來替代PBMC或與PBMC組合使用。

【1079】在一實施例中，Gen 3處理之初始第一擴增中所用之抗原呈現細胞為單核球細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為B細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為B細胞類淋巴母細胞或B類淋巴母細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為伯基特氏淋巴瘤細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為骨髓譜系細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為單核球。在一實施例中，抗原呈現細胞為HLA-A-02陽性單核球。在一實施例中，抗原呈現細胞為急性單核球性白血病細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為M5亞型急性單核球性白血病細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為Raji細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，抗原呈現細胞為Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，抗原呈現細胞為Ramos細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，抗原呈現細胞為U937細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，抗原呈現細胞為Daudi細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，抗原呈現細胞為黑色素細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為HLA-A-02陽性黑色素細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為黑色素瘤細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為HLA-A-02陽性黑色素瘤細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞係選自由以下組成之群組：Sk-MEL-5、Malme-3M、SK-MEL-28、SK-MEL-3、SH-4、SK-MEL-24、RPMI-7951、SK-MEL-1、A375、G-

361及其組合，或其衍生物、變體、修飾或後代。在任何前述實施例中，抗原呈現細胞可如本文中別處所描述經輻照或未經輻照。

【1080】在一實施例中，aAPC用於Gen 3過程之初始第一擴增中。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之單核球細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之B細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之B細胞類淋巴母細胞或B類淋巴母細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之伯基特氏淋巴瘤細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之骨髓譜系細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之單核球。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之HLA-A-02陽性單核球細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之急性單核球性白血病細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之M5亞型急性單核球性白血病細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之Raji細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之Ramos細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之U937細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之Daudi細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之黑色素細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之HLA-A-02陽性黑色素細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之黑色素瘤

細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之HLA-A-02陽性黑色素瘤細胞。在一實施例中，aAPC係選自由以下組成之群組的經基因修飾之抗原呈現細胞：Sk-MEL-5、Malme-3M、SK-MEL-28、SK-MEL-3、SH-4、SK-MEL-24、RPMI-7951、SK-MEL-1、A375、G-361及其組合，或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，經基因修飾之細胞經修飾以表現CD86、OX40L、4-1BBL、OX-40促效抗體、4-1BB促效抗體、能夠結合OKT-3之Fc鏈之抗體及/或ICOS-L，如美國專利第10,415,015號中所描述，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在任何前述實施例中，經基因修飾之aAPC可如本文中別處所描述經輻照或未經輻照。

2. 細胞介素

【1081】本文所描述之擴增方法通常使用具有高劑量細胞介素(特別是IL-2)之培養基，如本領域中所已知。

【1082】或者，使用細胞介素之組合用於TIL的初始第一擴增亦係是有可能的，其中IL-2、IL-15及IL-21中之兩者或更多者的組合描述於美國專利申請公開案第2017/0107490 A1及國際專利申請公開案第WO 2015/189357號中，該等專利中之每一者以全文引用之方式明確併入本文。因此，可能組合包含IL-2及IL-15、IL-2及IL-21、IL-15及IL-21以及IL-2、IL-15及IL-21，其中後者在許多實施例中具有特定用途。使用細胞介素之組合特別有利

於產生淋巴球，特別是如其中所描述的T細胞。

C. 步驟C：初始第一擴增至快速第二擴增之轉變

【1083】在一些情況下，獲自初始第一擴增(其可包含有時稱為預REP之擴增)之主體TIL群體，包含例如獲自例如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所指示之步驟B的TIL群體，可經歷快速第二擴增(其可包含有時稱為快速擴增方案(REP)之擴增)且接著如下文所論述冷凍保存。類似地，在經基因修飾之TIL將用於療法的情況下，來自初始第一擴增之經擴增TIL群體或來自快速第二擴增之經擴增TIL群體可在擴增步驟之前或在初始第一擴增之後且在快速第二擴增之前進行基因修飾以用於合適治療。

【1084】在一些實施例中，獲自初始第一擴增(例如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所指示之步驟B)之TIL經儲存直至為了選擇而測定表型。在一些實施例中，獲自初始第一擴增(例如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所指示之步驟B)之TIL不經儲存且直接進行快速第二擴增。在一些實施例中，獲自初始第一擴增之TIL在初始第一擴增之後且在快速第二擴增之前不經冷凍保存。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在腫瘤碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增

之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約3天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約3天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約4天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約4天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約5天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約5天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約6天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約6天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約7天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約8天發生。

【1085】在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後1

天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後1天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後1天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後2天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後2天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後3天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後3天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後4天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後4天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後5天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後5天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後6天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在

碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後6天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後7天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後7天發生在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後8天發生。

【1086】在一些實施例中，TIL在初級(primary)第一擴增之後且在快速第二擴增之前不經儲存，且TIL直接進行快速第二擴增(例如在一些實施例中，在如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所顯示的步驟B至步驟D之轉變期間不經儲存)。在一些實施例中，轉變在如本文所描述之密閉系統中發生。在一些實施例中，來自初始第一擴增之TIL(第二TIL群體)直接進行快速第二擴增而無轉變期。

【1087】在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變(例如根據圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟C)係在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用單一生物反應器。在一些實施例中，所採用的單一生物反應器為例如GREX-10或GREX-100。在一些實施例中，密閉系統生物反應器為單一生物反應器。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變涉及容器大小之規模縱向擴大。在一些實

施例中，初始第一擴增與快速第二擴增相比係在較小容器中進行。在一些實施例中，初始第一擴增在GREX-100中進行且快速第二擴增在GREX-500中進行。

i. 步驟D：快速第二擴增

【1088】在一些實施例中，TIL細胞群體在如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所指示之收集及初始第一擴增(步驟A及步驟B)及稱為步驟C之轉變之後進一步擴增數目。此進一步擴增在本文中稱為快速第二擴增，其可包含在本領域中通常稱為快速擴增過程(快速擴增方案或REP)之擴增過程；以及如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟D中所指示之過程。快速第二擴增通常使用包括多種組分(包含飼養細胞、細胞介素來源及抗CD3抗體)之培養基在透氣容器中完成。在一些實施例中，在快速第二擴增起始後1天、2天、3天或4天(亦即，在整體Gen 3過程之第8、9、10或11天)，將TIL轉移至較大體積容器。

【1089】在一些實施例中，TIL之快速第二擴增(其可包含有時稱為REP之擴增；以及如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟D中所指示之過程)可使用本領域中熟習此項技術者已知之任何TIL培養瓶或容器進行。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速

第二擴增起始後進行約1天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約1天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約2天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約2天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約3天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約3天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約4天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約4天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約5天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約5天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約6天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約6天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約7天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約7天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約8天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約8天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約9天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約1天。在一些實施例

中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約2天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約3天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約4天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約5天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約6天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約7天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約8天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約10天。

【1090】在一些實施例中，快速第二擴增可在透氣容器中使用本揭示案之方法(包含例如稱為REP之擴增；以及如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟D中所指示之過程)進行。在一些實施例中，TIL在快速第二擴增中在IL-2、OKT-3及飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)存在下擴增。在一些實施例中，TIL在快速第二擴增中在IL-2、OKT-3及飼養細胞存在下擴增，其中將飼養細胞添加至最終濃度，該最終濃度為存在於初始第一擴增中之飼養細胞濃度的兩倍、2.4倍、2.5倍、3倍、3.5倍或4倍。舉例而言，TIL可在介白素-2(IL-2)或介白素-15(IL-15)存在下使用非特異性T細胞受體刺激而快速擴增。非特異性T細胞受體刺激物可包含例如抗CD3抗體，諸如約30 ng/mL OKT3、小鼠單株抗CD3抗體(可購自

新澤西州拉里坦市的Ortho-McNeil或加利福尼亞州奧本的美天旎生物技術公司)或UHCT-1(可購自美國加利福尼亞州聖地亞哥的BioLegend)。TIL可藉由在第二擴增期間包含一種或多種癌症之抗原(包含其抗原部分，諸如抗原決定基)來擴增以誘導進一步TIL活體外刺激，該等抗原可視情況在T細胞生長因子(諸如300 IU/mL IL-2或IL-15)存在下視情況自載體表現，該載體諸如人類白血球抗原A2(HLA-A2)結合肽，例如0.3 μM MART-1 :26-35(27 L)或gp100:209-217(210M)。其他適合抗原可包含例如NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、酪胺酸酶癌症抗原、MAGE-A3、SSX-2及VEGFR2或其抗原部分。TIL亦可藉由用脈衝至表現HLA-A2之抗原呈現細胞上的相同癌症抗原再刺激而快速擴增。替代地，TIL可進一步用例如實例經照射之自體淋巴球或用經照射之HLA-A2+同種異體淋巴球及IL-2再刺激。在一些實施例中，再刺激作為第二擴增之部分發生。在一些實施例中，第二擴增在經照射之自體淋巴球或經照射之HLA-A2+同種異體淋巴球及IL-2存在下發生。

【1091】在一實施例中，細胞培養基進一步包括IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包括約3000 IU/mL IL-2。在一實施例中，細胞培養基包括約1000 IU/mL、約1500 IU/mL、約2000 IU/mL、約2500 IU/mL、約3000 IU/mL、約3500 IU/mL、約4000 IU/mL、約4500 IU/mL、約5000 IU/mL、約5500 IU/mL、約6000 IU/mL、約6500 IU/mL、約7000 IU/mL、約7500 IU/mL或約8000 IU/mL IL-

2。在一實施例中，細胞培養基包括1000與2000 IU/mL之間、2000與3000 IU/mL之間、3000與4000 IU/mL之間、4000與5000 IU/mL之間、5000與6000 IU/mL之間、6000與7000 IU/mL之間、7000與8000 IU/mL之間或8000 IU/mL之間的IL-2。

【1092】在一實施例中，細胞培養基包括OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包括約30 ng/mL OKT-3抗體。在一實施例中，細胞培養基包括約0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL及約1 μg/mL OKT-3抗體。在一實施例中，細胞培養基包括0.1 ng/mL與1 ng/mL之間、1 ng/mL與5 ng/mL之間、5 ng/mL與10 ng/mL之間、10 ng/mL與20 ng/mL之間、20 ng/mL與30 ng/mL之間、30 ng/mL與40 ng/mL之間、40 ng/mL與50 ng/mL之間、及50 ng/mL與100 ng/mL之間的OKT-3抗體。在一實施例中，細胞培養基包括15 ng/mL與30 ng/mL之間的OKT-3抗體。在一實施例中，細胞培養基包括30 ng/mL與60 ng/mL之間的OKT-3抗體。在一實施例中，細胞培養基包括約30 ng/mL OKT-3。在一實施例中，細胞培養基包括約60 ng/mL OKT-3。在一些實施例中，OKT-3抗體為莫羅單抗。

【1093】在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括IL-2。在一些實施例中，培養基包括6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括每容器7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括OKT-3。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括每容器500 mL培養基及30 μg OKT-3。在一些實施例中，容器為G-Rex 100 MCS培養瓶。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括6000 IU/mL IL-2、60 ng/mL OKT-3及7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包括每容器500 mL培養基及6000 IU/mL IL-2、30 μg OKT-3及7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。

【1094】在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括IL-2。在一些實施例中，培養基包括6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包括每容器5×10^8至7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括OKT-3。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括每容器500 mL培養基及30 μg OKT-3。在一些實施例中，容器為G-Rex 100 MCS培養瓶。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包括6000 IU/mL IL-2、60 ng/mL OKT-3及5×10^8至7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養

基包括每容器500 mL培養基及6000 IU/mL IL-2、30 μg OKT-3及5 × 10^8至7.5 × 10^8個抗原呈現飼養細胞。

【1095】在一些實施例中，細胞培養基包括一種或多種TNFRSF促效劑於細胞培養基中。在一些實施例中，TNFRSF促效劑包括4-1BB促效劑。在一些實施例中，TNFRSF促效劑為4-1BB促效劑，且該4-1BB促效劑選自由以下組成之群組：烏瑞魯單抗、烏圖木單抗、EU-101、融合蛋白及其片段、衍生物、變體、生物類似物及組合。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成0.1 μg/mL至100 μg/mL之濃度。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成20 μg/mL至40 μg/mL之濃度。

【1096】在一些實施例中，除了一種或多種TNFRSF促效劑之外，細胞培養基進一步包括初始濃度約3000 IU/mL之IL-2及初始濃度約30 ng/mL之OKT-3抗體，且其中該一種或多種TNFRSF促效劑包括4-1BB促效劑。

【1097】在一些實施例中，採用IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21之組合作為在第二擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21以及其任何組合可包含在第二擴增期間，包含例如在根據圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)以及本文所描述之步驟D過程期間。在一些實施例中，採用IL-2、IL-15及IL-21之組合作為在第二擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-15及IL-21以及其任何組合可包含在根據圖8(特別是

例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)及如本文所描述之步驟D過程期間。

【1098】在一些實施例中，第二擴增可在包括IL-2、OKT-3、抗原呈現飼養細胞且視情況包括TNFRSF促效劑之補充細胞培養基中進行。在一些實施例中，第二擴增在補充細胞培養基中發生。在一些實施例中，補充細胞培養基包括IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，第二細胞培養基包括IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC；亦稱為抗原呈現飼養細胞)。在一些實施例中，第二擴增在包括IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞(亦即抗原呈現細胞)之細胞培養基中進行。

【1099】在一些實施例中，第二擴增培養基包括約500 IU/mL IL-15、約400 IU/mL IL-15、約300 IU/mL IL-15、約200 IU/mL IL-15、約180 IU/mL IL-15、約160 IU/mL IL-15、約140 IU/mL IL-15、約120 IU/mL IL-15或約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約500 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約400 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約300 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約200 IU/mL IL-15。在一些實施例中，細胞培養基包括約180 IU/mL IL-15。在一實施例中，細胞培養基進一步包括IL-15。在較佳實施例中，細胞培養基包括約180 IU/mL IL-15。

【1100】在一些實施例中，第二擴增培養基包括約20 IU/mL IL-21、約15 IU/mL IL-21、約12 IU/mL IL-21、約10 IU/mL IL-21、約5 IU/mL IL-21、約4 IU/mL IL-21、約3 IU/mL IL-21、約2 IU/mL IL-21、約1 IU/mL IL-21或約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約20 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約15 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約12 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約10 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約5 IU/mL IL-21至約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包括約2 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包括約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包括約0.5 IU/mL IL-21。在一實施例中，細胞培養基進一步包括IL-21。在較佳實施例中，細胞培養基包括約1 IU/mL IL-21。

【1101】在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞(APC)為PBMC。在一實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中TIL與PBMC及/或抗原呈現細胞之比率為約1比10、約1比15、約1比20、約1比25、約1比30、約1比35、約1比40、約1比45、約1比50、約1比75、約1比100、約1比125、約1比150、約1比175、約1比200、約1比225、約1比250、約1比275、約1比300、約1比325、約1比350、約1比375、約1比400、或約1比500。在一實施例中，在快速擴增及/或第

二擴增中TIL與PBMC之比率介於1比50與1比300之間。在一實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中TIL與PBMC之比率介於1比100與1比200之間。

【1102】在一實施例中，REP及/或快速第二擴增係在培養瓶中進行，其中主體TIL在150 mL培養基中與100或200倍過量之去活化飼養細胞(其中飼養細胞濃度為初始第一擴增中的飼養細胞濃度的至少1.1倍(1.1×)、1.2×、1.3×、1.4×、1.5×、1.6×、1.7×、1.8×、1.8×、2×、2.1×、2.2×、2.3×、2.4×、2.5×、2.6×、2.7×、2.8×、2.9×、3.0×、3.1×、3.2×、3.3×、3.4×、3.5×、3.6×、3.7×、3.8×、3.9×或4.0×)、30 ng/mL OKT3抗CD3抗體及6000 IU/mL IL-2混合。替換培養基(通常經由抽取2/3用過的培養基且用相等體積的新鮮培養基替換來替換2/3培養基)直至細胞轉移至替代生長箱室。替代生長箱室包含G-Rex培養瓶及透氣容器，如下文更充分論述。

【1103】在一些實施例中，快速第二擴增(其可包含稱為REP過程之過程)為7至9天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，第二擴增為7天。在一些實施例中，第二擴增為8天。在一些實施例中，第二擴增為9天。

【1104】在一實施例中，第二擴增(其可包含稱為REP之擴增，以及在圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)之步驟D中提及之彼等者)可在500 mL容量的具有100 cm透氣矽底之透氣培養瓶(G-Rex 100，可購自美國明尼蘇達州新布萊頓的Wilson Wolf Manufacturing Corporation)中進行，5 ×

10^6或10 × 10^6個TIL可與PBMC在400 mL的補充有5%人類AB血清、3000 IU/mL IL-2及30 ng/mL抗CD3(OKT3)之50/50培養基中培養。G-Rex 100培養瓶可在37℃下在5% CO_2中培育。在第5天，可將250 mL上清液移除並放入離心瓶中且以1500 rpm (491 × g)離心10分鐘。可將TIL沈澱物用150 mL的含有5%人類AB血清、6000 IU/mL IL-2之新鮮培養基再懸浮，且添加回原始GREX-100培養瓶中。當TIL在GREX-100培養瓶中連續擴增時，在第10或11天可將TIL移至較大培養瓶，諸如GREX-500。細胞可在培養的第14天收集。細胞可在培養的第15天收集。細胞可在培養的第16天收集。在一些實施例中，替換培養基直至細胞轉移至替代生長箱室。在一些實施例中，藉由抽取用過的培養基且用相等體積的新鮮培養基替換來替換2/3培養基。在一些實施例中，替代生長箱室包含GREX培養瓶及透氣容器，如下文更充分論述。

【1105】在一些實施例中，本文揭示之擴增過程中使用的培養基為無血清培養基或成分確定培養基。在一些實施例中，無血清或成分確定培養基包括基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，無血清或成分確定培養基用於防止及/或減少部分因含血清培養基之批次間變化所致之實驗變化。

【1106】在一些實施例中，無血清或成分確定培養基包括基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，基礎細胞培養基包含但不限於CTS™

OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CTS™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【1107】在一些實施例中，血清補充劑或血清替代物包含但不限於以下中之一者或多者：CTS™ OpTmizer T細胞擴增血清補充劑、CTS™免疫細胞血清替代物、一種或多種白蛋白或白蛋白取代物、一種或多種胺基酸、一種或多種維生素、一種或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一種或多種抗氧化劑、一種或多種胰島素或胰島素取代物、一種或多種膠原蛋白前驅物、一種或多種抗生素及一種或多種微量元素。在一些實施例中，成分確定培養基包括白蛋白及一種或多種選自由以下組成之群組的成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Br、T、Mn^{2+}、P、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}及Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，成分確定培養基

進一步包括L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或2-巰基乙醇。

【1108】在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞免疫細胞血清替代物與習知生長培養基一起使用，該習知生長培養基包含但不限於CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CST™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【1109】在一些實施例中，以無血清或成分確定培養基之總體積計，無血清或成分確定培養基中之總血清替代物濃度(vol%)為約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或成分確定培養基之總體積的約3%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或成分確定培養基之總體積的約5%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或成分確定培養基之總體積的約10%。

【1110】在一些實施例中，無血清或成分確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1L CTS™ OpTmizer™ T細胞

擴增基礎培養基及26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑在使用前混合在一起之組合。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。

【1111】在一些實施例中，成分確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基及26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑在使用前混合在一起之組合。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM的2-巰基乙醇及2 mM的L-麩醯胺酸。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包括約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包括約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補

充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包括約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包括約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包括約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包括約1000 IU/mL至約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包括約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包括約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包括約6000 IU/mL IL-2。

【1112】在一些實施例中，無血清培養基或成分確定培養基補充有濃度為約0.1 mM至約10 mM、0.5 mM至約9

mM、1 mM至約8 mM、2 mM至約7 mM、3 mM至約6 mM或4 mM至約5 mM的麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。在一些實施例中，無血清培養基或成分確定培養基補充有濃度約2 mM之麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。

【1113】在一些實施例中，無血清培養基或成分確定培養基補充有濃度為約5 mM至約150 mM、10 mM至約140 mM、15 mM至約130 mM、20 mM至約120 mM、25 mM至約110 mM、30 mM至約100 mM、35 mM至約95 mM、40 mM至約90 mM、45 mM至約85 mM、50 mM至約80 mM、55 mM至約75 mM、60 mM至約70 mM，或約65 mM的2-巰基乙醇。在一些實施例中，無血清培養基或成分確定培養基補充有濃度約55 mM之2-巰基乙醇。

【1114】在一些實施例中，以引用之方式併入本文中的國際專利公開案第WO 1998/030679號中所描述之成分確定培養基可用於本發明。在該公開案中，描述無血清真核細胞培養基。無血清真核細胞培養基包含補充有能夠支持細胞在無血清培養中生長之無血清補充劑的基礎細胞培養基。無血清真核細胞培養基補充劑包括一種或多種選自由以下組成之群組的成分，或藉由組合一種或多種選自由以下組成之群組的成分而獲得：一種或多種白蛋白或白蛋白取代物、一種或多種胺基酸、一種或多種維生素、一種或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一種或多種抗氧化劑、一種或多種胰島素或胰島素取代物、一種或多種膠原蛋白前驅物、一種或多種微量元素及一種或多種抗生素。在一

些實施例中，成分確定培養基進一步包括L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或β-巰基乙醇。在一些實施例中，成分確定培養基包括白蛋白或白蛋白取代物及一種或多種選自由以下組成之群組的成分：一種或多種胺基酸、一種或多種維生素、一種或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一種或多種抗氧化劑、一種或多種胰島素或胰島素取代物、一種或多種膠原蛋白前驅物及一種或多種微量元素。在一些實施例中，成分確定培養基包括白蛋白及一種或多種選自由以下組成之群組的成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Br、T、Mn^{2+}、P、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}及Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，基礎細胞培養基選自由以下組成之群組：達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【1115】在一些實施例中，成分確定培養基中甘胺酸之濃度在約5至200 mg/L之範圍內，L-組胺酸之濃度為約5至250 mg/L，L-異白胺酸之濃度為約5至300 mg/L，L-甲硫

胺酸之濃度為約5至200 mg/L，L-苯丙胺酸之濃度為約5至400 mg/L，L-脯胺酸之濃度為約1至1000 mg/L，L-羥基脯胺酸之濃度為約1至45 mg/L，L-絲胺酸之濃度為約1至250 mg/L，L-蘇胺酸之濃度為約10至500 mg/L，L-色胺酸之濃度為約2至110 mg/L，L-酪胺酸之濃度為約3至175 mg/L，L-纈胺酸之濃度為約5至500 mg/L，硫胺素之濃度為約1至20 mg/L，還原麩胱甘肽之濃度為約1至20 mg/L，L-抗壞血酸-2-磷酸鹽之濃度為約1至200 mg/L，鐵飽和運鐵蛋白之濃度為約1至50 mg/L，胰島素之濃度為約1至100 mg/L，亞硒酸鈉之濃度為約0.000001至0.0001 mg/L，且白蛋白(例如AlbuMAX® I)之濃度為約5000至50,000 mg/L。

【1116】在一些實施例中，成分確定培養基中之非微量元素部分成分係以參見上文表4中標題「1X培養基中之濃度範圍」欄中列出之濃度範圍存在。在其他實施例中，成分確定培養基中之非微量元素部分成分係以參見上文表4中標題「1X培養基之較佳實施例」欄中列出之最終濃度存在。在其他實施例中，成分確定培養基為包括無血清補充劑之基礎細胞培養基。在一些此等實施例中，無血清補充劑包括參見上文表4中的類型及標題「補充劑之較佳實施例」欄中列出之濃度的非微量部分成分。

【1117】在一些實施例中，成分確定培養基之滲透壓介於約260與350 mOsmol之間。在一些實施例中，滲透壓介於約280與310 mOsmol之間。在一些實施例中，成分確定培養基補充有至多約3.7 g/L或約2.2 g/L碳酸氫鈉。成分

確定培養基可進一步補充有L-麩醯胺酸(最終濃度為約2 mM)、一種或多種抗生素、非必需胺基酸(NEAA；最終濃度為約100 μM)、2-巰基乙醇(最終濃度為約100 μM)。

【1118】在一些實施例中，Smith等人，《使用新穎無Xeno CTS免疫細胞血清替代物離體擴增人類T細胞以用於過繼免疫療法》，《臨床轉化免疫學》，4(1) 2015 (數位物件識別碼：10.1038/cti.2014.31)中所描述之成分確定培養基可用於本發明。簡言之，RPMI或CTS™ OpTmizer™用作基礎細胞培養基且補充有0、2%、5%或10% CTS™免疫細胞血清替代物。

【1119】在一實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基為未經過濾的。使用未經過濾之細胞培養基可簡化擴增細胞數目所需之程序。在一實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基缺乏β-巰基乙醇(BME或βME；亦稱為2-巰基乙醇，CAS 60-24-2)。

【1120】在一實施例中，進行快速第二擴增(包含稱為REP之擴增)，且其進一步包括其中選擇具有優異腫瘤反應性之TIL之步驟。可使用本領域中已知之任何選擇方法。舉例而言，美國專利申請公開案第2016/0010058 A1號(其揭示內容以引用之方式併入本文中)中所描述之方法可用於選擇具有優異腫瘤反應性之TIL。

【1121】視情況，可在快速第二擴增(包含稱為REP擴增之擴增)之後使用本領域中已知之標準分析來進行細胞存活性分析。舉例而言，可在主體TIL樣本上進行台盼藍

排除測定，其選擇性標記死細胞且允許存活性評估。在一些實施例中，TIL樣本可使用Cellometer K2自動化細胞計數器(馬薩諸塞州勞倫斯市的Nexcelom Bioscience)計算及判定存活性。在一些實施例中，存活性係根據標準Cellometer K2 Image Cytometer自動化細胞計數器方案判定。

【1122】T及B淋巴球之多樣抗原受體係藉由有限但大量的基因區段之體細胞重組產生。此等基因區段：V(可變區)、D(多樣區)、J(聯結區)及C(恆定區)決定免疫球蛋白及T細胞受體(TCR)之結合特異性及下游應用。本發明提供一種用於產生展現且增加T細胞組庫多樣性之TIL的方法。在一些實施例中，藉由本發明方法獲得之TIL展現T細胞組庫多樣性的增加。在一些實施例中，在第二擴增中獲得之TIL展現T細胞組庫多樣性的增加。在一些實施例中，多樣性增加係免疫球蛋白多樣性及/或T細胞受體多樣性的增加。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白重鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白輕鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於T細胞受體中。在一些實施例中，多樣性存在於選自由α、β、γ及δ受體組成之群組的T細胞受體中之一者中。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α及/或β之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)β之表現增加。在一些實施例中，TCRab(亦即，TCRα/β)之表現增加。

【1123】在一些實施例中，快速第二擴增培養基(例如有時稱為CM2或第二細胞培養基)包括IL-2、OKT-3以及抗原呈現飼養細胞(APC)，如下文更詳細論述。在一些實施例中，快速第二擴增培養基(例如有時稱為CM2或第二細胞培養基)包括6000 IU/mL IL-2、30 μg/培養瓶OKT-3以及7.5 × 10^8個抗原呈現飼養細胞(APC)，如下文更詳細論述。在一些實施例中，快速第二擴增培養基(例如有時稱為CM2或第二細胞培養基)包括IL-2、OKT-3以及抗原呈現飼養細胞(APC)，如下文更詳細論述。在一些實施例中，快速第二擴增培養基(例如有時稱為CM2或第二細胞培養基)包括6000 IU/mL IL-2、30 μg/培養瓶OKT-3以及5 × 10^8個抗原呈現飼養細胞(APC)，如下文更詳細論述。

【1124】在一些實施例中，快速第二擴增(例如根據圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟D)係在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用生物反應器。在一些實施例中，採用生物反應器作為容器。在一些實施例中，所採用的生物反應器為例如G-Rex-100或G-Rex-500。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-Rex-100。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-Rex-500。

1. 飼養細胞及抗原呈現細胞

【1125】在一實施例中，本文所描述之快速第二擴增

程序(例如包含如下擴增：諸如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟D中所描述之彼等擴增以及稱為REP之彼等擴增)在REP TIL擴增期間及/或在快速第二擴增期間需要過量的飼養細胞。在許多實施例中，飼養細胞係獲自健康血液供體之標準全血單位的末梢血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。

【1126】一般而言，同種異體PBMC經由輻照或熱處理去活化，且如實例中所描述用於REP程序，其提供用於評估經輻照同種異體PBMC之複製非勝任之例示性方案。

【1127】在一些實施例中，若第7或14天活細胞總數小於在REP第0天及/或第二擴增第0天(亦即第二擴增之起始日)放入培養的初始活細胞數目，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。

【1128】在一些實施例中，若第7天及第14天在OKT3及IL-2存在下培養的活細胞總數與在REP第0天及/或第二擴增第0天(亦即第二擴增之起始日)放入培養的初始活細胞數目相比並未增加，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。在一些實施例中，PBMC係在30 ng/mL OKT3抗體及3000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC係在60 ng/mL OKT3抗體及6000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC係在60 ng/mL OKT3抗體及3000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC係在30 ng/mL OKT3抗體及6000

IU/mL IL-2存在下培養。

【1129】在一些實施例中，若第7天及第14天在OKT3及IL-2存在下培養的活細胞總數與在REP第0天及/或第二擴增第0天(亦即第二擴增之起始日)放入培養的初始活細胞數目相比並未增加，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。在一些實施例中，PBMC係在30至60 ng/mL OKT3抗體及1000至6000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC係在30至60 ng/mL OKT3抗體及2000至5000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC係在30至60 ng/mL OKT3抗體及2000至4000 IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC係在30至60 ng/mL OKT3抗體及2500至3500 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC係在30至60 ng/mL OKT3抗體及6000 IU/mL IL-2存在下培養。

【1130】在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為PBMC。在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為人工抗原呈現飼養細胞。在一實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率為約1比10、約1比25、約1比50、約1比100、約1比125、約1比150、約1比175、約1比200、約1比225、約1比250、約1比275、約1比300、約1比325、約1比350、約1比375、約1比400或約1比500。在一實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比50與1比300之間。在一實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比100與1比200之間。

【1131】在一實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約5 × 10^8個飼養細胞與約100 × 10^6個TIL之比率。在一實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約7.5 × 10^8個飼養細胞與約100 × 10^6個TIL之比率。在另一實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約5 × 10^8個飼養細胞與約50 × 10^6個TIL之比率。在另一實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約7.5 × 10^8個飼養細胞與約50 × 10^6個TIL之比率。在又一實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約5 × 10^8個飼養細胞與約25 × 10^6個TIL。在又一實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約7.5 × 10^8個飼養細胞與約25 × 10^6個TIL。在又一實施例中，快速第二擴增需要快速第二擴增的兩倍數目的飼養細胞。在又一實施例中，當本文所描述之初始第一擴增需要約2.5 × 10^8個飼養細胞時，快速第二擴增需要約5 × 10^8個飼養細胞。在又一實施例中，當本文所描述之初始第一擴增需要約2.5 × 10^8個飼養細胞時，快速第二擴增需要約7.5 × 10^8個飼養細胞。在又一實施例中，快速第二擴增需要初始第一擴增的兩倍(2.0×)、2.5×、3.0×、3.5×或4.0×數目的飼養細胞。

【1132】在一實施例中，本文所描述之快速第二擴增程序在快速第二擴增期間需要過量的飼養細胞。在許多實施例中，飼養細胞係獲自同種異體健康血液供體之標準全血單位的末梢血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。在一實施例中，使用人工抗原呈現細胞(aAPC)代替PBMC。在一些實施例

中，PBMC以添加至初始第一擴增之PBMC濃度的兩倍添加至快速第二擴增。

【1133】一般而言，同種異體PBMC經由輻照或熱處理去活化，且用於本文所描述之TIL擴增程序，包含圖式及實例中所描述之例示性程序。

【1134】在一實施例中，在快速第二擴增中使用人工抗原呈現細胞來替代PBMC或與PBMC組合使用。

【1135】在一實施例中，Gen 3過程之快速第二擴增中所用之抗原呈現細胞為單核球細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為B細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為B細胞類淋巴母細胞或B類淋巴母細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為伯基特氏淋巴瘤細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為骨髓譜系細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為單核球。在一實施例中，抗原呈現細胞為HLA-A-02陽性單核球。在一實施例中，抗原呈現細胞為急性單核球性白血病細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為M5亞型急性單核球性白血病細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為Raji細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，抗原呈現細胞為Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，抗原呈現細胞為Ramos細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，抗原呈現細胞為U937細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，抗原呈現細胞為Daudi細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，抗原呈現細胞為黑色素細胞。在

一實施例中，抗原呈現細胞為HLA-A-02陽性黑色素細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為黑色素瘤細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞為HLA-A-02陽性黑色素瘤細胞。在一實施例中，抗原呈現細胞係選自由以下組成之群組：Sk-MEL-5、Malme-3M、SK-MEL-28、SK-MEL-3、SH-4、SK-MEL-24、RPMI-7951、SK-MEL-1、A375、G-361及其組合，或其衍生物、變體、修飾或後代。在任何前述實施例中，抗原呈現細胞可如本文中別處所描述經輻照或未經輻照。

【1136】在一實施例中，aAPC用於Gen 3過程之快速第二擴展。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之單核球細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之B細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之B細胞類淋巴母細胞或B類淋巴母細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之伯基特氏淋巴瘤細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之骨髓譜系細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之單核球。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之HLA-A-02陽性單核球細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之急性單核球性白血病細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之M5亞型急性單核球性白血病細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之Raji細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之Ramos細胞或其衍生物、變體、修飾

或後代。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之U937細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之Daudi細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之黑色素細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之HLA-A-02陽性黑色素細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之黑色素瘤細胞。在一實施例中，aAPC係經基因修飾之HLA-A-02陽性黑色素瘤細胞。在一實施例中，aAPC係選自由以下組成之群組的經基因修飾之抗原呈現細胞：Sk-MEL-5、Malme-3M、SK-MEL-28、SK-MEL-3、SH-4、SK-MEL-24、RPMI-7951、SK-MEL-1、A375、G-361及其組合，或其衍生物、變體、修飾或後代。在一實施例中，經基因修飾之細胞經修飾以表現CD86、OX40L、4-1BBL、OX-40促效抗體、4-1BB促效抗體、能夠結合OKT-3之Fc鏈之抗體及/或ICOS-L，如美國專利第10,415,015號中所描述，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在任何前述實施例中，經基因修飾之aAPC可如本文中別處所描述經輻照或未經輻照。

2. 細胞介素

【1137】本文所描述之快速第二擴增方法通常使用具有高劑量細胞介素(特別是IL-2)之培養基，如本領域中所已知。

【1138】替代地，使用細胞介素之組合用於TIL之快

速第二擴增係另外可能的，其中IL-2、IL-15及IL-21中之兩者或更多者之組合如WO 2015/189356及WO 2015/189357中大體上所概述，該等文獻在此明確地以全文引用之方式併入。因此，可能組合包含IL-2及IL-15、IL-2及IL-21、IL-15及IL-21以及IL-2、IL-15及IL-21，其中後者在許多實施例中具有特定用途。使用細胞介素之組合特別有利於產生淋巴球，特別是如其中所描述的T細胞。

D. 步驟E：收集TIL

【1139】在快速第二擴增步驟之後，可收集細胞。在一些實施例中，在例如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所提供之一個、兩個、三個、四個或更多個擴增步驟之後收集TIL。在一些實施例中，在例如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所提供之兩個擴增步驟之後收集TIL。在一些實施例中，在例如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所提供之兩個擴增步驟(一個初始第一擴增及一個快速第二擴增)之後收集TIL。

【1140】TIL可以任何適當且無菌之方式收集，包含例如離心。收集TIL之方法為本領域中熟知的且任何此類已知方法均可與本發明過程一起使用。在一些實施例中，使用自動化系統收集TIL。

【1141】細胞收集器及/或細胞處理系統可購自各種來源，包含例如費森尤斯卡比(Fresenius Kabi)、Tomtec

Life Science、珀金埃爾默(Perkin Elmer)及Inotech Biosystems International, Inc.。本發明方法可採用任何基於細胞之收集器。在一些實施例中，細胞收集器及/或細胞處理系統為基於膜之細胞收集器。在一些實施例中，細胞收集係經由細胞處理系統，諸如LOVO系統(由費森尤斯卡比製造)進行。術語「LOVO細胞處理系統」亦係指由任何供應商製造之任何可在無菌及/或密閉系統環境中將包括細胞之溶液泵送通過膜或過濾器(諸如旋轉膜或旋轉過濾器)的儀器或裝置，從而允許連續流動及細胞處理以移除上清液或細胞培養基而不發生團塊化。在一些實施例中，細胞收集器及/或細胞處理系統可在密閉無菌系統中進行細胞分離、洗滌、流體交換、濃縮及/或其他細胞處理步驟。

【1142】在一些實施例中，快速第二擴增(例如根據圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)之步驟D)係在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用生物反應器。在一些實施例中，採用生物反應器作為容器。在一些實施例中，所採用的生物反應器為例如G-Rex-100或G-Rex-500。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-Rex-100。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-Rex-500。

【1143】在一些實施例中，根據圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟E係根據本文所描

述之過程進行。在一些實施例中，密閉系統係在無菌條件下經由注射器進入以維持系統之無菌性及密閉性質。在一些實施例中，採用如本文所描述之密閉系統。

【1144】在一些實施例中，根據本文所描述之方法收集TIL。在一些實施例中，使用如本文所描述之方法收集第14與16天之間的TIL。在一些實施例中，使用如本文所描述之方法在第14天收集TIL。在一些實施例中，使用如本文所描述之方法在第15天收集TIL。在一些實施例中，使用如本文所描述之方法在第16天收集TIL。

E. 步驟F：經擴增TIL之測定

【1145】在一些實施例中，使用本文所描述之測定方法中之一者檢查來自上文提供之步驟的經擴增TIL的效力及/或功能性。

【1146】在一實施例中，本發明包含一種確定如本文所描述之Gen 3 TIL產物之效力的方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與Gen 3 TIL產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在Gen 3 TIL產物上的表現或(2)自Gen 3 TIL產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值，從而確定Gen 3 TIL產物的效力。

【1147】或者，在一些實施例中，使用組合測定分析經擴增TIL，該組合測定包括基於CD3或CD3/CD28珠粒的刺激以及對至少兩種分析物的ELISA或自動ELISA(例如，ELLA)偵測，該至少兩種分析物選自由IFN-γ、顆粒酶B、穿孔素及TNF-α組成之群組。在一實施例中，此類組合測定的產物釋放規格為：對於至少兩種所選擇的分析物係至少500 pg/mL；對於至少兩種所選擇的分析物係至少600 pg/mL；對於至少兩種所選擇的分析物係至少700 pg/mL；對於至少兩種所選擇的分析物係至少800 pg/mL；對於至少兩種所選擇的分析物係至少900 pg/mL；對於至少兩種所選擇的分析物係至少1000 pg/mL；對於至少兩種所選擇的分析物係至少1100 pg/mL；或對於至少兩種所選擇的分析物係至少1200 pg/mL；其中每毫升測試物含有1×10^5個TIL、2×10^5個TIL、3×10^5個TIL、4×10^5個TIL、5×10^5個TIL、6×10^5個TIL、7×10^5個TIL、8×10^5個TIL、9×10^5個TIL或10×10^5個TIL。

F. 步驟G：最終調配及轉移至輸注容器

【1148】在如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中以例示性次序提供且如上文及本文中所概述之步驟A至E完成之後，將細胞轉移至容器(諸如輸注袋或無菌小瓶)以用於向患者投予。在一些實施例中，一旦使用上文所描述之擴增方法獲得治療充足數目之TIL，則將其轉移至可包含輸注袋或無菌小瓶之容器中以用於以醫

藥組合物(包含本文所描述之醫藥組合物)的形式向患者投予。可在轉移至此容器之後評估TIL的效力，其可緊接在轉移之後或在容器已儲存一段時間之後進行，諸如用於穩定性測試。

【1149】在一實施例中，使用本發明之方法擴增之TIL係以醫藥組合物之形式向患者投與。在一實施例中，醫藥組合物為TIL於無菌緩衝液中之懸浮液。如本文所揭示擴增之TIL可藉由如本領域中已知之任何合適途徑投予。在一些實施例中，TIL係以單一動脈內或靜脈內輸注之形式投予，其較佳持續大約30至60分鐘。其他適合之投予途徑包含腹膜內、鞘內及淋巴管內投予。

II. 其他Gen 2、Gen 3及其他TIL製造過程實施例

A. PBMC飼養細胞比

【1150】在一些實施例中，用於本文所描述之擴增方法(參見例如圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C))的培養基包含抗CD3抗體，例如OKT-3。抗CD3抗體與IL-2之組合在TIL群體中誘導T細胞活化及細胞分裂。此效應可見於全長抗體以及Fab及F(ab')2片段，前者通常較佳；參見例如Tsoukas等人，《免疫學雜誌》**1985,** *135*, 1719，其以全文引用之方式併入本文中。

【1151】在一實施例中，PBMC飼養細胞層之數目如下計算：

A. T細胞體積(直徑10 μm)： $V = (4/3)\pi r^3 = 523.6\ \mu m^3$

B. 具有40 μm(4個細胞)高度之G-Rex 100(M)容積：$V = (4/3)\ \pi r^3 = 4\times10^{12}\ \mu m^3$

C. 填滿容積B所需的細胞數目：$4\times10^{12}\ \mu m^3/523.6\ \mu m^3 = 7.6\times10^8\ \mu m^3 * 0.64 = 4.86\times10^8$

D. 可在4D空間中被最佳活化的細胞數目：$4.86\times10^8/24 = 20.25\times10^6$

E. 外推至G-Rex 500之飼養細胞及TIL的數目：TIL：100×10^6及飼養細胞：2.5×10^9

【1152】在此計算中，使用在具有100 cm^2基底的圓柱體中提供TIL活化之二十面體幾何學所需的單核細胞近似數目。計算導出的T細胞臨界值活化之實驗結果為約5×10^8，其與NCI實驗資料密切相關，如Jin等人，《免疫療法雜誌》**2012,** *35,* 283-292中所描述。在(C)中，乘數(0.64)係等效球體的隨機堆積密度，由Jaeger及Nagel，《科學》, **1992**, *255*, 1523-3計算得出。在(D)中，除數24係4維空間中可接觸類似物體的等效球體的數目或「牛頓數(Newton number)」，如Musin, 《俄羅斯數學調查(*Russ.Math.Surv.***2003**, *58*, 794-795中所描述。

【1153】在一實施例中，在初始第一擴增期間外源供應的抗原呈現飼養細胞的數目大約為在快速第二擴增期間外源供應的抗原呈現飼養細胞的數目的一半。在某些實施例中，方法包括在相較於快速第二擴增之細胞培養基包括大約50%較少抗原呈現細胞的細胞培養基中進行初始第一擴增。

【1154】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的抗原呈現飼養細胞(APC)的數目大於在初始第一擴增期間外源供應的APC的數目。

【1155】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約20:1的範圍。

【1156】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約10:1的範圍。

【1157】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約9:1的範圍。

【1158】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約8:1的範圍。

【1159】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約7:1的範圍。

【1160】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源

供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約6:1的範圍。

【1161】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約5:1的範圍。

【1162】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約4:1的範圍。

【1163】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約3:1的範圍。

【1164】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.9:1的範圍。

【1165】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.8:1的範圍。

【1166】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源

供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.7:1的範圍。

【1167】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.6:1的範圍。

【1168】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.5:1的範圍。

【1169】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.4:1的範圍。

【1170】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.3:1的範圍。

【1171】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.2:1的範圍。

【1172】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源

供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.1:1的範圍。

【1173】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2:1的範圍。

【1174】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約10:1的範圍。

【1175】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約5:1的範圍。

【1176】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約4:1的範圍。

【1177】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約3:1的範圍。

【1178】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.9:1的範圍。

【1179】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源

供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.8:1的範圍。

【1180】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.7:1的範圍。

【1181】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.6:1的範圍。

【1182】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.5:1的範圍。

【1183】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.4:1的範圍。

【1184】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.3:1的範圍。

【1185】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源

供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.2:1的範圍。

【1186】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.1:1的範圍。

【1187】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係剛好或大約2:1。

【1188】在另一實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係剛好或大約1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2:1、2.1:1、2.2:1、2.3:1、2.4:1、2.5:1、2.6:1、2.7:1、2.8:1、2.9:1、3:1、3.1:1、3.2:1、3.3:1、3.4:1、3.5:1、3.6:1、3.7:1、3.8:1、3.9:1、4:1、4.1:1、4.2:1、4.3:1、4.4:1、4.5:1、4.6:1、4.7:1、4.8:1、4.9:1或5:1。

【1189】在另一實施例中，在初始第一擴增期間外源供應的APC數目係剛好或大約1×10^8、1.1×10^8、1.2×10^8、1.3×10^8、1.4×10^8、1.5×10^8、1.6×10^8、1.7×10^8、1.8×10^8、1.9×10^8、2×10^8、2.1×10^8、2.2×10^8、2.3×10^8、2.4×10^8、2.5×10^8、2.6×10^8、2.7×10^8、2.8×10^8、2.9×10^8、3×10^8、3.1×10^8、3.2×10^8、3.3×10^8、3.4×10^8或

3.5×10^8個APC，且在快速第二擴增期間外源供應的APC數目係剛好或大約3.5×10^8、3.6×10^8、3.7×10^8、3.8×10^8、3.9×10^8、4×10^8、4.1×10^8、4.2×10^8、4.3×10^8、4.4×10^8、4.5×10^8、4.6×10^8、4.7×10^8、4.8×10^8、4.9×10^8、5×10^8、5.1×10^8、5.2×10^8、5.3×10^8、5.4×10^8、5.5×10^8、5.6×10^8、5.7×10^8、5.8×10^8、5.9×10^8、6×10^8、6.1×10^8、6.2×10^8、6.3×10^8、6.4×10^8、6.5×10^8、6.6×10^8、6.7×10^8、6.8×10^8、6.9×10^8、7×10^8、7.1×10^8、7.2×10^8、7.3×10^8、7.4×10^8、7.5×10^8、7.6×10^8、7.7×10^8、7.8×10^8、7.9×10^8、8×10^8、8.1×10^8、8.2×10^8、8.3×10^8、8.4×10^8、8.5×10^8、8.6×10^8、8.7×10^8、8.8×10^8、8.9×10^8、9×10^8、9.1×10^8、9.2×10^8、9.3×10^8、9.4×10^8、9.5×10^8、9.6×10^8、9.7×10^8、9.8×10^8、9.9×10^8或1×10^9個APC。

【1190】在另一實施例中，在初始第一擴增期間外源供應的APC數目係選自剛好或大約1.5×10^8個APC至剛好或大約3×10^8個APC的範圍，且在快速第二擴增期間外源供應的APC數目係選自剛好或大約4×10^8個APC至剛好或大約7.5×10^8個APC的範圍。

【1191】在另一實施例中，在初始第一擴增期間外源供應的APC數目係選自剛好或大約2×10^8個APC至剛好或大約2.5×10^8個APC的範圍，且在快速第二擴增期間外源供應的APC數目係選自剛好或大約4.5×10^8個APC至剛好或大約5.5×10^8個APC的範圍。

【1192】在另一實施例中，在初始第一擴增期間外源供應的APC數目係剛好或大約2.5×10^8個APC，且在快速第二擴增期間外源供應的APC數目係剛好或大約5×10^8個APC。

【1193】在一實施例中，在初始第一擴增第0天添加的APC(包含例如PBMC)的數目係在初始第一擴增第7天(例如方法之第7天)添加的PBMC數目的大約一半。在某些實施例中，方法包括在初始第一擴增第0天添加抗原呈現細胞至第一TIL群體且在第7天添加抗原呈現細胞至第二TIL群體，其中在第0天添加之抗原呈現細胞的數目係在初始第一擴增第7天(例如方法之第7天)添加之抗原呈現細胞數目的大約50%。

【1194】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)的數目大於在初始第一擴增第0天外源供應的PBMC的數目。

【1195】在另一實施例中，在初始第一擴增中外源供應的APC係以選自剛好或大約1.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約4.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【1196】在另一實施例中，在初始第一擴增中外源供應的APC係以選自剛好或大約1.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【1197】在另一實施例中，在初始第一擴增中外源供應的APC係以選自剛好或大約2×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【1198】在另一實施例中，在初始第一擴增中外源供應的APC係以剛好或大約2×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中。

【1199】在另一實施例中，在初始第一擴增中外源供應的APC係以剛好或大約1.0×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6或4.5×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中。

【1200】在另一實施例中，在快速第二擴增中外源供應的APC係以選自剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約7.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【1201】在另一實施例中，在快速第二擴增中外源供應的APC係以選自剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約6.0×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【1202】在另一實施例中，在快速第二擴增中外源供應的APC係以選自剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約5.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【1203】在另一實施例中，在快速第二擴增中外源供應的APC係以選自剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【1204】在另一實施例中，在快速第二擴增中外源供應的APC係以剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2、2.6×10^6個APC/cm^2、2.7×10^6個APC/cm^2、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.1×10^6、6.2×10^6、6.3×10^6、6.4×10^6、6.5×10^6、6.6×10^6、6.7×10^6、6.8×10^6、6.9×10^6、7×10^6、7.1×10^6、7.2×10^6、7.3×10^6、7.4×10^6或7.5×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中。

【1205】在另一實施例中，在初始第一擴增中外源供應的APC係以剛好或大約1.0×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6或4.5×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中，且在快速第二擴增中外源供應的APC係以剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2、2.6×10^6個APC/cm^2、2.7×10^6個APC/cm^2、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、

3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.1×10^6、6.2×10^6、6.3×10^6、6.4×10^6、6.5×10^6、6.6×10^6、6.7×10^6、6.8×10^6、6.9×10^6、7×10^6、7.1×10^6、7.2×10^6、7.3×10^6、7.4×10^6或7.5×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中。

【1206】在另一實施例中，在初始第一擴增中外源供應的APC係以選自剛好或大約1.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約4.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中，且在快速第二擴增中外源供應的APC係以選自剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約7.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【1207】在另一實施例中，在初始第一擴增中外源供應的APC係以選自剛好或大約1.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中，且在快速第二擴增中外源供應的APC係以選自剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約6×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【1208】在其他實施例中，在初始第一擴增中外源供應的APC係以選自剛好或大約2×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中，且在快速第二擴增中外源供應的APC係以選自剛好或大約4×10^6

個APC/cm^{2}至剛好或大約5.5×10^{6}個APC/cm^{2}的範圍之密度接種於培養瓶中。

【1209】在另一實施例中，在初始第一擴增中外源供應的APC係以剛好或大約2×10^{6}個APC/cm^{2}之密度接種於培養瓶中，且在快速第二擴增中外源供應的APC係以剛好或大約4×10^{6}個APC/cm^{2}之密度接種於培養瓶中。

【1210】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的PBMC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約20:1的範圍。

【1211】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的PBMC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約10:1的範圍。

【1212】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的PBMC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約9:1的範圍。

【1213】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約8:1的範圍。

【1214】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0

天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約7:1的範圍。

【1215】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約6:1的範圍。

【1216】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約5:1的範圍。

【1217】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約4:1的範圍。

【1218】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約3:1的範圍。

【1219】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.9:1的範圍。

【1220】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0

天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.8:1的範圍。

【1221】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.7:1的範圍。

【1222】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.6:1的範圍。

【1223】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.5:1的範圍。

【1224】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.4:1的範圍。

【1225】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.3:1的範圍。

【1226】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0

天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.2:1的範圍。

【1227】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.1:1的範圍。

【1228】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2:1的範圍。

【1229】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約10:1的範圍。

【1230】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約5:1的範圍。

【1231】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約4:1的範圍。

【1232】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0

天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約3:1的範圍。

【1233】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.9:1的範圍。

【1234】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.8:1的範圍。

【1235】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.7:1的範圍。

【1236】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.6:1的範圍。

【1237】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.5:1的範圍。

【1238】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0

天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.4:1的範圍。

【1239】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.3:1的範圍。

【1240】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.2:1的範圍。

【1241】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.1:1的範圍。

【1242】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係剛好或大約2:1。

【1243】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目之比率係剛好或大約1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2:1、2.1:1、2.2:1、2.3:1、2.4:1、2.5:1、2.6:1、2.7:1、2.8:1、2.9:1、3:1、3.1:1、3.2:1、3.3:1、

3.4:1、3.5:1、3.6:1、3.7:1、3.8:1、3.9:1、4:1、4.1:1、4.2:1、4.3:1、4.4:1、4.5:1、4.6:1、4.7:1、4.8:1、4.9:1或5:1。

【1244】在另一實施例中，在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目係剛好或大約1×10^8、1.1×10^8、1.2×10^8、1.3×10^8、1.4×10^8、1.5×10^8、1.6×10^8、1.7×10^8、1.8×10^8、1.9×10^8、2×10^8、2.1×10^8、2.2×10^8、2.3×10^8、2.4×10^8、2.5×10^8、2.6×10^8、2.7×10^8、2.8×10^8、2.9×10^8、3×10^8、3.1×10^8、3.2×10^8、3.3×10^8、3.4×10^8或3.5×10^8個APC(包含例如PBMC)，且在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目係剛好或大約3.5×10^8、3.6×10^8、3.7×10^8、3.8×10^8、3.9×10^8、4×10^8、4.1×10^8、4.2×10^8、4.3×10^8、4.4×10^8、4.5×10^8、4.6×10^8、4.7×10^8、4.8×10^8、4.9×10^8、5×10^8、5.1×10^8、5.2×10^8、5.3×10^8、5.4×10^8、5.5×10^8、5.6×10^8、5.7×10^8、5.8×10^8、5.9×10^8、6×10^8、6.1×10^8、6.2×10^8、6.3×10^8、6.4×10^8、6.5×10^8、6.6×10^8、6.7×10^8、6.8×10^8、6.9×10^8、7×10^8、7.1×10^8、7.2×10^8、7.3×10^8、7.4×10^8、7.5×10^8、7.6×10^8、7.7×10^8、7.8×10^8、7.9×10^8、8×10^8、8.1×10^8、8.2×10^8、8.3×10^8、8.4×10^8、8.5×10^8、8.6×10^8、8.7×10^8、8.8×10^8、8.9×10^8、9×10^8、9.1×10^8、9.2×10^8、9.3×10^8、9.4×10^8、9.5×10^8、9.6×10^8、9.7×10^8、9.8×10^8、9.9×10^8或1×10^9個APC(包含例如PBMC)。

【1245】在另一實施例中，在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目係選自剛好或大約1×10^8個APC(包含例如PBMC)至剛好或大約3.5×10^8個APC(包含例如PBMC)的範圍，且在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目係選自剛好或大約3.5×10^8個APC(包含例如PBMC)至剛好或大約1×10^9個APC(包含例如PBMC)的範圍。

【1246】在另一實施例中，在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目係選自剛好或大約1.5×10^8個APC至剛好或大約3×10^8個APC(包含例如PBMC)的範圍，且在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目係選自剛好或大約4×10^8個APC(包含例如PBMC)至剛好或大約7.5×10^8個APC(包含例如PBMC)的範圍。

【1247】在另一實施例中，在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目係選自剛好或大約2×10^8個APC(包含例如PBMC)至剛好或大約2.5×10^8個APC(包含例如PBMC)的範圍，且在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目係選自剛好或大約4.5×10^8個APC(包含例如PBMC)至剛好或大約5.5×10^8個APC(包含例如PBMC)的範圍。

【1248】在另一實施例中，在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)數目係剛好或大約2.5×10^8個APC(包含例如PBMC)，且在快速第二擴增第7天外源供

應的APC(包含例如PBMC)數目係剛好或大約5×10^8個APC(包含例如PBMC)。

【1249】在一實施例中，在初始第一擴增第0天添加的APC(包含例如PBMC)層數係在快速第二擴增第7天添加的APC(包含例如PBMC)層數的大約一半。在某些實施例中，方法包括在初始第一擴增第0天添加抗原呈現細胞層至第一TIL群體且在第7天添加抗原呈現細胞層至第二TIL群體，其中在第0天添加之抗原呈現細胞層的數目係在第7天添加之抗原呈現細胞層的數目的大約50%。

【1250】在另一實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包含例如PBMC)層數大於在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包含例如PBMC)層數。

【1251】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約2個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約4個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生。

【1252】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約一個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約3個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生。

【1253】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約1.5個細胞層至剛好或大約2.5個細胞

層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約3個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生。

【1254】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約一個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約2個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生。

【1255】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生。

【1256】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約1個細胞層至剛好或大約2個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約3個細胞層至剛好或大約10個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生。

【1257】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約2個細胞層至剛好或大約3個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約4個細胞層至剛好或大約8個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生。

【1258】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約2個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約4個細胞層至剛好或大約8個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生。

【1259】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約1、2或3個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約3、4、5、6、7、8、9或10個細胞層的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生。

【1260】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:10的範圍。

【1261】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在

具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:8的範圍。

【1262】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:7的範圍。

【1263】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:6的範圍。

【1264】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在

具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:5的範圍。

【1265】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:4的範圍。

【1266】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:3的範圍。

【1267】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在

具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:2的範圍。

【1268】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.2至剛好或大約1:8的範圍。

【1269】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.3至剛好或大約1:7的範圍。

【1270】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在

具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.4至剛好或大約1:6的範圍。

【1271】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.5至剛好或大約1:5的範圍。

【1272】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.6至剛好或大約1:4的範圍。

【1273】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在

具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.7至剛好或大約1:3.5的範圍。

【1274】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.8至剛好或大約1:3的範圍。

【1275】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.9至剛好或大約1:2.5的範圍。

【1276】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在

具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係剛好或大約1:2。

【1277】在另一實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包含例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包含例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包含例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包含例如PBMC)層數與第二APC(包含例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.1、1:2.2、1:2.3、1:2.4、1:2.5、1:2.6、1:2.7、1:2.8、1:2.9、1:3、1:3.1、1:3.2、1:3.3、1:3.4、1:3.5、1:3.6、1:3.7、1:3.8、1:3.9、1:4、1:4.1、1:4.2、1:4.3、1:4.4、1:4.5、1:4.6、1:4.7、1:4.8、1:4.9、1:5、1:5.1、1:5.2、1:5.3、1:5.4、1:5.5、1:5.6、1:5.7、1:5.8、1:5.9、1:6、1:6.1、1:6.2、1:6.3、1:6.4、1:6.5、1:6.6、1:6.7、1:6.8、1:6.9、1:7、1:7.1、1:7.2、1:7.3、1:7.4、1:7.5、1:7.6、1:7.7、1:7.8、1:7.9、1:8、1:8.1、1:8.2、1:8.3、1:8.4、1:8.5、1:8.6、1:8.7、1:8.8、1:8.9、1:9、1:9.1、1:9.2、1:9.3、1:9.4、1:9.5、1:9.6、1:9.7、1:9.8、1:9.9或1:10。

【1278】在一些實施例中，初始第一擴增中之APC數目係選自約1.0×10^6個APC/cm^2至約4.5×10^6個APC/cm^2的範圍，且快速第二擴增中之APC數目係選自約2.5×10^6個APC/cm^2至約7.5×10^6個APC/cm^2的範圍。

【1279】在一些實施例中，初始第一擴增中之APC數目係選自約1.5×10^6個APC/cm^2至約3.5×10^6個APC/cm^2的範圍，且快速第二擴增中之APC數目係選自約3.5×10^6個APC/cm^2至約6.0×10^6個APC/cm^2的範圍。

【1280】在一些實施例中，初始第一擴增中之APC數目係選自約2.0×10^6個APC/cm^2至約3.0×10^6個APC/cm^2的範圍，且快速第二擴增中之APC數目係選自約4.0×10^6個APC/cm^2至約5.5×10^6個APC/cm^2的範圍。

B. 視情況選用的細胞培養基組分

1. 抗CD3抗體

【1281】在一些實施例中，用於本文所描述之擴增方法(包含稱為REP的彼等擴增，參見例如圖1及圖8(特別是例如圖8B))的培養基包含抗CD3抗體。抗CD3抗體與IL-2之組合在TIL群體中誘導T細胞活化及細胞分裂。此效應可見於全長抗體以及Fab及F(ab')2片段，前者通常較佳；參見例如Tsoukas等人，《免疫學雜誌》 **1985,** *135*, 1719，特此以全文引用之方式併入。

【1282】如本領域中熟習此項技術者將瞭解，一些合適的抗人類CD3抗體可用於本發明，包含來自各種哺乳動

物之抗人類CD3多株及單株抗體，包含但不限於鼠類、人類、靈長類動物、大鼠及犬科動物抗體。在特定實施例中，使用OKT3抗CD3抗體(可購自新澤西州拉里坦的Ortho-McNeil或加利福尼亞州奧本的美天旎生物技術公司)。

2. 4-1BB(CD137)促效劑

【1283】在一實施例中，初始第一擴增及/或快速第二擴增之細胞培養基包括TNFRSF促效劑。在一實施例中，TNFRSF促效劑為4-1BB(CD137)促效劑。4-1BB促效劑可為本領域中已知之任何4-1BB結合分子。4-1BB結合分子可為能夠與人類或哺乳動物4-1BB結合之單株抗體或融合蛋白。4-1BB促效劑或4-1BB結合分子可包括免疫球蛋白分子之任何同型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、類別(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或子類之免疫球蛋白重鏈。4-1BB促效劑或4-1BB結合分子可具有重鏈及輕鏈。如本文所使用，術語結合分子亦包含抗體(包含全長抗體)；單株抗體(包含全長單株抗體)；多株抗體；多特異性抗體(例如雙特異性抗體)；人類、人源化或嵌合抗體；以及抗體片段，例如Fab片段、F(ab')片段、由Fab表現文庫產生的片段、任何上述者之抗原決定基結合片段，以及與4-1BB結合之抗體之經工程改造形式，例如scFv分子。在一實施例中，4-1BB促效劑為一種完全人類抗體之抗原結合蛋白。在一實施例中，4-1BB促

效劑為一種人源化抗體之抗原結合蛋白。在一些實施例中，用於本發明所揭示之方法及組合物中之4-1BB促效劑包含抗4-1BB抗體、人類抗4-1BB抗體、小鼠抗4-1BB抗體、哺乳動物抗4-1BB抗體、單株抗4-1BB抗體、多株抗4-1BB抗體、嵌合抗4-1BB抗體、抗4-1BB阿德奈汀(adnectin)、抗4-1BB域抗體、單鏈抗4-1BB片段、重鏈抗4-1BB片段、輕鏈抗4-1BB片段、抗4-1BB融合蛋白，及其片段、衍生物、結合物、變體或生物類似物。已知促效性抗4-1BB抗體誘導強烈免疫反應。Lee等人，《公共科學圖書館·綜合(*PLOS One*)》 **2013**, *8*, e69677。在較佳實施例中，4-1BB促效劑為促效性抗4-1BB人源化或完全人類單株抗體(亦即，衍生自單一細胞株之抗體)。在一實施例中，4-1BB促效劑為EU-101(Eutilex Co. Ltd.)、烏圖木單抗或烏瑞魯單抗或其片段、衍生物、結合物、變體或生物類似物。在較佳實施例中，4-1BB促效劑為烏圖木單抗或烏瑞魯單抗或其片段、衍生物、結合物、變體或生物類似物。

【1284】在較佳實施例中，4-1BB促效劑或4-1BB結合分子亦可為融合蛋白。在較佳實施例中，相較於通常具有兩個配體結合域之促效性單株抗體，多聚4-1BB促效劑，諸如三聚或六聚4-1BB促效劑(具有三個或六個配體結合域)可誘導優良受體(4-1BBL)聚類及內部細胞傳訊複合物形成。包括三個TNFRSF結合域及IgG1-Fc且視情況進一步連接兩個或更多個此等融合蛋白之三聚(三價)或六聚(或

六價)或更大融合蛋白描述於例如Gieffers等人，《分子癌症治療學》2013, 12, 2735-47中。

【1285】已知促效性4-1BB抗體及融合蛋白誘導強烈免疫反應。在較佳實施例中，4-1BB促效劑係以足以減少毒性之方式與4-1BB抗原特異性結合的單株抗體或融合蛋白。在一些實施例中，4-1BB促效劑係消除抗體依賴性細胞毒性(ADCC)(例如NK細胞毒性)之促效性4-1BB單株抗體或融合蛋白。在一些實施例中，4-1BB促效劑係消除抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)之促效性4-1BB單株抗體或融合蛋白。在一些實施例中，4-1BB促效劑係消除補體依賴性細胞毒性(CDC)之促效性4-1BB單株抗體或融合蛋白。在一些實施例中，4-1BB促效劑係消除Fc區功能性之促效性4-1BB單株抗體或融合蛋白。

【1286】在一些實施例中，4-1BB促效劑之特徵為以高親和力及促效活性與人類4-1BB(SEQ ID NO: 40)結合。在一實施例中，4-1BB促效劑為與人類4-1BB(SEQ ID NO: 40)結合之結合分子。在一實施例中，4-1BB促效劑為與鼠類4-1BB(SEQ ID NO: 41)結合之結合分子。4-1BB促效劑或結合分子所結合之4-1BB抗原的胺基酸序列概述於表5中。

表5. 4-1BB抗原之胺基酸序列。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)
SEQ ID NO:40 人類4-1BB,腫瘤壞死因子受體超家族成員9 (智人)	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRFPEEEE GGCEL 255
SEQ ID NO:41 鼠類4-1BB,腫瘤壞死因子受體超家族成員9 (小家鼠)	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 60 CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG 180 GHSLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKTT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGGYEL 256

【1287】在一些實施例中，所描述之組合物、過程及方法包含如下4-1BB促效劑，該4-1BB促效劑以約100 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約90 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約80 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約70 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約60 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約50 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約40 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、或以約30 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB。

【1288】在一些實施例中，所描述之組合物、過程及方法包含如下4-1BB促效劑，該4-1BB促效劑以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約8×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約8.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約9×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約9.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、或以約1×10^6 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合。

【1289】在一些實施例中，所描述之組合物、過程及方法包含如下4-1BB促效劑，該4-1BB促效劑以約2 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.1 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.2 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.3 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.4 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.5 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.6 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、或以約2.7 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.8 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.9 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、或以約3 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合。

【1290】在一些實施例中，所描述之組合物、過程及方法包含如下4-1BB促效劑，該4-1BB促效劑以約10 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約9 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約8 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約7 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約6 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約5 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約4 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約3 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、或以約1 nM或更低之

IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合。

【1291】在較佳實施例中，4-1BB促效劑為烏圖木單抗(亦稱為PF-05082566或MOR-7480)或其片段、衍生物、變體或生物類似物。烏圖木單抗可購自輝瑞公司(Pfizer, Inc.)。烏圖木單抗為免疫球蛋白G2-λ抗[*智人*TNFRSF9(腫瘤壞死因子受體(TNFR)超家族成員9，4-1BB，T細胞抗原ILA，CD137)]*智人*(完全人類)單株抗體。烏圖木單抗之胺基酸序列闡述於表6中。烏圖木單抗包括位於Asn59及Asn292之糖基化位點；位於位置22-96(V_H-V_L)、143-199(C_H1-CL)、256-316(C_H2)及362-420(C_H3)之重鏈鏈內雙硫鍵；位於位置22'-87'-(V_H-V_L)及136'--195'-(C_H1-CL)之輕鏈鏈內雙硫鍵；位於IgG2A異型體位置218-218、219-219、222-222及225-225、位於IgG2A/B異型體位置218-130、219-219、222-222及225-225及位於IgG2B異型體位置219-130(2)、222-222及225-225之鏈間重鏈-重鏈雙硫鍵；以及位於IgG2A異型體位置130-213'-(2)、IgG2A/B異型體位置218-213'-及130-213'-及位於IgG2B異型體位置218-213'-(2)之鏈間重鏈-輕鏈雙硫鍵。烏圖木單抗及其變體及片段之製備及性質描述於美國專利第8,821,867、8,337,850及9,468,678號及國際專利申請公開案第WO 2012/032433 A1號中，其中每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。烏圖木單抗之臨床前特徵描述於Fisher等人，《癌症免疫學及免疫治療(*Cancer Immunolog. & Immunother.*)》**2012,** *61,* 1721-33中。目前烏

圖木單抗在多種血液及實體腫瘤適應症之臨床試驗包含美國國家衛生研究院(U.S. National Institutes of Health) clinicaltrials.gov識別號NCT02444793、NCT01307267、NCT02315066及NCT02554812。

【1292】在一實施例中，4-1BB促效劑包括SEQ ID NO:42所載之重鏈及SEQ ID NO:43所載之輕鏈。在一實施例中，4-1BB促效劑包括分別具有SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:43中所示之序列之重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:43中所示之序列至少99%一致之重鏈及輕鏈。在一實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:43中所示之序列至少98%一致之重鏈及輕鏈。在一實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:43中所示之序列至少97%一致之重鏈及輕鏈。在一實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:43中所示之序列至少96%一致之重鏈及輕鏈。在一實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:43中所示之序列至少95%一致之重鏈及輕鏈。

【1293】在一實施例中，4-1BB促效劑包括烏圖木單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，4-1BB促效劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:44中所示之序列，且4-1BB促效劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:45中

所示之序列，及其保守胺基酸取代。在一實施例中，4-1BB促效劑包括V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45中所示之序列至少99%一致。在一實施例中，4-1BB促效劑包括V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45中所示之序列至少98%一致。在一實施例中，4-1BB促效劑包括V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45中所示之序列至少97%一致。在一實施例中，4-1BB促效劑包括V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45中所示之序列至少96%一致。在一實施例中，4-1BB促效劑包括V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45中所示之序列至少95%一致。在一實施例中，4-1BB促效劑包括含有V_H及V_L區之scFv抗體，該等區各自分別與SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45中所示之序列至少99%一致。

【1294】在一實施例中，4-1BB促效劑包括分別具有SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47及SEQ ID NO:48中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50及SEQ ID NO:51中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1295】在一實施例中，4-1BB促效劑為藥物管理機構參考烏圖木單抗核准之4-1BB促效劑生物類似物單株抗體。在一實施例中，生物類似物單株抗體包括4-1BB抗體，該4-1BB抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基

酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其與該參考藥品或參考生物產品相比包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為烏圖木單抗。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之4-1BB促效劑抗體，其中4-1BB促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中參考藥品或參考生物產品為烏圖木單抗。4-1BB促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包括之賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為烏圖木單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包括之賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為烏圖木單抗。

表6. 與烏圖木單抗相關之4-1BB促效劑抗體的胺基酸序列。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:42 烏圖木單抗之重鏈	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTNY SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G	60 120 180 240 300 360 420 441
SEQ ID NO:43 烏圖木單抗之輕鏈	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS	60 120 180 214
SEQ ID NO:44 烏圖 木單抗之重鏈可變區	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
SEQ ID NO:45烏圖 木單抗之輕鏈可變區	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL	60 108
SEQ ID NO:46烏圖 木單抗之重鏈 CDR1	STYWIS	6
SEQ ID NO:47烏圖 木單抗之重鏈 CDR2	KIYPGDSYTN YSPSFQG	17
SEQ ID NO:48烏圖 木單抗之重鏈 CDR3	RGYGIFDY	8
SEQ ID NO:49烏圖 木單抗之輕鏈 CDR1	SGDNIGDQYA H	11
SEQ ID NO:50烏圖 木單抗之輕鏈 CDR2	QDKNRPS	7
SEQ ID NO:51烏圖 木單抗之輕鏈 CDR3	ATYTGFGSLA V	11

【1296】在較佳實施例中，4-1BB促效劑為單株抗體烏瑞魯單抗(亦稱為BMS-663513及20H4.9.h4a)或其片段、衍生物、變體或生物類似物。烏瑞魯單抗可購自百時美施貴寶公司及Creative Biolabs, Inc.。烏瑞魯單抗為免疫球蛋白G4-κ抗[*智人*TNFRSF9(腫瘤壞死因子受體超家族成員9，4-1BB，T細胞抗原ILA，CD137)]*智人*(完全人類)單株抗體。烏瑞魯單抗之胺基酸序列闡述於表7中。烏瑞魯單抗包括位於位置298(及298'')之N-糖基化位點；位於位置22-95(V_H-V_L)、148-204(C_H1-CL)、262-322(C_H2)及368-426(C_H3)(及位於位置22''-95''、148''-204''、262''-322''及368''-426'')之重鏈鏈內雙硫鍵；位於位置23'-88'(V_H-V_L)及136'-196'(C_H1-CL)(及位於位置23'''-88'''及136'''-196''')之輕鏈鏈內雙硫鍵；位於位置227-227''及230-230''之鏈間重

鏈-重鏈雙硫鍵；及位於135-216'及135''-216'''之鏈間重鏈-輕鏈雙硫鍵。烏瑞魯單抗及其變體及片段之製備及性質描述於美國專利第7,288,638及8,962,804號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。烏瑞魯單抗之臨床前及臨床特徵描述於Segal等人,《臨床癌症研究(*Clin. Cancer Res.*)》**2016**, 請訪問http:/dx.doi.org/ 10.1158/1078-0432. CCR-16-1272。目前烏瑞魯單抗在多種血液及實體腫瘤適應症之臨床試驗包含美國國家衛生研究院clinicaltrials.gov識別號NCT01775631、NCT02110082、NCT02253992及NCT01471210。

【1297】在一實施例中，4-1BB促效劑包括SEQ ID NO: 52所載之重鏈及SEQ ID NO: 53所載之輕鏈。在一實施例中，4-1BB促效劑包括分別具有SEQ ID NO:52及SEQ ID NO:53中所示之序列之重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:52及SEQ ID NO:53中所示之序列至少99%一致之重鏈及輕鏈。在一實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:52及SEQ ID NO:53中所示之序列至少98%一致之重鏈及輕鏈。在一實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:52及SEQ ID NO:53中所示之序列至少97%一致之重鏈及輕鏈。在一實施例中，4-1BB促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:52及SEQ ID NO:53中所示之序列至少96%一致之重鏈及輕鏈。在一實施例中，4-1BB促效劑包括各自分

別與SEQ ID NO:52及SEQ ID NO:53中所示之序列至少95%一致之重鏈及輕鏈。

【1298】在一實施例中，4-1BB促效劑包括烏瑞魯單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，4-1BB促效劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:54中所示之序列，且4-1BB促效劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:55中所示之序列，及其保守胺基酸取代。在一實施例中，4-1BB促效劑包括V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:54及SEQ ID NO:55中所示之序列至少99%一致。在一實施例中，4-1BB促效劑包括V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:54及SEQ ID NO:55中所示之序列至少98%一致。在一實施例中，4-1BB促效劑包括V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:54及SEQ ID NO:55中所示之序列至少97%一致。在一實施例中，4-1BB促效劑包括V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:54及SEQ ID NO:55中所示之序列至少96%一致。在一實施例中，4-1BB促效劑包括V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:54及SEQ ID NO:55中所示之序列至少95%一致。在一實施例中，4-1BB促效劑包括含有V_H及V_L區之scFv抗體，該等區各自分別與SEQ ID NO:54及SEQ ID NO:55中所示之序列至少99%一致。

【1299】在一實施例中，4-1BB促效劑包括分別具有SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57及SEQ ID NO:58中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60及SEQ ID

NO:61中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1300】在一實施例中，4-1BB促效劑為藥物管理機構參考烏瑞魯單抗核准之4-1BB促效劑生物類似物單株抗體。在一實施例中，生物類似物單株抗體包括4-1BB抗體，該4-1BB抗體包括與參考藥品或參考生物學產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為烏瑞魯單抗。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之4-1BB促效劑抗體，其中4-1BB促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為烏瑞魯單抗。4-1BB促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為烏瑞魯單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為烏瑞魯單抗。

表7.與烏瑞魯單抗相關之4-1BB促效劑抗體之胺基酸序列。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:52 烏瑞魯單抗之重鏈	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN PSLESRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 448
SEQ ID NO:53 烏瑞魯單抗之輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC	60 120 180 216
SEQ ID NO:54烏瑞魯單抗之可變重鏈	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP	60 120
SEQ ID NO:55烏瑞魯單抗之可變輕鏈	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ	60 110
SEQ ID NO:56烏瑞魯單抗之重鏈CDR1	GYYWS	5
SEQ ID NO:57烏瑞魯單抗之重鏈CDR2	EINHGGYVTY NPSLES	16
SEQ ID NO:58烏瑞魯單抗之重鏈CDR3	DYGPGNYDWY FDL	13
SEQ ID NO:59烏瑞魯單抗之輕鏈CDR1	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID NO:60烏瑞魯單抗之輕鏈CDR2	DASNRAT	7
SEQ ID NO:61烏瑞魯單抗之輕鏈CDR3	QQRSDWPPAL T	11

【1301】在一實施例中，4-1BB促效劑係選自由以下組成之群組：1D8、3Elor、4B4(BioLegend 309809)、H4-1BB-M127(BD Pharmingen 552532)、BBK2(賽默飛世爾MS621PABX)、145501(Leinco Technologies B591)、藉由寄存為ATCC第HB-11248號之細胞株產生且美國專利第6,974,863號中揭示之抗體、5F4(BioLegend 31 1503)、C65-485(BD Pharmingen 559446)、美國專利申請公開案第US 2005/0095244號中揭示之抗體、美國專利第7,288,638號中揭示之抗體(諸如20H4.9-IgG1(BMS-663031))、美國專利第6,887,673號中揭示之抗體(諸如4E9或BMS-554271)、美國專利第7,214,493號中揭示之抗體、美國專利第6,303,121號中揭示之抗體、美國專利第6,569,997號中揭示之抗體、美國專利第6,905,685號中揭示之抗體(諸如4E9

或BMS-554271)、美國專利第6,362,325號中揭示之抗體(諸如1D8或BMS-469492；3H3或BMS-469497；或3El)、美國專利第6,974,863號中揭示之抗體(諸如53A2)；美國專利第6,210,669號中揭示之抗體(諸如1D8、3B8或3El)、美國專利第5,928,893號中描述之抗體、美國專利第6,303,121號中揭示之抗體、美國專利第6,569,997號中揭示之抗體、國際專利申請公開案第WO 2012/177788、WO 2015/119923及WO 2010/042433號中揭示之抗體，及其片段、衍生物、結合物、變體或生物類似物，其中前述專利或專利申請公開案中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1302】在一實施例中，4-1BB促效劑為以下中描述之4-1BB促效融合蛋白：國際專利申請公開案第WO 2008/025516 A1號、第WO 2009/007120 A1號、第WO 2010/003766 A1號、第WO 2010/010051 A1號及第WO 2010/078966 A1號；美國專利申請公開案第US 2011/0027218 A1號、第US 2015/0126709 A1號、第US 2011/0111494 A1號、第US 2015/0110734 A1號及第US 2015/0126710 A1號；及美國專利第9,359,420號、第9,340,599, 8,921,519號及第8,450,460號，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1303】在一實施例中，4-1BB促效劑為如結構I-A(C端Fc抗體片段融合蛋白)或結構I-B(N端Fc抗體片段融合蛋白)或其片段、衍生物、結合物、變體或生物類似物中所描繪之4-1BB促效融合蛋白(參見圖18)。在結構I-A及I-B

中，圓柱係指個體多肽結合域。結構I-A及I-B包括三個線性連接的TNFRSF結合域，該等TNFRSF結合域衍生自例如4-1BBL(4-1BB配體、CD137配體(CD137L)或腫瘤壞死因子超家族成員9(tumor necrosis factor superfamily member 9；TNFSF9)或結合4-1BB之抗體，該等TNFRSF結合域摺疊以形成三價蛋白質，接著該三價蛋白質經由IgG1-Fc(包含C_H3及C_H2域)與第二三價蛋白質連接，隨後該IgG1-Fc用於經由二硫鍵(細長小橢圓)將兩個三價蛋白質連接在一起，從而使結構穩定且提供能夠將六個受體之細胞內傳訊域放在一起且傳訊蛋白質以形成傳訊複合物的促效劑。表示為圓柱體之TNFRSF結合域可為包括例如由連接子連接之V_H及V_L鏈的scFv域，該連接子可包括親水性殘基及提供柔性的Gly與Ser序列以及提供溶解性的Glu與Lys。可使用任何scFv域設計，諸如以下中描述之彼等scFv域：de Marco,《微生物細胞工廠(Microbial Cell Factories)》, 2011, 10, 44；Ahmad等人，《臨床及發育免疫學(Clin& Dev.Immunol.)》2012, 980250；Monnier等人，《抗體(Antibodies)》, 2013, 2, 193-208；或本文中別處併入之參考文獻。此形式之融合蛋白結構描述於美國專利第9,359,420號、第9,340,599號、第8,921,519號及第8,450,460號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1304】圖18中所給出之結構I-A之其他多肽域的胺基酸序列見於表8中。Fc域較佳包括完整恆定域(SEQ ID NO:62之胺基酸17-230)、完整鉸鏈域(SEQ ID NO:62之胺

基酸1-16)或鉸鏈域之一部分(例如SEQ ID NO:62之胺基酸4-16)。用於連接C端Fc抗體之較佳連接子可選自SEQ ID NO: 63至SEQ ID NO: 72中所載之實施例，包含適合於融合其他多肽之連接子。

表8. 具有C端 Fc抗體片段融合蛋白質設計(結構I-A)之TNFRSF促效劑融合蛋白(包含4-1BB促效劑融合蛋白)之胺基酸序列。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:62 Fc 域	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 230
SEQ ID NO:63 連接子	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
SEQ ID NO:64 連接子	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
SEQ ID NO:6 5連接子	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
SEQ ID NO:66 連接子	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
SEQ ID NO:67 連接子	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
SEQ ID NO:68 連接子	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
SEQ ID NO:69 連接子	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE	24
SEQ ID NO:70 連接子	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE	23
SEQ ID NO:71 連接子	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E	21
SEQ ID NO:72 連接子	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE	25

【1305】圖18中所提供之結構I-B之其他多肽域的胺基酸序列見於表9中。若Fc抗體片段如在結構I-B中與TNRFSF融合蛋白之N端融合，則Fc模組之序列較佳為SEQ ID NO:73中所示之序列，且連接子序列較佳係選自SED ID NO:74至SEQ ID NO:76中所闡述之實施例。

表9. 具有N端 Fc抗體片段融合蛋白設計(結構I-B)之TNFRSF促效劑融合蛋白(包含4-1BB促效劑融合蛋白)之胺基酸序列。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:73 Fc 域	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	60 120 180 240 246
SEQ ID NO:7 4連接子	SGSGSGSGSG S	11
SEQ ID NO:75 連接子	SSSSSSGSGS GS	12
SEQ ID NO:76 連接子	SSSSSSGSGS GSGSGS	16

【1306】在一實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包括一個或多個選自由以下組成之群組的4-1BB結合域：烏圖木單抗之可變重鏈及可變輕鏈、烏瑞魯單抗之可變重鏈及可變輕鏈、烏圖木單抗之可變重鏈及可變輕鏈、選自表10中描述之可變重鏈及可變輕鏈的可變重鏈及可變輕鏈、前述可變重鏈及可變輕鏈之任何組合，及其片段、衍生物、結合物、變體及生物類似物。

【1307】在一實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包括一個或多個包括4-1BBL序列的4-1BB結合域。在一實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包括一個或多個包括根據SEQ ID NO:77之序列的4-1BB結合域。在一實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包括一個或多個包括可溶性4-1BBL序列的4-1BB結合域。在一實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包括一個或多個包括根據SEQ ID NO:78之序列的4-1BB結合域。

【1308】在一實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包括一個或多個4-1BB結合域，該4-1BB

結合域為包括各自分別與SEQ ID NO:43及SEQ ID NO:44中所示之序列至少95%一致之V_H及V_L區的scFv域，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包括一個或多個4-1BB結合域，該4-1BB結合域為包括各自分別與SEQ ID NO:54及SEQ ID NO:55中所示之序列至少95%一致之V_H及V_L區的scFv域，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包括一個或多個4-1BB結合域，該4-1BB結合域為包括各自與表10中給出之V_H及V_L序列至少95%一致之V_H及V_L區的scFv域，其中V_H及V_L域由連接子連接。

表10.適用作融合蛋白中之4-1BB結合域或適用作scFv 4-1BB促效劑抗體之其他多肽域。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:77 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE	60 120 180 240 254
SEQ ID NO:78 4-1BBL 可溶性域	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE	60 120 168
SEQ ID NO:79 4B4-1-1 型式1之可變重鏈	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS	60 118
SEQ ID NO:80 4B4-1-1 型式1之可變輕鏈	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO:81 4B4-1-1 型式2之可變重鏈	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA	60 119
SEQ ID NO:82 4B4-1-1 型式2之可變輕鏈	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR	60 108
SEQ ID NO:83 H39E3-2之可變重鏈	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT	60 120
SEQ ID NO:84 H39E3-2之可變輕鏈	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA	60 110

【1309】在一實施例中，4-1BB促效劑為4-1BB促效單鏈融合多肽，其包括(i)第一可溶性4-1BB結合域、(ii)第一肽連接子、(iii)第二可溶性4-1BB結合域、(iv)第二肽連

接子，及(v)第三可溶性4-1BB結合域，進一步包括在N端及/或C端之另外的域，且其中該另外的域為Fab或Fc片段域。在一實施例中，4-1BB促效劑為4-1BB促效單鏈融合多肽，其包括(i)第一可溶性4-1BB結合域、(ii)第一肽連接子、(iii)第二可溶性4-1BB結合域、(iv)第二肽連接子，及(v)第三可溶性4-1BB結合域，進一步包括在N端及/或C端之另外的域，且其中該另外的域為Fab或Fc片段域，其中可溶性4-1BB域中之各者缺乏莖區(其促成三聚作用且提供距離細胞膜的某一距離，但不為4-1BB結合域之一部分)且該第一及第二肽連接子獨立地具有3-8個胺基酸的長度。

【1310】在一實施例中，4-1BB促效劑為4-1BB促效單鏈融合多肽，其包括(i)第一可溶性腫瘤壞死因子(TNF)超家族細胞介素域、(ii)第一肽連接子、(iii)第二可溶性TNF超家族細胞介素域、(iv)第二肽連接子，及(v)第三可溶性TNF超家族細胞介素域，其中可溶性TNF超家族細胞介素域中之各者缺乏莖區且該第一及第二肽連接子獨立地具有3-8個胺基酸的長度，且其中各TNF超家族細胞介素域為4-1BB結合域。

【1311】在一實施例中，4-1BB促效劑為4-1BB促效scFv抗體，其包括與任一前述V_L域連接之任一前述V_H域。

【1312】在一實施例中，4-1BB促效劑為BPS Bioscience 4-1BB促效劑抗體，目錄號79097-2，可購自美國加利福尼亞州聖地亞哥之BPS Bioscience。在一實施例中，4-1BB促效劑為Creative Biolabs 4-1BB促效劑抗體，

目錄號MOM-18179，可購自美國紐約州雪利市之Creative Biolabs (Creative Biolabs, Shirley, NY, USA)。

3. OX40(CD134)促效劑

【1313】在一實施例中，TNFRSF促效劑為OX40(CD134)促效劑。OX40促效劑可為本領域已知的任何OX40結合分子。OX40結合分子可以為能夠與人類或哺乳動物OX40結合之單株抗體或融合蛋白。OX40促效劑或OX40結合分子可包括免疫球蛋白分子之任何同型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、類別(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或子類之免疫球蛋白重鏈。OX40促效劑或OX40結合分子可具有重鏈及輕鏈。如本文所用，術語結合分子亦包含抗體(包含全長抗體)、單株抗體(包含全長單株抗體)、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)、人類抗體、人源化或嵌合抗體及抗體片段，例如Fab片段、F(ab')片段、由Fab表現文庫產生之片段、任一上述者之抗原決定基-結合片段及與OX40結合之抗體之經工程改造形式，例如scFv分子。在一實施例中，OX40促效劑為一種完全人類抗體之抗原結合蛋白。在一實施例中，OX40促效劑為一種人源化抗體之抗原結合蛋白。在一些實施例中，用於本揭示方法及組合物中之OX40促效劑包含抗OX40抗體、人類抗OX40抗體、小鼠抗OX40抗體、哺乳動物抗OX40抗體、單株抗OX40抗體、多株抗OX40抗體、嵌合抗OX40抗體、抗OX40阿德奈汀

(adnectin)、抗OX40域抗體、單鏈抗OX40片段、重鏈抗OX40片段、輕鏈抗OX40片段、抗OX40融合蛋白，及其片段、衍生物、結合物、變體或生物類似物。在較佳實施例中，OX40促效劑為促效性抗OX40人源化或完全人類單株抗體(亦即，源自單個細胞株的抗體)。

【1314】在較佳實施例中，OX40促效劑或OX40結合分子亦可為融合蛋白。包括與OX40L融合之Fc域之OX40融合蛋白描述於例如Sadun等人，《免疫療法雜誌》**2009**, *182*, 1481-89。在較佳實施例中，相較於通常具有兩個配體結合域之促效性單株抗體，多聚OX40促效劑，諸如三聚或六聚OX40促效劑(具有三個或六個配體結合域)可誘導優良受體(OX40L)聚類及內部細胞傳訊複合物形成。包括三個TNFRSF結合域及IgG1-Fc且視情況進一步連接兩個或更多個此等融合蛋白之三聚(三價)或六聚(或六價)或更大融合蛋白描述於例如Gieffers等人，《分子癌症治療學》2013, 12, 2735-47中。

【1315】已知促效性OX40抗體及融合蛋白可誘導強烈免疫反應。Curti等人，《癌症研究》**2013**, *73*, 7189-98。在較佳實施例中，OX40促效劑為以足夠減少毒性之方式與OX40抗原特異性結合之單株抗體或融合蛋白。在一些實施例中，OX40促效劑為消除抗體依賴性細胞毒性(ADCC)，例如NK細胞毒性之促效性OX40單株抗體或融合蛋白。在一些實施例中，OX40促效劑為消除抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)之促效性OX40單株抗體或融合蛋

白。在一些實施例中，OX40促效劑為消除補體依賴性細胞毒性(CDC)之促效性OX40單株抗體或融合蛋白。在一些實施例中，OX40促效劑為消除Fc區功能之促效性OX40單株抗體或融合蛋白。

【1316】在一些實施例中，OX40促效劑之特徵為以高親及力及促效性活性與人類OX40(SEQ ID NO:85)結合。在一實施例中，OX40促效劑為與人類OX40(SEQ ID NO:85)結合之結合分子。在一實施例中，OX40促效劑為與鼠類OX40(SEQ ID NO:86)結合之結合分子。表11中概述與OX40促效劑或結合分子結合之OX40抗原之胺基酸序列。

表11. OX40抗原之胺基酸序列。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:85 人類OX40 (智人)	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ	60
	NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK	120
	PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ	180
	GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL	240
	RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI	277
SEQ ID NO:86 鼠類OX40 (小家鼠)	MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC	60
	HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG	120
	VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP	180
	TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW	240
	RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI	272

【1317】在一些實施例中，所描述組合物、過程及方法包含如下OX40促效劑，該OX40促效劑以約100 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約90 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約80 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約70 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約60 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約50 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約40 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40或以約30 pM或更低之K_D結合人類或

鼠類OX40。

【1318】在一些實施例中，所描述之組合物、過程及方法包含如下OX40促效劑，該OX40促效劑以約7.5 × 10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合、以約7.5 × 10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合、以約8 × 10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合、以約8.5 × 10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合、以約9 × 10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合、以約9.5 × 10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合或以約1 × 10^6 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合。

【1319】在一些實施例中，所描述之組合物、過程及方法包含如下OX40促效劑，該OX40促效劑以約2 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.1 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.2 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.3 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.4 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.5 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.6 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.7 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.8 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.9 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合或以約3 × 10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合。

【1320】在一些實施例中，所描述之組合物、過程及

方法包含如下OX40促效劑，該OX40促效劑以約10 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約9 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約8 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約7 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約6 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約5 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約4 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約3 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約2 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合或以約1 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合。

【1321】在一些實施例中，OX40促效劑為塔沃西單抗，亦稱為MEDI0562或MEDI-0562。塔沃西單抗可獲自阿斯利康公司(AstraZeneca，Inc.)之醫學免疫子公司(MedImmune subsidiary)。塔沃西單抗為免疫球蛋白G1-κ抗[智人TNFRSF4(腫瘤壞死因子受體(TNFR)超家族成員4，OX40，CD134)]人源化及嵌合單株抗體。塔沃西單抗之胺基酸序列闡述於表12中。塔沃西單抗包括在位置301及301''處之N-糖基化位點，具有岩藻糖基化複合物二觸角CHO型聚醣；在位置22-95(V_H-V_L)、148-204((C_H1-C_L)、265-325(C_H2)及371-429(C_H3)處(及在位置22''-95''、148''-204''、265''-325''及371''-429''處)之重鏈鏈內雙硫鍵；在位置23'-88'(V_H-V_L)及134'-194'(C_H1-C_L)處(及在位置23'''-88'''及134'''-194'''處)之輕鏈鏈內雙硫鍵；在位置230-230''及233-233''處之鏈間重鏈-重鏈雙硫鍵；及在224-214'及

224''-214'''處之鏈間重鏈-輕鏈雙硫鍵。塔沃西單抗在各種實體腫瘤適應症中之當前臨床試驗包含美國國家衛生研究院clinicaltrials.gov識別號NCT02318394及NCT02705482。

【1322】在一實施例中，OX40促效劑包括SEQ ID NO:87所載之重鏈及SEQ ID NO:88所載之輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包括分別具有SEQ ID NO:87及SEQ ID NO:88中所示之序列之重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:87及SEQ ID NO:88中所示之序列至少99%一致之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:87及SEQ ID NO:88中所示之序列至少98%一致之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:87及SEQ ID NO:88中所示之序列至少97%一致之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:87及SEQ ID NO:88中所示之序列至少96%一致之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:87及SEQ ID NO:88中所示之序列至少95%一致之重鏈及輕鏈。

【1323】在一實施例中，OX40促效劑包括塔沃西單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:89中所示之序列，且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:90中所示之序列，及其保守胺基酸取代。在一實施例中，

OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所示之序列至少99%一致之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所示之序列至少98%一致之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所示之序列至少97%一致之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所示之序列至少96%一致之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所示之序列至少95%一致之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包括scFv抗體，該scFv抗體包括各自分別與SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所示之序列至少99%一致的V_H及V_L區。

【1324】在一實施例中，OX40促效劑包括分別具有SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92及SEQ ID NO:93中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95及SEQ ID NO:96中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1325】在一實施例中，OX40促效劑為藥物管理機構參考塔沃西單抗核准之OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一實施例中，生物類似物單株抗體包括OX40抗體，該OX40抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或

100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為塔沃西單抗。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之OX40促效劑抗體，其中OX40促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為塔沃西單抗。OX40促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為塔沃西單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為塔沃西單抗。

表12. 與塔沃西單抗相關之OX40促效劑抗體之胺基酸序列。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:87 塔沃西單抗之重鏈	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
SEQ ID NO:88 塔沃西單抗之輕鏈	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
SEQ ID NO:89 塔沃西單抗之重鏈可變區	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT	60 118
SEQ ID NO:90 塔沃西單抗之輕鏈可變區	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR	60 108
SEQ ID NO:91 塔沃西單抗之重鏈 CDR1	GSFSSGYWN	9
SEQ ID NO:92 塔沃西單抗之重鏈 CDR2	YIGYISYNGI TYH	13
SEQ ID NO:93 塔沃西單抗之重鏈 CDR3	RYKYDYDGGH AMDY	14
SEQ ID NO:94 塔沃西單抗之輕鏈 CDR1	QDISNYLN	8
SEQ ID NO:95 塔沃西單抗之輕鏈 CDR2	LLIYYTSKLH S	11
SEQ ID NO:96 塔沃西單抗之輕鏈 CDR3	QQGSALPW	8

【1326】在一些實施例中，OX40促效劑為11D4，其為可獲自輝瑞公司之完全人類抗體。11D4之製備及特性描述於美國專利第7,960,515號、第8,236,930號及第9,028,824號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。11D4之胺基酸序列闡述於表13中。

【1327】在一實施例中，OX40促效劑包括SEQ ID NO:97所載之重鏈及SEQ ID NO:98所載之輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包括分別具有SEQ ID NO:97及SEQ ID NO:98中所示之序列之重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:97及SEQ ID NO:98中所示之序列至少99%一致之重鏈及輕鏈。在一

實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:97及SEQ ID NO:98中所示之序列至少98%一致之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:97及SEQ ID NO:98中所示之序列至少97%一致之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:97及SEQ ID NO:98中所示之序列至少96%一致之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:97及SEQ ID NO:98中所示之序列至少95%一致之重鏈及輕鏈。

【1328】在一實施例中，OX40促效劑包括11D4之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:99中所示之序列，且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:100中所示之序列，及其保守胺基酸取代。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:99及SEQ ID NO:100中所示之序列至少99%一致之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:99及SEQ ID NO:100中所示之序列至少98%一致之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:99及SEQ ID NO:100中所示之序列至少97%一致之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:99及SEQ ID NO:100中所示之序列至少96%一致之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:99及SEQ ID NO:100中所示之序列至少95%一致之V_H及V_L區。

【1329】在一實施例中，OX40促效劑包括分別具有SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:102及SEQ ID NO:103中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:105及SEQ ID NO:106中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1330】在一實施例中，OX40促效劑為藥物管理機構參考11D4核准之OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一實施例中，生物類似物單株抗體包括OX40抗體，該OX40抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為11D4。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之OX40促效劑抗體，其中OX40促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為11D4。OX40促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為11D4。在一些實施例

中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為11D4。

表13. 與11D4相關之OX40促效劑抗體之胺基酸序列。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:97 11D4之重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPPCPAP PVAGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK	60 120 180 240 300 360 420 444
SEQ ID NO:98 11D4之輕鏈	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
SEQ ID NO:99 11D4 之重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
SEQ ID NO:100 11D4 之輕鏈可變區	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK	60 107
SEQ ID NO:101 11D4之重鏈 CDR1	SYSMN	5
SEQ ID NO:102 11D4之重鏈 CDR2	YISSSSSTID YADSVKG	17
SEQ ID NO:103 11D4之重鏈 CDR3	ESGWYLFDY	9
SEQ ID NO:104 11D4之輕鏈 CDR1	RASQGISSWL A	11
SEQ ID NO:105 11D4之輕鏈 CDR2	AASSLQS	7
SEQ ID NO:106 11D4之輕鏈 CDR3	QQYNSYPPT	9

【1331】在一些實施例中，OX40促效劑為18D8，其為可獲自輝瑞公司之完全人類抗體。18D8之製備及特性描述於美國專利第7,960,515號、第8,236,930號及第9,028,824號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。18D8之胺基酸序列闡述於表14中。

【1332】在一實施例中，OX40促效劑包括SEQ ID NO:107所載之重鏈及SEQ ID NO:108所載之輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包括分別具有SEQ ID NO:107及SEQ ID NO:108中所示之序列之重鏈及輕鏈，或其抗原結合片

段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:107及SEQ ID NO:108中所示之序列至少99%一致之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:107及SEQ ID NO:108中所示之序列至少98%一致之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:107及SEQ ID NO:108中所示之序列至少97%一致之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:107及SEQ ID NO:108中所示之序列至少96%一致之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:107及SEQ ID NO:108中所示之序列至少95%一致之重鏈及輕鏈。

【1333】在一實施例中，OX40促效劑包括18D8之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:109中所示之序列，且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:110中所示之序列，及其保守胺基酸取代。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:109及SEQ ID NO:110中所示之序列至少99%一致之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:109及SEQ ID NO:110中所示之序列至少98%一致之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:109及SEQ ID NO:110中所示之序列至少97%一致之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:109及SEQ

ID NO:110中所示之序列至少96%一致之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:109及SEQ ID NO:110中所示之序列至少95%一致之V_H及V_L區。

【1334】在一實施例中，OX40促效劑包括分別具有SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112及SEQ ID NO:113中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:115及SEQ ID NO:116中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1335】在一實施例中，OX40促效劑為藥物管理機構參考18D8核准之OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一實施例中，生物類似物單株抗體包括OX40抗體，該OX40抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為18D8。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之OX40促效劑抗體，其中OX40促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為18D8。OX40促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包

括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為18D8。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為18D8。

表14. 與18D8相關之OX40促效劑抗體之胺基酸序列。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:107 18D8 之重鏈	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID NO:108 18D8 之輕鏈	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	60 120 180 213
SEQ ID NO:109 18D8 之重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSS	60 120 124
SEQ ID NO:110 18D8 之輕鏈可變區	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK	60 106
SEQ ID NO:111 18D8 之重鏈 CDR1	DYAMH	5
SEQ ID NO:112 18D8 之重鏈 CDR2	GISWNSGSIG YADSVKG	17
SEQ ID NO:113 18D8 之重鏈 CDR3	DQSTADYYFY YGMDV	15
SEQ ID NO:114 18D8 之輕鏈 CDR1	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID NO:115 18D8 之輕鏈 CDR2	DASNRAT	7
SEQ ID NO:116 18D8 之輕鏈 CDR3	QQRSNWPT	8

【1336】在一些實施例中，OX40促效劑為Hu119-122，其為可獲自葛蘭素史克公共有限公司(GlaxoSmithKline plc)之人源化抗體。Hu119-122之製備及特性描述於美國專利第9,006,399號及第9,163,085號以及國際專利公開案第WO 2012/027328號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。Hu119-122之胺基酸序列闡述於表15中。

【1337】在一實施例中，OX40促效劑包括Hu119-122之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:117中所示之序列，且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:118中所示之序列，及其保守胺基酸取代。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:117及SEQ ID NO:118中所示之序列至少99%一致之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:117及SEQ ID NO:118中所示之序列至少98%一致之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:117及SEQ ID NO:118中所示之序列至少97%一致之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:117及SEQ ID NO:118中所示之序列至少96%一致之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:117及SEQ ID NO:118中所示之序列至少95%一致之V_H及V_L區。

【1338】在一實施例中，OX40促效劑包括分別具有SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:120及SEQ ID NO:121中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:123及SEQ ID NO:124中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1339】在一實施例中，OX40促效劑為藥物管理機構參考Hu119-122核准之OX40促效劑生物類似物單株抗

體。在一實施例中，生物類似物單株抗體包括OX40抗體，該OX40抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu119-122。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之OX40促效劑抗體，其中OX40促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu119-122。OX40促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu119-122。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu119-122。

表15. 與Hu119-122相關之OX40促效劑抗體之胺基酸序列。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:117 Hu119-122 之重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
SEQ ID NO:118 Hu119-122 之輕鏈可變區	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
SEQ ID NO:119 Hu119-122之重鏈 CDR1	SHDMS	5
SEQ ID NO:120 Hu119-122之重鏈 CDR2	AINSDGGSTY YPDTMER	17
SEQ ID NO:121 Hu119-122之重鏈 CDR3	HYDDYYAWFA Y	11
SEQ ID NO:122 Hu119-122之輕鏈 CDR1	RASKSVSTSG YSYMH	15
SEQ ID NO:123 Hu119-122之輕鏈 CDR2	LASNLES	7
SEQ ID NO:124 Hu119-122之輕鏈 CDR3	QHSRELPLT	9

【1340】在一些實施例中，OX40促效劑為Hu106-222，其為可獲自葛蘭素史克公共有限公司之人源化抗體。Hu106-222之製備及特性描述於美國專利第9,006,399號及第9,163,085號以及國際專利公開案第WO 2012/027328號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。Hu106-222之胺基酸序列闡述於表16中。

【1341】在一實施例中，OX40促效劑包括Hu106-222之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:125中所示之序列，且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:126中所示之序列，及其保守胺基酸取代。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:125及SEQ ID NO:126中所示之序列至少99%一致之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:125及SEQ

ID NO:126中所示之序列至少98%一致之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:125及SEQ ID NO:126中所示之序列至少97%一致之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:125及SEQ ID NO:126中所示之序列至少96%一致之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包括各自分別與SEQ ID NO:125及SEQ ID NO:126中所示之序列至少95%一致之V_H及V_L區。

【1342】在一實施例中，OX40促效劑包括分別具有SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:128及SEQ ID NO:129中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:131及SEQ ID NO:132中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1343】在一實施例中，OX40促效劑為藥物管理機構參考Hu106-222核准之OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一實施例中，生物類似物單株抗體包括OX40抗體，該OX40抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu106-222。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類

似物為獲得授權或申請授權之OX40促效劑抗體，其中OX40促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu106-222。OX40促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu106-222。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu106-222。

表16. 與Hu106-222相關之OX40促效劑抗體之胺基酸序列。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:125 Hu106-222之重鏈可變區	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	60 120 122
SEQ ID NO:126 Hu106-222之輕鏈可變區	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO:127 Hu106-222之重鏈CDR1	DYSMH	5
SEQ ID NO:128 Hu106-222之重鏈CDR2	WINTETGEPT YADDFKG	17
SEQ ID NO:129 Hu106-222之重鏈CDR3	PYYDYVSYYA MDY	13
SEQ ID NO:130 Hu106-222之輕鏈CDR1	KASQDVSTAV A	11
SEQ ID NO:131 Hu106-222之輕鏈CDR2	SASYLYT	7
SEQ ID NO:132 Hu106-222之輕鏈CDR3	QQHYSTPRT	9

【1344】在一些實施例中，OX40促效劑抗體為MEDI6469(亦稱為9B12)。MEDI6469為鼠類單株抗體。

Weinberg等人,《免疫療法雜誌》**2006**, *29*, 575-585。在一些實施例中，OX40促效劑為由9B12雜交瘤產生，由Biovest Inc.(美國馬薩諸塞州馬爾文(Malvern, MA, USA))寄存的抗體，如Weinberg等人,《免疫療法雜誌》2006, 29, 575-585中所描述，其揭示內容以全文引用之方式併入本文中。在一些實施例中，抗體包括MEDI6469之CDR序列。在一些實施例中，抗體包括MEDI6469之重鏈可變區序列及/或輕鏈可變區序列。

【1345】在一實施例中，OX40促效劑為L106 BD (Pharmingen，產品號340420)。在一些實施例中，OX40促效劑包括抗體L106(BD Pharmingen，產品號340420)之CDR。在一些實施例中，OX40促效劑包括抗體L106(BD Pharmingen，產品號340420)之重鏈可變區序列及/或輕鏈可變區序列。在一實施例中，OX40促效劑為ACT35(Santa Cruz Biotechnology，目錄號20073)。在一些實施例中，OX40促效劑包括抗體ACT35(Santa Cruz Biotechnology，目錄號20073)之CDR。在一些實施例中，OX40促效劑包括抗體ACT35(Santa Cruz Biotechnology，目錄號20073)之重鏈可變區序列及/或輕鏈可變區序列。在一實施例中，OX40促效劑為鼠類單株抗體抗mCD134/mOX40(選殖株OX86)，可購自新罕布什爾州西黎巴嫩之BioXcell Inc之InVivoMAb。

【1346】在一實施例中，OX40促效劑係選自以下中描述之OX40促效劑：國際專利申請公開案第WO 95/12673

號、第WO 95/21925號、第WO 2006/121810號、第WO 2012/027328號、第WO 2013/028231號、第WO 2013/038191號及第WO 2014/148895號；歐洲專利申請案EP 0672141；美國專利申請公開案第US 2010/136030號、第US 2014/377284號、第US 2015/190506號及第US 2015/132288號(包含選殖株20E5及12H3)；及美國專利第7,504,101號、第7,550,140號、第7,622,444號、第7,696,175號、第7,960,515號、第7,961,515號、第8,133,983號、第9,006,399號及第9,163,085號，其中每一者之揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

【1347】在一實施例中，OX40促效劑為如結構I-A(C端Fc抗體片段融合蛋白)或結構I-B(N端Fc抗體片段融合蛋白)中所描繪之OX40促效融合蛋白，或其片段、衍生物、結合物、變體或生物類似物。結構I-A及I-B之特性已在上文及美國專利第9,359,420號、第9,340,599號、第8,921,519號及第8,450,460號中描述，其揭示內容以引用之方式併入本文中。圖18中所提供之結構I-A之多肽域的胺基酸序列見於表9中。Fc域較佳包括完整恆定域(SEQ ID NO:62之胺基酸17-230)、完整鉸鏈域(SEQ ID NO:62之胺基酸1-16)或鉸鏈域之一部分(例如SEQ ID NO:62之胺基酸4-16)。用於連接C端Fc抗體之較佳的連接子可選自SEQ ID NO:63至SEQ ID NO:72中所載之實施例，包含適合於融合其他多肽之連接子。同樣，圖18中所提供之結構I-B之多肽域的胺基酸序列見於表10中。若Fc抗體片段如在結構I-

B中與TNRFSF融合蛋白之N端融合，則Fc模組之序列較佳地為SEQ ID NO:73中所示之序列，且連接子序列較佳地係選自SED ID NO:74至SEQ ID NO:76中所闡述之彼等實施例。

【1348】在一實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個選自由以下組成之群組之OX40結合域：塔沃西單抗的可變重鏈及可變輕鏈、11D4的可變重鏈及可變輕鏈、18D8的可變重鏈及可變輕鏈、Hu119-122的可變重鏈及可變輕鏈、Hu106-222的可變重鏈及可變輕鏈、選自表17中描述之可變重鏈及可變輕鏈的可變重鏈及可變輕鏈、前述之可變重鏈及可變輕鏈的任何組合，及其片段、衍生物、結合物、變體及生物類似物。

【1349】在一實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個包括OX40L序列之OX40結合域。在一實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個包括根據SEQ ID NO:133之序列之OX40結合域。在一實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個包括可溶性OX40L序列之OX40結合域。在一實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個包括根據SEQ ID NO:134之序列之OX40結合域。在一實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個包括根據SEQ ID NO:135之序列的OX40結合域。

【1350】在一實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促

效劑融合蛋白包括一個或多個OX40結合域，該OX40結合域為scFv域，該scFv域包括各自分別與SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所示之序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個OX40結合域，該OX40結合域為scFv域，該scFv域包括各自分別與SEQ ID NO:99及SEQ ID NO:100中所示之序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個OX40結合域，該OX40結合域為scFv域，該scFv域包括各自分別與SEQ ID NO:109及SEQ ID NO:110中所示之序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個OX40結合域，該OX40結合域為scFv域，該scFv域包括各自分別與SEQ ID NO:127及SEQ ID NO:128中所示之序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個OX40結合域，該OX40結合域為scFv域，該scFv域包括各自分別與SEQ ID NO:125及SEQ ID NO:126中所示之序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包括一個或多個OX40結合域，該OX40結合域為scFv域，該scFv域包括各自與表17中給出之V_H及V_L序列至少95%一致之V_H及

V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。

表17. 適用作融合蛋白(例如結構I-A及I-B)中之OX40結合域或適用作scFv OX40促效劑抗體之另外的多肽域。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)
SEQ ID NO:133 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ 60 SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ 120 KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF 180 CVL 183
SEQ ID NO:134 OX40L 可溶性域	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE 60 VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL 120 IHQNPGEFCV L 131
SEQ ID NO:135 OX40L 可溶性域 (替代)	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI 60 SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ 120 NPGEFCVL 128
SEQ ID NO:136 008 之可變重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS 120
SEQ ID NO:137 008 之可變輕鏈	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO:138 011 之可變重鏈	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD 60 SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA 120
SEQ ID NO:139 011 之可變輕鏈	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO:140 021之可變重鏈	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS 120
SEQ ID NO:141 021之可變輕鏈	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK 108
SEQ ID NO:142 023之可變重鏈	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA 60 DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS 120
SEQ ID NO:143 023之可變輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR 108
SEQ ID NO:144 重鏈可變區	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY 60 NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS 119
SEQ ID NO:145 輕鏈可變區	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:146 重鏈可變區	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY 60 NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS 120 P 121
SEQ ID NO:147 輕鏈可變區	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD 60 RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:148人源 化抗體之重鏈可變區	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV 120 SS 122
SEQ ID NO:149人源 化抗體之重鏈可變區	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV 120 SS 122
SEQ ID NO:150人源 化抗體之輕鏈可變區	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:151人源 化抗體之輕鏈可變區	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:152人源 化抗體之重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA 120
SEQ ID NO:153人源 化抗體之重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS 120
SEQ ID NO:154人源 化抗體之輕鏈可變區	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K 111
SEQ ID NO:155人源 化抗體之輕鏈可變區	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO:156 重鏈可變區	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP 60 EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG 120 EVFYFDYWGQ GTTLTVSS 138
SEQ ID NO:157 輕鏈可變區	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP 60 GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG 120 TKLELK 126

【1351】在一實施例中，OX40促效劑為OX40促效性單鏈融合多肽，其包括：(i)第一可溶性OX40結合域；(ii)

第一肽連接子；(iii)第二可溶性OX40結合域；(iv)第二肽連接子；及(v)第三可溶性OX40結合域，其進一步包括在N端及/或C端處之另外的域，且其中該另外域為Fab或Fc片段域。在一實施例中，OX40促效劑為OX40促效性單鏈融合多肽，其包括：(i)第一可溶性OX40結合域；(ii)第一肽連接子；(iii)第二可溶性OX40結合域；(iv)第二肽連接子；及(v)第三可溶性OX40結合域，其進一步包括在N端及/或C端處之另外的域，其中該另外域為Fab或Fc片段域，其中可溶性OX40結合域中之各者缺乏莖區(其促成三聚作用且提供距離細胞膜之某一距離，但不為OX40結合域之一部分)且該第一及第二肽連接子獨立地具有3-8個胺基酸的長度。

【1352】在一些施例中，OX40促效劑為OX40促效性單鏈融合多肽，其包括：(i)第一可溶性腫瘤壞死因子(TNF)超家族細胞介素域；(ii)第一肽連接子；(iii)第二可溶性TNF超家族細胞介素域；(iv)第二肽連接子；及(v)第三可溶性TNF超家族細胞介素域，其中可溶性TNF超家族細胞介素域中之各者缺乏莖區且該第一及第二肽連接子獨立地具有3-8個胺基酸的長度，且其中TNF超家族細胞介素域為OX40結合域。

【1353】在一些實施例中，OX40促效劑為MEDI6383。MEDI6383為OX40促效性融合蛋白且可如美國專利第6,312,700號中所描述來製備，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1354】在一實施例中，OX40促效劑為OX40促效性scFv抗體，其包括與任一前述V_L域連接之任一前述V_H域。

【1355】在一實施例中，OX40促效劑為Creative Biolabs OX40促效劑單株抗體MOM-18455，可購自美國紐約州雪利市之Creative Biolabs，Inc.。

【1356】在一實施例中，OX40促效劑為OX40促效性抗體選殖株Ber-ACT35，可購自美國加利福尼亞州聖地亞哥之BioLegend, Inc.。

C. 視情況選用之細胞存活性分析

【1357】視情況，在初始第一擴增(有時稱為初始主體擴增(initial bulk expansion))之後，可使用本領域已知之標準分析進行細胞存活性分析。因此，在某些實施例中，方法包括在初始第一擴增之後進行細胞存活性分析。舉例而言，可在主體TIL樣本上進行台盼藍排除測定，其選擇性標記死細胞且允許存活性評估。其他用於測試存活性之分析可包含但不限於阿爾瑪藍(Alamar blue)分析及MTT分析。

1. 細胞計數、存活性、流動式細胞測量術

【1358】在一些實施例中，量測細胞計數及/或存活性。標記物(諸如但不限於CD3、CD4、CD8及CD56以及本文所揭示或描述之任何其他標記物)之表現可藉由流動式細胞測量術，使用FACSCanto流式細胞儀(美國新澤西州富

蘭克林湖的BD Biosciences)，用抗體(例如但不限於可購自BD Biosciences, Inc.(加利福尼亞州聖荷西)的抗體)來進行量測。細胞可使用拋棄式c-晶片血球計(VWR，伊利諾伊州巴達維亞)手動計算，且存活性可使用本領域中已知之任何方法(包含但不限於台盼藍染色)來評估。細胞存活性亦可基於美國專利申請公開案第2018/0282694號測定，其以全文引用的方式併入本文中。細胞存活性亦可基於美國專利申請公開案第2018/0280436號或國際專利申請公開案第WO/2018/081473號測定，兩者全文均出於所有目的併入本文中。

【1359】在一些情況下，主體TIL群體可使用下文論述之方案立即冷凍保存。替代地，主體TIL群體可進行REP且接著如下文所論述冷凍保存。類似地，在其中基因修飾的TIL將用於療法中之情況下，主體或REP TIL群體可進行基因修飾以用於合適治療。

2. 細胞培養

【1360】在一實施例中，用於擴增TIL之方法(包含上文所論述以及圖1及圖8，特別是例如圖8B及/或圖8C中例示之彼等方法)可包含使用約5,000 mL至約25,000 mL之細胞培養基、約5,000 mL至約10,000 mL之細胞培養基或約5,800 mL至約8,700 mL之細胞培養基。在一些實施例中，培養基為不含血清培養基。在一些實施例中，初始第一擴增中之培養基不含血清。在一些實施例中，第二擴增中之

培養基不含血清。在一些實施例中，初始第一擴增及第二擴增(亦稱為快速第二擴增)中之培養基均不含血清。在一實施例中，擴增TIL數目使用不超過一種類型之細胞培養基。可使用任何合適的細胞培養基，例如AIM-V細胞培養基(L-麩醯胺酸、50 μM硫酸鏈黴素及10 μM硫酸建它黴素)細胞培養基，亦被稱作AIM V培養基(可購自加利福尼亞州喀斯巴德英傑公司(Invitrogen, Carlsbad CA))。就此而言，本發明方法有利地減少擴增TIL數目所需之培養基的量及培養基類型的數目。在一實施例中，擴增TIL數目可包括頻繁性不超過每三或四天一次地餵養細胞。在透氣容器中擴增細胞數目藉由減少擴增細胞所需之餵養頻率，簡化擴增細胞數目所需之程序。

【1361】在一些施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基為未經過濾的。使用未經過濾之細胞培養基可簡化擴增細胞數目所需之程序。在一實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基缺乏β-巰基乙醇(BME)。

【1362】在一實施例中，持續一定時間的方法包括獲得來自哺乳動物之腫瘤組織樣本；在第一透氣容器中培養腫瘤組織樣本持續約1至8天(例如約7天)之時間作為初始第一擴增或持續約8天的時間作為初始第一擴增，該第一透氣容器含有包含IL-2、1X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基；將TIL轉移至第二透氣容器且在第二透氣容器中擴增TIL數目持續約7至9天(例如約7天、約8天或約9天)之時間，該第二透氣容器含有包含IL-2、2X抗原呈現

飼養細胞及OKT-3之細胞培養基。

【1363】在一實施例中，持續一定時間的方法包括獲得來自哺乳動物之腫瘤組織樣本；在第一透氣容器中培養腫瘤組織樣本持續約1至7天(例如約7天)之時間作為初始第一擴增，該第一透氣容器含有包含IL-2、1X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基；將TIL轉移至第二透氣容器且在第二透氣容器中擴增TIL數目持續約7至14天或約7至9天(例如約7天、約8天、約9天、約10天或約11天)之時間，該第二透氣容器含有包含IL-2、2X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基。

【1364】在一實施例中，持續一定時間的方法包括獲得來自哺乳動物之腫瘤組織樣本；在第一透氣容器中培養腫瘤組織樣本持續約1至7天(例如約7天)之時間作為初始第一擴增，該第一透氣容器含有包含IL-2、1X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基；將TIL轉移至第二透氣容器且在第二透氣容器中擴增TIL數目持續約7至11天(例如約7天、約8天、約9天、約10天或約11天)之時間，該第二透氣容器含有包含IL-2、2X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基。

【1365】在一實施例中，TIL係在透氣容器中擴增。已使用透氣容器來擴增TIL，使用PBMC，使用本領域中已知之方法、組合物及裝置，包含美國專利申請案公開案第2005/0106717 A1號中描述之彼等，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，TIL係在透氣袋中擴

增。在一實施例中，TIL使用在透氣袋中擴增TIL之細胞擴增系統(諸如Xuri細胞擴增系統W25(GE Healthcare))擴增。在一些、實施例中，TIL使用在透氣袋中擴增TIL之細胞擴增系統(諸如WAVE生物反應器系統，亦稱為Xuri細胞擴增系統W5(GE Healthcare))擴增。在一實施例中，細胞擴增系統包含透氣細胞袋，該透氣細胞袋之容積選自由以下組成之群組：約100 mL、約200 mL、約300 mL、約400 mL、約500 mL、約600 mL、約700 mL、約800 mL、約900 mL、約1 L、約2 L、約3 L、約4 L、約5 L、約6 L、約7 L、約8 L、約9 L及約10 L。

【1366】在一實施例中，TIL可在G-Rex培養瓶(可購自Wilson Wolf Manufacturing)中擴增。此類實施例允許細胞群體自約5×10^5個細胞/平方公分擴增至介於10×10^6與30×10^6個細胞/平方公分之間。在一實施例中，此係未進行餵養。在一實施例中，此係未進行餵養，只要G-Rex培養瓶中之培養基位於約10 cm之高度。在一實施例中，此係未進行餵養但添加一種或多種細胞介素。在一實施例中，細胞介素可以推注形式添加而無需將細胞介素與培養基進行任何混合。此類容器、裝置及方法為本領域中已知的且已用於擴增TIL，且包含以下中描述之彼等者：美國專利申請公開案第US 2014/0377739A1號、國際公開案第WO 2014/210036 A1號、美國專利申請公開案第us 2013/0115617 A1號、國際公開案第WO 2013/188427 A1號、美國專利申請公開案第US 2011/0136228 A1號、美國

專利第US 8,809,050 B2號、國際公開案第WO 2011/072088 A2號、美國專利申請公開案第US 2016/0208216 A1號、美國專利申請公開案第US 2012/0244133 A1號、國際公開案第WO 2012/129201 A1號、美國專利申請公開案第US 2013/0102075 A1號、美國專利第US 8,956,860 B2號、國際公開案第WO 2013/173835 A1號、美國專利申請公開案第US 2015/0175966 A1號，其揭示內容以引用之方式併入本文中。此類過程亦描述於Jin等人，《免疫療法雜誌》，2012, 35:283-292中。

D. 視情況選用之TIL之基因工程改造

【1367】在一些實施例中，本發明之經擴增之TIL在擴增步驟之前、期間或之後，包含在密閉無菌製造過程期間(各者如本文所提供)經進一步操作，以用暫時性方式改變蛋白質表現。在一些實施例中，暫時性改變的蛋白質表現係因為暫時性基因編輯。在一些實施例中，本發明之經擴增之TIL用轉錄因子(transcription factor；TF)及/或其他能夠暫時性改變TIL中之蛋白質表現的分子處理。在一些實施例中，TF及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現之分子提供TIL群體中改變的腫瘤抗原表現及/或改變腫瘤抗原特異性T細胞之數目。

【1368】在某些實施例中，方法包括基因編輯TIL群體。在某些實施例中，方法包括基因編輯第一TIL群體、第二TIL群體及/或第三TIL群體。

【1369】在一些實施例中，本發明包含經由核苷酸插入，諸如經由核糖核酸(RNA)插入，包含插入信使RNA(mRNA)或小(或短)干擾RNA(siRNA)至TIL群體中進行基因編輯，以促進一種或多種蛋白質之表現或抑制一種或多種蛋白質之表現以及同時促進一組蛋白質與抑制另一組蛋白質之組合。

【1370】在一些實施例中，本發明之經擴增之TIL經歷暫時性改變蛋白質表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現發生在第一擴增之前的主體TIL群體，包含例如獲自例如如圖8(尤其圖8B及/或圖8C)中所指示之步驟A的TIL群體中。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現發生在第一擴增期間，包含例如在例如如圖8(例如圖8B及/或圖8C)中所指示之步驟B中擴增的TIL群體中。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現發生在第一擴增之後，包含例如在第一與第二擴增之間轉變的TIL群體(例如如本文所描述之第二TIL群體)、獲自例如如圖8中所指示之步驟B且包含於步驟C中的TIL群體中。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現發生在第二擴增之前的主體TIL群體中，包含例如在獲自例如如圖8中所指示之步驟C且在步驟D中其擴增之前的TIL群體中。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現發生在第二擴增期間，包含例如在例如如圖8中所指示之步驟D中擴增之TIL群體(例如第三TIL群體)中。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現發生在第二擴增之後，包含例如在獲自例如如圖8中所指示之步驟D中

之擴增的TIL群體中。

【1371】在一實施例中，暫時性改變TIL群體中之蛋白質表現之方法包含電穿孔之步驟。電穿孔方法為本領域中已知的，且描述於例如以下中：Tsong,《生物理雜誌》1991, *60*, 297-306及美國專利申請公開案第2014/0227237 A1號，其中每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，暫時性改變TIL群體中之蛋白質表現之方法包含磷酸鈣轉染之步驟。磷酸鈣轉染方法(磷酸鈣DNA沈澱、細胞表面包覆及胞吞作用)為本領域中已知的且描述於以下中：Graham及van der Eb,《病毒學》1973, 52, 456-467；Wigler等人,《美國國家科學院院刊》1979, 76, 1373-1376；及Chen及Okayarea,《分子細胞生物學》1987, *7*, 2745-2752；及美國專利第5,593,875號，其中每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，暫時性改變TIL群體中之蛋白質表現之方法包含脂質體轉染之步驟。脂質體轉染方法，諸如採用陽離子脂質*N*-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-*n*, *n*,*n*-三甲基氯化銨(DOTMA)及二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)於過濾水中之1:1(w/w)脂質體調配物之方法為本領域中已知的且描述於以下中：Rose等人,《生物技術》1991, 10, 520-525及Felgner等人,《美國國家科學院院刊》, 1987, 84, 7413-7417以及美國專利第5,279,833號、第5,908,635號、第6,056,938號、第6,110,490號、第6,534,484號及第7,687,070號，其中每一者之揭示內容以引用之方式併入本

文中。在一實施例中，暫時性改變TIL群體中之蛋白質表現之方法包含使用以下中描述之方法之轉染步驟：美國專利第5,766,902號、第6,025,337號、第6,410,517號、第6,475,994號及第7,189,705號，其中每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1372】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致幹記憶T細胞(Stem Memory T cell；TSCM)增加。TSCM為抗原經歷中央記憶T細胞之早期前驅細胞。TSCM一般呈現定義幹細胞之長期存活、自我更新及多效力能力，且一般為產生有效TIL產物所需的。TSCM在授受性細胞轉移之小鼠模型中已顯示相較於其他T細胞子集之增強的抗腫瘤活性(Gattinoni等人《自然醫學》2009, 2011；Gattinoni,《自然癌症綜述(Nature Rev.Cancer)》, 2012；Cieri等人《血液》2013)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致具有包括高比例之TSCM之組成的TIL群體。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TSCM百分比增加至少5%、至少10%、至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TIL群體中之TSCM增加至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍或10倍。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致具有至少至少5%、至少10%、至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少

40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95% TSCM之TIL群體。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致具有至少至少5%、至少10%、至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95% TSCM之治療性TIL群體。

【1373】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致抗原經歷T細胞回春(rejuvenation)。在一些實施例中，回春包含例如增加增殖、增加T細胞活化及/或增加抗原識別。

【1374】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現改變一大部分T細胞之表現，以保留腫瘤衍生之TCR組庫。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現不改變腫瘤衍生之TCR組庫。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現維持腫瘤衍生之TCR組庫。

【1375】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質導致改變特定基因之表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向包含但不限於以下之基因：PD-1(亦稱為PDCD1或CC279)、TGFBR2、CCR4/5、CBLB(CBL-B)、CISH、嵌合共刺激受體(chimeric co-stimulatory receptor；CCR)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2 ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TGFβ、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、

CXCR2、CSCR3、CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1α)、CCL4(MIP1-β)、CCL5(RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1及/或cAMP蛋白激酶A(protein kinase A；PKA)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向選自由以下組成之群組之基因：PD-1、TGFBR2、CCR4/5、CBLB(CBL-B)、CISH、嵌合共刺激受體(CCR)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2 ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TGFβ、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1α)、CCL4(MIP1-β)、CCL5(RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1、及/或cAMP蛋白激酶A(PKA)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向PD-1。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向TGFBR2。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR4 / 5。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CBLB。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CISH。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR(嵌合共刺激受體)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向IL-2。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向IL-12。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向IL-15。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向IL-21。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向NOTCH 1/2 ICD。在一些實施例中，暫時性改變蛋

白質表現靶向TIM3。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向LAG3。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向TIGIT。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向TGFβ。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR1。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR2。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR4。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR5。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CXCR1。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CXCR2。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CSCR3。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL2(MCP-1)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL3(MIP-1α)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL4(MIP1-β)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL5(RANTES)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CXCL1。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CXCL8。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL22。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL17。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向VHL。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CD44。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向PIK3CD。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向SOCS1。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向cAMP蛋白激酶A(PKA)。

【1376】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致趨化激素受體增加及/或過度表現。在一些實施例中，因暫時性蛋白質表現而過度表現之趨化激素受體包含具有配體之受體，該配體包含但不限於CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1α)、CCL4(MIP1-β)、CCL5(RANTES)、CXCL1、CXCL8、CCL22及/或CCL17。

【1377】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1、CTLA-4、TIM3、LAG3、TIGIT、TGFβR2及/或TGFβ之表現降低及/或減少(包含導致例如TGFβ路徑阻斷)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CBLB(CBL-B)之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CISH之表現降低及/或減少。

【1378】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致趨化激素受體增加及/或過度表現，以例如改善TIL運輸或運動至腫瘤部位。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致嵌合共刺激受體(CCR)增加及/或過度表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由以下組成之群組之趨化激素受體增加及/或過度表現：CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2及/或CSCR3。

【1379】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致介白素增加及/或過度表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由以下組成之群組之介白素增加及/或過度表現：IL-2、IL-12、IL-15及/或IL-21。

【1380】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導

致NOTCH 1/2 ICD增加及/或過度表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致VHL增加及/或過度表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CD44增加及/或過度表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PIK3CD增加及/或過度表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致SOCS1增加及/或過度表現。

【1381】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致cAMP蛋白激酶A(PKA)之表現降低及/或減少。

【1382】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由以下組成之群組之分子之表現降低及/或減少：PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由以下組成之群組之兩種分子之表現降低及/或減少：PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及選自由以下組成之群組之一種分子之表現降低及/或減少：LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致以下之表現降低及/或減少：PD-1、LAG3、CISH、CBLB、TIM3及其組合。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及以下中之一者之表現降低及/或減少：LAG3、CISH、CBLB、TIM3及其組合。在一些實施例

中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及LAG3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及CISH之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及CBLB之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致LAG3及CISH之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致LAG3及CBLB之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CISH及CBLB之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TIM3及PD-1之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TIM3及LAG3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TIM3及CISH之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TIM3及CBLB之表現降低及/或減少。

【1383】在一些實施例中，選自由CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及其組合組成之群組之黏著分子藉由γ逆轉錄病毒或慢病毒方法插入第一TIL群體、第二TIL群體或所收集TIL群體中(例如黏著分子之表現增加)。

【1384】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合組成之群組之分子的表現降低及/或減少，及CCR2、CCR4、CCR5、

CXCR2、CXCR3、CX3CR1及其組合的表現增加及/或增強。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由PD-1、LAG3、TIM3、CISH、CBLB及其組合組成之群組之分子的表現降低及/或減少，及CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及其組合的表現增加及/或增強。

【1385】在一些實施例中，表現減少約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約80%。在一些實施例中，表現減少至少約85%。在一些實施例中，表現減少至少約90%。在一些實施例中，表現減少至少約95%。在一些實施例中，表現減少至少約99%。

【1386】在一些實施例中，表現增加約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現增加至少約65%、約70%、約75%、約80%、約

85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現增加至少約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現增加至少約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現增加至少約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現增加至少約80%。在一些實施例中，表現增加至少約85%。在一些實施例中，表現增加至少約90%。在一些實施例中，表現增加至少約95%。在一些實施例中，表現增加至少約99%。

【1387】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現藉由用轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時性改變TIL中之蛋白質表現之分子處理TIL來誘導。在一些實施例中，採用無SQZ載體之微流體平台進行轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現之分子的細胞內遞送。此類方法展示了將蛋白質(包含轉錄因子)遞送至多種初代人類細胞(包含T細胞)的能力(Sharei等人. 《美國國家科學院院刊(PNAS)》 2013，以及Sharei等人. 《公共科學圖書館·綜合(PLOS ONE)》 2015及Greisbeck 等人. 《免疫學雜誌》 第195卷, 2015)已經描述；參見，例如，國際專利公開案WO 2013/059343A1、WO 2017/008063A1及WO 2017/123663A1，以上全部均以全文引用之方式併入本文中。描述於國際專利公開案WO 2013/059343A1、WO 2017/008063A1及WO 2017/123663A1之此類方法可用於本發明中，以將TIL群體暴露於轉錄因子(TF)及/或其他能夠誘導暫時性蛋白質表現之分子，其中該等TF及/或其他能

夠誘導暫時性蛋白質表現之分子使TIL群體中之腫瘤抗原之表現增加及/或腫瘤抗原特異性T細胞之數目增加，從而導致TIL群體重新程式化及重新程式化TIL群體之治療功效相較於非重新程式化TIL群體增加。在一些實施例中，重新程式化導致相對於開始或先前TIL群體(亦即，在重新程式化之前)，效應T細胞及/或中央記憶T細胞亞群增加，如本文所描述。

【1388】在一些實施例中，轉錄因子(TF)包含但不限於TCF-1、NOTCH 1/2 ICD及/或MYB。在一些實施例中，轉錄因子(TF)為TCF-1。在一些實施例中，轉錄因子(TF)為NOTCH 1/2 ICD。在一些實施例中，轉錄因子(TF)為MYB。在一些實施例中，轉錄因子(TF)與誘導性富潛能幹細胞培養物(iPSC)，諸如市售KNOCKOUT血清替代品(Gibco/賽默飛世爾)一起投予，以誘導另外TIL重新程式化。在一些實施例中，轉錄因子(TF)與iPSC混合物一起投予，以誘導另外TIL重新程式化。在一些實施例中，轉錄因子(TF)不與iPSC混合物一起投予。在一些實施例中，重新程式化導致TSCM之百分比增加。在一些實施例中，重新程式化導致TSCM之百分比增加約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95% TSCM。

【1389】在一些實施例中，如上文所描述之暫時性改變蛋白質表現之方法可與基因修飾TIL群體之方法組合，

包含穩定併入基因以產生一種或多種蛋白質之步驟。在某些實施例中，方法包括基因修飾TIL群體之步驟。在某些實施例中，方法包括基因修飾第一TIL群體、第二TIL群體及/或第三TIL群體。在一實施例中，基因修飾TIL群體之方法包含逆轉錄病毒轉導之步驟。在一實施例中，基因修飾TIL群體之方法包含慢病毒轉導之步驟。慢病毒轉導系統為本領域中已知的且描述於例如以下中：Levine等人，《美國國家科學院院刊》2006, 103, 17372-77；Zufferey等人，《自然生物技術學》1997, 15, 871-75；Dull等人，《病毒學雜誌》 1998, 72, 8463-71及美國專利第6,627,442號，其中每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，基因修飾TIL群體之方法包含γ-逆轉錄病毒轉導之步驟。γ-逆轉錄病毒轉導系統為本領域中已知的且描述於例如Cepko及Pear, 《分子生物學中之當前方案(Cur.案》1996, 9.9.1-9.9.16，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，基因修飾TIL群體之方法包含轉位子介導之基因轉移之步驟。轉位子介導之基因轉移系統為本領域中已知的，且包含其中轉位酶作為DNA表現載體或作為可表現的RNA或蛋白質提供，使得轉位酶之長期表現不發生在轉殖基因細胞中，例如提供為mRNA(例如包括帽及多腺苷酸尾之mRNA)的轉位酶。包含類鮭魚型Tel樣轉位酶(SB或睡美人轉位酶)，諸如SB10、SB11及SB100x；及酶活性增加之經工程改造酶之合適的轉位子介導之基因轉移系統描述於例如以下中：Hackett等人，《分

子療法》2010, 18, 674-83及美國專利第6,489,458號，其中每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1390】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現為由自我遞送RNA干擾(self-delivering RNA interference；sdRNA)誘導之表現減少，該自我遞送RNA干擾為具有高百分比之2'-OH取代(通常氟或-OCH_3)之化學上合成的不對稱siRNA雙螺旋，其包括20個核苷酸之反義(引導)股及使用四乙基乙二醇(TEG)連接子在其3'端處與膽固醇結合之13至15個鹼基有義(乘客)股。在一些實施例中，該方法包括暫時性改變TIL群體中的蛋白質表現，包括使用自我遞送RNA干擾(sdRNA)，其為具有高百分比之2'-OH取代(通常氟或-OCH_3)之化學上合成的不對稱siRNA雙螺旋，其包括20個核苷酸之反義(引導)股及使用四乙基乙二醇(TEG)連接子在其3'端處與膽固醇結合之13至15個鹼基有義(乘客)股。使用sdRNA之方法已描述於以下中：Khvorova及Watts, 《自然生物技術學》2017, *35*, 238-248；Byrne等人, 《眼藥理學與治療學雜誌(*J. Ocul.Pharmacol.Ther.*)》2013, 29, 855-864；及Ligtenberg等人, 《分子療法》2018(印製中)，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，將sdRNA遞送至TIL群體無需使用電穿孔、SQZ或其他方法完成，而是使用1至3天的時段即可完成，其中將TIL群體暴露於在培養基中濃度為1 μM/10,000個TIL的sdRNA。在某些實施例中，該方法包括遞送sdRNA至TIL群體，其包括將TIL群體暴露於在培養基中濃度為1 μM/

10,000個TIL之sdRNA持續1至3天之間的時段。在一實施例中，將sdRNA遞送至TIL群體係使用1至3天時段完成，其中使TIL群體暴露於在培養基中濃度為10 μM/10,000個TIL之sdRNA。在一實施例中，將sdRNA遞送至TIL群體係使用1至3天時段完成，其中使TIL群體暴露於在培養基中濃度為50 μM/10,000個TIL之sdRNA。在一實施例中，將sdRNA遞送至TIL群體係使用1至3天時段完成，其中使TIL群體暴露於在培養基中濃度介於0.1 μM/10,000個TIL與50 μM/10,000個TIL之間的sdRNA。在一實施例中，將sdRNA遞送至TIL群體係使用1至3天的時段完成，其中使TIL群體暴露於在培養基中濃度介於0.1 μM/10,000個TIL與50 μM/10,000個TIL之間的sdRNA，其中該暴露於sdRNA係藉由將新鮮sdRNA添加至培養基中來進行兩次、三次、四次或五次。其他合適過程描述於例如以下中：美國專利申請公開案第US 2011/0039914 A1號、第US 2013/0131141 A1號及第US 2013/0131142 A1號，及美國專利第9,080,171號，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1391】在一些實施例中，在製造期間將sdRNA插入TIL群體中。在一些實施例中，sdRNA編碼干擾以下之RNA：NOTCH 1/2 ICD、PD-1、CTLA-4、TIM3、LAG3、TIGIT、TGFβ、TGFBR2、cAMP蛋白激酶A(PKA)、BAFFBR3、CISH及/或CBLB。在一些實施例中，表現減少係基於例如如藉由流動式細胞測量術及/或qPCR評估之基因靜默之百分比而判定。在一些實施例中，表現減少約5%、

約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約80%。在一些實施例中，表現減少至少約85%。在一些實施例中，表現減少至少約90%。在一些實施例中，表現減少至少約95%。在一些實施例中，表現減少至少約99%。

【1392】基於化學修飾siRNA之自我可遞送RNAi技術可用於本發明之方法中，以成功遞送sdRNA至如本文所描述之TIL。具有不對稱siRNA結構之主鏈修飾與疏水性配體之組合(參見例如Ligtenberg等人，《分子療法》2018及US20160304873)允許sdRNA藉由簡單添加至培養基而穿透培養的哺乳動物細胞而不需要另外的調配物及方法，從而利用sdRNA之核酸酶穩定性。此穩定性允許僅藉由維持sdRNA於培養基中之有效濃度，支援恆定含量之RNAi介導之目標基因活性減少。儘管不受理論束縛，但sdRNA之主鏈穩定化提供延長減少基因表現效應，其在非分裂細胞中可持續數月。

【1393】在一些實施例中，超過95%之TIL轉染效率

及目標之表現減少藉由各種特定sdRNA發生。在一些實施例中，含有若干未經修飾之核糖殘基之sdRNA經完全修飾的序列置換，以增加RNAi效應之效力及/或壽命。在一些實施例中，表現減少效應維持12小時、24小時、36小時、48小時、5天、6天、7天或8天或更久。在一些實施例中，表現減少效應在sdRNA處理TIL 10天或更久後降低。在一些實施例中，目標表現維持超過70%之表現減少。在一些實施例中，TIL中之目標表現維持超過70%之表現減少。在一些實施例中，PD-1/PD-L1路徑中之表現減少允許TIL展現更強效的活體內效應，此在一些實施例中係因為避免PD-1/PD-L1路徑之抑制效應。在一些實施例中，因sdRNA之PD-1之表現減少導致增加TIL增殖。

【1394】在一些實施例中，暫時性改變TIL中之蛋白質表現係由小干擾RNA(small interfering RNA；siRNA)誘導，該小干擾RNA有時稱為短干擾RNA或靜默RNA，其為雙股RNA分子，長度一般為19-25個鹼基對。siRNA用於RNA干擾(RNA interference；RNAi)中，其中siRNA干擾具有互補核苷酸序列之特定基因之表現。siRNA可用於暫時性減弱TIL中根據本發明亦經修飾為CCR之基因。

【1395】雙股DNA(dsRNA)可通常用以定義包括一對互補RNA股，一般有義(乘客)及反義(引導)股之任何分子，且可包含單股懸垂臂區。與siRNA不同，術語dsRNA一般係指包含siRNA分子之序列之前驅物分子，該siRNA分子藉由裂解酶系統(包含Dicer)之作用自較大dsRNA分子

釋放。

【1396】sdRNA(自我可遞送RNA)係一類新的經共價修飾之RNAi化合物，其與傳統siRNA相比，不需要遞送載體即可進入細胞，且具有改良之藥理學。「自我可遞送RNA」或「sdRNA」係一種疏水經修飾之RNA干擾-反義雜合體，其在活體外初代細胞及活體內局部投予後經證明為高度有效的。已證明無毒性下之穩固吸收及/或沉默。sdRNA通常係具有最少雙股區域之不對稱化學修飾的核酸分子。sdRNA分子通常含有單股區域及雙股區域，且可以在分子的單股及雙股區域內含有多種化學修飾。此外，如本文所描述，sdRNA分子可連接至疏水結合物，諸如習知及高級的固醇型分子。sdRNAs及用於製造此類sdRNAs的相關方法亦已在例如US20160304873、WO2010033246、WO2017070151、WO2009102427、WO2011119887、WO2010033247A2、WO2009045457、WO2011119852中廣泛描述，以上所有之全部內容出於所有目的以引用之方式併入本文中。為了最佳化sdRNA結構、化學性質、靶向位置、序列偏好及其類似者，已開發一種演算法且將其用於sdRNA效力預測(參見例如US 20160304873)。基於此等分析，功能性sdRNA序列一般定義為在1 μM濃度下表現減少超過70%，其中概率超過40%。

【1397】在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列展現70%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列展現75%之目標基因表現減少。

在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列展現80%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列展現85%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列展現90%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列展現95%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列展現99%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約0.25 μM至約4 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約0.25 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約0.5 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約0.75 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約1.0 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約1.25 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約1.5 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約1.75 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約2.0 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約2.25 μM之

濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約2.5 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約2.75 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約3.0 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約3.25 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約3.5 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約3.75 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約4.0 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。

【1398】在一些實施例中，寡核苷酸劑包括一種或多種修飾以增加治療劑之穩定性及/或有效性及實現寡核苷酸至待治療之細胞或組織之有效遞送。此類修飾可包含2'-O-甲基修飾、2'-O-氟修飾、二硫代磷酸酯修飾、2' F修飾的核苷酸、2'-O-甲基修飾的及/或2'去氧核苷酸。在一些實施例中，寡核苷酸經修飾以包含一個或多個疏水性修飾，包含例如固醇、膽固醇、維生素D、萘基、異丁基、苯甲基、吲哚、色胺酸及/或苯基。在另一特定實施例中，化學修飾的核苷酸為硫代磷酸酯、2'-O-甲基、2'去氧、疏水性修飾及硫代磷酸酯之組合。在一些實施例中，糖可經修飾且經修飾的糖可包含但不限於D-核糖、2'-O-

烷基(包含2'-O-甲基及2'-O-乙基)，亦即2'-烷氧基、2'-胺基、2'-S-烷基、2'-鹵基(包含2'-氟)、T-甲氧基乙氧基、2'-烯丙氧基(-$OCH_2CH=CH_2$)、2'-炔丙基、2'-丙基、乙炔基、乙烯基、丙烯基及氰基及其類似者。在一個實施例中，糖部分可為己醣且併入寡核苷酸中，如Augustyns等人，《核酸研究(*Nucl.Acids.Res.*)》**1992,** *18,* 4711中所描述。

【1399】在一些實施例中，本發明之雙股寡核苷酸在其整個長度上為雙股，亦即在分子之任一端處無懸垂單股序列，亦即為鈍端。在一些實施例中，個別核酸分子可具有不同長度。換言之，本發明之雙股寡核苷酸在其整個長度上不為雙股。舉例而言，當使用兩個分開的核酸分子時，分子中之一者，例如包括反義序列之第一分子可比與其雜交之第二分子更長(留下一部分之分子為單股)。在一些實施例中，當使用單核酸分子時，在任一端處之一部分之分子可保持單股。

【1400】在一些實施例中，本發明之雙股寡核苷酸含有錯配及/或環或凸起，但在至少約70%之寡核苷酸長度上為雙股的。在一些實施例中，本發明之雙股寡核苷酸在至少約80%之寡核苷酸長度上為雙股的。在另一實施例中，本發明之雙股寡核苷酸在至少約90%-95%之寡核苷酸長度上為雙股的。在一些實施例中，本發明之雙股寡核苷酸在至少約96%-98%之寡核苷酸長度上為雙股的。在一些實施例中，本發明之雙股寡核苷酸含有至少或至多1、2、3、

4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個錯配。

【1401】在一些實施例中，寡核苷酸可例如藉由修飾3'或5'鍵聯而實質上保護免受核酸酶影響(例如美國專利第5,849,902號及WO 98/13526)。舉例而言，寡核苷酸可藉由納入「阻斷基團」而具有抗性。如本文所用之術語「阻斷基團」係指可作為用於合成之保護基或偶合基團與寡核苷酸或核單體連接之取代基(例如除OH基團以外)(例如FITC、丙基(CH_2-CH_2-CH_3)、二醇(-0-CH_2-CH_2 -O-)磷酸鹽($PO_3^{2"}$)、膦酸氫鹽或胺基亞磷酸酯)。「阻斷基團」亦可包含「末端阻斷基團」或「核酸外切酶阻斷基團」，其保護寡核苷酸之5'及3'端，其包含經修飾的核苷酸及非核苷酸核酸外切酶抗性結構。

【1402】在一些實施例中，sdRNA內之至少一部分連續多核苷酸藉由取代基鍵聯，例如硫代磷酸酯鍵聯連接。

【1403】在一些實施例中，化學修飾可導致至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500細胞攝取增強。在一些實施例中，C或U殘基中之至少一者包含疏水性修飾。在一些實施例中，複數個C及U含有疏水性修飾。在一些實施例中，至少10%、15%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、

65%、70%、75%、80%、85%、90%或至少95%之C及U可含有疏水性修飾。在一些實施例中，所有C及U均含有疏水性修飾。

【1404】在一些實施例中，sdRNA或sd-rxRNAs經由併入可質子化胺而展現增強的sd-rxRNA分子的胞內體釋放。在一些實施例中，將可質子化胺併入有義股中(在RISC裝載後被捨棄的分子部分中)。在一些實施例中，本發明之sdRNA化合物包括不對稱化合物，該不對稱化合物包括雙螺旋區(有效RISC進入所需，10-15個鹼基長)及4-12個核苷酸長之單股區；具有13個核苷酸的雙螺旋。在一些實施例中，採用6個核苷酸的單股區。在一些實施例中，sdRNA之單股區包括2-12個硫代磷酸酯核苷酸間鍵聯(稱為硫代磷酸酯修飾)。在一些實施例中，採用6-8個硫代磷酸酯核苷酸間鍵聯。在一些實施例中，本發明之sdRNA化合物亦包含獨特的化學修飾模式，其提供穩定性且與RISC進入相容。

【1405】舉例而言，引導股亦可藉由任何證實穩定性而不干擾RISC進入之化學修飾來修飾。在一些實施例中，引導股中之化學修飾模式包含大部分為2' F修飾且5'端經磷酸化之C及U核苷酸。

【1406】在一些實施例中，sdRNA或sd-rxRNA中至少30%核苷酸係經修飾的。在一些實施例中，sdRNA或sd-rxRNA中至少30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、

46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之核苷酸為經修飾的。在一些實施例中，sdRNA或sd-rxRNA中100%之核苷酸為經修飾的。

【1407】在一些實施例中，sdRNA分子具有極少雙股區。在一些實施例中，分子之雙股區介於8-15個核苷酸長範圍內。在一些實施例中，分子之雙股區為8、9、10、11、12、13、14或15個核苷酸長。在一些實施例中，雙股區為13個核苷酸長。引導股與乘客股之間可有100%互補性，或引導股與乘客股之間可存在一個或多個錯配。在一些實施例中，在雙股分子之一端上，分子為鈍端或具有一個核苷酸之懸垂臂。分子之單股區在一些實施例中係介於4-12個核苷酸長。在一些實施例中，單股區可為4、5、6、7、8、9、10、11或12個核苷酸長。在一些實施例中，單鏈區亦可小於4個核苷酸或大於12個核苷酸長。在某些實施例中，單股區為6或7個核苷酸長。

【1408】在一些實施例中，sdRNA分子具有增加的穩定性。在一些情況下，化學修飾的sdRNA或sd-rxRNA分子在培養基中之半衰期長於1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、

22、23、24或超過24小時，包含任何中間值。在一些實施例中sd-rxRNA在培養基中之半衰期長於12小時。

【1409】在一些實施例中，對sdRNA進行最佳化以增加效力及/或減少毒性。在一些實施例中，引導股及/或乘客股之核苷酸長度及/或引導股及/或乘客股中硫代磷酸酯修飾之數目在一些態樣中可影響RNA分子之效力，而用2'-0-甲基(2'OMe)修飾置換2'-氟(2'F)修飾在一些態樣中可影響分子之毒性。在一些實施例中，預期減少分子之2'F含量將減少分子之毒性。在一些實施例中，RNA分子中硫代磷酸酯修飾之數目可影響攝取分子至細胞中，例如被動攝取分子至細胞中之效率。在一些實施例中，sdRNA不具有2'F修飾，但其特徵為細胞攝取與組織滲透方面之功效相等。

【1410】在一些實施例中，引導股之長度為大約18-19個核苷酸且具有大約2-14個磷酸酯修飾。舉例而言，引導股可含有2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或超過14個經磷酸酯修飾之核苷酸。引導股可含有一個或多個賦予增加的穩定性而不干擾RISC進入之修飾。磷酸酯修飾的核苷酸，諸如硫代磷酸酯修飾的核苷酸，可在3'端、5'端或遍佈於整個引導股中。在一些實施例中，引導股之3'端10個核苷酸含有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個硫代磷酸酯修飾的核苷酸。引導股亦可含有2'F及/或2'OMe修飾，其可位於整個分子中。在一些實施例中，引導股中位置一之核苷酸(引導股之最5'位置中之核苷酸)經

2'OMe修飾及/或磷酸化。引導股內之C及U核苷酸可經2'F修飾。舉例而言，19個核苷酸之引導股之位置2-10(或不同長度之引導股中之對應位置)中之C及U核苷酸可經2'F修飾。引導股內之C及U核苷酸亦可經2'OMe修飾。舉例而言，19個核苷酸之引導股之位置11-18(或不同長度之引導股中之對應位置)中之C及U核苷酸可經2'OMe修飾。在一些實施例中，在引導股之最3'端處之核苷酸未經修飾。在某些實施例中，引導股內之大部分C及U經2'F修飾，且引導股之5'端經磷酸化。在其他實施例中，位置1及位置11-18中之C或U經2'OMe修飾，且引導股之5'端經磷酸化。在其他實施例中，位置1及位置11-18中之C或U經2'OMe修飾，引導股之5'端經磷酸化，且位置2-10中之C或U經2'F修飾。

【1411】自我可遞送RNAi技術提供一種直接用RNAi劑轉染細胞而無需另外的調配物或技術之方法。轉染難以轉染細胞株之能力、高活體內活性及使用簡單為該等組合物及方法之特徵，其相對於基於siRNA之傳統技術存在顯著的功能優勢，且因此在關於減少本發明之TIL中目標基因表現之方法之若干實施例中採用sdRNA方法。sdRNAi方法允許直接遞送化學合成化合物至廣泛範圍之離體及活體內初代細胞及組織。在本文中本發明之一些實施例中描述之sdRNA可購自美國馬薩諸塞州伍斯特之Advirna LLC。

【1412】sdRNA形成為疏水性修飾的siRNA-反義寡核苷酸雜交結構，且揭示於例如Byrne等人，2013年12月，

《眼科藥理學及治療雜誌(J. Ocular Pharmacology and Therapeutics)》，29(10): 855-864中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1413】在一些實施例中，sdRNA寡核苷酸可使用無菌電穿孔遞送至本文所描述之TIL。在某些實施例中，該方法包括無菌電穿孔TIL群體以遞送sdRNA寡核苷酸。

【1414】在一些實施例中，寡核苷酸可與跨膜遞送系統組合遞送至細胞。在一些實施例中，此跨膜遞送系統包括脂質、病毒載體及其類似者。在一些實施例中，寡核苷酸劑為不需要任何遞送劑之自我遞送RNAi劑。在某些實施例中，該方法包括使用跨膜遞送系統來遞送sdRNA寡核苷酸至TIL群體。

【1415】使寡核苷酸及寡核苷酸組合物與本文所描述之TIL接觸(例如使其接觸，在本文中亦稱為投予或遞送至)且被攝入，包含經由TIL被動攝取。sdRNA可在以下時添加至如本文所描述之TIL：在第一擴增期間(例如步驟B)、在第一擴增之後(例如在步驟C期間)、在第二擴增之前或期間(例如在步驟D之前或期間)、在步驟D之後且在步驟E中收集之前、在步驟F中收集期間或之後、在步驟F中最終調配及/或轉移至輸注袋之前或期間、以及在步驟F中任何視情況冷凍保存步驟之前。此外，sdRNA可在自步驟F中任何冷凍保存步驟解凍之後添加。在一實施例中，可將一個或多個靶向如本文中所描述之基因(包含PD-1、LAG3、TIM3、CISH及CBLB)之sdRNA，以選自由100 nM

至20 mM、200 nM至10 mM、500 nm至1 mM、1 μM至100 μM及1 μM至100 μM組成之群組之濃度，添加至包括TIL及其他試劑之細胞培養基。在一實施例中，可將一個或多個靶向如本文中所描述之基因(包含PD-1、LAG3、TIM3、CISH及CBLB)之sdRNA，以選自由以下組成之群組之量添加至包括TIL及其他試劑之細胞培養基：0.1 μM sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、0.5 μM sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、0.75 μM sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、1 μM sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、1.25 μM sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、1.5 μM sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、2 μM sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、5 μM sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基或10 μM sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基。在一實施例中，可將一個或多個靶向如本文中所描述之基因(包含PD-1、LAG3、TIM3、CISH及CBLB)之sdRNA，在REP前或REP階段期間一天兩次、一天一次、每兩天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次或每七天一次添加至TIL培養物。

【1416】本發明之寡核苷酸組合物，包含sdRNA，可在擴增過程期間，例如藉由將高濃度sdRNA溶解於細胞培養培養基中及允許足夠時間發生被動攝取而與如本文所描述之TIL接觸。在某些實施例中，本發明方法包括使TIL群體與如本文所描述之寡核苷酸組合物接觸。在某些實施例中，該方法包括將寡核苷酸，例如sdRNA，溶解於細胞培

養基中，且使細胞培養基與TIL群體接觸。TIL可為如本文所描述之第一群體、第二群體及/或第三群體。

【1417】在一些實施例中，遞送寡核苷酸至細胞中可藉由合適的本領域公認方法增強，包含磷酸鈣、DMSO、甘油或聚葡萄糖、電穿孔或藉由轉染，例如使用陽離子、陰離子或中性脂質組合物或脂質體，使用本領域中已知的方法(參見例如WO 90/14074、WO 91/16024、WO 91/17424、美國專利第4,897,355號；Bergan等人1993.《核酸研究》21: 3567)。

【1418】在一些實施例中，使用超過一種sdRNA來減少目標基因表現。在一些實施例中，靶向sdRNA之PD-1、TIM3、CBLB、LAG3及/或CISH中之一者或多者一起使用。在一些實施例中，PD-1 sdRNA與TIM3、CBLB、LAG3及/或CISH中之一者或多者一起使用，以減少超過一種基因目標之表現。在一些實施例中，LAG3 sdRNA與靶向sdRNA之CISH組合使用，以減少兩種目標之基因表現。在一些實施例中，本文中靶向PD-1、TIM3、CBLB、LAG3及/或CISH中之一者或多者之sdRNA可購自美國馬薩諸塞州伍斯特的Advirna LLC(Advirna LLC, Worcester, MA, USA)。

【1419】在一些實施例中，sdRNA靶向選自由以下組成之群組之基因：PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，sdRNA靶向選自由以下組成之群

組之基因：PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，一種sdRNA靶向PD-1，且另一種sdRNA靶向選自由以下組成之群組之基因：LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，sdRNA靶向選自以下之基因：PD-1、LAG3、CISH、CBLB、TIM3及其組合。在一些實施例中，sdRNA靶向選自PD-1及以下中之一者之基因：LAG3、CISH、CBLB、TIM3及其組合。在一些實施例中，一種sdRNA靶向PD-1並且一種sdRNA靶向LAG3。在一些實施例中，一種sdRNA靶向PD-1並且一種sdRNA靶向CISH。在一些實施例中，一種sdRNA靶向PD-1並且一種sdRNA靶向CBLB。在一些實施例中，一種sdRNA靶向LAG3並且一種sdRNA靶向CISH。在一些實施例中，一種sdRNA靶向LAG3並且一種sdRNA靶向CBLB。在一些實施例中，一種sdRNA靶向CISH並且一種sdRNA靶向CBLB。在一些實施例中，一種sdRNA靶向TIM3並且一種sdRNA靶向PD-1。在一些實施例中，一種sdRNA靶向TIM3並且一種sdRNA靶向LAG3。在一些實施例中，一種sdRNA靶向TIM3並且一種sdRNA靶向CISH。在一些實施例中，一種sdRNA靶向TIM3並且一種sdRNA靶向CBLB。

【1420】如上文所論述，本發明之實施例提供：已經由基因編輯進行基因修飾以增強其治療作用。本發明之實施例涵蓋經由核苷酸插入(RNA或DNA)TIL群體中進行之

基因編輯，以促進一種或多種蛋白質之表現及抑制一種或多種蛋白質之表現以及其組合本發明之實施例亦提供用於將TIL擴增為治療性群體之方法，其中該等方法包括基因編輯TIL。存在若干種可用於基因修飾TIL群體之基因編輯技術，該等基因編輯技術適合於根據本發明使用。

【1421】在一些實施例中，方法包括基因修飾TIL群體之方法，該方法包含穩定併入用於產生一種或多種蛋白質之基因的步驟。在一實施例中，基因修飾TIL群體之方法包含逆轉錄病毒轉導之步驟。在一實施例中，基因修飾TIL群體之方法包含慢病毒轉導之步驟。慢病毒轉導系統為本領域中已知的且描述於例如以下中：Levine等人，《美國國家科學院院刊》2006, 103, 17372-77；Zufferey等人，《自然生物技術學》1997, 15, 871-75；Dull等人，《病毒學雜誌》 1998, 72, 8463-71及美國專利第6,627,442號，其中每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，基因修飾TIL群體之方法包含γ-逆轉錄病毒轉導之步驟。γ-逆轉錄病毒轉導系統為本領域中已知的且描述於例如Cepko及Pear, 《分子生物學中之當前方案(Cur.案》1996, 9.9.1-9.9.16，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，基因修飾TIL群體之方法包含轉位子介導之基因轉移之步驟。轉位子介導之基因轉移系統為本領域中已知的，且包含其中轉位酶作為DNA表現載體或作為可表現的RNA或蛋白質提供，使得轉位酶之長期表現不發生在轉殖基因細胞中，例如提供為mRNA(例如包

括帽及多腺苷酸尾之mRNA)的轉位酶。包含類鮭魚型Tel樣轉位酶(SB或睡美人轉位酶)，諸如SB10、SB11及SB100x；及酶活性增加之經工程改造酶之合適的轉位子介導之基因轉移系統描述於例如以下中：Hackett等人，《分子療法》2010, 18, 674-83及美國專利第6,489,458號，其中每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1422】在一實施例中，該方法包括基因修飾TIL群體之方法，該TIL群體例如如本文所描述之第一群體、第二群體及/或第三群體。在一實施例中，基因修飾TIL群體之方法包含穩定併入用於產生或抑制(例如靜默)一種或多種蛋白質之基因之步驟。在一實施例中，基因修飾TIL群體之方法包含電穿孔之步驟。電穿孔方法為本領域中已知的，且描述於例如以下中：Tsong, 《生物理雜誌》1991, 60, 297-306及美國專利申請公開案第2014/0227237 A1號，其中每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。可使用本領域中已知之其他電穿孔方法，諸如以下中描述之彼等電穿孔方法：美國專利第5,019,034號、第5,128,257號、第5,137,817號、第5,173,158號、第5,232,856號、第5,273,525號、第5,304,120號、第5,318,514號、第6,010,613號及第6,078,490號，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，電穿孔方法為無菌電穿孔方法。在一實施例中，電穿孔方法為脈衝電穿孔方法。在一實施例中，電穿孔方法為脈衝電穿孔方法，其包括用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的

永久性或暫時性變化之步驟，包括向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制、獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該一系列至少三個DC電脈衝具有一個、兩個或三個以下特徵：(1)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝振幅上彼此不同；(2)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝寬度上彼此不同；及(3)第一組該至少三個脈衝中兩者的第一脈衝間隔與第二組至少三個脈衝中兩者的第二脈衝間隔不同。在一實施例中，電穿孔方法為脈衝電穿孔方法，其包括用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包括向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝振幅上彼此不同。在一些實施例中，電穿孔方法為脈衝電穿孔方法，其包括用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包括向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝寬度上彼此不同。在一實施例中，電穿孔方法為脈衝電穿孔方法，其包括用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包括向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中第一組

該至少三個脈衝中兩者的第一脈衝間隔與第二組該至少三個脈衝中兩者的第二脈衝間隔不同。在一實施例中，電穿孔方法為脈衝電穿孔方法，其包括用脈衝電場處理TIL以誘導TIL中孔形成之步驟，包括向TIL施加一系列至少三個DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該一系列至少三個DC電脈衝具有一個、兩個或三個以下特徵：(1)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝振幅上彼此不同；(2)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝寬度上彼此不同；及(3)第一組該至少三個脈衝中兩者的第一脈衝間隔與第二組該至少三個脈衝中兩者的第二脈衝間隔不同，使得所誘導的孔持續相對長的時段，及使得維持TIL之存活性。在一實施例中，基因修飾TIL群體之方法包含磷酸鈣轉染之步驟。磷酸鈣轉染方法(磷酸鈣DNA沈澱、細胞表面包覆及胞吞作用)為本領域中已知的且描述於以下中：Graham及van der Eb, 《病毒學》 1973, *52*, 456-467；Wigler等人, 《美國國家科學院院刊》 1979, *76*, 1373-1376；及Chen及Okayarea, 《分子細胞生物學》 1987, *7*, 2745-2752；及美國專利第5,593,875號，其中每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，基因修飾TIL群體之方法包含脂質體轉染之步驟。脂質體轉染方法，諸如採用陽離子脂質*N*-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-*n*, *n*,*n*-三甲基氯化銨(DOTMA)及二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)於過濾水中之1: 1(w/w)脂質體調配物之方法為本領域中已知的且描述於以下中：Rose等人, 《生物技

術》 1991, 10, 520-525及Felgner等人, 《美國國家科學院院刊》, 1987, 84, 7413-7417以及美國專利第5,279,833號、第5,908,635號、第6,056,938號、第6,110,490號、第6,534,484號及第7,687,070號，其中每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，基因修飾TIL群體之方法包含使用以下中描述之方法進行轉染之步驟：美國專利第5,766,902號、第6,025,337號、第6,410,517號、第6,475,994號及第7,189,705號，其中每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。TIL可為如本文所描述之第一TIL群體、第二TIL群體及/或第三TIL群體。

【1423】根據一實施例，基因編輯方法可包括使用介導在一個或多個免疫檢查點基因處產生雙股或單股斷裂之可程式化核酸酶。此類可程式化核酸酶藉由在特定基因體基因座處引入斷裂而能夠進行精確基因體編輯，亦即其依賴於識別基因體內之特定DNA序列以將核酸酶域靶向此位置且介導在目標序列處產生雙股斷裂。DNA中之雙股斷裂隨後將內源性修復機制募集至斷裂位點，以藉由非同源末端連接(NHEJ)或同源定向修復(HDR)來介導基因體編輯。因此，斷裂之修復可導致引入擾亂(例如靜默、抑制或增強)目標基因產物之插入/缺失突變。

【1424】經開發而使得能夠進行位點特異性基因體編輯之核酸酶之主要類別包含鋅指核酸酶(zinc finger nuclease；ZFN)、轉錄活化因子樣核酸酶(transcription activator-like nucleases；TALEN)及CRISPR相關核酸酶(例

如CRISPR/Cas9)。此等核酸酶系統可基於其DNA識別模式而大致分類為兩類：ZFN及TALEN經由蛋白質-DNA相互作用達成特定DNA結合，而CRISPR系統，諸如Cas9，藉由與目標DNA直接鹼基配對之短RNA引導分子及藉由蛋白質-DNA相互作用而靶向特定DNA序列。參見例如Cox等人，《自然醫學(*Nature Medicine*)》，2015，第21卷，第2期。

【1425】可根據本發明之TIL擴增方法使用之基因編輯方法之非限制性實例包含CRISPR方法、TALE方法及ZFN方法，該等方法在下文更詳細地描述。根據一實施例，將TIL擴增為治療性群體之方法可根據本文所描述之方法(例如GEN 3過程)之任一實施例或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所描述進行，其中該方法進一步包括藉由CRISPR方法、TALE方法或ZFN方法中之一者或多者基因編輯至少一部分的TIL，以產生可提供增強治療效果的TIL。根據一實施例，可藉由活體外比較基因編輯的TIL與未經修飾的TIL，例如藉由評估相較於未經修飾的TIL之活體外效應功能、細胞介素概況等，來評估基因編輯的TIL之改善的治療效果。在某些實施例中，方法包括使用CRISPR、TALE及/或ZFN方法來基因編輯TIL群體。

【1426】在本發明之一些實施例中，使用電穿孔來遞送基因編輯系統，諸如CRISPR、TALEN及ZFN系統。在本發明之一些實施例中，電穿孔系統為流式電穿孔系統。

適用於本發明之一些實施例之合適的流式電穿孔系統之實例為市售MaxCyte STX系統。有若干種可能適用於本發明之替代性市售電穿孔儀器，諸如可獲自BTX-Harvard Apparatus之AgilePulse系統或ECM 830、Cellaxess Elektra (Cellectricon)、Nucleofector(龍沙(Lonza)/Amaxa)、GenePulser MXcell(伯樂(BIORAD)、iPorator-96(Primax)或siPORTer96(Ambion)。在本發明之一些實施例中，電穿孔系統與TIL擴增方法之其餘部分一起形成密閉無菌系統。在本發明之一些實施例中，電穿孔系統為如本文中所描述之脈衝電穿孔系統，且與TIL擴增方法之其餘部分一起形成密閉無菌系統。

【1427】用於將TIL擴增為治療性群體之方法可根據本文所描述之方法(例如過程GEN 3)之任何實施例或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633號中所描述進行，其中該方法進一步包括藉由CRISPR方法(例如CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1)基因編輯至少一部分的TIL。根據特定實施例，在TIL擴增過程期間使用CRISPR方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一種或多種免疫檢查點基因之表現靜默或減少。替代地，在TIL擴增過程期間使用CRISPR方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一種或多種免疫檢查點基因之表現增強。

【1428】CRISPR代表「成簇規律間隔短回文重複序列(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)」。使用CRISPR系統進行基因編輯之方法在本文

中亦稱為CRISPR方法。有三種類型之併入RNA及Cas蛋白且可根據本發明使用之CRISPR系統：I、II及III型。II型CRISPR (藉由Cas9例示)為最充分表徵之系統之一。

【1429】CRISPR技術係改編自細菌及古菌(單細胞微生物之域)之天然防禦機制。此等生物體使用CRISPR衍生之RNA及各種Cas蛋白(包含Cas9)，藉由切碎及破壞外來入侵者之DNA來阻止病毒及其他外來體的攻擊。CRISPR為具有兩個獨特特徵之DNA特化區：存在核苷酸重複序列及間隔子。核苷酸之重複序列分佈在整個CRISPR區中，其中短外來DNA區段(間隔子)穿插在重複序列中。在II型CRISPR/Cas系統中，間隔子整合於CRISPR基因體基因座內且轉錄並加工成短CRISPR RNA(crRNA)。此等crRNA退火成反式活化crRNA(tracrRNA)，且引導Cas蛋白進行序列特異性裂解及靜默病原性DNA。Cas9蛋白進行之目標識別需要crRNA內之「種子」序列及crRNA結合區上游之含有二核苷酸的保守原間隔序列相鄰模體(PAM)序列。藉此CRISPR/Cas系統可藉由重新設計crRNA而重新靶向以裂解幾乎任何DNA序列。原生系統中之crRNA及tracrRNA可簡化為大約100個核苷酸之單引導RNA(sgRNA)以用於基因工程改造。CRISPR/Cas系統藉由共同遞送表現Cas9核酸內切酶及必需crRNA組分之質體可直接攜帶入人類細胞。可使用不同的Cas蛋白變體來減少靶向限制(例如Cas9之異種同源物，諸如Cpf1)。

【1430】可經由CRISPR方法永久性基因編輯TIL而靜

默或抑制之基因之非限制性實例包含PD-1、CTLA-4、LAG3、HAVCR2(TIM3)、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GUCY1B3。

【1431】可經由CRISPR方法永久性基因編輯TIL而增強之基因之非限制性實例包含CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15及IL-21。

【1432】藉由CRISPR方法來改變目標基因序列之表現且可根據本發明之實施例使用之系統、方法及組合物之實例描述於美國專利第8,697,359號；第8,993,233號；第8,795,965號；第8,771,945號；第8,889,356號；第8,865,406號；第8,999,641號；第8,945,839號；第8,932,814號；第8,871,445號；第8,906,616號；及第8,895,308號中，其以引用之方式併入本文中。用於進行CRISPR方法之資源，諸如用於表現CRISPR/Cas9及CRISPR/Cpf1之質體，可購自公司，諸如金斯瑞(GenScript)。

【1433】在一實施例中，基因修飾如本文中所描述之

TIL群體可使用如美國專利第US 9790490號中所描述之CRISPR/Cpf1系統進行，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1434】將TIL擴增為治療性群體之方法可根據本文所描述之方法(例如Gen 2)之任一實施例或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所描述進行，其中該方法進一步包括藉由TALE方法基因編輯至少一部分的TILL。根據特定實施例，在TIL擴增過程期間使用TALE方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一種或多種免疫檢查點基因之表現靜默或減少。替代地，在TIL擴增過程期間使用TALE方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一種或多種免疫檢查點基因之表現增強。

【1435】TALE代表「轉錄活化因子樣效應」蛋白，其包含TALEN(「轉錄活化因子樣效應核酸酶」)。使用TALE系統來基因編輯之方法在本文中亦稱為TALE方法。TALE為來自植物病原細菌黃單孢菌屬(*Xanthomonas*)之天然存在蛋白質，且含有由一系列各自識別單鹼基對之33-35個胺基酸之重複域構成之DNA結合域。TALE特異性係藉由被稱為重複可變二殘基(repeat-variable di-residue；RVD)之兩個高變胺基酸判定。模組化TALE重複序列連接在一起以識別連續DNA序列。DNA結合域中之特異性RVD識別目標基因座中之鹼基，從而提供結構特徵以組裝可預測的DNA結合域。將TALE之DNA結合域與IIS型FokI核酸

內切酶之催化域融合，以製備可靶向的TALE核酸酶。為了誘導位點特異性突變，由14-20個鹼基對間隔區域分開之兩個個別TALEN臂將FokI單體拉近以二聚合及產生靶向的雙股斷裂。

【1436】若干個利用各種組裝方法之大的系統性研究指示，可併入TALE重複序列以識別幾乎任何使用者定義的序列。定製設計的TALE陣列亦由Cellectis Bioresearch(法國巴黎)、Transposagen Biopharmaceuticals(美國肯塔基州列克星敦(Lexington, KY, USA))及Life Technologies(美國紐約州格蘭德島(Grand Island, NY, USA))市售。適用於本發明之TALE及TALEN方法描述於以下中：美國專利申請公開案第US 2011/0201118 A1號、第US 2013/0117869 A1號、第US 2013/0315884 A1號、第US 2015/0203871 A1號及第US 2016/0120906 A1號，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1437】可經由TALE方法永久性基因編輯TIL而靜默或抑制之基因之非限制性實例包含PD-1、CTLA-4、LAG3、HAVCR2(TIM3)、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GUCY1B3。

【1438】可經由TALE方法永久性基因編輯TIL而增強之基因之非限制性實例包含CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15及IL-21。

【1439】藉由TALE方法來改變目標基因序列之表現且可根據本發明之實施例使用之系統、方法及組合物之實例描述於美國專利第8,586,526號中，其以引用之方式併入本文中。

【1440】用於將TIL擴增為治療性群體之方法可根據本文所描述之方法(例如過程GEN 3)之任一實施例或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所描述進行，其中該方法進一步包括藉由鋅指或鋅指核酸酶方法基因編輯至少一部分TIL。根據特定實施例，在TIL擴增過程期間使用鋅指方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一種或多種免疫檢查點基因之表現靜默或減少。替代地，在TIL擴增過程期間使用鋅指方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一種或多種免疫檢查點基因之表現增強。

【1441】呈保守ββα組態之個別鋅指含有大約30個胺基酸。α-螺旋表面上之幾個胺基酸通常以不同的選擇性水準接觸DNA主溝槽中的3 bp。鋅指具有兩個蛋白域。第一域為DNA結合域，其包含真核轉錄因子且含有鋅指。第二域為核酸酶域，其包含FokI限制酶且負責催化裂解DNA。

【1442】個別ZFN之DNA結合域通常含有介於三個與六個之間的個別鋅指重複且各自可識別介於9個與18個之間的鹼基對。若鋅指域對其預期目標位點具有特異性，則甚至一對識別總共18個鹼基對之3指ZFN理論上可靶向哺乳動物基因體中之單個基因座。一個產生新的鋅指陣列之方法為組合具有已知特異性之較小鋅指「模組」。最常見的模組組裝過程涉及組合三個分開的可各自識別3個鹼基對DNA序列之鋅指，以產生可識別9個鹼基對目標位點之3指陣列。替代地，可使用基於選擇之方法，諸如寡聚池工程改造(oligomerized pool engineering；OPEN)，來自隨機分組文庫選擇新的鋅指陣列，該等隨機分組文庫考慮介於鄰近指之間的上下文依賴性相互作用(context-dependent interaction)。工程改造的鋅指為可商購的；Sangamo Biosciences(美國加利福尼亞州里奇蒙(Richmond))已與西格瑪奧瑞奇(Sigma-Aldrich)(美國密蘇里州聖路易斯(St.Louis, MO, USA))合作開發一種用於鋅指構築之專用平台(CompoZr®)。

【1443】可藉由經由鋅指方法對TIL進行永久性基因編輯而沉默或抑制之基因的非限制性實例包含PD-1、CTLA-4、LAG3、HAVCR2(TIM3)、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GUCY1B3。

【1444】可經由鋅指方法永久性基因編輯TIL而增強之基因之非限制性實例包含CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15及IL-21。

【1445】藉由鋅指方法來改變目標基因序列之表現且可根據本發明之實施例使用之系統、方法及組合物之實例描述於以下中：美國專利第6,534,261號、第6,607,882號、第6,746,838號、第6,794,136號、第6,824,978號、第6,866,997號、第6,933,113號、第6,979,539號、第7,013,219號、第7,030,215號、第7,220,719號、第7,241,573號、第7,241,574號、第7,585,849號、第7,595,376號、第6,903,185號及第6,479,626號，其以引用之方式併入本文中。

【1446】藉由鋅指方法來改變目標基因序列之表現且可根據本發明之其他實施例使用之系統、方法及組合物之實例描述於Beane等人，《分子療法》，2015, 23 1380-1390中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1447】在一些實施例中，TIL視情況經基因工程改造以包含另外官能性，該等官能性包含但不限於高親和力T細胞受體(T cell receptor；TCR)，例如靶向腫瘤相關抗

原(MAGE-1、HER2或NY-ESO-1)處之TCR，或與腫瘤相關細胞表面分子(例如間皮素)或譜系限制細胞表面分子(例如CD19)結合的嵌合抗原受體(chimeric antigen receptor；CAR)。在一些實施例中，描述於國際專利公開案第WO 2019/160829 A1號(其揭示內容以引用之方式併入本文中)的基因工程改造方法可用於基因編輯TIL，包含基因剔除特異性目標基因，諸如編碼PD-1及CTLA-4之基因。在某些實施例中，該方法包括基因工程改造TIL群體以包含高親和力T細胞受體(TCR)，例如靶向腫瘤相關抗原(諸如MAGE-1、HER2或NY-ESO-1)處之TCR，或與腫瘤相關細胞表面分子(例如間皮素)或譜系限制細胞表面分子(例如CD19)結合的嵌合抗原受體(CAR)。適當地，TIL群體可為如本文所描述之第一群體、第二群體及/或第三群體。

E. 用於TIL製造之密閉系統

【1448】本發明提供在TIL培養過程期間使用密閉系統。此類密閉系統允許預防及/或減少微生物污染、允許使用較少培養瓶且允許成本降低。在一些實施例中，密閉系統使用兩個容器。

【1449】此類密閉系統為本領域中熟知的且可見於例如 http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm 及 https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm處。

【1450】無菌連接裝置(Sterile connecting device；

STCD)在兩件相容性管之間產生無菌熔接部分(weld)。此程序允許無菌連接多個容器及管直徑。在一些實施例中，密閉系統包含魯爾鎖(luer lock)及熱封系統，如例如實例14中所描述。在一些實施例中，密閉系統係在無菌條件下經由注射器進入以維持系統之無菌性及密閉性質。在一些實施例中，採用如實例14中所描述之密閉系統。在一些實施例中，根據實例14「最終調配及填充」部分中所描述之方法，將TIL調配至最終產物調配容器中。

【1451】在一些實施例中，自獲得腫瘤碎片之時間至準備向患者投予TIL或冷凍保存為止，密閉系統使用一個容器。在一些實施例中，當使用兩個容器時，第一容器為密閉G容器，且在不打開第一密閉G容器之情況下離心TIL群體且將其轉移至輸注袋。在一些實施例中，當使用兩個容器時，輸注袋為含有HypoThermosol之輸注袋。密閉系統或密閉TIL細胞培養系統之特徵在於，一旦已添加腫瘤樣本及/或腫瘤碎片，則系統自外部緊密密封以形成密閉環境，不受細菌、真菌及/或任何其他微生物污染入侵。

【1452】在一些實施例中，微生物污染減少介於約5%與約100%之間。在一些實施例中，微生物污染減少介於約5%與約95%之間。在一些實施例中，微生物污染減少介於約5%與約90%之間。在一些實施例中，微生物污染減少介於約10%與約90%之間。在一些實施例中，微生物污染減少介於約15%與約85%之間。在一些實施例中，微生物污染減少為約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、

約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%或約100%。

【1453】密閉系統允許TIL在不存在微生物污染下及/或在微生物污染顯著減少下生長。

【1454】此外，TIL細胞培養環境之pH、二氧化碳分壓及氧氣分壓各自隨細胞培養而變化。因此，即使適合於細胞培養之培養基經循環，但密閉環境仍需要不斷地維持為TIL增殖之最佳環境。為了此目的，合乎需要的是，藉助於感測器監測密閉環境之培養液內之pH、二氧化碳分壓及氧氣分壓之物理因素，其訊號用於控制安設在培養環境之入口處的氣體交換器，及根據培養液中之變化實時調整密閉環境之氣體分壓以便最佳化細胞培養環境。在一些實施例中，本發明提供密閉細胞培養系統，其在至密閉環境之入口處併入配備有量測密閉環境之pH、二氧化碳分壓及氧氣分壓之監測裝置的氣體交換器，且藉由基於來自監測裝置之訊號自動調整氣體濃度來最佳化細胞培養環境。

【1455】在一些實施例中，連續地或間歇地控制密閉環境內之壓力。即，密閉環境中之壓力可藉助於例如壓力維持裝置來改變，從而確保空間在正壓力狀態下適合於TIL生長或促進在負壓力狀態下滲出流體且因此促進細胞增殖。此外，藉由間歇性地施加負壓力，有可能藉助於暫時性縮小密閉環境之容積而均勻且有效地置換密閉環境中之循環液體。

【1456】在一些實施例中，可替換或添加TIL增殖之最佳培養物組分，且可添加包含諸如IL-2及/或OKT3以及組合之因子。

F. TIL之視情況冷凍保存

【1457】主體TIL群體(例如第二TIL群體)或擴增TIL群體(例如第三TIL群體)可視情況進行冷凍保存。在一些實施例中，冷凍保存發生於治療性TIL群體。在一些實施例中，冷凍保存發生於在第二擴增後收集之TIL。在一些實施例中，冷凍保存發生於圖1及/或圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)之例示性步驟F中之TIL。在一些實施例中，TIL係冷凍保存於輸注袋中。在一些實施例中，TIL係在置於輸注袋中之前冷凍保存。在一些實施例中，冷凍保存TIL且不將其置於輸注袋中。在一些實施例中，使用冷凍保存培養基進行冷凍保存。在一些實施例中，冷凍保存培養基含有二甲基亞碸(DMSO)。此一般藉由將TIL群體放置於冷凍溶液(例如85%補體去活化AB血清及15%二甲基亞碸(DMSO))中來完成。將溶液中之細胞置放於低溫小瓶中且儲存在-80℃ 24小時，其中視情況轉移至氣態氮冷凍器用於冷凍保存。參見Sadeghi等人，《腫瘤學報(Acta Oncologica)》2013, 52, 978-986。

【1458】在適當時，自冷凍器取出細胞且在37℃水浴中解凍直至大約4/5之溶液解凍。一般將細胞再懸浮於完全培養基中且視情況洗滌一次或多次。在一些實施例中，

可計算解凍的TIL且如本領域中已知的來評估存活性。

【1459】在較佳實施例中，TIL群體係使用CS10冷凍保存培養基(CryoStor 10，BioLife Solutions)冷凍保存。在較佳實施例中，TIL群體係使用含有二甲基亞碸(DMSO)之冷凍保存培養基冷凍保存。在較佳實施例中，TIL群體係使用1:1(vol:vol)比率之CS10與細胞培養基冷凍保存。在較佳實施例中，TIL群體係使用約1:1(vol:vol)比率之CS10與細胞培養基(進一步包括另外IL-2)冷凍保存。

【1460】如上文所論述且如圖1及/或圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)中提供之步驟A至E中所例示，冷凍保存可發生在TIL擴增過程中的多個點。在一些實施例中，在的第一次擴增之後(如例如根據步驟B所提供)的經擴增TIL群體或在根據圖1或圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)之步驟D的一次或多次第二次擴增之後的經擴增TIL群體可經冷凍保存。冷凍保存一般可藉由將TIL群體置放於冷凍溶液(例如85%補體去活化AB血清及15%二甲基亞碸(DMSO))中來完成。將溶液中之細胞置放於低溫小瓶中且儲存在-80℃ 24小時，其中視情況轉移至氣態氮冷凍器用於冷凍保存。參見Sadeghi等人，《腫瘤學報》 2013, 52, 978-986。在一些實施例中，TIL係冷凍保存於5% DMSO中。在一些實施例中，TIL係冷凍保存於細胞培養基加5% DMSO中。在一些實施例中，TIL係根據實例6中提供之方法冷凍保存。

【1461】在適當時，自冷凍器取出細胞且在37℃水浴

中解凍直至大約4/5之溶液解凍。一般將細胞再懸浮於完全培養基中且視情況洗滌一次或多次。在一些實施例中，可計算解凍的TIL且如本領域中已知的來評估存活性。

【1462】在一些情況下，步驟B TIL群體可使用下文論述之方案立即冷凍保存。替代地，主體TIL群體可進行步驟C及步驟D且接著在步驟D後冷凍保存。類似地，在其中基因修飾TIL將用於療法中之情況下，步驟B或步驟D TIL群體可進行基因修飾以用於合適的治療。

G. 經擴增TIL之測定及表型特徵

【1463】在一些實施例中，使用本文所描述之測定方法中之一者檢查來自上述過程之TIL的效力及/或功能性。

【1464】在一實施例中，本發明包含一種測定如上文所描述之TIL產物之效力的方法，該TIL產物包含經基因工程改造之TIL產物及使用CD134(OX40)及/或CD137(4-1BB)促效劑產生的TIL產物，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL產物細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物；以及

c. 評估收集物中(1)一種或多種標記物在TIL產物上的表現或(2)自TIL產物細胞分泌的一種或多種分析物，以獲得一個或多個觀測值，從而確定TIL產物的效力。

【1465】或者，在一些實施例中，使用組合測定分析

來自上述過程的TIL，該組合測定包括基於CD3或CD3/CD28珠粒的刺激以及對至少兩種分析物的ELISA或自動ELISA(例如，ELLA)偵測，該至少兩種分析物選自由IFN-γ、顆粒酶B、穿孔素及TNF-α組成之群組。在一實施例中，此類組合測定的產物釋放規格為：對於至少兩種所選擇的分析物係至少500 pg/mL；對於至少兩種所選擇的分析物係至少600 pg/mL；對於至少兩種所選擇的分析物係至少700 pg/mL；對於至少兩種所選擇的分析物係至少800 pg/mL；對於至少兩種所選擇的分析物係至少900 pg/mL；對於至少兩種所選擇的分析物係至少1000 pg/mL；對於至少兩種所選擇的分析物係至少1100 pg/mL；或對於至少兩種所選擇的分析物係至少1200 pg/mL；其中每毫升測試物含有1×10^5個TIL、2×10^5個TIL、3×10^5個TIL、4×10^5個TIL、5×10^5個TIL、6×10^5個TIL、7×10^5個TIL、8×10^5個TIL、9×10^5個TIL或10×10^5個TIL。

【1466】在一些實施例中，分析TIL在擴增後之多種表型標價物之表現，該等標記物包含本文及實例中所描述之彼等者。在一實施例中，檢查一種或多種表型標記物之表現。在一些實施例中，在步驟B中之第一擴增後分析TIL之表型特徵。在一些實施例中，在步驟C中之轉變期間分析TIL之表型特徵。在一些實施例中，在根據步驟C之轉變期間及在冷凍保存後分析TIL之表型特徵。在一些實施例中，在根據步驟D之第二擴增後分析TIL之表型特徵。在

一些實施例中，在根據步驟D之兩次或更多次擴增後分析TIL之表型特徵。

【1467】在一些實施例中，標記物係選自由CD8及CD28組成之群組。在一些實施例中，檢查CD8之表現。在一些實施例中，檢查CD28之表現。在一些實施例中，相較於其他過程(例如如例如圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)中提供之Gen 3過程)，相較於如例如圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)中提供之2A過程，根據本發明過程產生之TIL上之CD8及/或CD28的表現更高。在一些實施例中，相較於其他過程(例如如例如圖8(特別是例如圖8B)中提供之Gen 3過程)，相較於如例如圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)中提供之2A過程，根據本發明過程產生之TIL上之CD8的表現更高。在一些實施例中，相較於其他過程(例如如例如圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)中提供之Gen 3過程)，相較於如例如圖8(特別是例如圖8A)中提供之2A過程，根據本發明過程產生之TIL上之CD28的表現更高。在一些實施例中，高CD28表現指示較年輕、更持久的TIL表型。在一實施例中，量測一種或多種調節標記物之表現。

【1468】在一實施例中，在用於擴增本文所描述之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法之任一步驟期間，未基於CD8及/或CD28表現選擇第一TIL群體、第二TIL群體、第三TIL群體或所收集TIL群體。

【1469】在一些實施例中，相較於其他過程(例如如例如圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)中提供之Gen 3過

程)，相較於如例如圖8(特別是例如圖8A)中提供之2A過程，根據本發明過程產生之TIL上的中央記憶細胞的百分比更高。在一些實施例中，中央記憶細胞之記憶標記物係選自由CCR7及CD62L組成之群組。

【1470】在一些實施例中，CD4+及/或CD8+ TIL記憶子集可分為不同記憶子集。在一些實施例中，CD4+及/或CD8+ TIL包括初始(CD45RA+CD62L+)TIL。在一些實施例中，CD4+及/或CD8+ TIL包括中央記憶(central memory，CM；CD45RA-CD62L+)TIL。在一些實施例中，CD4+及/或CD8+ TIL包括效應記憶(effector memory，EM；CD45RA-CD62L-)TIL。在一些實施例中，CD4+及/或CD8+ TIL包括RA+效應記憶/效應(TEMRA/TEFF；CD45RA+CD62L+)TIL。

【1471】在一些實施例中，TIL表現一種或多種選自由以下組成之群組之標記物：顆粒酶B、穿孔蛋白及顆粒溶解素。在一些實施例中，TIL表現顆粒酶B。在一些實施例中，TIL表現穿孔蛋白。在一些實施例中，TIL表現顆粒溶解素。

【1472】在一實施例中，亦可使用細胞介素釋放測定，評估再刺激的TIL之細胞介素釋放。在一些實施例中，可評估TIL之干擾素-γ(IFN-γ)分泌。在一些實施例中，IFN-γ分泌係藉由ELISA分析量測。在一些實施例中，IFN-γ分泌係藉由ELISA測定在快速第二擴增步驟之後、在如例如圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)所提供之步驟D之

後量測。在一些實施例中，TIL健康係藉由IFN-γ(IFN-γ)分泌量測。在一些實施例中，IFN-γ分泌指示活性TIL。在一些實施例中，採用針對IFN-γ產生之效力分析。IFN-γ產生為細胞毒性潛力的另一種量度。IFN-γ產生可藉由測定經抗CD3、CD28及CD137/4-1BB之抗體刺激之TIL培養基中之細胞介素IFN-γ之含量量測。來自此等受刺激TIL之培養基中之IFN-γ含量可藉由量測IFN-γ釋放測定。在一些實施例中，例如圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)中所提供之Gen 3過程中之步驟D相較於例如圖8(特別是例如圖8A)中所提供之2A過程中之步驟D之IFN-γ產生增加，指示步驟D TIL之細胞毒性潛力增加。在一些實施例中，IFN-γ分泌增加一倍、兩倍、三倍、四倍或五倍或更多。在一些實施例中，IFN-γ分泌增加一倍。在一些實施例中，IFN-γ分泌增加兩倍。在一些實施例中，IFN-γ之分泌增加三倍。在一些實施例中，IFN-γ分泌增加四倍。在一些實施例中，IFN-γ分泌增加五倍。在一些實施例中，使用Quantikine ELISA套組量測IFN-γ。在一些實施例中，量測離體TIL中之IFN-γ。在一些實施例中，量測離體TIL中之IFN-γ，包含藉由本發明之方法(包含例如圖8B方法)產生之TIL。

【1473】在一些實施例中，能夠分泌至少一倍、兩倍、三倍、四倍或五倍或更多IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少多於一倍之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/

或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少多於兩倍之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少多於三倍之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少多於四倍之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少多於五倍之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。

【1474】在一些實施例中，能夠分泌至少100 pg/mL至約1000 pg/mL或更多之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，在能夠分泌至少200 pg/mL、至少250 pg/mL、至少300 pg/mL、至少350 pg/mL、至少400 pg/mL、至少450 pg/mL、至少500 pg/mL、至少550 pg/mL、至少600 pg/mL、至少650 pg/mL、至少700 pg/mL、至少750 pg/mL、至少800 pg/mL、至少850 pg/mL、至少900 pg/mL、至少950 pg/mL或至少1000 pg/mL或更多IFN-γ之TIIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或

圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少300 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少400 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少500 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少600 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少700 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少800 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少900 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少1000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例

中，能夠分泌至少2000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少3000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少4000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少5000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少6000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少7000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少8000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少9000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少10,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少15,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉

由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少20,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少25,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少30,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少35,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少40,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少45,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少50,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。

【1475】在一些實施例中，能夠分泌至少100 pg/mL/5×10^5個細胞至約1000 pg/mL/5×10^5個細胞或更多IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能

夠分泌至少200 pg/mL/5×10^{5}個細胞、至少250 pg/mL/5×10^{5}個細胞、至少300 pg/mL/5×10^{5}個細胞、至少350 pg/mL/5×10^{5}個細胞、至少400 pg/mL/5×10^{5}個細胞、至少450 pg/mL/5×10^{5}個細胞、至少500 pg/mL/5×10^{5}個細胞、至少550 pg/mL/5×10^{5}個細胞、至少600 pg/mL/5×10^{5}個細胞、至少650 pg/mL/5×10^{5}個細胞、至少700 pg/mL/5×10^{5}個細胞、至少750 pg/mL/5×10^{5}個細胞、至少800 pg/mL/5×10^{5}個細胞、至少850 pg/mL/5×10^{5}個細胞、至少900 pg/mL/5×10^{5}個細胞、至少950 pg/mL/5×10^{5}個細胞或至少1000 pg/mL/5×10^{5}個細胞或更多IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少300 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少400 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少500 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法

(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少600 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少700 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少800 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少900 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少1000 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少2000 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少3000 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D中描繪之方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少4000 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分

泌至少5000 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少6000 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少7000 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少8000 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少9000 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少10,000 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少15,000 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少20,000 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少25,000 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例

如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少30,000 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少35,000 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少40,000 pg/mL/×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少45,000 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少50,000 pg/mL/5×10^{5}個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。

【1476】T及B淋巴球之多樣抗原受體係藉由有限但大量的基因區段之體細胞重組產生。此等基因區段：V(可變區)、D(多樣區)、J(聯結區)及C(恆定區)決定免疫球蛋白及T細胞受體(TCR)之結合特異性及下游應用。本發明提供一種用於產生展現且增加T細胞組庫多樣性之TIL的方法。在一些實施例中，藉由本發明方法獲得之TIL展現T細胞組庫多樣性增加。在一些實施例中，相較於新鮮收集的TIL及/或使用除本文所提供之方法以外之其他方法製備的

TIL，藉由本發明方法獲得的TIL展現T細胞組庫多樣性增加，該等其他方法包含例如除圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)中體現之方法以外的方法。在一些實施例中，相較於新鮮收集的TIL及/或使用如圖8(特別是例如圖8A)中例示的稱為Gen 2之方法製備的TIL，藉由本發明方法獲得的TIL展現T細胞組庫多樣性增加。在一些實施例中，在第一擴增中獲得之TIL展現T細胞組庫多樣性增加。在一些實施例中，多樣性增加係免疫球蛋白多樣性及/或T細胞受體多樣性增加。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白重鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白輕鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於T細胞受體中。在一些實施例中，多樣性存在於選自由α、β、γ及δ受體組成之群組的T細胞受體中之一者中。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α及/或β之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)β之表現增加。在一些實施例中，TCRαβ(亦即TCRα/β)之表現增加。在一些實施例中，如本文所描述之過程(例如Gen 3過程)相較於其他過程(例如稱為Gen 2之過程)，基於樣本內獨特肽CDR之數目，顯示更高的選殖多樣性(參見例如圖12-14)。

【1477】在一些實施例中，TIL之活化及耗竭可藉由檢查一種或多種標記物判定。在一些實施例中，活化及耗竭可使用多色流動式細胞測量術判定。在一些實施例中，

標價物之活化及耗竭包含但不限於一種或多種選自由以下組成之群組的標記物：CD3、PD-1、2B4/CD244、CD8、CD25、BTLA、KLRG、TIM3、CD194/CCR4、CD4、TIGIT、CD183、CD69、CD95、CD127、CD103及/或LAG3)。在一些實施例中，標記物之活化及耗竭包含但不限於一種或多種選自由以下組成之群組的標記物：BTLA、CTLA-4、ICOS、Ki67、LAG3、PD-1、TIGIT及/或TIM3。在一些實施例中，標記物之活化及耗竭包含但不限於一種或多種選自由以下組成之群組的標記物：BTLA、CTLA-4、ICOS、Ki67、LAG3、CD103+/CD69+、CD103+/CD69-、PD-1、TIGIT及/或TIM3。在一些實施例中，可判定及/或分析T細胞標記物(包含活化及耗竭標記物)以檢查T細胞活化、抑制或功能。在一些實施例中，T細胞標記物可包含但不限於一種或多種選自由以下組成之群組的標記物：TIGIT、CD3、FoxP3、TIM3、PD-1、CD103、CTLA-4、LAG3、BTLA-4、ICOS、Ki67、CD8、CD25、CD45、CD4及/或CD59。

【1478】在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL至300000 pg/10^6個TIL或更多顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL、高於5000 pg/10^6個TIL、高於7000 pg/10^6個TIL、高於9000 pg/10^6個TIL、高於11000 pg/10^6個TIL、高於13000 pg/10^6個TIL、高於15000 pg/10^6個TIL、高於

17000 pg/10^6個TIL、高於19000 pg/10^6個TIL、高於20000 pg/10^6個TIL、高於40000 pg/10^6個TIL、高於60000 pg/10^6個TIL、高於80000 pg/10^6個TIL、高於100000 pg/10^6個TIL、高於120000 pg/10^6個TIL、高於140000 pg/10^6個TIL、高於160000 pg/10^6個TIL、高於180000 pg/10^6個TIL、高於200000 pg/10^6個TIL、高於220000 pg/10^6個TIL、高於240000 pg/10^6個TIL、高於260000 pg/10^6個TIL、高於280000 pg/10^6個TIL、高於300000 pg/10^6個TIL或更多顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於5000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於7000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於9000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於11000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於13000 pg/10^6個TIL

顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於15000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於17000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於19000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於20000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於40000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於60000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於80000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於100000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於120000 pg/10^6個TIL

顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於140000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於160000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於180000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於200000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於220000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於240000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於260000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於280000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於300000 pg/10^6個TIL

顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL至300000 pg/10^6個TIL或更多顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL、高於5000 pg/10^6個TIL、高於7000 pg/10^6個TIL、高於9000 pg/10^6個TIL、高於11000 pg/10^6個TIL、高於13000 pg/10^6個TIL、高於15000 pg/10^6個TIL、高於17000 pg/10^6個TIL、高於19000 pg/10^6個TIL、高於20000 pg/10^6個TIL、高於40000 pg/10^6個TIL、高於60000 pg/10^6個TIL、高於80000 pg/10^6個TIL、高於100000 pg/10^6個TIL、高於120000 pg/10^6個TIL、高於140000 pg/10^6個TIL、高於160000 pg/10^6個TIL、高於180000 pg/10^6個TIL、高於200000 pg/10^6個TIL、高於220000 pg/10^6個TIL、高於240000 pg/10^6個TIL、高於260000 pg/10^6個TIL、高於280000 pg/10^6個TIL、高於300000 pg/10^6個TIL或更多顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於5000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例

中，展現分泌高於7000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於9000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於11000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於13000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於15000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於17000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於19000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於20000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於40000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例

中，展現分泌高於60000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於80000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於100000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於120000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於140000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於160000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於180000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於200000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於220000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例

中，展現分泌高於240000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於260000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於280000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於300000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。

【1479】在一些實施例中，展現分泌高於1000 pg/mL至300000 pg/mL或更多之顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於1000 pg/mL、高於2000 pg/mL、高於3000 pg/mL、高於4000 pg/mL、高於5000 pg/mL、高於6000 pg/mL，更大之TIL。大於7000 pg/mL、高於8000 pg/mL、高於9000 pg/mL、高於10000 pg/mL、高於20000 pg/mL、高於30000 pg/mL、高於40000 pg/mL、高於50000 pg/mL、高於60000 pg/mL、高於70000 pg/mL、高於80000 pg/mL、高於90000 pg/mL、高於100000 pg/mL或更多顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現高於1000 pg/mL顆粒酶B之

TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現高於2000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現高於3000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現高於4000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現高於5000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現高於6000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現高於7000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現高於8000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現高於9000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現高於10000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展

現高於20000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現高於30000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現高於40000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現高於50000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現高於60000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現高於70000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現高於80000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現高於90000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現高於100000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於120000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之

擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於140000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於160000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於180000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於200000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於220000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於240000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於260000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於280000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於300000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之擴增方法產生之TIL。

【1480】在一些實施例中，本發明之擴增方法產生展現相較於未經擴增之TIL群體增加的活體外顆粒酶B分泌的經擴增TIL群體，包含例如如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D中提供的TIL。在一些實施例中，相較於未經擴增之TIL群體，本發明之經擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少一倍至五十倍或更多。在一些實施例中，相較於未經擴增之TIL群體，IFN-γ分泌增加至少一倍、至少兩倍、至少三倍、至少四倍、至少五倍、至少六倍、至少七倍、至少八倍、至少九倍、至少十倍、至少二十倍、至少三十倍、至少四十倍、至少五十倍或更多。在一些實施例中，相較於未經擴增之TIL群體，本發明之經擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少一倍。在一些實施例中，相較於未經擴增之TIL群體，本發明之經擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少兩倍。在一些實施例中，相較於未經擴增之TIL群體，本發明之經擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少三倍。在一些實施例中，相較於未經擴增之TIL群體，本發明之經擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少四倍。在一些實施例中，相較於未經擴增之TIL群體，本發明之經擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少五倍。在一些實施例中，相較於未經擴增之TIL群體，本發明之經擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少六倍。在一些實施例中，相較於未經擴增之TIL群體，本發明之經擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少七倍。在一些實施例中，相較於未經擴增之TIL群體，本發明之經擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少八

倍。在一些實施例中，相較於未經擴增之TIL群體，本發明之經擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少九倍。在一些實施例中，相較於未經擴增之TIL群體，本發明之經擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少十倍。在一些實施例中，相較於未經擴增之TIL群體，本發明之經擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少二十倍。在一些實施例中，相較於未經擴增之TIL群體，本發明之經擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少三十倍。在一些實施例中，相較於未經擴增之TIL群體，本發明之經擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少四十倍。在一些實施例中，相較於未經擴增之TIL群體，本發明之經擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少五十倍。

【1481】在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌分泌低至少一倍、兩倍、三倍、四倍或五倍或更多含量之TNF-α(亦即，TNF-alpha)之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌分泌低至少一倍含量之TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌分泌低至少兩倍含量之TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌分泌低至少三倍含量之TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖

8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌分泌低至少四倍含量之TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌分泌低至少五倍含量之TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。

【1482】在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/mL/5×10^5個細胞至約10,000 pg/mL/5×10^5個細胞或更多TNF-α(亦即，TNF-alpha)之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少500 pg/mL/5×10^5個細胞至約10,000 pg/mL/5×10^5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少1000 pg/mL/5×10^5個細胞至約10,000 pg/mL/5×10^5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少2000 pg/mL/5×10^5個細胞至約10,000 pg/mL/5×10^5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少3000 pg/mL/5×10^5個細胞至約10,000 pg/mL/5×10^5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或

圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少4000 pg/mL/5×10^{5}個細胞至約10,000 pg/mL/5×10^{5}個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少5000 pg/mL/5×10^{5}個細胞至約10,000 pg/mL/5×10^{5}個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少6000 pg/mL/5×10^{5}個細胞至約10,000 pg/mL/5×10^{5}個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少7000 pg/mL/5×10^{5}個細胞至約10,000 pg/mL/5×10^{5}個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少8000 pg/mL/5×10^{5}個細胞至約10,000 pg/mL/5×10^{5}個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少9000 pg/mL/5×10^{5}個細胞至約10,000 pg/mL/5×10^{5}個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。

【1483】在一些實施例中，量測IFN-γ及顆粒酶B含量以判定藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及

/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL的表型特徵。在一些實施例中，量測IFN-γ及TNF-α含量以判定藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL的表型特徵。在一些實施例中，量測顆粒酶B及TNF-α含量以判定藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL的表型特徵。在一些實施例中，量測IFN-γ、顆粒酶B及TNF-α含量以判定藉由本發明之擴增方法(包含例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL的表型特徵。

【1484】在一些實施例中，在冷凍保存之後進行表型表徵。

H. 另外的過程實施例

【1485】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包括：(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；(b)藉由在包括IL-2及OKT-3之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，其中該初始第一擴增進行約1至7天或約1至8天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與包括IL-2、OKT-3及外源性抗原呈現細胞(APC)之細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增進行約1至11天或約1天至10天以獲得第三TIL群

體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體。在一些實施例中，快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天或約2至4天之時段進行快速第二擴增；及接著(2)實現將來自小規模培養之第二TIL群體轉移至比第一容器大的第二容器(例如G-Rex 500MCS容器)，其中在第二容器中，來自小規模培養之第二TIL群體係在較大規模培養中培養約4至7天或約4至8天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之第一小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；及接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個與第一容器大小相等之第二容器之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器的來自第一小規模培養之第二TIL群體部分係在第二小規模培養中培養約4至7天或約4至8天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天或約2至4天之時段進行快速第二擴增；及接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移

且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大之第二容器(例如G-Rex 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，自小規模培養轉移至此類第二容器之第二TIL群體部分係在較大規模培養中培養約4至7天或約4至8天之時段。在一些實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；及接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-Rex 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，自小規模培養轉移至此類第二容器之第二TIL群體部分係在較大規模培養中培養約5至7天的時段。

【1486】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體的方法，其包括：(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；(b)藉由在包括IL-2及OKT-3之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，其中該初始第一擴增進行約1至8天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與包括IL-2、OKT-3及外源性抗原呈現細胞(APC)之細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增進行約1至

8天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體。在一些實施例中，快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自小規模培養之第二TIL群體轉移至比第一容器大的第二容器(例如G-REX 500MCS容器)，其中在第二容器中，來自小規模培養之第二TIL群體係在較大規模培養中培養約4至8天的時段。在一些實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之第一小規模培養中培養第二TIL群體約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個與第一容器大小相等之第二容器之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自第一小規模培養之第二TIL群體部分係在第二小規模培養中培養約4至6天的時段。在一些實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3、4、

5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大之第二容器(例如G-Rex 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，自小規模培養轉移至此類第二容器之第二TIL群體部分係在較大規模培養中培養約4至6天的時段。在一些實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-Rex 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，自小規模培養轉移至此類第二容器之第二TIL群體部分係在較大規模培養中培養約4至5天的時段。

【1487】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體的方法，其包括：(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；(b)藉由在包括IL-2及OKT-3之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，其中該初始第一擴增進行約1至7天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與包括IL-2、OKT-3及外源性抗原呈現細胞(APC)之細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增進行約1至11天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL

群體；及(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體。在一些實施例中，快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自小規模培養之第二TIL群體轉移至比第一容器大的第二容器(例如G-Rex 500MCS容器)，其中在第二容器中，來自小規模培養之第二TIL群體係在較大規模培養中培養約4至7天的時段。在一些實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之第一小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個與第一容器大小相等之第二容器之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自第一小規模培養之第二TIL群體部分係在第二小規模培養中培養約4至7天的時段。在一些實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個

大小比第一容器大之第二容器(例如G-Rex 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，自小規模培養轉移至此類第二容器之第二TIL群體部分係在較大規模培養中培養約4至7天的時段。在一些實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-Rex 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，自小規模培養轉移至此類第二容器之第二TIL群體部分係在較大規模培養中培養約5天的時段。

【1488】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由使第一TIL群體與進一步包括外源性抗原呈現細胞(APC)之培養基接觸來進行，其中步驟(c)中培養基中之APC數目大於步驟(b)中培養基中之APC數目。

【1489】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，培養基補充有另外的外源性APC。

【1490】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約20:1的範圍。

【1491】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約10:1的範圍。

【1492】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約9:1的範圍。

【1493】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約8:1的範圍。

【1494】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約7:1的範圍。

【1495】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約6:1的範圍。

【1496】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約5:1的範圍。

【1497】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約4:1的範圍。

【1498】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約3:1的範圍。

【1499】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.9:1的範圍。

【1500】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.8:1的範圍。

【1501】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.7:1的範圍。

【1502】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.6:1的範圍。

【1503】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.5:1的範圍。

【1504】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.4:1的範圍。

【1505】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.3:1的範圍。

【1506】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.2:1的範圍。

【1507】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.1:1的範圍。

【1508】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2:1的範圍。

【1509】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約10:1的範圍。

【1510】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約5:1的範圍。

【1511】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約4:1的範圍。

【1512】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約3:1的範圍。

【1513】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.9:1的範圍。

【1514】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.8:1的範圍。

【1515】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.7:1的範圍。

【1516】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.6:1的範圍。

【1517】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.5:1的範圍。

【1518】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.4:1的範圍。

【1519】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.3:1的範圍。

【1520】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.2:1的範圍。

【1521】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.1:1的範圍。

【1522】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率為剛好或大約2:1。

【1523】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在快速第二擴增中添加之APC數目與在步驟(b)中添加之APC數目的比率為剛好或大約1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2:1、2.1:1、2.2:1、2.3:1、2.4:1、2.5:1、2.6:1、2.7:1、2.8:1、2.9:1、3:1、3.1:1、3.2:1、3.3:1、3.4:1、3.5:1、3.6:1、3.7:1、3.8:1、3.9:1、4:1、4.1:1、4.2:1、4.3:1、4.4:1、4.5:1、4.6:1、4.7:1、4.8:1、4.9:1或5:1。

【1524】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在初始第一擴增中添加之APC數目為剛好或大約1×10^8、1.1×10^8、1.2×10^8、1.3×10^8、1.4×10^8、1.5×10^8、1.6×10^8、1.7×10^8、1.8×10^8、1.9×10^8、2×10^8、2.1×10^8、2.2×10^8、2.3×10^8、2.4×10^8、2.5×10^8、2.6×10^8、2.7×10^8、2.8×10^8、2.9×10^8、3×10^8、3.1×10^8、3.2×10^8、3.3×10^8、

3.4×10^8或3.5×10^8個APC，且其中在快速第二擴增中添加之APC數目為剛好或大約3.5×10^8、3.6×10^8、3.7×10^8、3.8×10^8、3.9×10^8、4×10^8、4.1×10^8、4.2×10^8、4.3×10^8、4.4×10^8、4.5×10^8、4.6×10^8、4.7×10^8、4.8×10^8、4.9×10^8、5×10^8、5.1×10^8、5.2×10^8、5.3×10^8、5.4×10^8、5.5×10^8、5.6×10^8、5.7×10^8、5.8×10^8、5.9×10^8、6×10^8、6.1×10^8、6.2×10^8、6.3×10^8、6.4×10^8、6.5×10^8、6.6×10^8、6.7×10^8、6.8×10^8、6.9×10^8、7×10^8、7.1×10^8、7.2×10^8、7.3×10^8、7.4×10^8、7.5×10^8、7.6×10^8、7.7×10^8、7.8×10^8、7.9×10^8、8×10^8、8.1×10^8、8.2×10^8、8.3×10^8、8.4×10^8、8.5×10^8、8.6×10^8、8.7×10^8、8.8×10^8、8.9×10^8、9×10^8、9.1×10^8、9.2×10^8、9.3×10^8、9.4×10^8、9.5×10^8、9.6×10^8、9.7×10^8、9.8×10^8、9.9×10^8或1×10^9個APC。

【1525】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在初始第一擴增中添加之APC數目係選自剛好或大約1×10^8個APC至剛好或大約3.5×10^8個APC的範圍，且其中在快速第二擴增中添加之APC數目係選自剛好或大約3.5×10^8個APC至剛好或大約1×10^9個APC的範圍。

【1526】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在初始第一擴增中添加之APC數目係選自剛好或大約1.5×10^8個APC至剛好或大約3×10^8個APC的範圍，且其中在快速第二擴增中添

加之APC數目係選自剛好或大約4×10^8個APC至剛好或大約7.5×10^8個APC的範圍。

【1527】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在初始第一擴增中添加之APC數目係選自剛好或大約2×10^8個APC至剛好或大約2.5×10^8個APC的範圍，且其中在快速第二擴增中添加之APC數目係選自剛好或大約4.5×10^8個APC至剛好或大約5.5×10^8個APC的範圍。

【1528】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中剛好或大約2.5×10^8個APC係添加至初始第一擴增，且剛好或大約5×10^8個APC係添加至快速第二擴增。

【1529】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中抗原呈現細胞為末梢血液單核細胞(PBMC)。

【1530】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個腫瘤碎片係分佈至複數個分開的容器中，在各分開的容器中，第一TIL群體係在步驟(a)中獲得，第二TIL群體係在步驟(b)中獲得，且第三TIL群體係在步驟(c)中獲得，且將來自步驟(c)中複數個容器之治療性TIL群體合併以產生來自步驟(d)之經收集的TIL群體。

【1531】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個腫瘤均勻分

佈至複數個分開的容器中。

【1532】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包括至少兩個分開的容器。

【1533】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包括兩個至二十個分開的容器。

【1534】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包括兩個至十五個分開的容器。

【1535】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包括兩個至十個分開的容器。

【1536】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包括兩個至五個分開的容器。

【1537】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包括2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個分開的容器。

【1538】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在各容器中對步驟(b)中之第一TIL群體進行初始第一擴增，在同一容器中對由此類第一TIL群體產生之第二TIL群體進行步驟(c)中

的快速第二擴增。

【1539】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中分開的容器中之各者包括第一透氣表面區域。

【1540】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個腫瘤碎片分佈於單一容器中。

【1541】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中單一容器包括第一透氣表面區域。

【1542】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中，APC以剛好或大約一個細胞層至剛好或大約三個細胞層的平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1543】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約1.5個細胞層至剛好或大約2.5個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1544】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約2個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣

表面區域上。

【1545】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上：1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3個細胞層。

【1546】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3個細胞層至剛好或大約10個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1547】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約4個細胞層至剛好或大約8個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1548】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3、4、5、6、7、8、9或10個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1549】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上：4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、

6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8個細胞層。

【1550】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係在包括第一透氣表面區域的第一容器中進行，且在步驟(c)中，快速第二擴增係在包括第二透氣表面區域的第二容器中進行。

【1551】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二容器大於第一容器。

【1552】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中，APC以剛好或大約一個細胞層至剛好或大約三個細胞層的平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1553】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約1.5個細胞層至剛好或大約2.5個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1554】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，

APC以剛好或大約2個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1555】在另一實施例中，本發明提供經修改之如適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上：1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3個細胞層。

【1556】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3個細胞層至剛好或大約10個細胞層之平均厚度層疊至第二透氣表面區域上。

【1557】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約4個細胞層至剛好或大約8個細胞層之平均厚度層疊至第二透氣表面區域上。

【1558】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3、4、5、6、7、8、9或10個細胞層之平均厚度層疊至第二透氣表面區域上。

【1559】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層疊至第二透氣表面區域上：4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、

4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8個細胞層。

【1560】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係在包括第一透氣表面區域的第一容器中進行，且在步驟(c)中，快速第二擴增係在第一容器中進行。

【1561】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中，APC以剛好或大約一個細胞層至剛好或大約三個細胞層的平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1562】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約1.5個細胞層至剛好或大約2.5個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1563】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約2個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1564】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上：1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3個細胞層。

【1565】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3個細胞層至剛好或大約10個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1566】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約4個細胞層至剛好或大約8個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1567】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3、4、5、6、7、8、9或10個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【1568】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上：4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8個細胞

層。

【1569】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中在步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:10的範圍。

【1570】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:9的範圍。

【1571】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:8的範

圍。

【1572】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:7的範圍。

【1573】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:6的範圍。

【1574】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:5的範

圍。

【1575】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:4的範圍。

【1576】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:3的範圍。

【1577】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:2的範

圍。

【1578】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.2至剛好或大約1:8的範圍。

【1579】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.3至剛好或大約1:7的範圍。

【1580】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.4至剛好或大約1:6的範

圍。

【1581】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.5至剛好或大約1:5的範圍。

【1582】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.6至剛好或大約1:4的範圍。

【1583】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.7至剛好或大約1:3.5的範

圍。

【1584】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.8至剛好或大約1:3的範圍。

【1585】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.9至剛好或大約1:2.5的範圍。

【1586】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:2的範圍。

【1587】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.1、1:2.2、1:2.3、1:2.4、1:2.5、1:2.6、1:2.7、1:2.8、1:2.9、1:3、1:3.1、1:3.2、1:3.3、1:3.4、1:3.5、1:3.6、1:3.7、1:3.8、1:3.9、1:4、1:4.1、1:4.2、1:4.3、1:4.4、1:4.5、1:4.6、1:4.7、1:4.8、1:4.9、1:5、1:5.1、1:5.2、1:5.3、1:5.4、1:5.5、1:5.6、1:5.7、1:5.8、1:5.9、1:6、1:6.1、1:6.2、1:6.3、1:6.4、1:6.5、1:6.6、1:6.7、1:6.8、1:6.9、1:7、1:7.1、1:7.2、1:7.3、1:7.4、1:7.5、1:7.6、1:7.7、1:7.8、1:7.9、1:8、1:8.1、1:8.2、1:8.3、1:8.4、1:8.5、1:8.6、1:8.7、1:8.8、1:8.9、1:9、1:9.1、1:9.2、1:9.3、1:9.4、1:9.5、1:9.6、1:9.7、1:9.8、1:9.9或1:10。

【1588】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體中之TIL數目與第一TIL群體中之TIL數目的比率為剛好或大約1.5:1至剛好或大約100:1。

【1589】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體中

之TIL數目與第一TIL群體中之TIL數目的比率為剛好或大約50:1。

【1590】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體中之TIL數目與第一TIL群體中之TIL數目的比率為剛好或大約25:1。

【1591】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體中之TIL數目與第一TIL群體中之TIL數目的比率為剛好或大約20:1。

【1592】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體中之TIL數目與第一TIL群體中之TIL數目的比率為剛好或大約10:1。

【1593】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體在數目上比第一TIL群體大至少剛好或大約50倍。

【1594】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體在數目上比第一TIL群體大至少剛好或大約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50倍。

【1595】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中之第二時段開始後剛好或大約2天或剛好或大約3天，對細胞培養基補充另外的IL-2。

【1596】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，進一步包括使用冷凍保存過程冷凍保存步驟(d)中之經收集的TIL群體的步驟。

【1597】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，包括在步驟(d)之後執行額外步驟(e)：將來自步驟(d)的經收集TIL群體轉移至視情況含有HypoThermosol之輸注袋中。

【1598】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，包括使用冷凍保存過程冷凍保存步驟(e)中包括經收集之TIL群體的輸注袋的步驟。

【1599】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中使用1:1比率之經收集之TIL群體與冷凍保存培養基來進行冷凍保存過程。

【1600】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中抗原呈現細胞為末梢血液單核細胞(PBMC)。

【1601】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中PBMC為經輻照

且同種異體的。

【1602】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中添加至細胞培養物之APC總數為2.5×10^8個。

【1603】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中添加至細胞培養物之APC總數為5×10^8個。

【1604】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中APC為PBMC。

【1605】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中PBMC為經輻照且同種異體的。

【1606】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中抗原呈現細胞為人工抗原呈現細胞。

【1607】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中使用基於膜之細胞處理系統來進行步驟(d)中之收集。

【1608】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中使用LOVO細胞處理系統來進行步驟(d)中之收集。

【1609】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約5至剛好或大約60個碎片。

【1610】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約10至剛好或大約60個碎片。

【1611】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約15至剛好或大約60個碎片。

【1612】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約20至剛好或大約60個碎片。

【1613】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約25至剛好或大約60個碎片。

【1614】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約30至剛好或大約60個碎片。

【1615】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約35至剛好或大約60個碎片。

【1616】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約40至剛好或大約60個碎片。

【1617】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約45至剛好或大約60個碎片。

【1618】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約50至剛好或大約60個碎片。

【1619】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括在步驟(b)中每容器剛好或大約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59或60個碎片。

【1620】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約27 mm^3之體積。

【1621】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約20 mm^3至剛好或大約50 mm^3之體積。

【1622】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約21 mm^3至剛好或大約30 mm^3之體積。

【1623】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約22 mm^3至剛好或大約29.5 mm^3之體積。

【1624】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約23 mm^3至剛好或大約29 mm^3之體積。

【1625】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約24 mm^3至剛好或大約28.5 mm^3之體積。

【1626】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約25 mm^3至剛好或大約28 mm^3之體積。

【1627】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約26.5 mm^3至剛好或大約27.5 mm^3之體積。

【1628】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約以下之體積：21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50 mm^3。

【1629】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括剛好或大約30至剛好或大約60個碎片，其中總體積為剛好或大約1300 mm^3至剛好或大約1500 mm^3。

【1630】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括剛好或大約50個碎片，其中總體積為剛好或大約1350 mm^3。

【1631】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包括剛好或大約50個碎片，其中總質量為剛好或大約1公克至剛好或大約1.5公克。

【1632】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中細胞培養基係提供於呈G容器或Xuri細胞袋之容器中。

【1633】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中細胞培養基中之IL-2濃度為約10,000 IU/mL至約5,000 IU/mL。

【1634】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中細胞培養基中之IL-2濃度為約6,000 IU/mL。

【1635】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中冷凍保存培養基包括二甲基亞碸(DMSO)。

【1636】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中冷凍保存培養基包括7%至10% DMSO。

【1637】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(b)中之第一時段係於剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天之時段內進行。

【1638】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(c)中之第二

時段係於剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天之時段內進行。

【1639】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(b)中之第一時段及步驟(c)中之第二時段各自分別係於剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天之時段內進行。

【1640】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(b)中之第一時段及步驟(c)中之第二時段各自分別係於剛好或大約5天、6天或7天之時段內進行。

【1641】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(b)中之第一時段及步驟(c)中之第二時段各自分別係於剛好或大約7天之時段內進行。

【1642】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約14天至剛好或大約18天中進行。

【1643】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約15天至剛好或大約18天中進行。

【1644】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約16天至剛好或大約18天中進行。

【1645】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約17天至剛好或大約18天中進行。

【1646】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約14天至剛好或大約17天中進行。

【1647】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約15天至剛好或大約17天中進行。

【1648】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約16天至剛好或大約17天中進行。

【1649】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約14天至剛好或大約16天中進行。

【1650】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約15天至剛好或大約16天中進行。

【1651】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約14天中進行。

【1652】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約15天中進行。

【1653】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約16天中進行。

【1654】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約17天中進行。

【1655】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約18天中進行。

【1656】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約14天或更短時間中進行。

【1657】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約15天或更短中時間進行。

【1658】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約16天或更短中進行。

【1659】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約18天或更短時間中進行。

【1660】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(d)中收集之治療性TIL群體包括足以用於TIL之治療有效劑量的TIL。

【1661】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中足以用於治療有效劑量之TIL的數目為剛好或大約2.3×10^{10}至剛好或大約13.7×10^{10}。

【1662】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(c)中之第三TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1663】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中相較於藉由長於16天之過程來製備的TIL，步驟(c)中之第三TIL群體提供至少一倍至五倍或更多的干擾素-γ產生。

【1664】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中相較於藉由長於17天之過程來製備的TIL，步驟(c)中之第三TIL群體提供至少一倍至五倍或更多的干擾素-γ產生。

【1665】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中相較於藉由長於18天之過程來製備的TIL，步驟(c)中之第三TIL群體提供至少一倍至五倍或更多的干擾素-γ產生。

【1666】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中相對於獲自步驟(b)第二細胞群體之效應T細胞及/或中央記憶T細胞，獲自步驟(c)第三TIL群體之效應T細胞及/或中央記憶T細胞展

現增加的CD8及CD28表現。

【1667】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中引述之各容器為密閉容器。

【1668】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中引述之各容器為G容器。

【1669】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中引述之各容器為GREX-10。

【1670】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中引述之各容器為GREX-100。

【1671】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中引述之各容器為GREX-500。

【1672】在另一實施例中，本發明提供藉由如上適用之任何前述段落中描述之方法製備的治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體。

【1673】在另一實施例中，本發明提供一種自患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由其中TIL之第一擴增係在未添加任何抗原呈現細胞(APC)或OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，治療性TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或

增加的多株性。

【1674】在另一實施例中，本發明提供一種自患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由其中TIL之第一擴增係在未添加任何抗原呈現細胞(APC)之情況下進行之過程製備的TIL，治療性TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1675】在另一實施例中，本發明提供一種自患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由其中TIL之第一擴增係在未添加任何OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，治療性TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1676】在另一實施例中，本發明提供一種自患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由其中TIL之第一擴增係在未添加抗原呈現細胞(APC)及未添加OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，治療性TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1677】在另一實施例中，本發明提供一種自患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由過程長於16天之過程製備的TIL，治療性TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1678】在另一實施例中，本發明提供一種自患者之

腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由過程長於17天之過程製備的TIL，治療性TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1679】在另一實施例中，本發明提供一種自患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由過程長於18天之過程製備的TIL，治療性TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1680】在另一實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，該治療性TIL群體提供增加的干擾素-γ產生。

【1681】在另一實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，該治療性TIL群體提供增加的多株性。

【1682】在另一實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，該治療性TIL群體提供增加的功效。

【1683】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於16天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於17天之過程製備的TIL，該

治療性TIL群體能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於18天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【1684】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於16天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於17天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於18天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。

【1685】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較

於藉由長於16天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於17天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於18天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。

【1686】在另一實施例中，本發明提供一種治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在未添加任何抗原呈現細胞(APC)之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性腫瘤浸潤性淋巴球群體能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【1687】在另一實施例中，本發明提供一種治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在未添加任何OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性腫瘤浸潤性淋巴球群體產生至少多於一倍的干擾

素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【1688】在另一實施例中，本發明提供一種治療性TIL群體，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在未添加任何APC之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體產生至少多於兩倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。

【1689】在另一實施例中，本發明提供一種治療性TIL群體，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在未添加任何OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體產生至少多於兩倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。

【1690】在另一實施例中，本發明提供一種治療性TIL群體，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在未添加任何APC之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體產生至少多於三倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描

述之擴增過程(亦如例如圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【1691】在另一實施例中，本發明提供一種治療性TIL群體，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在未添加任何OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體產生至少多於三倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(特別是例如圖8B及/或圖8C)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。

【1692】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中腫瘤碎片為小型生檢體(包含例如穿孔生檢體)、核心生檢體、芯針生檢體或細針抽吸物。

【1693】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中腫瘤碎片為核心生檢體。

【1694】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中腫瘤碎片為細針抽吸物。

【1695】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中腫瘤碎片為小型生檢體(包含例如穿孔生檢體)。

【1696】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中腫瘤碎片為芯針生檢體。

【1697】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括自一個或多個來自個體之腫瘤組織的小型生檢體(包含例如穿孔生檢體)、核心生檢體、芯針生檢或體細針抽吸物獲得第一TIL群體；(ii)該方法包括在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在包括IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包括進行初始第一擴增約8天之時段；及(iv)該方法包括進行快速第二擴增約11天之時段。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1698】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括自一個或多個來自個體之腫瘤組織的小型生檢(包含例如穿孔生檢)、核心生檢、芯針生檢或細針抽吸物獲得第一TIL群體；(ii)該方法包括在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在包括IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包括進行初始第一擴增約8天之時段；及(iv)該方法包括藉由以下方式進行快速第二擴增：培養第二TIL群體之培養物約5天，將培養物分成至多5個繼代培養物，以及培養該等繼代培養物約6天。在一些前述實施例中，在與在快速第二擴增中開始培養第二TIL群體的容器相同大小或更大的容器中，分別培養至多5個

繼代培養物。在一些前述實施例中，第二TIL群體之培養物平均分在至多5個繼代培養物中。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1699】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1至約20個來自個體之腫瘤組織的小型生檢(包含例如穿孔生檢)、核心生檢、芯針生檢或細針抽吸物。

【1700】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1至約10個來自個體之腫瘤組織的小型生檢(包含例如穿孔生檢)、核心生檢、芯針生檢或細針抽吸物。

【1701】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自個體之腫瘤組織的小型生檢(包含例如穿孔生檢)、核心生檢、芯針生檢或細針抽吸物。

【1702】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自個體之腫瘤組織的小型生檢(包含例如穿孔生檢)、核心生檢、芯針生檢或細針抽吸物。

【1703】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係

獲自1至約20個來自個體之腫瘤組織的核心生檢。

【1704】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1至約10個來自個體之腫瘤組織的核心生檢。

【1705】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自個體之腫瘤組織的核心生檢。

【1706】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自個體之腫瘤組織的核心生檢。

【1707】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1至約20個來自個體之腫瘤組織的細針抽吸物。

【1708】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1至約10個來自個體之腫瘤組織的細針抽吸物。

【1709】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自個體之腫瘤組織的細針抽吸物。

【1710】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自個體之腫瘤組織的細針抽吸物。

【1711】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1至約20個來自個體之腫瘤組織的芯針生檢。

【1712】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1至約10個來自個體之腫瘤組織的芯針生檢。

【1713】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自個體之腫瘤組織的芯針生檢。

【1714】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自個體之腫瘤組織的芯針生檢。

【1715】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1至約20個來自個體之腫瘤組織的小型生檢(包含例如穿孔生檢)。

【1716】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1至約10個來自個體之腫瘤組織的小型生檢(包含例如穿孔生檢)。

【1717】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自個體之腫瘤組織的小型生檢(包含例如穿孔生檢)。

【1718】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自個體之腫瘤組織的小型生檢(包含例如穿孔生檢)。

【1719】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括自1至約10個來自個體之腫瘤組織的核心生檢獲得第一TIL群體；(ii)該方法包括在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在包括IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包括藉由在包括IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之培養基中培養第一TIL群體約8天之時段來進行初始第一擴增步驟，以獲得第二TIL群體；且(iv)該方法包括藉由在包括IL-2、OKT-3及APC之培養基中培養第二TIL群體約11天之時段來進行快速第二擴增步驟。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1720】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括自1至約10個來自個體之腫瘤組織的核心生檢獲得第一TIL群體；(ii)該方法包括在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在包括IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包括藉由在包括IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之培養基中培養第一TIL群體約8天之時段來進行初始第一擴增步驟，以獲得第二TIL群體；且(iv)該方法包括藉由以下方式進行快速第二擴增：在包括IL-2、OKT-3及APC之細胞培養基中培養第二TIL群體之培養物約5天，將培養物分成至多5個繼代培養物，以及在包括IL-2之培養基中培養該等繼代培養物中之每一者約6天。在一些前述實施例中，在與在快速第二擴增中開始培養第二TIL群體的容器相同大小或更大的容器中，分別培養至多5個繼代培養物。在一些前述實施例中，第二TIL群體之培養物平均分在至多5個繼代培養物中。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1721】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包括自1至約10個來自個體之腫瘤組織的核心生檢獲得第一TIL群體；(ii)該方法包括在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在G-Rex 100M培養瓶中在包括含6000 IU IL-2/mL之0.5 L CM1培養基的細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包括藉由以下方式進行初始第一擴增：添加含有6000 IU/ml IL-2、30 ng/ml OKT-3及約10^8個

飼養細胞之0.5 L CM1培養基，且培養約8天之時段；且(iv)該方法包括藉由以下方式進行快速第二擴增：(a)將第二TIL群體轉移至含有具有3000 IU/mL IL-2、30 ng/mL OKT-3及5×10^9個飼養細胞之5 L CM2培養基的G-Rex 500MCS培養瓶中，且培養約5天；(b)藉由將10^9個TIL轉移至含有具有3000 IU/mL IL-2之5 L AIM-V培養基的至多5個G-Rex 500MCS培養瓶中之每一者中而將培養物分成至多5個繼代培養物，且培養該等繼代培養物約6天。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1722】在另一實施例中，本發明提供一種擴增T細胞之方法，其包括：(a)藉由培養獲自供體之第一T細胞群體來進行該第一T細胞群體的初始第一擴增，以實現生長及啟動第一T細胞群體的活化；(b)在步驟(a)中啟動之第一T細胞群體之活化開始衰退後，藉由培養第一T細胞群體進行第一T細胞群體的快速第二擴增以實現生長及增強第一T細胞群體的活化，以獲得第二T細胞群體；及(c)收集第二T細胞群體。在另一實施例中，快速第二擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移至大於第一容器的第二容器(例如G-Rex 500MCS容器)，及在第二容器中之較大規模培養中培養來自小規模培養的第一T細胞群體約4至7天的時段。在另一實施例中，快速擴增步

驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之第一小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自第一小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個與第一容器大小相等之第二容器之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自第一小規模培養的第一T細胞群體部分係在第二小規模培養中培養約4至7天的時段。在另一實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大之第二容器(例如G-Rex 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約4至7天的時段。在另一實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少

2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-Rex 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約5天的時段。

【1723】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移至大於第一容器之第二容器(例如G-Rex 500MCS容器)之中，及在第二容器中之較大規模培養中培養來自小規模培養的第一T細胞群體約5至7天的時段。

【1724】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之第一小規模培養中培養第一T細胞群體約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自第一小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個與第一容器大小相等之第二容器之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自第一小規模培養的第一T細胞群體部分係在第二小規模培養中培養約5至7天的時段。

【1725】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大之第二容器(例如G-Rex 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約5至7天的時段。

【1726】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-Rex 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約5至6天的時段。

【1727】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速擴增步驟分

為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-Rex 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約5天的時段。

【1728】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-Rex500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約6天的時段。

【1729】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-Rex 100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之

第一T細胞群體轉移且分配至2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-Rex 500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約7天的時段。

【1730】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中步驟(a)之初始第一擴增係在至多7天之時段內進行。

【1731】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中步驟(b)之快速第二擴增係在至多8天之時段內進行。

【1732】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中步驟(b)之快速第二擴增係在至多9天之時段內進行。

【1733】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中步驟(b)之快速第二擴增係在至多10天之時段內進行。

【1734】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中步驟(b)之快速第二擴增係在至多11天之時段內進行。

【1735】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之初始第一擴增係在7天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多9天之時段內進行。

【1736】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之初始第一擴增係在7天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多10天之時段內進行。

【1737】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之初始第一擴增係在7天或8天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多9天之時段內進行。

【1738】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之初始第一擴增係在7天或8天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多10天之時段內進行。

【1739】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之初始第一擴增係在8天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多9天之時段內進行。

【1740】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之初始第一擴增係在8天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多8天之時段內進行。

【1741】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(a)中，第一T細胞群體係在包括OKT-3及IL-2之第一培養基中培養。

【1742】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一培養基包括4-1BB促效劑、OKT-3及IL-2。

【1743】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一培養基包括OKT-3、IL-2及抗原呈現細胞(APC)。

【1744】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一培養基包括4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及抗原呈現細胞(APC)。

【1745】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，第一T細胞群體係在包括OKT-3、IL-2及抗原呈現細胞(APC)之第二培養基中培養。

【1746】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第二培養基包括4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及抗原呈現細胞(APC)。

【1747】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一T細胞群體係在包括第一透氣表面之容器中於第一培養基中培養，其中第一培養基包括OKT-3、IL-2及第一抗原呈現細胞(APC)群體，其中第一APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第一APC群體層疊至第一透氣表面上，其中在步驟(b)中，第一T細胞群體係在容器中於第二培養基中培養，其中第二培養基包括OKT-3、IL-2及第二APC群體，其中第二APC群體對於第一T細胞群體之供

體為外源性的，且第二APC群體層疊至第一透氣表面上，且其中第二APC群體比第一APC群體大。

【1748】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一T細胞群體係在包括第一透氣表面之容器中於第一培養基中培養，其中第一培養基包括4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及第一抗原呈現細胞(APC)群體，其中第一APC群體對於第一T細胞群體供體為外源性的，且第一APC群體層疊至第一透氣表面上，其中在步驟(b)中，第一T細胞群體係在容器中於第二培養基中培養，其中第二培養基包括OKT-3、IL-2及第二APC群體，其中第二APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第二APC群體層疊至第一透氣表面上，且其中第二APC群體比第一APC群體大。

【1749】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一T細胞群體係在包括第一透氣表面之容器中於第一培養基中培養，其中第一培養基包括OKT-3、IL-2及第一抗原呈現細胞(APC)群體，其中第一APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第一APC群體層疊至第一透氣表面上，其中在步驟(b)中，第一T細胞群體係在容器中於第二培養基中培養，其中第二培養基包括4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及第二APC群體，其中第二APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第二APC群體層疊至

第一透氣表面上，且其中第二APC群體比第一APC群體大。

【1750】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一T細胞群體係在包括第一透氣表面之容器中於第一培養基中培養，其中第一培養基包括4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及第一抗原呈現細胞(APC)群體，其中第一APC群體對於第一T細胞群體供體為外源性的，且第一APC群體層疊至第一透氣表面上，其中在步驟(b)中，第一T細胞群體係在容器中於第二培養基中培養，其中第二培養基包括4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及第二APC群體，其中第二APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第二APC群體層疊至第一透氣表面上，且其中第二APC群體比第一APC群體大。

【1751】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第二APC群體中之APC之數目與第一APC群體中之APC之數目的比率為約2:1。

【1752】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一APC群體中之APC之數目為約2.5×10^8，且第二APC群體中之APC之數目為約5×10^8。

【1753】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(a)中，第

一APC群體以2個APC層之平均厚度層疊至第一透氣表面上。

【1754】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中，第二APC群體以選自4至8個APC層之範圍內的平均厚度層疊至第一透氣表面上。

【1755】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中層疊至第一透氣表面上之APC層的平均數目與在步驟(a)中層疊至第一透氣表面上之APC層的平均數目的比率為2:1。

【1756】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以選自剛好或大約1.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約4.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1757】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以選自剛好或大約1.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1758】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以選自剛好或大約2.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3.0×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表

面上。

【1759】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以剛好或大約2.0×10^6個APC/cm^2之密度接種在第一透氣表面上。

【1760】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中，第二APC群體以選自剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約7.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1761】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中，第二APC群體以選自剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約6.0×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1762】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中，第二APC群體以選自剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約5.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1763】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中，第二APC群體以剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2之密度接種在第一透氣表面上。

【1764】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以選自剛好或大約1.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約4.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上，且在步驟(b)中，第二APC群體以選自剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約7.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1765】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以選自剛好或大約1.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上，且在步驟(b)中，第二APC群體以選自剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約6.0×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1766】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以選自剛好或大約2.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3.0×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上，且在步驟(b)中，第二APC群體以選自剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約5.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1767】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以剛好或大約2.0×10^6個APC/cm^2之密度接種在

第一透氣表面上，且在步驟(b)中，第二APC群體以剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2之密度接種在第一透氣表面上。

【1768】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中APC為末梢血液單核細胞(PBMC)。

【1769】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中PBMC經輻照且對於第一T細胞群體之供體為外源性的。

【1770】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中T細胞為腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)。

【1771】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中T細胞為骨髓浸潤性淋巴球(MIL)。

【1772】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中T細胞為末梢血液淋巴球(PBL)。

【1773】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一T細胞群體係藉由自供體之全血分離而獲得。

【1774】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一T細胞群體係藉由自供體之血球分離術產物分離而獲得。

【1775】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一T細胞群體係藉由T細胞表型之正向或負向選擇自供體之全血或血球分離術產物分離。

【1776】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中T細胞表型為CD3+及CD45+。

【1777】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在進行第一T細胞群體之初始第一擴增之前，自NK細胞分離T細胞。在另一實施例中，藉由自第一T細胞群體移除CD3-CD56+細胞來將第一T細胞群體中之T細胞與NK細胞分離。在另一實施例中，藉由使用移除CD3-CD56+細胞級份且回收陰性級份之圈選策略對第一T細胞群體進行細胞分選，自第一T細胞群體移除CD3-CD56+細胞。在另一實施例中，前述方法係用於以高百分比之NK細胞為特徵的第一T細胞群體中之T細胞擴增。在另一實施例中，前述方法係用於以高百分比之CD3-CD56+細胞為特徵的第一T細胞群體中之T細胞擴增。在另一實施例中，前述方法用於以存在大量NK細胞為特徵的腫瘤組織中之T細胞擴增。在其他實施例中，前述方法係用於以大量CD3-CD56+細胞為特徵的腫瘤組織中之T細胞擴增。在另一實施例中，前述方法係用於自患有以存在大量NK細胞為特徵之腫瘤的患者獲得的腫瘤組織中之T細胞擴增。在另一實施例中，前述方法係用於自患有以存在大量CD3-CD56+細胞為特徵之腫瘤的患者獲得

的腫瘤組織中之T細胞擴增。在另一實施例中，前述方法係用於自患有卵巢癌之患者獲得的腫瘤組織中之T細胞擴增。

【1778】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中將剛好或大約1×10^7個來自第一T細胞群體之T細胞接種於容器中，以起始此類容器中之初始第一擴增培養。

【1779】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中將第一T細胞群體分佈至複數個容器中，且在各容器中接種剛好或大約1×10^7個來自第一T細胞群體之T細胞，以起始此類容器中之初始第一擴增培養。

【1780】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(c)中收集之第二T細胞群體為治療性TIL群體。

【1781】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自一個或多個來自供體之腫瘤組織的小型生檢(包含例如穿孔生檢)、核心生檢、芯針生檢或細針抽吸物。

【1782】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至20個來自供體之腫瘤組織的小型生檢(包含例如穿孔生檢)、核心生檢、芯針生檢或細針抽吸物。

【1783】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至10個來自供體之腫瘤組織的小型生檢(包含例如穿孔生檢)、核心生檢、芯針生檢或細針抽吸物。

【1784】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自供體之腫瘤組織的小型生檢(包含例如穿孔生檢)、核心生檢、芯針生檢或細針抽吸物。

【1785】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自供體之腫瘤組織的小型生檢(包含例如穿孔生檢)、核心生檢、芯針生檢或細針抽吸物。

【1786】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自一個或多個來自供體之腫瘤組織的核心生檢。

【1787】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至20個來自供體之腫瘤組織的核心生檢。

【1788】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至10個來自供體之腫瘤組織的核心生檢。

【1789】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自供體之腫瘤組織的核心生檢。

【1790】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自供體之腫瘤組織的核心生檢。

【1791】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自一個或多個來自供體之腫瘤組織的細針抽吸物。

【1792】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至20個來自供體之腫瘤組織的細針抽吸物。

【1793】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至10個來自供體之腫瘤組織的細針抽吸物。

【1794】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自供體之腫瘤組織的細針抽吸物。

【1795】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體

係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自供體之腫瘤組織的細針抽吸物。

【1796】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自一個或多個來自供體之腫瘤組織的小型生檢(包含例如穿孔生檢)。

【1797】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至20個來自供體之腫瘤組織小型生檢(包含例如穿孔生檢)。

【1798】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至10個來自供體之腫瘤組織的小型生檢(包含例如穿孔生檢)。

【1799】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自供體之腫瘤組織的小型生檢(包含例如穿孔生檢)。

【1800】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自供體之腫瘤組織的小型生檢(包含例如穿孔生檢)。

【1801】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自一個或多個來自供體之腫瘤組織的芯針生檢。

【1802】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至20個來自供體之腫瘤組織的芯針生檢。

【1803】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至10個來自供體之腫瘤組織的芯針生檢。

【1804】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自供體之腫瘤組織的芯針生檢。

【1805】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自供體之腫瘤組織的芯針生檢。

【1806】在另一實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包括：i)藉由在包括IL-2之第一細胞培養基中培養自個體腫瘤之一個或多個小型生檢、核心生檢或穿刺生檢獲得的腫瘤樣本約3天而自該腫瘤樣本獲得及/或接受第一TIL群體；(ii)藉由在包括IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增

以產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增係在包括第一透氣表面區域之容器中進行，其中該初始第一擴增進行約7天或8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(iii)藉由用另外的IL-2、OKT-3及APC補充第二TIL群體之第二細胞培養基來進行快速第二擴增以產生第三TIL群體，其中在快速第二擴增中添加之APC數目為在步驟(ii)中添加之APC數目的至少兩倍，其中該快速第二擴增進行約11天之第二時段以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體，其中該快速第二擴增係在包括第二透氣表面區域之容器中進行；(iv)收集獲自步驟(iii)之治療性TIL群體；及(v)將來自步驟(iv)之經收集的TIL群體轉移至輸注袋。

【1807】在另一實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包括：(i)藉由在包括IL-2之第一細胞培養基中培養自個體腫瘤之一個或多個小型生檢、核心生檢或穿刺生檢獲得的腫瘤樣本約3天而自該腫瘤樣本獲得及/或接受第一TIL群體；(ii)藉由在包括IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增以產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約7天或8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(iii)藉由使第二TIL群體與包括IL-2、OKT-3及APC之第三細胞培養基接觸來進行快速第二擴增以產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增進行約11天

之第二時段以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及(iv)收集獲自步驟(iii)之治療性TIL群體。

【1808】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在第二時段之第5天後，將培養物分成2個或更多個繼代培養物，且向各繼代培養物補充另外數量的第三培養基並且培養約6天。

【1809】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在第二時段之第5天後，將培養物分成2個或更多個繼代培養物，且向各繼代培養物補充包括IL-2之第四培養基並且培養約6天。

【1810】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在第二時段之第5天後，將培養物分成至多5個繼代培養物。

【1811】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中之所有步驟係在約22天內完成。

【1812】在另一實施例中，本發明提供一種擴增T細胞之方法，其包括：(i)藉由培養來自腫瘤樣本之第一T細胞群體來進行該第一T細胞群體的初始第一擴增，以實現生長及啟動第一T細胞群體的活化，該腫瘤樣本係自供體腫瘤之一個或多個小型生檢、核心生檢或穿刺生檢獲得；(ii)在步驟(a)中啟動之第一T細胞群體之活化開始衰退後，藉由培養第一T細胞群體進行第一T細胞群體的快速第二擴增以實現生長及增強第一T細胞群體的活化，以獲得第二T

細胞群體；及(iv)收集第二T細胞群體。在一些實施例中，腫瘤樣本係自複數個核心生檢獲得。在一些實施例中，複數個核心生檢係選自由以下組成之群組：2、3、4、5、6、7、8、9及10個核心生檢。

【1813】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中T細胞或TIL自腫瘤碎解物中獲得。在一些實施例中，藉由在酶培養基(例如但不限於RPMI 1640、2 mM GlutaMAX、10 mg/mL建它黴素、30 U/mL DNA酶及1.0 mg/mL膠原蛋白酶)中培育腫瘤，隨後進行機械解離(加利福尼亞州奧本美天旎生物技術的GentleMACS)來產生腫瘤碎解物。在一些實施例中，將腫瘤置放於腫瘤解離酶混合物中，該腫瘤解離酶混合物包含一或多種解離(消化)酶，諸如但不限於膠原蛋白酶(包含任何摻合物或類型之膠原蛋白酶)、Accutase™、Accumax™、玻尿酸酶、中性蛋白酶(分散酶)、胰凝乳蛋白酶、木瓜凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、酪蛋白酶、彈性蛋白酶、木瓜蛋白酶、蛋白酶型XIV(鏈蛋白酶)、去氧核糖核酸酶I(DNA酶)、胰蛋白酶抑制劑、任何其他解離或蛋白分解酶，及其任何組合。在其他實施例中，將腫瘤置放於腫瘤解離酶混合物中，該腫瘤解離酶混合物包含膠原蛋白酶(包含任何摻合物或類型之膠原蛋白酶)、中性蛋白酶(分散酶)及去氧核糖核酸酶I(DNA酶)。

【1814】醫藥組合物、劑量及給藥方案

【1815】在一實施例中，使用本揭示案之方法擴增之

TIL係以醫藥組合物之形式向患者投予。在一實施例中，醫藥組合物為TIL於無菌緩衝液中之懸浮液。使用本揭示案之PBMC擴增的TIL可藉由本領域中已知的任何適合途徑投予。在一些實施例中，T細胞係以單一動脈內或靜脈內輸注之形式投與，其較佳持續大約30至60分鐘。其他適合之投予途徑包含腹膜內、鞘內及淋巴管內投予。

【1816】可投予任何適合劑量之TIL。在一些實施例中，投予約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}個TIL，平均約7.8×10^{10}個TIL，特別是在癌症為黑色素瘤之情況下。在一實施例中，投予約1.2×10^{10}至約4.3×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投予約3×10^{10}至約12×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投予約4×10^{10}至約10×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投予約5×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投予約6×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投予約7×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}個。在一些實施例中，治療有效劑量為約7.8×10^{10}個TIL，特別是在癌症為黑色素瘤之情況下。在一些實施例中，治療有效劑量為約1.2×10^{10}至約4.3×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約3×10^{10}至約12×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約4×10^{10}至約10×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約5×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約6×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約7×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。

【1817】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之數目為約1×10^6、2×10^6、3×10^6、4×10^6、5×10^6、6×10^6、7×10^6、8×10^6、9×10^6、1×10^7、2×10^7、3×10^7、4×10^7、5×10^7、6×10^7、7×10^7、8×10^7、9×10^7、1×10^8、2×10^8、3×10^8、4×10^8、5×10^8、6×10^8、7×10^8、8×10^8、9×10^8、1×10^9、2×10^9、3×10^9、4×10^9、5×10^9、6×10^9、7×10^9、8×10^9、9×10^9、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}及9×10^{13}。在一實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之數目在1×10^6至5×10^6、5×10^6至1×10^7、1×10^7至5×10^7、5×10^7至1×10^8、1×10^8至5×10^8、5×10^8至1×10^9、1×10^9至5×10^9、5×10^9至1×10^{10}、1×10^{10}至5×10^{10}、5×10^{10}至1×10^{11}、5×10^{11}至1×10^{12}、1×10^{12}至5×10^{12}及5×10^{12}至1×10^{13}之範圍內。

【1818】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度小於例如醫藥組合物之100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、

0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001% w/w、w/v或v/v。

【1819】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度大於醫藥組合物之90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19.75%、19.50%、19.25%、19%、18.75%、18.50%、18.25%、18%、17.75%、17.50%、17.25%、17%、16.75%、16.50%、16.25%、16%、15.75%、15.50%、15.25%、15%、14.75%、14.50%、14.25%、14%、13.75%、13.50%、13.25%、13%、12.75%、12.50%、12.25%、12%、11.75%、11.50%、11.25%、11%、10.75%、10.50%、10.25%、10%、9.75%、9.50%、9.25%、9%、8.75%、8.50%、8.25%、8%、7.75%、7.50%、7.25%、7%、6.75%、6.50%、6.25%、6%、5.75%、5.50%、5.25%、5%、4.75%、4.50%、4.25%、4%、3.75%、3.50%、3.25%、3%、2.75%、2.50%、2.25%、2%、1.75%、1.50%、125%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、

0.0003%、0.0002%或0.0001% w/w、w/v或v/v。

【1820】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度在醫藥組合物的約0.0001%至約50%、約0.001%至約40%、約0.01%至約30%、約0.02%至約29%、約0.03%至約28%、約0.04%至約27%、約0.05%至約26%、約0.06%至約25%、約0.07%至約24%、約0.08%至約23%、約0.09%至約22%、約0.1%至約21%、約0.2%至約20%、約0.3%至約19%、約0.4%至約18%、約0.5%至約17%、約0.6%至約16%、約0.7%至約15%、約0.8%至約14%、約0.9%至約12%或約1%至約10% w/w、w/v或v/v之範圍內。

【1821】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度在醫藥組合物之約0.001%至約10%、約0.01%至約5%、約0.02%至約4.5%、約0.03%至約4%、約0.04%至約3.5%、約0.05%至約3%、約0.06%至約2.5%、約0.07%至約2%、約0.08%至約1.5%、約0.09%至約1%、約0.1%至約0.9% w/w、w/v或v/v之範圍內。

【1822】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之量等於或小於10 g、9.5 g、9.0 g、8.5 g、8.0 g、7.5 g、7.0 g、6.5 g、6.0 g、5.5 g、5.0 g、4.5 g、4.0 g、3.5 g、3.0 g、2.5 g、2.0 g、1.5 g、1.0 g、0.95 g、0.9 g、0.85 g、0.8 g、0.75 g、0.7 g、0.65 g、0.6 g、0.55 g、0.5 g、0.45 g、0.4 g、0.35 g、0.3 g、0.25 g、0.2 g、0.15 g、0.1 g、0.09 g、0.08 g、0.07 g、0.06 g、0.05 g、0.04 g、0.03 g、0.02 g、0.01 g、0.009 g、0.008 g、0.007 g、

0.006 g、0.005 g、0.004 g、0.003 g、0.002 g、0.001 g、0.0009 g、0.0008 g、0.0007 g、0.0006 g、0.0005 g、0.0004 g、0.0003 g、0.0002 g或0.0001 g。

【1823】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之量大於0.0001 g、0.0002 g、0.0003 g、0.0004 g、0.0005 g、0.0006 g、0.0007 g、0.0008 g、0.0009 g、0.001 g、0.0015 g、0.002 g、0.0025 g、0.003 g、0.0035 g、0.004 g、0.0045 g、0.005 g、0.0055 g、0.006 g、0.0065 g、0.007 g、0.0075 g、0.008 g、0.0085 g、0.009 g、0.0095 g、0.01 g、0.015 g、0.02 g、0.025 g、0.03 g、0.035 g、0.04 g、0.045 g、0.05 g、0.055 g、0.06 g、0.065 g、0.07 g、0.075 g、0.08 g、0.085 g、0.09 g、0.095 g、0.1 g、0.15 g、0.2 g、0.25 g、0.3 g、0.35 g、0.4 g、0.45 g、0.5 g、0.55 g、0.6 g、0.65 g、0.7 g、0.75 g、0.8 g、0.85 g、0.9 g、0.95 g、1 g、1.5 g、2 g、2.5、3 g、3.5、4 g、4.5 g、5 g、5.5 g、6 g、6.5 g、7 g、7.5 g、8 g、8.5 g、9 g、9.5 g或10 g。

【1824】提供於本發明之醫藥組合物中的TIL在廣泛劑量範圍內有效。準確劑量將視投予途徑、化合物投予形式、待治療個體之性別及年齡、待治療個體之體重及主治醫師之偏好及經驗而定。適當時亦可使用TIL之臨床確定劑量。使用本文之方法投予之醫藥組合物的量，諸如TIL之劑量將視所治療之人類或哺乳動物、病症或病狀之嚴重程度、投予速率、活性醫藥成分之配置及開處方醫師之判

斷而定。

【1825】在一些實施例中，TIL可以單次劑量投予。此類投予可藉由例如靜脈內注射之注射進行。在一些實施例中，TIL可以多次劑量投予。給藥可為每年一次、兩次、三次、四次、五次、六次或超過六次。給藥可為每月一次、每兩週一次、一週一次或每隔一天一次。TIL之投予可視需要而繼續。

【1826】在一些實施例中，TIL之有效劑量為約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}、8×10^{7}、9×10^{7}、1×10^{8}、2×10^{8}、3×10^{8}、4×10^{8}、5×10^{8}、6×10^{8}、7×10^{8}、8×10^{8}、9×10^{8}、1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}及9×10^{13}。在一些實施例中，TIL之有效劑量在1×10^{6}至5×10^{6}、5×10^{6}至1×10^{7}、1×10^{7}至5×10^{7}、5×10^{7}至1×10^{8}、1×10^{8}至5×10^{8}、5×10^{8}至1×10^{9}、1×10^{9}至5×10^{9}、5×10^{9}至1×10^{10}、1×10^{10}至5×10^{10}、5×10^{10}至1×10^{11}、5×10^{11}至1×10^{12}、1×10^{12}至5×10^{12}及5×10^{12}至1×10^{13}之範圍內。

【1827】在一些實施例中，TIL之有效劑量在約0.01 mg/kg至約4.3 mg/kg、約0.15 mg/kg至約3.6 mg/kg、約0.3 mg/kg至約3.2 mg/kg、約0.35 mg/kg至約2.85 mg/kg、約0.15 mg/kg至約2.85 mg/kg、約0.3 mg至約2.15 mg/kg、約0.45 mg/kg至約1.7 mg/kg、約0.15 mg/kg至約1.3 mg/kg、約0.3 mg/kg至約1.15 mg/kg、約0.45 mg/kg至約1 mg/kg、約0.55 mg/kg至約0.85 mg/kg、約0.65 mg/kg至約0.8 mg/kg、約0.7 mg/kg至約0.75 mg/kg、約0.7 mg/kg至約2.15 mg/kg、約0.85 mg/kg至約2 mg/kg、約1 mg/kg至約1.85 mg/kg、約1.15 mg/kg至約1.7 mg/kg、約1.3 mg/kg mg至約1.6 mg/kg、約1.35 mg/kg至約1.5 mg/kg、約2.15 mg/kg至約3.6 mg/kg、約2.3 mg/kg至約3.4 mg/kg、約2.4 mg/kg至約3.3 mg/kg、約2.6 mg/kg至約3.15 mg/kg、約2.7 mg/kg至約3 mg/kg、約2.8 mg/kg至約3 mg/kg或約2.85 mg/kg至約2.95 mg/kg之範圍內。

【1828】在一些實施例中，TIL之有效劑量在約1 mg至約500 mg、約10 mg至約300 mg、約20 mg至約250 mg、約25 mg至約200 mg、約1 mg至約50 mg、約5 mg至約45 mg、約10 mg至約40 mg、約15 mg至約35 mg、約20 mg至約30 mg、約23 mg至約28 mg、約50 mg至約150 mg、約60 mg至約140 mg、約70 mg至約130 mg、約80 mg至約120 mg、約90 mg至約110 mg、或約95 mg至約105 mg、約98 mg至約102 mg、約150 mg至約250 mg、約160 mg至約240 mg、約170 mg至約230 mg、約180 mg至約220 mg、約190

mg至約210 mg、約195 mg至約205 mg或約198至約207 mg之範圍內。

【1829】有效量之TIL可藉由投予具有類似效用之試劑的任一種公認模式，包含鼻內及經皮途徑、藉由動脈內注射、靜脈內、腹膜內、非經腸、肌肉內、皮下、局部、藉由移植或藉由吸入，以單次或多次劑量投予。

【1830】在其他實施例中，本發明提供一種輸注袋，其包括如上適用的在任何前述段落中描述的治療性TIL群體。

【1831】在其他實施例中，本發明提供一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組合物，其包括如上適用的在任何前述段落中描述的治療性TIL群體及醫藥學上可接受之載劑。

【1832】在其他實施例中，本發明提供一種輸注袋，其包括如上適用的在任何前述段落中描述的TIL組合物。

【1833】在其他實施例中，本發明提供一種如上適用的在任何前述段落中描述的治療性TIL群體的冷凍保存製劑。

【1834】在另一實施例中，本發明提供一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組合物，其包括在如上任何前述段落中描述的治療性TIL群體及冷凍保存培養基。

【1835】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上任何前述段落中描述的TIL組合物，其中冷凍保存培養基含有DMSO。

【1836】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上

任何前述段落中描述的TIL組合物，其中冷凍保存培養基含有7%至10% DMSO。

【1837】在另一實施例中，本發明提供一種如上任何前述段落中描述的TIL組合物的冷凍保存製劑。

【1838】在一實施例中，使用本揭示案之方法擴增之TIL係以醫藥組合物之形式向患者投予。在一實施例中，醫藥組合物為TIL於無菌緩衝液中之懸浮液。使用本揭示案之PBMC擴增的TIL可藉由本領域中已知的任何適合途徑投予。在一些實施例中，T細胞係以單一動脈內或靜脈內輸注之形式投與，其較佳持續大約30至60分鐘。其他適合之投予途徑包含腹膜內、鞘內及淋巴管內投予。

【1839】可投予任何適合劑量之TIL。在一些實施例中，投予約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}個TIL，平均約7.8×10^{10}個TIL，特別是在癌症為黑色素瘤之情況下。在一實施例中，投予約1.2×10^{10}至約4.3×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投予約3×10^{10}至約12×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投予約4×10^{10}至約10×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投予約5×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投予約6×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投予約7×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}。在一些實施例中，治療有效劑量為約7.8×10^{10}個TIL，特別是在癌症為黑色素瘤之情況下。在一些實施例中，治療有效劑量為約1.2×10^{10}至約4.3×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約3×10^{10}至約

12×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約4×10^{10}至約10×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約5×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約6×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約7×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。

【1840】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之數目為約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}、8×10^{7}、9×10^{7}、1×10^{8}、2×10^{8}、3×10^{8}、4×10^{8}、5×10^{8}、6×10^{8}、7×10^{8}、8×10^{8}、9×10^{8}、1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}及9×10^{13}。在一實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之數目在1×10^{6}至5×10^{6}、5×10^{6}至1×10^{7}、1×10^{7}至5×10^{7}、5×10^{7}至1×10^{8}、1×10^{8}至5×10^{8}、5×10^{8}至1×10^{9}、1×10^{9}至5×10^{9}、5×10^{9}至1×10^{10}、1×10^{10}至5×10^{10}、5×10^{10}至1×10^{11}、5×10^{11}至1×10^{12}、1×10^{12}至5×10^{12}及5×10^{12}至1×10^{13}之範圍內。

【1841】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合

物中的TIL之濃度小於例如醫藥組合物之100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001% w/w、w/v或v/v。

【1842】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度大於醫藥組合物之90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19.75%、19.50%、19.25%、19%、18.75%、18.50%、18.25%、18%、17.75%、17.50%、17.25%、17%、16.75%、16.50%、16.25%、16%、15.75%、15.50%、15.25%、15%、14.75%、14.50%、14.25%、14%、13.75%、13.50%、13.25%、13%、12.75%、12.50%、12.25%、12%、11.75%、11.50%、11.25%、11%、10.75%、10.50%、10.25%、10%、9.75%、9.50%、9.25%、9%、8.75%、8.50%、8.25%、8%、7.75%、7.50%、7.25%、7%、6.75%、6.50%、6.25%、6%、5.75%、5.50%、5.25%、5%、4.75%、4.50%、4.25%、4%、3.75%、3.50%、3.25%、3%、2.75%、2.50%、2.25%、2%、1.75%、

1.50%、125%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001% w/w、w/v或v/v。

【1843】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度在醫藥組合物的約0.0001%至約50%、約0.001%至約40%、約0.01%至約30%、約0.02%至約29%、約0.03%至約28%、約0.04%至約27%、約0.05%至約26%、約0.06%至約25%、約0.07%至約24%、約0.08%至約23%、約0.09%至約22%、約0.1%至約21%、約0.2%至約20%、約0.3%至約19%、約0.4%至約18%、約0.5%至約17%、約0.6%至約16%、約0.7%至約15%、約0.8%至約14%、約0.9%至約12%或約1%至約10% w/w、w/v或v/v之範圍內。

【1844】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度在醫藥組合物之約0.001%至約10%、約0.01%至約5%、約0.02%至約4.5%、約0.03%至約4%、約0.04%至約3.5%、約0.05%至約3%、約0.06%至約2.5%、約0.07%至約2%、約0.08%至約1.5%、約0.09%至約1%、約0.1%至約0.9% w/w、w/v或v/v之範圍內。

【1845】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之量等於或小於10 g、9.5 g、9.0 g、8.5 g、8.0 g、7.5 g、7.0 g、6.5 g、6.0 g、5.5 g、5.0 g、4.5 g、4.0

g、3.5 g、3.0 g、2.5 g、2.0 g、1.5 g、1.0 g、0.95 g、0.9 g、0.85 g、0.8 g、0.75 g、0.7 g、0.65 g、0.6 g、0.55 g、0.5 g、0.45 g、0.4 g、0.35 g、0.3 g、0.25 g、0.2 g、0.15 g、0.1 g、0.09 g、0.08 g、0.07 g、0.06 g、0.05 g、0.04 g、0.03 g、0.02 g、0.01 g、0.009 g、0.008 g、0.007 g、0.006 g、0.005 g、0.004 g、0.003 g、0.002 g、0.001 g、0.0009 g、0.0008 g、0.0007 g、0.0006 g、0.0005 g、0.0004 g、0.0003 g、0.0002 g或0.0001 g。

【1846】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之量大於0.0001 g、0.0002 g、0.0003 g、0.0004 g、0.0005 g、0.0006 g、0.0007 g、0.0008 g、0.0009 g、0.001 g、0.0015 g、0.002 g、0.0025 g、0.003 g、0.0035 g、0.004 g、0.0045 g、0.005 g、0.0055 g、0.006 g、0.0065 g、0.007 g、0.0075 g、0.008 g、0.0085 g、0.009 g、0.0095 g、0.01 g、0.015 g、0.02 g、0.025 g、0.03 g、0.035 g、0.04 g、0.045 g、0.05 g、0.055 g、0.06 g、0.065 g、0.07 g、0.075 g、0.08 g、0.085 g、0.09 g、0.095 g、0.1 g、0.15 g、0.2 g、0.25 g、0.3 g、0.35 g、0.4 g、0.45 g、0.5 g、0.55 g、0.6 g、0.65 g、0.7 g、0.75 g、0.8 g、0.85 g、0.9 g、0.95 g、1 g、1.5 g、2 g、2.5、3 g、3.5、4 g、4.5 g、5 g、5.5 g、6 g、6.5 g、7 g、7.5 g、8 g、8.5 g、9 g、9.5 g或10 g。

【1847】提供於本發明之醫藥組合物中的TIL在廣泛劑量範圍內有效。準確劑量將視投予途徑、化合物投予形

式、待治療個體之性別及年齡、待治療個體之體重及主治醫師之偏好及經驗而定。適當時亦可使用TIL之臨床確定劑量。使用本文之方法投予之醫藥組合物的量，諸如TIL之劑量將視所治療之人類或哺乳動物、病症或病狀之嚴重程度、投予速率、活性醫藥成分之配置及開處方醫師之判斷而定。

【1848】在一些實施例中，TIL可以單次劑量投予。此類投予可藉由例如靜脈內注射之注射進行。在一些實施例中，TIL可以多次劑量投予。給藥可為每年一次、兩次、三次、四次、五次、六次或超過六次。給藥可為每月一次、每兩週一次、一週一次或每隔一天一次。TIL之投予可視需要而繼續。

【1849】在一些實施例中，TIL之有效劑量為約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}、8×10^{7}、9×10^{7}、1×10^{8}、2×10^{8}、3×10^{8}、4×10^{8}、5×10^{8}、6×10^{8}、7×10^{8}、8×10^{8}、9×10^{8}、1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}及

9×10^{13}。在一些實施例中，TIL之有效劑量在1×10^{6}至5×10^{6}、5×10^{6}至1×10^{7}、1×10^{7}至5×10^{7}、5×10^{7}至1×10^{8}、1×10^{8}至5×10^{8}、5×10^{8}至1×10^{9}、1×10^{9}至5×10^{9}、5×10^{9}至1×10^{10}、1×10^{10}至5×10^{10}、5×10^{10}至1×10^{11}、5×10^{11}至1×10^{12}、1×10^{12}至5×10^{12}及5×10^{12}至1×10^{13}之範圍內。

【1850】在一些實施例中，TIL之有效劑量在約0.01 mg/kg至約4.3 mg/kg、約0.15 mg/kg至約3.6 mg/kg、約0.3 mg/kg至約3.2 mg/kg、約0.35 mg/kg至約2.85 mg/kg、約0.15 mg/kg至約2.85 mg/kg、約0.3 mg至約2.15 mg/kg、約0.45 mg/kg至約1.7 mg/kg、約0.15 mg/kg至約1.3 mg/kg、約0.3 mg/kg至約1.15 mg/kg、約0.45 mg/kg至約1 mg/kg、約0.55 mg/kg至約0.85 mg/kg、約0.65 mg/kg至約0.8 mg/kg、約0.7 mg/kg至約0.75 mg/kg、約0.7 mg/kg至約2.15 mg/kg、約0.85 mg/kg至約2 mg/kg、約1 mg/kg至約1.85 mg/kg、約1.15 mg/kg至約1.7 mg/kg、約1.3 mg/kg mg至約1.6 mg/kg、約1.35 mg/kg至約1.5 mg/kg、約2.15 mg/kg至約3.6 mg/kg、約2.3 mg/kg至約3.4 mg/kg、約2.4 mg/kg至約3.3 mg/kg、約2.6 mg/kg至約3.15 mg/kg、約2.7 mg/kg至約3 mg/kg、約2.8 mg/kg至約3 mg/kg或約2.85 mg/kg至約2.95 mg/kg之範圍內。

【1851】在一些實施例中，TIL之有效劑量在約1 mg至約500 mg、約10 mg至約300 mg、約20 mg至約250 mg、約25 mg至約200 mg、約1 mg至約50 mg、約5 mg至約45 mg、約10 mg至約40 mg、約15 mg至約35 mg、約20 mg至

約30 mg、約23 mg至約28 mg、約50 mg至約150 mg、約60 mg至約140 mg、約70 mg至約130 mg、約80 mg至約120 mg、約90 mg至約110 mg、或約95 mg至約105 mg、約98 mg至約102 mg、約150 mg至約250 mg、約160 mg至約240 mg、約170 mg至約230 mg、約180 mg至約220 mg、約190 mg至約210 mg、約195 mg至約205 mg或約198至約207 mg之範圍內。

【1852】有效量之TIL可藉由投予具有類似效用之試劑的任一種公認模式，包含鼻內及經皮途徑、藉由動脈內注射、靜脈內、腹膜內、非經腸、肌肉內、皮下、局部、藉由移植或藉由吸入，以單次或多次劑量投予。

I. 改良的人工抗原呈現細胞過程實施例

【1853】在一些實施例中，本發明包含一種使用APC擴增TIL、MIL或PBL之方法，該等APC選自由以下組成之群組：Raji細胞、Ramos細胞、Daudi細胞、U937細胞、Thp1細胞及其衍生物、變體、修飾或後代。在一些實施例中，本發明包含一種使用APC擴增TIL、MIL或PBL之方法，其中APC係經輻照或未經輻照單核球譜系細胞，諸如U937或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。在一些實施例中，APC為人工APC。在一些實施例中，如本文中別處所描述對APC進行基因修飾，例如以表現4-1BBL或OX40L。在一實施例中，經基因修飾之細胞經修飾以表現CD86、OX40L、4-1BBL、OX-40促效抗體、4-1BB促效抗

體、能夠結合OKT-3之Fc鏈之抗體及/或ICOS-L，如美國專利第10,415,015號中所描述，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在任何前述實施例中，經基因修飾之aAPC可如本文中別處所描述經輻照或未經輻照。可採用前述Gen 2、Gen 3以及其他TIL製造過程，包含基於細胞表面標記物之選擇的過程。

【1854】在一些實施例中，本發明包含一種治療患有癌症之個體的方法，該方法包括投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，該方法包括：

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

(b) 將腫瘤碎片添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包括IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中第一擴增進行約3至11天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上比第一TIL群體大至少10倍，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(d) 藉由用另外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係在

提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之治療性TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放該系統之情況下進行；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(f)的包括所收集TIL群體的輸注袋；以及

(h) 向該個體投予治療有效劑量的來自步驟(g)中的輸注袋之第三TIL群體；

其中APC係選自由以下組成之群組：Raji細胞、Ramos細胞、Daudi細胞、U937細胞、Thp1細胞及其衍生物、變體、修飾或後代。

【1855】在一些實施例中，本發明包含一種治療患有癌症之個體的方法，該方法包括投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，該方法包括：

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

(b) 將腫瘤碎片添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包括IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群

體進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中第一擴增進行約3至11天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上比第一TIL群體大至少10倍，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(d) 藉由用另外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之治療性TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放該系統之情況下進行；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(f)的包括所收集TIL群體的輸注袋；以及

(h) 向該個體投予治療有效劑量的來自步驟(g)中的輸注袋之第三TIL群體；

其中APC為經輻照或未經輻照之單核球譜系細胞，諸

如U937或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。

【1856】在一些實施例中，本發明包含一種經擴增之腫瘤浸潤淋巴球(TIL)群體，其中該經擴增之TIL群體係可藉由包括以下之方法獲得的第三TIL群體：

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

(b) 將腫瘤碎片添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包括IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(d) 藉由用另外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；以及

(e) 收集自步驟(d)獲得之治療性TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統之情況

下進行；

其中APC係選自由以下組成之群組：Raji細胞、Ramos細胞、Daudi細胞、U937細胞、Thp1細胞及其衍生物、變體、修飾或後代。

【1857】在一些實施例中，本發明包含一種經擴增之腫瘤浸潤淋巴球(TIL)群體，其中該經擴增之TIL群體係可藉由包括以下之方法獲得的第三TIL群體：

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

(b) 將腫瘤碎片添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包括IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(d) 藉由用另外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放該系統之

情況下進行；以及

(e) 收集自步驟(d)獲得之治療性TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

其中APC為經輻照或未經輻照之單核球譜系細胞，諸如U937或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。

【1858】在一些實施例中，本發明包含一種經冷凍保存之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組合物，其包括治療性浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中經冷凍保存之TIL組合物係藉由包括以下之方法產生：

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

(b) 將腫瘤碎片添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包括IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中第一擴增進行約7至11天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上比第一TIL群體大至少10倍，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(d) 藉由用另外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該第二擴增進

行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不開放該系統的情況下進行；(e)收集自步驟(d)獲得的治療性TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(e) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放該系統之情況下進行；及

(f) 使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(f)的包括所收集TIL群體的輸注袋，以獲得經冷凍保存之TIL組合物；

其中APC係選自由以下組成之群組：Raji細胞、Ramos細胞、Daudi細胞、U937細胞、Thp1細胞及其衍生物、變體、修飾或後代。

【1859】在一些實施例中，本發明包含一種經冷凍保存之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組合物，其包括治療性浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中經冷凍保存之TIL組合物係藉由包括以下之方法產生：

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

(b) 將腫瘤碎片添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包括IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群

體進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中第一擴增進行約7至11天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上比第一TIL群體大至少10倍，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(d) 藉由用另外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)的轉變係在不開放該系統的情況下進行；(e)收集自步驟(d)獲得的治療性TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(e) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放該系統之情況下進行；及

(f) 使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(f)的包括所收集TIL群體的輸注袋，以獲得經冷凍保存之TIL組合物；

其中APC為經輻照或未經輻照之單核球譜系細胞，諸如U937或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。

【1860】在一些實施例中，本發明包含一種治療患有

癌症之個體的方法，該方法包括投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，該方法包括：

(a) 藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b) 將腫瘤碎解物添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包括IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(d) 藉由用另外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得的第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(f) 將來自步驟(e)之所收集第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放該系統的情況下進行；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(f)的包括所收集TIL群體的輸注袋；以及

(h) 向該個體投予治療有效劑量的來自步驟(g)中的輸注袋之第三TIL群體；

其中APC係選自由以下組成之群組：Raji細胞、Ramos細胞、Daudi細胞、U937細胞、Thp1細胞及其衍生物、變體、修飾或後代。

【1861】在一些實施例中，本發明包含一種治療患有癌症之個體的方法，該方法包括投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，該方法包括：

(a) 藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b) 將腫瘤碎解物添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包括IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(d) 藉由用另外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其

中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(f) 將來自步驟(e)之所收集第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放該系統的情況下進行；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(f)的包括所收集TIL群體的輸注袋；以及

(h) 向該個體投予治療有效劑量的來自步驟(g)中的輸注袋之第三TIL群體；

其中APC為經輻照或未經輻照之單核球譜系細胞，諸如U937或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。

【1862】在一些實施例中，本發明包含一種治療患有癌症之個體的方法，該方法包括投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，該方法包括：

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

(b) 將腫瘤碎片添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包括IL-2及視情況選用之OKT-3以及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表

面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3至14天以獲得第二TIL群體，其中自步驟(b)至步驟(c)的轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(d) 藉由用另外的IL-2、OKT-3及APC補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約4至6天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(e) 將該第三TIL群體分成第一複數個2至5個TIL亞群，其中至少1.0×10^9個TIL存在於各亞群中，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(f) 藉由用另外的IL-2、OKT-3及APC視情況補充各TIL亞群之細胞培養基來進行第一複數個TIL亞群之第三次擴增，以產生第二複數個TIL亞群，其中第三次擴增進行約5至7天，其中各亞群之第三次擴增係在提供第三透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(e)至步驟(f)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(g) 收集自步驟(f)獲得之第二複數個TIL亞群，其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(h) 將來自步驟(g)之經收集的TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋中，其中自步驟(g)至(h)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(i) 使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(h)的包括所收集TIL亞群的一個或多個輸注袋；及

(j) 向該個體投予治療有效劑量的來自步驟(i)中之一個或多個輸注袋的所收集TIL亞群；

其中APC係選自由以下組成之群組：Raji細胞、Ramos細胞、Daudi細胞、U937細胞、Thp1細胞及其衍生物、變體、修飾或後代。

【1863】在一些實施例中，本發明包含一種治療患有癌症之個體的方法，該方法包括投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，該方法包括：

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

(b) 將腫瘤碎片添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包括IL-2及視情況選用之OKT-3以及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)的細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3至14天以獲得第二TIL群體，其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(d) 藉由用另外的IL-2、OKT-3及APC補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約4至6天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(e) 將該第三TIL群體分成第一複數個2至5個TIL亞群，其中至少1.0×10^9個TIL存在於各亞群中，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(f) 藉由用另外的IL-2、OKT-3及APC視情況補充各TIL亞群之細胞培養基來進行第一複數個TIL亞群之第三次擴增，以產生第二複數個TIL亞群，其中第三次擴增進行約5至7天，其中各亞群之第三次擴增係在提供第三透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(e)至步驟(f)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(g) 收集自步驟(f)獲得之第二複數個TIL亞群，其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(h) 將來自步驟(g)之經收集的TIL亞群轉移至一個或多個輸注袋中，其中自步驟(g)至(h)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(i) 使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(h)的包括所

收集TIL亞群的一個或多個輸注袋；及

(j) 向該個體投予治療有效劑量的來自步驟(i)中之一個或多個輸注袋之所收集TIL亞群；

其中APC為經輻照或未經輻照之單核球譜系細胞，諸如U937或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。

VII. 治療患者之方法

【1864】治療方法始於原始TIL收集及TIL培養。此類方法均已描述於本領域中的例如Jin等人，《免疫療法雜誌》，**2012**, *35*(3):283-292中，其以全文引用之方式併入本文中。下文貫穿各個部分，包含實例，描述了治療方法之實施例。

【1865】發現根據本文所描述之方法，包含例如如上文步驟A至F中所描述或根據上文步驟A至F(亦如例如圖1及或圖8中所示)而產生的經擴增TIL在治療癌症患者方面的特殊用途(例如，如Goff等人，《臨床腫瘤學雜誌》，2016, 34(20):2389-239以及補充內容中所描述)；其全文以引用之方式併入本文。在一些實施例中，如先前描述自經切除轉移性黑色素瘤沈積物生長TIL(參見Dudley等人,《免疫療法雜誌》，**2003**, *26*:332-342；其以全文引用的方式併入本文中)。可在無菌條件下分割新鮮腫瘤。可收集代表樣本以用於正式病理分析。可使用2 mm^3至3 mm^3之單個碎片。在一些實施例中，自每位患者獲得5、10、15、20、25或30個樣本。在一些實施例中，自每位患者獲得20、25

或30個樣本。在一些實施例中，自每位患者獲得20、22、24、26或28個樣本。在一些實施例中，自每位患者獲得24個樣本。可將樣本置於24孔盤之個別孔中，維持於含高劑量IL-2(6,000 IU/mL)之生長培養基中，並監測腫瘤破壞及/或TIL增殖。如本文所描述，可將在處理後剩餘活細胞之任何腫瘤酶碎解成單細胞懸浮液並冷凍保存。

【1866】在一些實施例中，可對成功生長之TIL進行取樣以用於表型分析(CD3、CD4、CD8及CD56)，並在可用時針對自體腫瘤進行測試。若隔夜共培養產生之干擾素-γ(IFN-γ)含量> 200 pg/mL且為背景之兩倍，則可認為TIL具反應性。(Goff等人，《免疫療法雜誌》，**2010,** *33,* 840-847；以全文引用之方式併入本文中)。在一些實施例中，可選擇證明具有自體反應性或充足生長模式的培養物用於第二次擴增(例如根據圖1及/或圖8之步驟D中所提供之第二次擴增)，包含有時稱為快速擴增(REP)之第二次擴增。在一些實施例中，選擇具有高自體反應性(例如在第二擴增期間高度增殖)的經擴增TIL用於另外的第二擴增。在一些實施例中，選擇具高自體反應性(例如在如圖1及/或圖8之步驟D中所提供之第二擴增期間高度增殖)的TIL用於根據圖1及/或圖8之步驟D的另外的第二擴增。

【1867】可藉由針對表面標記物CD3、CD4、CD8、CCR7及CD45RA之流動式細胞測量術(例如FlowJo)(BD BioSciences))以及藉由本文所描述之任一種方法分析輸注袋TIL之冷凍保存樣本之細胞表型。藉由使用標準酶聯免

疫吸附分析技術量測血清細胞介素。血清IFN-g之升高定義為>100 pg/mL及大於43之基線水準。

【1868】在一些實施例中，藉由本文所提供之方法(例如圖1及/或圖8中例示之方法)產生的TIL實現TIL之臨床功效的驚人改良。在一些實施例中，相較於藉由除本文所描述之方法以外之方法(包含例如除圖1中及/或圖8中例示之方法以外的方法)產生的TIL，藉由本文所提供之方法(例如圖1及/或圖8中例示之方法)產生的TIL展現增加之臨床功效。在一些實施例中，除本文所描述之方法外的方法包含稱作過程1C及/或第1代(Gen 1)之方法。在一些實施例中，藉由DCR、ORR及/或其他臨床反應量測增加之功效。在一些實施例中，相較於藉由除本文所描述之方法以外之方法(包含例如除圖1中及/或圖8中例示之方法以外的方法，例如Gen 1過程)產生的TIL，藉由本文所提供之方法(例如圖1中例示之方法)產生之TIL展現類似的反應時間及安全性概況。

【1869】在一些實施例中，IFN-γ指示治療功效及/或增加之臨床功效。在一些實施例中，用TIL治療的個體之血液中之IFN-γ指示活性TIL。在一些實施例中，採用針對IFN-γ產生之效力分析。IFN-γ產生為細胞毒性潛力的另一種量度。可以藉由測定用由本發明方法(包含如例如圖1及/或圖8中所描述之方法)製備之TIL治療的個體之血液、血清或離體TIL中之細胞介素IFN-γ含量來量測IFN-γ產生。在一些實施例中，IFN-γ增加指示對用藉由本發明方法產

生之TIL治療的患者之治療功效。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除圖1及/或圖8中體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ增加一倍、兩倍、三倍、四倍或五倍或更多倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除圖1及/或圖8中體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加一倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除圖1及/或圖8中體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加兩倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除圖1及/或圖8中體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加三倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除圖1及/或圖8中體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加四倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除圖1及/或圖8中體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加五倍。在一些實施例中，使用Quantikine ELISA套組量測IFN-γ。在一些實施例中，IFN-γ係在用藉由本發明方法(包含如例如圖1及/或圖8中所描述之方法)製備之TIL治療的個體之離體TIL中量測。在

一些實施例中，IFN-γ係在用藉由本發明方法(包含如例如圖1及/或圖8中所描述之方法)製備之TIL治療的個體之血液中量測。在一些實施例中，IFN-γ係在用藉由本發明方法(包含如例如圖1及/或圖8中所描述之方法)製備之TIL治療的個體之血清中的TIL量測。

【1870】在一些實施例中，IFN-γ指示治療功效及/或增加之臨床功效。在一些實施例中，用TIL治療的個體之血液中之IFN-γ指示活性TIL。在一些實施例中，採用針對IFN-γ產生之效力分析。IFN-γ產生為細胞毒性潛力的另一種量度。可以藉由測定用由本發明方法(包含如例如圖1及/或圖8中所描述之方法)製備之TIL治療的個體之血液、血清或其他組織中之細胞介素IFN-γ含量來量測IFN-γ產生。在一些實施例中，IFN-γ增加指示對用藉由本發明方法產生之TIL治療的患者之治療功效。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除圖1及/或圖8中體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ增加一倍、兩倍、三倍、四倍或五倍或更多倍。

【1871】在一些實施例中，相較於藉由其他方法(包含未在圖1及/或圖8中例示之方法，包含例如稱為過程1C方法之方法)產生之TIL，藉由本發明之方法(包含如例如圖1及/或圖8中所描述之方法)製備之TIL展現增加的多株性。在一些實施例中，顯著提高之多株性及/或增加之多株性指示治療功效及/或增加之臨床功效。在一些實施例

中，多株性係指T細胞組庫多樣性。在一些實施例中，多株性增加可指示關於投予藉由本發明方法產生之TIL的治療功效。在一些實施例中，相較於使用除本文中提供之方法以外之方法(包含例如除圖1及/或圖8中體現之方法以外的方法)製備之TIL，多株性增加一倍、兩倍、十倍、100倍、500倍或1000倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包含例如除圖1及/或圖8中體現之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加一倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包含例如除圖1及/或圖8中體現之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加兩倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包含例如除圖1及/或圖8中體現之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加十倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包含例如除圖1及/或圖8中體現之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加100倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包含例如除圖1及/或圖8中體現之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加500倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包含例如除圖1及/或圖8中體現之方法以外之方

法)製備之TIL治療之患者，多株性增加1000倍。

【1872】功效之量度可包含疾病控制率(DCR)以及總反應率(ORR)，如本領域已知以及本文所描述。

1. 治療癌症及其他疾病之方法

【1873】本文所描述之組合物及方法可用於一種治療疾病之方法中。在一實施例中，其用於治療過度增生病症。其亦可用於治療如本文及以下段落中所描述之其他病症。

【1874】在一些實施例中，過度增生病症為癌症。在一些實施例中，過度增生病症為實體腫瘤癌症。在一些實施例中，實體腫瘤癌症係選自由以下組成之群組：肉瘤、胰臟癌、肝癌、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、胃腸癌、黑色素瘤、卵巢癌、子宮內膜癌、甲狀腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、胃癌、食道癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起的癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、腎癌、前列腺癌及腎細胞癌。在一些實施例中，過度增生病症為血液惡性病。在一些實施例中，實體腫瘤癌症係選自由以下組成之群組：慢性淋巴球性白血病、急性淋巴母細胞白血病、彌漫性大B細胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤及套細胞淋巴瘤。在一些實施例中，實體腫瘤癌症係選自由以下組成之群組：肛門癌、膀胱癌、乳癌(包含三陰性乳癌)、骨癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起

的癌症(HPV)、中樞神經系統相關癌症(包含室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、神經母細胞瘤、松果體母細胞瘤及原始神經外胚層腫瘤)、子宮頸癌(包含鱗狀細胞子宮頸癌、腺鱗狀子宮頸癌及子宮頸腺癌)、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌、食道癌、食管胃交界處癌症、胃癌、胃腸癌、胃腸基質瘤、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、喉咽癌、喉癌、鼻咽癌、口咽癌及咽癌)、腎癌、肝癌、肺癌(包含非小細胞肺癌(NSCLC)及小細胞肺癌)、黑色素瘤(包含葡萄膜黑色素瘤、脈絡膜黑色素瘤、睫狀體黑色素瘤或虹膜黑色素瘤)、間皮瘤(包含惡性胸膜間皮瘤)、卵巢癌、胰臟癌(包含胰管腺癌)、陰莖癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉瘤(包含尤文氏肉瘤、骨肉瘤、橫紋肌肉瘤以及其他骨及軟組織肉瘤)、甲狀腺癌(包含退行性甲狀腺癌)、子宮癌及陰道癌。

【1875】在一些實施例中，癌症為黑色素瘤。在一些實施例中，癌症係黑色素瘤IIB至IV期。

【1876】在一些實施例中，本發明提供一種治療患有癌症之個體之方法，其中該癌症為黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包含GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。

【1877】在另一實施例中，本發明提供一種用於治療

患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中該癌症為黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包含GBM)及胃腸癌。

【1878】在另一實施例中，本發明提供一種治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中該癌症為黑色素瘤。

【1879】在另一實施例中，本發明提供一種治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中該癌症為HNSCC。

【1880】在另一實施例中，本發明提供一種治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中該癌症為子宮頸癌。

【1881】在另一實施例中，本發明提供一種治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中該癌症為NSCLC。

【1882】在另一實施例中，本發明提供一種用於治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中該癌症為神經膠母細胞瘤(包含GBM)。

【1883】在另一實施例中，本發明提供一種治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中該癌症為胃腸癌。

【1884】在另一實施例中，本發明提供一種治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中該癌症為超突變癌症。

【1885】在另一個實施例中，本發明提供一種用於治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中該癌症為小兒超突變癌症。

【1886】在一些實施例中，過度增生病症為血液惡性病。在一些實施例中，血液惡性病係選自由以下組成之群組：慢性淋巴球性白血病、急性淋巴母細胞白血病、彌漫性大B細胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤、套細胞淋巴瘤及多發性骨髓瘤。在一些實施例中，本發明包含一種治療癌症患者的方法，其中該癌症係血液惡性病。在一些實施例中，本發明包含使用經修飾以表現一種或多種CCR之TIL、MIL或PBL治療癌症患者的方法，其中該癌症係血液惡性病。在一些實施例中，本發明包含一種使用經修飾以表現一種或多種CCR之MIL或PBL治療癌症患者的方法，其中該癌症係血液惡性病。

【1887】在一些實施例中，癌症為超突變癌症或超突變癌症表型。超突變癌症充分描述於Campbell等人，《細胞》**2017,** *171,* 1042-1056中；其出於所有目的以全文引用的方式併入本文中。在一些實施例中，高突變腫瘤包括每兆鹼基(Mb)9至10個突變。在一些實施例中，小兒高突變腫瘤包括每兆鹼基(Mb)9.91個突變。在一些實施例中，成人高突變腫瘤包括每兆鹼基(Mb)9個突變。在一些實施例中，增強高突變腫瘤包括每兆鹼基(Mb)10至100個突變。在一些實施例中，增強小兒高突變腫瘤包括每兆鹼基(Mb)10至100個突變。在一些實施例中，增強成人高突變腫瘤包括每兆鹼基(Mb)10至100個突變。在一些實施例中，超高突變腫瘤包括每兆鹼基(Mb)大於100個突變。在

一些實施例中，小兒超高突變腫瘤包括每兆鹼基(Mb)大於100個突變。在一些實施例中，成人超高突變腫瘤包括每兆鹼基(Mb)大於100個突變。

【1888】在一些實施例中，高突變腫瘤具有複製修復路徑之突變。在一些實施例中，高突變腫瘤具有複製修復相關DNA聚合酶之突變。在一些實施例中，高突變腫瘤具有微衛星不穩定性。在一些實施例中，超高突變腫瘤具有複製修復相關DNA聚合酶之突變且具有微衛星不穩定性。在一些實施例中，腫瘤之高突變與對免疫檢查點抑制劑之反應相關。在一些實施例中，高突變腫瘤對免疫檢查點抑制劑治療具有抗性。在一些實施例中，高突變腫瘤可使用本發明之TIL治療。在一些實施例中，腫瘤之高突變係由環境因素(外在暴露)引起。舉例而言，UV光可為惡性黑色素瘤中大量突變之主要原因(參見例如Pfeifer等人《突變研究(*Mutat.Res.*)》**2005,** *571*, 19-31；Sage, 《光化學與光生物學(*Photochem. Photobiol.*)》**1993,** *57*, 163-174)。在一些實施例中，腫瘤之高突變可歸因於直接突變原暴露而由菸草煙霧中大於60種之肺及喉腫瘤以及其他腫瘤致癌物引起(參見例如Pleasance等人《自然》**2010**, *463*, 184-190)。在一些實施例中，腫瘤之高突變係由已顯示在廣泛範圍之癌症中引起C至T轉變量增加的催化性多肽樣脂蛋白元BmRNA編輯酶(APOBEC)家族成員的失調引起(參見例如Roberts等人，《自然遺傳學(*Nat. Genet.*)》**2013**, *45*, 970-976)。在一些實施例中，腫瘤之高突變係由缺陷性DNA複

製修復引起，該缺陷性DNA複製修復係由損害主要複製酶Pol3及Pold1所進行之校讀的突變造成。在一些實施例中，腫瘤之超突變係由DNA錯配修復缺陷引起，該等缺陷與結腸直腸癌、子宮內膜癌及其他癌症中之超突變相關(參見例如Kandoth等人，《自然》**2013,** *497*, 67-73.；Muzny等人，《自然》**2012**, *487*, 330-337)。在一些實施例中，DNA複製修復突變亦發現於癌症易感症候群，諸如組成性或雙對偶錯配修復缺陷(constitutional or biallelic mismatch repair deficiency；CMMRD)、林奇症候群(Lynch syndrome)及聚合酶校讀相關息肉病(PPAP)中。

【1889】在一實施例中，本發明包含一種用TIL群體治療癌症之方法，其中癌症為高突變癌症。在一實施例中，本發明包含一種用TIL群體治療癌症之方法，其中癌症為增強高突變癌症。在一實施例中，本發明包含一種用TIL群體治療癌症之方法，其中癌症為超高突變癌症。

【1890】在一實施例中，本發明包含一種用TIL群體治療癌症之方法，其中患者在輸注根據本揭示案之TIL之前經非骨髓清除式化療預治療。在一實施例中，非骨髓清除式化療為環磷醯胺60 mg/kg/d持續2天(在TIL輸注前第27及26天)及氟達拉濱25 mg/m^2/d持續5天(在TIL輸注前第27至23天)。在一些實施例中，非骨髓清除式化療為環磷醯胺60 mg/kg/d持續2天(在TIL輸注前第27及26天)及氟達拉濱25 mg/m^2/d持續3天(在TIL輸注前第27至25天)。在一些實施例中，非骨髓清除式化療為環磷醯胺60 mg/kg/d持續2

天(在TIL輸注前第27及26天)，然後為氟達拉濱25 mg/m^2/d持續3天(在TIL輸注前第25至23天)。在一實施例中，在根據本揭示案之非骨髓清除式化療及TIL輸注之後(第0天)，患者每8小時以720,000 IU/kg靜脈內接受IL-2的靜脈內輸注以達到生理耐受。

【1891】可使用本領域已知的為人類疾病治療提供指南之各種模型來測試本文所描述之化合物及化合物組合在治療、預防及/或控制所指示疾病或病症中的功效。舉例而言，用於測定卵巢癌治療功效之模型描述於例如Mullany等人，《內分泌學(*Endocrinology*)》**2012,** *153*, 1585-92；及Fong等人，《卵巢研究雜誌(*J. Ovarian Res.*)》**2009**, 2, 12中。用於測定胰臟癌治療功效之模型描述於Herreros-Villanueva等人，《世界胃腸病學雜誌(*World J. Gastroenterol.*)》**2012,** *18,* 1286-1294中。用於測定乳癌治療功效之模型描述於例如Fantozzi,《乳癌研究(*Breast Cancer Res.*)》**2006,** *8,* 212中。用於測定黑色素瘤治療功效之模型描述於例如Damsky等人，《色素細胞及黑色素瘤研究(*Pigment Cell & Melanoma Res.*)》**2010,** *23*,853-859中。用於測定肺癌治療功效之模型描述於例如Meuwissen等人，《基因與發育(*Genes&Development*)》，**2005,** *19,* 643-664中。用於測定肺癌治療功效之模型描述於例如Kim,《臨床與實驗耳鼻喉科學(*Clin. Exp. Otorhinolaryngol.*)》**2009,** *2,* 55-60；及Sano,《頭頸癌腫瘤學(*Head Neck Oncol.*)》**2009,** *1,* 32中。

【1892】在一些實施例中，IFN-γ指示過度增生病症治療之治療功效。在一些實施例中，用TIL治療的個體之血液中之IFN-γ指示活性TIL。在一些實施例中，採用針對IFN-γ產生之效力分析。IFN-γ產生為細胞毒性潛力的另一種量度。藉由測定由本發明方法製備之TIL治療的個體之血液中之細胞介素IFN-γ含量，可量測IFN-γ產生，該等方法包含如例如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所描述之方法。在一些實施例中，相較於用使用如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)及整個本申請案所例示之稱作Gen 3過程之方法製備的TIL治療之個體，藉由本發明方法獲得之TIL在用本發明方法之TIL治療的個體之血液中提供增加之IFN-γ。在一些實施例中，IFN-γ增加指示對用藉由本發明方法產生之TIL治療的患者之治療功效。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ增加一倍、兩倍、三倍、四倍或五倍或更多倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加一倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除圖8(特別是例如圖8A及/或圖

8B及/或圖8C及/或圖8D)中體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加兩倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加三倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加四倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加五倍。在一些實施例中，使用Quantikine ELISA套組量測IFN-γ。在一些實施例中，使用Quantikine ELISA套組量測IFN-γ。在一些實施例中，量測來自用藉由本發明方法產生之TIL治療的患者的離體TIL中之IFN-γ。在一些實施例中，量測用藉由本發明方法產生之TIL治療的患者的血液中之IFN-γ。在一些實施例中，量測用藉由本發明方法產生之TIL治療的患者的血清中之IFN-γ。

【1893】在一些實施例中，相較於藉由其他方法(包含例如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中未例示之方法，諸如稱作過程1C方法之方法)產生的

TIL，藉由本發明方法，包含如例如圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所描述之方法製備的TIL展現增加之多株性。在一些實施例中，顯著提高之多株性及/或增加之多株性指示對癌症治療之治療功效及/或增加之臨床功效。在一些實施例中，多株性係指T細胞組庫多樣性。在一些實施例中，多株性增加可指示關於投予藉由本發明方法產生之TIL的治療功效。在一些實施例中，相較於使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中之方法外的方法)製備的TIL，多株性增加一倍、兩倍、十倍、100倍、500倍或1000倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加一倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加兩倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加十倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如

除體現於圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加100倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加500倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包含例如除體現於圖8(特別是例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，多株性增加1000倍。

2. 與PD-1及PD-L1抑制劑之組合

【1894】在一些實施例中，提供給癌症患者之TIL療法可包含單獨用治療性TIL群體治療，或可包含組合治療，包含TIL及一或多種PD-1及/或PD-L1抑制劑。舉例而言，靶向PD-1且可與本發明之TIL共同投予的抗體包含例如但不限於納武單抗(BMS-936558，百時美施貴寶；Opdivo®)、帕博利珠單抗(蘭立珠單抗、MK03475或MK-3475，默克公司；Keytruda®)、人源化抗PD-1抗體JS001(上海君實)、單株抗PD-1抗體TSR-042(Tesaro, Inc.)、皮立珠單抗(抗PD-1 mAb CT-011，Medivation)、抗PD-1單株抗體BGB-A317(百濟神州)，及/或抗PD-1抗體SHR-1210(上海恆瑞)、人類單株抗體REGN2810(再生元

(Regeneron))、人類單株抗體MDX-1106(百時美施貴寶)及/或人源化抗PD-1 IgG4抗體PDR001(諾華公司)。在一些實施例中，PD-1抗體係來自選殖株：RMP1-14(大鼠IgG)-BioXcell目錄號BP0146。適合與如本文所描述根據步驟A至F產生的TIL一起用於共同投予方法中的其他適合抗體為揭示於以引用之方式併入本文中的美國專利第8,008,449號中之抗PD-1抗體。在一些實施例中，抗體或其抗原結合部分特異性結合至PD-L1且抑制其與PD-1之相互作用，從而增加免疫活性。本領域已知的結合至PD-L1且破壞PD-1與PD-L1之相互作用並刺激抗腫瘤免疫反應的任何抗體均適合與如本文所描述根據步驟A至F產生的TIL一起用於共同投予方法中。舉例而言，靶向PD-L1且處於臨床試驗中之抗體包含BMS-936559(百時美施貴寶)及MPDL3280A(基因泰克)。靶向PD-L1之其他適合之抗體揭示於以引用之方式併入本文中的美國專利第7,943,743號中。一般技術者應理解，結合至PD-1或PD-L1、破壞PD-1/PD-L1相互作用且刺激抗腫瘤免疫反應之任何抗體均適合與如本文所描述根據步驟A至F產生的TIL一起用於共同投予方法中。在一些實施例中，當患者患有單獨投予抗PD-1抗體難以治療之癌症類型時，向投予根據步驟A至F產生之TIL之組合的個體共同投予抗PD-1抗體。在一些實施例中，當患者患有難治性黑色素瘤時，向患者投予TIL與抗PD-1之組合。

【1895】計劃性死亡1(PD-1)為由T細胞、B細胞、自然殺手(NK)T細胞、活化單核球及樹突狀細胞表現之288胺

基酸跨膜免疫檢查點受體蛋白。PD-1，亦稱為CD279，屬於CD28家族，且在人類中係由2號染色體上之Pdcd1基因編碼。PD-1由一個免疫球蛋白(Ig)超家族域、跨膜區及細胞內域組成，該細胞內域含有免疫受體酪胺酸抑制模體(ITIM)及免疫受體酪胺酸切換模體(ITSM)。已知PD-1及其配體(PD-L1及PD-L2)在免疫耐受性中起重要作用，如Keir等人，《免疫學年度評論》**2008**, *26*, 677-704中所描述。PD-1提供負向調節T細胞免疫反應的抑制信號。PD-L1(亦稱為B7-H1或CD274)及PD-L2(亦稱為B7-DC或CD273)表現於腫瘤細胞及基質細胞上，其可能遇到表現PD-1之活化T細胞，導致對T細胞之免疫抑制。PD-L1為由人類9號染色體上之Cd274基因編碼的290胺基酸跨膜蛋白。藉由使用PD-1抑制劑、PD-L1抑制劑及/或PD-L2抑制劑阻斷PD-1與其配體PD-L1及PD-L2之間的相互作用，可克服免疫抗性，如近期臨床研究，諸如Topalian等人，《新英格蘭醫學雜誌(N. Eng. J. Med.)》**2012**, *366*, 2443-54中所描述之研究所顯示。PD-L1表現於許多腫瘤細胞株上，而PD-L2表現於主要地表現於樹突狀細胞及一些腫瘤株上。除T細胞(其在活化後誘導性表現PD-1)以外，PD-1亦表現於B細胞、自然殺手細胞、巨噬細胞、活化單核球及樹突狀細胞上。

【1896】在一實施例中，PD-1抑制劑可為本領域已知的任何PD-1抑制劑或PD-1阻斷劑。詳言之，其為在以下段落中更詳細描述的PD-1抑制劑或阻斷劑之一。關於PD-1抑

制劑，術語「抑制劑」、「拮抗劑」及「阻斷劑」在本文中可互換使用。為了避免疑問，本文中提及作為抗體之PD-1抑制劑時可指代化合物或其抗原結合片段、變體、結合物或生物類似物。為了避免疑問，本文中提及PD-1抑制劑時亦可指代小分子化合物或其醫藥學上可接受之鹽、酯、溶劑合物、水合物、共晶體或前藥。

【1897】在較佳實施例中，PD-1抑制劑為抗體(亦即抗PD-1抗體)、其片段，包含其Fab片段或單鏈可變片段(scFv)。在一些實施例中，PD-1抑制劑為多株抗體。在較佳實施例中，PD-1抑制劑為單株抗體。在一些實施例中，PD-1抑制劑競爭結合PD-1，及/或結合至PD-1上之抗原決定基。在一實施例中，抗體競爭結合PD-1，及/或結合至PD-1上之抗原決定基。

【1898】在一些實施例中，PD-1抑制劑為如下PD-1抑制劑，該PD-1抑制劑以約100 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約90 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約80 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約70 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約60 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約50 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約40 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約30 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約20 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約10 pM或更低之KD結合人類PD-1，或以約1 pM或更低之KD結合人類PD-1。

【1899】在一些實施例中，PD-1抑制劑為如下PD-1抑制劑，該PD-1抑制劑以約7.5×10^5 1/M·s或更快之kassoc結

合至人類PD-1、以約7.5×10^5 1/M·s或更快之kassoc結合至人類PD-1、以約8×10^5 1/M·s或更快之kassoc結合至人類PD-1、以約8.5×10^5 1/M·s或更快之kassoc結合至人類PD-1、以約9×10^5 1/M·s或更快之kassoc結合至人類PD-1、以約9.5×10^5 1/M·s或更快之kassoc結合至人類PD-1，或以約1×10^6 1/M·s或更快之kassoc結合至人類PD-1。

【1900】在一些實施例中，PD-1抑制劑為如下PD-1抑制劑，該PD-1抑制劑以約2×10^{-5} 1/s或更慢之kdissoc結合至人類PD-1、以約2.1×10^{-5} 1/s或更慢之kdissoc結合至人類PD-1、以約2.2×10^{-5} 1/s或更慢之kdissoc結合至人類PD-1、以約2.3×10^{-5} 1/s或更慢之kdissoc結合至人類PD-1、以約2.4×10^{-5} 1/s或更慢之kdissoc結合至人類PD-1、以約2.5×10^{-5} 1/s或更慢之kdissoc結合至人類PD-1、以約2.6×10^{-5} 1/s或更慢之kdissoc結合至人類PD-1，或以約2.7×10^{-5} 1/s或更慢之kdissoc結合至人類PD-1、以約2.8×10^{-5} 1/s或更慢之kdissoc結合至人類PD-1、以約2.9×10^{-5} 1/s或更慢之kdissoc結合至人類PD-1，或以約3×10^{-5} 1/s或更慢之kdissoc結合至人類PD-1。

【1901】在一些實施例中，PD-1抑制劑為如下PD-1抑制劑，該PD-1抑制劑以約10 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約9 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約8 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約7 nM或更低之IC50

阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約6 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約5 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約4 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約3 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約2 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合，或以約1 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合。

【1902】在一實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗(可自百時美施貴寶公司以OPDIVO商購)或其生物類似物、抗原結合片段、結合物或變體。納武單抗為阻斷PD-1受體之完全人類IgG4抗體。在一實施例中，抗PD-1抗體為免疫球蛋白G4κ抗(人類CD274)抗體。納武單抗經指派化學文摘社(CAS)登記號946414-94-4且亦稱為5C4、BMS-936558、MDX-1106及ONO-4538。納武單抗之製備及特性描述於美國專利第8,008,449號及國際專利公開案第WO 2006/121168號中，該等專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。納武單抗在各種形式之癌症中的臨床安全性及功效已描述於Wang等人，《癌症免疫學研究》**2014,** *2,* 846-56；Page等人,《年度醫學評論(Ann. Rev. Med.)》, **2014**, *65*, 185-202；及Weber等人，《臨床腫瘤學雜誌》, **2013**, *31*, 4311-4318中，該等文獻之揭示內容以引用之方式併入本文中。

納武單抗之胺基酸序列闡述於表18中。納武單抗在22-96、140-196、254-314、360-418、22''-96''、140''-196''、254''-314''及360''-418''處具有重鏈內雙硫鍵；在23'-88'、134'-194'、23'''-88'''及134'''-194'''處具有輕鏈內雙硫鍵；在127-214'、127''-214'''處具有重鏈-輕鏈間雙硫鍵；在219-219''及222-222''處具有重鏈-重鏈間雙硫鍵；且在290、290''處具有N-糖基化位點(H CH2 84.4)。

【1903】在一實施例中，PD-1抑制劑包括SEQ ID NO:158所載之重鏈及SEQ ID NO:159所載之輕鏈。在一實施例中，PD-1抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:158及SEQ ID NO:159中所示之序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:158及SEQ ID NO:159中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:158及SEQ ID NO:159中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:158及SEQ ID NO:159中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:158及SEQ ID NO:159中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:463及SEQ ID NO:159中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1904】在一實施例中，PD-1抑制劑包括納武單抗之

重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，PD-1抑制劑重鏈可變區(VH)包括SEQ ID NO:160中所示之序列，且PD-1抑制劑輕鏈可變區(VL)包括SEQ ID NO:161中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:160及SEQ ID NO:161中所示之序列至少99%一致的VH區及VL區。在一實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:160及SEQ ID NO:161中所示之序列至少98%一致的VH區及VL區。在一實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:160及SEQ ID NO:161中所示之序列至少97%一致的VH區及VL區。在一實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:160及SEQ ID NO:161中所示之序列至少96%一致的VH區及VL區。在一實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:160及SEQ ID NO:161中所示之序列至少95%一致的VH區及VL區。

【1905】在一實施例中，PD-1抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:162、SEQ ID NO:163及SEQ ID NO:164中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:165、SEQ ID NO:166及SEQ ID NO:167中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：PD-1上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【1906】在一實施例中，PD-1抑制劑為藥物管理機構

參考納武單抗核准之抗PD-1生物類似物單株抗體。在一實施例中，生物類似物包括抗PD-1抗體，該抗PD-1抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為納武單抗。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗PD-1抗體，其中該抗PD-1抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為納武單抗。抗PD-1抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為納武單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為納武單抗。

表18. 與納武單抗相關之PD-1抑制劑之胺基酸序列。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:463 納武單抗重鏈	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 440
SEQ ID NO:159 納武單抗輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
SEQ ID NO:160 納武單抗可變重鏈	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSS	60 113
SEQ ID NO:161 納武單抗可變輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIK	60 107
SEQ ID NO:162 納武單抗重鏈CDR1	NSGMH	5
SEQ ID NO:163 納武單抗重鏈CDR2	VIWYDGSKRY YADSVKG	17
SEQ ID NO:164 納武單抗重鏈CDR3	NDDY	4
SEQ ID NO:165 納武單抗輕鏈CDR1	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID NO:166 納武單抗輕鏈CDR2	DASNRAT	7
SEQ ID NO:167 納武單抗輕鏈CDR3	QQSSNWPRT	9

【1907】在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，且納武單抗係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投予。在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，且納武單抗係以如下劑量投予：約0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約1.5 mg/kg、約2 mg/kg、約2.5 mg/kg、約3 mg/kg、約3.5 mg/kg、約4 mg/kg、約4.5 mg/kg、約5 mg/kg、約5.5 mg/kg、約6 mg/kg、約6.5 mg/kg、約7 mg/kg、約7.5 mg/kg、約8 mg/kg、約8.5 mg/kg、約9 mg/kg、約9.5 mg/kg或約10 mg/kg。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自

個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1908】在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，且納武單抗係以約200 mg至約500 mg之劑量投予。在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，且納武單抗係以如下劑量投予：約200 mg、約220 mg、約240 mg、約260 mg、約280 mg、約300 mg、約320 mg、約340 mg、約360 mg、約380 mg、約400 mg、約420 mg、約440 mg、約460 mg、約480 mg或約500 mg。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1909】在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，且每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投予納武單抗。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦

可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1910】在一些實施例中，投予納武單抗以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤。在一些實施例中，投予納武單抗以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤，且每2週以約240 mg進行投予。在一些實施例中，投予納武單抗以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤，且每4週以約480 mg進行投予。在一些實施例中，投予納武單抗以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤，且每3週於同一天投予約1 mg/kg納武單抗，然後投予3 mg/kg伊匹木單抗，持續4次劑量，隨後每2週投予240 mg或每4週投予480 mg納武單抗。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1911】在一些實施例中，投予納武單抗以輔助治療黑色素瘤。在一些實施例中，每2週以約240 mg投予納武單抗以輔助治療黑色素瘤。在一些實施例中，每4週以約480 mg投予納武單抗以輔助治療黑色素瘤。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體

或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1912】在一些實施例中，投予納武單抗以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，每2週以約3 mg/kg投予納武單抗且每6週以約1 mg/kg投予伊匹木單抗，以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，每3週以約360 mg投予納武單抗，加上每6週1 mg/kg伊匹木單抗與2個週期之含鉑雙重化療，以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg或每4週以480 mg投予納武單抗以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1913】在一些實施例中，投予納武單抗以治療小細胞肺癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投予納武單抗以治療小細胞肺癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例

中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1914】在一些實施例中，每3週以約360 mg投予納武單抗且每6週投予1 mg/kg伊匹木單抗，以治療惡性胸膜間皮瘤。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1915】在一些實施例中，投予納武單抗以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投予納武單抗以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投予納武單抗以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，以約3 mg/kg投予納武單抗，然後每3週在同一天以約1 mg/kg投予伊匹木單抗達4次劑量，隨後每2週投予240 mg納武單抗，以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，以約3 mg/kg投予納武單抗，然後每3週在同一天以約1 mg/kg投予伊匹木單抗達4次劑量，隨後每2週投予240 mg、每4週投予480 mg納武單抗，以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦

即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1916】在一些實施例中，投予納武單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤。在一些實施例中，每2週以約240 mg投予納武單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤。在一些實施例中，每4週以約480 mg投予納武單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1917】在一些實施例中，投予納武單抗以治療復發性或轉移性頭頸鱗狀細胞癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投予納武單抗以治療復發性或轉移性頭頸鱗狀細胞癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投予納武單抗以治療復發性或轉移性頭頸鱗狀細胞癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單

抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1918】在一些實施例中，每2週以約240 mg投予納武單抗以治療局部晚期或轉移性尿道上皮癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投予納武單抗以治療局部晚期或轉移性尿道上皮癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1919】在一些實施例中，投予納武單抗以治療高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性結腸直腸癌。在一些實施例中，投予納武單抗以治療成人及小兒患者之高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性結腸直腸癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投予納武單抗以治療≥40 kg之成人及小兒患者之高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性結腸直腸癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投予納武單抗以治療≥40 kg之成人及小兒患者之高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性結腸直腸癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始

納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1920】在一些實施例中，每2週以約3 mg/kg投予納武單抗以治療<40 kg之小兒患者之高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性結腸直腸癌。在一些實施例中，以約3 mg/kg投予納武單抗，然後每3週在同一天投予1 mg/kg伊匹木單抗達4次劑量，隨後每2週投予240 mg納武單抗，以治療≥40 kg之成人及小兒患者之高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性結腸直腸癌。在一些實施例中，以約3 mg/kg投予納武單抗，然後每3週在同一天投予1 mg/kg伊匹木單抗達4次劑量，隨後每4週投予480 mg納武單抗，以治療≥40 kg之成人及小兒患者之高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性結腸直腸癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1921】在一些實施例中，投予納武單抗以治療肝細胞癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投予納武單抗

以治療肝細胞癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投予納武單抗以治療肝細胞癌。在一些實施例中，以約1 mg/kg投予納武單抗，然後每3週在同一天投予3 mg/kg伊匹木單抗達4次劑量，隨後每2週投予納武單抗240 mg，以治療肝細胞癌。在一些實施例中，以約1 mg/kg投予納武單抗，然後每3週在同一天投予3 mg/kg伊匹木單抗達4次劑量，隨後每4週投予480 mg納武單抗，以治療肝細胞癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1922】在一些實施例中，投予納武單抗以治療食道鱗狀細胞癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投予納武單抗以治療食道鱗狀細胞癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投予納武單抗以治療食道鱗狀細胞癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始納武單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始納武單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予納武單抗。

【1923】在另一實施例中，PD-1抑制劑包括帕博利珠單抗(可自美國新澤西州凱尼爾沃思之默克公司以KEYTRUDA商購)或其抗原結合片段、結合物或變體。帕博利珠單抗經指派CAS登記號1374853-91-4且亦稱為蘭立珠單抗、MK-3475及SCH-900475。帕博利珠單抗具有免疫球蛋白G4抗(人類蛋白PDCD1(計劃性細胞死亡1))抗體，含(人類小家鼠單株重鏈)雙硫鍵與人類小家鼠單株輕鏈二聚體結構。帕博利珠單抗之結構亦可描述為免疫球蛋白G4抗(人類計劃性細胞死亡1)抗體；含人源化小鼠單株[228-L-脯胺酸(H10-S>P)]γ4重鏈(134-218')雙硫鍵與人源化小鼠單株κ輕鏈二聚體(226-226'':229-229'')雙二硫鍵。帕博利珠單抗之特性、用途及製備描述於國際專利公開案第WO 2008/156712 A1號、美國專利第8,354,509號以及美國專利申請公開案第US 2010/0266617 A1號、第US 2013/0108651 A1號及第US 2013/0109843 A2號中，該等專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。帕博利珠單抗在各種形式之癌症中的臨床安全性及功效描述於Fuerst, 《腫瘤學時報(*Oncology Times*)》, **2014**, *36*, 35-36；Robert等人, 《柳葉刀(*Lancet*)》, **2014**, *384*, 1109-17；及Thomas等人, 《生物治療專家意見(*Exp. Opin.Biol. Ther.*)》, **2014**, *14*, 1061-1064中。帕博利珠單抗之胺基酸序列闡述於表19中。帕博利珠單抗包含以下雙硫鍵：22-96、22''-96''、23'-92'、23'''-92'''、134-218'、134''-218'''、138'-198'、138'''-198'''、147-203、147''-203''、226-226''、229-229''、261-

321、261''-321''、367-425及367''-425''；以及以下糖基化位點(N)：Asn-297及Asn-297''。帕博利珠單抗為在Fc區中含穩定化S228P突變的IgG4/κ同型；IgG4鉸鏈區中此突變之插入防止形成IgG4抗體通常觀測到之半分子。帕博利珠單抗在各重鏈之Fc域內於Asn297處異質糖基化，使得完整抗體之分子量為大約149 kDa。帕博利珠單抗之主要糖型為岩藻糖基化去半乳糖基雙線聚糖形式(G0F)。

【1924】在一實施例中，PD-1抑制劑包括SEQ ID NO:168所載之重鏈及SEQ ID NO:169所載之輕鏈。在一實施例中，PD-1抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:168及SEQ ID NO:169中所示之序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:168及SEQ ID NO:169中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:168及SEQ ID NO:169中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:168及SEQ ID NO:169中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:168及SEQ ID NO:169中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:168及SEQ ID NO:169中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1925】在一實施例中，PD-1抑制劑包括帕博利珠單

抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，PD-1抑制劑重鏈可變區(VH)包括SEQ ID NO:170中所示之序列，且PD-1抑制劑輕鏈可變區(VL)包括SEQ ID NO:171中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:170及SEQ ID NO:171中所示之序列至少99%一致的VH區及VL區。在一實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:170及SEQ ID NO:171中所示之序列至少98%一致的VH區及VL區。在一實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:170及SEQ ID NO:171中所示之序列至少97%一致的VH區及VL區。在一實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:170及SEQ ID NO:171中所示之序列至少96%一致的VH區及VL區。在一實施例中，PD-1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:170及SEQ ID NO:171中所示之序列至少95%一致的VH區及VL區。

【1926】在一實施例中，PD-1抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:172、SEQ ID NO:173及SEQ ID NO:174中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:175、SEQ ID NO:176及SEQ ID NO:177中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：PD-1上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【1927】在一實施例中，PD-1抑制劑為藥物管理機構

參考帕博利珠單抗核准之抗PD-1生物類似物單株抗體。在一實施例中，生物類似物包括抗PD-1抗體，該抗PD-1抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為帕博利珠單抗。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗PD-1抗體，其中該抗PD-1抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為帕博利珠單抗。抗PD-1抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為帕博利珠單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為帕博利珠單抗。

表19.與帕博利珠單抗相關之PD-1抑制劑之胺基酸序列。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)
SEQ ID NO:168 帕博利珠單抗重鏈	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF 60 NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS 120 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 180 GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV 240 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY 300 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK 360 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG 420 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK 447
SEQ ID NO:169 帕博利珠單抗輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF 120 IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS 180 STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC 218
SEQ ID NO:170 帕博利珠單抗可變重鏈	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF 60 NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS 120
SEQ ID NO:171 帕博利珠單抗可變輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO:172 帕博利珠單抗重鏈CDR1	NYYMY 5
SEQ ID NO:173 帕博利珠單抗重鏈CDR2	GINPSNGGTN FNEKFK 16
SEQ ID NO:174 帕博利珠單抗重鏈CDR3	RDYRFDMGFD Y 11
SEQ ID NO:175 帕博利珠單抗輕鏈CDR1	RASKGVSTSG YSYLH 15
SEQ ID NO:176 帕博利珠單抗輕鏈CDR2	LASYLES 7
SEQ ID NO:177 帕博利珠單抗輕鏈CDR3	QHSRDLPLT 9

【1928】在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，且帕博利珠單抗係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投予。在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，且帕博利珠單抗係以如下劑量投予：約0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約1.5 mg/kg、約2 mg/kg、約2.5 mg/kg、約3 mg/kg、約3.5 mg/kg、約4 mg/kg、約4.5 mg/kg、約5 mg/kg、約5.5 mg/kg、約6 mg/kg、約6.5 mg/kg、約7 mg/kg、約7.5 mg/kg、約8 mg/kg、約8.5 mg/kg、約9 mg/kg、約9.5 mg/kg或約10 mg/kg。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天

開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1929】在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，其中帕博利珠單抗係以約200 mg至約500 mg之劑量投予。在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，且納武單抗係以如下劑量投予：約200 mg、約220 mg、約240 mg、約260 mg、約280 mg、約300 mg、約320 mg、約340 mg、約360 mg、約380 mg、約400 mg、約420 mg、約440 mg、約460 mg、約480 mg或約500 mg。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1930】在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，其中每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施

例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1931】在一些實施例中，投予帕博利珠單抗以治療黑色素瘤。在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療黑色素瘤。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療黑色素瘤。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1932】在一些實施例中，投予帕博利珠單抗以治療NSCLC。在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療NSCLC。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療NSCLC。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博

利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1933】在一些實施例中，投予帕博利珠單抗以治療小細胞肺癌(SCLC)。在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療SCLC。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療SCLC。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1934】在一些實施例中，投予帕博利珠單抗以治療頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC)。在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療HNSCC。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療HNSCC。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或

3週投予帕博利珠單抗。

【1935】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤(cHL)或原發性縱隔大B細胞淋巴瘤(PMBCL)。在一些實施例中，成人每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤(cHL)或原發性縱隔大B細胞淋巴瘤(PMBCL)。在一些實施例中，小兒每3週以約2 mg/kg(至多200 mg)投予帕博利珠單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤(cHL)或原發性縱隔大B細胞淋巴瘤(PMBCL)。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1936】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療尿道上皮癌。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療尿道上皮癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投

予帕博利珠單抗。

【1937】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)癌。在一些實施例中，成人每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療MSI-H或dMMR癌。在一些實施例中，小兒每3週以約2 mg/kg(至多200 mg)投予帕博利珠單抗以治療MSI-H或dMMR癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1938】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷結腸直腸癌(dMMR CRC。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療MSI-H或dMMR CRC。

在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1939】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療胃癌。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療胃癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1940】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療食道癌。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療食道癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予

帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1941】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療子宮頸癌。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療子宮頸癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1942】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療肝細胞癌(HCC)。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療HCC。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1943】在一些實施例中，成人每3週以約200 mg投

予帕博利珠單抗以治療默克氏細胞癌(Merkel cell carcinoma；MCC)。在一些實施例中，成人每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療MCC。在一些實施例中，小兒每3週以約2 mg/kg(至多200 mg)投予帕博利珠單抗以治療MCC。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1944】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療腎細胞癌(RCC)。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗且每天兩次經口投予阿西替尼5 mg以治療RCC。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些

實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1945】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療子宮內膜癌。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗且每天一次經口投予用於非MSI-H或dMMR腫瘤之樂伐替尼20 mg以治療子宮內膜癌。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1946】在一些實施例中，成人每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療高腫瘤突變負荷(TMB-H)癌症。在一些實施例中，成人每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療TMB-H癌症。在一些實施例中，小兒每3週以約2 mg/kg(至多200 mg)投予帕博利珠單抗以治療TMB-H癌症。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之

前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1947】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療皮膚鱗狀細胞癌(cSCC)。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療cSCC。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1948】在一些實施例中，每3週以約200 mg投予帕博利珠單抗以治療三陰性乳癌(TNBC)。在一些實施例中，每6週以約400 mg投予帕博利珠單抗以治療TNBC。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1949】在一實施例中，若患者或個體為成人，亦即

治療成人適應症，則可採用另外的每6週400 mg之給藥方案。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，在IL-2投予後1、2或3天開始帕博利珠單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投予帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投予帕博利珠單抗。

【1950】在一實施例中，PD-1抑制劑或抗PD-1抗體為測米匹單抗(cemiplimab)或其片段、變異體、結合物或生物類似物，其可購自再生元公司。在一實施例中，PD-1抑制劑或抗PD-1抗體為替雷利珠單抗(tislelizumab)或其片段、變體、結合物或生物類似物，其可購自諾華AG及百濟神州有限公司(Beigene Co., Ltd)。在一實施例中，PD-1抑制劑或抗PD-1抗體為斯迪利單抗(sintilimab)或其片段、變體、結合物或生物類似物，其可購自禮來公司(Eli Lilly and Co)。在一實施例中，PD-1抑制劑或抗PD-1抗體為特瑞普利單抗(toripalimab)或其片段、變體、結合物或生物類似物，其可購自君實生物技術有限公司(Junshi Biosciences Co., Ltd.)及Coherus BioSciences,Inc.。在一實施例中，PD-1抑制劑或抗PD-1抗體為多斯利單抗(dostarlimab)或其片段、變體、結合物或生物類似物，其可獲自葛蘭素史克(GlaxoSmithKline plc)。

【1951】在一實施例中，PD-1抑制劑為可商購抗PD-1

單株抗體，諸如抗m-PD-1選殖株J43(目錄號BE0033-2)及RMP1-14(目錄號BE0146)(美國新罕布夏州西黎巴嫩的Bio X Cell, Inc.)。多種可商購抗PD-1抗體為本領域一般熟習此項技術者所知。

【1952】在一實施例中，PD-1抑制劑為揭示於美國專利第8,354,509號或美國專利申請公開案第2010/0266617 A1號、第2013/0108651 A1號、第2013/0109843 A2號中之抗體，該等專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，PD-1抑制劑為描述於美國專利第8,287,856號、第8,580,247號及第8,168,757號以及美國專利申請公開案第2009/0028857 A1號、第2010/0285013 A1號、第2013/0022600 A1號及第2011/0008369 A1號中之抗PD-1抗體，該等專利之教示內容以引用之方式併入本文中。在另一實施例中，PD-1抑制劑為揭示於美國專利第8,735,553 B1號中之抗PD-1抗體，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，PD-1抑制劑為皮立珠單抗，亦稱為CT-011，其描述於美國專利第8,686,119號中，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1953】在一實施例中，PD-1抑制劑可為小分子或肽或肽衍生物，諸如美國專利第8,907,053號、第9,096,642號及第9,044,442號以及美國專利申請公開案第US 2015/0087581號中所描述之小分子或肽或肽衍生物；1,2,4-噁二唑化合物及衍生物，諸如美國專利申請公開案第2015/0073024號中所描述之1,2,4-噁二唑化合物及衍生

物；環狀肽模擬化合物及衍生物，諸如美國專利申請公開案第US 2015/0073042號中所描述之環狀肽模擬化合物及衍生物；環狀化合物及衍生物，諸如美國專利申請公開案第US 2015/0125491中所描述之環狀化合物及衍生物；1,3,4-噁二唑及1,3,4-噻二唑化合物及衍生物，諸如國際專利申請公開案第WO 2015/033301號中所描述之1,3,4-噁二唑及1,3,4-噻二唑化合物及衍生物；基於肽之化合物及衍生物，諸如國際專利申請公開案第WO 2015/036927號及第WO 2015/04490號中所描述之基於肽之化合物及衍生物；或基於肽之巨環化合物及衍生物，諸如美國專利申請公開案第US 2014/0294898號中所描述之基於肽之巨環化合物及衍生物；該等專利中之每一者之揭示內容以全文引用之方式併入本文中。在一實施例中，PD-1抑制劑為測米匹單抗，其可購自再生元公司。在一實施例中，PD-1抑制劑為替雷利珠單抗，其可購自諾華AG及百濟神州有限公司。在一實施例中，PD-1抑制劑為斯迪利單抗，其可購自禮來公司。在一實施例中，PD-1抑制劑為特瑞普利單抗，其可購自君實生物技術有限公司及Coherus BioSciences,Inc.。

【1954】在一實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑可為本領域已知的任何PD-L1或PD-L2抑制劑、拮抗劑或阻斷劑。詳言之，其為在以下段落中更詳細描述的PD-L1或PD-L2抑制劑、拮抗劑或阻斷劑之一。關於PD-L1及PD-L2抑制劑，術語「抑制劑」、「拮抗劑」及「阻斷劑」在本文中可互換使用。為了避免疑問，本文中提及作為抗體之

PD-L1或PD-L2抑制劑時可指代化合物或其抗原結合片段、變體、結合物或生物類似物。為了避免疑問，本文中提及PD-L1或PD-L2抑制劑時亦可指代化合物或其醫藥學上可接受之鹽、酯、溶劑合物、水合物、共晶體或前藥。

【1955】在一些實施例中，本文所描述之組合物、過程及方法包含PD-L1或PD-L2抑制劑。在一些實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑為小分子。在較佳實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑為抗體(亦即抗PD-1抗體)、其片段，包含其Fab片段或單鏈可變片段(scFv)。在一些實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑為多株抗體。在較佳實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑為單株抗體。在一些實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑競爭結合PD-L1或PD-L2及/或結合至PD-L1或PD-L2上之抗原決定基。在一實施例中，抗體競爭結合PD-L1或PD-L2，及/或結合至PD-L1或PD-L2上之抗原決定基。

【1956】在一些實施例中，本文提供之PD-L1抑制劑對PD-L1具選擇性，因為化合物與PD-L1結合或相互作用之濃度相比其與包含PD-L2受體之其他受體結合或相互作用之濃度低得多。在某些實施例中，化合物以如下結合常數結合至PD-L1受體，該結合常數為相比結合至PD-L2受體之濃度高至少約2倍之濃度、高約3倍之濃度、高約5倍之濃度、高約10倍之濃度、高約20倍之濃度、高約30倍之濃度、高約50倍之濃度、高約100倍之濃度、高約200倍之濃度、高約300倍之濃度或高約500倍之濃度。

【1957】在一些實施例中，本文提供之PD-L2抑制劑對PD-L2具選擇性，因為化合物與PD-L2結合或相互作用之濃度相比其與包含PD-L1受體之其他受體結合或相互作用之濃度低得多。在某些實施例中，化合物以如下結合常數結合至PD-L2受體，該結合常數為相比結合至PD-L1受體之濃度高至少約2倍之濃度、高約3倍之濃度、高約5倍之濃度、高約10倍之濃度、高約20倍之濃度、高約30倍之濃度、高約50倍之濃度、高約100倍之濃度、高約200倍之濃度、高約300倍之濃度或高約500倍之濃度。

【1958】不受任何理論束縛，咸信腫瘤細胞表現PD-L1，且T細胞表現PD-1。然而，腫瘤細胞對PD-L1之表現不為PD-1或PD-L1抑制劑或阻斷劑之功效所需。在一實施例中，腫瘤細胞表現PD-L1。在另一實施例中，腫瘤細胞並不表現PD-L1。在一些實施例中，方法可包含PD-1及PD-L1抗體(諸如本文所描述之PD-1及PD-L1抗體)與TIL之組合。可同時或依序投予PD-1及PD-L1抗體與TIL之組合。

【1959】在一些實施例中，PD-L1及/或PD-L2抑制劑為如下PD-L1及/或PD-L2抑制劑，該PD-L1及/或PD-L2抑制劑以約100 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約90 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約80 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約70 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約60 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約50 pM或更低之

KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約40 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2，或以約30 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2。

【1960】在一些實施例中，PD-L1及/或PD-L2抑制劑為如下PD-L1及/或PD-L2抑制劑，該PD-L1及/或PD-L2抑制劑以約7.5×10^5 1/M·s或更快之kassoc結合至人類PD-L1及/或PD-L2、以約8×10^5 1/M·s或更快之kassoc結合至人類PD-L1及/或PD-L2、以約8.5×10^5 1/M·s或更快之kassoc結合至人類PD-L1及/或PD-L2、以約9×10^5 1/M·s或更快之kassoc結合至人類PD-L1及/或PD-L2、以約9.5×10^5 1/M·s或更快之kassoc結合至人類PD-L1及/或PD-L2，或以約1×10^6 1/M·s或更快之kassoc結合至人類PD-L1及/或PD-L2。

【1961】在一些實施例中，PD-L1及/或PD-L2抑制劑為如下PD-L1及/或PD-L2抑制劑，該PD-L1及/或PD-L2抑制劑以約2×10^{-5} 1/s或更慢之kdissoc結合至人類PD-L1或PD-L2、以約2.1×10^{-5} 1/s或更慢之kdissoc結合至人類PD-1、以約2.2×10^{-5} 1/s或更慢之kdissoc結合至人類PD-1、以約2.3×10^{-5} 1/s或更慢之kdissoc結合至人類PD-1、以約2.4×10^{-5} 1/s或更慢之kdissoc結合至人類PD-1、以約2.5×10^{-5} 1/s或更慢之kdissoc結合至人類PD-1、以約2.6×10^{-5} 1/s或更慢之kdissoc結合至人類PD-1、以約2.7×10^{-5} 1/s或更慢之kdissoc結合至人類PD-L1或PD-L2，或以約3×10^{-5} 1/s或更慢之kdissoc結合至人類PD-L1或PD-L2。

【1962】在一些實施例中，PD-L1及/或PD-L2抑制劑

為如下PD-L1及/或PD-L2抑制劑，該PD-L1及/或PD-L2抑制劑以約10 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約9 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約8 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約7 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約6 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約5 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約4 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約3 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約2 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合，或以約1 nM或更低之IC50阻斷人類PD-1或阻斷人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合。

【1963】在一實施例中，PD-L1抑制劑為德瓦魯單抗，亦稱為MEDI4736(其可購自馬里蘭州蓋瑟斯堡阿斯特捷利康製藥公司子公司Medimmune, LLC)或其抗原結合片段、結合物或變體。在一實施例中，PD-L1抑制劑為揭示於美國專利第8,779,108號或美國專利申請公開案第2013/0034559號中之抗體，該等專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。德瓦魯單抗之臨床功效已描述於Page等人，《年度醫學評論》，2014, 65, 185-202；Brahmer等人，

《臨床腫瘤學雜誌》2014, 32, 5s(增刊，摘要8021)；及McDermott等人，《癌症治療評論(Cancer Treatment Rev.)》, 2014, 40, 1056-64中。德瓦魯單抗之製備及特性描述於美國專利第8,779,108號中，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。德瓦魯單抗之胺基酸序列闡述於表20中。德瓦魯單抗單株抗體包含22-96、22''-96''、23'-89'、23'''-89'''、135'-195'、135'''-195'''、148-204、148''-204''、215'-224、215'''-224''、230-230''、233-233''、265-325、265''-325''、371-429及371''-429'處之雙硫鍵；及Asn-301及Asn-301''處之N-糖基化位點。

【1964】在一實施例中，PD-L1抑制劑包括SEQ ID NO:178所載之重鏈及SEQ ID NO:179所載之輕鏈。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:178及SEQ ID NO:179中所示之序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:178及SEQ ID NO:179中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:178及SEQ ID NO:179中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:178及SEQ ID NO:179中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:178及SEQ ID NO:179中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-L1抑制劑包

括各自分別與SEQ ID NO:178及SEQ ID NO:179中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1965】在一實施例中，PD-L1抑制劑包括德瓦魯單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，PD-L1抑制劑重鏈可變區(VH)包括SEQ ID NO:180中所示之序列，且PD-L1抑制劑輕鏈可變區(VL)包括SEQ ID NO:181中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:181中所示之序列至少99%一致的VH區及VL區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:181中所示之序列至少98%一致的VH區及VL區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:181中所示之序列至少97%一致的VH區及VL區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:181中所示之序列至少96%一致的VH區及VL區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:181中所示之序列至少95%一致的VH區及VL區。

【1966】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:182、SEQ ID NO:183及SEQ ID NO:184中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:185、SEQ ID NO:186及SEQ ID NO:187中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一實施例中，抗體競爭以

與以下結合及/或結合至以下：PD-L1上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【1967】在一實施例中，PD-L1抑制劑為藥物管理機構參考德瓦魯單抗核准之抗PD-L1生物類似物單株抗體。在一實施例中，生物類似物包括抗PD-L1抗體，該抗PD-L1抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為德瓦魯單抗。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗PD-L1抗體，其中該抗PD-L1抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為德瓦魯單抗。抗PD-L1抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為德瓦魯單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為德瓦魯單抗。

表20. 與德瓦魯單抗相關之PD-L1抑制劑的胺基酸序列。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:178 德瓦魯單抗重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEFEG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPASIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	60 120 180 240 300 360 420 451
SEQ ID NO:179 德瓦魯單抗輕鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC	60 120 180 240 265
SEQ ID NO:180 德瓦魯單抗可變重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS S	60 120 121
SEQ ID NO:181 德瓦魯單抗可變輕鏈	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIK	60 108
SEQ ID NO:182 德瓦魯單抗重鏈CDR1	RYWMS	5
SEQ ID NO:183 德瓦魯單抗重鏈CDR2	NIKQDGSEKY YVDSVKG	17
SEQ ID NO:184 德瓦魯單抗重鏈CDR3	EGGWFGELAF DY	12
SEQ ID NO:185 德瓦魯單抗輕鏈CDR1	RASQRVSSSY LA	12
SEQ ID NO:186 德瓦魯單抗輕鏈CDR2	DASSRAT	7
SEQ ID NO:187 德瓦魯單抗輕鏈CDR3	QQYGSLPWT	9

【1968】在一些實施例中，PD-L1抑制劑為阿維魯單抗，亦稱為MSB0010718C(可自默克集團/雪蘭諾商購)或其抗原結合片段、結合物或變體。阿維魯單抗之製備及特性描述於美國專利申請公開案第US 2014/0341917 A1號中，該專利之揭示內容特別以引用之方式併入本文中。阿維魯單抗之胺基酸序列闡述於表21中。阿維魯單抗具有22-96、147-203、264-324、370-428、22''-96''、147''-203''、264''-324''及370''-428''處之重鏈內雙硫鍵(C23-C104)；22'-90'、138'-197'、22'''-90'''及138'''-197'''處之輕鏈內雙

硫鍵(C23-C104)；223-215'及223''-215'''處之重鏈-輕鏈內雙硫鍵(h 5-CL 126)；229-229''及232-232''處之重鏈-重鏈內雙硫鍵(h 11，h 14)；300、300''處之N-糖基化位點(H CH2 N84.4)；岩藻糖基化複合物雙線CHO類聚糖；及450及450'處之H CHS K2 C端離胺酸裁剪。

【1969】在一實施例中，PD-L1抑制劑包括SEQ ID NO:188所載之重鏈及SEQ ID NO:189所載之輕鏈。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:188及SEQ ID NO:189中所示之序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:188及SEQ ID NO:189中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:188及SEQ ID NO:189中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:188及SEQ ID NO:189中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:188及SEQ ID NO:189中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:188及SEQ ID NO:189中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1970】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括阿維魯單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，PD-L1抑制劑重鏈可變區(VH)包括SEQ ID NO:190中所示

之序列，且PD-L1抑制劑輕鏈可變區(VL)包括SEQ ID NO:191中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:190及SEQ ID NO:191中所示之序列至少99%一致的VH區及VL區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:190及SEQ ID NO:191中所示之序列至少98%一致的VH區及VL區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:190及SEQ ID NO:191中所示之序列至少97%一致的VH區及VL區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:190及SEQ ID NO:191中所示之序列至少96%一致的VH區及VL區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:190及SEQ ID NO:191中所示之序列至少95%一致的VH區及VL區。

【1971】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:192、SEQ ID NO:193及SEQ ID NO:194中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:195、SEQ ID NO:196及SEQ ID NO:197中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：PD-L1上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【1972】在一實施例中，PD-L1抑制劑為藥物管理機構參考阿維魯單抗核准之抗PD-L1生物類似物單株抗體。在一實施例中，生物類似物包括抗PD-L1抗體，該抗PD-

L1抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為阿維魯單抗。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗PD-L1抗體，其中該抗PD-L1抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為阿維魯單抗。抗PD-L1抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為阿維魯單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為阿維魯單抗。

表21. 與阿維魯單抗相關之PD-L1抑制劑的胺基酸序列。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:188 阿維魯單抗重鏈	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID NO:189 阿維魯單抗輕鏈	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL GQPKANPTVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS	60 120 180 216
SEQ ID NO:190 阿維魯單抗可變重鏈	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS	60 120
SEQ ID NO:191 阿維魯單抗可變輕鏈	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL	60 110
SEQ ID NO:192 阿維魯單抗重鏈 CDR1	SYIMM	5
SEQ ID NO:193 阿維魯單抗重鏈 CDR2	SIYPSGGITF YADTVKG	17
SEQ ID NO:194 阿維魯單抗重鏈 CDR3	IKLGTVTTVD Y	11
SEQ ID NO:195 阿維魯單抗輕鏈 CDR1	TGTSSDVGGY NYVS	14
SEQ ID NO:196 阿維魯單抗輕鏈 CDR2	DVSNRPS	7
SEQ ID NO:197 阿維魯單抗輕鏈 CDR3	SSYTSSSTRV	10

【1973】在一實施例中，PD-L1抑制劑為阿特珠單抗，亦稱為MPDL3280A或RG7446(其可自瑞士巴塞爾羅氏之子公司基因泰克公司以TECENTRIQ商購)或其抗原結合片段、結合物或變體。在一實施例中，PD-L1抑制劑為揭示於美國專利第8,217,149號中之抗體，該專利之揭示內容特別以引用之方式併入本文中。在一實施例中，PD-L1抑制劑為揭示於美國專利申請公開案第2010/0203056 A1號、第2013/0045200 A1號、第2013/0045201 A1號、第2013/0045202 A1號或第2014/0065135 A1號中之抗體，該等專利之揭示內容特別以引用之方式併入本文中。阿替利

珠單抗之製備及特性描述於美國專利第8,217,149號中，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。阿替利珠單抗之胺基酸序列闡述於表22中。阿替利珠單抗具有22-96、145-201、262-322、368-426、22''-96''、145''-201''、262''-322''及368''-426''處之重鏈內雙硫鍵(C23-C104)；23'-88'、134'-194'、23'''-88'''及134'''-194'''處之輕鏈內雙硫鍵(C23-C104)；221-214'及221''-214'''處之重鏈-輕鏈內雙硫鍵(h 5-CL 126)；227-227''及230-230''處之重鏈-重鏈內雙硫鍵(h 11，h 14)；及298及298'處之N-糖基化位點(HCH2 N84.4>A)。

【1974】在一實施例中，PD-L1抑制劑包括SEQ ID NO:198所載之重鏈及SEQ ID NO:199所載之輕鏈。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:198及SEQ ID NO:199中所示之序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:198及SEQ ID NO:199中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:198及SEQ ID NO:199中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:198及SEQ ID NO:199中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:198及SEQ ID NO:199中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-L1抑制劑包

括各自分別與SEQ ID NO:198及SEQ ID NO:199中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1975】在一實施例中，PD-L1抑制劑包括阿替利珠單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，PD-L1抑制劑重鏈可變區(VH)包括SEQ ID NO:200中所示之序列，且PD-L1抑制劑輕鏈可變區(VL)包括SEQ ID NO:201中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:200及SEQ ID NO:201中所示之序列至少99%一致的VH區及VL區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:200及SEQ ID NO:201中所示之序列至少98%一致的VH區及VL區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:200及SEQ ID NO:201中所示之序列至少97%一致的VH區及VL區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:200及SEQ ID NO:201中所示之序列至少96%一致的VH區及VL區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:200及SEQ ID NO:201中所示之序列至少95%一致的VH區及VL區。

【1976】在一實施例中，PD-L1抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:202、SEQ ID NO:203及SEQ ID NO:204中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:205、SEQ ID NO:206及SEQ ID NO:207中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一實施例中，抗體競爭以

與以下結合及/或結合至以下：PD-L1上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【1977】在一實施例中，抗PD-L1抗體為藥物管理機構參考阿替利珠單抗核准之抗PD-L1生物類似物單株抗體。在一實施例中，生物類似物包括抗PD-L1抗體，該抗PD-L1抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為阿替利珠單抗。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗PD-L1抗體，其中該抗PD-L1抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為阿替利珠單抗。抗PD-L1抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為阿替利珠單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為阿替利珠單抗。

表22. 與阿替利珠單抗相關之PD-L1抑制劑的胺基酸序列。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:198 阿替利珠單抗重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYAST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 448
SEQ ID NO:199 阿替利珠單抗輕鏈	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
SEQ ID NO:200 阿替利珠單抗可變重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSA	60 118
SEQ ID NO:201 阿替利珠單抗可變輕鏈	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKR	60 108
SEQ ID NO:202 阿替利珠單抗重鏈CDR1	GFTFSDSWIH	10
SEQ ID NO:203 阿替利珠單抗重鏈CDR2	AWISPYGGST YYADSVKG	18
SEQ ID NO:204 阿替利珠單抗重鏈CDR3	RHWPGGFDY	9
SEQ ID NO:205 阿替利珠單抗輕鏈CDR1	RASQDVSTAV A	11
SEQ ID NO:206 阿替利珠單抗輕鏈CDR2	SASFLYS	7
SEQ ID NO:207 阿替利珠單抗輕鏈CDR3	QQYLYHPAT	9

【1978】在一實施例中，PD-L1抑制劑或抗PD-L1抗體為瑞弗利單抗(retifanlimab)或其片段、變體、結合物或生物類似物，其可購自英賽德公司(Incyte, Inc)。

【1979】在一實施例中，PD-L1抑制劑包含美國專利申請公開案第US 2014/0341917 A1號中所描述之彼等抗體，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。在另一實施例中，亦包含與此等抗體中之任一種競爭結合至PD-L1的抗體。在一實施例中，抗PD-L1抗體為MDX-1105，亦稱為BMS-935559，其揭示於美國專利第US 7,943,743號中，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實

施例中，抗PD-L1抗體係選自揭示於美國專利第US 7,943,743號中之抗PD-L1抗體，該專利以引用之方式併入本文中。

【1980】在一實施例中，PD-L1抑制劑為可商購單株抗體，諸如INVIVOMAB抗m-PD-L1選殖株10F.9G2(目錄號BE0101，美國新罕布夏州西黎巴嫩的Bio X Cell, Inc.)。在一實施例中，抗PD-L1抗體為可商購單株抗體，諸如AFFYMETRIX EBIOSCIENCE(MIH1)。多種可商購抗PD-L1抗體為本領域一般熟習此項技術者所知。

【1981】在一實施例中，PD-L2抑制劑為可商購單株抗體，諸如BIOLEGEND 24F.10C12小鼠IgG2aκ同型(目錄號329602，加利福尼亞聖地亞哥Biolegend, Inc.)、SIGMA抗PD-L2抗體(目錄號SAB3500395，密蘇里州聖路易斯西格瑪奧瑞奇公司)或本領域一般熟習此項技術者已知的其他可商購抗PD-L2抗體。

3. 與CTLA-4抑制劑的組合

【1982】在一些實施例中，提供給癌症患者之TIL療法可包含單獨用治療性TIL群體治療，或可包含組合治療，包含TIL及一種或多種CTLA-4抑制劑。

【1983】細胞毒性T淋巴球抗原4(CTLA-4)為免疫球蛋白超家族成員且表現於輔助T細胞表面上。CTLA-4為CD28依賴性T細胞活化之負向調節因子且充當適應性免疫反應之檢查點。類似於T細胞共刺激蛋白CD28，CTLA-4

結合抗原在細胞上呈遞CD80及CD86。CTLA-4將抑制因子信號遞送至T細胞，而CD28遞送刺激信號。針對人類CTLA-4之人類抗體已描述為許多疾病病狀之免疫刺激調節劑，諸如治療或預防病毒及細菌感染且治療癌症(WO 01/14424及WO 00/37504)。已在臨床試驗中針對治療各種類型的實體腫瘤研究了多種完全人類抗人類CTLA-4單株抗體(mAb)，該等抗體包含但不限於伊匹木單抗(MDX-010)及曲美單抗(CP-675,206)。

【1984】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑可為本領域已知的任何CTLA-4抑制劑或CTLA-4阻斷劑。詳言之，其為在以下段落中更詳細描述的CTLA-4抑制劑或阻斷劑之一。關於CTLA-4抑制劑，術語「抑制劑」、「拮抗劑」及「阻斷劑」在本文中可互換使用。為了避免疑問，本文中提及作為抗體之CTLA-4抑制劑時可指代化合物或其抗原結合片段、變體、結合物或生物類似物。為了避免疑問，本文中提及CTLA-4抑制劑時亦可指代小分子化合物或其醫藥學上可接受之鹽、酯、溶劑合物、水合物、共晶體或前藥。

【1985】適用於本發明之方法的CTLA-4抑制劑包含但不限於抗CTLA-4抗體、人類抗CTLA-4抗體、小鼠抗CTLA-4抗體、哺乳動物抗CTLA-4抗體、人源化抗CTLA-4抗體、單株抗CTLA-4抗體、多株抗CTLA-4抗體、嵌合抗CTLA-4抗體、MDX-010(伊匹木單抗)、曲美單抗、抗CD28抗體、抗CTLA-4阿德奈汀、抗CTLA-4域抗體、單鏈

抗CTLA-4片段、重鏈抗CTLA-4片段、輕鏈抗CTLA-4片段、促效共刺激路徑之CTLA-4抑制劑、揭示於PCT公開案第WO 2001/014424號中之抗體、揭示於PCT公開案第WO 2004/035607號中之抗體、揭示於美國公開案第2005/0201994號中之抗體及揭示於授與歐洲專利第EP 1212422 B1號中之抗體，該等專利中之每一者的揭示內容以引用之方式併入本文中。另外的CTLA-4抗體描述於美國專利第5,811,097號、第5,855,887號、第6,051,227號及第6,984,720號中；PCT公開案第WO 01/14424號及第WO 00/37504號中；及美國公開案第2002/0039581號及第2002/086014號中，該等專利中之每一者的揭示內容以引用之方式併入本文中。可用於本發明方法中之其他抗CTLA-4抗體包含例如揭示於以下中之抗體：WO 98/42752；美國專利第6,682,736號及第6,207,156號；Hurwitz等人，《美國國家科學院院刊》，95(17):10067-10071 (1998)；Camacho等人，《臨床腫瘤學雜誌》，22(145): 摘要號2505 (2004)(抗體CP-675206)；Mokyr等人，《癌症研究》，58:5301-5304 (1998)；及美國專利第5,977,318號、第6,682,736號、第7,109,003號及第7,132,281號，該等專利中之每一者的揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1986】另外的CTLA-4抑制劑包含但不限於以下：通常由於經活化而能夠破壞CD28抗原結合至其同源配體之能力、抑制CTLA-4結合至其同源配體之能力、增強經由共刺激路徑之T細胞反應、破壞B7結合至CD28及/或

CTLA-4之能力、破壞B7活化共刺激路徑之能力、破壞CD80結合至CD28及/或CTLA-4之能力、破壞CD80活化共刺激路徑之能力、破壞CD86結合至CD28及/或CTLA-4之能力、破壞CD86活化共刺激路徑之能力及破壞共刺激路徑的任何抑制劑。此必定包含：CD28、CD80、CD86、CTLA-4以及共刺激路徑之其他成員之小分子抑制劑；針對CD28、CD80、CD86、CTLA-4以及共刺激路徑之其他成員的抗體；針對CD28、CD80、CD86、CTLA-4以及共刺激路徑之其他成員的反義分子；針對CD28、CD80、CD86、CTLA-4以及共刺激路徑之其他成員的阿德奈汀；CD28、CD80、CD86、CTLA-4以及共刺激路徑之其他成員的RNAi抑制劑(單股及雙股)；以及其他CTLA-4抑制劑。

【1987】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑以如下K_d結合至CTLA-4，該Kd為約10^{-6} M或更小、10^{-7} M或更小、10^{-8} M或更小、10^{-9} M或更小、10^{-10} M或更小、10^{-11} M或更小、10^{-12} M或更小，例如10^{-13} M與10^{-16} M之間，或在任兩個前述值作為端點的任何範圍內。在一些實施例中，當使用相同測定比較時，CTLA-4抑制劑結合至CTLA-4的K_d不超過伊匹木單抗之K_d之10倍。在一些實施例中，當使用相同分析比較時，CTLA-4抑制劑結合至CTLA-4的Kd與伊匹木單抗之Kd大致相同或更小(例如低至多10倍或低至多100倍)。在一些實施例中，當使用相同測定比較時，與CTLA-4分別與CD80或CD86結合的伊匹木單抗介導之抑制

的IC_{50}值相比，CTLA-4抑制劑抑制CTLA-4與CD80或CD86之結合的IC_{50}值高不超過10倍。在一些實施例中，當使用相同測定比較時，與CTLA-4分別與CD80或CD86結合的伊匹木單抗介導之抑制的IC_{50}值相比，CTLA-4抑制劑抑制CTLA-4與CD80或CD86之結合的IC_{50}值大致相同或更小(例如，低至多10倍或低至多100倍)。

【1988】在一些實施例中，以如下量使用CTLA-4抑制劑，該量足以相對於適合之對照將CTLA-4之表現抑制及/或使CTLA-4之生物活性降低至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%，例如50%與75%、75%與90%或90%與100%之間。在一些實施例中，以如下量使用CTLA-4路徑抑制劑，該量足以藉由使CTLA-4與CD80、CD86或兩者之結合相對於適合之對照減少至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%，例如相對於適合之對照減少50%與75%、75%與90%或90%與100%之間來降低CTLA-4之生物活性。在評估或量化所關注之藥劑之效應的上下文中之適合對照通常為尚未暴露於所關注之藥劑(例如CTLA-4路徑抑制劑)或用該藥劑處理的相當之生物系統(例如細胞或個體)(或已暴露於可忽略量或用可忽略量進行處理)。在一些實施例中，生物系統可充當其自身之對照，例如可在暴露於藥劑或用藥劑處理之前評估生物系統並與開始或結束暴露或處理之後的狀態進行比較。在一些實施例中，可使用歷史對照。

【1989】在一實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單

抗(可自百時美施貴寶公司以Yervoy商購)或其生物類似物、抗原結合片段、結合物或變體。如本領域中已知，伊匹木單抗係指抗CTLA-4抗體，一種來源於具有編碼重鏈及輕鏈之人類基因以產生功能性人類譜系之轉殖基因小鼠的完全人類IgG1κ抗體。伊匹木單抗亦可藉由其CAS登記號477202-00-9及在PCT公開案第WO 01/14424中提及，該公開案出於所有目的以全文引用之方式併入。其以抗體10DI之形式揭示。具體言之，伊匹木單抗含有輕鏈可變區及重鏈可變區(具有包括SEQ ID NO:211之輕鏈可變區且具有包括SEQ ID NO:210之重鏈可變區)。伊匹木單抗之醫藥組合物包含含有伊匹木單抗及一種或多種稀釋劑、媒劑或賦形劑的所有醫藥學上可接受之組合物。含有伊匹木單抗之醫藥組合物之實例描述於國際專利申請公開案第WO 2007/67959號中。伊匹木單抗可靜脈內(IV)投予。

【1990】在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括SEQ ID NO:208所載之重鏈及SEQ ID NO:209所載之輕鏈。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:208及SEQ ID NO:209中所示之序列的重鏈及輕鏈或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:208及SEQ ID NO:209中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:208及SEQ ID NO:209中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括

各自分別與SEQ ID NO:208及SEQ ID NO:209中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:208及SEQ ID NO:209中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:208及SEQ ID NO:209中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1991】在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括伊匹木單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，CTLA-4抑制劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:210中所示之序列，且CTLA-4抑制劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:211中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:210及SEQ ID NO:211中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:210及SEQ ID NO:211中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:210及SEQ ID NO:211中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:210及SEQ ID NO:211中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:210及SEQ ID NO:211中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【1992】在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:212、SEQ ID NO:213及SEQ ID NO:214中所

闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:215、SEQ ID NO:216及SEQ ID NO:217中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：CTLA-4上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【1993】在一實施例中，CTLA-4抑制劑為藥物管理機構參考伊匹木單抗核准之CTLA-4生物類似物單株抗體。在一實施例中，生物類似物包括抗CTLA-4抗體，該抗CTLA-4抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為伊匹木單抗。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。伊匹木單抗之胺基酸序列闡述於表23中。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗CTLA-4抗體，其中該抗CTLA-4抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為伊匹木單抗。抗CTLA-4抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不

同，其中該參考藥品或參考生物產品為伊匹木單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為伊匹木單抗。

表23. 伊匹木單抗之胺基酸序列。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:208 伊匹木單抗重鏈	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTH	60 120 180 225
SEQ ID NO:209 伊匹木單抗輕鏈	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC	60 120 180 215
SEQ ID NO:210 伊匹木單抗可變重鏈	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
SEQ ID NO:211 伊匹木單抗可變輕鏈	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIK	60 108
SEQ ID NO:212 伊匹木單抗重鏈 CDR1	GFTFSSYT	8
SEQ ID NO:213 伊匹木單抗重鏈 CDR2	TFISYDGNNK	10
SEQ ID NO:214 伊匹木單抗重鏈 CDR3	ARTGWLGPFD Y	11
SEQ ID NO:215 伊匹木單抗輕鏈 CDR1	QSVGSSY	7
SEQ ID NO:216 伊匹木單抗輕鏈 CDR2	GAF	3
SEQ ID NO:217 伊匹木單抗輕鏈 CDR3	QQYGSSPWT	9

【1994】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且伊匹木單抗係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投予。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且伊匹木單抗係以如下劑量投予：約0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約1.5 mg/kg、約2 mg/kg、約2.5 mg/kg、約3 mg/kg、約3.5 mg/kg、約4

mg/kg、約4.5 mg/kg、約5 mg/kg、約5.5 mg/kg、約6 mg/kg、約6.5 mg/kg、約7 mg/kg、約7.5 mg/kg、約8 mg/kg、約8.5 mg/kg、約9 mg/kg、約9.5 mg/kg或約10 mg/kg。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投予。

【1995】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，其中伊匹木單抗係以約200 mg至約500 mg之劑量投予。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且伊匹木單抗係以如下劑量投予：約200 mg、約220 mg、約240 mg、約260 mg、約280 mg、約300 mg、約320 mg、約340 mg、約360 mg、約380 mg、約400 mg、約420 mg、約440 mg、約460 mg、約480 mg或約500 mg。在一些實施例中，在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投予。

【1996】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投予伊匹木單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或

5週開始伊匹木單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投予。

【1997】在一些實施例中，投予伊匹木單抗以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤。在一些實施例中，每3週以約mg/kg投予伊匹木單抗，持續最多4次劑量以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投予。

【1998】在一些實施例中，投予伊匹木單抗以輔助治療黑色素瘤。在一些實施例中，每3週以約10 mg/kg投予伊匹木單抗，持續4次劑量，然後每12週投予10 mg/kg，持續至多3年，以輔助治療黑色素瘤。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投予。

【1999】在一些實施例中，投予伊匹木單抗以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，每3週以約1 mg/kg投予伊匹木單抗，緊接著在同一天投予3 mg/kg納武單抗，持續4次劑量，以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，在完成組合之4次劑量之後，可根據標準給藥方案針對晚期腎細

胞癌及/或腎細胞癌以單一試劑形式投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投予。

【2000】在一些實施例中，投予伊匹木單抗以治療高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性結腸直腸癌。在一些實施例中，每3週經30分鐘以約1 mg/kg靜脈內投予伊匹木單抗，緊接著在同一天經30分鐘靜脈內投予3 mg/kg納武單抗，持續4次劑量，以治療高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性結腸直腸癌。在一些實施例中，在完成組合物之4次劑量之後，如根據標準給藥方案所推薦針對高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性結腸直腸癌以單一試劑形式投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投予。

【2001】在一些實施例中，投予伊匹木單抗以治療肝細胞癌。在一些實施例中，每3週經30分鐘以約3 mg/kg靜脈內投予伊匹木單抗，緊接著在同一天經30分鐘靜脈內投予1 mg/kg納武單抗，持續4次劑量，以治療肝細胞癌。在一些實施例中，在完成組合之4次劑量之後，根據標準給

藥方案針對肝細胞癌以單一試劑形式投予納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投予。

【2002】在一些實施例中，投予伊匹木單抗以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，每6週以約1 mg/kg投予伊匹木單抗且每2週投予3 mg/kg納武單抗，以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，每6週以約1 mg/kg投予伊匹木單抗，加上每3週360 mg納武單抗與2個週期之含鉑雙重化療，以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投予。

【2003】在一些實施例中，投予伊匹木單抗以治療惡性胸膜間皮瘤。在一些實施例中，每6週以約1 mg/kg投予伊匹木單抗且每3週投予360 mg納武單抗，以治療惡性胸膜間皮瘤。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投予。

【2004】曲美單抗(亦稱為CP-675,206)為完全人類

IgG2單株抗體且CAS編號為745013-59-6。曲美單抗以抗體11.2.1形式揭示於美國專利第6,682,736號(以引用之方式併入本文中)中。曲美單抗之重鏈及輕鏈之胺基酸序列分別闡述於SEQ IND NO:218及219中。已在臨床試驗中針對治療包含黑色素瘤及乳癌之各種腫瘤研究了曲美單抗；其中每4或12週以0.01與15 mg/kg之間的劑量範圍呈單次劑量或多次劑量靜脈內投予曲美單抗。在本發明提供之方案中，局部投予，尤其是皮內或皮下投予曲美單抗。皮內或皮下投予之曲美單抗的有效量通常在每人5-200毫克/劑的範圍內。在一些實施例中，曲美單抗之有效量在每人每劑10-150毫克/劑的範圍內。在一些特定實施例中，曲美單抗之有效量為每人約10、25、37.5、40、50、75、100、125、150、175或200毫克/劑。

【2005】在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括SEQ ID NO:218所載之重鏈及SEQ ID NO:219所載之輕鏈。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:218及SEQ ID NO:219中所示之序列的重鏈及輕鏈或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:218及SEQ ID NO:219中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:218及SEQ ID NO:219中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:218及SEQ ID NO:219中所示之序列

至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:218及SEQ ID NO:219中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:218及SEQ ID NO:219中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【2006】在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括曲美單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，CTLA-4抑制劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:220中所示之序列，且CTLA-4抑制劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:221中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:220及SEQ ID NO:221中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:220及SEQ ID NO:221中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:220及SEQ ID NO:221中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:220及SEQ ID NO:221中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:220及SEQ ID NO:221中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【2007】在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:222、SEQ ID NO:223及SEQ ID NO:224中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及

CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:225、SEQ ID NO:226及SEQ ID NO:227中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：CTLA-4上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【2008】在一實施例中，CTLA-4抑制劑為藥物管理機構參考曲美單抗核准之抗CTLA-4生物類似物單株抗體。在一實施例中，生物類似物包括抗CTLA-4抗體，該抗CTLA-4抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為曲美單抗。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。曲美單抗之胺基酸序列闡述於表24中。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗CTLA-4抗體，其中該抗CTLA-4抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為曲美單抗。抗CTLA-4抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為曲美單抗。在一些實施例中，

生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為曲美單抗。

表24. 曲美單抗之胺基酸序列。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)
SEQ ID NO:218 曲美單抗重鏈	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP RGATLYYYYY GMDVWGQGTT 120 VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA 180 VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVERKCCVE CPPCPAPPVA 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF 300 NSTFRVVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
SEQ ID NO:219 曲美單抗輕鏈	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIN SYLDWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYSTPFTFGP GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:220 曲美單抗可變重鏈	GVVQPGRSLR LSCAASGFTF SSYGMHWVRQ APGKGLEWVA VIWYDGSNKY YADSVKGRFT 60 ISRDNSKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCARD PRGATLYYYY YGMDVWGQGT TVTVSSASTK 120 GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVH 167
SEQ ID NO:221 曲美單抗可變輕鏈	PSSLSASVGD RVTITCRASQ SINSYLDWYQ QKPGKAPKLL IYAASSLQSG VPSRFSGSGS 60 GTDFTLTISS LQPEDFATYY CQQYYSTPFT FGPGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS 120 GTASVVCLLN NFYPREAKV 139
SEQ ID NO:222 曲美單抗重鏈CDR1	GFTFSSYGMH 10
SEQ ID NO:223 曲美單抗重鏈CDR2	VIWYDGSNKY YADSV 15
SEQ ID NO:224 曲美單抗重鏈CDR3	DPRGATLYYY YYGMDV 16
SEQ ID NO:225 曲美單抗輕鏈CDR1	RASQSINSYL D 11
SEQ ID NO:226 曲美單抗輕鏈CDR2	AASSLQS 7
SEQ ID NO:227 曲美單抗輕鏈CDR3	QQYYSTPFT 9

【2009】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，且曲美單抗係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投予。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，且曲美單抗係以如下劑量投予：約0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約1.5 mg/kg、約2 mg/kg、約2.5 mg/kg、約3 mg/kg、約3.5 mg/kg、約4 mg/kg、約4.5 mg/kg、約5 mg/kg、約5.5 mg/kg、約6 mg/kg、約6.5 mg/kg、約7 mg/kg、約7.5 mg/kg、約8 mg/kg、約8.5

mg/kg、約9 mg/kg、約9.5 mg/kg或約10 mg/kg。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始曲美單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始曲美單抗投予。

【2010】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，其中曲美單抗係以約200 mg至約500 mg之劑量投予。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，且曲美單抗係以如下劑量投予：約200 mg、約220 mg、約240 mg、約260 mg、約280 mg、約300 mg、約320 mg、約340 mg、約360 mg、約380 mg、約400 mg、約420 mg、約440 mg、約460 mg、約480 mg或約500 mg。在一些實施例中，在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始曲美單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始曲美單抗投予。

【2011】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，且每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投予曲美單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始曲美單抗投予。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始曲美單抗投予。

【2012】在一實施例中，CTLA-4抑制劑為來自

Adgenus之澤弗利單抗或其生物類似物、抗原結合片段、結合物或變體。澤弗利單抗為完全人類單株抗體。澤弗利單抗經指派化學文摘社(CAS)登記號2148321-69-9且亦稱為亦稱為AGEN1884。澤弗利單抗之製備及特性描述於美國專利第10,144,779號及美國專利申請公開案第US2020/0024350 A1號中，該等專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【2013】在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括SEQ ID NO:228所載之重鏈及SEQ ID NO:229所載之輕鏈。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:228及SEQ ID NO:229中所示之序列的重鏈及輕鏈或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或結合物。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:228及SEQ ID NO:229中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:228及SEQ ID NO:229中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:228及SEQ ID NO:229中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:228及SEQ ID NO:229中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:228及SEQ ID NO:229中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【2014】在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括澤弗利

單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，CTLA-4抑制劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:230中所示之序列，且CTLA-4抑制劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:231中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:230及SEQ ID NO:231中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:230及SEQ ID NO:231中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:230及SEQ ID NO:231中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:230及SEQ ID NO:231中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括各自分別與SEQ ID NO:230及SEQ ID NO:231中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【2015】在一實施例中，CTLA-4抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:231、SEQ ID NO:233及SEQ ID NO:234中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:235、SEQ ID NO:236及SEQ ID NO:237中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：CTLA-4上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【2016】在一實施例中，CTLA-4抑制劑為藥物管理

機構參考澤弗利單抗核准之CTLA-4生物類似物單株抗體。在一實施例中，生物類似物包括抗CTLA-4抗體，該抗CTLA-4抗體包括與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包括一個或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為澤弗利單抗。在一些實施例中，一個或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。澤弗利單抗之胺基酸序列闡述於表25中。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗CTLA-4抗體，其中該抗CTLA-4抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為澤弗利單抗。抗CTLA-4抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為澤弗利單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包括一種或多種賦形劑之組合物，其中該一種或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包括的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為澤弗利單抗。

表25. 澤弗利單抗之胺基酸序列。

識別號	序列 (單字母胺基酸符號)
SEQ ID NO:228 澤弗利單抗重鏈	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
SEQ ID NO:229 澤弗利單抗輕鏈	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKP GQAPRLLIYG ASTRATGIPD 60 RFSGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:230 澤弗利單抗可變重鏈	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSS 118
SEQ ID NO:231 澤弗利單抗可變輕鏈	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKP GQAPRLLIYG ASTRATGIPD 60 RFSGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQ GTKVEIK 107
SEQ ID NO:232 澤弗利單抗重鏈 CDR1	GFTFSSYS 8
SEQ ID NO:233 澤弗利單抗重鏈 CDR2	ISSSSSYI 8
SEQ ID NO:234 澤弗利單抗重鏈 CDR3	ARVGLMGPFD I 11
SEQ ID NO:235 澤弗利單抗輕鏈 CDR1	QSVSRY 6
SEQ ID NO:236 澤弗利單抗輕鏈 CDR2	GAS 3
SEQ ID NO:237 澤弗利單抗輕鏈 CDR3	QQYGSSPWT 9

【2017】另外的抗CTLA-4抗體之實例包含但不限於：AGEN1181、BMS-986218、BCD-145、ONC-392、CS1002、REGN4659及ADG116，其為本領域一般熟習此項技術者已知。

【2018】在一些實施例中，抗CTLA-4抗體為揭示於以下專利公開案(以引用之方式併入本文中)中之任一者中的抗CTLA-4抗體：US 2019/0048096 A1；US 2020/0223907；US 2019/0201334；US 2019/0201334；US 2005/0201994；EP 1212422 B1；WO 2018/204760；WO 2018/204760；WO 2001/014424；WO 2004/035607；WO

2003/086459；WO 2012/120125；WO 2000/037504；WO 2009/100140；WO 2006/09649；WO2005092380；WO 2007/123737；WO 2006/029219；WO 2010/0979597；WO 2006/12168；及WO1997020574。另外的CTLA-4抗體描述於以下中：美國專利第5,811,097號、第5,855,887號、第6,051,227號及第6,984,720號；PCT公開案第WO 01/14424號及第WO 00/37504號；以及美國公開案第2002/0039581號及第2002/086014號；及/或美國專利第5,977,318號、第6,682,736號、第7,109,003號及第7,132,281號(以引用之方式併入本文中)。在一些實施例中，抗CTLA-4抗體為例如揭示於以下中之抗體：WO 98/42752；美國專利第6,682,736號及第6,207,156號；Hurwitz等人，《美國國家科學院院刊》，95(17):10067-10071 (1998)；Camacho等人，《臨床腫瘤學雜誌》，22(145): 摘要號2505 (2004)(抗體CP-675206)；Mokyr等人，《癌症研究》，58:5301-5304 (1998)(以引用之方式併入本文中)。

【2019】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為如WO1996040915(以引用之方式併入本文中)中所揭示之CTLA-4配體。

【2020】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為CTLA-4表現之核酸抑制劑。舉例而言，抗CTLA-4 RNAi分子可呈Mello及Fire在以下中描述之分子的形式：PCT公開案第WO 1999/032619號及第WO 2001/029058號；美國公開案第2003/0051263號、第2003/0055020號、第2003/0056235

號、第2004/265839號、第2005/0100913號、第2006/0024798號、第2008/0050342號、第2008/0081373號、第2008/0248576號及第2008/055443號；及/或美國專利第6,506,559號、第7,282,564號、第7,538,095號及第7,560,438號(以引用之方式併入本文中)。在一些情況下，抗CTLA-4 RNAi分子呈由Tuschl在歐洲專利第EP 1309726號(以引用之方式併入本文中)中描述之雙股RNAi分子形式。在一些情況下，抗CTLA-4 RNAi分子呈由Tuschl在美國專利第7,056,704號及第7,078,196號(以引用之方式併入本文中)中描述之雙股RNAi分子形式。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為PCT公開案第WO2004081021號(以引用之方式併入本文中)中所描述之適體。

【2021】在其他實施例中，本發明之抗CTLA-4 RNAi分子為Crooke在美國專利第5,898,031號、第6,107,094號、第7,432,249號及第7,432,250號以及歐洲申請案第EP 0928290號(以引用之方式併入本文中)中描述之RNA分子。

4. 患者之視情況淋巴球耗盡預調節

【2022】在一實施例中，本發明包含一種用TIL群體治療癌症之方法，其中患者在輸注根據本揭示案之TIL之前經非骨髓清除式化療預治療。在一實施例中，本發明包含一種用於治療已用非骨髓清除式化療預治療之患者之癌症的TIL群體。在一實施例中，TIL群體係藉由輸注投予。

在一實施例中，非骨髓清除式化療為環磷醯胺60 mg/kg/d持續2天(在TIL輸注前第27及26天)及氟達拉濱25 mg/m^2/d持續5天(在TIL輸注前第27至23天)。在一些實施例中，非骨髓清除式化療為環磷醯胺60 mg/kg/d持續2天(在TIL輸注前第27及26天)及氟達拉濱25 mg/m^2/d持續3天(在TIL輸注前第27至25天)。在一些實施例中，非骨髓清除式化療為環磷醯胺60 mg/kg/d持續2天(在TIL輸注前第27及26天)，然後氟達拉濱25 mg/m^2/d持續3天(在TIL輸注前第25至23天)。在一實施例中，在根據本揭示案之非骨髓清除式化療及TIL輸注(第0天)之後，患者每8小時以720,000 IU/kg靜脈內接受IL-2(阿地介白素，可以PROLEUKIN商購)之靜脈內輸注以達到生理耐受。在某些實施例中，TIL群體用於與IL-2組合治療癌症，其中IL-2係在TIL群體之後投予。

【2023】實驗發現表明，在過繼性轉移腫瘤特異性T淋巴球之前，淋巴球耗盡藉由消除調節性T細胞且競爭免疫系統之元件(『細胞介素庫』)在增強治療功效方面發揮關鍵作用。因此，本發明之一些實施例在引入本發明之TIL之前在患者身上採用淋巴球耗盡步驟(有時亦稱為「免疫抑制性調節」)。

【2024】一般而言，使用氟達拉濱或環磷醯胺(活性形式稱作馬磷醯胺)及其組合之投予實現淋巴球耗盡。此類方法描述於Gassner等人，《癌症免疫學及免疫治療》**2011**, 60, 75-85、Muranski等人，《自然臨床實踐腫瘤學》,**2006,** 3, 668-681、Dudley等人，《臨床腫瘤學雜誌》

2008, *26*, 5233-5239及Dudley等人，《臨床腫瘤學雜誌》**2005**, *23*, 2346-2357中，所有該等文獻以全文引用之方式併入本文中。

【2025】在一些實施例中，氟達拉濱係以0.5 μg/mL至10 μg/mL氟達拉濱之濃度投予。在一些實施例中，氟達拉濱係以1 μg/mL氟達拉濱之濃度投予。在一些實施例中，投予氟達拉濱治療1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天或更多天。在一些實施例中，氟達拉濱係以10毫克/公斤/天、15毫克/公斤/天、20毫克/公斤/天、25毫克/公斤/天、30毫克/公斤/天、35毫克/公斤/天、40毫克/公斤/天或45毫克/公斤/天之劑量投予。在一些實施例中，氟達拉濱治療係以35毫克/公斤/天投予2至7天。在一些實施例中，氟達拉濱治療係以35毫克/公斤/天投予4至5天。在一些實施例中，氟達拉濱治療係以25毫克/公斤/天投予4至5天。

【2026】在一些實施例中，藉由投予環磷醯胺獲得濃度為0.5 μg/mL至10 μg/mL的馬磷醯胺(環磷醯胺之活性形式)。在一些實施例中，藉由投予環磷醯胺獲得濃度為1 μg/mL的環磷醯胺之活性形式馬磷醯胺。在一些實施例中，投予環磷醯胺治療1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天或更多天。在一些實施例中，環磷醯胺係以100毫克/平方公尺/天、150毫克/平方公尺/天、175毫克/平方公尺/天、200毫克/平方公尺/天、225毫克/平方公尺/天、250毫克/平方公尺/天、275毫克/平方公尺/天或300毫克/平方公尺/天之劑量投予。在一些實施例中，環磷醯胺係靜脈內

(亦即i.v.)投予。在一些實施例中，環磷醯胺治療係以35毫克/公斤/天投予2至7天。在一些實施例中，環磷醯胺治療係以250毫克/平方公尺/天靜脈內投予4至5天。在一些實施例中，環磷醯胺治療係以250毫克/平方公尺/天靜脈內投予4天。

【2027】在一些實施例中，藉由將氟達拉濱及環磷醯胺一起投予給患者進行淋巴球耗盡。在一些實施例中，經4天以25毫克/平方公尺/天靜脈內投予氟達拉濱且以250毫克/平方公尺/天靜脈內投予環磷醯胺。

【2028】在一實施例中，藉由以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱五天來進行淋巴球耗盡。

【2029】在一實施例中，藉由以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天及以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱五天來進行淋巴球耗盡，其中在前兩天投予環磷醯胺及氟達拉濱兩者，且其中在總計五天中進行淋巴球耗盡。

【2030】在一實施例中，藉由以約50毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天及以約25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱五天來進行淋巴球耗盡，其中在前兩天投予環磷醯胺及氟達拉濱兩者，且其中在總計五天中進行淋巴球耗盡。

【2031】在一實施例中，藉由以約50毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天及以約20毫克/平方公尺/天之

劑量投予氟達拉濱五天來進行淋巴球耗盡，其中在前兩天投予環磷醯胺及氟達拉濱兩者，且其中在總計五天中進行淋巴球耗盡。

【2032】在一實施例中，藉由以約40毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天及以約20毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱五天來進行淋巴球耗盡，其中在前兩天投予環磷醯胺及氟達拉濱兩者，且其中在總計五天中進行淋巴球耗盡。

【2033】在一實施例中，藉由以約40毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天及以約15毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱五天來進行淋巴球耗盡，其中在前兩天投予環磷醯胺及氟達拉濱兩者，且其中在總計五天中進行淋巴球耗盡。

【2034】在一實施例中，藉由持續兩天以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺及以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱三天來進行淋巴球耗盡。

【2035】在一實施例中，環磷醯胺係與美司鈉(mesna)一起投予。在一實施例中，美司鈉係以15 mg/kg投予。在一實施例中，輸注美司鈉，且若連續輸注，則歷經24小時，伴隨各自環磷醯胺劑量開始，美司鈉可經大約2小時與環磷醯胺一起輸注(第-5天及/或第-4天)，隨後在剩餘22小時以3毫克/千克/小時之速率輸注。

【2036】在一實施例中，淋巴球耗盡包括以下步驟：

始於在向患者投予第三TIL群體之後當天，用IL-2方案治療患者。

【2037】在一實施例中，淋巴球耗盡包括以下步驟：始於向患者投予第三TIL群體當天，用IL-2方案治療患者。

【2038】在一些實施例中，淋巴球耗盡包括5天之預調節治療。在一些實施例中，天數指示為第-5天至第-1天，或第0天至第4天。在一些實施例中，該方案包括第-5天及第-4天(亦即第0天及第1天)的環磷醯胺。在一些實施例中，該方案包括第-5天及第-4天(亦即第0天及第1天)的靜脈內環磷醯胺。在一些實施例中，該方案包括第-5天及第-4天(亦即第0天及第1天)的60 mg/kg靜脈內環磷醯胺。在一些實施例中，環磷醯胺係與美司鈉一起投予。在一些實施例中，該方案進一步包括氟達拉濱。在一些實施例中，該方案進一步包括靜脈內氟達拉濱。在一些實施例中，該方案進一步包括25 mg/m^2靜脈內氟達拉濱。在一些實施例中，該方案進一步包括第-5天及第-1天(亦即第0天至第4天)的25 mg/m^2靜脈內氟達拉濱。在一些實施例中，該方案進一步包括第-5天及第-1天(亦即第0天至第4天)的25 mg/m^2靜脈內氟達拉濱。

【2039】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：持續兩天以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺及以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱五

天。

【2040】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：持續兩天以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺及以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱三天。

【2041】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：持續兩天以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺及以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱，以及以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱兩天，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱一天。

【2042】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：持續兩天以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺及以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱，以及以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱兩天，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱兩天。

【2043】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：持續兩天以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺及以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱，以及以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱兩天，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱三天。

【2044】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括5天之預調節治療。在一些實施例中，天數指示為第-5天至第-1天，或第0天至第4天。在一些實施例中，該方案包括第-5天及第-4天(亦即第0天及第1天)的環磷醯胺。在一些實施例中，該方案包括第-5天及第-4天(亦即第0天及第1天)的靜脈內環磷醯胺。在一些實施例中，該方案包括第-5天及第-4天(亦即第0天及第1天)的300 mg/kg靜脈內環磷醯胺。在一些實施例中，環磷醯胺係與美司鈉一起投予。在一些實施例中，該方案進一步包括氟達拉濱。在一些實施例中，該方案進一步包括靜脈內氟達拉濱。在一些實施例中，該方案進一步包括30 mg/m^2靜脈內氟達拉濱。在一些實施例中，該方案進一步包括第-5天及第-1天(亦即第0天至第4天)的30 mg/m^2靜脈內氟達拉濱。在一些實施例中，該方案進一步包括第-5天及第-1天(亦即第0天至第4天)的30 mg/m^2靜脈內氟達拉濱。

【2045】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：持續兩天以300毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺及以30毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱，然後以30毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱五天。

【2046】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：持續兩天以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺及以30毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱，然後以30毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱三

天。

【2047】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：持續兩天以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺及以30毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱，以及以30毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱兩天，然後以30毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱一天。

【2048】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：持續兩天以300毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺及以30毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱，以及以30毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱兩天，然後以30毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱兩天。

【2049】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：持續兩天以300毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺及以30毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱，以及以30毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱兩天，然後以30毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱三天。

【2050】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表26投予。

表 26. 例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 60 mg/kg	X	X								
美司鈉（按需要）	X	X								
氟達拉濱 25 毫克/平方公尺/天	X	X	X	X	X					
TIL 輸注						X				

【2051】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表27投予。

表 27. 例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 60 mg/kg	X	X							
美司鈉（按需要）	X	X							
氟達拉濱 25 毫克/平方公尺/天	X	X	X	X					
TIL 輸注					X				

【2052】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表28投予。

表 28. 例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 60 mg/kg	X	X						
美司鈉（按需要）	X	X						
氟達拉濱 25 毫克/平方公尺/天	X	X	X					
TIL 輸注				X				

【2053】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表29投予。

表 29.例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 60 mg/kg	X	X								
美司鈉（按需要）	X	X								
氟達拉濱 25 毫克/平方公尺/天			X	X	X					
TIL 輸注						X				

【2054】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡

方案係根據表30投予。

表30. 例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 300 mg/kg	X	X								
美司鈉（按需要）	X	X								
氟達拉濱 30 毫克/平方公尺/天	X	X	X	X	X					
TIL 輸注						X				

【2055】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表31投予。

表31. 例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 300 mg/kg	X	X							
美司鈉（按需要）	X	X							
氟達拉濱 30 毫克/平方公尺/天	X	X	X	X					
TIL 輸注					X				

【2056】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表32投予。

表32. 例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 300 mg/kg	X	X						
美司鈉（按需要）	X	X						
氟達拉濱 30 毫克/平方公尺/天	X	X	X					
TIL 輸注				X				

【2057】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表33投予。

表33. 例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 300 mg/kg	X	X								
美司鈉（按需要）	X	X								
氟達拉濱 30 毫克/平方公尺/天			X	X	X					
TIL 輸注						X				

【2058】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括在TIL輸注當天之前1、2或3天的過程中以100 mg/m^{2}之總劑量投予美法侖。在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括在TIL輸注當天之前1、2或3天的過程中以200 mg/m^{2}之總劑量投予美法侖。在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括在TIL輸注當天之前1、2或3天的過程中以100 mg/m^{2}之總劑量投予美法侖及以30毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱。在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括在TIL輸注當天之前1、2或3天的過程中以200 mg/m^{2}之總劑量投予美法侖及以30毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱。

【2059】在一些實施例中，與骨髓清除式淋巴球耗盡方案之前述實施例一起使用之TIL輸注可為本文所描述之任何TIL組合物且亦可包含代替TIL輸注之MIL及PBL輸注，以及添加IL-2方案及投予如本文所描述之共同療法(諸如PD-1及/或PD-L1抑制劑)。

5. IL-2方案

【2060】在一實施例中，IL-2方案包括高劑量IL-2方案，其中高劑量IL-2方案包括阿地介白素或其生物類似物

或變體，其在投予治療性TIL群體之治療有效部分之後當天開始靜脈內投予，其中阿地介白素或其生物類似物或變體係每八小時使用15分鐘推注靜脈內輸注以0.037 mg/kg或0.044 mg/kg IU/kg(患者體重)之劑量投予直至耐受，最多為14個劑量。在休止9天後，可重複此時程再投予14次劑量，最多總計28次劑量。在一些實施例中，IL-2係以1、2、3、4、5或6次劑量投予。在一些實施例中，IL-2係以至多6次劑量之最大劑量投予。在一些實施例中，高劑量IL-2方案適用於小兒用途。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為600,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為500,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為400,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為500,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為300,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為200,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為100,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。

【2061】在一實施例中，IL-2方案包括遞減IL-2方案。遞減IL-2方案已描述於O'Day等人，《臨床腫瘤學雜誌》**1999**, *17*, 2752-61及Eton等人，《癌症》**2000**, *88*,

1703-9，該等文獻之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一實施例中，遞減IL-2方案包括經6小時靜脈內投予18×10^6 IU/m^2，然後經12小時靜脈內投予18×10^6 IU/m^2，然後經24小時靜脈內投予18×10^6 IU/m^2，然後經72小時靜脈內投予4.5×10^6 IU/m^2。此治療週期可每28天重複，達最多四個週期。在一實施例中，遞減IL-2方案包括第1天18,000,000 IU/m^2、第2天9,000,000 IU/m^2以及第3天及第4天4,500,000 IU/m^2。

【2062】在一實施例中，IL-2方案包括每1、2、4、6、7、14或21天以0.10毫克/天至50毫克/天之劑量投予聚乙二醇化IL-2。

【2063】在一實施例中，IL-2方案包括投予移植至抗體主鏈上之IL-2片段。在一實施例中，IL-2方案包括投予結合IL-2低親和力受體之抗體細胞介素移植蛋白。在一實施例中，IL-2方案包括投予與阿地白介素相比展現出與IL-2Rβ及/或IL-2Rγ受體結合增強的抗體-細胞介素移植蛋白，而不影響與IL-2Rα受體的結合。

【2064】在一些實施例中，本文所描述之抗體細胞介素移植蛋白的血清半衰期比野生型IL-2分子(諸如但不限於阿地介白素(Proleukin®)或可比分子)長。

6. 另外的治療方法

【2065】在另一實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體的方法，其包括向該個體投予治療有效劑

量之上文任何前述段落中描述之治療性TIL群體。

【2066】在另一實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體的方法，其包括向該個體投予治療有效劑量之上文任何前述段落中描述之TIL組合物。

【2067】在另一實施例中，本發明提供經修改的上文任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中在分別投予治療有效劑量的上文任何前述段落中描述的治療性TIL群體及TIL組合物之前，已向個體投予非骨髓清除式淋巴球耗盡方案。

【2068】在另一實施例中，本發明提供經修改之上文任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱五天。

【2069】在另一實施例中，本發明提供經修改之上文任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其進一步包括以下步驟：始於在向個體投予TIL細胞之後當天，用高劑量IL-2方案治療個體。

【2070】在另一實施例中，本發明提供經修改之上文任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中高劑量IL-2方案包括每八小時以15分鐘推注靜脈內輸注形式投予600,000或720,000 IU/kg直至耐受。

【2071】在另一實施例中，本發明提供經修改之上文任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，

其中癌症為實體腫瘤。

【2072】在另一實施例中，本發明提供經修改之上文任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為黑色素瘤。

【2073】在另一實施例中，本發明提供經修改之上文任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為小兒高突變癌症。

【2074】在另一實施例中，本發明提供上文任何前述段落中描述的治療性TIL群體，其用於治療患有癌症之個體的方法中，該方法包括向個體投予治療有效劑量之治療性TIL群體。

【2075】在另一實施例中，本發明提供上文任何前述段落中描述的TIL組合物，其用於治療患有癌症之個體的方法中，該方法包括向個體投予治療有效劑量之TIL組合物。

【2076】在另一實施例中，本發明提供經修改的上文任何前述段落中描述的治療性TIL群體或上文任何前述段落中描述的TIL組合物，其中在向個體投予治療有效劑量之上文任何前述段落中描述的治療性TIL群體或上文任何前述段落中描述的TIL組合物之前，已向個體投予非骨髓清除式淋巴球耗盡方案。

【2077】在另一實施例中，本發明提供經修改之上文任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其中非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：以60毫克/

平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱五天。

【2078】在另一實施例中，本發明提供經修改之上文任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其進一步包括以下步驟：始於在向患者投予TIL細胞之後當天，用高劑量IL-2方案治療患者。

【2079】在另一實施例中，本發明提供經修改之上文任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其中高劑量IL-2方案包括每八小時以15分鐘推注靜脈內輸注形式投予600,000或720,000 IU/kg直至耐受。

【2080】在另一實施例中，本發明提供經修改之上文任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為實體腫瘤。

【2081】在另一實施例中，本發明提供經修改之上文任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為黑色素瘤。

【2082】在另一實施例中，本發明提供經修改之上文任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為高突變癌症。

【2083】在另一實施例中，本發明提供經修改之上文任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為小兒高突變癌症。

【2084】在另一實施例中，本發明提供上文任何前述段落中描述的治療性TIL群體在用於治療個體之癌症之方

法中的用途，該方法包括向個體投予治療有效劑量之治療性TIL群體。

【2085】在另一實施例中，本發明提供上文任何前述段落中描述的TIL組合物在治療個體之癌症之方法中的用途，該方法包括向個體投予治療有效劑量之TIL組合物。

【2086】在另一實施例中，本發明提供上文任何前述段落中描述的治療性TIL群體或上文任何前述段落中描述的TIL組合物在治療個體之癌症之方法中的用途，該方法包括向個體投與非骨髓清除式淋巴球耗盡方案且隨後向個體投與治療有效劑量之上文任何前述段落中描述的治療性TIL群體或治療有效劑量之上文任何前述段落中描述的TIL組合物。

實例

【2087】現參考以下實例描述本文中涵蓋之實施例。此等實例僅出於說明之目的提供且本揭示案決不應理解為限於此等實例，而應理解為涵蓋由於本文提供之教示而變得顯而易見的任何及所有變化形式。

實例1：製備用於預REP及REP過程之培養基

【2088】此實例描述用於製備適用於涉及衍生自包含黑色素瘤之各種腫瘤類型之TIL的培養物之方案中的組織培養基之程序。此培養基可用於製備本申請案及實例中所描述之任一TIL。

【2089】製備CM1。自冷藏庫取出以下試劑並使其在37℃水浴中升溫：(RPMI1640、人類AB血清、200 mM L-麩醯胺酸)。根據下表34，藉由將每一成分添加至適於待過濾體積之0.2 μm過濾器單元的頂部來製備CM1培養基。儲存於4℃下。

表34.製備CM1

成分	最終濃度	最終體積500 mL	最終體積 IL
RPMI1640	NA	450 mL	900 mL
人 AB 血清，加熱去活化 10%	50 mL	100 mL	
200 mM L-麩醯胺酸	2 mM	5 mL	10 mL
55 mM BME	55 μM	0.5 mL	1 mL
50 mg/mL 硫酸建它黴素	50 μg/mL	0.5 mL	1 mL

【2090】使用當天，將所需量之CM1在37℃水浴中預熱並添加6000 IU/mL IL-2。

【2091】根據表35，可按需要進行額外補充。

表35. 按需要對CM1之額外補充。

補充	**儲備液濃度**	**稀釋**	**最終濃度**
GlutaMAX™	200 mM	1:100	2 mM
青黴素/鏈黴素	10,000 U/mL 青黴素 10,000μg/mL 鏈黴素	1:100	100 U/mL 青黴素 100 μg/mL 鏈黴素
雙性黴素 B	250 μg/mL	1:100	2.5 μg/mL

【2092】製備CM2。自冰箱取出已製備之CM1或製備新鮮CM1。自冰箱取出AIM-V®，且藉由在無菌培養基瓶中混合已製備之CM1與等體積AIM-V®來製備所需量之CM2。在使用當天向CM2培養基中添加3000 IU/mL IL-2。在使用當天用3000 IU/mL IL-2製成足夠量之CM2。將CM2

培養基瓶標記上名稱、製備者首字母縮寫、過濾/製備日期、兩週之過期日期，且在需要用於組織培養之前儲存於4℃下。

【2093】製備CM3。在需要使用的當天，製備CM3。CM3與AIM-V®培養基相同，但在使用當天補充3000 IU/mL IL-2。藉由向AIM-V瓶或袋中直接添加IL-2儲備溶液，製備滿足實驗需求之量的CM3。藉由輕微振盪進行充分混合。添加AIM-V之後，立即將瓶子標記上「3000 IU/mL IL-2」。若存在過量CM3，則將其儲存於處於4℃下之瓶子中，標記上培養基名稱、製備者名字縮寫、製備培養基之日期及其過期日期(製備後7天)。儲存於4℃下7天後，捨棄補充有IL-2之培養基。

【2094】製備CM4。CM4與CM3相同，但另外補充2 mM GlutaMAX™(最終濃度)。每1L CM3添加10 ml之200 mM GlutaMAX™。藉由向AIM-V瓶或袋直接添加IL-2儲備溶液及GlutaMAX™儲備溶液，製備滿足實驗需求之量的CM4。藉由輕微振盪進行充分混合。添加AIM-V之後，立即將瓶子標記上「3000 IL/mL IL-2及GlutaMAX」。若存在過量CM4，則將其儲存於處於4℃下之瓶子中，標記上培養基名稱、「GlutaMAX」及其過期日期(製備後7天)。儲存於4℃下7天後，捨棄補充有IL-2之培養基。

實例2：對單個批次之經Γ輻照的末梢單核細胞之限定

【2095】本實例描述用於限定在本文所描述之例示性

方法中用作同種異體飼養細胞的個別批次之經γ輻照之末梢單核細胞(PBMC，亦稱為單核細胞或MNC)的簡化程序。

【2096】每個經輻照之MNC飼養細胞批次均由個別供體製備。在存在經純化之抗CD3(選殖株OKT3)抗體及介白素-2(IL-2)的情況下，針對各批次或供體在REP中擴增TIL的能力進行單獨篩選。此外，每個批次之飼養細胞均在不添加TIL之情況下進行測試，以驗證所接受之γ輻照劑量足以使其不能夠複製。

【2097】TIL之REP需要經γ輻照之生長停滯的MNC飼養細胞。飼養細胞MNC上之膜受體與抗CD3(選殖株OKT3)抗體結合且與REP培養瓶中之TIL交聯，從而刺激TIL擴增。飼養細胞批次由採集自個體供體的全血的白血球清除術製備。將白血球清除術產物在Ficoll-Hypaque上進行離心、洗滌、輻照且在GMP條件下冷凍保存。

【2098】重要的係，接受TIL療法之患者不輸注活飼養細胞，因為此可能導致移植物抗宿主病(GVHD)。因此，飼養細胞因對該等細胞給予γ輻照而發生生長停滯，導致雙股DNA斷裂及在再培養時MNC細胞之細胞活力喪失。

【2099】根據兩個準則評估飼養細胞批次：(1)其在共同培養中使TIL擴增>100倍的能力，及(2)其複製能力不足。

【2100】利用在立式T25組織培養瓶中生長的兩個主

要預REP TIL細胞株，以微型REP型式測試飼養細胞批次。針對兩個不同的TIL細胞株測試飼養細胞批次，因為各TIL細胞株在其回應於REP中活化而增殖之能力方面係獨特的。作為對照，與測試批次一起運行了許多歷來已證明滿足上述準則的經輻照的MNC飼養細胞。

【2101】為確保在單一實驗中測試的所有批次都接受等效測試，可使用相同預REP TIL細胞株的足夠儲備液來測試所有條件及所有飼養細胞批次。

【2102】對於測試的各批次飼養細胞，總共存在六個T25培養瓶：預REP TIL細胞株#1(2個培養瓶)；預REP TIL細胞株#2(2個培養瓶)；及飼養細胞對照組(2個培養瓶)。含有TIL細胞株#1及#2之培養瓶用於評估飼養細胞批次擴增TIL之能力。飼養細胞對照組培養瓶評估飼養細胞批次的複製能力不足。

A. 實驗方案

【2103】第-2/3天，TIL細胞株解凍。製備CM2培養基且使CM2在37℃水浴中升溫。製備40 mL補充有3000 IU/mL IL-2之CM2。保持溫熱直至使用。將20 mL不含IL-2之預溫熱CM2置放於用所使用之TIL細胞株之名稱標記之兩個50 mL錐形管中之每一者中。自LN2儲存器取出兩個指定的預REP TIL細胞株且將小瓶轉移至組織培養室中。藉由將小瓶於拉鏈密封之儲存袋內置放於37℃水浴中解凍直至保留少量冰。

【2104】使用無菌移液管，將各小瓶之內容物立即轉移至準備好的經標記之50 mL錐形管中之20 mL CM2中。補足至40mL，使用不含IL-2的CM2來洗滌細胞，且在400×CF下離心5分鐘。抽吸上清液且再懸浮於補充有3000 IU/mL IL-2之5 mL溫熱的CM2中。

【2105】一式兩份取出小等分試樣(20 μL)，使用自動細胞計數器進行細胞計數。記錄計數。在計數時，將具有TIL細胞之50 mL錐形管置放於潮濕的37℃、5% CO_2培育箱中，並將蓋鬆開以允許氣體交換。測定細胞濃度，且將TIL在補充有3000 IU/mL IL-2之CM2中稀釋至1×10^6個細胞/毫升。

【2106】在潮濕的37℃培育箱中，視需要在24孔組織培養盤中之多個孔中以2毫升/孔進行培養，直至微型REP的第0天。不同TIL細胞株在單獨的24孔組織培養盤中培養以避免混淆及潛在的交叉污染。

【2107】第0天，起始微型REP。針對待測試之飼養細胞批次之數目製備足夠的CM2培養基。(例如，為了一次測試4個飼養細胞批次，製備800 mL CM2培養基)。將上述製備之CM2之一部分等分，且對其補充3000 IU/mL IL-2用於細胞培養。(例如，為了一次測試4個飼養細胞批次，製備具有3000 IU/mL IL-2之500 mL CM2培養基)。

【2108】用各TIL細胞株獨立地操作以防止交叉污染，自培育箱取出具有TIL培養物之24孔盤，並轉移至BSC。

【2109】使用無菌移液管或100-1000 μL移液管及吸頭，自待使用之TIL之各孔移除約1 mL培養基，並將其置於24孔組織培養盤之未使用孔中。

【2110】使用新鮮的無菌移液管或100-1000 μL移液管及吸頭，將剩餘培養基與孔中的TIL混合以使細胞再懸浮，且接著將細胞懸浮液轉移至標記有TIL批次名稱的50 mL錐形管中且記錄體積。

【2111】用保留的培養基清洗孔且將該體積轉移至相同的50 mL錐形管中。以400×CF旋轉細胞以收集細胞沈澱物。抽取出培養基上清液且將細胞沈澱物再懸浮於2-5 mL含有3000 IU/mL IL-2之CM2培養基中，所使用之體積係基於所收集的孔之數目及沈澱物之大小，亦即，體積應足以確保濃度>1.3×10^6個細胞/毫升。

【2112】使用血清移液管將細胞懸浮液徹底混合且記錄體積。取出200 μL，使用自動化細胞計數器進行細胞計數。在計數時，將具有TIL細胞之50 mL錐形管置放於潮濕的5% CO_2 37℃培育箱中，其中蓋鬆開以允許氣體交換。記錄計數。

【2113】自培育箱取出含有TIL細胞之50 mL錐形管，且使其細胞以1.3×10^6個細胞/毫升之濃度再懸浮於補充有3000 IU/mL IL-2之溫熱CM2中。將50 mL錐形管放回培育箱中且將蓋子鬆開。

【2114】對於第二TIL細胞株重複以上步驟。

【2115】僅在將TIL塗鋪至用於實驗的T25培養瓶中之

前，如下所示將TIL以1:10稀釋至最終濃度為1.3×10^5個細胞/毫升。

【2116】製備MACS GMP CD3純(OKT3)工作溶液。自4℃冰箱中取出OKT3(1 mg/mL)的儲備溶液且置放於BSC中。在微型REP之培養基中使用最終濃度為30 ng/mL之OKT3。

【2117】在用於實驗之各T25培養瓶中，每20 mL需要600 ng OKT3；此相當於每20 mL需要60 µL的10 µg/mL溶液，或對於各飼養細胞批次，所測試之全部6個培養瓶需要360 µL。

【2118】對於所測試的各飼養細胞批次，對於10 µg/mL之工作濃度，製備400 µL的1 mg/mL OKT3之1:100稀釋液(例如為了一次測試4個飼養細胞批次，製備1600 µL的1 mg/mL OKT3之1:100稀釋液：16 µL的1 mg/mL OKT3+1.584 mL具有3000 IU/mL IL-2之CM2培養基)。

【2119】準備T25培養瓶。在準備飼養細胞之前，標記各培養瓶且用CM2培養基填充培養瓶。將培養瓶置放於37℃潮濕的5% CO_2培育箱中以保持培養基溫熱，同時等待添加剩餘組分。在準備飼養細胞後，將組分添加至各培養瓶中之CM2中。

表 36.溶液

組分	共培養瓶中之體積	對照（僅飼養細胞）培養瓶中之體積
CM2 + 3000 IU/mL IL-2	18 mL	19 mL
MNC：1.3×10^7/mL 於 CM2 + 3000 IU IL-2 中（最終濃度 1.3×10^7/培養瓶）	1 mL	1 mL
OKT3：10 μL/mL 於 CM2 = 3000 IU IL-2 中	60 μL	60 μL
TIL：1.3×10^5/mL 於含有 3000 IU IL-2 的 CM2 中（最終濃度 1.3×10^5/培養瓶）	1 mL	0

【2120】準備飼養細胞。對於此方案，所測試之每個批次需要至少78×10^6個飼養細胞。由SDBB冷凍之每個1 mL小瓶在冷凍時具有100×10^6個活細胞。假設自液態N_2儲存器解凍後之回收率為50%，建議每批次至少解凍兩個1 mL小瓶之飼養細胞，向各REP提供估計100×10^6個活細胞。或者，若供應於1.8 mL小瓶中，則僅一個小瓶提供足夠的飼養細胞。

【2121】在解凍飼養細胞之前，對於待測試之各飼養細胞批次預溫熱約50 mL不含IL-2之CM2。自LN2儲存器取出指定飼養細胞批次小瓶，置放於拉鏈儲存袋中，並置放於冰上。將小瓶在封閉的拉鏈儲存袋中藉由浸沒於37℃水浴中來解凍。自拉鏈袋取出小瓶，用70% EtOH噴灑或擦拭，並轉移至BSC。

【2122】使用移液管，將飼養細胞小瓶之內容物立即轉移至50 mL錐形管中之30 mL溫熱CM2中。用小體積CM2

洗滌小瓶以移除小瓶中之任何殘餘細胞且以400×CF離心5分鐘。抽吸上清液且再懸浮於4 mL溫熱的CM2加3000 IU/mL IL-2中。取出200 μL，使用自動細胞計數器進行細胞計數。記錄計數。

【2123】將細胞以1.3×10^7個細胞/毫升再懸浮於溫熱CM2加3000 IU/mL IL-2中。將TIL細胞自1.3×10^6個細胞/毫升稀釋至1.3×10^5個細胞/毫升。

【2124】設定共培養。將TIL細胞自1.3×10^6個細胞/毫升稀釋至1.3×10^5個細胞/毫升。將4.5 mL CM2培養基添加至15 mL錐形管。自培育箱取出TIL細胞且使用10 mL血清移液管使其充分再懸浮。自1.3×10^6個細胞/毫升TIL懸浮液移出0.5 mL細胞且添加至15 mL錐形管中之4.5 mL培養基中。將TIL儲備液瓶放回培育箱中。充分混合。對第二TIL細胞株重複上述操作。

【2125】將具有用於單一飼養細胞批次之預溫熱培養基之培養瓶自培育箱轉移至BSC。藉由用1 mL移液管吸頭上下移液數次來混合飼養細胞，且然後將1 mL(1.3×10^7個細胞)轉移至該飼養細胞批次的各培養瓶中。向各培養瓶中添加60 μL OKT3工作儲備液(10 μg/mL)。將兩個對照培養瓶放回培育箱。

【2126】將1 mL(1.3×10^5)之各TIL批次轉移至相應標記的T25培養瓶中。將培養瓶放回培育箱中且直立培育。自第5天開始進行干預。對於所測試之所有飼養細胞批次重複此程序。

【2127】第5天，培養基更換。製備具有3000 IU/mL IL-2之CM2。每個培養瓶需要10 mL。利用10 mL移液管，將具有3000 IU/mL IL-2之10 mL溫熱的CM2轉移至各培養瓶中。將培養瓶放回培育箱中且直立培育至第7天。對測試的所有飼養細胞批次重複操作。

【2128】第7天：收集。自培育箱中取出培養瓶且轉移至BSC，注意不要破壞在培養瓶底部上之細胞層。在不破壞在培養瓶底部上生長之細胞的情況下，自各測試培養瓶取出10 mL培養基且自各對照培養瓶取出15 mL培養基。

【2129】使用10 mL血清移液管，將細胞再懸浮於剩餘培養基中且充分混合以打散任何細胞團塊。在藉由移液充分混合細胞懸浮液之後，移出200 μL以進行細胞計數。結合自動細胞計數器設備使用適當標準操作程序對TIL進行計數。在第7天記錄計數。對於所測試之所有飼養細胞批次重複此程序。

【2130】評估飼養細胞對照培養瓶之複製能力不足，且自第0天起評估含有TIL的培養瓶的擴增倍數。

【2131】第7天，繼續操作飼養細胞對照培養瓶至第14天。在完成第7天飼養細胞對照培養瓶之計數之後，將15 mL含有3000 IU/mL IL-2之新鮮CM2培養基添加至各對照培養瓶中。將對照培養瓶放回培育箱中且以直立位置培育至第14天。

【2132】第14天，飼養細胞對照培養瓶之非增殖期延長。自培育箱中取出培養瓶且轉移至BSC，注意不要破壞

在培養瓶底部上之細胞層。在不破壞在培養瓶底部上生長之細胞的情況下，自各對照培養瓶取出大約17 mL培養基。使用5 mL血清移液管，將細胞再懸浮於剩餘培養基中且充分混合以打散任何細胞團塊。記錄各培養瓶之體積。

【2133】藉由移液充分混合細胞懸浮液之後，取出200 μL用於細胞計數。使用適當標準操作程序結合自動細胞計數器設備對TIL進行計數且記錄下計數。對於所測試之所有飼養細胞批次重複此程序。

B. 結果及接受準則方案

【2134】結果。伽馬輻照的劑量足以使飼養細胞無法複製。預期所有批次符合評估準則且亦展現相比於第0天，REP培養第7天剩餘之飼養細胞之總活細胞數目減少。預期所有飼養細胞批次均符合以下評估準則：到REP培養之第7天，TIL之生長擴增100倍。預期飼養細胞對照培養瓶之第14天計數將持續在第7天發現的非增殖趨勢。

【2135】接受準則。測試的各批次飼養細胞之每個TIL細胞株複本均滿足以下接受準則。接受準則為雙重的，如下表37中所示，其可以使用本文所闡述之方法與效力測定接受準則組合。

表37.接受準則

測試	接受準則
MNC之輻照/複製無能	在7天及14天未觀測到生長
TIL擴增	各TIL至少擴增100倍（最小1.3×10^7個活細胞）

【2136】當在30 ng/mL OKT3抗體及3000 IU/mL IL-2存在下培養時，評估照射劑量是否足以使MNC飼養細胞無法複製。如藉由在REP的第7天及第14天藉由自動細胞計數測定的總活細胞計數(TVC)來評估複製無能。

【2137】接受準則為「無生長」，意謂在第7天及第14天，總活細胞數目與在REP之第0天放入培養物中之初始活細胞數目相比未增加。

【2138】評估飼養細胞支援TIL擴增之能力。根據活細胞自REP第0天培養開始至REP第7天的擴增倍數來量測TIL生長。在第7天，如藉由自動細胞計數所評估，TIL培養物達成最小100倍擴增(亦即，超過在REP第0天放入培養物中之總活TIL細胞數目的100倍)。

【2139】不符合接受準則的MNC飼養細胞批次的應急測試。在MNC飼養細胞批次不滿足以上概述之接受準則中之任一者的情況下，將採取以下步驟對該批次進行再測試，以排除造成此情形之簡單實驗者錯誤。

【2140】若該批次存在兩個或更多個剩餘衛星測試小瓶，則再測試該批次。若該批次存在一個或不存在剩餘衛星測試小瓶，則根據上文所列之接受準則，該批次不合格。

【2141】為了合格，所討論批次及對照批次必須達成以上接受準則。在符合此等準則之後，釋放該批次以供使用。

實例3：對個別批次之經γ照射的末梢單核細胞之限定

【2142】此實例描述了用於限定在本文所描述之例示性方法中用作同種異體飼養細胞的單個批次的經γ輻照的末梢單核細胞(PBMC)的新穎簡化程序。此實例提供用於評估經輻照PBMC細胞批次以用於產生TIL之臨床批次的方案。每個經輻照之PBMC批次均由個別供體製備。在超過100個限定方案之過程中，已顯示在所有情況下，來自SDBB(聖地亞哥血庫)經輻照之PBMC批次在REP之第7天擴增TIL>100倍。此經修改之限定方案意欲應用於來自SDBB之經輻照供體PBMC批次，接著對其進行進一步測試以驗證所接收之γ輻照劑量足以使其無法複製。一旦證實其在14天過程內維持複製無能，供體PBMC批次就視為「合格的」以用於生產臨床批次TIL。

【2143】TIL之現行標準REP需要經γ輻照之生長停滯的PBMC。PBMC上的膜受體與抗CD3(選殖株OKT3)抗體結合並且與培養物中的TIL交聯，從而刺激TIL擴增。PBMC批次由採集自個別供體的全血的白血球清除術製備。將白血球清除術產物在Ficoll-Hypaque上進行離心、洗滌、輻照且在GMP條件下冷凍保存。

【2144】重要的係，接受TIL療法之患者不輸注活PBMC，因為此可能導致移植物抗宿主病(GVHD)。因此，供體PBMC因對該等細胞給予γ輻照而發生生長停滯，導致雙股DNA斷裂及在再培養時PBMC之細胞活力喪失。

【2145】經輻照PBMC批次之評估準則為其複製無

能。

【2146】使用在立式T25組織培養瓶中微型REP格式測試飼養細胞批次，如同其與TIL共培養一樣。對照批次係一批輻照過的PBMC，歷史上已證明符合評估準則，與實驗批次一起作為對照運行。對於所測試之各批次之輻射供體PBMC，運行一式兩份的培養瓶。

【2147】實驗方案-第0天。針對待測試之供體PBMC各批次製備約90 mL CM2培養基。使CM2在37℃水浴中保持溫熱。解凍6×10^6 IU/ml IL-2的等分試樣。將CM2培養基放回BSC，用70% EtOH擦拭，隨後置放於通風櫥中。對於各測試批次的PBMC，將約60 mL CM2移出至單獨的無菌瓶中。將解凍的6×10^6 IU/mL儲備溶液中的IL-2添加至此培養基中，最終濃度為3000 IU/mL。將此瓶子標記為「CM2/IL2」(或類似名稱)以將其與未補充CM2區分開。

【2148】準備OKT3。自4℃冰箱中取出抗CD3(OKT3)之儲備溶液且置放於BSC中。在微型REP之培養基中使用最終濃度為30 ng/mL之OKT3。由1 mg/mL儲備溶液製備10 μg/mL抗CD3(OKT3)工作溶液。將其置放於冰箱中直至需要。

【2149】對於所測試之各PBMC批次，製備150 μL之1:100稀釋度之抗CD3(OKT3)儲備液。舉例而言，為了一次測試4個PBMC批次，藉由添加6 μL的1 mg/mL儲備溶液至594 μl的補充有3000 IU/ml IL-2之CM2來製備600μl的110 μg/mL抗CD3(OKT3)。

【2150】準備培養瓶。將每培養瓶19 mL的CM2/IL-2添加至經標記之T25培養瓶中，且將培養瓶置放於37℃、潮濕、5% CO_2培育箱中，同時製備細胞。

【2151】準備經輻照之PBMC。自LN_2儲存器取出待測試之PBMC批次小瓶。將此等物置於-80℃下或在解凍之前保持在乾冰上。將30 mL CM2(無IL-2補充)置放於50 mL錐形管中進行各批次解凍。用不同批次數目的待解凍PBMC標記每個試管。在使用之前將試管緊緊地加蓋且置於37℃水浴中。按需要，將50 mL錐形管放回BSC，用70% EtOH擦拭，隨後置放於通風櫥中。

【2152】自冷藏庫移出小瓶PBMC，且將其置於在37℃水浴中之浮管套管架中以解凍。進行解凍允許直至少量冰殘留在小瓶中。使用無菌移液管，將小瓶之內容物立即轉移至50 mL錐形管中之30 mL CM2中。自試管中取出約1 mL培養基以沖洗小瓶；將沖洗液返回至50 mL錐形管中。緊緊地加蓋且平緩地旋動以洗滌細胞。

【2153】在室溫下在400×g下離心5分鐘。使用1000 μL移液管吸頭將上清液抽吸且使細胞沈澱物再懸浮於1 mL溫熱CM2/IL-2中。或者，在添加培養基之前，通藉由沿空管架拖動加蓋的試管來使細胞沈澱物再懸浮。再懸浮細胞沈澱物之後，使用CM2/IL-2培養基使體積達到4 mL。記錄體積。

【2154】取出小等分試樣(例如100 μL)，使用自動細胞計數器進行細胞計數。根據特定自動化細胞計數器SOP

一式兩份地進行計數。在進行細胞計數之前，最可能有必要進行PBMC稀釋。推薦的起始稀釋度為1:10，但其取決於所用細胞計數器的類型。記錄計數。

【2155】使用CM2/IL-2培養基將PBMC之濃度調整至1.3×10^7個細胞/毫升。藉由輕輕旋動或使用血清移液管輕輕上下吸液充分混合。

【2156】設定培養瓶。將兩個經標記之T25培養瓶自組織培養培育箱放回BSC。將10 μg/mL之抗CD3/OKT3小瓶放回BSC。將1 mL 1.3×10^7個PBMC細胞懸浮液添加至各培養瓶。添加60 μL的10 μg/mL的抗CD3/OKT3至各燒瓶。將加蓋之培養瓶返回至組織培養培育箱中進行14天的無干擾生長。將抗CD3/OKT3小瓶置放於冰箱中直至下一批次需要。對各批次待評估之PBMC進行重複。

【2157】第14天，PBMC之非增殖之量測。將一式兩份T25培養瓶返回至BSC。對於各培養瓶，使用新鮮10 mL血清移液管自每一個培養瓶取出約17 mL，接著小心地向上拉起剩餘培養基以量測培養瓶中剩餘之體積。記錄體積。

【2158】藉由使用相同的血清移液管上下移液來充分混合樣本。

【2159】自各培養瓶移出200 μL樣本用於計數。使用自動細胞計數器對細胞進行計數。針對所評估之各批次PBMC重複各步驟。

【2160】結果。預計伽馬輻照的劑量足以使飼養細胞

無法複製。預期所有批次符合評估準則，展現出相比於第0天，REP培養第14天剩餘之飼養細胞之總活細胞數目減少。

【2161】接受準則。對於所測試之每個經輻照供體PBMC批次滿足以下接受準則：「無生長」，意謂第14天活細胞之總數小於REP之第0天放入培養物中的初始活細胞數目。

【2162】不符合接受準則的MNC飼養細胞批次的應急測試。在經輻照供體PBMC批次不滿足以上接受準則之情況下，採取以下步驟重新測試批次，以排除簡單的實驗者錯誤作為其失敗的原因。若該批次中存在兩個或更多個剩餘衛星小瓶，則再測試該批次。若該批次中存在一或不存在剩餘衛星小瓶，則根據上文之接受準則，該批次不合格。

【2163】為了合格，經歷應急測試之PBMC批次的對照批次及相關批次之兩個複本均達到了接受準則。在符合此準則之後，隨後釋放該批次以供使用。

實例4：製備IL-2儲備溶液

【2164】此實例描述將經純化之凍乾重組人類介白素-2溶解於適合用於其他組織培養方案(包含本申請案及實例中所描述之所有彼等方案)之儲備樣本中的過程，包含涉及使用rhIL-2之彼等過程。

【2165】程序。製備0.2%乙酸溶液(HAc)。將29 mL無

菌水轉移至50 mL錐形管中。向50 mL錐形管中添加1 mL 1N乙酸。藉由倒轉管2至3次進行充分混合。藉由使用Steriflip過濾器對HAc溶液進行滅菌。

【2166】製備含1% HSA之PBS。在150 mL無菌過濾器單元中，向96 mL PBS中添加4 mL 25% HSA儲備溶液。過濾溶液。儲存於4℃下。針對製備的每一小瓶rhIL-2，填寫表格。

【2167】製備rhIL-2儲備溶液(6×10^6 IU/mL最終濃度)。每一批次之rhIL-2不同，且所需資訊見於製造商之分析證書(COA)，諸如：1)每小瓶rhIL-2之質量(mg)、2)rhIL-2之比活性(IU/mg)及3)推薦0.2% HAc復原體積(mL)。

【2168】使用以下公式計算rhIL-2批次所需的1% HSA之體積：

$$\left(\frac{\text{小瓶質量}\,(mg)\,x\,\text{生物活性}\,(\frac{IU}{mg})}{6x10^6\,\frac{IU}{mL}}\right) - HAc\ vol\ (mL) = 1\%\ HSA\ vol\ (mL)$$

【2169】舉例而言，根據rhIL-2批次10200121(Cellgenix)的COA，1 mg小瓶之比活性為25×10^6 IU/mg。推薦於2 mL 0.2% HAc中重構rhIL-2。

$$\left(\frac{1mg\,x\,25x10^6\,\frac{IU}{mg}}{6x10^6\,\frac{IU}{mL}}\right) - 2mL = 2.167mL\ HSA$$

【2170】用酒精擦拭物擦拭IL-2小瓶之橡膠塞。使用連接於3 mL注射器之16G針頭，將推薦體積之0.2% HAc注

入小瓶中。請小心不要在拔出針頭時取開塞子。將小瓶倒轉3次並旋動直至所有粉末均溶解。小心地取下塞子並擱置於酒精擦拭物上。向小瓶中添加所計算體積之1% HSA。

【2171】rhIL-2溶液的儲存：對於短期儲存(<72小時)，將小瓶儲存在4℃。對於長期儲存(> 72小時)，將小瓶等分成較小體積，且在準備使用之前儲存於-20℃下之冷凍小瓶中。避免冷凍/解凍循環。在製備日期之後6個月過期。RhIL-2標籤包含供應商及目錄號、批號、過期日期、操作員姓名縮寫、濃度及等分體積。

實例5：冷凍保存過程

【2172】此實例描述使用CryoMed受控速率冷凍機型號7454(Thermo Scientific)對利用本文所描述之程序製備的TIL進行冷凍保存過程的方法。

【2173】所用設備如下：鋁製卡盒支架(與CS750冷凍袋相容)、用於750mL袋的冷凍盒、低壓(22 psi)液氮罐、冰箱、熱電偶感測器(帶式袋)及CryoStore CS750冷凍袋(OriGen Scientific)。

【2174】冷凍程序提供自成核以0.5℃速率達到-20℃，且以1℃/min之冷卻速率達到-80℃終點溫度。程式參數如下：步驟1 - 在4℃下等待；步驟2：1.0℃/min(樣本溫度)達至-4℃；步驟3：20.0℃/min(箱室溫度)達至-45℃；步驟4：10.0℃/min(箱室溫度)達至-10.0℃；步驟5：

0.5℃/min(箱室溫度)達至-20℃；且步驟6：1.0℃/min(樣本溫度)達至-80℃。

實例6：GEN 2及GEN 3例示性過程

【2175】此實例說明Gen 2及Gen 3過程。過程Gen 2及Gen 3 TIL通常由來源於個別患者(經由手術切除腫瘤)的自體TIL構成，且然後離體擴增。Gen 3過程之初始第一擴增步驟係在介白素-2(IL-2)及單株抗體OKT3存在下進行細胞培養，該單株抗體OKT3靶向經輻照之末梢血液單核細胞(PBMC)之支架上的T細胞共受體CD3。例示性Gen 2過程描述於美國專利第11,083,752號及第11,168,304號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中，且其中其揭示內容可經修改以用本文中別處所描述之aAPC或抗原呈現細胞(諸如視情況經基因修飾且視情況經輻照之Thp1或U937細胞)置換PBMC。

【2176】Gen 2 TIL產物之製造由兩個階段組成：1)預快速擴增(預REP)及2)快速擴增方案(REP)。在預REP期間，將切除的腫瘤切割成≤50個各尺寸為2-3 mm的碎片，將此等碎片用含血清培養基(含有補充的10% HuSAB之RPMI 1640培養基)及6,000 IU/mL介白素-2(IL-2)培養11天之時段。在第11天，收集TIL且將其引入大規模二級REP擴增中。REP由在5×10^9個經輻照之同種異體PBMC飼養細胞(或本文別處描述的aAPC或抗原呈現細胞，例如Thp1或U937，其視情況經基因修飾且視情況經輻照)的共培養物

中活化≤200×10^{6}個來自預REP的活細胞5天組成，該等飼養細胞在補充有3000 IU/mL rhIL-2的5 L體積的CM2中負載有150 μg單株抗CD3抗體(OKT3)。在第16天，將培養物體積減少90%且將細胞級分以≥1×10^{9}個活淋巴球/培養瓶分至多個G-Rex-500培養瓶中，且用CM4補足至5 L。將TIL再培育6天。REP在第22天收集，洗滌，調配且冷凍保存，隨後在-150℃下運送至臨床站點進行輸注。

【2177】Gen 3 TIL產物之製造由三個階段組成：1)初始第一擴增方案；2)快速第二擴增方案(亦稱作快速擴增階段或REP)；及3)繼代培養物分瓶。為了實現初始第一擴增TIL增殖，將切除之腫瘤切成≤120個各尺寸為2-3 mm的碎片。在初始第一次擴增之第0天，在3個100 MCS容器中之每一者中，在大約100 cm^{2}之表面區域上建立約2.5×10^{8}個負載有OKT-3的經輻照之同種異體PBMC飼養細胞的飼養細胞層。將腫瘤片段分佈在3個100 MCS容器中且在每個容器中用500 mL含血清的CM1培養基及6,000 IU/mL的介白素-2(IL-2)及15 μg OKT-3培養7天之時段。在第7天，藉由以下來起始REP：將約5×10^{8}個負載有OKT-3之同種異體輻照的PBMC飼養細胞之額外飼養細胞層併入三個100 MCS容器中之每一者中的腫瘤碎斷化培養階段中且用500 mL CM2培養基及6,000 IU/mL IL-2及30 μg OKT-3進行培養。藉由使用密閉系統將裝載有OKT3的飼養細胞流體轉移至100MCS容器中來活化同一容器中的整個初始第一擴增培養來促進REP起始。對於Gen 3，TIL規模縱向擴大或

分瓶涉及以下過程步驟：將整個細胞培養物經由密閉系統流體轉移而按比例調整至較大容器且轉移(自100 M培養瓶轉移至500 M培養瓶)且添加額外4 L CM4培養基。在第16天收集REP細胞，洗滌，調配且冷凍保存，隨後在-150℃下運送至臨床站點進行輸注。代替PBMC，可採用本文別處所描述之aAPC或抗原呈現細胞，諸如Thp1或U937細胞，其視情況經基因修飾且視情況經輻照。

【2178】總體而言，Gen 3過程係一個較短、可縮放性較高且易於修改之擴增平台，其將適應穩健製造及過程可比較性。

表 38. 例示性 Gen 2 與例示性 Gen 3 製造過程之比較。

步驟	過程（Gen 2）	過程（Gen 3）
預 REP-第 0 天	至多 50 個片段，1 G-Rex 100MCS，11 天， 在 1 L CM1 培養基 + IL-2（6000 IU/mL）中	整個腫瘤至多 120 個碎片，均勻分於至多 3 個培養瓶中。1 個培養瓶：1-60 個碎片 2 個培養瓶：61-89 個碎片 3 個培養瓶 90-120 個碎片 7 天，在 500 mL CM1 培養基 + IL-2（6000 IU/mL）中 2.5×10^8 個飼養細胞/培養瓶 15 μg OKT-3/培養瓶
REP 起始	直接進行 REP，第 11 天， <200×10^6 個 TIL （1）G-Rex 500MCS，於 5L CM2 培養基中 IL-2（3000 IU/mL） 5×10^9 個飼養細胞 150 μg OKT-3	直接進行 REP，第 7 天，所有細胞，同一 G-Rex 100MCS 添加 500 CM2 培養基 IL-2（6000 IU/mL） 5×10^8 個飼養細胞/培養瓶 30 μg OKT-3/培養瓶
TIL 增殖或規模縱向擴大	體積減少及將細胞級份分瓶於至多 5 個 G-Rex 500MCS 中 4.5L CM4 培養基 + IL-2（3000 IU/mL） ≥ 1×10^9 個 TVC/培養瓶 第 16 天分瓶	每個 G-Rex 100MCS（1L）轉移至 1 個 G-Rex 500MCS 添加 4L CM4 培養基 +IL-2（3000 IU/mL） 在第 9 天至第 11 天規模縱向擴大
收集	第 22 天收集 LOVO 自動細胞洗滌器	第 16 天收集 LOVO 自動細胞洗滌器
最終調配	冷凍保存之產物 LN_2 中的 300 IU/mL IL2-CS10，多個等分試樣	冷凍保存之產物 LN_2 中的 300 IU/mL IL-2-CS10，多個等分試樣
處理時間	**22 天**	**16 天**

【2179】在第0天，對於兩種過程，將腫瘤洗滌3次且將碎片隨機分組且分成兩個池；每個過程一個池。對於Gen 2過程，將碎片轉移至一個具有含有6,000 IU/mL rhIL-2的1 L CM1培養基的GREX 100MCS培養瓶中。對於Gen 3

過程，將碎片轉移至一個具有含有6,000IU/mL rhIL-2、15 μg OKT-3及2.5 × 10^8個飼養細胞的500 mL CM1的G-Rex 100MCS培養瓶中。根據各過程在不同的日子進行Rep起始日之TIL的接種。對於Gen 2過程，其中G-Rex 100MCS培養瓶的體積減少了90%，將收集的細胞懸浮液轉移至新的G-Rex 500MCS中，以在第11天在含有IL-2(3000 IU/mL)，外加5×10^9個飼養細胞及OKT-3(30 ng/mL)的CM2培養基中開始REP起始。根據方案，將細胞擴增且在第16天分至多個具有含有IL-2(3000 IU/mL)之CM4培養基之G-Rex 500 MCS培養瓶中。接著，根據方案，在第22天收集培養物且冷凍保存。對於Gen 3過程，REP起始發生在第7天，其中同一G-Rex 100MCS用於REP起始。簡言之，向各培養瓶中添加500 mL含有IL-2(6000 IU/mL)及5×10^8個飼養細胞及30 ug OKT-3之CM2培養基。第9-11天，將培養物之規模縱向擴大。將整個體積的G-Rex 100M(1L)轉移至G-Rex 500MCS中，且添加4L含有IL-2(3000 IU/mL)的CM4。將培養瓶培養5天。在第16天收集培養物且冷凍保存。

【2180】比較中包含三種不同的腫瘤，即兩種肺腫瘤(L4054及L4055)及一種黑素瘤(M1085T)。

【2181】對於L4054及L4055，CM1(培養基1)、CM2(培養基2)及CM4(培養基4)培養基係預先製備的且保持在4℃下。在不進行過濾之情況下製備CM1及CM2培養基，以比較在進行及不進行培養基過濾之情況下的細胞生長情況。

【2182】對於L4055腫瘤，在REP起始及規模縱向擴大時，將培養基在37℃下提前加熱至多24小時。

【2183】結果。對於所達到的總活細胞，Gen 3之結果在Gen 2結果之30%以內。在再刺激之後，Gen 3最終產物展現較高的IFN-γ產量。如藉由存在之總獨特CDR3序列所量測，Gen 3最終產物展現選殖多樣性增加。Gen 3最終產物展現較長的平均端粒長度。

【2184】Gen 2及Gen 3過程之預REP及REP擴增遵循上文所描述之程序。對於每個腫瘤，兩個池包含相同數目的碎片。由於腫瘤的大小較小，故無法達成每個培養瓶之最大碎片數目。在Gen 2過程之第11天及Gen 3過程之第7天收集總預REP細胞(TVC)且進行計數。為比較兩個預REP組，將細胞計數除以培養物中所提供之碎片之數目，以計算每個碎片之活細胞之平均值。如下表39中所指示，Gen 2過程與Gen 3過程相比始終使每片段更多細胞生長。外推計算第11天Gen 3過程預期的TVC數目，TVC數目係用預REP TVC除以7且接著乘以11來計算。

表 39.預 REP 細胞計數

腫瘤 ID	**L4054**		**L4055***		**M1085T**	
過程	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
預 REP TVC	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
碎片數	21	21	24	24	16	16
預 REP 時每個碎片之平均 TVC	6.65E+06	2.06E+06	1.12E+06	5.75E+05	7.66E+05	2.18E+05
在第 11 天預 REP 時的 Gen 3 外推值	N/A	6.79E+07	N/A	2.17E+07	N/A	5.49E+06

* L4055，未過濾的培養基。

【2185】對於 Gen 2及 Gen 3過程，根據過程條件對 TVC進行計數，且在過程之每天產生活細胞百分比。在收集時，收集第22天(Gen 2)及第16天(Gen 3)細胞且確定TVC計數。然後將TVC除以第0天提供之碎片數目，以計算每個碎片的活細胞的平均值。藉由將所收集之TVC除以REP起始TVC來計算擴增倍數。如表40中所現，比較Gen 2與Gen 3，L4054之擴增倍數類似；在L4055之情況下，Gen 2過程的擴增倍數較高。具體而言，在此情況下，在REP起始日之前使培養基升溫24。在Gen 3中亦觀測到M1085T之較高倍數擴增。外推計算第22天Gen 3過程預期的TVC數目，該TVC數目係將REP TVC除以16且接著乘以22來計算。

表 40. TIL 最終產物之總活細胞計數及倍數擴增

腫瘤 ID	**L4054**		**L4055**		**M1085T**	
過程	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
#碎片	**21**	**21**	**24**	**24**	**16**	**16**
TVC/碎片（在收集時）	3.18E+09	8.77E+08	2.30E+09	3.65E+08	7.09E+08	4.80E+08
REP 起始	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
規模縱向擴大	3.36E+09	9.35E+08	3.49E+09	8.44E+08	1.99E+09	3.25E+08
收集	6.67E+10	1.84E+10	5.52E+10	8.76E+09	1.13E+10	7.68E+09
擴增倍數收集/REP 起始	**468.4**	**425.9**	**2056.8**	**634.6**	**925.0**	**2197.2**
在第 22 天 REP 收集時的 Gen 3 外推值	**N/A**	**2.53E+10**	**N/A**	**1.20E+10**	**N/A**	**1.06E+10**

* L4055，未過濾的培養基。

【2186】在收集後，將最終TIL REP產物與存活%的釋放準則進行比較。Gen 2及Gen 3過程之所有條件皆超過70%存活性準則，且在各過程及腫瘤中係類似的。

表 41. REP（TIL 最終產物）之存活%

腫瘤 ID	**L4054**		**L4055**		**M1085T**	
過程	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
REP 起始	98.23%	97.97%	97.43%	92.03%	81.85%	68.27%
規模縱向擴大	94.00%	93.57%	90.50%	95.93%	78.55%	71.15%
收集	87.95%	89.85%	87.50%	86.70%	86.10%	87.45%

【2187】由於每個培養瓶之碎片數目低於最大所需數目，故計算各腫瘤在收集日之估計細胞計數。該估計係基於以下預期：臨床腫瘤在第0天足夠大以接種2個或3個培養瓶。

表42.將估計的細胞計數計算值外推至Gen 3過程之全標度（2個及3個培養瓶）。

腫瘤ID	L4054		L4055		M1085T	
Gen 3過程	2個培養瓶	3個培養瓶	2個培養瓶	3個培養瓶	2個培養瓶	3個培養瓶
估計收集	3.68E+10	5.52E+10	1.75E+10	2.63E+10	1.54E+10	2.30E+10

【2188】免疫表型-TIL最終產物之表型標記物比較。三種腫瘤L4054、L4055及M1085T在Gen 2及Gen 3過程中均經歷TIL擴增。在收集後，對REP TIL最終產物進行流動式細胞測量術分析，以測試純度、分化及記憶標記物。對於所有條件，TCR a/b+細胞之百分比超過90%。

【2189】與自Gen 2過程收集的TIL相比，自Gen 3過程收集之TIL顯示更高的CD8及CD28之表現。Gen 2過程顯示較高百分比之CD4+。

【2190】與自Gen 2程序收集之TIL相比，自Gen 3程序收集之TIL顯示較高的中樞記憶隔室表現。

【2191】在來自兩種腫瘤L4054及L4055之TIL中分析活化及耗竭標記物，以比較來自Gen 2及Gen 3 TIL擴增過程的最終TIL產物。Gen 2與Gen 3過程之活化及耗竭標記物具有可比性。

【2192】再刺激後的干擾素γ分泌。在收集日，即Gen 2的第22天及Gen 3的第16天，對於L4054及L4055，使用經塗佈之抗CD3盤對TIL進行再刺激隔夜。使用抗CD3、CD28及CD137珠粒對M1085T進行再刺激。在所有條件下再刺激24小時後收集上清液且冷凍上清液。同時使用相同ELISA盤對來自兩種過程之上清液評估藉由ELISA進行之

IFN-γ分析。在所分析之三種腫瘤中觀測到來自Gen 3過程之IFN-γ產量較高。

【2193】培養基中IL-2含量之量測。為了比較Gen 2及Gen 3過程之間的IL-2消耗，在REP起始、規模縱向擴大及收集日，在腫瘤L4054及L4055上收集細胞上清液。藉由來自R&D之Quantitate ELISA套組量測細胞培養物上清液中之IL-2的量。總體趨勢指示，當與Gen 2過程相比較時，Gen 3過程中保持較高的IL-2濃度。此可能歸因於Gen 3在REP起始時之IL-2濃度較高(6000 IU/mL)以及整個過程中培養基之殘留。

【2194】代謝受質及代謝物分析。量測代謝受質(諸如D-葡萄糖及L-麩醯胺酸)之含量作為整體培養基消耗之代替物。量測其互逆代謝物，諸如乳酸及氨。葡萄糖係培養基中的一種單糖，粒線體利用其以ATP的形式產生能量。當葡萄糖經氧化時，會產生乳酸(乳酸係乳酸酯)。在細胞指數生長期期間大量產生乳酸鹽。高含量之乳酸鹽會對細胞培養過程產生負面影響。

【2195】在Gen 2及Gen 3程序之REP起始、規模縱向擴大及收集日收集L4054及L4055的用過的培養基。在Gen 2之第11天、第16天及第22天且在Gen 3之第7天、第11天及第16天收集用過的培養基。在CEDEX生物分析儀上分析上清液中葡萄糖、乳酸、麩醯胺酸、GlutaMax及氨的濃度。

【2196】L-麩醯胺酸係細胞培養基調配中所需的一種

不穩定的必需胺基酸。麩醯胺酸含有胺，且此醯胺結構基團可向細胞輸送及遞送氮。當L-麩醯胺酸氧化時，細胞會產生有毒的氨副產物。為了抵消L-麩醯胺酸的降解，Gen 2及Gen 3過程之培養基添加了GlutaMax，其在水溶液中更穩定且不會自發降解。在兩個腫瘤株中，Gen 3組在過程期間顯示L-麩醯胺酸及Glutamax之減少，以及整個REP中氨之增加。在Gen 2組中，觀測到恆定的L-麩醯胺酸及GlutaMax濃度，以及氨產量略微增加。對於氨，Gen 2及Gen 3過程在收集日時係類似的，且顯示L-麩醯胺酸降解之略微差異。

【2197】依據Flow-FISH之端粒重複。使用Flow-FISH技術量測Gen 2及Gen 3過程中L4054及L4055上端粒重複的平均長度。使用來自DAKO的用於流動式細胞測量術分析的端粒PNA套組/FITC計算相對端粒長度(RTL)之測定結果。Gen 3顯示與Gen 2相當的端粒長度。

【2198】CD3分析。為了確定在每個過程中產生的細胞產物之選殖多樣性，對所收集的L4054及L4055之TIL最終產物進行取樣，且經由T細胞受體的CDR3部分之定序進行選殖多樣性的分析。

【2199】表43顯示了Gen 2及Gen 3之間在TIL收集的細胞產物上的L4054上共有獨特CDR3序列百分比的比較。Gen 3與Gen 2最終產物共有199個序列，對應於Gen 2最終產物中前80%的獨特CDR3序列中之97.07%係與Gen 3最終產物共有的。

表 43. L4054 上在 Gen 2 與 Gen 3 程序之間共有 uCDR3 序列之比較。

# uCDR3（重疊%）	所有 uCDR3		前 80%的 uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4054	8915	4355 (48.85%)	205	199 (97.07%)
Gen 3-L4054	-	18130	-	223

【2200】表44顯示了Gen 2及Gen 3之間在TIL收集的細胞產物上的L4055上共有獨特CDR3序列百分比的比較。Gen 3與Gen 2最終產物共有1833個序列，對應於Gen 2最終產物中前80%的獨特CDR3序列中之99.45%係與Gen 3最終產物共有的。

表 44. L4055 上在 Gen 2 與 Gen 3 過程之間共有 uCDR3 序列之比較。

# uCDR3（重疊%）	所有 uCDR3		前 80%的 uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4055	12996	6599 (50.77%)	1843	1833 (99.45%)
Gen 3-L4055	-	27246	-	2616

【2201】CM1及CM2培養基係未過濾情況下預先製備且保持在4℃，直至使用腫瘤L4055以用於Gen 2及Gen 3過程。

【2202】對於腫瘤L4055，在REP起始日，在37℃下提前加熱培養基24小時以用於Gen 2及Gen 3程序。

【2203】在過程中收集的上清液中未量測到LDH。

【2204】用K2 cellometer細胞計數器進行M1085T TIL細胞計數。

【2205】在腫瘤M1085T上無法獲得樣本，諸如用於代謝分析之上清液、用於活化及耗竭標記物分析、端粒長度及CD3-TCR vb分析之TIL產物。

【2206】結論此實例在功能品質屬性以及Gen 2及Gen

3過程之擴展表現型表徵及培養基消耗方面比較3個獨立供體腫瘤組織。

【2207】Gen 2及Gen 3預REP及REP擴增比較係根據所產生之總活細胞數及總成核細胞群體之存活性來評估。收集日時之TVC細胞劑量在Gen 2(22天)與Gen 3(16天)之間無可比性。Gen 3細胞劑量低於Gen 2，為在收集時所收集的總活細胞之約40%。

【2208】假設在第11天而非第7天進行預REP收集且在第22天而非第16天進行REP收集，計算Gen 3過程之外推細胞數目。在此兩種情況下，與Gen 2過程相比，Gen 3在TVC上顯示出更接近的數目，表明早期活化可對TIL生長產生總體較佳效能。

【2209】在Gen 3過程中額外(2或3個)培養瓶的外推值的情況下，假設處理的腫瘤尺寸更大，且達到如所描述之每個過程所需的最大碎片數目。觀測到，與在第22天之Gen 2過程相比，Gen 3過程在第16天收集之TVC上可達類似劑量。此觀測結果為至關重要的且指示培養物之早期活化可允許在較少處理時間中更好地表現TIL。

【2210】Gen 2及Gen 3預REP及REP擴增比較係根據所產生之總活細胞數及總成核細胞群體之存活性來評估。收集日時之TVC細胞劑量在Gen 2(22天)與Gen 3(16天)之間無可比性。Gen 3細胞劑量低於Gen 2，為在收集時所收集的總活細胞之約40%。

【2211】就表型表徵而言，與Gen 2過程相比，在Gen

3過程中之三個腫瘤上觀測到較高的CD8+及CD28+表現。此數據指示Gen 3程序相較於Gen 2具有最終TIL產物之經改良屬性。

【2212】與Gen 2過程相比，Gen 3過程顯示出略微較高的中樞記憶隔室。

【2213】Gen 2及Gen 3過程顯示出相當的活化及耗竭標記物，儘管Gen 3過程的持續時間較短。

【2214】在所分析之三個腫瘤中，Gen 3最終產物上之IFNγ(IFN gamma)產量比Gen 2高3倍。此數據表明，與Gen 2過程相比，Gen 3過程產生了功能強大且更有效的TIL產物，此可能係由於Gen 3上CD8及CD28的表現更高。表型表徵表明，與Gen 2過程相比，Gen 3在三個腫瘤上的CD8+、CD28+表現呈正向趨勢。

【2215】Gen 2與Gen 3之間的TIL最終產物之端粒長度相當。

【2216】Gen 2及Gen 3最終產物之葡萄糖及乳酸鹽含量類似，表明Gen 3過程之培養基上的營養物含量未受到影響，因為與Gen 2相比，在過程中之每一天皆未進行減量移除且過程中之整體培養基體積較小。

【2217】與Gen 2過程相比，整個Gen 3過程的處理時間減少約兩倍，此將顯著降低藉由Gen 3過程擴展的TIL產物之商品成本(COG)。

【2218】IL-2消耗表明Gen 2過程中IL-2消耗之總體趨勢，且在Gen 3程序中，由於未移除舊培養基，故IL-2較

高。

【2219】Gen 3過程顯示藉由CDR3 TCRab序列分析量測之較高選殖多樣性。

【2220】在預REP的第0天添加飼養細胞及OKT-3允許TIL的早期活化並允許使用Gen 3過程實現總體較佳生長TIL效能。

【2221】表45描述與當前Gen 2過程相比，Gen 3過程之各種實施例及結果。

表 45. 例示性 Gen 3 過程特徵。

步驟	過程 Gen 2	過程 Gen 3 實施例
預 REP-第 0 天	≤50 個碎片 1X G-Rex 100MCS 1L 培養基 IL-2（6000IU/mL） 11 天	≤240 個碎片 ≤60 個碎片/培養瓶 ≤4 個培養瓶 ≤2L 培養基（500 mL/培養瓶） IL-2（6000IU/mL） 2.5×10^8 個飼養細胞/培養瓶 15ug OKT3/培養瓶
REP 起始	新鮮 TIL 直接進行 REP 第 11 天 $\leq200\times10^6$ 個活細胞 5×10^9 個飼養細胞 G-Rex 500MCS 5L CM2 培養基 + IL-2（3000 IU/mL） 150ug OKT3	新鮮 TIL 直接進行 REP 第 7 天 活化整個培養物 5×10^8 個飼養細胞 30 ug OKT3/培養瓶 G-Rex 100MCS 500 mL 培養基 + IL-2 （6000IU/mL）
TIL 繼代培養或規模縱向擴大	≤5 G-Rex 500MCS ≤1×10 個活細胞/培養瓶 5 L/培養瓶 第 16 天	≤4 G-Rex 500MCS 將整個培養物規模縱向擴大 4L/培養瓶 第 10-11 天
收集	第 22 天收集， LOVO 自動細胞洗滌器 2 個洗滌循環	第 16 天收集 LOVO 自動細胞洗滌器 5 個洗滌循環
最終調配	冷凍保存之產物 LN_2 中的 300 IU/mL IL2-CS10，多個等分試樣	冷凍保存之產物 LN_2 中的 300IU/mL IL-2-CS10， 多個等分試樣
處理時間	22 天	16 天

實例 7：第 0 天 GEN 3 擴增過程之例示性實施例

【2222】製備腫瘤洗滌培養基。在開始之前加熱培養基。將 5 mL 建它黴素 (50 mg/mL) 添加至 500 mL HBSS 瓶中。將 5 mL 腫瘤洗滌培養基添加至 15 mL 錐形管中，用於

OKT3稀釋。儲存在室溫(RT)下。

【2223】準備飼養細胞(PBMC)袋。將飼養細胞無菌轉移至飼養細胞袋且在37℃下儲存直至使用或冷凍。若在37℃下，則對飼養細胞計數。若冷凍，則解凍且接著對飼養細胞計數。代替PBMC，可採用本文別處所描述之aAPC或抗原呈現細胞，諸如Thp1或U937細胞，其視情況經基因修飾且視情況經輻照。

【2224】飼養細胞濃度之最佳範圍在5×10^4及5×10^6個細胞/毫升之間。準備四個具有4.5mL AIM-V的錐形管。對於每次細胞計數，添加0.5 mL細胞級份。

【2225】若總活飼養細胞數≥1×10^9個細胞，則進行下一步驟以調節飼養細胞濃度。計算自第一飼養細胞袋中移出的飼養細胞體積，以便將1×10^9個細胞添加至第二飼養細胞袋中。

【2226】使用p1000微量吸液器，將900 µL的腫瘤洗滌培養基轉移至OKT3等分試樣(100 µL)中。使用注射器及無菌技術，吸取0.6 mL之OKT3且添加至第二個飼養細胞袋中。將培養基體積調整至2L之總體積。將第二個飼養細胞袋轉移至培育箱中。

【2227】OKT3調配物詳情：OKT3可以從自小瓶(1 mg/mL)中以100 µL等分試樣的原始儲備濃度進行等分及冷凍。每個1 mL小瓶約10×等分試樣。儲存於-80℃下第0天：15 µg/培養瓶，亦即30 ng/mL在500 mL-60 µL最大約1個等分試樣中。

【2228】製備腫瘤樣本。獲得6孔盤及100 mm皮氏培養皿(總共4個)。將6孔盤標記為『多餘腫瘤塊』。將四個100 mm皮氏培養皿中的每一個標記為「Wash_01'』、『Wash_02'』、『Wash_03'』、『Wash_04'』及「保持』。

【2229】將5 mL腫瘤洗滌培養基添加至標記為多餘腫瘤塊的6孔盤的所有孔中。保持腫瘤洗滌培養基可用，以進一步用於使腫瘤在分割期間保持水合。

【2230】將50 mL腫瘤洗滌培養基添加至每個100 mm的標有Wash_01、Wash_02、Wash_03及保持的皮氏培養皿中。使用標記物將每個皮氏培養皿標記為分割1至分割4。在環境溫度下在Wash_01中培育腫瘤≥3 min。在環境溫度下在Wash_02中培育腫瘤≥3 min。在環境溫度下在Wash_03中培育腫瘤≥3 min。洗滌完成後，將腫瘤移至『保持』盤，以確保組織保持水分。

【2231】當腫瘤培育正在進行中，將10 mL腫瘤運送培養基轉移至標有腫瘤運送培養基的試管中。將10 mL腫瘤運送培養基抽吸至注射器中且用5 mL腫瘤運送培養基接種各一個厭氧及好氧無菌性瓶。

【2232】在整個分割過程中將直尺放在皮氏培養皿的蓋下方。量測且記錄腫瘤長度及碎片數目。將腫瘤分割成四個中間塊或分成四組當量體積且保存每個中間塊的腫瘤結構。保持腫瘤塊水合。

【2233】將沒有被主動分割的任何中間腫瘤塊轉移至

保持盤以保持組織水分。

【2234】使用分割盤蓋下的直尺作為參考，將腫瘤分割成27 mm^3的碎片(3×3×3mm)。分割中間碎片，直至達到60個碎片。根據所產生之最終碎片之數目(每個培養瓶通常60個碎片)對最終碎片之總數目進行計數且準備G-Rex 100MCS培養瓶。

【2235】在標記為碎片管1至碎片管4的錐形管中保留有利的組織碎片。根據起始片段管之數目計算用飼養細胞懸浮液接種之G-Rex 100MCS培養瓶之數目。

【2236】自培育箱中取出飼養細胞袋且接種G-Rex 100MCS。標籤為D0(第0天)。

【2237】向G-Rex 100 MCS中的培養物中添加腫瘤碎片。在無菌條件下，擰下標有腫瘤碎片培養(D0)1的G-Rex 100MCS及標有碎片管的50 mL錐形管的蓋子。旋轉打開的碎片管1，同時輕輕抬起G-Rex 100MCS的蓋子。在旋轉的同時將帶有碎片的培養基添加至G-Rex 100MCS。記錄轉移至G-Rex 100MCS的碎片數目。

【2238】一旦碎片位於G-REX瓶之底部，抽取7 mL培養基且產生七個1 mL等分試樣，5 mL用於擴展表徵且2 mL用於無菌樣本。將用於擴展表徵之5個等分試樣(最終碎片培養上清液)儲存在-20℃下，直至需要為止。

【2239】分別為一個厭氧BacT/Alert瓶及一個好氧BacT/Alert瓶接種1 mL最終碎片培養物上清液。對採樣的每個培養瓶進行重複。

實例8：第7至8天GEN 3擴增過程之例示性實施例

【2240】準備飼養細胞袋。在冷凍時，將飼養細胞袋在37℃水浴中解凍3-5分鐘。若冷凍，則對飼養細胞進行計數。

【2241】飼養細胞濃度之最佳範圍在5×10^4及5×10^6個細胞/毫升之間。準備四個具有4.5mL AIM-V的錐形管。對於每次細胞計數，將0.5 mL細胞級份添加至新的冷凍小瓶管中。將樣本充分混合並進行細胞計數。

【2242】當活飼養細胞總數為≥2×10^9個細胞時，進行下一步以調整飼養細胞濃度。計算自第一飼養細胞袋移出的飼養細胞之體積，以便將2×10^9個細胞添加至第二飼養細胞袋中。

【2243】使用p1000微量移液管，將900 µL HBSS轉移至100 µL OKT3等分試樣中。藉由上下移液3次混合。製備兩個等分試樣。

【2244】OKT3調配物詳情：OKT3可以從自小瓶(1 mg/mL)中以100 µL等分試樣的原始儲備濃度進行等分及冷凍。每個1 mL小瓶約10×等分試樣。儲存於-80℃下第7/8天：30 µg/培養瓶，亦即60 ng/mL在500 mL-120 µl最大約2等分試樣中。

【2245】使用注射器及無菌技術，吸取0.6 mL OKT3且添加至飼養細胞袋中，確保全部添加。將培養基體積調整至2 L之總體積。用第二個OKT3等分試樣重複上述操作

且添加至飼養細胞袋中。將第二個飼養細胞袋轉移至培育箱中。

【2246】製備具有飼養細胞懸浮液之G-Rex 100MCS培養瓶。根據第0天生成的G-Rex培養瓶的數目記錄要處理的G-Rex 100MCS培養瓶的數目。自培育箱移出G-Rex培養瓶且自培育箱移出第二飼養細胞袋。

【2247】在添加飼養細胞懸浮液之前移除上清液。將一個10 mL注射器連接至G-Rex 100培養瓶且抽取5 mL培養基。創建五個1 mL等分試樣 - 5 mL用於擴展表徵，且將5個等分試樣(最終碎片培養上清液)儲存在-20℃用於擴展表徵，直至要求分析。對各G-Rex 100培養瓶進行標記及重複。

【2248】製備5-20×1 mL用於表徵的樣本，其取決於培養瓶數目：

- 5 mL = 1個培養瓶
- 10 mL = 2個培養瓶
- 15 mL = 3個培養瓶
- 20 mL = 4個培養瓶

【2249】繼續將飼養細胞接種至G-Rex 100 MCS中，且針對各G-Rex 100 MCS培養瓶重複。使用無菌轉移方法，將500 mL第二飼養細胞袋按重量(假設1 g=1 mL)藉由重力轉移至各G-Rex 100 MCS培養中且記錄轉移量。標記為第7天培養且對各G-Rex 100培養瓶進行重複。將G-Rex 100MCS培養瓶轉移至培育箱。

實例9：第10-11天GEN 3擴增過程之例示性實施例

【2250】取出第一個G-Rex 100MCS培養瓶，且使用無菌條件使用10 mL注射器取出7 mL預處理培養物上清液。創建七個1 mL等分試樣-5 mL用於擴展表徵且2 mL用於無菌樣本。

【2251】小心地混合培養瓶並使用新的10 mL注射器取出10 mL上清液，且轉移至標記為D10/11黴漿菌上清液之15 mL管中。

【2252】小心地混合培養瓶且使用新注射器根據待處理的培養瓶數量取出以下體積：

- 1個培養瓶 = 40 mL
- 2個培養瓶 = 20 mL/培養瓶
- 3個培養瓶 = 13.3 mL/培養瓶
- 4個培養瓶 = 10 mL/培養瓶

【2253】應自所有培養瓶抽吸總共40 mL，且彙集在標有『第10/11天QC樣本』之50 mL錐形管中，且儲存在培育箱中直至需要為止。進行細胞計數且分配細胞。

【2254】將用於擴展表徵之5個等分試樣(預處理培養物上清液)儲存在≤-20℃下直至需要為止。分別為一個厭氧BacT/Alert瓶及一個好氧BacT/Alert瓶接種1 mL預處理培養物上清液。

【2255】繼續將細胞懸浮液轉移至G-Rex 500MCS且針對各G-Rex 100MCS進行重複。使用無菌條件，將各G-

Rex 100MCS之內容物轉移至G-Rex 500MCS中，每次監測約100 mL液體轉移。當G-Rex 100MCS之體積減小至500 mL時停止轉移。

【2256】在轉移步驟期間，使用10 mL注射器且自G-Rex 100MCS抽吸10 mL細胞懸浮液至注射器中。根據培養中之培養瓶數目，遵循說明書進行操作。若僅有1個培養瓶：使用兩個注射器總共取出20 mL。若有2個培養瓶：每個培養瓶取出10 mL。若有3個培養瓶：每個培養瓶取出7 mL。若有4個培養瓶：每個培養瓶取出5 mL。將細胞懸浮液轉移至一個常見的50 mL錐形管中。保持在培育箱中直至細胞計數步驟及QC樣本。QC所需之細胞總數為約20×10^6個細胞：4×0.5 mL細胞計數(細胞計數起初未經稀釋)。

【2257】測定所需之細胞量如下：

- 最少10×10^6個細胞用於效力測定，諸如本文所描述之彼等測定，或用於IFN-γ或顆粒酶B測定
- 1×10^6個細胞用於黴漿菌
- 5×10^6個細胞用於針對CD3+/CD45+之流動式細胞測量術

【2258】將G-Rex 500MCS培養瓶轉移至培育箱。

【2259】製備QC樣本。本實施例中的測定至少需要15×10^8個細胞。測定包含：細胞計數及存活性；黴漿菌(1×10^6個細胞/平均存活濃度)；流動(5×10^6個細胞/平均存活濃度)；及IFN-γ測定(5×10^6個細胞-1×10^6個細胞；IFN-γ

測定需要8-10×10^6個細胞。

【2260】計算以10×10^6個細胞/毫升冷凍保存之細胞級份之體積，且計算需準備之小瓶之數目

實例10：第16至17天GEN 3擴增過程之例示性實施例

【2261】洗滌緩衝液製備(1% HAS/PlasmaLyte A)。將HSA及Plasmalyte轉移至5 L袋中以製作LOVO洗滌緩衝液。使用無菌條件，轉移125 mL總體積之25% HSA至5 L袋中，儲存在室溫下。

【2262】取出10 mL或40 mL洗滌緩衝液並轉移至『IL-2 6 × 10^4 IU/mL』管中(若預先製備IL-2，則為10 mL，或若新鮮製備IL-2，則為40 mL)。

【2263】計算添加至Plasmalyte+1% HSA中的經復原IL-2的體積：經復原IL-2的體積=(IL-2的最終濃度×最終體積)/IL-2的比活性(基於標準測定)。IL-2之最終濃度為6 × 10^4 IU/mL。最終體積為40 mL。

【2264】取出所計算之經復原之IL-2所需之初始體積之IL-2且轉移至『IL-2 6×10^4 IU/mL』管中。將來自預先製備之等分試樣的100 μL之6×10^6 IU/mL IL-2添加至含有10 mL LOVO洗滌緩衝液的標記為『IL-2 6×10^4 IU/mL』之管中。

【2265】自G-Rex 500MCS培養瓶取出約4500 mL上清液。旋轉剩餘的上清液且將細胞轉移至細胞收集池袋中。對所有G-Rex 500MCS培養瓶重複上述操作。

【2266】取出60 mL上清液且添加至上清液試管中用於品質對照測定，包含黴漿菌偵測。儲存於+2-8℃下。

【2267】樣本收集。對細胞進行計數。準備四個具有4.5 mL AIM-V之15 mL錐形管。此等錐形管可提前準備。最佳範圍=介於5×10^4與5×10^6個細胞/毫升之間。(推薦1:10稀釋度)。對於1:10稀釋度，向先前製備之4500 µL AIM V中添加500 µL CF。記錄稀釋因數。

【2268】計算預LOVO(活+死)的TC(總細胞)=

平均總細胞

濃度(預LOVO TC濃度)

(活+死)

X

源包體積

【2269】計算預LOVO(活)的TVC(總活細胞)=

平均總活細胞

濃度(預LOVO TVC)

(活)

X

LOVO源包體積

【2270】當總細胞(TC)數目> 5×10^9時，取出5×10^8個細胞進行冷凍保存，作為MDA保留樣本。5×10^8 ÷ 平均TC濃度(步驟14.44)=要取出的體積。

【2271】當總細胞(TC)數為≤5×10^9，取出4×10^6個細胞進行冷凍保存，作為MDA保留樣本。4×10^6 ÷ 平均TC

濃度=要取出的體積。

【2272】使用恰當大小之注射器自LOVO來源袋中取出所需體積。在冷凍保存步驟之前保存於培育箱中。

【2273】當總細胞數目確定時，要取出的細胞數目應允許保留150×10^9個活細胞。確認預LOVO TVC 5 × 10^8或4 × 10^6或不適用。計算要取出細胞之體積。

【2274】計算袋中剩餘的剩餘細胞總數。計算預LOVO TC(總細胞)作為[平均總細胞濃度× 剩餘體積=預LOVO剩餘TC]。

【2275】根據剩餘的細胞總數，選擇表46中的相應過程。

表46. 細胞總數。

總細胞	*滲餘物（mL）*
0＜細胞總數≤31 × 10^9	115
31 × 10^9＜細胞總數≤71 × 10^9	165
71 × 10^9＜細胞總數≤110 × 10^9	215
110 × 10^9＜細胞總數≤115 × 10^9	265

【2276】選擇與所用過程相對應的IL-2添加量。體積計算為：保留物體積×2×300 IU/mL=所需IL-2的IU。所需IL-2的IU/6×10^4 IU/mL=LOVO後之袋中添加的IL-2之體積。記錄所有添加之體積。獲得冷凍小瓶中的樣本用於進一步分析。

【2277】將細胞產物充分混合。密封所有袋以用於進一步處理，適當時包含冷凍保存。

【2278】按需要對獲得的冷凍小瓶樣本進行內毒素、

IFN-γ、無菌及其他測定。

實例11：例示性GEN 3過程(亦稱為GEN 3.1)

【2279】此實例描述關於「Gen 2與Gen 3程序之間針對TIL擴增的可比較性」的其他研究。Gen 3過程經修改以在該過程早期包含活化步驟，其目標為增加最終總活細胞(TVC)輸出以與Gen 2中之總活細胞(TVC)輸出相當(或較佳)，同時維持如先前所見之表型及功能概況。

【2280】該示例之範圍涉及經由在第0天對培養的腫瘤碎片引入活化步驟來評估TVC輸出；在兩個獨立的患者腫瘤中證明在功能及擴展表型表徵方面與Gen 3標準以及對照組的可比性；並分析培養基消耗及代謝物產生，以確認處理參數保持在生理條件下。

【2281】此實例之所有操作均使用市售供體腫瘤組織作為起始材料以全尺寸平台進行。

【2282】Gen 3實施例經修改為另一實施例且在本文中在此實例中被稱作Gen 3.1。

【2283】在一實施例中，Gen 3.1 TIL製造過程具有四個操作員干預：

1.腫瘤碎片分離及活化：在該過程之第0天，分割腫瘤且產生各自為約3×3 mm之最終碎片(總計至多240個碎片)且在1至4個G-Rex 100 MCS培養瓶中培養。各培養瓶含有至多60個碎片、500 mL CM1或DM1培養基，且補充有6,000 IU rhIL-2、15 μg OKT3及2.5×10^8個經輻照之同種異

體單核細胞(PBMC)。將培養物在37℃下培育6至8天。代替PBMC，可採用本文別處所描述之aAPC或抗原呈現細胞，諸如Thp1或U937細胞，其視情況經基因修飾且視情況經輻照。

2.TIL培養物再活化：在第7-8天，在兩種情況下，培養物經由緩慢添加補充有6,000 IU rhIL-2、30 μg OKT3及5×10^8個經輻照之同種異體單核細胞之CM2或DM1培養基進行補充。注意不要破壞培養瓶底部之現有細胞。將培養物在37℃下培育3-4天。

3.培養規模縱向擴大：在第10-11天進行。在培養規模縱向擴大期間，在兩種情況下，將G-Rex 100 MCS之全部內容物轉移至含有4 L補充有3,000 IU/mL IL-2之CM4或DM2的G-Rex 500 MCS培養瓶中。將培養瓶在37℃下培育5-6天直至收集。

4.收集/洗滌/調配：在第16-17天，將培養瓶體積減小且彙集起來。將細胞濃縮且用含有1% HSA之PlasmaLyte A pH 7.4洗滌。將洗滌之細胞懸浮液與CryoStor10以1:1的比率調配，且補充rhIL-2，達到最終濃度300 IU/mL。

【2284】藉由受控速率冷凍將DP冷凍保存且儲存在氣相液氮中。完全標準TIL培養基1、2或4(CM1、CM2、CM4)可替代CTS™OpTmizer™ T細胞無血清擴增培養基，其稱為成分確定培養基(DM1或DM2)，如上文所提及。

【2285】過程描述。在第0天，將腫瘤洗滌3次，然後碎斷成3×3×3的最終碎片。整個腫瘤經碎斷後，隨後將最

後碎片同等地隨機化且分成三個池。將一個隨機化碎片池引入各組，每個三個實驗矩陣添加相同數目之碎片。

【2286】在整個TIL擴增過程中，用標準培養基進行腫瘤L4063擴增，且用成分確定培養基(CTS OpTmizer)進行腫瘤L4064擴增。培養基之組分描述於本文中。

【2287】CM1完全培養基1：RPMI+麩醯胺酸，補充有2 mM Glutamax、10%人類AB血清、建它黴素(50 ug/mL)、2-巯基乙醇(55 μM)。補充有6000 IU/mL IL-2之最終培養基調配物。

【2288】CM2完全培養基2：50% CM1培養基+50% AIM-V培養基。補充有6000 IU/mL IL-2之最終培養基調配物。

【2289】CM4完全培養基4：補充有Glutamax(2 mM)之AIM-V。補充有3000 IU/mL IL-2之最終培養基調配物。

【2290】補充有CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑(26 mL/L)的CTS OpTmizer CTS™OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基。

【2291】DM1：補充有CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑(26 mL/L)及CTS™免疫細胞SR(3%)以及Glutamax(2 mM)之CTS™OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基。補充有6,000 IU/mL IL-2的最終調配物。

【2292】DM2：補充有CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑(26 mL/L)及CTS™免疫細胞SR(3%)以及Glutamax(2 mM)之CTS™OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基。補充有

3,000 IU/mL IL-2之最終調配物。

【2293】所使用的所有類型之培養基，亦即完全培養基(CM)及成分確定培養基(DM)，保持在4℃直至使用前一天，且在處理日之前，在培育箱中在37℃下提前升溫，持續至多24小時。

【2294】在第7天進行兩種腫瘤之TIL培養物再活化。L4063在第10天且L4064在第11天進行規模縱向擴大。收集兩種培養物且在第16天冷凍保存。

【2295】達成的結果。確定Gen 3.0及Gen 3.1過程的細胞計數及存活%。所有條件下的擴增遵循描述於此實例中之細節。

【2296】對於每個腫瘤，碎片被分成三個數量相等的池。歸因於腫瘤之較小尺寸，無法達成每個培養瓶之最大碎片數目。對於三種不同的過程，評估在各條件下的總活細胞及細胞存活性。細胞計數確定為在第7天用於再活化的TVC、在第10天(L4064)或在第11天(L4063)用於規模縱向擴大的TVC，以及在第16/17天收集的TVC。

【2297】第7天及第10/11天的細胞計數視為FIO。藉由將第16/17天收集日TVC除以第7天再活化日TVC來計算擴增倍數。為了比較三個組，將收集日之TVC除以在第0天添加至培養物中之碎片的數目，以便計算每個碎片之活細胞的平均值。

【2298】對L4063及L4064進行細胞計數及存活性測定。Gen 3.1-對於兩個腫瘤，測試過程每個碎片產生的細

胞比Gen 3.0過程要多。

【2299】總活細胞計數及倍數擴增；該過程期間之存活%。在再活化、規模縱向擴大及收集後，在所有條件下執行存活性百分比。在第16/17天收集時，將最終TIL與存活性%的放行準則進行比較。所評估之所有條件均超過70%的存活性準則，且在過程及腫瘤方面具有可比性。

【2300】免疫表型分析-TIL最終產物之表型表徵。對最終產物進行流動式細胞測量術分析，以測試純度、分化及記憶標記物。在所有條件下，TCRα/β、CD4+及CD8+細胞之群體百分比係恆定的。

【2301】進行了REP TIL的擴展表型分析。在兩個腫瘤中TIL產物顯示，與Gen 3.0相比，Gen 3.1條件下CD4+細胞的百分比較高，且在兩種條件下，與Gen 3.1條件相比，Gen 3.0中來自CD8+群體的CD28+細胞百分比較高。

【2302】自Gen 3.0及Gen 3.1過程中收集的TIL顯示出與CD4+及CD8+細胞上的CD27及CD56表現相當的表型標記物，以及CD4+閘控細胞群上相當的CD28表現。TIL最終產物上之記憶標記物比較：

【2303】對在第16天收集之TIL的冷凍樣本染色以進行分析。TIL記憶狀態在Gen 3.0與Gen 3.1過程之間係相當的。TIL最終產物上之活化及耗竭標記物比較：

【2304】活化及耗竭標記物在CD4+及CD8+細胞上閘控的Gen 3.0及Gen 3.1過程之間具有可比性。

【2305】再刺激後的干擾素γ分泌。對於L4063及

L4064，使用經塗佈之抗CD3盤對所收集之TIL進行再刺激隔夜。在所分析之兩個腫瘤中，與Gen 3.0過程相比，觀測到來自Gen 3.1過程之較高的IFN-γ產量。

【2306】培養基中IL-2含量之量測。為比較所有條件與過程之間的IL-2消耗量，在第7天再活化起始、第10天(L4064)/第11天(L4063)規模縱向擴大及第16天/第17天收集日收集細胞上清液，且冷凍。隨後將上清液解凍，然後進行分析。藉由製造商方案量測細胞培養物上清液中之IL-2之量。

【2307】總體而言，在相同培養基條件下評估的整個過程中，Gen 3及Gen 3.1過程在IL-2消耗方面具有可比性。對所收集的L4063及L4064之用過的培養基進行IL-2濃度(pg/mL)分析。

【2308】代謝物分析。對於每種條件，在L4063及L4064第7天再活化起始、第10天(L4064)/第11天(L4063)規模縱向擴大及第16天/第17天收集日自L4063及L4064收集用過之培養基上清液。在CEDEX生物分析儀上分析上清液中葡萄糖、乳酸鹽、麩醯胺酸、GlutaMax及氨之濃度。

【2309】與完全培養基(2 g/L)相比，成分確定培養基中之葡萄糖濃度較高，為4.5 g/L。總體而言，在各培養基類型中，Gen 3.0及Gen 3.1過程的葡萄糖之濃度及消耗係相當的。

【2310】對於所有測試條件，觀測到兩個腫瘤L4063及L4064之乳酸鹽增加。乳酸鹽增加在Gen 3.0與Gen 3.1條

件之間及在用於再活化擴增之兩個培養基(用於L4063之完全培養基及用於L4064之成分確定培養基)之間相當。

【2311】在L4063之情況下，標準基礎培養基含有2 mM L-麩醯胺酸且補充有2 mM GlutaMax以補償L-麩醯胺酸在培養條件下自然降解為L-麩胺酸及氨。

【2312】對於L4064腫瘤，所使用之成分確定(無血清)培養基在基礎培養基上不含L-麩醯胺酸，且僅補充有GlutaMax，達到最終濃度2 mM。GlutaMax係含L-丙胺酸及L-麩醯胺酸之二肽，在水溶液中比L-麩醯胺酸更穩定，且不會自發降解為麩胺酸及氨。實際上，二肽逐漸解離成個別胺基酸，由此維持較低但足夠濃度的L-麩醯胺酸，以保持穩健的細胞生長。

【2313】對於L4063，麩醯胺酸及GlutaMax之濃度在規模縱向擴大日略有下降，但在收集日顯示出與再活化日相比增加至類似或更接近的含量。對於L4064，在整個過程期間，麩醯胺酸及GlutaMax濃度在不同條件之間顯示以類似速率略微降低。

【2314】如所預期，L4063之氨濃度(在含有2 mM麩醯胺酸+2 mM GlutaMax的標準培養基中生長)比L4064(在含有2 mM GlutaMax的成分確定培養基中生長)更高。此外，正如預期的，在培養過程中，氨逐漸增加或積聚。在三種不同測試條件下，不存在氨濃度之差異。

【2315】依據Flow-FISH之端粒重複。使用Flow-FISH技術量測Gen 3及Gen 3.1過程中L4063及L4064上端粒重複

的平均長度。使用來自DAKO的用於流動式細胞測量術分析的端粒PNA套組/FITC計算相對端粒長度(RTL)之測定結果。進行端粒測定。將L4063及L4064之樣本中的端粒長度與對照細胞株(1301白血病)進行比較。對照細胞株係具有允許計算相對端粒長度之長穩定端粒的四倍體細胞株。在兩種腫瘤中評估之Gen 3及Gen 3.1過程顯示出相當的端粒長度。TCR Vβ組庫分析

【2316】為了確定各過程中產生之細胞產物的選殖多樣性，經由對T細胞受體之CDR3部分進行定序來確定TIL最終產物之選殖多樣性分析。

【2317】在三種條件之間比較三個參數：

- 獨特CDR3(uCDR3)之多樣性指數
- 共有uCDR3的%
- 對於uCDR3的前80%：
    - 比較共有uCDR3複本的%
    - 比較獨特純系型之出現率

【2318】對照及Gen 3.1測試，在TIL收集的細胞產物上L4063的共用獨特CDR3序列的百分比：975個序列在Gen 3及Gen 3.1測試最終產物之間共用，等效於與Gen 3.1測試最終產物共用的來自Gen 3的獨特CDR3序列的前80%的88%。

【2319】對照及Gen 3.1測試，在TIL收集的細胞產物上L4064的共用獨特CDR3序列的百分比：2163個序列在Gen 3及Gen 3.1測試最終產物之間共用，等效於與Gen 3.1

測試最終產物共用的來自Gen 3獨特CDR3序列的前80%的87%。

【2320】來自收集第16天收集的1×10^6個細胞中鑑別的獨特CD3序列的數目，用於不同的過程。基於樣本內獨特肽CDR之數目，Gen 3.1測試條件顯示相較於Gen 3.0略微較高的選殖多樣性。

【2321】夏儂熵(Shannon entropy)多樣性指數為一個可靠及常用的比較度量，因為在兩種腫瘤中，Gen 3.1條件與Gen 3過程相比展示略微更高的多樣性，表明Gen 3.1測試條件之TCR Vβ組庫之多株性高於Gen 3.0過程。

【2322】此外，Gen 3.1測試條件的TCRVβ組庫與Gen 3.0過程的相應組庫在腫瘤L4063及L4064上顯示超過87%的重疊。

【2323】在再活化日，用於Gen 3.1測試L4064的用過之培養基的IL-2濃度值低於預期值(與Gen 3.1對照及Gen 3.0條件類似)。

【2324】該低值可能歸因於移液誤差，但由於採集的樣本極少，故不可能重複該分析。

【2325】未收集樣本L4064上來自規模縱向擴大第10/11天之用過的培養基，且不包含在對上清液之IL-2濃度分析及代謝物分析中。

【2326】結論。與Gen 3.0及Gen 3.1對照相比，第0天的Gen 3.1測試條件(包含飼養細胞及OKT-3)在收集第16天顯示出細胞劑量的較高TVC。在Gen 3.1測試條件下最終產

物之TVC比Gen 3.0要高約2.5倍。

【2327】對於L4063及L4064兩個腫瘤，在第0天添加OKT-3及飼養細胞之Gen 3.1測試條件在收集時達到培養瓶的最大容量。在此等條件下，若在第0天起始最多4個培養瓶，則最終細胞劑量可在80-100×10^9個TIL之間。

【2328】在Gen 3.1測試及Gen 3.0過程之間保持所有品質屬性且具有可比性，例如表型表徵，包含最終TIL產物的純度、耗竭、活化及記憶標記物。在Gen 3.0與Gen 3.1過程之間，TIL最終產物上之端粒長度及用過的培養基上之IL-2消耗量相當。

【2329】在所分析之兩個腫瘤中，在第0天添加飼養細胞及OKT-3之Gen 3.1上的最終TIL產物的IFN-γ產生比Gen 3.0高3倍，表明Gen 3.1過程產生有效的TIL產物。

【2330】在各測試條件下未觀測到葡萄糖或乳酸鹽含量之差異。在各種培養基條件下，未觀測到Gen 3.0與Gen 3.1過程之間的麩醯胺酸及氨之差異。培養基上之較低含量之麩醯胺酸不限制細胞生長，且表明僅在培養基中添加GlutaMax就足以給予細胞增殖所需之營養。

【2331】L4063及L4064的規模縱向擴大日分別為第11天及第10天，且在過程之收集日所達到之細胞數目方面未顯示出重大差異，且在兩種情況下，在整個過程期間的代謝物消耗均具有可比性。此觀測結果表明Gen 3.0最佳化過程可在處理天數方面具有靈活性，由此促進製造時程之靈活性。

【2332】藉由CDR3 TCRab序列分析所量測，與Gen 3.0相比，在第0天添加飼養細胞及OKT-3之Gen 3.1過程顯示更高的選殖多樣性。

【2333】圖32描述了Gen 3過程(Gen 3最佳化過程)之實施例。可使用標準培養基及CTS Optimizer無血清培養基進行Gen 3最佳化過程TIL擴增。在使用CTS Optimizer無血清培養基之情況下，建議將培養基上的GlutaMax之最終濃度增加至4 mM。

【2334】在所有實驗中建立所有研究條件之可行性。在所有實驗及條件以及供體腫瘤組織之間，所有實驗均使用相同批次的關鍵原材料進行，諸如IL-2、人類血清AB、同種異體飼養細胞、OKT-3。

【2335】藉由任何研究組根據冷凍保存第22天TIL產物之先前規格滿足臨床產品放行標準的能力來確定可比較性。

實例12：利用成分確定培養基之腫瘤擴增過程。

【2336】用成分確定培養基(例如CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM，賽默飛世爾，包含例如DM1及DM2)替代CM1及CM2培養基來進行以上揭示之過程。

實例13：冷凍保存之TIL細胞療法之例示性生產

【2337】此實例描述一種根據當前組織優良操作規範(current Good Tissue Practices)及當前優良製造規範

(current Good Manufacturing Practices)在G-Rex培養瓶中進行TIL細胞療法過程的例示性cGMP製造。

表47. 過程擴增例示性計劃

估計天數（接種後）	活性	目標準則	預期容器	估計總體積（mL）
0	腫瘤分割	每G-Rex 100MCS ≤50個期望腫瘤碎片	G-Rex 100MCS 1個培養瓶	≤1000
11	REP接種	5 - 200 × 10^6個活細胞/G-Rex 500MCS	G-Rex 500MCS 1個培養瓶	≤5000
16	REP分瓶	1 × 10^9個活細胞/G-Rex 500MCS	G-Rex 500MCS≤5個培養瓶	≤25000
22	收集	可獲得細胞總數	3至4個CS-750袋	≤530

表48. 培養瓶體積

培養瓶類型	工作容積/培養瓶（mL）
G-Rex 100MCS	1000
G-Rex 500MCS	5000

【2338】第0天CM1培養基製備。在BSC中，向RPMI 1640培養基瓶添加試劑。添加以下試劑t，每瓶添加：加熱去活化人AB血清(100.0 mL)；GlutaMax(10.0 mL)；硫酸建它黴素，50 mg/mL(1.0 mL)；2-巯基乙醇(1.0 mL)

【2339】自BSC取出不必要之材料。自BSC分發培養基試劑，將硫酸建它黴素及HBSS保留在BSC以用於調配洗滌培養基製備。

【2340】解凍IL-2等分試樣。解凍一個1.1 mL IL-2等分試樣(6×10^6 IU/mL)(BR71424)，直至所有冰融化為止。記錄IL-2：批號及有效期

【2341】將IL-2儲備溶液轉移至培養基中。在BSC中，將1.0 mL IL-2儲備溶液轉移至準備之CM1第0天培養

基瓶中。添加CM1第0天培養基1瓶及IL-2(6×10^6 IU/mL)1.0 mL。

【2342】將G-Rex 100MCS傳遞至BSC中。將G-Rex 100MCS(W3013130)無菌傳遞至BSC中。

【2343】將所有完全CM1第0天培養基泵吸至G-Rex 100MCS培養瓶中。錐形組織碎片或G-Rex 100 MCS

【2344】第0天腫瘤洗滌培養基製備。在BSC中，將5.0 mL建它黴素(W3009832或W3012735)添加至1×500 mL HBSS培養基(W3013128)瓶中。每瓶添加：HBSS(500.0 mL)；硫酸建它黴素，50 mg/mL(5.0 mL)。經由1L 0.22微米過濾器單元(W1218810)製備含有建它黴素之經過濾HBSS。

【2345】第0天腫瘤處理。獲得腫瘤標本且立即轉移至2-8℃之套件中進行處理。

【2346】等分腫瘤洗滌培養基。使用8''鑷子(W3009771)進行腫瘤洗滌1。自標本瓶取出腫瘤且轉移至所製備之「洗滌1」培養皿中。隨後為腫瘤洗滌2及腫瘤洗滌3。

【2347】量測且評估腫瘤。評估是否觀測到整個腫瘤面積之> 30%壞死及/或為脂肪組織。適用時，進行清除性分割。若腫瘤較大且觀測到>30%組織外表壞死/為脂肪，則藉由使用解剖刀及/或鑷子之組合移除壞死/脂肪組織並同時保留腫瘤內部結構來進行「清除性分割」。

【2348】分割腫瘤。使用解剖刀及/或鑷子之組合，

將腫瘤標本切割成偶數個適當大小之碎片(至多6個中間碎片)。轉移中間腫瘤碎片。將腫瘤碎片分割成大小大約3×3×3 mm之碎片。儲存中間碎片以防脫水。

【2349】重複中間碎片分割。測定收集之小塊數目。若僅保留所需組織，則自「有利中間碎片」6孔盤選擇另外的有利腫瘤碎片來填充丟棄碎片，使得最多達50個碎片。

【2350】準備錐形管。將腫瘤塊轉移至50 mL錐形管中。製備BSC用於G-Rex 100 MCS。自培育箱中取出G-Rex 100 MCS。將G-Rex 100MCS培養瓶無菌傳遞至BSC中。將腫瘤碎片添加至G-Rex 100MCS培養瓶中。使小塊均勻分佈。

【2351】按以下參數使G-Rex 100 MCS保溫：使G-Rex培養瓶保溫：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。計算：保溫時間；下限=保溫時間+252小時；上限=保溫時間+276小時。

【2352】過程完成後，捨棄所有剩餘已升溫培養基並解凍IL-2之等分試樣。

【2353】第11天-培養基製備。監測培育箱。培育箱參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO2百分比：5.0±1.5% CO2。

【2354】在培育箱中使3×1000 mL RPMI 1640培養基(W3013112)瓶及3×1000 mL AIM-V(W3009501)瓶升溫≥30分鐘。自培育箱取出RPMI 1640培養基瓶。準備RPMI 1640

培養基瓶。過濾培養基。解凍3 x 1.1 mL等分的IL-2(6×10^6 IU/mL)(BR71424)。自培育箱中取出AIM-V培養基。將IL-2添加至AIM-V中。將10 L Labtainer袋及中繼泵轉移裝置無菌轉移至BSC中。

【2355】準備10 L Labtainer培養基袋。準備Baxa泵。準備10L Labtainer培養基袋。將培養基泵入10 L Labtainer。自Labtainer袋取下自動泵吸管。

【2356】混合培養基。輕緩地揉按袋子以進行混合。依據取樣計劃對培養基進行取樣。取出20.0 mL培養基並置放於50 mL錐形管中。製備細胞計數稀釋管。在BSC中，向四個的15 mL錐形管中添加4.5 mL已標記有「用於細胞計數稀釋」及批號之AIM-V培養基。將試劑自BSC轉移至2至8℃下。準備1 L轉移包。在BSC外部，將1L轉移包熔接(依據過程註釋5.11)至附接於所準備的「完全CM2第11天培養基」袋的轉移裝置上。準備飼養細胞轉移包。培育完全CM2第11天培養基。

【2357】第11天 - TIL收集。預處理表格。培育箱參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。自培育箱中取出G-Rex 100 MCS。準備300 mL轉移包。將轉移包熔接至G-Rex 100 MCS。

【2358】準備用於TIL收集之培養瓶並起始TIL收集。收集TIL。使用GatheRex泵，透過血液過濾器將細胞懸浮液轉移至300 mL轉移包中。檢查膜上之黏附細胞。

【2359】沖洗培養瓶膜。閉合G-Rex 100 MCS上的夾

子確保所有夾子閉合。熱封TIL及「上清液」轉移包。計算TIL懸浮液之體積。準備用於取樣之上清液轉移包。

【2360】抽取Bac-T樣本。在BSC中，自1L「上清液」轉移包中吸取約20.0 mL上清液，並分配至無菌的50mL錐形管中。

【2361】依據取樣計劃接種BacT。使用適當大小之注射器自準備的標記有BacT之50 mL錐形管取出1.0 mL樣本並接種於厭氧瓶。

【2362】培育TIL。在需要之前將TIL轉移包置於培育箱中。進行細胞數目計算及演算。測定進行細胞計數之細胞的活細胞濃度平均值及存活性平均值。存活性÷2。活細胞濃度÷2。確定計數之上限及下限。下限：活細胞濃度平均值×0.9。上限：活細胞濃度平均值×1.1。確認兩個計數在可接受界限內。根據進行的所有四次數目計算測定平均活細胞濃度。

【2363】調整TIL懸浮液之體積：計算取出細胞計數樣本後TIL懸浮液之經調整體積。總TIL細胞體積(A)。取出的細胞計數樣本之體積(4.0 mL)(B)經調整TIL細胞總體積C = A - B。

【2364】計算活TIL細胞總數。平均活細胞濃度：總體積；活細胞總數：C = A×B。

【2365】流動式細胞測量術之計算：若活TIL細胞總計數為$\geq 4.0\times10^{7}$，則計算獲得用於流動式細胞測量術樣本的1.0×10^{7}個細胞的體積。

【2366】流動式細胞測量術所需之活細胞總數：1.0×10^7個細胞。流動式細胞測量術所需之細胞體積：活細胞濃度除以1.0×10^7個細胞A。

【2367】計算等於2.0×10^8個活細胞的TIL懸浮液之體積。按需要，計算待取出的過量TIL細胞體積，且取出過量TIL並按需要將TIL置於培育箱中。計算按需要取出之過量TIL總量。

【2368】將以供冷凍之目標細胞濃度添加至過量TIL細胞的CS-10培養基之計算量為1.0×10^8個細胞/毫升。按需要使過量TIL離心。觀測錐形管並添加CS-10。

【2369】填充小瓶。將1.0 mL細胞懸浮液等分至適當大小之冷凍小瓶中。將剩餘體積等分至適當大小之冷凍小瓶中。如果體積≤0.5 mL，將CS10添加至小瓶中，直至體積為0.5 mL。

【2370】計算獲得用於冷凍保存之1×10^7個細胞所需之細胞體積。取出樣本以進行冷凍保存。將TIL置於培育箱中。

【2371】樣本之冷凍保存。觀測錐形管，且緩慢添加CS-10並記錄添加0.5 mL CS10後的體積。

【2372】第11天-飼養細胞。獲得飼養細胞。自LN2冷凍機獲得至少兩個不同批號的3袋飼養細胞。在準備解凍之前將細胞保存於乾冰上。準備水浴或cryotherm。在37.0±2.0℃水浴或cytotherm中解凍飼養細胞約3至5分鐘或直至冰剛好消失為止。自培育箱取出培養基。合併解凍之飼養

細胞。將飼養細胞添加至轉移包。將飼養細胞自注射器分配至轉移包中。對合併飼養細胞進行混合，且標記轉移包。

【2373】計算轉移包中之飼養細胞懸浮液之總體積。取出細胞計數樣本。針對每個樣本使用單獨的3mL注射器，使用無針注入口自飼養細胞懸浮液轉移包抽取4×1.0 mL細胞計數樣本。將每個樣本等分至經標記之冷凍小瓶中。進行細胞計數，且判定乘數選定方案且輸入乘數。測定進行細胞計數之細胞的活細胞濃度平均值及存活性平均值。確定計數之上限及下限，並確認其在界限內。

【2374】調整飼養細胞懸浮液之體積。計算取出細胞計數樣本後飼養細胞懸浮液之經調整體積。計算活飼養細胞總數。按需要獲得另外的飼養細胞。按需要解凍另外的飼養細胞。將第4飼養細胞袋置於拉鏈袋中，且在37.0±2.0℃水浴或cytotherm中解凍約3至5分鐘並合併另外的飼養細胞。量測體積。量測注射器中飼養細胞之體積並記錄在下面(B)。計算飼養細胞之新的總體積。將飼養細胞添加至轉移包。

【2375】按需要製備稀釋液，將4.5 mL AIM-V培養基添加至四個15 mL錐形管中。準備計算細胞數目。針對每個樣本使用單獨的3mL注射器，使用無針注入口自飼養細胞懸浮液轉移包取出4×1.0 mL細胞計數樣本。進行細胞數目計算及演算。根據進行的所有四次數目計算測定平均活細胞濃度。調整飼養細胞懸浮液之體積，且計算取出細胞

計數樣本後飼養細胞懸浮液之經調整體積。飼養細胞總體積減去取出之4.0 mL。計算獲得5×10^9個活飼養細胞所需的飼養細胞懸浮液之體積。計算過量飼養細胞體積。計算待取出之過量飼養細胞之體積。取出過量飼養細胞。

【2376】使用1.0 mL注射器及16G針頭，吸取0.15 mL OKT3且添加OKT3。熱封飼養細胞懸浮液轉移包。

【2377】第11天G-Rex填充及接種設定G-Rex500MCS。自培育箱取出「完全CM2第11天培養基」並將培養基泵吸至G-Rex500MCS中。將4.5L培養基泵吸至G-Rex500MCS中，填充至培養瓶上標示之線處。按需要熱封並使培養瓶保溫。將飼養細胞懸浮液轉移包熔接至G-Rex500MCS。將飼養細胞添加至G-Rex500MCS。熱封。將TIL懸浮液轉移包熔接至培養瓶。將TIL添加至G-Rex500MCS。熱封。將G-Rex500MCS在37.0±2.0℃下保溫，CO2百分比：5.0±1.5% CO2。

【2378】計算保溫範圍。進行計算以確定在第16天自培育箱取出G-Rex500MCS的適當時間。下限：保溫時間+108小時。上限：保溫時間+132小時。

【2379】第11天過量TIL冷凍保存。適用：冷凍過量TIL小瓶。確證在冷凍前已設定CRF。進行冷凍保存。將小瓶自速率受控冷凍機轉移至適當儲存件中。完成冷凍後，將小瓶自CRF轉移至適當儲存容器。將小瓶轉移至適當儲存件中。記錄在LN2中的儲存位置。

【2380】第16天培養基製備。預熱AIM-V培養基。針

對培養基袋1、2及3計算使培養基升溫的時間。確保所有袋子已升溫12至24小時之持續時間。設定用於上清液之10L Labtainer。使用魯爾連接子將流體泵轉移裝置之較大直徑端附接至10L Labtainer袋之一個凹形端口。設定用於上清液之10L Labtainer並進行標記。設定用於上清液之10L Labtainer。確保在自BSC之前取出前閉合所有夾子。注意：在TIL收集期間使用上清液袋，該TIL收集可與培養基製備並行地進行。

【2381】解凍IL-2。每袋CTS AIM-V培養基解凍5×1.1 mL IL-2等分試樣(6×10^6 IU/mL)(BR71424)，直至所有冰融化為止。等分100.0 mL GlutaMax。將IL-2添加至GlutaMax。準備用於調配之CTS AIM-V培養基袋。準備用於調配之CTS AIM V培養基袋。多級Baxa泵。準備調配培養基。將GlutaMax + IL-2泵吸至袋子中。監測之參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。使完全CM4第16天培養基升溫。製備稀釋液。

【2382】第16天REP分瓶監測培育箱參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。自培育箱取出G-Rex500MCS。準備1 L轉移包且標記為TIL懸浮液並稱重為1 L。

【2383】G-Rex500MCS之體積減少。將約4.5L培養物上清液自G-Rex500MCS轉移至10L Labtainer。

【2384】準備用於TIL收集之培養瓶。取出上清液後，閉合通向紅色管線之所有夾子。

【2385】起始TIL收集。劇烈敲擊培養瓶並旋動培養基以使細胞剝離且確保所有細胞剝落。

【2386】TIL收集。鬆開通向TIL懸浮液轉移包之所有夾子。使用GatheRex，將細胞懸浮液轉移至TIL懸浮液轉移包中。注意：確保維持邊緣傾斜，直至收集到所有細胞及培養基為止。檢查膜上之黏附細胞。沖洗培養瓶膜。閉合G-Rex500MCS上之夾子。熱封含有TIL之轉移包。熱封含有上清液之10L Labtainer。記錄含細胞懸浮液之轉移包的重量並計算懸浮液體積。準備用於樣本取出之轉移包。自細胞上清液取出測試樣本。

【2387】無菌及BacT測試取樣。自所準備的15 mL標記有BacT之錐形管取出1.0 mL樣本。取出細胞計數樣本。在BSC中，針對每個樣本使用單獨的3 mL注射器，自「TIL懸浮液」轉移包取出4×1.0 mL細胞計數樣本。

【2388】取出黴漿菌樣本。使用3 mL注射器，自TIL懸浮液轉移包取出1.0 mL並置於準備的標記有「黴漿菌稀釋劑」之15 mL錐形管中。

【2389】準備用於接種之轉移包。將TIL置於培育箱中。自BSC取出細胞懸浮液，且在需要之前置於培育箱中。進行細胞數目計算及演算。首先藉由將0.5 mL細胞懸浮液添加至所製備的4.5 mL AIM-V培養基中來對細胞計數樣本進行稀釋，得到稀釋度為1:10。測定進行細胞計數之細胞的活細胞濃度平均值及存活性平均值。確定計數之上限及下限。注意：稀釋可以根據預期的細胞濃度進行調

整。自進行的所有四次計數中確定平均活細胞濃度。調整TIL懸浮液之體積。計算取出細胞計數樣本後TIL懸浮液之經調整體積。總TIL細胞體積減去取出以用於測試之5.0 mL。

【2390】計算活TIL細胞總數。計算待接種之培養瓶之總數。注意：待接種的G-Rex500MCS培養瓶之最大數目為五。若計算的待接種培養瓶之數目超過五，則使用可用的所有體積之細胞懸浮液接種僅五個培養瓶。

【2391】計算用於繼代培養之培養瓶數目。計算除所準備之袋子以外還需要之培養基袋的數目。按計算需要每兩個G-Rex-500M培養瓶準備一個10L「CM4第16天培養基」袋。繼續接種第一GREX-500M培養瓶，同時準備另外的培養基並使其升溫。準備確定的所計算數目之其他培養基袋並使其升溫。填充G-Rex500MCS。準備泵吸培養基並將4.5L培養基泵吸至G-Rex500MCS中。熱封。重複填充。使培養瓶保溫。計算待添加至新G-Rex500MCS培養瓶中的TIL懸浮液之目標體積。若計算之培養瓶數目超過五，則使用所有體積之細胞懸浮液接種僅五個培養瓶。準備用於接種之培養瓶。自培育箱取出G-Rex500MCS。準備用於泵吸之G-Rex500MCS。除較大過濾器管線外，閉合所有夾子。自培育箱取出TIL。製備用於接種之細胞懸浮液。將「TIL懸浮液」轉移包無菌熔接(依據過程註釋5.11)至泵入口管線。將TIL懸浮液袋置於稱上。

【2392】用TIL懸浮液接種培養瓶。泵吸所計算體積

之TIL懸浮液至培養瓶中。熱封。填充剩餘培養瓶。

【2393】監測培育箱。培育箱參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。使培養瓶保溫。

【2394】測定在第22天自培育箱取出G-Rex500MCS的時間範圍。

【2395】第22天洗滌緩衝液製備。準備10L Labtainer袋。在BSC中，經由魯爾連接子將4''血漿轉移裝置附接至10L Labtainer袋。準備10L Labtainer袋。在轉移出BSC之前，閉合所有夾子。注意：為待進行收集之每兩個G-Rex500MCS培養瓶準備一個10L Labtainer袋。將Plasmalyte泵吸至3000 mL袋中，且藉由翻轉泵並操縱袋子之位置而自3000 mL Origen袋移除空氣。將25%的人類白蛋白添加至3000 mL袋中。獲得最終體積為120.0 mL的25%人類白蛋白。

【2396】製備IL-2稀釋劑。使用10 mL注射器，使用LOVO洗滌緩衝液袋上之無針注入口取出5.0 mL LOVO洗滌緩衝液。將LOVO洗滌緩衝液分配至50 mL錐形管中。

【2397】等分CRF空白袋LOVO洗滌緩衝液。使用100 mL注射器，自無針注入口吸取70.0 mL LOVO洗滌緩衝液。

【2398】解凍一份1.1 mL IL-2(6×1^{06} IU/mL)，直至所有冰融化為止。將50 µL IL-2儲備液(6×10^{6} IU/mL)添加至標記為「IL-2稀釋劑」的50 mL錐形管中。

【2399】冷凍保存準備。將5個冷凍盒置於2至8℃下，以對其進行預處理，以便用於最終產物冷凍保存。

【2400】製備細胞計數稀釋液。在BSC中，向4個單獨的15mL錐形管中添加4.5 mL已標記有批號及「用於細胞計數稀釋液」的AIM-V培養基。準備計算細胞數目。將4個冷凍小瓶標記上小瓶編號(1至4)。將小瓶保存在BSC以供使用。

【2401】第22天TIL收集。監測培育箱。培育箱參數：溫度LED顯示器：37±2.0℃，CO2百分比：5%±1.5%。自培育箱取出G-Rex500MCS培養瓶。準備TIL收集袋並進行標記。封閉額外之連接子。體積減少：將約4.5L上清液自G-Rex500MCS轉移至上清液袋。

【2402】準備用於TIL收集之培養瓶。起始TIL收集。劇烈敲擊培養瓶並旋動培養基以剝離細胞。確保所有細胞剝落。起始TIL收集。鬆開通向TIL懸浮液收集袋之所有夾子。TIL收集。使用GatheRex，將TIL懸浮液轉移至3000 mL收集袋中。檢查膜上之黏附細胞。沖洗培養瓶膜。閉合G-Rex500MCS上之夾子，並確保閉合所有夾子。將細胞懸浮液轉移至LOVO來源袋中。閉合所有夾子。熱封。取出4×1.0 mL細胞計數樣本

【2403】進行細胞數目計算。利用NC-200及過程註釋5.14進行細胞數目計算及演算。首先藉由將0.5 mL細胞懸浮液添加至所製備的4.5 mL AIM-V培養基中來對細胞計數樣本進行稀釋。得到1:10稀釋度。測定進行計數之細胞的

平均存活性、活細胞濃度及總成核細胞濃度。確定計數之上限及下限。測定進行計數之細胞的平均存活性、活細胞濃度及總成核細胞濃度。稱量LOVO來源袋。計算活TIL細胞總數。計算成核細胞總數。

【2404】製備黴漿菌稀釋劑。經由魯爾樣本口自一個上清液袋取出10.0 mL並置於15 mL錐形管中。

【2405】進行「TIL G-Rex收集」方案並測定最終產物目標體積。裝載一次性套組。取出濾液袋。輸入濾液容量。將濾液容器置於實驗台上。附接PlasmaLyte。確證已附接PlasmaLyte，且觀測到PlasmaLyte正在移動。將來源容器附接至導管，且確證已附接來源容器。確認PlasmaLyte正在移動。

【2406】最終調配及填充。目標體積/袋子計算。計算待調配於空白袋中之CS-10及LOVO洗滌緩衝液的體積。準備CRF空白袋。

【2407】計算待添加至最終產物的IL-2之體積。所需最終IL-2濃度(IU/mL)-300IU/mL。IL-2工作儲備液：6×10^4 IU/mL。組裝連接設備。將4S-4M60無菌熔接至CC2單元接頭。將CS750冷凍袋無菌熔接至製備之線束上。將CS-10袋熔接至4S-4M60之尖端上。用IL-2製備TIL。使用適當大小之注射器，自「IL-2 6×10^4」等分試樣取出所測定量之IL-2。標記經調配TIL袋。將經調配TIL袋添加至設備。添加CS10。切換注射器。將約10 mL空氣吸取至100 mL注射器中並替換設備上之60 mL注射器。添加

CS10。準備CS-750袋。分配細胞。

【2408】自最終產物袋移除空氣並獲得保留物。一旦已填充最後一個最終產物袋，即閉合所有夾子。將10 mL空氣吸取至新的100 mL注射器中且更換設備上的注射器。將保留物分配至50 mL錐形管中，且將管標記為「保留物」及批號。針對每個袋子重複空氣移除步驟。

【2409】準備用於冷凍保存之最終產物，包含目視檢查。在冷凍保存之前將冷凍袋保存於降溫包上或2至8℃下。

【2410】取出細胞計數樣本。使用適當大小之吸液管，取出2.0 mL保留物並置於15 mL錐形管中以用於細胞數目計算。進行細胞數目計算及演算。注意：僅將一個樣本稀釋至確證稀釋度足夠的適當稀釋度。將另外的樣本稀釋至適當稀釋因數並繼續進行數目計算。測定進行細胞計數之細胞的活細胞濃度平均值及存活性平均值。確定計數之上限及下限。注意：可根據預期細胞濃度調整稀釋度。測定活細胞濃度平均值及存活性平均值。確定計數之上限及下限。計算IFN-γ。熱封最終產物袋。

【2411】依據以下例示性取樣計劃標記並收集樣本。

表 49. 樣本計劃。

樣本	容器數目	每次添加之樣本體積	容器類型
*黴漿菌	1	1.0 mL	15 mL 錐形管
內毒素	2	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
革蘭氏染色	1	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
IFN-γ	1	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
流動式細胞測量術	1	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
**Bac-T 無菌性	2	1.0 mL	Bac-T 瓶
QC 保留物	4	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
衛星小瓶	10	0.5 mL	2 mL 冷凍小瓶

【2412】無菌性及BacT測試。測試取樣。在BSC中，自使用適當大小之注射器收集的保留細胞懸浮液中取出1.0 mL樣本，並接種厭氧瓶。對好氧瓶重複以上操作。

【2413】最終產物冷凍保存準備受控速率冷凍機(CRF)。確證已設定CRF。設定CRF探針。將最終產物及樣本置於CRF中。測定要達至4℃ ±1.5℃所需的時間並繼續進行CRF運行。完成CRF並儲存。完成運行後停止CRF。自CRF取出盒子及小瓶。將盒子及小瓶轉移至氣相LN2進行儲存。記錄儲存位置。

【2414】最終藥品之後處理及分析包含以下測試：(第22天)藉由流動式細胞測量術確定第22天REP之CD3+細胞；(第22天)革蘭氏染色法(GMP)；(第22天)藉由凝膠凝塊LAL測定(GMP)進行細菌內毒素測試；(第16天)BacT無菌性測定(GMP)；(第16天)藉由TD-PCR(GMP)偵測黴漿菌DNA；可接受之外觀屬性；(第22天)BacT無菌性測定

(GMP)(第22天)；(第22天)IFN-γ測定。如本文中所描述之其他效力測定亦用於分析TIL產物。

實例14：TIL效力測定前導研究

【2415】此實例描述了用於表徵臨床TIL產物批次之效力測定。此實例中所描述之方案應用於由Gen 2製造過程產生之兩個TIL樣本，其由肺腫瘤(L4224)及黑色素瘤腫瘤(M1154)製備。將TIL與經輻照之Raji細胞共培養。K562細胞及PBMC珠粒分別用作陰性及陽性對照。通用實驗方案示於圖34中。用抗CD3/抗CD28/抗4-1BB塗佈珠粒檢驗TIL之功能。亦測試添加抗CD28抗體以提供共刺激，從而判定其是否提供任何益處或沒有效果。觀測到不同的共培養持續時間。

【2416】將K562及Raji細胞解凍、計數且在6孔板或T25培養瓶中擴增10至14天。一旦細胞數目達到$>160\times10^6$，將細胞在35 Gy下輻照，等分且回冷以供後續使用。將Gen 2擴增之TIL解凍且計數，並置於培養物中用於在共培養之前恢復48至72小時。

【2417】將經輻照之Raji氏胞及經輻照之K562對照解凍，且在+/-抗CD28抗體的情況下使用以下TIL:目標比與TIL共培養：50:1、25:1、12.5:1、6.25:1、1:1、1:6.25、1:12.5及1:25。亦用塗佈有抗CD3/CD28/4-1BB之磁性珠粒刺激TIL以提供陽性活化對照。亦包含TIL及僅腫瘤細胞株對照。

【2418】在共培養開始後6至24小時收集上清液且冷凍於-80℃。在相同時間點收集細胞且染色以便表現T細胞活化之表面標記物。使用Ella平台評估經解凍上清液的細胞介素。使用Ze5儀器，藉由流動式細胞測量分析染色樣本。

【2419】使用三種不同細胞株與TIL共培養。野生型Raji(目錄號CCL-86)及K562(目錄號CCL-243)細胞可購自ATCC。Raji細胞為來源於患有伯基特氏淋巴瘤之患者的人類B淋巴母細胞瘤細胞株，且K562為骨髓性白血病細胞株。經輻照之人類PBMC係接收自聖地亞哥血庫(San Diego Blood Bank)。

【2420】在與經輻照之Raji細胞、K562細胞及PBMC細胞共培養後測試兩個Gen 2 TIL批次之活化。TIL活化經定義為與K562細胞相比，在與Raji細胞共培養時的選擇表面標記物之表現增加，表示為標記物陽性細胞百分比或平均螢光強度(MFI)。或者，可單獨培養Raji細胞、K562及TIL。若使用PBMC作為對照，則亦可使用CD3/CD28。預期TIL活化係由目標細胞與效應細胞之間的不同MHC表現引起。TIL TCR複合物與目標細胞HLA-肽複合物之同種異體相互作用稱為MHC顯性識別。Felix及Allen，《自然免疫學評論》，**2007,** *7*(12), 942-53；Matzinger及Bevan,《細胞免疫學(*Cell Immunol.*)》**1977,** *29*, 1-5；及Janeway,《主要組織相容性複合物及其在免疫生物學方面的功能：健康與疾病免疫系統》，第5版，《加蘭科學》，編，

2001，《加蘭科學》。

【2421】由於缺乏MHC I及II表現，K562細胞提供將與TIL同Raji細胞之共培養進行比較的基線活化水準。添加針對CD28之小鼠單株抗體以提供共刺激以擴增T細胞反應。將PBMC與各TIL批次一起共培養，作為MLR反應之陽性對照。

【2422】使Raji細胞在輻照之前擴增至超過160×10^6百萬，以確保有足夠細胞可用前導實驗。

【2423】腫瘤細胞樣本之解凍及培養。將K562及Raji腫瘤細胞解凍且培養10至14天以使細胞解凍後恢復，適應培養基，且在實驗之前擴增至適當數目。使200 mL培養基在37℃水浴中升溫持續15±5 min。對於腫瘤細胞樣本中之每一者，準備具有10 mL溫熱培養基的50 mL錐形管且其標有腫瘤細胞株名稱。

【2424】在37℃水浴中解凍單個細胞小瓶(每1 mL小瓶含有介於2×10^6至10×10^6之間的細胞)直至僅剩下少量冰為止。將部分解凍之小瓶轉移至BSC中。將解凍之腫瘤細胞的內容物轉移至指定錐形管。將0.5 mL溫熱培養基緩慢地逐滴添加至冷凍小瓶中，在添加培養基進行混合的同時渦旋小瓶。藉由輕輕地上下吸液5至6次來混合冷凍小瓶之內容物。將小瓶之內容物轉移至50 mL錐形管。

【2425】在室溫(RT)下以400×g將錐形管一起離心5分鐘。自每個管取出上清液，避免細胞沈澱。藉由抵靠管架輕輕刮擦管來使細胞沈澱物鬆散。每天檢查細胞並在細胞

約70-80%匯合時按1:4分離。

【2426】腫瘤細胞收集。自培養瓶或培養盤中取出懸浮液中之腫瘤細胞，並添加至具有腫瘤培養基之50 mL錐形管中。用1×PBS或腫瘤培養基沖洗培養瓶，且將內容物添加至50 mL錐形管中。

【2427】在室溫下以400×g將錐形管一起離心5分鐘。小心地自每個管中取出上清液，避免細胞沈澱。藉由抵靠管架輕輕刮擦管來使細胞沈澱物鬆散。使用1 mL移液管，將TIL再懸浮於1 mL培養基中且輕輕地上下移液以進一步使沈澱物破裂。使用血清移液管，用培養基使細胞懸浮液達到5 mL。用血清移液管上下吸取細胞懸浮液以充分混合。取出兩個200 μL細胞懸浮液等分試樣以在K2細胞計數器上進行計數。

【2428】K562及Raji細胞的輻照。一旦腫瘤細胞已擴增至大於160×10^6個細胞，則使用標準操作程序在35 Gy下輻照細胞。

【2429】輻照後，使用K2細胞計數器對細胞計數且評估存活性。然後將細胞在杜瓦瓶中以10×10^6個細胞/毫升冷凍在CryoStor CS10冷凍培養基(BioLife Solutions, Washington, 目錄號210373)中。

【2430】TIL的解凍及恢復。將200 mL TIL培養基(CM1)在37℃水浴中加熱15±5分鐘，然後放入BSC中。製備IL-2儲備溶液(6×10^6 IU/mL)。將溫熱培養基及IL-2儲備溶液轉移至BSC。藉由將10 μL IL-2儲備溶液(6×10^6

IU/mL)添加至培養基中，用300 IU/mL IL-2補充培養基。

【2431】對於各TIL批次，準備具有10 mL溫熱培養基之50 mL錐形管。為管標記上TIL數目。基於TIL產物之可用性及每個小瓶之細胞數目，解凍足夠小瓶以獲得每個TIL批次60×10^6個總細胞。

【2432】在37℃水浴中解凍冷凍之TIL小瓶，直至僅剩下小冰塊。將解凍的小瓶轉移至BSC中。將解凍之TIL小瓶及PBMC之內容物轉移至指定的錐形管。將0.5 mL溫熱培養基緩慢地逐滴添加至TIL小瓶中，在添加培養基進行混合的同時渦旋小瓶。藉由輕輕地上下吸液5至6次來混合TIL小瓶之內容物。將TIL小瓶內容物轉移至50 mL錐形管中。

【2433】在室溫下以400×g將錐形管一起離心5分鐘。小心地自每個管取出上清液，避免細胞沈澱。藉由抵靠管架輕輕刮擦管來使細胞沈澱物鬆散。使用1 mL移液管，將TIL再懸浮於1 mL TIL培養基中且輕輕地上下移液以進一步使沈澱物破裂。使用血清移液管，用培養基使細胞懸浮液達到5 mL。

【2434】用血清移液管上下吸細胞懸浮液以充分混合。取出兩個200 μL細胞懸浮液等分試樣以在K2細胞計數器上進行計數。在CM1培養基及3000 IU/mL IL-2中再懸浮TIL以達到$1.5\times10^6/3\times10^6$個細胞/毫升的濃度。使用G-Rex 10培養瓶或G-Rex 6孔盤使細胞在37℃/5% CO_2下恢復48至72小時。

【2435】準備TIL進行共培養。將200 mL培養基在37℃水浴中加熱15±5分鐘，然後放入BSC中。製備具有10 mL溫熱培養基的50 mL錐形管。自G-Rex 10培養瓶或G-Rex 6孔盤收集TIL且將細胞轉移至指定錐形管中。在室溫下以400×g將錐形管一起離心5分鐘。

【2436】小心地自每個管取出上清液，避免細胞沈澱。藉由抵靠管架輕輕刮擦管來使細胞沈澱物鬆散。使用1 mL移液管，將TIL再懸浮於1 mL培養基中且輕輕地上下移液以進一步使沈澱物破裂。使用血清移液管，用培養基使細胞懸浮液達到2 mL。用血清移液管上下吸取細胞懸浮液以充分混合。取出兩個200 μL細胞懸浮液等分試樣以在K2細胞計數器上進行計數。

【2437】按5×10^5個細胞/毫升使TIL再懸浮於TIL培養基中。解凍經輻照之K562細胞、Raji細胞及PBMC進行共培養。將200 mL培養基在37℃水浴中加熱15±5 min。將溫熱培養基轉移至BSC。對於每個細胞株，製備具有10 mL溫熱培養基的50 mL錐形管。

【2438】在37℃水浴中解凍冷凍之腫瘤細胞株，直至僅剩下小冰塊。將解凍之衛星小瓶轉移至BSC中。將解凍之腫瘤細胞株的內容物轉移至指定錐形管。將0.5 mL溫熱培養基緩慢地逐滴添加至冷凍小瓶中，在添加培養基進行混合的同時渦旋小瓶。藉由輕輕地上下吸液5至6次來混合小瓶之內容物。將細胞內容物轉移至50 mL錐形管。

【2439】在室溫(RT)下以400×g將錐形管一起離心5分

鐘。小心地自每個管取出上清液，避免細胞沈澱。藉由抵靠管架輕輕刮擦管來使細胞沈澱物鬆散。使用1 mL移液管，將TIL再懸浮於1 mL培養基中且輕輕地上下移液以進一步使沈澱物破裂。使用血清移液管，用培養基使細胞懸浮液達到5 mL。用血清移液管上下吸取細胞懸浮液以充分混合。取出兩個200 μL細胞懸浮液等分試樣以在K2細胞計數器上進行計數。將細胞以5×10^5個細胞/毫升之濃度再懸浮於腫瘤培養基中且在製備TIL後置於培育箱中以供共培養。

【2440】TIL及腫瘤細胞共培養設定。使用下文所指示之TIL:目標比及細胞數+/-抗CD28(5 μg/mL)抗體，將每個TIL批次分別與經輻照之K562細胞、Raji細胞及PBMC(3至4個供體)共培養或進行珠粒刺激。將總共1×10^6個細胞以1 mL塗鋪在48孔盤的1個孔中。前導及主要研究的實驗設定相同。每個TIL批次需要一個培養盤，另外的對照孔將在另一培養盤上運行，如圖47中可見。

- 50:1 (9.8×10^5 TIL:2×10^4個目標細胞)
- 25:1 (9.6×10^5 TIL:4×10^4個目標細胞)
- 12.5:1 (9.2×10^5 TIL:8×10^4個目標細胞)
- 6.25:1 (8.4×10^5 TIL:1.5×10^5個目標細胞)
- 1:1 (5×10^5 TIL:5×10^5個目標細胞)
- 1:6.25 (1.5×10^5 TIL:8.4×10^5個目標細胞)
- 1:12.5 (8×10^4 TIL:9.2×10^5個目標細胞)
- 1:25 (4×10^4 TIL:9.6×10^5個目標細胞)

[2441] 添加5 mg/mL抗CD28至指定孔。用TIL培養基使孔之體積達到1000 µL。對於含有αCD3/αCD28/α4-1BB珠粒的孔，根據製造商的說明洗滌、製備且添加珠粒。每個TIL批次需要約27.0×10⁶個TIL及9×10⁶個目標細胞。

[2442] 將培養盤在培育箱(5% CO_2，37℃)中保溫所選培養持續時間。對於使用兩個Gen 2研究樣本之前導研究，將培養盤將在不同時間點(亦即6、12、18及24小時)保溫。最佳共培養持續時間定義為產生最高Raji/K562活化值且應用於六個Gen 2 TIL臨床樣本之持續時間。

[2443] 收集細胞以評估活化標記物之表現。自48孔盤移出細胞懸浮液，且置於經預標記之FACS管中。將約3 mL 1×PBS添加至各管中。將試管在室溫下在400×g、高加速度及制動下旋轉5分鐘。倒出上清液。將細胞用表50中所示之例示性抗體小組染色。

表50.活化（DIG1）流動式細胞測量術抗體及染色劑。

標記物	螢光	選殖株	公司	目錄
CD3	BUV395	UCHT1	BD Bioscience	563546
Live/Dead Fix Blue	Live/Dead Fix Blue	N/A	賽默飛世爾	134962
CD8	Pacific Blue	RPA-T8	BioLegend	301033
CD4	VioGreen	M-T466	美天旎	130-106-655
CD25	BUV563	2A3	BD Bioscience	565699
PD-1	PE	EH12.2H7	BioLegend	329906
KLRG1	PE-Dazzle 594	SA231A2	BioLegend	367710
CD137/4-1BB	PerCP-Cy5.5	4B4-1	BioLegend	309814
CD69	APC-R700	FN50	BD Bioscience	565154
CD134/OX40	BUV737	Ber-ACT35	BD Bioscience	749286

[2444] 染色完成後，將樣本儲存在4℃的暗處，直

至準備在流式細胞儀上收集，並在24小時內獲取關於Ze5的數據。使用FlowJo軟體分析流動式細胞測量術數據。結果表示為活CD3+CD4+及CD3+CD8+胞之標記物陽性細胞百分比。

【2445】收集上清液及針對細胞介素之評估。自培育箱中取出培養盤。不要破壞培養盤底部之細胞。自各孔之頂部取出80 μL上清液且將80 μL樣本轉移至96孔U形盤中。使用另外兩個96孔盤重複此步驟，以產生兩個備用培養盤。用黏著密封件密封各96孔盤且將培養盤儲存於-80℃冷凍器中。結果顯示於圖35至圖38中。

【2446】隨後使用ELLA平台評估上清液之IFN-γ、CCL4、顆粒酶B、TNF-α及MIP-1β分泌。IFN-γ之結果顯示於圖39中。CCL4之結果顯示於圖40中。顆粒酶B之結果顯示於圖41中。培養盤佈局顯示於圖42中。

實例15：用於六個TIL樣本之TIL效力評估

【2447】如實例14中所描述，基於Raji細胞之共培養系統用於評估總共六個Gen 2黑色素瘤TIL批次。K562細胞用作HLA陰性對照。分析TIL樣本之活化及分泌細胞介素之表型標記物。可使用ELISA或自動ELISA方法監測多種另外的細胞介素或其他分泌蛋白。一般實驗方案顯示於圖42中。

【2448】圖43至圖54顯示對此組TIL樣本進行共培養效力測定之實驗的結果。有臨床反應的患者按照伴隨研究

中使用的準則與沒有反應的患者分開；然而，患者的反應狀態並不限制數據測定或分析的使用。該等實驗證明了該測定偵測在與Raji細胞共培養時的IFN-γ及顆粒酶B分泌的能力。在六個Gen 2 TIL樣本中，由TIL-Raji細胞共培養測定確定的IFN-γ範圍為42.1 pg/mL(301-001)至3708 pg/mL(患者008-002)。藉由TIL-Raji細胞共培養測定確定之顆粒酶B之範圍為568.3 pg/mL(301-001)至8721.33 pg/mL(008-002)。

實例16：用於二十二個TIL樣本之多功能TIL效力評估

【2449】在此實例中，使用基於Raji細胞之共培養系統結合基於K562細胞之陰性對照共培養系統來評估TIL批次之效力，展現多功能TIL效力測定之各種實施例。將K562及Raji細胞解凍、計數且在6孔盤或T25培養瓶中擴增10至14天。一旦細胞數目達到>160×10^6，將細胞在35 Gy下輻照，等分且回冷以供後續使用。將Gen 2 TIL批次解凍且計數，並置於培養物中用於在共培養之前恢復48至72小時。將經輻照之K562及Raji細胞解凍並使用三種TIL:目標比(3:1、1:1、1:3)與TIL共培養，其中TIL數目恆定(500,000個細胞)。TIL批次亦將用塗佈有抗CD3/CD28/41BB之磁珠刺激以提供視情況選用之陽性活化對照。亦將包含TIL及僅腫瘤細胞株對照。將在共培養起始後第12及18小時收集上清液。將使用ELLA自動化基於ELISA的平台評估上清液的細胞介素。兩個細胞株將與TIL共培養。

野生型Raji(目錄號CCL-86)及K562(目錄號CCL-243)細胞可購自ATCC。Raji細胞為來源於患有伯基特氏淋巴瘤之患者的人類B類淋巴母細胞瘤細胞株。K562係一種骨髓性白血病細胞株。在使用之前驗證Raji細胞之HLA類型。

【2450】除了本領域技術人員已知的通常可用的實驗室材料之外，以下材料用於該示例：RPMI 1640培養基(ATCC，VA，USA，目錄號ATCC 30-2001)；麩胺酸(Gibco, MA, USA，目錄號30050-061)；β-巰基乙醇(Gibco，MA，USA，目錄號21985-023)；用於TIL的人類AB血清(Gemini，CA，USA，目錄號100-512)；用於腫瘤細胞株的胎牛血清(ATCC, VA, USA, 目錄號ATCC 30-2020)；建它黴素(gentamycin)(Gibco，MA，USA，目錄號15750-060)；GMP重組 IL-2(CellGenix, Germany, 目錄號1020-1000)；漢克氏平衡鹽溶液，或HBSS(Gibco，MA，USA，目錄號14175-095)；CELLSTAR T25培養瓶(Fisher Scientific，MA，USA，目錄號07-000-225)；G-Rex 6、24孔盤及10個培養瓶(Wilson Wolf，MN，USA，目錄號P/N 80240M, P/N 80192M; #80040S)；用於 IFN-γ(第三代)、顆粒酶B、TNF-α(第二代)及MIP-1α(BioAgilytix，NC，USA，套組ID 127725)的ELLA人類多分析物卡匣；人類細胞介素凍乾對照(BioAgilytix，NC，USA，目錄號89077)；及CryoStor CS10冷凍培養基(BioLife Solutions，WA，USA，目錄號210373)。

【2451】除了本領域技術人員已知的通常可用的實驗

室設備之外，以下設備用於該實例：Protein Simple ELLA (BioAgilytix, NC, USA, 目錄號500-140)；K2細胞計數器(Nexcelom，MA，USA)；K2計數室(Nexcelom，MA，USA，目錄號SD100)；JUN-AIR，84R-RP型真空泵(Sony，NY，USA)；以及Steri-Cycle i160 CO2培育箱(ThermoFisher Scientific，MA，USA，目錄號51030301)。

【2452】測試二十二個隨機選擇之黑色素瘤Gen 2 TIL批次，以在與經輻照之Raji及K562細胞共培養時進行活化。

【2453】不受理論束縛，在本發明之一實施例中，TIL TCR複合物與目標細胞HLA-肽複合物之同種異體相互作用作為MHC顯性識別，如圖56中所描繪且亦如本文別處所描述。由於缺乏MHC I及II表現，預期K562細胞會提供可與TIL同Raji細胞之共培養進行比較的基線活化水準。單獨的TIL培養物亦可用作基線。

【2454】腫瘤細胞樣本的解凍及培養。將K562及Raji腫瘤細胞解凍且培養10至14天以使細胞解凍後恢復，適應培養基，且在研究之前擴增至適當數目。將培養基(200 mL)在37℃水浴中加熱15±5分鐘，然後放入BSC中。對於每個腫瘤細胞樣本，製備具有10 mL溫熱培養基的50 mL錐形管。該等管標記有腫瘤株名稱。在37℃水浴中解凍單個細胞小瓶(每1 mL小瓶含有介於2×10^6至10×10^6之間的細胞)，直至僅剩下小冰塊為止。將部分解凍之小瓶轉移至生物安全櫃中。將解凍的腫瘤細胞之內容物轉移至指定錐

形管，且將0.5 mL溫熱培養基逐滴緩慢添加至冷凍小瓶中，旋動小瓶，同時添加培養基進行混合。隨後藉由輕輕地上下吸液5至6次來混合冷凍小瓶之內容物。將小瓶之內容物轉移至50 mL錐形管。在室溫(RT)下以400×g將錐形管離心5分鐘。小心地自每個管取出上清液，避免細胞沈澱。藉由抵靠管架輕輕刮擦管來使細胞沈澱物鬆散。每天檢查細胞並在細胞約70-80%匯合時按1:4分瓶。

【2455】收集腫瘤細胞。將懸浮液中之腫瘤細胞自培養瓶或培養盤中取出且添加至具有腫瘤培養基之50 mL錐形管中。用1×PBS或腫瘤培養基沖洗培養瓶，且將內容物添加至50 mL錐形管中。在室溫下以400×g將錐形管一起離心5分鐘。小心地自每個管取出上清液，避免細胞沈澱。藉由抵靠管架輕輕刮擦管來使細胞沈澱物鬆散。使用1 mL移液管，將TIL再懸浮於1 mL培養基中且輕輕地上下移液以進一步使沈澱物破裂。使用血清移液管，用培養基使細胞懸浮液達到5 mL。用血清移液管上下吸取細胞懸浮液以充分混合。隨後取出兩個200 μL細胞懸浮液等分試樣以在K2細胞計數器上進行計數。

【2456】K562及Raji細胞的輻照。一旦Raji及K562細胞已擴增至>160×10^6個細胞，則在35 Gy下輻照細胞。輻照後，使用K2細胞計數器對細胞計數且評估存活性。將細胞以10×10^6個細胞/毫升冷凍於CryoStor CS10中。

【2457】TIL之解凍及恢復。將200 mL TIL培養基(CM1)在37℃水浴中加熱15±5分鐘，隨後置放於生物安全

櫃(BSC)中。製備IL-2儲備溶液(6×10^6 IU/mL)並將其與溫熱培養基一起轉移至BSC中。藉由將10 μL IL-2儲備溶液(6×10^6 IU/mL)添加至培養基中，為培養基補充300 IU/mL IL-2。對於每個TIL批次，製備具有用10 mL溫熱培養基的50 mL錐形管且其標記有TIL批號基於TIL產物之可用性及每個小瓶之細胞數目，解凍足夠小瓶以獲得每個TIL批次60×10^{6}個總細胞。在37℃水浴中解凍冷凍之TIL小瓶，直至僅剩下小冰塊。將解凍的小瓶轉移至BSC中。隨後將解凍之TIL小瓶及PBMC(後者用作MLR陽性對照)的內容物轉移至指定錐形管。將溫熱培養基(0.5 mL)逐滴緩慢添加至TIL小瓶中，同時旋動小瓶且添加培養基進行混合。藉由輕輕地上下吸液5至6次來混合每個TIL小瓶之內容物。將TIL小瓶內容物轉移至50 mL錐形管中。在室溫下以400×g將錐形管一起離心5分鐘。小心地自每個管取出上清液，避免細胞沈澱。藉由抵靠管架輕輕刮擦管來使細胞沈澱物鬆散。使用1 mL移液管，將TIL批次再懸浮於1 mL TIL培養基中且輕輕地上下移液以進一步使沈澱物破裂。使用血清移液管，用培養基使細胞懸浮液達到5 mL，且上下吸移懸浮液以充分混合。取出兩個200 μL細胞懸浮液等分試樣以在K2細胞計數器上進行計數。在CM1培養基及3000 IU/mL IL-2中再懸浮TIL批次以達到1.5×10^6/3×10^{6}個細胞/毫升的濃度。使用G-Rex 10培養瓶或G-Rex 6孔盤使細胞在37℃/5% CO_2下恢復48至72小時。

【2458】準備TIL進行共培養。將200 mL培養基在37

℃水浴中加熱15±5分鐘，然後放入BSC中。製備具有10 mL溫熱培養基之50 mL錐形管。自G-Rex 10培養瓶或G-Rex 6孔盤收集TIL樣本且轉移至指定錐形管中。在室溫下以400×g將錐形管一起離心5分鐘。小心地自每個管取出上清液，避免細胞沈澱。藉由抵靠管架輕輕刮擦管來使細胞沈澱物鬆散。使用1 mL移液管，將TIL批次再懸浮於1 mL培養基中且輕輕地上下移液以進一步使沈澱物破裂。使用血清移液管，用培養基使細胞懸浮液達到2 mL，且上下移液以充分混合。取出兩個200 μL細胞懸浮液等分試樣以在K2細胞計數器上進行計數。按5×10^5個細胞/毫升使TIL批次再懸浮於TIL培養基中。

【2459】解凍經輻照之K562細胞、Raji細胞及PBMC進行共培養。將200 mL培養基在37℃水浴中加熱15±5 min，然後放入BSC中。將溫熱培養基轉移至BSC。對於每個細胞株，準備具有10 mL溫熱培養基的50 mL錐形管且對其恰當標記。在37℃水浴中解凍冷凍之K562及Raji細胞，直至僅剩下小冰塊。將解凍之衛星小瓶轉移至BSC中。將解凍的K562及Raji細胞株之內容物轉移至指定錐形管，且將0.5 mL溫熱培養基逐滴緩慢添加至冷凍小瓶中，旋動小瓶，同時添加培養基進行混合。藉由輕輕地上下吸液5至6次來混合小瓶之內容物。將細胞內容物轉移至50 mL錐形管。在室溫下以400×g將錐形管一起離心5分鐘。小心地自每個管取出上清液，避免細胞沈澱。藉由抵靠管架輕輕刮擦管來使細胞沈澱物鬆散。使用1 mL移液管，將TIL再懸

浮於1 mL培養基中且輕輕地上下移液以進一步使沈澱物破裂。使用血清移液管，用培養基使細胞懸浮液達到5 mL，且用血清移液管上下移液以充分混合。取出兩個200 μL細胞懸浮液等分試樣以在K2細胞計數器上進行計數。將細胞以5×10^5個細胞/毫升之濃度再懸浮於腫瘤培養基中且在製備TIL樣本後置於培育箱中進行共培養。

【2460】TIL及腫瘤細胞共培養設定。使用以下TIL:目標比將每個TIL批次分別與經輻照之K562細胞及Raji細胞共培養：3:1(5.0×10^5: 1.67×10^5)；1: 1(5.0×10^5: 5.0×10^5)；及1:3(5.0×10^5: 1.5×10^6)。對於所有條件，將用於共培養的TIL樣本以1 mL中500,000個細胞塗鋪於48孔盤的1個孔中，一式三份，總共24個條件，如下所示。每個培養盤可以運行兩個Gen 2 TIL株。一次最多設定3個培養盤。添加1 mL培養基，每孔總共2 mL。對於含有αCD3/αCD28/α41BB珠粒之孔(用作如本文別處所描述的視情況選用之對照)，根據製造商說明洗滌、製備及添加珠粒。將培養盤保溫(5% CO_2，37℃)所選培養持續時間。培養盤佈局顯示於圖57中且一般實驗方案顯示於圖58中。

【2461】收集上清液及針對細胞介素之評估。自培育箱中取出培養盤而不破壞培養盤底部之細胞。在共培養12及18小時後，取出50 μL上清液且轉移至埃彭道夫管(Eppendorf tube)或96孔U形盤中。用另外兩個96孔盤重複此步驟，以產生兩個備用培養盤。標記培養盤以鑑別樣本。備用培養盤儲存於-80℃。將每個96孔盤用黏著密封

件來密封且儲存在4℃直至使用。使用ELLA平台評估上清液之IFN-γ及顆粒酶B。可進行另外的流動式細胞測量術實驗以評估如本文所描述之所關注標記物，諸如CD25、CD69、CD134、CD137或CD150。

【2462】結果。22個TIL樣本之結果顯示於圖59至圖97中。除了樣本007-016(進行一次，除了在1:3比率條件下使用Raji及K562細胞一式兩份地進行以外)、樣本019-006(在所有條件下一式兩份地進行)，以及022-001(在所有條件下進行一次)，所有實驗均一式三份地進行。顯示了12小時及18小時共培養期的IFN-γ及顆粒酶B結果，且顯示了18小時共培養期的TNF-α結果。結果說明了多種TIL樣本的測定具有令人驚訝的良好效能，包含當與K562陰性對照細胞株一起使用時，顯示了IFN-γ及顆粒酶的產量成倍增加，並證明共培養系統係用於經由同種異體MHC-TCR接合活化TIL，並在Gen 2製造、冷凍保存及解凍之後提供對TIL產物之效力的量度。該測定在本質上係多功能的，從而允許以高效方式選擇一種分析物或分析物組合。一般而言，當考慮IFN-γ及顆粒酶B時，18小時共培養時間點係較穩固時間點。亦可在12小時時間點評估TNF-α且若適合則利用TNF-α。在此實例中，1:3(TIL:目標)比引起最大細胞介素分泌。跨越TIL:目標比範圍之劑量反應對於TNF-α係出人意料地顯著的。TIL:目標比可以增加，例如增加至1:5、1:10或1:20。

實例17：恢復時間評估

【2463】在此實例中，研究冷凍TIL產物之解凍後的恢復時間。亦為本發明之一實施例之實驗方案描繪於圖98中。使用Gen 2過程製備之五個研究TIL批次解凍且在解凍之後恢復72、48或24小時，且使用實例16中所描述之方法在與Raji及K562細胞以1:3 TIL:目標比共培養後評估IFN-γ及顆粒酶B。圖99中顯示關於批次M1173之結果，圖100顯示關於批次M1152之結果，圖101顯示關於批次M1187之結果，圖102顯示關於批次M1179之結果，且圖103顯示關於批次M1183之結果。IFN-γ之結果概述於圖104及105中，且顆粒酶B之結果概述於圖106及107中。IFN-γ之全部三個讀數(絕對值、相對於TIL之倍數及喜愛那個對於TIL加上K562細胞之倍數)在恢復條件下係類似的。對於顆粒酶B分泌，72小時的TIL恢復導致TIL加Raji相對於TIL加K562的倍數誘導更大。在24小時恢復樣本中觀測到降低之細胞產率及存活性。

實例18：主細胞庫準備

【2464】在此實例中，主細胞庫係為Raji及K562細胞株準備的。此類主細胞庫適用於供人類使用的TIL、MIL或PBL產物的釋放及/或穩定性測試的測定，其中此類產物由諸如美國食品及藥物管理局之衛生當局調節。首先使用25個小瓶進行前導研究，然後評估其在本發明的一種或多種效力測定中的表現。然後使用500個小瓶製備Raji及

K562細胞株的主細胞庫，每小瓶含有介於5×10^6與5×10^6之間的細胞，每小瓶體積為1 mL。必要時進行細胞培養擴增。然後進行表徵及釋放，包含直接接種測試方法適用性、藉由直接接種測試無菌性、藉由DNA擴增快速偵測黴漿菌的干擾測試、藉由DNA擴增快速偵測黴漿菌、或體外外來病毒測定偵測(細胞株MRC-5、Vero及HeLa、病毒PIV-5)，以及藉由細胞色素C氧化酶次單位1進行鑑定。準備分析證書及批次記錄。Raji及K562細胞株隨後經適當限定，以適用於方法驗證及測試程序。可以類似地製備用於Ramos、U937、Thp1及Daudi細胞的主細胞庫。

實例19：使用THP1細胞之同種異體反應性共培養測定

【2465】在此實例中，展現了使用TIL與Thp1(亦稱為THP-1)目標細胞株(人類單核球性白血病細胞株)之共培養物的同種異體反應性共培養測定之實施例。不受理論束縛，TIL活化據信係在TCR對Thp1細胞表面不匹配的肽-MHC複合物(MHCp)的同種異體識別時誘導的，如圖108中所示。該測定的讀數係目標細胞的殺傷，其可以藉由報告化學發光蛋白的釋放來偵測。該測定需要使用在GMP條件下產生的目標細胞株以產生主細胞庫及工作細胞庫，例如，如本文別處所描述。目標細胞經工程改造以穩定表現用ProLabel®(ePL)標記的管家蛋白，其係一種β-gal酶片段。在與T細胞(包含TIL、MIL或PBL)共培養後，並在細胞毒性介導的膜破裂後，ePL β-gal片段被釋放至培養基

中。共培養後，添加β-gal酶的酶受體片段，形成活性β-gal酶，其水解添加的受質，產生與死目標細胞數目成比例的化學發光信號。讀數特定於目標細胞死亡並直接量測目標細胞死亡，例如，Thp1或Raji細胞的細胞死亡。前述過程係於圖109中所說明。該測定的作用機制係同種異體反應(例如，混合淋巴球反應，或MLR)，諸如T細胞識別肽-同種異體MHC複合物的能力。

【2466】使用兩種TIL解凍後條件(自冷凍的TIL批次開始)測試經基因修飾之Thp1細胞株：(1)解凍後靜置隔夜18至24小時，(2)解凍後不靜置。測試的效應物：目標(E：T)比率對於第一個條件為35:1至2.5:1，且對於第二個條件為10:1至1:10。兩種條件係使用每孔10,000個目標細胞。測試的共培養持續時間對於第一種條件係4小時、8小時、16小時及36小時，且對於第二種條件係隔夜(16至24小時)。藉由對於第一種條件的劑量及時間依賴性反應以及對於第二種情條件的劑量依賴性反應觀測到細胞毒性。圖110顯示了第一個條件的結果。顯示的數據係3次實驗的平均值。圖111顯示了第二個條件的結果。對於該兩種條件，0%細胞毒性信號對應於無效應細胞，且100%細胞毒性信號對應於完全裂解的目標細胞。

實例20：在共培養期間使用IL-2的TIL效力方法

【2467】在此實例中，相較於如上文所描述且如圖112中說明為實施例A的最初添加了3000 IU/mL IL-2的CM1

培養基，使用在共培養期間連續添加了300 IU/mL IL-2的AIM-V培養基(如在圖112中說明為實施例B、C、D及E)進一步評估本發明之效力方法。實施例B、C、D及E包含在共培養期間添加含300 IU/mL IL-2的AIM-V，其匹配最終Gen 2及Gen 3產物調配物之實施例且提供較好系統適用性。AIM-V培養基不含血清，以匹配最終的細胞擴增，並提供更好的系統適用性。在共培養期間添加IL-2會增加細胞介素濃度。解凍後立即起始共培養(亦即TIL恢復沒有靜置期)亦可能提供優勢，因為其更接近於在投予時代表TIL藥品。較長的靜置時間會促進TIL的恢復，且可能不是穩定性指示，並且亦可能掩蓋製造過程的失效。

【2468】圖113顯示了兩種不同TIL細胞株M1179及M1183在不同共培養基條件下的總活細胞計數(TVC)及存活百分比的評估結果，作為TIL細胞株解凍後靜置期的函數。在前24小時期間觀測到存活百分比降低，且在靜置>24小時(約1倍/天)的TIL中觀測到TVC及增殖增加。此等結果表明，靜置24小時後恢復的TIL可能不代表藥品的相同細胞群體。對於該兩種TIL細胞株，在解凍後觀測到輕微的減少，然後開始恢復。

【2469】在存在及不存在300 IU/mL IL-2下與Raji及K562細胞共培養之比較結果係在表51、圖114及圖115中給出。在TIL株M1179及M1183解凍後立即在AIM-V培養基中進行實驗(亦即沒有靜置期)。結果表明，添加IL-2可增強IFN-γ分泌。IFN-γ的絕對濃度值及倍數變化隨著添加IL-2

而增加。觀測到IL-2增加了使用單獨的TIL進行的對照的基線。在此等實驗中，對共培養複製品的可重複性進行了評估。獲得了11%的單個小瓶變異係數(CV)%。

表51. 使用兩種TIL細胞株在存在及不存在300 IU/mL IL-2的情況下Raji與K562共培養實驗的結果。

TIL批次	**IL-2 濃度**	**Raji共培養**				**K562共培養**				**單獨的TIL**			
		平均值	標準偏差	%CV	N	平均值	標準偏差	%CV	N	平均值	標準偏差	%CV	N
M1179	0 IU/mL	68	5	7	3	17	1	7	3	33	2	7	3
	300 IU/mL	711	22	3	3	64	3	4	3	73	6	8	3
M1183	0 IU/mL	58	2	4	3	7	0	5	3	14	1	5	3
	300 IU/mL	192	9	5	3	23	3	11	3	28	1	5	3

【2470】亦探索了不同的培養條件及靜置期，結果在表52、圖116及圖117中給出。結果顯示當AIM-V及IL-2用於共培養基中時，良好IFN-γ分泌不需要72小時恢復。

表 52. 兩種 TIL 細胞株（M1179 及 M1183）在不同培養基培養條件下的 Raji 及 K562 共培養實驗結果，包含在 TIL 解凍後不靜置（「0 小時靜置」）；在具有 300 IU/mL IL-2 之 AIM-V 培養基中靜置 72 小時後（「AIM-V+IL2 中靜置 72 小時」）；在具有 300 IU/mL IL-2 之 CM1 培養基中靜置 72 小時後（「CM1+IL2 中靜置 72 小時」）；在不含 300 IU/mL IL-2 的 CM1 培養基中靜置 72 小時後(「在 CM1-IL2 中靜置 72 小時」）。

TIL 批次	**條件**	**Raji 共培養**				**K562 共培養**				**單獨的 TIL**			
		平均值	標準偏差	%CV	N	平均值	標準偏差	%CV	N	平均值	標準偏差	%CV	N
M1179	0 小時靜置 + IL2	470	101	21	6	56	4	7	6	93	5	6	6
	在 AIM-V+IL2 中靜置 72 小時	1146	87	8	3	277	20	7	3	311	16	5	3
	在 CM1+IL2 中靜置 72 小時	854	35	4	3	18	0	2	3	187	36	20	3
	在 CM1-IL2 中靜置 72 小時	261	6	2	3	16	0	1	3	87	5	6	3
M1183	0 小時靜置 + IL2	291	151	52	5	26	10	39	5	28	5	19	5
	在 AIM-V+IL2 中靜置 72 小時	476	26	6	3	97	1	1	3	204	12	6	3
	在 CM1+IL2 中靜置 72 小時	285	6	2	3	17	1	5	3	73	5	6	3
	在 CM1-IL2 中靜置 72 小時	158	7	4	3	19	0	1	3	129	7	5	3

【2471】進行用於測定在解凍後恢復期延長時的細胞

介素分泌作用之實驗，結果概述於表53、圖118及圖119中。在此等實驗中，靜置培養基為具有3000 IU/mL IL-2之CM1，且共培養基為具有300 IU/mL IL-2之AIM-V。在與Raji細胞共培養的所有條件下偵測到絕對IFN-γ分泌。在所有靜置條件下，IFN-γ相對於單獨的TIL的倍數變化係一致的。在大於24小時之時間點觀測到單獨的TIL與使用K562陰性對照之間的倍數變化差異，且可指示細胞群體變化。

表53. 用不同的TIL解凍後恢復期的兩個TIL細胞株（M1179及M1183）進行之Raji及K562共培養實驗的結果。

TIL批次	**靜置於CM1中的時間（小時）**	**Raji共培養**				**K562共培養**				**單獨的TIL**			
		平均值（pg/mL）	標準偏差	%CV	N	平均值（pg/mL）	標準偏差	%CV	N	平均值（pg/mL）	標準偏差	%CV	N
M1179	0	559	37	7	3	59	3	5	3	92	7	8	3
	24	679	68	10	3	36	2	5	3	79	4	5	3
	48	681	58	9	3	13	0	2	3	87	6	7	3
	72	854	35	4	3	18	0	2	3	187	36	20	3
M1183	0	182	11	6	3	19	1	6	3	24	1	4	3
	24	275	30	11	3	17	1	7	3	59	7	12	3
	48	284	16	6	3	15	1	5	3	69	10	14	3
	72	285	6	2	3	17	1	5	3	73	5	6	3

【2472】進行流動式細胞測量術分析以確定72小時時段內之細胞群體特徵。在兩個實驗中進行時間研究，如表54及表55中所提供。

表 54. 實驗 1 設計。

時間點	培養基	
0 小時	AIM-V + 300 IU/mL IL-2	N/A
24 小時靜置	AIM-V + 300 IU/mL IL-2	CM1 - 無 IL-2
48 小時靜置	AIM-V + 300 IU/mL IL-2	CM1 - 無 IL-2
72 小時靜置	AIM-V + 300 IU/mL IL-2	CM1 - 無 IL-2

表 55. 實驗 2 設計。

時間點	培養基	
0 小時	AIM-V + 300 IU/mL IL-2	N/A
24 小時靜置	AIM-V + 300 IU/mL IL-2	CM1 + IL-2
48 小時靜置	AIM-V + 300 IU/mL IL-2	CM1 + IL-2
72 小時靜置	AIM-V + 300 IU/mL IL-2	CM1 + IL-2

【2473】按照此等設計，將細胞以1×10^6/mL的濃度接種在24孔盤中，並在37℃及5% CO_2下靜置。在每個特定時間點+/- 1小時收集細胞。在每個時間點進行存活性及TVC。使用具有FMO對照的限定殘餘流動測定法對細胞進行染色，並在同一天採集的情況下在BD FACSCanto流式細胞儀(美國新澤西州富蘭克林湖的BD Biosciences，Inc.)上採集該等細胞。結果概述於表56及表57中，其中對來自實驗1及實驗2的AIM-V+ IL2結果取平均值。

表 56. T 淋巴球群體在靜置條件（0 至 72 小時，IL-2 及血清）下變化。

細胞群體	淋巴球%			活%		
	AIM-V + IL2（無血清）	CM1 無 IL2（血清）	CM1 + IL2（血清）	AIM-V + IL2（無血清）	CM1 無 IL2（血清）	CM1 + IL2（血清）
M1179（0 小時）	96	N/A	N/A	94.35	N/A	N/A
M1179（24 小時）	91.00	85.80	94.80	33.80	36.00	67.10
M1179（48 小時）	92.80	85.90	93.90	56.45	38.60	89.90
M1179（72 小時）	90.20	77.70	99.20	42.40	94.90	74.70
M1183（0 小時）	92.80	N/A	N/A	92.85	N/A	N/A
M1183（24 小時）	93.30	86.90	92.00	44.85	60.30	46.30
M1183（48 小時）	92.95	83.60	98.30	74.30	69.00	79.90
M1183（72 小時）	91.75	87.70	98.60	50.80	93.50	59.40

【2474】結果顯示，在所有培養基中，72小時內總細胞群體的% CD45+及% CD3+細胞群體與IL-2一致。然而，在所有條件下靜置24小時後，活群體的CD45+及CD3+群體%百降低了約50%。結果在靜置超過24小時的培養基條件(IL-2、血清)下而異。

表57. 殘餘細胞（B細胞、NK細胞及單核球）在靜置條件（0至72小時、IL-2及血清）之間有所變化。

細胞群體	% CD45+/CD3+			% CD19+/CD20+			% CD16+/CD56+			% CD14+		
	AIM-V+IL2	CM1無IL2	CM1+IL2	AIM-V+IL2	CM1無IL2	CM1+IL2	AIM-V+IL2	CM1無IL2	CM1+IL2	AIM-V+IL2	CM1無IL2	CM1+IL2
M1179（0小時）	98.10	N/A	N/A	0.76	N/A	N/A	0.37	N/A	N/A	0.01	N/A	N/A
M1179（24小時）	95.60	89.90	93.00	1.50	1.39	1.30	0.47	0.22	0.48	0.07	0.01	0.03
M1179（48小時）	97.40	96.10	92.90	0.40	0.47	0.02	4.87	0.15	5.91	0.03	0.03	0.00
M1179（72小時）	94.60	50.30	98.40	3.56	20.30	0.05	4.75	3.55	4.03	0.03	0.73	0.00
M1183（0小時）	98.00	N/A	N/A	0.59	N/A	N/A	0.24	N/A	N/A	0.01	N/A	N/A
M1183（24小時）	96.40	92.30	89.80	1.03	0.74	0.95	0.37	0.16	0.33	0.04	0.00	0.01
M1183（48小時）	98.70	96.40	97.40	0.18	0.20	0.10	3.47	0.12	3.52	0.01	0.02	0.01
M1183（72小時）	95.20	64.10	97.40	3.26	13.20	0.14	3.59	2.30	1.76	0.04	1.28	0.01

【2475】觀測到殘餘細胞群體隨著在解凍後靜置更長時間而增加。例如，在沒有IL-2的情況下，B細胞群體在72小時靜置時增加了約20%，而NK細胞在24小時靜置後增加了4-5%。藥品之平均殘餘細胞群體通常<1%。

【2476】圖120顯示了TIL株M1179之親本活體群體之

殘餘細胞群體的流動式細胞測量術分析。圖121及122分別顯示了Raji及K562細胞株之增殖概況。

【2477】總之，在共培養中添加300 IU/mL的IL-2會增加細胞介素信號及IFN-γ在不含IL-2的培養基內的倍數變化。在靜置24小時(包含生長、分化及異質性)之後，觀測到共培養中的細胞群體在CM1培養基中發生變化，因此TIL在解凍後及開始共培養測定之前靜置72小時會使此版本測定對製造過程失效的敏感性較低，因為產物能夠在恢復期間恢復及擴增。AIM-V及IL-2更適合於Gen 2及Gen 3 TIL產物之矩陣適用性。由於有干擾，在配體結合測定中不推薦血清。

實例21：黑色素瘤TIL細胞株與RAJI、THP1、RAMOS及U937目標細胞的同種異體反應性共培養測定

【2478】本實施例探討了多種目標細胞株(包含Raji、Thp1、Ramos及U937目標細胞株)在本發明的效力測定中的使用，包含與K562細胞株陰性對照一起使用。實驗方案概述於圖123中。

【2479】共培養系統用於經由同種異體MHC-TCR接合活化TIL。評估了四種研究性黑色素瘤Gen 2 TIL產物在與Raji、Ramos、Thp1及U937細胞以及K562細胞以3:1、1:1及1:3的比率(TIL與腫瘤細胞的比率)共培養後的IFN-γ及TNF-α。結果顯示於圖124至圖129中。TNF-α及IFN-γγ之細胞介素分泌及倍數誘導在所評估的腫瘤細胞中係可變

的。一般而言，此處選擇的四種TIL細胞株對腫瘤株的反應性自最大至最小如下：Thp1、U937、Raji及Ramos。相較於與對單獨的TIL或K562細胞作出反應，四個所評估的Gen 2 TIL株中之兩者對Raji細胞作出反應而分泌相似量的IFN-γ，在U937或Thp1存在下共培養時分泌更多的細胞介素。觀測到在沒有TIL的情況下共培養時，TNF-α由Raji、Ramos、Thp1及U937細胞分泌，但不由K562細胞分泌。由腫瘤株分泌之TNF-α之量在不同株中係不同的且隨腫瘤細胞數目增加而增加，其中在此實例中在1:3下觀測到最顯著作用。

【2480】用於本發明之效力測定之例示性目標細胞株的HLA特性提供於表58中。不同程度之HLA多樣性及/或免疫原性可獲自使用此等細胞株及本領域中已知之其他適合的目標細胞株。

表58. 例示性效力測定目標細胞株之HLA-A、B及C特性。

腫瘤株	**HLA-A**	**HLA-B**	**HLA-C**
Raji	03:01, 03:01	15:10, 15:10	04:01, 03:04
Ramos	03:01, 03:01	44:03, 51:01	16:01,16:01
Daudi	66:01, 01:02	58:01, 35:01	03:02, 06:02
THP-1	02:01; 24:02	15:11, 35:01	03:03
U937	03:01, 31:01	18:01, 51:01	01:02, 07:02

【2481】圖134概述了四種所測試黑色素瘤TIL細胞株的不同目標細胞株及細胞株組合的IFN-γ效能。

【2482】圖135顯示，對於黑色素瘤TIL細胞株M1152、M1187、M1198及M1200，所測試目標細胞株及陰性對照細胞(包含組合目標細胞株)的TNF-α分泌(pg/mL)。對於相同四個黑色素瘤TIL細胞株，圖136顯示了呈

(TIL+腫瘤細胞株或組合)/單獨的TIL的倍數變化形式的TNF-α分泌，而圖137顯示了呈(TIL+腫瘤細胞株或組合)/(TIL+K562)的倍數變化形式的TNF-α分泌。

【2483】圖138顯示了對於黑色素瘤TIL細胞株M1152、M1187、M1198及M1200，所測試目標細胞株及陰性對照細胞(包含組合目標細胞株)的顆粒酶B分泌(pg/mL)。對於相同四個黑色素瘤TIL細胞株，圖139顯示了呈(TIL+腫瘤細胞株或組合)/單獨的TIL的倍數變化形式的顆粒酶B分泌，而圖140顯示了呈(TIL+腫瘤細胞株或組合)/(TIL+K562)的倍數變化形式的顆粒酶B分泌。

【2484】結果證明了不同目標細胞株及其組合在評估TIL效力中的有效性。

實例22：非小細胞肺癌TIL細胞株與RAJI、THP1、RAMOS及U937目標細胞的同種異體反應性共培養測定

【2485】使用圖141之實驗方案，使用不同目標細胞株及目標細胞株之組合評估十個非小細胞肺癌(NSCLC)TIL細胞株。

【2486】十個NSCLC TIL細胞株中有四個係自商業來源之供體腫瘤生長的研究細胞株。來自此等四個TIL細胞株之結果顯示於圖142至圖144中。

【2487】在用Iovance Biotherapeutics,Inc.贊助的抗PD-1抗體治療之後的NSCLC患者中的TIL療法的非註冊研究中，十個NSCLC TIL細胞株中之其他六個係獲自臨床試

驗參與者的臨床細胞株。來自此等六個TIL株的結果顯示於圖145至147中。

【2488】關於IFN-γ分泌的臨床NSCLC結果的概述係呈相對於單獨TIL的倍數形式顯示於圖148中，並且關於IFN-γ分泌的臨床NSCLC結果的概述係呈相對於與K562陰性對照細胞共培養的TIL的倍數形式顯示於圖149中。

【2489】19個批次(包含此實例之十個NSCLC批次及九個黑色素瘤批次)之概述係呈相對於單獨TIL的倍數形式顯示於圖150中，且IFN-γ分泌的概述係呈相對於與K562陰性對照細胞共培養的TIL的倍數形式顯示於圖151中。

實例23：經輻照目標細胞與未經輻照目標細胞的比較

【2490】藉由觀測增殖(總活細胞)、使用實例20中所描述的使用300 IU/mL IL-2及AIM-V培養基之共培養方法的IFN-γ分泌及流式細胞測量術特性(包含依據散射及細胞表面標記物以及針對細胞凋亡的磷脂結合蛋白V染色的形態)來比較經輻照之Raji及K562細胞與未經輻照之Raji及K562細胞。使用X-Rad 160輻照器(美國康涅狄格州北布蘭福德的Precision X-ray)在30 cm處5000 rads及420 rads/min的條件下進行輻照。

【2491】圖152顯示在24小時的共培養時間內，Raji及K562細胞之輻照對增殖的影響通常最小。在24小時培養中，經輻照之Raji細胞在各濃度下的增殖增加了18至27%。在24小時培養中，未經輻照的Raji細胞在不同濃度

下的增殖增加了2%至14%。在24小時培養中，經輻照之K562細胞在各濃度下具有15%減少至8%增加的變化在24小時培養中，未經輻照之K562細胞在各濃度下的增殖增加了14至34%。

【2492】圖153顯示了，使用所測試之兩個子宮頸癌TIL批次，發現相比用未經輻照之Raji細胞刺激，在用未經輻照之Raji細胞刺激時TIL細胞株會分泌更大濃度的IFN-γ。

【2493】表59及圖154中之流動式細胞測量術結果表明，觀測到輻照會減少兩種監測之細胞表面標記物以及HLA I類表現。

表59.輻照對細胞表面標記物及HLA I類表現之影響。

條件	活	CD33+（活）	CD33+ (MFI)	CD19+（活）	CD19+ (MFI)	HLA-ABC+（或）	HLA-ABC+ (MFI)
K562	83.4 %	82.4 %	1191.0	0.54 %	71.7	0.90 %	560
Irr.K562	97.3 %	59.4 %	541.0	0.51 %	68.7	0.048 %	485
Raji	74.9 %	0.51 %	48.2	97.0 %	6267.0	96.0 %	12943
Irr.Raji	97.4 %	0.17 %	61.2	99.8 %	4727.0	98.4 %	9499

【2494】結果表明，未經輻照之Raji及K562細胞之增殖在24小時(適用於進行效力測定的共培養期)內可以忽略不計。24小時內未經輻照之Raji細胞之增殖(<14%)小於經輻照Raji細胞之增殖(<27%)，且因此輻照在24小時培養期內對Raji細胞及此處使用之TIL細胞株之增加的增殖具有極小影響。相較於未經照射，IFN-γ分泌在照射條件下減少，其通常與經照射之Raji細胞上HLA-ABC之下調相關(以MFI計為-26%)。藉由流動式細胞測量術，使用正向散

射觀測對比側向散射觀測，亦觀測到輻照會誘導K562及Raji兩者之形態變化。最後，與未輻照條件相比，使用Raji細胞之輻照條件增加了晚期細胞凋亡且其在K562之所有細胞凋亡階段中均有所增加，如藉由磷脂結合蛋白V染色所觀測。

【2495】總體而言，結果表明，未經輻照之Raji及K562細胞可用於本發明之效力測定，或者，僅Raji(或其他目標細胞)可經輻照，或僅K562細胞可經輻照。

實例24：共培養條件之評估

【2496】使用實例20中所描述的利用300 IU/mL IL-2及AIM-V培養基的共培養方法，其中使用未經輻照之Raji目標細胞、以1×10^6至2×10^6個TIL/孔範圍內之密度接種之TIL及特定於1:1及3:1比率之中點的濃度範圍之Raji細胞(500,000個細胞)。一式三份地評估18、24及30小時之三個共培養期的IFN-γ釋放。結果在表60及圖155中給出。

表60.輻照對細胞表面標記物及HLA I類表現之影響。以「M」、「L」及「C」開頭的TIL批次分別代表黑色素瘤、NSCLC及子宮頸TIL細胞株。

TIL批次	共培養期	平均值	標準偏差	%CV	倍數變化TIL	(pg/mL)/h	速率增加(pg/mL)/6 hr
M40231	18 h	199.7	6.5	3.3	5.1	11.1	-
M40231	24 h	252.0	4.4	1.7	6.0	10.5	8.7
M40231	30 h	309.3	7.1	2.3	7.0	10.3	9.6
M1802	18 h	298.0	32.4	10.9	2.7	16.6	-
M1802	24 h	368.3	4.5	1.2	3.4	15.3	11.7
M1802	30 h	454.0	45.7	10.1	3.8	15.1	14.3
M1172a	18 h	508.7	15.5	3.1	4.0	28.3	-
M1172a	24 h	820.0	44.6	5.4	3.4	34.2	51.9
M1172a	30 h	1128.3	58.5	5.2	2.4	37.6	51.4
L4262	18 h	1347.0	67.0	5.0	2.4	74.8	-
L4262	24 h	1581.3	49.5	3.1	2.4	65.9	39.1
L4262	30 h	1875.3	61.6	3.3	2.4	62.5	49.0
C172071358-H	18 h	506.7	67.2	13.3	6.4	28.2	-
C172071358-H	24 h	518.0	42.9	8.3	4.7	21.6	1.9
C172071358-H	30 h	650.0	34.4	5.3	4.4	21.7	22.0
C170971358-J	18 h	173.3	3.8	2.2	3.6	9.6	-
C170971358-J	24 h	248.3	5.9	2.4	4.9	10.3	12.5
C170971358-J	30 h	307.0	14.7	4.8	4.8	10.2	9.8

【2497】結果顯示，在30小時時無信號飽和跡象，且相對於TIL值之倍數變化對時間點相對不敏感。來自單獨的TIL之IFN-γ信號在30小時顯示出最小的增加。

實例25：腫瘤目標細胞株之比較

【2498】使用通常在實例20中所描述的利用300 IU/mL IL-2及AIM-V培養基的共培養方法，在此實例中進行腫瘤目標細胞株之另外比較。使用未經輻照之Thp1、U937及Raji細胞株。基於本文所提供之教示內容，可使用其他方法、腫瘤目標細胞株及陰性對照進行類似比較。圖156顯示用於研究十二個黑色素瘤TIL細胞株的實驗設計。

表61概述用於每個實驗之TIL及目標細胞之數目。

表61.用於實驗設計的每孔TIL及目標細胞之數目及每孔總活細胞(TVC)。

	3:1比率		1:1比率		1:3比率	
TVC/孔	**TIL**	**目標**	**TIL**	**目標**	**TIL**	**目標**
5×10^5	3.75×10^5	1.25×10^5	2.5×10^5	2.5×10^5	1.25×10^5	3.75×10^5
1.0×10^6	7.50×10^5	2.50×10^5	5.0×10^5	5.0×10^5	2.50×10^5	7.50×10^5
2.0×10^6	1.5×10^6	5.0×10^5	1.0×10^6	1.0×10^6	5.0×10^5	1.5×10^6
3.0×10^6	2.25×10^6	7.50×10^5	1.50×10^6	1.50×10^6	7.50×10^5	2.25×10^6

【2499】圖157中概述關於1.0×10^6個TVC/孔的結果(相對於單獨的TIL作為對照)，圖158中概述關於2.0×10^6個TVC/孔的結果(相對於單獨的TIL作為對照)，圖159中概述關於1.0×10^6個TVC/孔的結果(相對於K562細胞作為對照)，並且圖160中概述關於2.0×10^6個TVC/孔的結果(相對於K562細胞作為對照)。一般而言，使每孔總TIL增加會增強IFN-γ信號。對於所測試之大部分TIL批次，3:1比率展現所測試之所有三種腫瘤細胞株之IFN-γ的最大信號。發現此研究中之最佳接種密度為約2×10^6(TVC/孔或每孔總細胞)。一般而言，Thp1出人意料地需要較少的TIL細胞及較低的TVC來誘導穩定的IFN-γ信號。

【2500】亦進行野生型及經基因修飾之Thp1(亦稱為THP-1)細胞之比較。經基因修飾之Thp1細胞可用於殺傷測定，如實例19中所描述。執行圖161中所示之實驗程序。關於七個TIL細胞株的以pg/mL為單位之IFN-γ之絕對值的結果顯示於圖162中，且關於相對於單獨的TIL之倍數變化的結果顯示於圖163中。結果表明，野生型及經基因修飾之Thp1使用共培養方法表現相似，並且任一者可以用於分析TIL樣本，其取決於是否要量測IFN-γ或其他細胞介素，

或者是否要量測藉由發光進行的細胞殺滅(使用如本文別處描述的或本領域已知的基因修飾)。

實例26：使用HLA阻斷抗體之陰性對照

【2501】代替使用K562細胞、目標細胞的基因剔除或其他基於細胞的陰性對照或除了使用K562細胞、目標細胞的基因剔除或其他基於細胞的陰性對照以外，本發明的共培養測定亦可以藉由使用HLA阻斷抗體的陰性對照來補充或支援。此實例演示了HLA阻斷抗體之使用。不受理論束縛，所提出之本發明測定中的HLA阻斷描繪於圖164中。

【2502】此實例中所用的HLA-I阻斷抗體係獲自Biolegend, Inc.(美國加利福尼亞州聖地亞哥)的選殖株W6/32(抗HLA-ABC)並且呈超葉純化型式。此實例中所用的HLA-II阻斷抗體係獲自BD Biosciences, Inc.(美國新澤西州富蘭克林湖)的選殖株TU39(HLA-DR、DP、DQ)並且呈功能級型式，不含疊氮化物且內毒素含量低(≤0.01 EU/μg(≤0.001 ng/μg))，其係以不含防腐劑之緩衝水溶液形式提供並經過0.2 μm無菌過濾。

【2503】一般實驗程序如下。塗鋪目標細胞加上HLA I類及/或II類抗體，且培育至少1至2小時，隨後添加TIL。TIL:目標比為3:1(1.5×10^6個TIL至5×10^5個目標細胞)，但初始實驗係以1:1 TIL:目標比進行。每種條件一式三份地進行。將目標細胞解凍且再懸浮於AIM-V中，並且用NC200或K2細胞計數器計數。將細胞以1×10^6在1 mL具有300

IU/mL IL-2之AIM-V培養基中接種至48孔盤中。按下列段落中提及之濃度立即添加HLA阻斷抗體(在1至20個μg/mL之範圍內；儲備濃度為1 mg/mL)。將細胞在37℃下培育24小時。接著收集細胞且用磷酸鹽緩衝鹽水洗掉未結合之抗體。如下文所指示，針對HLA抗體結合或細胞凋亡對細胞染色，且在BD FACSCanto II流式細胞儀(美國新澤西州富蘭克林湖的BD Biosciences, Inc.)上進行分析。

【2504】首先評估HLA-I及HLA-II阻斷抗體對測定目標細胞存活性之影響。添加HLA-I阻斷抗體至如上文所描述之Thp1及U937細胞之培養物以及關於用固定活/死活力染料染色細胞之另一步驟的結果顯示於圖165中。結果表明存活性無損失。類似地，添加HLA-II阻斷抗體至如上文所描述之Thp1及U937細胞之培養物以及同樣關於用固定活/死活力染料染色細胞之另一步驟的結果顯示於圖166中，且亦表明存活性無損失。在圖167中，觀測到Raji野生型細胞在添加抗HLA-II抗體及活/死活力染色後顯示出活力損失。然而，未表現HLA-I之RajiB2M(β-2微球蛋白)基因剔除細胞株(美國密蘇里州聖路易斯的西格瑪奧瑞奇)在添加抗HLA-II抗體及用活/死活力染料染色後未顯示出相同效應。

【2505】使用前述通用程序，接著評估HLA-I及HLA-II阻斷抗體對TIL存活性的影響。在對7AAD及磷脂結合蛋白V染色之後，藉由流動式細胞測量術偵測細胞凋亡：經由7AAD+磷脂結合蛋白V-偵測壞死細胞；經由7AAD+磷脂

結合蛋白V+偵測晚期凋亡細胞；經由7AAD-磷脂結合蛋白V+偵測早期凋亡細胞；且藉由7AAD-磷脂結合蛋白V-偵測活細胞。結果顯示於圖168、169及170中。對於三種不同TIL細胞株，與HLA I類及II類阻斷抗體共培養的TIL中未觀測到毒性。

【2506】針對與1×10^{6}個TIL/1 mL之目標細胞濃度相比濃度為0至20 μg/mL之Thp1及U937細胞株進行用以評估HLA-I及HLA-II抗體之濃度的滴定實驗。藉由使用表62中之試劑，用與阻斷抗體屬於相同選殖株之螢光團結合抗體染色細胞來分析HLA抗體之結合。

表62. 用於HLA結合研究之小組。

染色劑	**Fluor**
CD45	PerCP-Cy5.5
CD19	APC-H7
CD47	APC
HLA-I (W6/32)	BB515
HLA-II (TU39)	PE

【2507】結果顯示於圖171中。流動抗體之結合損失(如藉由平均螢光強度或MFI所報告)表明阻斷抗體所佔據之結合位點的量。圖171中的紅色虛綫指示螢光減一級。

【2508】具有HLA-I及HLA-II阻斷抗體的TIL培養物的IFN-γ ELLA結果顯示於圖172中。圖172中之頂部圖描繪了在培育18小時之後具有1×10^{6}個TIL之培養物的結果，而底部圖描繪在培育24小時之後來自1.5×10^{6}個TIL之結果。結果亦表明，HLA-II阻斷抗體對TIL細胞株之影響在5 μg/mL下不太明顯。

【2509】使用HLA-I、HLA-II或兩種阻斷抗體作為陰性對照的本發明之效力測定的某些實施例說明於圖173中，且此方法的關於IFN-γ之絕對值的結果顯示於圖174至圖178中，並且關於相對於單獨TIL的倍數增強的結果顯示於圖179至圖183中。使用HLA-I、HLA-II或兩種阻斷抗體作為陰性對照的本發明之效力測定的其他實施例說明於圖184中，且此方法的關於IFN-γ之絕對值的結果顯示於圖185至圖189中，並且關於相對於單獨TIL的倍數增強的結果顯示於圖190至圖194中。結果說明HLA-I及HLA-II阻斷抗體作為陰性對照的有效性。用抗HLA-I(A、B、C)阻斷導致在TIL與THP-1或U937目標細胞共培養時(類似於單獨的TIL加抗HLA A、B、C抗體對照)終止IFN-γ分泌，且證明陰性對照可用於效力測定。用抗HLA-II(DP、DQ、DR)處理亦會使自U937及THP-1目標細胞分泌之IFN-γ減少。單獨的抗HLA-I處理(10 μg/mL)足以下調藉由U937及THP-1目標細胞誘導的TIL活化；然而，添加抗HLA-II作為陰性對照亦表現良好。$CD4^+/CD8^+$比率在所評估之TIL細胞株中係可變的(參見關於圖185至圖194之圖式說明)。HLA-I及HLA-II阻斷對TIL之影響與$CD4^+$及$CD8^+$TIL之比率無關。添加HLA阻斷抗體對TIL樣本的毒性可以忽略不計，其亦不會引起對培養物中單獨的TIL的有害活化。Raji B2M細胞單獨或與HLA-II抗體阻斷組合亦可用作有用的陰性對照。

【2510】在15種黑色素瘤TIL細胞株中進一步評估

HLA阻斷(I類及II類)作為陰性對照之有效性及本文所描述的針對經由TCR複合物對TIL進行的MHC-肽活化之效力測定的驚人特異性。圖195顯示使用抗HLA-I、抗HLA-II或兩種阻斷抗體作為陰性對照之本發明之效力測定的進一步實施例。用10 μg/mL HLA I類(抗HLA A、B、C)及/或+/- 5 μg/mL HLA II類(抗HLA DP、DQ、DR)阻斷抗體預處理腫瘤細胞株1至2小時。全部使用Gen 2過程生產之15種黑色素瘤TIL細胞株係與未經輻照之Raji、Raji β2M KO、THP1及U937腫瘤細胞以3:1 TIL:目標比在2×10^6個TVC下共培養24小時。

【2511】關於U937之結果概述於圖196中且關於Thp1之結果概述於圖197中。用抗HLA A、B、C抗體阻斷導致在TIL與THP-1或U937共培養時(類似於單獨的TIL加抗HLA A、B、C對照)終止IFN-γ分泌。發現單獨的抗HLA A、B、C處理(10μg/mL)足以終止U937及THP-1誘導的TIL活化。用抗HLA DP、DQ、DR抗體(5μg/mL)處理引起：減少IFN-γ在THP-1細胞中的分泌，但在用抗HLA A、B、C阻斷之情況下不減少；及完全阻斷U937細胞中的IFN-γ分泌，類似於用抗HLA A、B、C阻斷。$CD4^+/CD8^+$比率在所評估之TIL細胞株中係可變的。HLA I類及II類阻斷之作用與$CD4^+/CD8^+$細胞之比率無關，表明TIL在與同種異體腫瘤細胞株共培養時的活化不受HLA限制。使用HLA阻斷終止IFNγ分泌表明，非自體腫瘤細胞株誘導的TIL活化係經由TCR-HLA接合直接介導。

實例27：單核球細胞株測定數據的平行線分析

【2512】在此實例中，平行線分析的使用被證明用於作為本發明實施例的若干測定及測定條件。此研究使用了六個黑色素瘤TIL批次：M1150A、M1164、M1174、M1163、M1169及M1218。跨兩個目標(U937及Thp1細胞)中之每一者的七種目標濃度(1e6、5e5、2.5e5、1.25e5、6.25e4、3.13×10^4或3.13e4、1.56×10^4或1.56e4)測試各TIL批次之七種濃度(2×10^6或2e6、1.5×10^6或1.5 e6、1×10^6或1e6、5×10^5或5e5、2.5×10^5或2.5e5、1.25×10^5或1.25e5及6.25×10^4或6.25e4)。進行統計分析以判定測定方法之最佳TIL濃度。使用四參數邏輯(4PL)分析測定Hills斜率、範圍及EC50。平行線分析(PLA)用於回歸(線性)。

【2513】PLA方法之細節可見於文獻中，包含USP第<1032>章《生物測定的設計及開發》。USP藥典公約：馬里蘭州羅克維爾，2013；USP第<111>章《生物測定的設計及分析》。美國藥典公約：馬里蘭州羅克維爾，2014 USP第<1033>章《生物測定驗證》。USP藥典公約：馬里蘭州羅克維爾，2013；USP第<1034>章《生物測定分析》。美國藥典公約：馬里蘭州羅克維爾，2013；Hauck等人，*PDA*《醫藥科學與技術雜誌》**2005,** 15(3), 437-463; Callahan及Sajjadi，《生物過程雜誌》**2003,** 2(2), 71-77; Findlay等人，《藥學與生物分析期刊》**2000,** 21, 1249-1273；及Gottschalk及Dunn，《生物醫藥統計期刊》**2005,**

15(3), 437-463，該等文獻中之每一者的揭示內容以引用之方式併入本文中。

【2514】為了判定TIL產物對兩種目標細胞株(U937及Thp1)的刺激條件，考慮兩種非限制性因素：(i)在劑量曲線之線性部分上具有最大數目的濃度之可重複性及線性，及(ii)IFN-γ之最大信號，其可能亦導致最佳信雜比。IFN-γ係依據針對Thp1(圖198)及U937(圖199)之有效TIL濃度來量測。對於所有6個TIL批次，均觀測到與目標濃度相關的信號顯著減少。僅1.5×10^6及2.0×10^6 TIL濃度顯示出劑量反應，其中超過四(4)種濃度的目標細胞濃度在線性範圍內。U937顯示出比Thp1更高的IFN-γ信號及更大的信雜比。

【2515】圖200及圖201顯示使用測定法的六個黑色素瘤TIL細胞株的劑量反應曲線。1.5×10^6或2.0×10^6之TIL濃度提供用於測定方法中之可接受結果。其基於線性劑量曲線提供了增加的信號、更好的信雜比及較大數目的目標濃度。圖202顯示在1.5×10^6個細胞之TIL濃度下使用U937目標細胞對六個TIL批次的平行線分析，發現所有六個TIL均顯示出對此目標細胞株的明確劑量反應。在圖203中，顯示了使用Thp1目標細胞在相同條件下對相同六個TIL批次的平行線分析，其中只有TIL M1173及TIL M1213顯示出明顯的劑量反應。圖204及圖205說明了阻斷抗體在六個TIL批次中與抗HLA-I(10 μg/mL)及抗HLA-II(5 μg/mL)一起顯示出對U937細胞的測定特異性。令人驚訝的是，U937細

胞株的表現優於Thp1細胞株。對於給定的目標濃度，在測定方法之此實施例中，與Thp1細胞相比，U937細胞提供更大的IFN-γ信號。U937細胞亦在劑量反應曲線之線性部分上提供更多濃度。4點劑量曲線可與線性擬合一起使用，其中選擇去除每條曲線的一個離群值並掩蔽曲線飽和度(如此將提供最終分析所需的曲線上的至少三個點)。可以進行篩選及去除離群值以及掩蔽曲線飽和度，如USP第<1032>章《生物測定的設計及開發》，美國藥典公約：馬里蘭州羅克維爾，2013所描述般進行，其揭示內容係以引用的方式併入本文中。另外，用Thp1細胞測試之TIL批次需要在較低濃度下進行掩蔽以在大多數TIL批次上呈線性，而U937細胞則沒有此要求。上部漸近線並不總是用Thp1細胞來解析；因此，可能並未在用Thp1細胞測試的TIL批次中定義上限範圍。

實例28：效力及一致性測定矩陣

【2516】在此實例中，演示了效力及一致性測定矩陣的使用。效力及一致性分析矩陣可用於TIL、MIL及PBL產物之釋放及穩定性測試，且可包含本文中描述為矩陣之組成部分的效力測定。例示性及非限制性測定矩陣在表63中給出，表63亦為本發明之實施例且可經修改以移除或添加矩陣之成員。在適當及/或需要的情況下，測定的精密度、準確度、特異性及線性係合格的。

表 63. 例示性非限制性效力及一致性測定矩陣。

	所量測之屬性	測定	目的
效力	TCR-HLA 接合及功能；U937 或 Thp1 細胞目標	偵測 IFN-γ 以獲得相對效力的細胞共培養測定	依據與 lifileucel 的 MoA 相關的高度特異性機制的 TIL 活化及功能
	CD3、CD28 及 CD137 共刺激及 TIL 活化	偵測 IFN-γ 分泌量的基於珠粒之測定	依據正交 T 細胞活化機制之 TIL 活化及功能性
	活細胞百分比	細胞計數器	報告劑量中功能性 TIL 的百分比
	總活細胞	細胞計數器	報告總活細胞及功能性 TIL 劑量
效力及一致性	具有 LAG3 表現的細胞百分比	流動式細胞測量術	與 lifileucel 的效力及一致性高度相關的耗盡標記物
	具有 KLRG1 表現的細胞百分比	流動式細胞測量術	與 lifileucel 的效力及一致性高度相關的分化標記物
	總活 $CD4^+$及 $CD8^+$細胞群體	流動式細胞測量術及細胞計數器	$CD4^+$及 $CD8^+$細胞群體均涉及 TIL 反應且與 lifileucel 的效力及一致性相關
	$CD4^+$細胞百分比	流動式細胞測量術	反映 $CD4^+$譜系細胞在 lifileucel 的效力及一致性中的關鍵作用
	$CD8^+$細胞百分比	流動式細胞測量術	反映 $CD8^+$譜系細胞在 lifileucel 的效力及一致性中的關鍵作用
	總活 T_{CM}及 T_{EM}細胞群體	流動式細胞測量術及細胞計數器	T_{CM}及 T_{EM}細胞群體均有助於 TIL 效應功能，並與 lifileucel 的效力及一致性相關
	T_{CM}細胞百分比	流動式細胞測量術	反映分化為 T_{EM}細胞的 T_{CM}細胞在 lifileucel 的效力及一致性中的關鍵作用
	T_{EM}細胞百分比	流動式細胞測量術	反映 T_{EM}細胞及其效應功能在 lifileucel 的效力及一致性中的關鍵作用
一致性	$CD45^+/CD3^+$細胞百分比	流動式細胞測量術	lifileucel 產品的一致性測試
	$CD16^+/CD56^+$細胞百分比	流動式細胞測量術	偵測 lifileucel 產品中是否存在 NK 及 NKT 細胞

【2517】本文例如實例14至27中所描述之同種異體共培養測定係用於評估TCR-HLA相互作用。表63中所示之矩

陣呈現一個實例，其使用U937或Thp1細胞結合針對陽性對照之相對效力及如實例27及本文中其他處所描述之平行線分析方法。使用HLA阻斷抗體之陰性對照係用以證明在檢核期間針對TCR-HLA相互作用之特異性且亦可在常規測試期間用作相對效力量度與如本文所描述之陽性對照參考標準之替代方案。使用已知的TIL、MIL或PBL細胞株製備陽性對照，此韓細胞株已為此目的成組及表徵。

【2518】例如，使用U937共培養測定，使用以下程序。U937細胞來自ATCC，用於創建兩層GMP細胞庫(MCB，250小瓶及WCB，500小瓶)。WCB被製造為用於生物測定之即用型(RTU)GMP非生產庫，其中將直接自小瓶解凍的細胞用於測定中，由此消除對細胞擴增的需要及相關的污染或變異風險。測試MCB之活細胞計數、成活%、一致性、無菌性、黴漿菌及活體外外來病原(adventitious agent)。測試WCB之活細胞計數、成活%、無菌性、黴漿菌及活體外外來病原。評估了MCB及WCB對穩健性資格參數內的共培養效力測定的通道依賴性影響，發現沒有顯著差異。陽性對照TIL批次係在GMP下使用與臨床TIL產品相同的Gen 2製造過程製造的，並且亦將用作參考標準。在調配之後，將參考標準之整個藥品填充至小瓶中，接著使用用於臨床TIL藥品製造之相同設備及程式以受控速率冷凍小瓶。將小瓶冷凍保存在氣相液氮中。測試代表性小瓶之若干屬性，包含無菌性、黴漿菌、細胞計數、存活性、一致性及效力，且限定適用作參考標準之TIL批次。一旦

合格，參考標準的一次性使用小瓶將被解凍，並在每次測定時與測試物一起進行測試。該測定在每孔1.5×10^{6}個TIL的限定設定值下評估TIL產物批次與參考標準TIL批次的相對效力，並以可靠且劑量依賴性方式對與U937細胞的四種劑量濃度(每孔4×10^5、2×10^5、1×10^{5}及0.5×10^{5}個細胞；在每個劑量濃度下一式三份進行)的持續24小時之時段的共培養作出反應。量測在各U937劑量濃度下自各複製物釋放至上清液中的IFN-γ的濃度。ELLA系統(如本文其他地方所述)用於量測TIL產物及U937的共培養測定的活化後IFN-γ濃度。使用Simple Plex 72孔IFN-γ第3代第5版料筒(可自美國加利福尼亞州聖何塞的BioTechne, Inc.的ProteinSimple部門獲得，目錄號#SPCKB-CS-002697)。在共培養之前立即進行培養基的培育及儲存，以便隨後測量分泌的IFN-γ。將上清液轉移至三個重複的96孔盤中並儲存在<60℃。隨後解凍培養盤且針對IFN-γ進行量測。在每個經過商業驗證的72孔料筒上篩選自共培養中收集的上清液以用於IFN-γ生產。按照USP <1032>，USP藥典公約：馬里蘭州羅克維爾，2013進行數據分析。根據USP <1032>及USP <1033>《生物測定驗證》，USP藥典公約：馬里蘭州羅克維爾，2013對數據進行對數轉換，以滿足在效力範圍內量測的對稱性、正態分佈及變異性均一性的要求。如USP <1034>《生物測定分析》USP藥典公約:馬里蘭州羅克維爾，2013中所述，對離群值進行評估並自分析中省略。在四點劑量曲線上進行線性回歸，其中由於曲線飽和而掩

蔽最高或最低濃度(若需要)。根據USP<1032>，建議「使用至少三個，較佳四個相鄰的[劑量]濃度；要求線性段的斜率足夠陡峭；並要求符合標準和測試樣本的線係筆直的，並且線係平行的」。根據USP<1032>，在TIL測試物與RS之間進行平行線分析。藉由平行度量測之參考標準與TIL測試物之間的統計相似性證明了TIL測試物與參考標準之生物學相似性。計算並報告平行度斜率比、線性比、回歸(R^2)及均方根誤差(RMSE)。對平行度及線性的測定適用性及有效性進行排名並判定「通過」抑或「未通過」根據USP<1033>的限制內的有效性標準。作為耐受百分比範圍的95%置信區間內的相對效力被判定為「可報告的」或「非決定性的」。根據USP<1032>，相對效力可能優於源自絕對值的效力，因為相對效力係一種消除生物樣本固有的可變性及細胞行為隨時間推移的影響的校準因子。最後，在每個U937細胞密度下報告預測的IFN-γ濃度。評估TIL在與U937細胞共培養中產生的絕對IFN-γ濃度與單獨的TIL(未刺激)相比的倍數增加，以用作每個TIL批次的替代或另外的可報告值。使用來自JMP Statistical Discovery LLC(美國北卡羅來納州卡瑞)的JMP軟體進行分析，並進行適當的驗證。本發明之其他測定細節及實施例亦提供於表64中。

表 64. 共培養方法條件及本發明之實施例的例示性非限制性概述。

步驟	參數	描述
刺激	測定型式	4 點劑量 U937 與 IFN-γ 濃度曲線
	測定通量	48 孔盤
	活化細胞株	U937，ATCC CRL-1593.2（批號 70036658）
	每孔 TIL 之數目	1.5×10^6
	每孔 U937 細胞數	4.0×10^5、2.0×10^5、1.0×10^5、0.5×10^5
	共培養基	含有 IL-2（300 IU/mL）之 AIM-V（無血清培養基）
	培養基體積	1000 µL
	每個樣本/每個培養盤/每個操作之重複孔數	3 個（所有三個孔均來源於同一個解凍之測試物小瓶；使用平均 3 個孔測定 IFNγ 濃度）。
	刺激期	在 37℃下在具有 5% CO_2 之培育箱中 24±0.5 小時
	陽性對照	合格的 TIL 細胞株
	陰性對照	抗 HLA I&II 抗體
分析	測定通量	72 孔盤
	儀器	ELLA 自動 ELISA
	系統軟體	Simple Plex Runner 及 Simple Plex Explorer
	ELLA 參數	Simple Plex 72 孔 IFN-γ 第 3 代第 5 版料筒（目錄號 SPCKB-CS-002697），ProteinSimple，成對的捕獲及偵測抗體串聯結合至三（3）個玻璃微管，用於在每個孔內三次重複讀數。
	系統適應性控制，IFN-γ 免疫控制標準	Protein Simple 人類 IFN-γ 第三代凍乾對照（Protein Simple 目錄號 899077）
	每個樣本、每個盤、每次操作的重複次數	3

【2519】表63中所示之矩陣亦包含正交活化測定，該測定使用由TIL分泌之IFN-γ的量測值，以回應於藉由塗佈有抗CD3/CD28/CD137抗體之珠粒進行的活化。當TIL產物

暴露於此等珠粒時，抗體將結合CD3傳訊複合物內所含的CD3ε及T細胞共刺激受體CD28及CD137。使用抗CD3有絲分裂原抗體OKT3刺激TIL來評估TIL產物之功能，如Borovsky等人《生物化學雜誌》**2002,** *277,* 21529-36中所描述，其揭示內容以引用之方式併入本文中。已知抗CD28活性會增強活體外T細胞增殖及細胞介素產生。CD137(4-1BB)為腫瘤壞死因子家族之成員。促效性抗CD137抗體充當活化共刺激分子，對於效應及記憶T細胞尤其重要且促進T淋巴球存活及增殖。基於珠粒之IFN-γ測定之設計因此意欲藉由利用與抗原特異性T細胞之生理再刺激及擴增有關之三個活化信號來模擬對由專業抗原呈現細胞進行的活體內T細胞活化有反應的TIL細胞的生物活性。

【2520】總活細胞及活細胞百分比亦包含於表63中。在文獻中，總活細胞計數係與客觀腫瘤對TIL產物輸注之反應相關的參數。Seitter等人《臨床癌症研究》**2021,** *27,* 5289-98。細胞生存力係總活細胞計數固有的參數。細胞維持或恢復存活性之能力係TIL功能之必需前提條件，且對細胞存活性的證明因此充當額外的活性量度。此等參數對TIL產物效能的重要性得到了臨床前研究以及在迄今為止已招募了數百名轉移性黑色素瘤患者的研究中使用TIL療法的大量臨床經驗的支援。在此等研究中，儘管研究人員已報導了客觀腫瘤反應率與所投予的總活細胞之間存在統計學上顯著的正相關，但在有反應者與無反應者之間的

總細胞數分佈中仍存在實質性重疊：Seitter等人《臨床癌症研究》**2021,** *27,* 5289-98；Goff等人《臨床腫瘤學雜誌》**2016,** *34,* 2389-97。總活細胞計數及存活性百分比之例示性結果在表65中給出。

表65.臨床黑色素瘤TIL批次的總活細胞及存活性百分比的概況統計數據。

屬性	N	均值	標準偏差	最小值	中值	最大值
總活細胞	149	25.74	17.54	1.19	21.89	99.60
存活性(%)	149	89.55	4.20	74.70	87.50	90.50

【2521】表63之矩陣中之譜系標記物包含總的活$CD4^+$及$CD8^+$細胞群體、$CD4^+$細胞百分比及$CD8^+$細胞百分比，其係藉由流式動細胞測量術及細胞計數器量測。TIL由淋巴球(包含$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞)之混合物構成。$CD8^+$及$CD4^+$ T細胞係以可變比例存在於TIL產物中，且兩種細胞譜系似乎均會促成抗腫瘤免疫反應。Topalian等人《免疫學方法雜誌(*J. Immunological Methods*)》**1987,** *102,* 127-41；Andersen等人《臨床癌症研究》**2016,** *22,* 3734-45；Goff等人《臨床腫瘤學雜誌》**2016,** *34,* 2389-97。$CD8^+$ T細胞與腫瘤消退相關，而$CD4^+$ T細胞對於免疫系統之功能至關重要，且藉由促進$CD8^+$ T細胞增殖及IFN-γ分泌來增強$CD8^+$ T細胞功能。Shedlock及Shen,《科學》**2003,** *300,* 337-9；Sun及Bevan,《科學》**2003,** *300,* 339-42。Seitter等人分析了迄今為止已招募數百名轉移性黑色素瘤患者的TIL治療研究的綜合數據，並顯示客觀腫瘤反應率與所投予的總活$CD8^+$細胞之間存在統計學上顯著的正相關，以及在有反應者與無反應者之間的總細胞數分佈中存

在實質性重疊。Seitter等人《臨床癌症研究》**2021,** *27,* 5289-98。不受理論束縛，具有$CD8^+$及$CD4^+$ T細胞群體之TIL產物可為授受細胞療法之最有利產物，並且最可能具有臨床功效。臨床黑色素瘤TIL批次之$CD4^+$及$CD8^+$表現的例示性結果在表66中給出。

表66. 臨床黑色素瘤TIL批次之$CD4^+$及$CD8^+$表現的概況統計數據。

屬性[1]	N	均值	標準偏差	最小值	中值	最大值
$\%CD8^+$	147	53.98	29.66	0.93	58.20	97.60
$\%CD4^+$	147	40.21	29.08	0.32	33.00	97.50
活 $CD4^+$及 $CD8^+$ 細胞總數 ($\times 10^6$)	147	24520.35	17176.11	1057.61	11921.25	20342.07

[1] $\%CD8^+$及$\%CD4^+$細胞係以$CD3^+$細胞之百分比表示

【2522】表63亦包含若干記憶標記物，總活的中央記憶(T_{CM})及效應記憶(T_{EM})細胞群體、T_{CM}細胞百分比及T_{EM}細胞百分比，其藉由流動式細胞測量術及細胞計數器量測。記憶T細胞以多個亞群形式存在，其遷移模式、功能能力及譜系關係不同。Farber等人《自然免疫學評論》**2014,** *14,* 24-35；Sallusto等人，《免疫學年度評論》**2004,** *22,* 745-63。主要亞群包含TCM細胞，其保留了向淋巴組織運輸的能力；及T_{EM}細胞，其遷移至周邊組織部位。兩個亞群均具有效應能力。藉由流動式細胞測量術將T_{EM}細胞定義為$CD45RA^-CCR7^-$且將TCM細胞定義為$CD45RA^-CCR7^+$。TIL產物中之大部分細胞具有與高級功能性一致之效應記憶T細胞表型。Goff等人《臨床腫瘤學雜誌》**2016,** *34,* 2389-97。類似地，T_{EM}細胞常常係由Gen 2過程在第22天樣本中產生之TIL樣本中的主要群體，因為其在

第22天過程中有效擴增。臨床黑色素瘤TIL批次中T_{EM}及T_{CM}含量之例示性結果在表67中給出。

表67. 臨床黑色素瘤TIL批次之T_{EM}及T_{CM}細胞的概況統計數據。

屬性[1]	N	均值	標準偏差	最小值	中值	最大值
$\%T_{EM}$	147	81.47	17.90	3.23	87.50	99.50
$\%T_{CM}$	147	15.45	15.09	0.36	10.00	73.40
活T_{EM}及T_{CM}細胞總數（$\times 10^6$）	147	24690.57	17571.59	1055.39	11800.69	20686.78

[1] $\%T_{EM}$及$\%T_{CM}$細胞係以$CD3^+$細胞之百分比表示

【2523】具有LAG3表現之細胞之百分比亦包含於表63之矩陣中，作為最終TIL產物中之耗竭標記物且因此作為效力標記物。藉由流動式細胞測量術量測LAG3表現。舉例而言，LAG3水準通常由Gen 2過程上調。此上調與T細胞活化及效應功能相關且表明LAG3可能係用於監測之敏感性及代表性耗竭標記物。Annunziato等人《美國生物實驗學學會聯合會會刊(*FASEB J.*)》**1996,** *10,* 769-76。臨床黑色素瘤TIL批次之例示性統計數據在表68中給出。

表68. 臨床黑色素瘤TIL批次之LAG3表現的概括統計數據。

屬性	N	均值	標準偏差	最小值	中值	最大值
$\%LAG3^+$	147	15.15	8.63	1.31	13.00	45.20

[1] $\%LAG3^+$細胞係以$CD3^+$細胞之百分比表示

【2524】跨此等臨床數據集之LAG3表現的直方圖顯示於圖206中。

【2525】具有KLRG1表現之細胞之百分比亦包含於表63之矩陣中，作為最終lifileucel產物中之分化標記物且因此作為效力標記物。藉由流動式細胞測量術量測KLRG1表現。KLRG1係T細胞終末分化及衰老的標記物，顯示為在

記憶T細胞分化時下調。Henson等人,《血液》**2009,** *113,* 6619-28；Herndler-Brandstetter等人，《免疫學》**2018,** *48,* 716-729。臨床黑色素瘤TIL批次之例示性統計數據在表69中給出。

表69. 臨床黑色素瘤TIL批次之KLRG1表現的概況統計數據。

屬性	N	均值	標準偏差	最小值	中值	最大值
%KLRG1^{+}	141	13.19	13.32	0.76	8.48	58.30

[1] %KLRG1^{+}細胞係以CD3^{+}細胞的百分比表示

【2526】跨臨床數據集的KLRG1表現直方圖顯示於圖207中。

【2527】CD14^{+}/CD19^{+}/CD16^{+}/CD56^{+}流動式細胞測量術測定可替代表63中所示之CD16^{+}/CD56^{+}測定以偵測NK細胞、NKT細胞、B細胞及單核球。

【2528】本文所描述且併入表63之矩陣中之U937共培養物用於評估如上文所描述之臨床黑色素瘤TIL批次的相對效力。結果顯示於表70中，其中觀測到若干批次沒有展現出劑量依賴性反應，表明潛在的效力損失。

表 70. 臨床黑色素瘤 TIL 批次的相對效力結果。

批號	相對效力（%）
170171423	21.6[1]
187371423	125.2
186871423	34.0[1]
170271423	48.4
1810271423	33.3[1]
187071423	435.8
187471423	87.5
182671423	38.3[1]
185571423	238.3
186371423	226.4
171171423	284.9
185671423	100.0
189171423	222.0
186471423	261.7
189571423	377.9
183271423	25.2
170871423	1393.8
180171423	42.5
187971423	165.4
183871423	68.8
185171423	515.5
181071423	180.7
186271423	1268.5
181171423	166.3
185071423	455.6
181271423	303.6
189071423	399.7
CD47	115.3
171271423	2022.9
171071423	103.9
184271423	360.2
183171423	444.6

[1]批次未顯示出劑量依賴性反應

【2529】表70之結果在圖208中標繪為直方圖，其中觀測到對數正態分佈。

【2530】可利用額外標記物及對應流動式細胞測量術

測定，包含CD101$^+$細胞含量測定、CD69$^+$細胞含量測定、T_{SCM}細胞含量測定、T_{EMRA}細胞含量測定、T_{reg}細胞測定含量、PD-1$^+$細胞含量測定、TIM3$^+$細胞含量測定、CD25$^+$細胞含量測定、CD27$^+$細胞含量測定、CD28$^+$細胞含量測定、CD56$^+$細胞測定含量、CTLA-4$^+$細胞含量測定、TIGIT$^+$細胞含量測定及/或CD57$^+$細胞含量測定。TIL產物在Gen 2製造過程期間再生之某些標記物的統計顯著性描述於Simpson-Abelson等人，《腫瘤學年鑒(*Ann.Oncol.*,)》，**2020,** *31,* S720及Simpson-Abelson等人，《Iovance第2代腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)產物在製造過程內再生(Iovance Generation-2 Tumor-infiltrating Lymphocyte (TIL) Product Is Reinvigorated During the Manufacturing Process)》，ESMO大會，2020年9月19日至21日，海報1053P，每篇參考文獻之揭示內容均以引用之方式併入本文。

實例29：使用U937細胞擴增TIL產物

【2531】經輻照U937細胞可用作Gen 2過程或類似過程的REP階段(或Gen 3或類似過程之啟動階段，或經基因編輯TIL過程及經選定TIL過程中之類似階段)的人工抗原處理細胞(aAPC)。將三個黑色素瘤預REP TIL批次解凍，並使用如本文別處所描述之程序(例如實例6)與經輻照之U937細胞或同種異體PBMC飼養細胞(三個供體)以及抗CD3(OKT-3)一起培育11天且針對擴增進行評估。結果示

於圖209中。U937細胞能夠誘導TIL細胞之擴增。在刺激CD3及CD28珠粒後，TIL分泌IFN-γ作為反應，如圖210中所示，表明其能夠活化。使用U937細胞作為aAPC可支援較低頻率TCR選殖株之生長或保存，如藉由TCR組庫分析(例如針對獨特CDR3域)評估。在本發明之一些實施例中，藉由使用U937 aAPC(包含經基因修飾之U937 aAPC)使用Gen 2、Gen 3或本文所描述之其他程序擴增之TIL、MIL或PBL可顯示較低頻率TCR選殖株之生長或保存增加。

* * *

【2532】提供上文所闡述之實例以向本領域中一般熟習此項技術者提供如何製得及使用本發明之組合物、程序、測定、系統及方法之實施例的完整揭示內容及描述，且並不意欲限制本發明人視作其發明之範疇。本領域中熟習此項技術者顯而易見的進行本發明之上文所描述模式的修改意欲在以下申請專利範圍之範疇內。本說明書中提及之所有專利、專利申請案及公開案指示本領域中熟習本發明所屬領域者之技能水準。

【2533】所有標題及章節名稱僅用於清晰及參考目的，且不應視為以任何方式具限制性。舉例而言，本領域中熟習此項技術者應瞭解根據本文所描述之本發明之精神及範疇按需要組合來自不同標題及章節之各種態樣的有用性。

【2534】本文中引用之所有參考文獻以全文引用之方

式且出於所有目的併入本文中，其引用程度如同各個別公開案或專利或專利申請案經特定且個別地指示出於所有目的以全文引用的方式併入本文中一般。

【2535】如本領域中熟習此項技術者將顯而易見，可在不脫離本申請案之精神及範疇的情況下對其進行多種修改及改變。本文所描述之特定實施例及實例僅作為實例提供，且本申請案僅受隨附申請專利範圍之各項以及申請專利範圍授權之等效物之全部範疇限制。

【序列表】

<110> 美商艾歐凡斯生物治療公司(Iovance Biotherapeutics, Inc.)

<120> 用於T細胞共培養效力測定及與配合細胞療法產品使用的方法及組合物

<130> 116983-5089-US

<140> TW 111111476
<141> 2022-03-25

<150> 63/309,919
<151> 2022-02-14

<150> 63/286,145
<151> 2021-12-06

<150> 63/246,890
<151> 2021-09-22

<150> 63/233,035
<151> 2021-08-13

<150> 63/212,933
<151> 2021-06-21

<150> 63/189,829
<151> 2021-05-18

<150> 63/166,210
<151> 2021-03-25

<160> 237

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成莫羅單抗重鏈

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

```
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
            20                  25                  30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Gly Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser
            180                 185                 190

Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
        195                 200                 205

Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Pro Lys Ser Cys Asp
```

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 2
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成莫羅單抗輕鏈

<400> 2

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Ala Asp Thr Ala Pro
100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 3
<211> 134
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成重組人類IL-2（rhIL-2）

<400> 3

Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1 5 10 15

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
35 40 45

Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
50 55 60

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
65 70 75 80

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
85 90 95

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
100 105 110

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser
115 120 125

Ile Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 4
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿地介白素

<400> 4

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1 5 10 15

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
20 25 30

Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
35 40 45

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
50 55 60

Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65 70 75 80

Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
85 90 95

Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
100 105 110

Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
115 120 125

Ser Thr Leu Thr
130

<210> 5
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成IL-2形式

<400> 5

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 6
<211> 303
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成IL-2形式

<400> 6

Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn
1 5 10 15

Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu
20 25 30

Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile
35 40 45

Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Ser Ser Ser
50 55 60

Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln
65 70 75 80

Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg
85 90 95

```
Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys
            100                 105                 110

His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu
        115                 120                 125

Asn Leu Ala Gln Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Leu Cys Asp Asp Asp
    130                 135                 140

Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu
145                 150                 155                 160

Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys
                165                 170                 175

Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser
            180                 185                 190

Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr
        195                 200                 205

Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr
    210                 215                 220

Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly
225                 230                 235                 240

His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile
                245                 250                 255

Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly
            260                 265                 270

Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr
        275                 280                 285

His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly
```

290 295 300

<210> 7
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成IL-2形式

<400> 7

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Ala Arg Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys
20 25 30

Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu
35 40 45

Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn
50 55 60

Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly
85 90 95

Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser
100 105 110

Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser
115 120 125

Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu
130 135 140

Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro

145 150 155 160

Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Gly Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro
180 185 190

His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser
195 200 205

Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

```
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
        355                 360                 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
    370                 375                 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385                 390                 395                 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
                405                 410                 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
            420                 425                 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
        435                 440                 445

Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成黏蛋白域多肽

<400> 8

```
Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Pro
1               5                   10                  15
```

<210> 9
<211> 130
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成重組人類IL-4（rhIL-4）

<400> 9

Met His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn
1 5 10 15

Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp
20 25 30

Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg
35 40 45

Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr
50 55 60

Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu
65 70 75 80

Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly
85 90 95

Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn
100 105 110

Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys
115 120 125

Ser Ser
130

<210> 10
<211> 153
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成重組人類IL-7（rhIL-7）

<400> 10

Met Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val

1 5 10 15

Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly
20 25 30

Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys
35 40 45

Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu
50 55 60

Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu
65 70 75 80

Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln
85 90 95

Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys
100 105 110

Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp
115 120 125

Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn
130 135 140

Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 11
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成重組人類IL-15（rhIL-15）

<400> 11

Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu

1 5 10 15

Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
20 25 30

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
35 40 45

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
50 55 60

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
65 70 75 80

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
85 90 95

Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
100 105 110

Asn Thr Ser
115

<210> 12
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成重組人類IL-21（rhIL-21）

<400> 12

Met Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val
1 5 10 15

Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro
20 25 30

Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys

35 40 45

Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg
50 55 60

Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr
65 70 75 80

Asn Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp
85 90 95

Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser
100 105 110

Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly
115 120 125

Ser Glu Asp Ser
130

<210> 13
<211> 153
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成IL-2

<400> 13

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe

50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145 150

<210> 14
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成IL-2黏蛋白

<400> 14

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 15
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成IL-2黏蛋白

<400> 15

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 16
<211> 145
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成HCDR1_IL-2

<400> 16

Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
1 5 10 15

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
20 25 30

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe
35 40 45

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
50 55 60

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
65 70 75 80

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile

85 90 95

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
100 105 110

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
115 120 125

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser Val
130 135 140

Gly
145

<210> 17
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成HCDR2

<400> 17

Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成HCDR3

<400> 18

Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 19
<211> 141
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成HCDR1_IL-2 kabat

<400> 19

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly
130 135 140

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成HCDR2 kabat

<400> 20

Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成HCDR3 kabat

<400> 21

Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 22
<211> 142
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成HCDR1_IL-2 clothia

<400> 22

Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
1 5 10 15

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
20 25 30

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe
35 40 45

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
50 55 60

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
65 70 75 80

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
85 90 95

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
100 105 110

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
115 120 125

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met
130 135 140

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成HCDR2 clothia

<400> 23

Trp Trp Asp Asp Lys
1 5

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成HCDR3 clothia

<400> 24

Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 25
<211> 143
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成HCDR1_IL-2 IMGT

<400> 25

Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
1 5 10 15

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
20 25 30

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe
35 40 45

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
50 55 60

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
65 70 75 80

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
85 90 95

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
100 105 110

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
115 120 125

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser
130 135 140

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成HCDR2 IMGT

<400> 26

Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys
1 5

<210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成HCDR3 IMGT

<400> 27

Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 28
<211> 253
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成VH

<400> 28

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr
20 25 30

Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
35 40 45

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys
50 55 60

Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr
65 70 75 80

Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu

85 90 95

Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg
100 105 110

Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser
115 120 125

Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val
130 135 140

Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr
145 150 155 160

Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro
165 170 175

Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys
180 185 190

Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr
195 200 205

Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp
210 215 220

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe
225 230 235 240

Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 29
<211> 533
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成重鏈

<400> 29

Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
1 5 10 15

Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
20 25 30

Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
35 40 45

Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
50 55 60

Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
65 70 75 80

Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
85 90 95

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
100 105 110

Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
115 120 125

Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr
130 135 140

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
145 150 155 160

Asn Gln Val Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala
165 170 175

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
180 185 190

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
195 200 205

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
210 215 220

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
225 230 235 240

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
245 250 255

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
260 265 270

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
275 280 285

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
290 295 300

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
305 310 315 320

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
325 330 335

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val
340 345 350

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
355 360 365

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
370 375 380

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

385 390 395 400

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Ala Ala
405 410 415

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
420 425 430

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
435 440 445

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
450 455 460

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
465 470 475 480

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
485 490 495

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
500 505 510

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
515 520 525

Leu Ser Pro Gly Lys
530

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成LCDR1 kabat

<400> 30

Lys Ala Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met His

1 5 10

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成LCDR2 kabat

<400> 31

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成LCDR3 kabat

<400> 32

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成LCDR1 chothia

<400> 33

Gln Leu Ser Val Gly Tyr
1 5

<210> 34
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成LCDR2 chothia

<400> 34

Asp Thr Ser
1

<210> 35
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成LCDR3 chothia

<400> 35

Gly Ser Gly Tyr Pro Phe
1 5

<210> 36
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成VL

<400> 36

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp

65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 37
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成輕鏈

<400> 37

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 38
<211> 583
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成輕鏈

<400> 38

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr
20 25 30

Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
35 40 45

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys

50 55 60

Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr
65 70 75 80

Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu
85 90 95

Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg
100 105 110

Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser
115 120 125

Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val
130 135 140

Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr
145 150 155 160

Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro
165 170 175

Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys
180 185 190

Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr
195 200 205

Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp
210 215 220

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe
225 230 235 240

Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
245 250 255

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
260 265 270

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
275 280 285

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
290 295 300

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
305 310 315 320

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
325 330 335

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
340 345 350

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
355 360 365

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
370 375 380

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
385 390 395 400

Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
405 410 415

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
420 425 430

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
435 440 445

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

450 455 460

Ala Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
465 470 475 480

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
485 490 495

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
500 505 510

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
515 520 525

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
530 535 540

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
545 550 555 560

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
565 570 575

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
580

<210> 39
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成輕鏈

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 40
<211> 255
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成人類4-1BB、腫瘤壞死因子受體超家族，成員9（智人）

<400> 40

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
35 40 45

Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
50 55 60

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
85 90 95

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
130 135 140

Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu
180 185 190

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
195 200 205

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
210 215 220

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
245 250 255

<210> 41
<211> 256
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成鼠類4-1BB、腫瘤壞死因子受體超家族，成員9（小家鼠）

<400> 41

Met Gly Asn Asn Cys Tyr Asn Val Val Val Ile Val Leu Leu Leu Val
1 5 10 15

Gly Cys Glu Lys Val Gly Ala Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln
20 25 30

Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro
35 40 45

Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys
50 55 60

Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr
65 70 75 80

His Asn Ala Glu Cys Glu Cys Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro
85 90 95

Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr
100 105 110

Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn
115 120 125

Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg
130 135 140

Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

Pro Val Val Ser Phe Ser Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu
165 170 175

Gly Gly Pro Gly Gly His Ser Leu Gln Val Leu Thr Leu Phe Leu Ala
180 185 190

Leu Thr Ser Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ile Phe Ile Thr Leu Leu Phe
195 200 205

Ser Val Leu Lys Trp Ile Arg Lys Lys Phe Pro His Ile Phe Lys Gln
210 215 220

Pro Phe Lys Lys Thr Thr Gly Ala Ala Gln Glu Glu Asp Ala Cys Ser
225 230 235 240

Cys Arg Cys Pro Gln Glu Glu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Glu Leu
245 250 255

<210> 42

<211> 441
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗之合成重鏈

<400> 42

```
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
            20                  25                  30

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        115                 120                 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
    130                 135                 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
```

165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 43
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗之合成輕鏈

<400> 43

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
85 90 95

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 44
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗之合成重鏈可變區

<400> 44

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 45
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗之合成輕鏈可變區

<400> 45

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
85 90 95

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 46
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗之合成重鏈CDR1

<400> 46

Ser Thr Tyr Trp Ile Ser
1 5

<210> 47
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗之合成重鏈CDR2

<400> 47

Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 48

<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗之合成重鏈CDR3

<400> 48

Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr
1 5

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗之合成輕鏈CDR1

<400> 49

Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala His
1 5 10

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗之合成輕鏈CDR2

<400> 50

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 51
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗之合成輕鏈CDR3

<400> 51

Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu Ala Val
1 5 10

<210> 52
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗之合成重鏈

<400> 52

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

```
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
        195                 200                 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
    210                 215                 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
            260                 265                 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
        275                 280                 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
    290                 295                 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305                 310                 315                 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
                325                 330                 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
```

340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 53
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗之合成輕鏈

<400> 53

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Ala Leu Thr Phe Cys Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 54
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗之合成可變重鏈

<400> 54

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
35 40 45

Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Pro
115 120

<210> 55
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗之合成可變輕鏈

<400> 55

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

<210> 56
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗之合成重鏈CDR1

<400> 56

Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 57
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗之合成重鏈CDR2

<400> 57

Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser
1 5 10 15

<210> 58
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗之合成重鏈CDR3

<400> 58

Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 59
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗之合成輕鏈CDR1

<400> 59

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗之合成輕鏈CDR2

<400> 60

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗之合成輕鏈CDR3

<400> 61

Gln Gln Arg Ser Asp Trp Pro Pro Ala Leu Thr
1 5 10

<210> 62
<211> 230
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成Fc域

<400> 62

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
1 5 10 15

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
20 25 30

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
35 40 45

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
50 55 60

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
85 90 95

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
100 105 110

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
115 120 125

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn

130 135 140

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
145 150 155 160

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
165 170 175

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
180 185 190

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
195 200 205

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
210 215 220

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 63
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 63

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
1 5 10 15

Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20

<210> 64
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 64

Gly Gly Ser Gly Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
1 5 10 15

Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20

<210> 65
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 65

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys
1 5 10 15

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25

<210> 66
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 66

Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys
1 5 10 15

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25

<210> 67

<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 67

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys
1 5 10 15

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25

<210> 68
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 68

Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys
1 5 10 15

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25

<210> 69
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 69

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ser Asp Lys Thr His Thr
1 5 10 15

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

20

<210> 70
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 70

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
1 5 10 15

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20

<210> 71
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 71

Gly Gly Pro Ser Ser Ser Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
1 5 10 15

Cys Pro Ala Pro Glu
20

<210> 72
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 72

Gly Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Asp Lys Thr His

1 5 10 15

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25

<210> 73
<211> 246
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成Fc域

<400> 73

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Ala Gly Asn Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
20 25 30

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
35 40 45

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
50 55 60

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
65 70 75 80

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
85 90 95

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
100 105 110

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
115 120 125

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

130 135 140

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
145 150 155 160

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
165 170 175

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
180 185 190

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
195 200 205

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
210 215 220

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
225 230 235 240

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
245

<210> 74
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 74

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 75
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 75

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 76
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成連接子

<400> 76

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10 15

<210> 77
<211> 254
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成4-1BBL

<400> 77

Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro
1 5 10 15

Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val
20 25 30

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe
35 40 45

Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser
50 55 60

Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp

65 70 75 80

Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val
85 90 95

Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp
100 105 110

Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu
115 120 125

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
130 135 140

Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
145 150 155 160

Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
165 170 175

Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
180 185 190

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
195 200 205

Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
210 215 220

Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
225 230 235 240

Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
245 250

<210> 78
<211> 168
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成4-1BBL可溶域

<400> 78

```
Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
1               5                  10                  15

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
            20                  25                  30

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
        35                  40                  45

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
    50                  55                  60

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
65                  70                  75                  80

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
                85                  90                  95

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
            100                 105                 110

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
        115                 120                 125

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
    130                 135                 140

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
145                 150                 155                 160

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
                165
```

<210> 79
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B4-1-1型式1之合成可變重鏈

<400> 79

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Val Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 80
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B4-1-1型式1之合成可變輕鏈

<400> 80

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Gln Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 81
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B4-1-1型式2之合成可變重鏈

<400> 81

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Val Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 82
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B4-1-1型式2之合成可變輕鏈

<400> 82

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Gln Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 83
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> H39E3-2之合成可變重鏈

<400> 83

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asp Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Asp Ile Lys Asn Asp Gly Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala
65 70 75 80

Pro Ser Leu Thr Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Leu Thr

115 120

<210> 84
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> H39E3-2之合成可變輕鏈

<400> 84

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Ser Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Arg Gln
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
100 105

<210> 85
<211> 277
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成人類OX40（智人）

<400> 85

```
Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1               5                  10                  15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
            20                  25                  30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
        35                  40                  45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
    50                  55                  60

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
65                  70                  75                  80

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
                85                  90                  95

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
            100                 105                 110

Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
        115                 120                 125

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
    130                 135                 140

Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
145                 150                 155                 160

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
                165                 170                 175

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
            180                 185                 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
```

195 200 205

Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
210 215 220

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
225 230 235 240

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
260 265 270

Thr Leu Ala Lys Ile
275

<210> 86
<211> 272
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成鼠類OX40（小家鼠）

<400> 86

Met Tyr Val Trp Val Gln Gln Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu
1 5 10 15

Thr Leu Gly Val Thr Ala Arg Arg Leu Asn Cys Val Lys His Thr Tyr
20 25 30

Pro Ser Gly His Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met
35 40 45

Val Ser Arg Cys Asp His Thr Arg Asp Thr Leu Cys His Pro Cys Glu
50 55 60

Thr Gly Phe Tyr Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys

65 70 75 80

Thr Gln Cys Asn His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr
85 90 95

Pro Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg
100 105 110

Gln Asp Ser Gly Tyr Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro
115 120 125

Gly His Phe Ser Pro Gly Asn Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn
130 135 140

Cys Thr Leu Ser Gly Lys Gln Thr Arg His Pro Ala Ser Asp Ser Leu
145 150 155 160

Asp Ala Val Cys Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu
165 170 175

Thr Gln Arg Pro Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Gln Ser Thr Thr Val
180 185 190

Trp Pro Arg Thr Ser Glu Leu Pro Ser Pro Pro Thr Leu Val Thr Pro
195 200 205

Glu Gly Pro Ala Phe Ala Val Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Leu
210 215 220

Ala Pro Leu Thr Val Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Lys Ala Trp
225 230 235 240

Arg Leu Pro Asn Thr Pro Lys Pro Cys Trp Gly Asn Ser Phe Arg Thr
245 250 255

Pro Ile Gln Glu Glu His Thr Asp Ala His Phe Thr Leu Ala Lys Ile
260 265 270

<210> 87
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔沃西單抗之合成重鏈

<400> 87

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
            20                  25                  30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
        35                  40                  45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65                  70                  75                  80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    130                 135                 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160
```

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 88
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔沃西單抗之合成輕鏈

<400> 88

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 89
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔沃西單抗之合成重鏈可變區

<400> 89

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr
115

<210> 90
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔沃西單抗之合成輕鏈可變區

<400> 90

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔沃西單抗之合成重鏈CDR1

<400> 91

Gly Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Trp Asn
1 5

<210> 92
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔沃西單抗之合成重鏈CDR2

<400> 92

Tyr Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His
1 5 10

<210> 93
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔沃西單抗之合成重鏈CDR3

<400> 93

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 94
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔沃西單抗之合成輕鏈CDR1

<400> 94

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5

<210> 95
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔沃西單抗之合成輕鏈CDR2

<400> 95

Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser
1 5 10

<210> 96
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔沃西單抗之合成輕鏈CDR3

<400> 96

Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
1 5

<210> 97
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4之合成重鏈

<400> 97

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 98
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4之合成輕鏈

<400> 98

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

```
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 99
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4之合成重鏈可變區

<400> 99

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 100
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4之合成輕鏈可變區

<400> 100

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4之合成重鏈CDR1

<400> 101

Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 102
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4之合成重鏈CDR2

<400> 102

Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4之合成重鏈CDR3

<400> 103

Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr
1 5

<210> 104
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4之合成輕鏈CDR1

<400> 104

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 105
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4之合成輕鏈CDR2

<400> 105

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 106

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4之合成輕鏈CDR3

<400> 106

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 107
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 18D8之合成重鏈

<400> 107

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
130 135 140

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
195 200 205

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
210 215 220

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 108
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 18D8之合成輕鏈

<400> 108

Glu Ile Val Val Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 109
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 18D8之合成重鏈可變區

<400> 109

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 110
<211> 106
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 18D8之合成輕鏈可變區

<400> 110

Glu Ile Val Val Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 111
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 18D8之合成重鏈CDR1

<400> 111

Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 112

<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 18D8之合成重鏈CDR2

<400> 112

Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 113
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 18D8之合成重鏈CDR3

<400> 113

Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 114
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 18D8之合成輕鏈CDR1

<400> 114

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 115
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 18D8之合成輕鏈CDR2

<400> 115

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 116
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 18D8之合成輕鏈CDR3

<400> 116

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
1 5

<210> 117
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu119-122之合成重鏈可變區

<400> 117

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
50 55 60

Glu Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 118
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu119-122之合成輕鏈可變區

<400> 118

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 119
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu119-122之合成重鏈CDR1

<400> 119

Ser His Asp Met Ser
1 5

<210> 120
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu119-122之合成重鏈CDR2

<400> 120

Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Glu
1 5 10 15

Arg

<210> 121
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu119-122之合成重鏈CDR3

<400> 121

His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 122

<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu119-122之合成輕鏈CDR1

<400> 122

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10 15

<210> 123
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu119-122之合成輕鏈CDR2

<400> 123

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 124
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu119-122之合成輕鏈CDR3

<400> 124

Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 125
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu106-222之合成重鏈可變區

<400> 125

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 126
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu106-222之合成輕鏈可變區

<400> 126

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 127
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu106-222之合成重鏈CDR1

<400> 127

Asp Tyr Ser Met His
1 5

<210> 128
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu106-222之合成重鏈CDR2

<400> 128

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 129
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu106-222之合成重鏈CDR3

<400> 129

Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 130
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu106-222之合成輕鏈CDR1

<400> 130

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 131
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu106-222之合成輕鏈CDR2

<400> 131

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr
1 5

<210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu106-222之合成輕鏈CDR3

<400> 132

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
1 5

<210> 133
<211> 183
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成OX40L

<400> 133

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg
1 5 10 15

Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln
20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser
35 40 45

Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val
50 55 60

Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln
65 70 75 80

Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn
85 90 95

Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu
100 105 110

Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln
115 120 125

Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr
130 135 140

Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu
145 150 155 160

Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
165 170 175

Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
180

<210> 134
<211> 131
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成OX40L可溶域

<400> 134

Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu
1 5 10 15

Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu
20 25 30

Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe
35 40 45

Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser
50 55 60

Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val
65 70 75 80

Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys
85 90 95

Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His
100 105 110

Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe
115 120 125

Cys Val Leu
130

<210> 135
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成OX40L可溶域（可替代）

<400> 135

Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys
1 5 10 15

Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys
20 25 30

Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile
35 40 45

Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr
50 55 60

Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg Ser Val
65 70 75 80

Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu
85 90 95

Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly
100 105 110

Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
115 120 125

<210> 136
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 008之合成可變重鏈

<400> 136

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Arg Tyr Ser Gln Val His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 137
<211> 108
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 008之合成可變輕鏈

<400> 137

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Ala Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
85 90 95

Tyr Asn His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 138
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 011之合成可變重鏈

<400> 138

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Arg Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80

Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95

Asp Arg Tyr Phe Arg Gln Gln Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 139
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 011之合成可變輕鏈

<400> 139

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Ala Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
85 90 95

Tyr Asn His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 140
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 021之合成可變重鏈

<400> 140

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Arg Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Arg Tyr Ile Thr Leu Pro Asn Ala Leu Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 141
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 021之合成可變輕鏈

<400> 141

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Val Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
85 90 95

Lys Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 142
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 023之合成可變重鏈

<400> 142

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Gly Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Met
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Asp Asn Val Met Gly Leu Tyr Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 143
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 023之合成可變輕鏈

<400> 143

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 144
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成重鏈可變區

<400> 144

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 145
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成輕鏈可變區

<400> 145

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 146
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成重鏈可變區

<400> 146

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Phe Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Gly Tyr His Gly Pro His Leu Asp Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Pro
115 120

<210> 147
<211> 108
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成輕鏈可變區

<400> 147

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ala Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Thr Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ile Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 148
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體之合成重鏈可變區

<400> 148

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly His Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 149
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體之合成重鏈可變區

<400> 149

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 150
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體之合成輕鏈可變區

<400> 150

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 151
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體之合成輕鏈可變區

<400> 151

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 152
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體之合成重鏈可變區

<400> 152

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ser Asn Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Lys Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
50 55 60

Glu Arg Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Lys Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 153
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體之合成重鏈可變區

<400> 153

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
50 55 60

Glu Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 154
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體之合成輕鏈可變區

<400> 154

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 155
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體之合成輕鏈可變區

<400> 155

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 156
<211> 138
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成重鏈可變區

<400> 156

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly
1 5 10 15

Val Gln Ser Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr
65 70 75 80

Tyr Ala Glu Ser Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
85 90 95

Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Trp Gly Glu Val Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 157
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成輕鏈可變區

<400> 157

Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His
1 5 10 15

Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Asp
35 40 45

Ile Asn Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser
85 90 95

Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp
100 105 110

Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

<210> 158
<211> 440
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成納武單抗重鏈

<400> 158

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 159
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成納武單抗輕鏈

<400> 159

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 160
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成納武單抗可變重鏈

<400> 160

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 161
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成納武單抗可變輕鏈

<400> 161

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 162
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成納武單抗重鏈CDR1

<400> 162

Asn Ser Gly Met His
1 5

<210> 163
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成納武單抗重鏈CDR2

<400> 163

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 164
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成納武單抗重鏈CDR3

<400> 164

Asn Asp Asp Tyr
1

<210> 165
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成納武單抗輕鏈CDR1

<400> 165

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 166
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成納武單抗輕鏈CDR2

<400> 166

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 167
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成納武單抗輕鏈CDR3

<400> 167

Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 168

<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成帕博利珠單抗重鏈

<400> 168

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                  10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
    130                 135                 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
```

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 169
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成帕博利珠單抗輕鏈

<400> 169

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 170
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成帕博利珠單抗可變重鏈

<400> 170

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 171
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成帕博利珠單抗可變輕鏈

<400> 171

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 172
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成帕博利珠單抗重鏈CDR1

<400> 172

Asn Tyr Tyr Met Tyr
1 5

<210> 173
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成帕博利珠單抗重鏈CDR2

<400> 173

Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

<210> 174
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成帕博利珠單抗重鏈CDR3

<400> 174

Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 175
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成帕博利珠單抗輕鏈CDR1

<400> 175

Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 176
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成帕博利珠單抗輕鏈CDR2

<400> 176

Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
1 5

<210> 177
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成帕博利珠單抗輕鏈CDR3

<400> 177

Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 178
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成德瓦魯單抗重鏈

<400> 178

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 179
<211> 265
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成德瓦魯單抗輕鏈

<400> 179

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser

50 55 60

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser
65 70 75 80

Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
85 90 95

Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
100 105 110

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
115 120 125

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser
130 135 140

Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
145 150 155 160

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
165 170 175

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
180 185 190

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
195 200 205

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
210 215 220

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
225 230 235 240

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
245 250 255

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
260 265

<210> 180
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成德瓦魯單抗可變重鏈

<400> 180

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 181
<211> 108
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成德瓦魯單抗可變輕鏈

<400> 181

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 182
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成德瓦魯單抗重鏈CDR1

<400> 182

Arg Tyr Trp Met Ser
1 5

<210> 183

<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成德瓦魯單抗重鏈CDR2

<400> 183

Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 184
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成德瓦魯單抗重鏈CDR3

<400> 184

Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 185
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成德瓦魯單抗輕鏈CDR1

<400> 185

Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 186
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成德瓦魯單抗輕鏈CDR2

<400> 186

Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 187
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成德瓦魯單抗輕鏈CDR3

<400> 187

Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 188
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿維魯單抗重鏈

<400> 188

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 189

<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿維魯單抗輕鏈

<400> 189

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr

165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 190
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿維魯單抗可變重鏈

<400> 190

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 191
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿維魯單抗可變輕鏈

<400> 191

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 192
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿維魯單抗重鏈CDR1

<400> 192

Ser Tyr Ile Met Met
1 5

<210> 193
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿維魯單抗重鏈CDR2

<400> 193

Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 194
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿維魯單抗重鏈CDR3

<400> 194

Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr
1 5 10

<210> 195
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿維魯單抗輕鏈CDR1

<400> 195

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 196
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿維魯單抗輕鏈CDR2

<400> 196

Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 197
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿維魯單抗輕鏈CDR3

<400> 197

Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Arg Val
1 5 10

<210> 198
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿特珠單抗重鏈

<400> 198

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30

```
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
        115                 120                 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
    130                 135                 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
                165                 170                 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
            180                 185                 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
        195                 200                 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
    210                 215                 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
```

225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 199
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿特珠單抗輕鏈

<400> 199

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 200
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿特珠單抗可變重鏈

<400> 200

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 201
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿特珠單抗可變輕鏈

<400> 201

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 202
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿特珠單抗重鏈CDR1

<400> 202

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 203
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿特珠單抗重鏈CDR2

<400> 203

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 204
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿特珠單抗重鏈CDR3

<400> 204

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 205
<211> 11
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿特珠單抗輕鏈CDR1

<400> 205

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 206
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿特珠單抗輕鏈CDR2

<400> 206

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 207
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成阿特珠單抗輕鏈CDR3

<400> 207

Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr
1 5

<210> 208
<211> 225
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成伊匹木單抗重鏈

<400> 208

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His
225

<210> 209
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成伊匹木單抗輕鏈

<400> 209

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 210
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成伊匹木單抗可變重鏈

<400> 210

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 211
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成伊匹木單抗可變輕鏈

<400> 211

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 212
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成伊匹木單抗重鏈CDR1

<400> 212

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr
1 5

<210> 213
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成伊匹木單抗重鏈CDR2

<400> 213

Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys
1 5 10

<210> 214
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成伊匹木單抗重鏈CDR3

<400> 214

Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 215
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成伊匹木單抗輕鏈CDR1

<400> 215

Gln Ser Val Gly Ser Ser Tyr
1 5

<210> 216
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成伊匹木單抗輕鏈CDR2

<400> 216

Gly Ala Phe
1

<210> 217
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成伊匹木單抗輕鏈CDR3

<400> 217

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 218
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成曲美單抗重鏈

<400> 218

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
130 135 140

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys
195 200 205

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu
210 215 220

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 219
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成曲美單抗輕鏈

<400> 219

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 220
<211> 167
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成曲美單抗可變重鏈

<400> 220

Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
1 5 10 15

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
20 25 30

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn

35 40 45

Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
50 55 60

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
65 70 75 80

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu
85 90 95

Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165

<210> 221
<211> 139
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成曲美單抗可變輕鏈

<400> 221

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
1 5 10 15

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys

20 25 30

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
50 55 60

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
85 90 95

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
100 105 110

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
115 120 125

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
130 135

<210> 222
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成曲美單抗重鏈CDR1

<400> 222

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
1 5 10

<210> 223
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成曲美單抗重鏈CDR2

<400> 223

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

<210> 224
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成曲美單抗重鏈CDR3

<400> 224

Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 225
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成曲美單抗輕鏈CDR1

<400> 225

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp
1 5 10

<210> 226
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成曲美單抗輕鏈CDR2

<400> 226

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 227
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成曲美單抗輕鏈CDR3

<400> 227

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 228
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成澤弗利單抗重鏈

<400> 228

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

```
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305                 310                 315                 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
                325                 330                 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
            340                 345                 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
        355                 360                 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
    370                 375                 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385                 390                 395                 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
                405                 410                 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
            420                 425                 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445
```

<210> 229
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成澤弗利單抗輕鏈

<400> 229

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                   10                  15
```

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 230
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成澤弗利單抗可變重鏈

<400> 230

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 231
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成澤弗利單抗可變輕鏈

<400> 231

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 232
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成澤弗利單抗重鏈CDR1

<400> 232

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser
1 5

<210> 233
<211> 8
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成澤弗利單抗重鏈CDR3

<400> 233

Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile
1 5

<210> 234
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成澤弗利單抗重鏈CDR3

<400> 234

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 235
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成澤弗利單抗輕鏈CDR1

<400> 235

Gln Ser Val Ser Arg Tyr
1 5

<210> 236
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成澤弗利單抗輕鏈CDR2

<400> 236

Gly Ala Ser

1

<210> 237
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成澤弗利單抗輕鏈CDR3

<400> 237

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種確定TIL效力之方法，該方法包括以下步驟：

a. 將目標細胞與TIL細胞進行持續第一時段的共培養；

b. 自該共培養獲得收集物或萃取上清液；以及

c. 評估(1)該收集物中一或多個標記物在該TIL細胞上的表現或(2)該上清液中一或多個自該TIL細胞分泌之分析物，以獲得一個或多個觀測值來判定該TIL之該效力。

【請求項2】如請求項1之方法，該方法包括以下另外的步驟：

d. 將包括(i)陰性對照細胞之陰性對照與該目標細胞進行第二次共培養，或將包括(ii)人類白血球抗原(HLA)阻斷抗體之陰性對照與該TIL細胞及該目標細胞進行持續第二時段的第二次共培養，此第二時段視情況與該第一時段同時發生；

e. 自該第二次共培養獲得第二收集物或萃取第二上清液；

f. 評估(1)該第二收集物中一或多個標記物在該TIL細胞上的表現或(2)該第二上清液中一或多個自該TIL細胞分泌之分析物，以獲得一個或多個對照值；以及

g. 將來自步驟c之該一或多個觀測值與來自步驟f之

該一或多個對照值進行比較，其中將各觀測值或觀測值集合與對應的對照值或對照值集合進行比較，以確定該TIL之該效力。

【請求項3】如請求項1至2中任一項之方法，其中該TIL選自由以下組成之群組：腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)產物、骨髓浸潤性淋巴球(MIL)產物或末梢血液淋巴球(PBL)產物，其中該方法視情況進一步包括將冷凍保存之TIL產物、MIL產物或PBL產物解凍之步驟。

【請求項4】如請求項1至3中任一項之方法，其中該TIL為來自人類之TIL產物，且其中該TIL產物係藉由切除腫瘤或腫瘤碎斷或碎解而獲得的，並且係藉由包括快速擴增方案步驟之TIL擴增過程製造的。

【請求項5】如請求項1至4中任一項之方法，其進一步包括釋放該TIL以用於治療人類患者之步驟。

【請求項6】如請求項1至5中任一項之方法，其中該目標細胞係選自由以下組成之群組：單核球細胞、B類淋巴母細胞、伯基特氏淋巴瘤細胞、Raji細胞、Thp1細胞、Ramos細胞、U937細胞、Daudi細胞及其衍生物、變體、修飾或後代及其組合，其中此類目標細胞或其組合視情況經輻照，並且其中該目標細胞或其組合視情況對該TIL、MIL或PBL產物具有同種異體反應性。

【請求項7】如請求項2至6中任一項之方法，其中該陰性對照細胞缺乏MHC或HLA I類及MHC或HLA II類表現。

【請求項8】如請求項7之方法，其中該陰性對照細胞為K562細胞或其衍生物、變體、修飾或後代，其中此類陰性對照細胞視情況經輻照。

【請求項9】如請求項2至8中任一項之方法，其中TIL產物細胞之數目與目標細胞之數目之間的比率在5:1與1:5之間，且其中TIL產物細胞之數目與陰性對照細胞之數目之間的比率在5:1與1:5之間。

【請求項10】如請求項2至8中任一項之方法，其中TIL產物細胞之數目與陰性對照細胞之數目之間的比率在1:2與1:4之間，且其中TIL產物細胞之數目與陰性對照細胞之數目之間的比率在1:2與1:4之間。

【請求項11】如請求項1至10中任一項之方法，其中該第一時段為約6小時至約48小時。

【請求項12】如請求項1至11中任一項之方法，其中該第二時段為約6小時至約48小時。

【請求項13】如請求項1至12中任一項之方法，其中該第一時段選自由以下組成之群組：約12小時、約18小時及約24小時。

【請求項14】如請求項1至13中任一項之方法，其中該第二時段選自由以下組成之群組：約12小時、約18小時及約24小時。

【請求項15】如請求項1至14中任一項之方法，其中該TIL上的該一個或多個標記物選自由以下組成之群組：CD25、CD69、CD134、CD137、CD150、KLRG1或其組

合。

【請求項16】如請求項1至15中任一項之方法，其中該一種或多種自該TIL分泌之分析物選自由以下組成之群組：2]IFN-α、IFN-β、IFN-γ、顆粒酶B、穿孔素、TNF-α、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、IL-13、IL-14、IL-16、IL-17、IL-18、IL-22、IL-25、IL-26、MIP-1β及其組合。

【請求項17】如請求項4至15中任一項之方法，其中該一種或多種自該TIL產物分泌之分析物選自由以下組成之群組：IFN-α、IFN-β、IFN-γ、顆粒酶B、穿孔素、TNF-α、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、IL-13、IL-14、IL-16、IL-17、IL-18、IL-22、IL-25、IL-26、MIP-1β及其組合，其中對於該一種或多種分析物的每一種分析物，以該對照值數量標準化該觀測值數量，並且其中該一種或多種分析物中的每一種分析物的該觀測值相對於該對照值的增加選自由以下組成之群組：至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少3.5倍、至少4倍、至少4.5倍及至少5倍。

【請求項18】如請求項4至17中任一項之方法，其中該TIL產物係由藉由手術切除、穿刺生檢、核心生檢、小型生檢或其他用於自人類患者獲得含有腫瘤與TIL細胞之混合物之樣本的手段獲得的腫瘤製造的。

【請求項19】一種用腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體治療有需要患者之癌症的方法，該方法包括以下步驟：

(a) 藉由將獲自該患者之腫瘤樣本處理成(i)多個腫瘤碎片或(ii)腫瘤碎解物，獲得及/或接收來自藉由手術切除、穿刺生檢、核心生檢、小型生檢或其他手段自該患者切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包括IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3至14天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(d) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7至14天以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該治療性TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(f) 將來自步驟(e)之該治療性TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放該系

統的情況下進行；

(g) 視情況冷凍保存來自步驟(f)的包括該治療性TIL群體的該輸注袋；

(h) 藉由以下方式測定該治療性TIL群體之效力：

i. 若包括治療性TIL群體的該輸注袋在步驟(g)中視情況冷凍保存，則視情況解凍包括該治療性TIL群體的該輸注袋；

ii. 將目標細胞與該治療性TIL群體的一部分進行持續第一時段的共培養；

iii. 自該共培養中獲得收集物或上清液；

iv. 評估(1)該收集物中一個或多個標記物在該治療性TIL群體之該部分上的表現或(2)該上清液中該一個或多個自該治療性TIL群體之該部分分泌的分析物，以獲得一個或多個觀測值來確定該治療性TIL群體的效力；

v. 將(i)陰性對照細胞與該治療性TIL群體之該部分或(ii)人類白血球抗原(HLA)阻斷抗體與該治療性TIL群體之第二部分及該目標細胞進行持續第二時段的第二次共培養；

vi. 自該第二次共培養獲得第二收集物或第二上清液；

vii. 評估(1)該第二收集物中一個或多個標記物在該治療性TIL群體之該第二部分上的表現或(2)該第二上清液中一個或多個自該治療性TIL群體之該第

二部分分泌的分析物，以獲得一個或多個對照值；及

viii. 將該一個或多個觀測值與該一個或多個對照值進行比較，其中將各觀測值與其對應的對照值進行比較，以確定該治療性TIL群體之效力；以及

(i) 若確定該治療性TIL群體有效，則向該患者投予治療有效劑量之來自步驟(f)或((g)中之該輸注袋的該治療性TIL群體。

【請求項20】如請求項19之方法，其中檢查所收集之該TIL的效力及/或功能性在冷凍保存之後進行，或視情況在冷凍保存步驟之前及之後進行。

【請求項21】如請求項19至20中任一項之方法，其中該患者具有不可切除、轉移性、耐藥或難以用CTLA-4抑制劑、PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑治療的腫瘤，且視情況其中該患者先前已用CTLA-4抑制劑、PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑進行治療。

【請求項22】如請求項19至21中任一項之方法，其中步驟(c)中之該第二TIL群體在數目上比該第一TIL群體大至少50倍。

【請求項23】如請求項19至22中任一項之方法，其中該第一次擴增在約10至約12天的時段內進行。

【請求項24】如請求項19至23中任一項之方法，其中該第二次擴增在約10至約12天之時段內進行。

【請求項25】如請求項19至24中任一項之方法，其中

該第一次擴增在約11天之時段內進行。

【請求項26】如請求項19至25中任一項之方法，其中該第二次擴增在約11天之時段內進行。

【請求項27】如請求項19至26中任一項之方法，其中該IL-2在該第一次擴增中以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在於該細胞培養基中。

【請求項28】如請求項19至27中任一項之方法，其中在該第二次擴增步驟中，該IL-2以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在且該OKT-3抗體以約30 ng/mL之初始濃度存在。

【請求項29】如請求項19至28中任一項之方法，其進一步包括以下步驟：在向該患者投予該等TIL之前，用非骨髓清除式淋巴球耗盡方案治療該患者。

【請求項30】如請求項29之方法，其中該非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺兩天，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱五天。

【請求項31】如請求項30之方法，其中該非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包括以下步驟：持續兩天以60毫克/平方公尺/天之劑量投予環磷醯胺及以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱，然後以25毫克/平方公尺/天之劑量投予氟達拉濱三天。

【請求項32】如請求項19至31中任一項之方法，其進一步包括以下步驟：始於向該患者投予該治療性TIL群體

之後的第二天，用IL-2方案治療該患者。

【請求項33】如請求項19至31中任一項之方法，其進一步包括以下步驟：始於向該患者投予該治療性TIL群體的同一天，用IL-2方案治療該患者。

【請求項34】如請求項33之方法，其中在完成向該患者投予該治療性TIL群體之後約3至約24小時投予該IL-2方案。

【請求項35】如請求項33至34中任一項之方法，其中該IL-2方案為包括600,000或720,000 IU/kg阿地介白素或其生物類似物或變體之高劑量IL-2方案，其以每八小時15分鐘的推注靜脈內輸注形式投予直至耐受為止。

【請求項36】如請求項19至35中任一項之方法，其中在步驟(a)中將獲自該患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物進一步包括在酶素性培養基中培育該腫瘤樣本。

【請求項37】如請求項19至36中任一項之方法，其中在步驟(a)中將獲自該患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物進一步包括以機械方式破壞該腫瘤樣本以便分解該腫瘤樣本。

【請求項38】如請求項19至37中任一項之方法，其中在步驟(a)中將獲自該患者之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物進一步包括使用密度梯度分離純化該經分解的腫瘤樣本。

【請求項39】如請求項36之方法，其中該酶素性培養基包括DNase。

【請求項40】如請求項39之方法，其中該酶培素性養

基包括約30單位/毫升之DNase。

【請求項41】如請求項36之方法，其中該酶素性培養基包括膠原蛋白酶。

【請求項42】如請求項41之方法，其中該酶素性培養基包括約1.0 mg/mL之膠原蛋白酶。

【請求項43】如請求項19至42中任一項之方法，其中該癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、胰臟癌、子宮內膜癌、甲狀腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、乳癌、頭頸癌、神經膠母細胞瘤、胃腸癌、腎癌、肉瘤及腎細胞癌。

【請求項44】如請求項19至43中任一項之方法，其進一步包括向該患者投予PD-1抑制劑、PD-L1抑制劑或CTLA-4抑制劑之步驟。

【請求項45】一種T細胞產物之效力的方法，該方法包括以下步驟：

e. 將目標細胞與T細胞產物細胞在不同目標細胞濃度下進行至少三次共培養；

f. 將目標細胞與T細胞參考標準細胞在不同目標細胞濃度下進行至少三次共培養；

g. 自該等共培養中之每次共培養中萃取上清液；以及

h. 評估該等上清液中自該等T細胞產物細胞及T細胞參考標準細胞分泌的細胞介素，以獲得劑量濃度，從而確定該T細胞產物之該效力；

其中該等目標細胞係單核球細胞。

【請求項46】如請求項45之方法，其中該T細胞產物係腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)產物、骨髓浸潤性淋巴球(MIL)產物或末梢血液淋巴球(PBL)產物。

【請求項47】如請求項45至46中任一項之方法，其中該等單核球細胞為U937或Thp1細胞，或其衍生物、變體、修飾或後代，且其中該細胞介素為干擾素-γ。

【請求項48】如請求項47之方法，其中該共培養物進行選自由以下組成之群組的時段：約6小時、約12小時、約18小時、約24小時、約30小時、約36小時、約42小時及約48小時。

【請求項49】如請求項48之方法，其中該T細胞產物為TIL產物，且其中使用約4×10^5、約2×10^5、約1×10^5及約0.5×10^5個目標細胞/孔之四種目標細胞劑量濃度及約1.5×10^6個TIL/孔之單一TIL細胞濃度。

【請求項50】如請求項49之方法，其中使用目標細胞與T細胞產物細胞之至少四種共培養物及目標細胞與T細胞參考標準細胞之至少四種共培養物，進行平行線分析，並且丟棄一個離群值目標細胞劑量濃度。

【請求項51】如請求項50之方法，其中該方法係效力測定分析矩陣之組成部分。

【請求項52】如請求項51之方法，其中該效力測定矩陣包括一種或多種選自由以下組成之群組的測定：使用CD3、CD28及/或CD137刺激並報告干擾素γ、顆粒酶B或

腫瘤壞死因子-α的基於珠粒或基於培養盤的測定；總活細胞測定；活細胞百分比測定；CD4+細胞含量測定；CD8+細胞含量測定；T_{EM}細胞含量測定；T_{CM}細胞含量測定；LAG3+細胞含量測定；及KLRG1+細胞含量測定；CD101+細胞含量測定；CD69+細胞含量測定；T_{SCM}細胞含量測定；T_{EMRA}細胞含量測定；T_{reg}細胞含量測定；PD-1+細胞含量測定；TIM3+細胞含量測定；CD25+細胞含量測定；CD27+細胞含量測定；CD28+細胞含量測定；CD56+細胞含量測定；CTLA-4+細胞含量測定；TIGIT+細胞含量測定；以及CD57+細胞含量測定。

【請求項53】一種用於治療患有癌症之個體的方法，該方法包括投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，該方法包括：

(a) 將腫瘤碎解物或腫瘤碎片添加至密閉系統中，其中該腫瘤碎解物或腫瘤碎片包括第一TIL群體且係獲自自該個體切除之腫瘤；

(b) 藉由在包括IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(c) 藉由補充包括IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之額外細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三

TIL群體，其中該第二擴增係進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放該系統的情況下進行；

(d) 收集自步驟(c)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(e) 將自步驟(d)收集的該第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(d)轉移至(e)係在不開放該系統之情況下進行；

(f) 使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(e)的包括該所收集TIL群體的該輸注袋；以及

(g) 向該個體投予治療有效劑量的來自步驟(f)中之該輸注袋的該第三TIL群體；

其中該等APC係選自由以下組成之群組：Raji、Ramos、Daudi、U937或Thp1細胞或其衍生物、變體、修飾或後代。

【請求項54】如請求項53之方法，其中該癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤(包含轉移性黑色素瘤及葡萄膜黑色素瘤)、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、小細胞肺癌、膀胱癌、乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包含頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、食道癌、食道胃交界處癌症、胃癌、胃腸

癌、腎癌及腎細胞癌。

【請求項55】如請求項54之方法，其中步驟(a)中之該第一次擴增及步驟(b)中之該第二次擴增各自單獨地在11天之時段內進行。

【請求項56】如請求項54之方法，其中步驟(a)至(d)在約10天至約22天內進行。

【請求項57】如請求項53至56中任一項之方法，其中該等TIL之效力已使用如請求項1至18中任一項或如請求項45至52中任一項之方法測定。

【請求項58】如請求項19至44中任一項之方法，其中該等TIL之效力已使用如請求項1至18中任一項或如請求項45至52中任一項之方法測定。

(發明圖式)

[illegible]

[illegible]

1. [illegible]

[illegible]

2. [illegible]

[illegible]

3. [illegible]

[illegible]

4. [illegible]

[illegible]

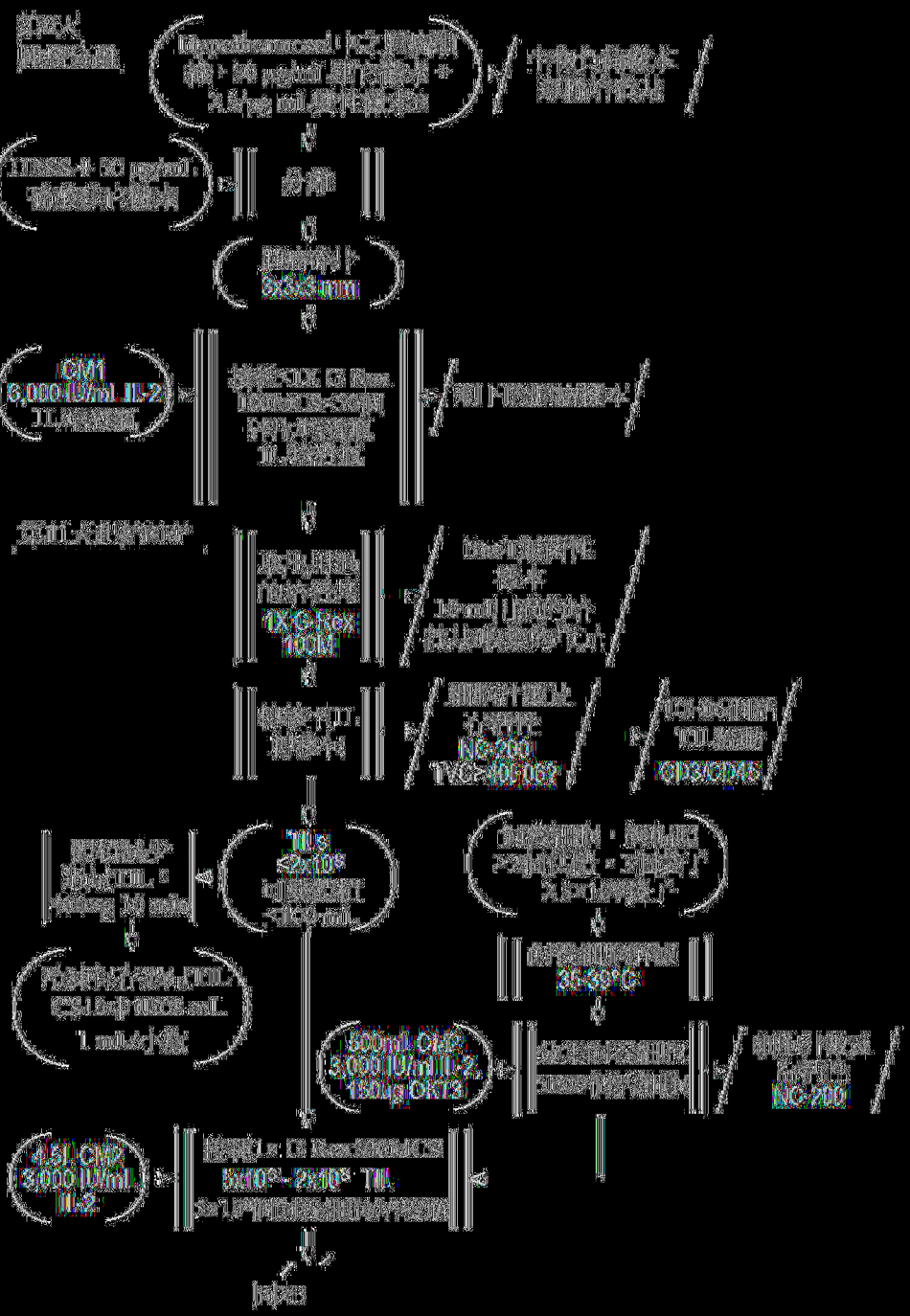
5. [illegible]

[illegible]

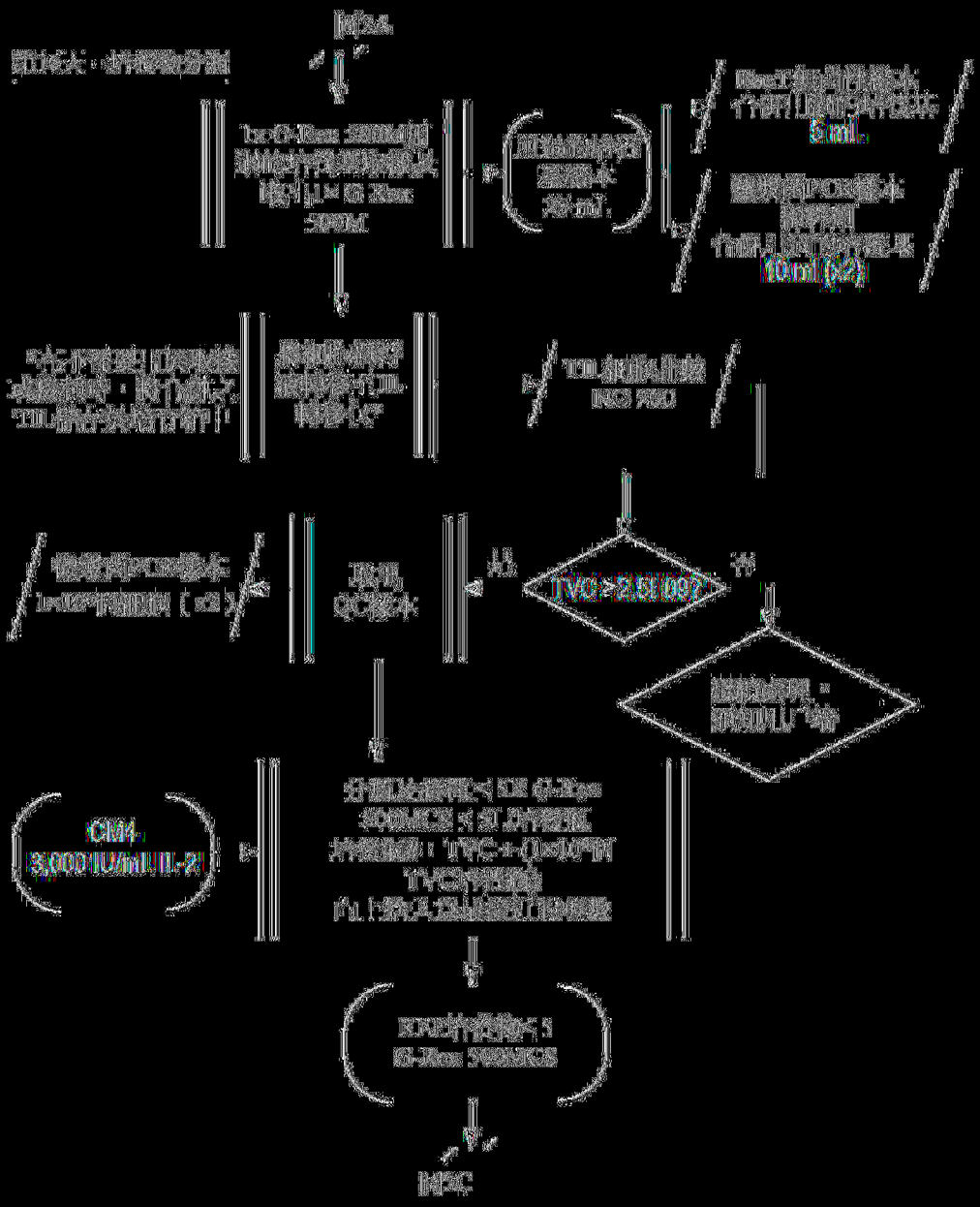
6. [illegible]

[illegible]

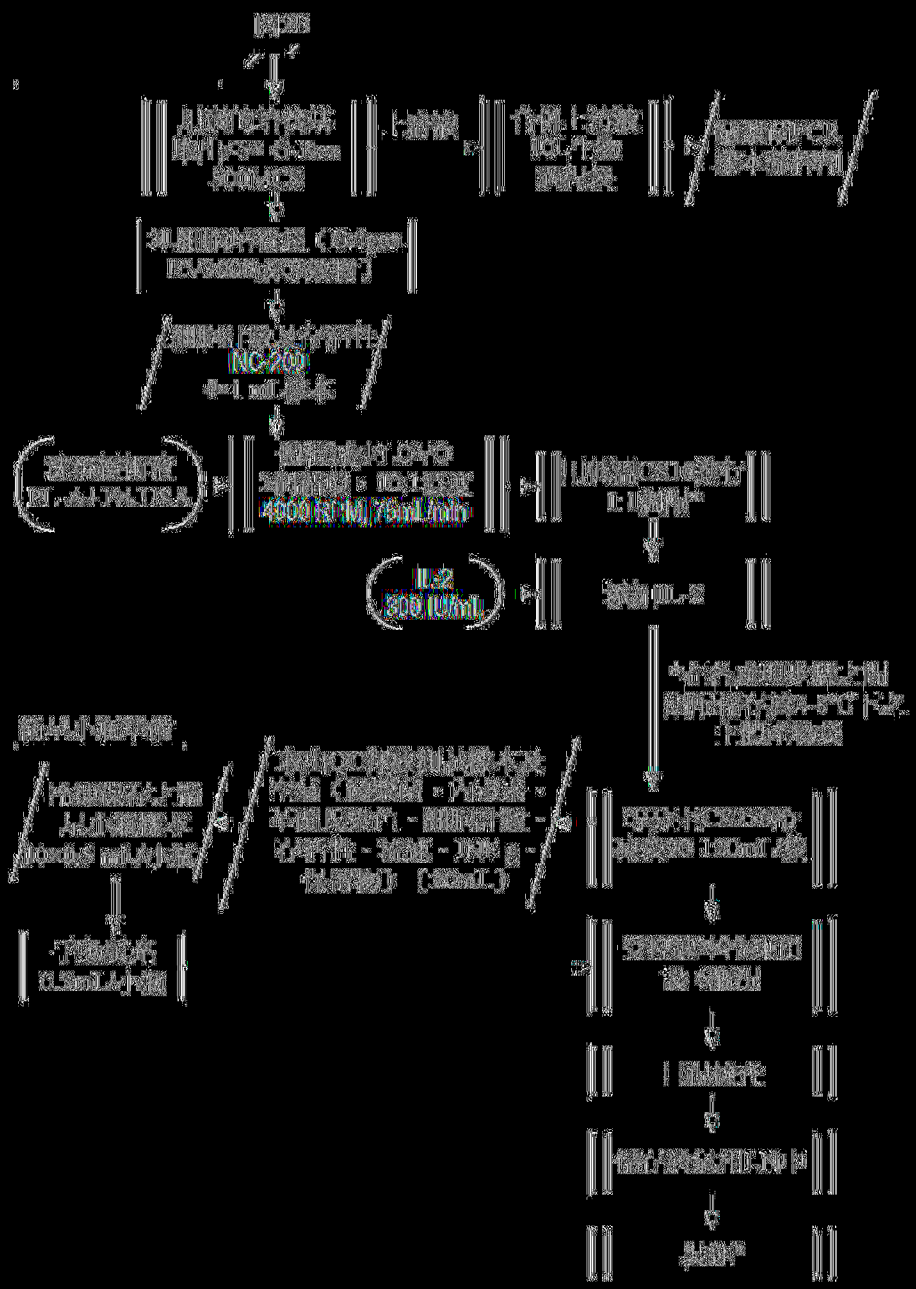
(圖 1)



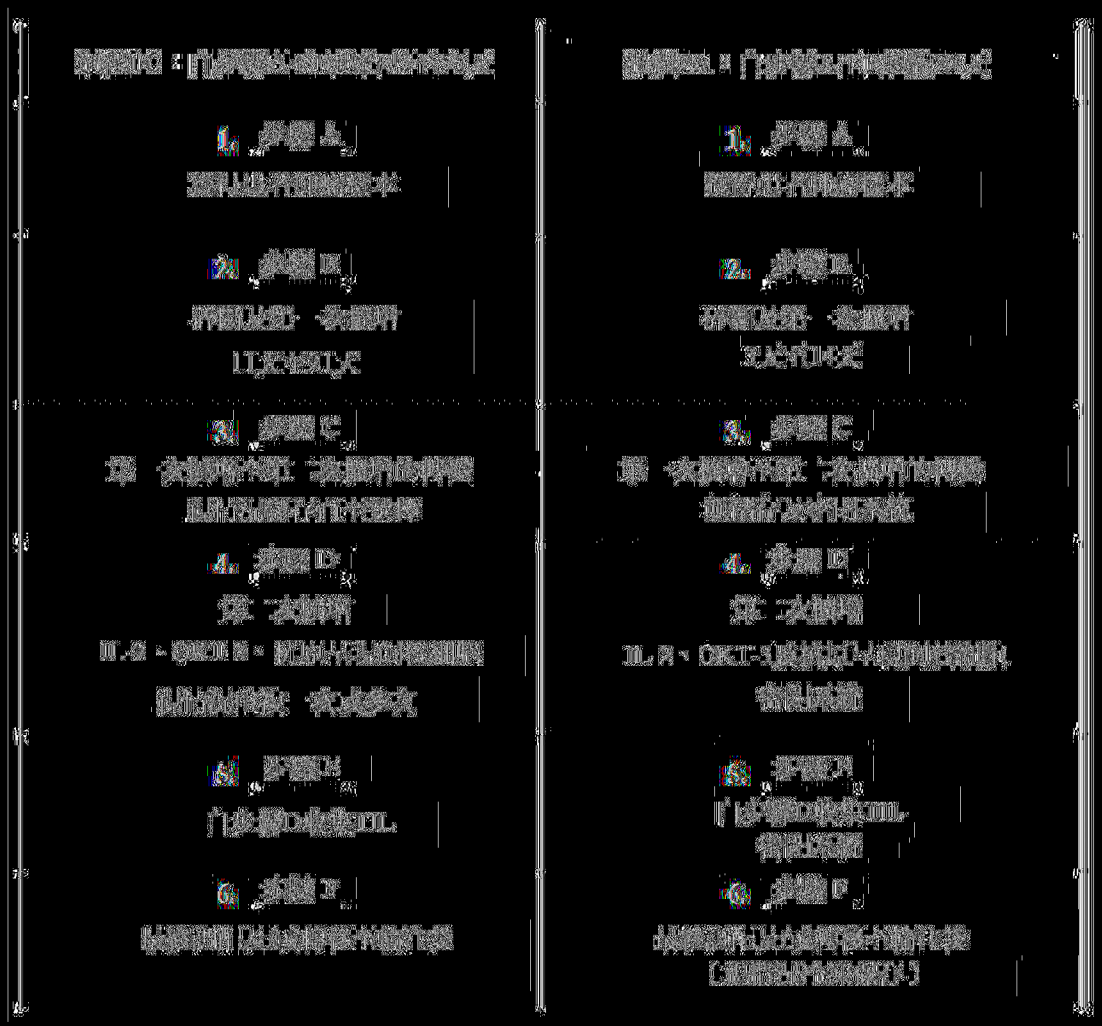
(圖 2A)



(圖 2B)



(圖 2C)



(圖 5)

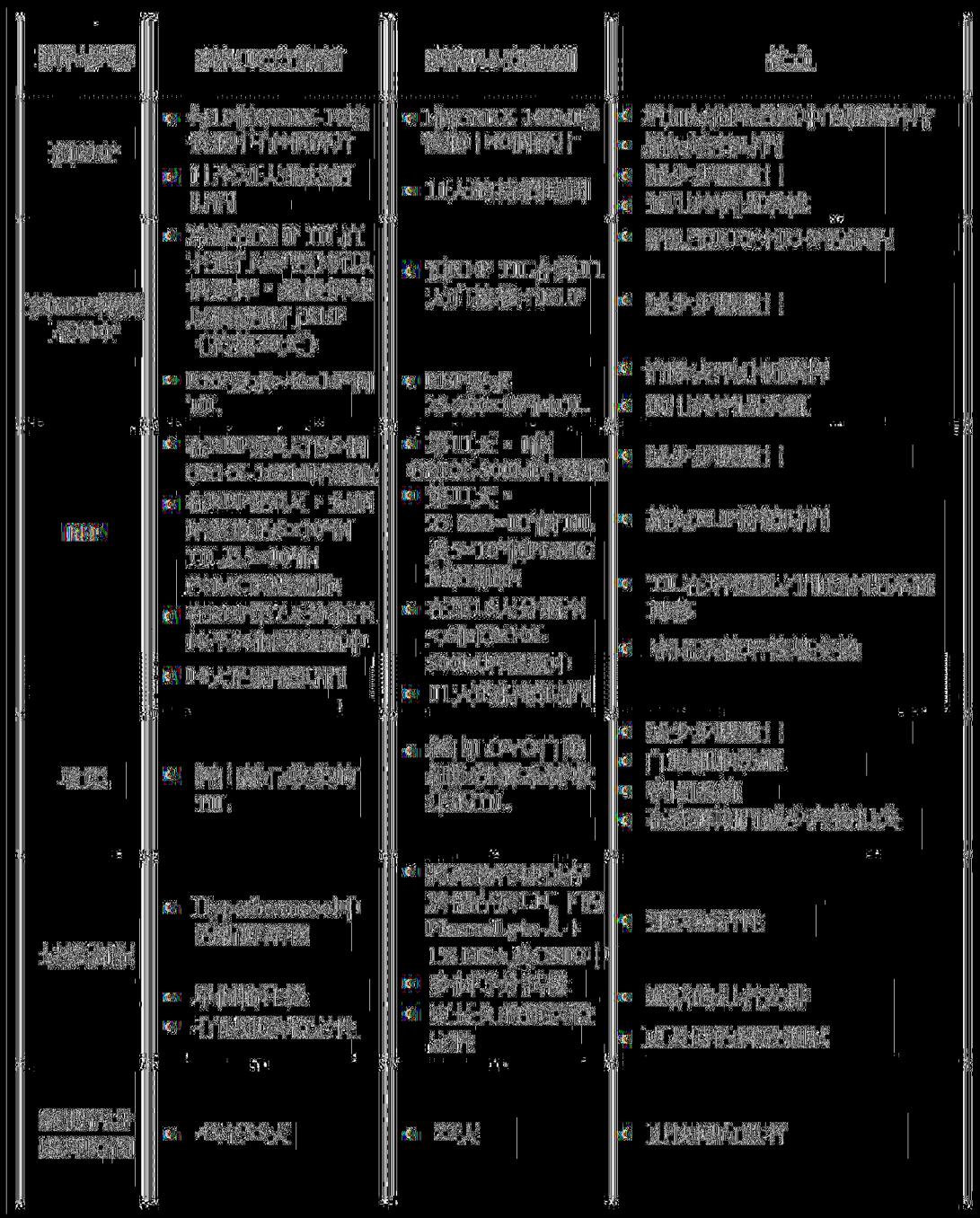
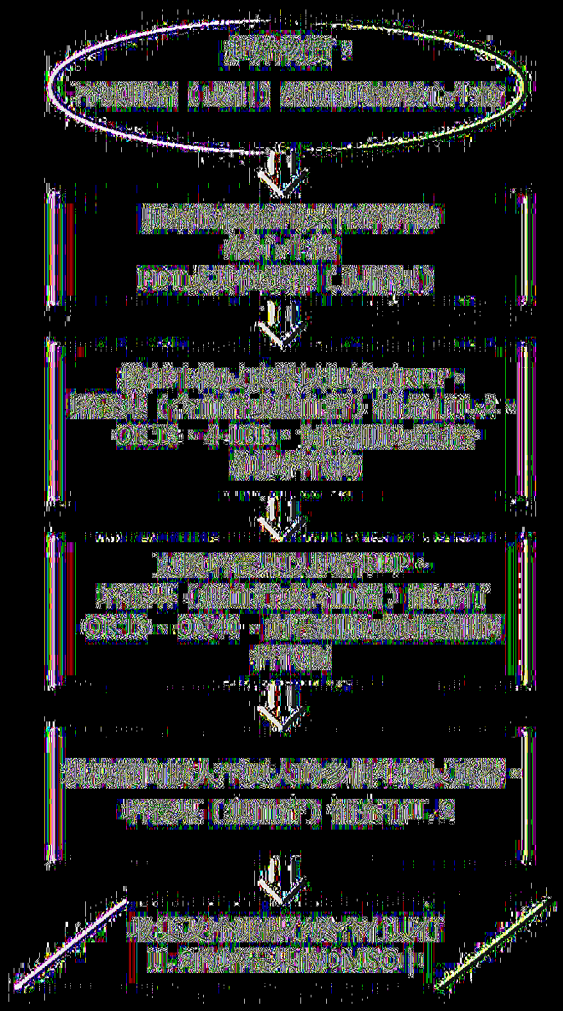


圖 6



|(圖 7)|

實例2A/Gen 2：自步驟A約開始22天	實例Gen 3：自步驟A約開始14至18天
步驟 A 獲得患者腫瘤樣本 （視情況可以在步驟B之前冷凍）	步驟 A 獲得患者腫瘤樣本 （視情況可以在步驟B之前冷凍）
步驟 B 第一次擴增 （對用IL-2之培養基生長約3天至14天的每個容器至少40個碎片進行物理碎斷）	步驟 B 初始第一次擴增 （對用IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞之培養基生長約1天至7天的每個容器至多60個碎片進行物理碎斷）
步驟 C 第一次擴增至第二次擴增之轉變 （視情況在步驟B第11天，步驟B TIL直接移至步驟D）	步驟 C 初始第一次擴增至快速第二次擴增之轉變 （步驟B TIL在第7天直接移至步驟D）
步驟 D 第二次擴增 （在密閉容器中IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞之生長培養基中生長的TIL）	步驟 D 快速第二次擴增 （在IL-2、OKT-3及2X抗原呈現飼養細胞之生長培養基中生長的TIL；第10至11天規模縱向擴大且添加另外的IL-2）
步驟 E 自步驟D收集TIL （經由密閉系統收集之TIL）	步驟 E 自步驟D收集TIL
步驟 F 檢查來自步驟E之TIL的效力及成功能性	步驟 F 檢查來自步驟E之TIL的效力及成功能性
步驟 G 最終調配及成型移至輸注袋 （視情況冷凍保存）	步驟 G 最終調配及成型移至輸注袋 （視情況冷凍保存）

圖 8A

調配Gen 3：自步驟A至步驟J約14至18天

步驟 A

獲得患者腫瘤樣本

（視情況可以在步驟B之前冷凍）

步驟 B

初始第一次擴增

（對自TIL、2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞之培養基生長約1天至7天的每個容器至多60個碎片進行物理碎斷）

步驟 C

初始第一次擴增至快速第二次擴增之轉變

（步驟B TIL在第7天直接移至步驟D）

步驟 D

快速第二次擴增

（在TIL、2、OKT-3及2X抗原呈現飼養細胞之生長培養基中生長的TIL；第10至11天期模組向擴大且添加另外的IL-2）

步驟 E

自步驟D收集TIL

步驟 F

檢查來自步驟E之TIL的效力及成功能性

步驟 G

最終調配及/或轉移至輸注袋

（視情況冷凍保存）

|（圖 8B）|

實施例Gen 3.0： 門步驟A冷凍週期14至18天	實施例Gen 3.1對照： 門步驟A冷凍週期14至18天	實施例Gen 3.1測試F： 門步驟A冷凍週期14至18天
步驟 A 獲得患者腫瘤樣本 （視情況可以在步驟B之前冷凍）	步驟 A 獲得患者腫瘤樣本 （視情況可以在步驟B之前冷凍）	步驟 A 獲得患者腫瘤樣本 （視情況可以在步驟B之前冷凍）
步驟 B 初始第一次擴增 （對用包括IL-2之培養基生長約1天至7/8天的多個容器至少60個碎片進行物理碎斷）	步驟 B 初始第一次擴增 （對用包括IL-2及OKT-3之培養基生長約1天至7/8天的多個容器至少60個碎片進行物理碎斷）	步驟 B 初始第一次擴增 （對用包括IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞之培養基生長約1天至7/8天的多個容器至多60個碎片進行物理碎斷）
步驟 C 初始第一次擴增至快速第二次擴增之轉變 （步驟B TIL在第7/8天直接移至步驟D）	步驟 C 初始第一次擴增至快速第二次擴增之轉變 （步驟B TIL在第7/8天直接移至步驟D）	步驟 C 初始第一次擴增至快速第二次擴增之轉變 （步驟B TIL在第7/8天直接移至步驟D）
步驟 D 快速第二次擴增 （在包括IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞之生長培養基中生長的TIL；第10至11天規模縱向擴大且添加另外的IL-2）	步驟 D 快速第二次擴增 （在包括IL-2、OKT-3及2X抗原呈現飼養細胞之生長培養基中生長的TIL；第10至11天規模縱向擴大且添加另外的IL-2）	步驟 D 快速第二次擴增 （在包括IL-2、OKT-3及2X抗原呈現飼養細胞之生長培養基中生長的TIL；第10至11天規模縱向擴大且添加另外的IL-2）
步驟 E 門步驟D收集TIL	步驟 E 門步驟D收集TIL	步驟 E 門步驟D收集TIL
步驟 F 檢查來門步驟E之TIL的效力及/或功能性	步驟 F 檢查來門步驟E之TIL的效力及/或功能性	步驟 F 檢查來門步驟E之TIL的效力及/或功能性
步驟 G 最終調配及/或轉移至輸注袋 （視情況冷凍保存）	步驟 G 最終調配及/或轉移至輸注袋 （視情況冷凍保存）	步驟 G 最終調配及/或轉移至輸注袋 （視情況冷凍保存）

|（圖 8C）|

經修改之類Gen 2流程：自步驟A至B1歷經22天

步驟 A

獲得患者腫瘤樣本

（視情況可以在步驟B之前冷凍；

視情況腫瘤樣本可為核心小型生檢體）

步驟 B1

初始培養

對於3個容器至多60個腫瘤碎片或至多10個核心小型生檢體進行物理碎斷，TIL在含IL-2之生長培養基中生長3天

步驟 B2

初始第一次擴增

在含IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞之生長培養基中生長8天的TIL

步驟 C

初始第一次擴增至快速第二次擴增之轉變

（步驟B TIL在第11天直接移至步驟D）

步驟 D

快速第二次擴增

（體積減少；在含IL-2、OKT-3及50X抗原呈現飼養細胞之生長培養基中生長的TIL；第16天規模擴大且添加另外的IL-2）

步驟 E

自步驟D收集之TIL

步驟 F

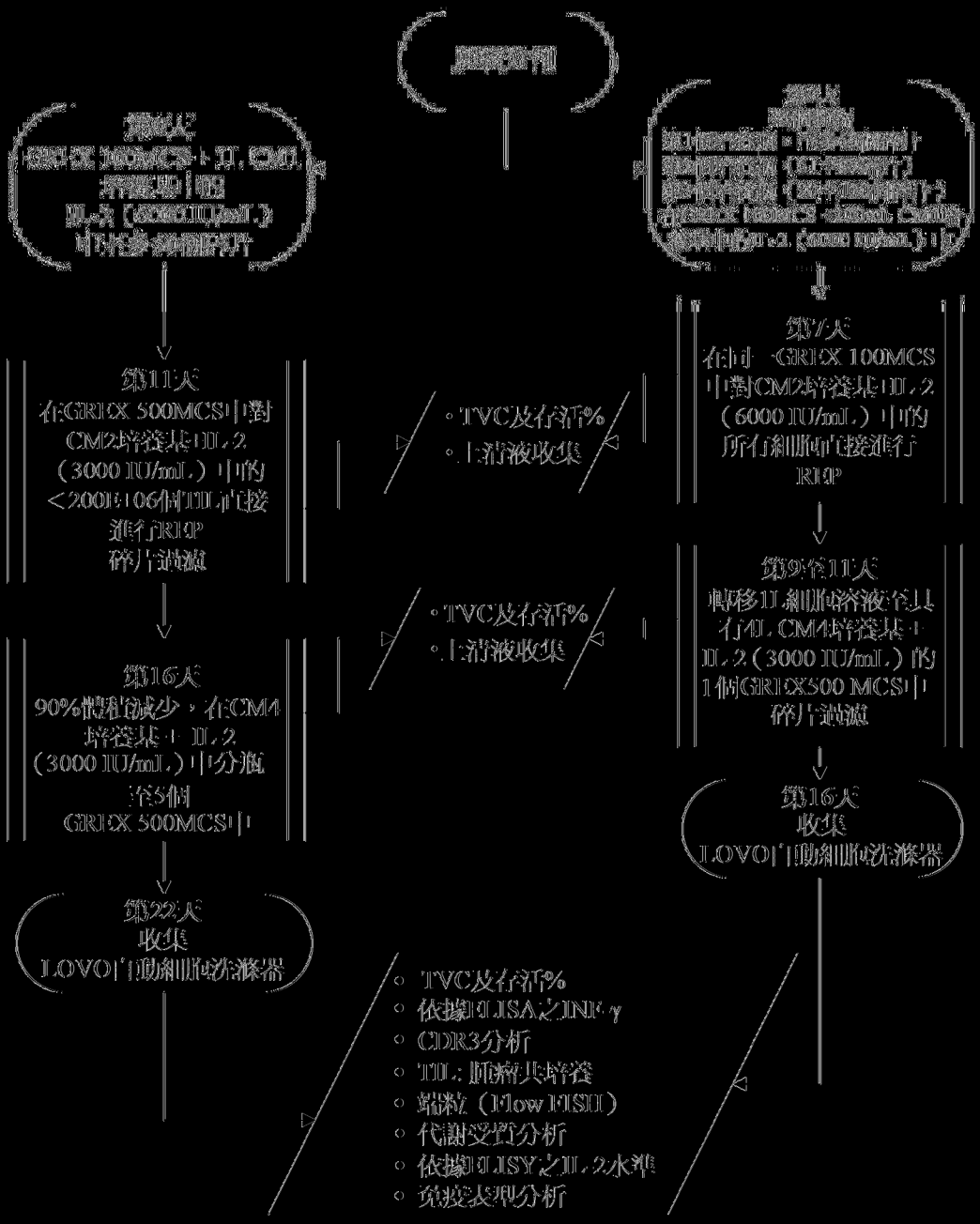
檢查來自步驟E之TIL的效力及成功能性

步驟 G

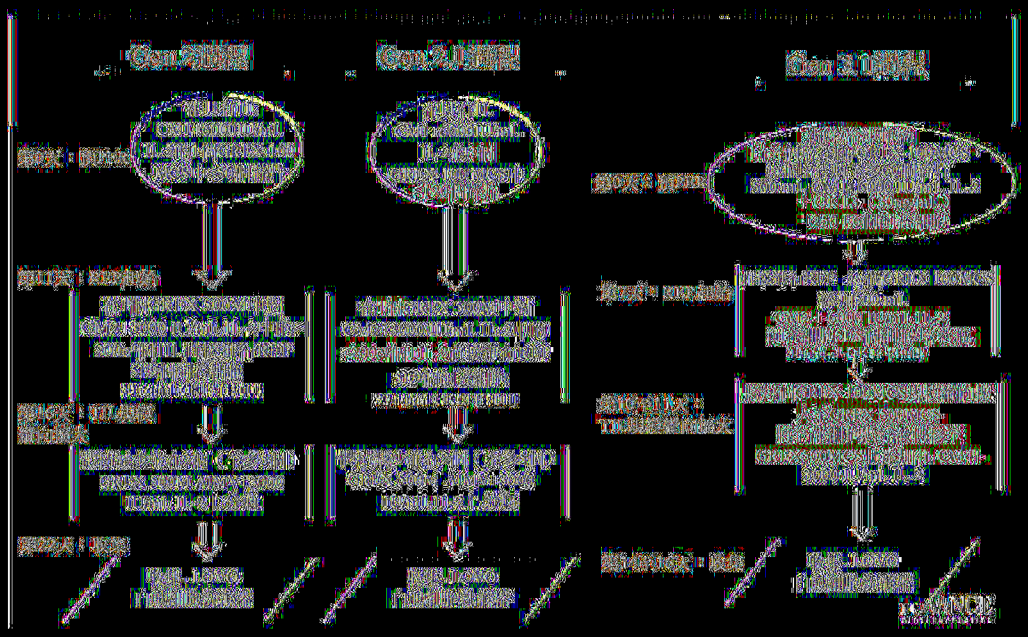
最終調配及/或轉移至輸注袋

（視情況冷凍保存）

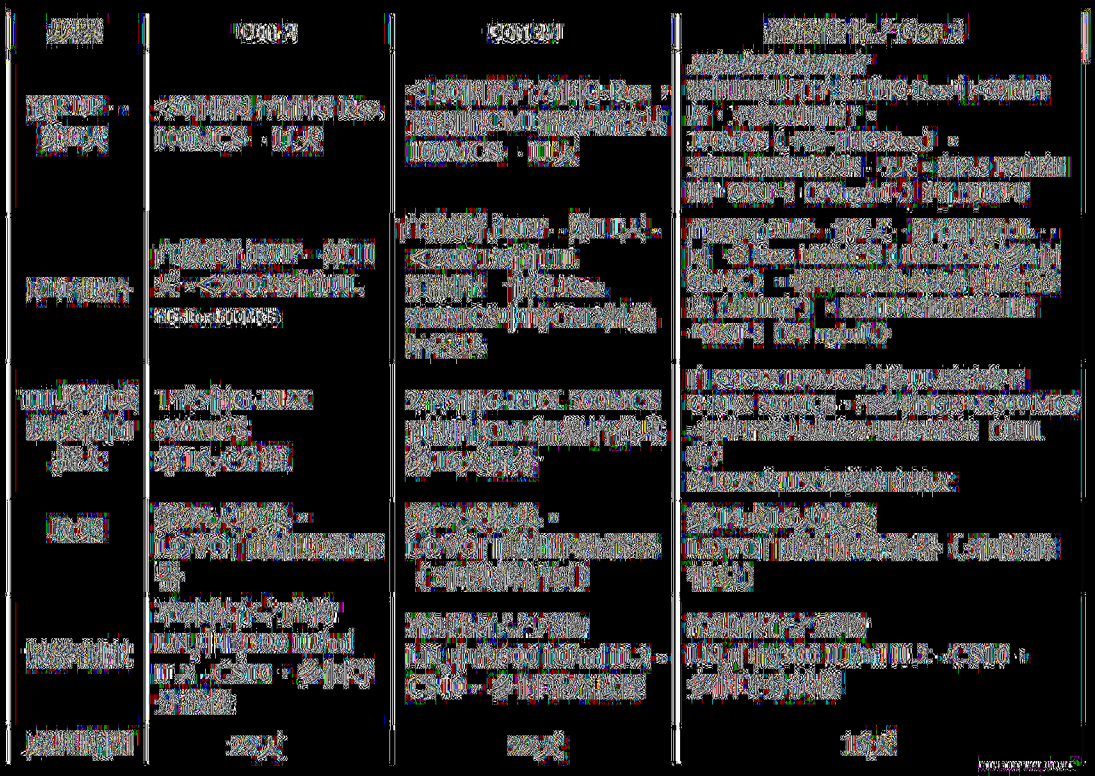
|(時 8D)|


腫瘤細胞
第0天
在GREX 500MCS中，以CM2培養基、IL-2（3000 IU/mL）中的1.0×10^6個腫瘤細胞/cm^2接種腫瘤細胞
第0天
在GREX 100MCS中，以CM2培養基、IL-2（6000 IU/mL）中的1.0×10^6個腫瘤細胞/cm^2接種腫瘤細胞
第7天
在同一GREX 100MCS中對CM2培養基、IL-2（6000 IU/mL）中的所有細胞直接進行RIP
第9至11天
轉移IL-細胞溶液至具有IL-CM4培養基、IL-2（3000 IU/mL）的1個GREX500 MCS中
碎片過濾
第16天
收集
LOVO自動細胞洗滌器
第11天
在GREX 500MCS中對CM2培養基、IL-2（3000 IU/mL）中的＜2000萬106個IL直接進行RIP
碎片過濾
第16天
90%體積減少，在CM4培養基、IL-2（3000 IU/mL）中分瓶至5個GREX 500MCS中
第22天
收集
LOVO自動細胞洗滌器
◦TVC及存活%
◦上清液收集
◦TVC及存活%
◦上清液收集
◦TVC及存活%
◦依據ELISA之INF-γ
◦CDR3分析
◦TIL：腫瘤共培養
◦螢粒（Flow FISH）
◦代謝受質分析
◦依據ELISY之IL-2水準
◦免疫表型分析

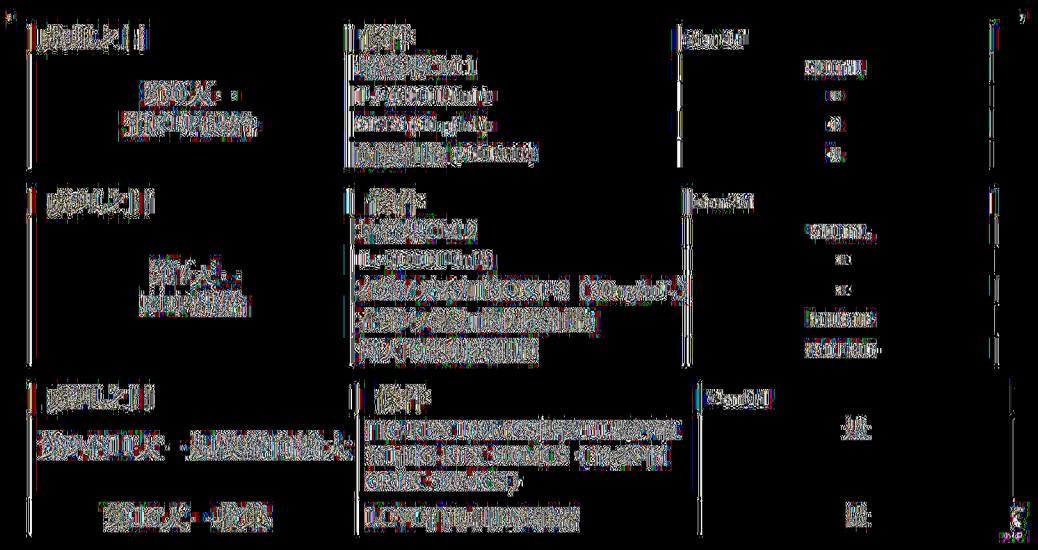
圖（圖 9）



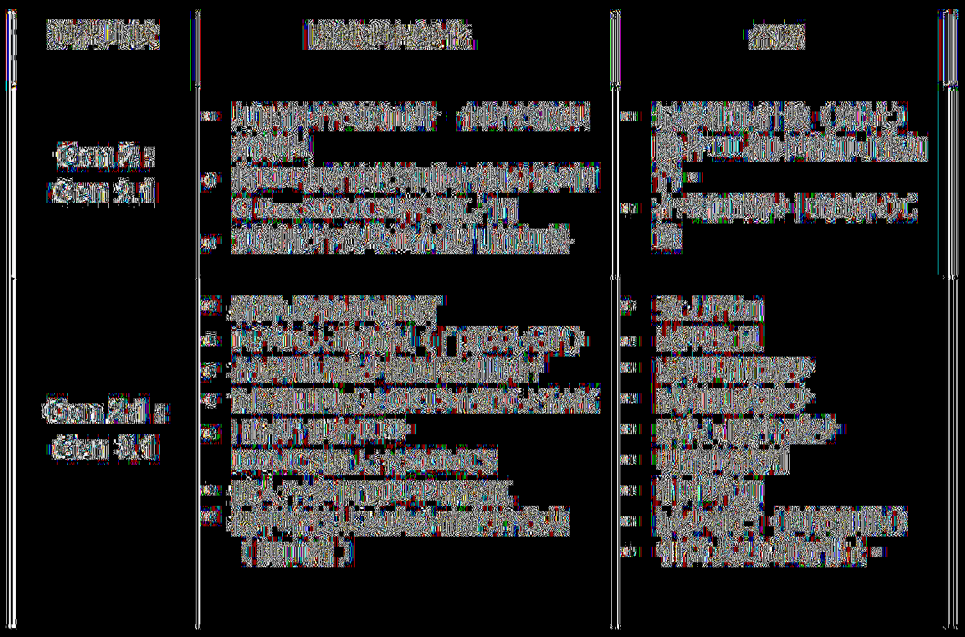
|(圖 10)|



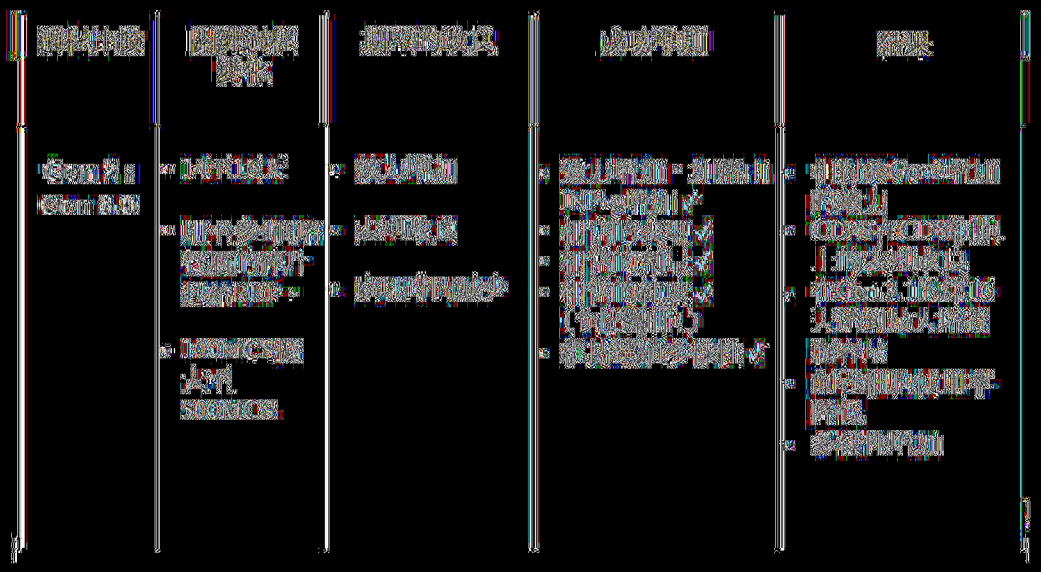
(圖 11)



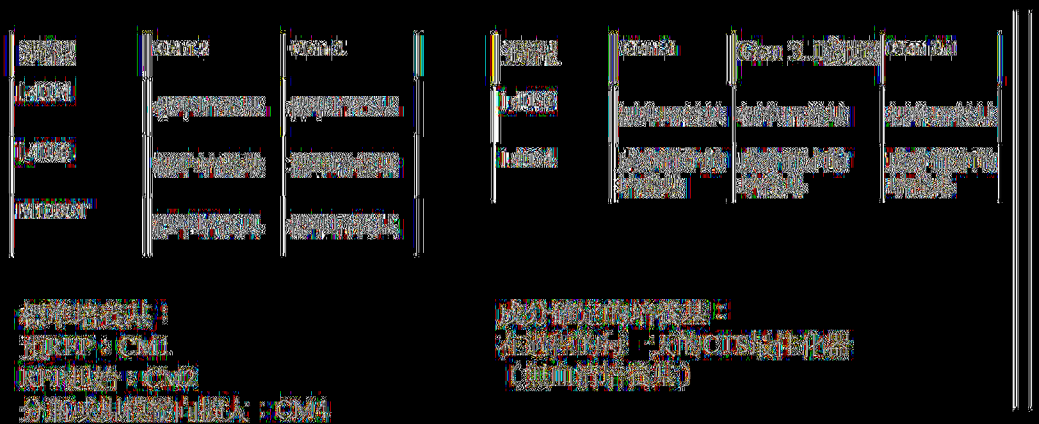
(圖 12)



(圖 13)



(圖 14)



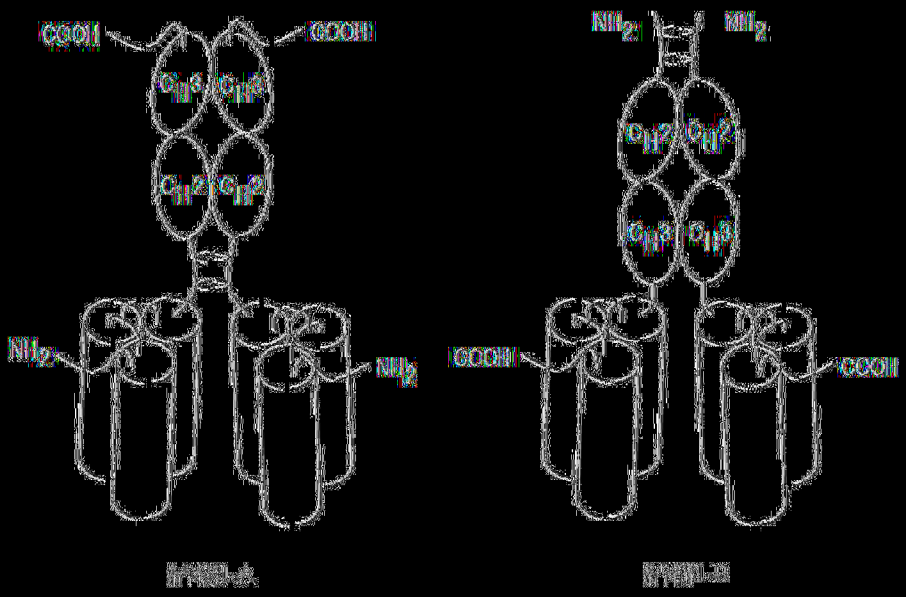
|(圖 15)|



(附圖 16)



圖 17



(圖 18)

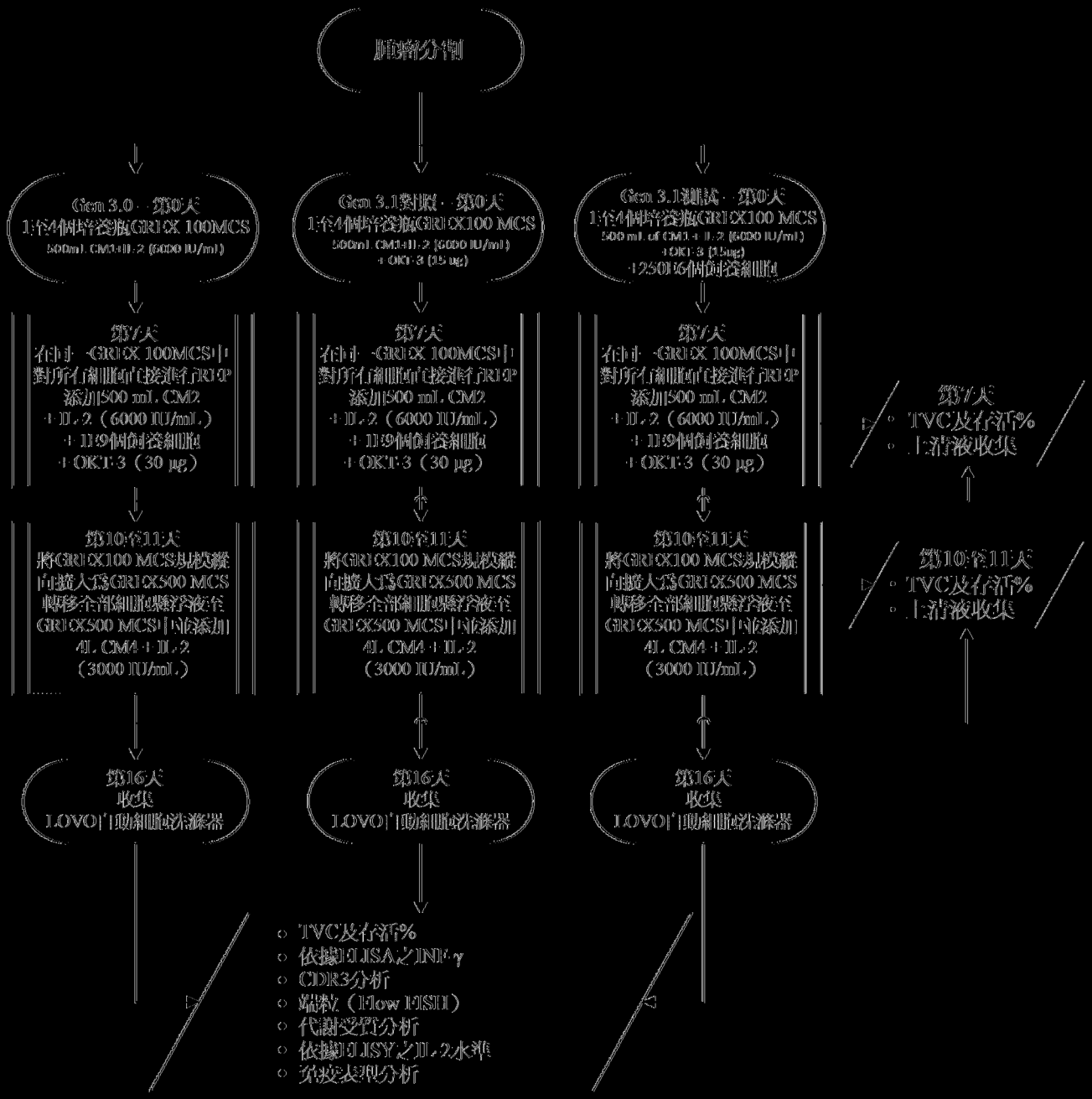
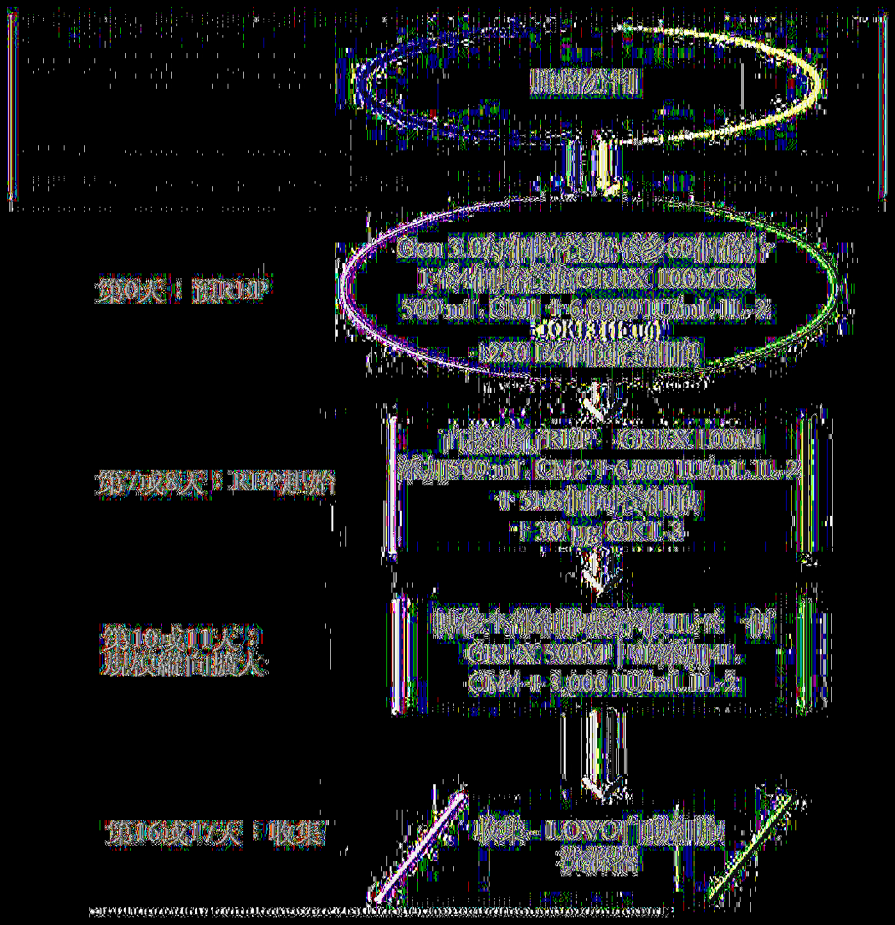

腫瘤分割
Gen 3.0 - 第0天
1至4個培養瓶GRExX 100MCS
500ml CM4+IL-2 (6000 IU/ml)
Gen 3.1對照 - 第0天
1至4個培養瓶GRExX100 MCS
500ml CM4+IL-2 (6000 IU/ml)
+ OKT-3 (15 ug)
Gen 3.1測試 - 第0天
1至4個培養瓶GRExX100 MCS
500 ml of CM4 + IL-2 (6000 IU/ml)
+OKT-3 (15ug)
+2501至6個周邊血細胞
第7天
在由 -GRExX 100MCS中
對所有細胞加在接種瓶內
添加500 ml, CM2
+IL-2（6000 IU/mL）
+ 1至9個周邊血細胞
+OKT-3（30 μg）
第10至11天
將GRExX100 MCS規模縱
向擴大至GRExX500 MCS
轉移全部細胞懸浮液至
GRExX500 MCS中(同步添加)
4L CM4 + IL-2
（3000 IU/mL）
第16天
收集
LOVO自動細胞洗滌器
第7天
• TVC及存活%
• 上清液收集
第10至11天
• TVC及存活%
• 上清液收集
• TVC及存活%
• 依據ELISA之IFN-γ
• CDR3分析
• 端粒（Flow FISH）
• 代謝受質分析
• 依據ELISY之IL-2水準
• 免疫表型分析

圖 19

圖 20



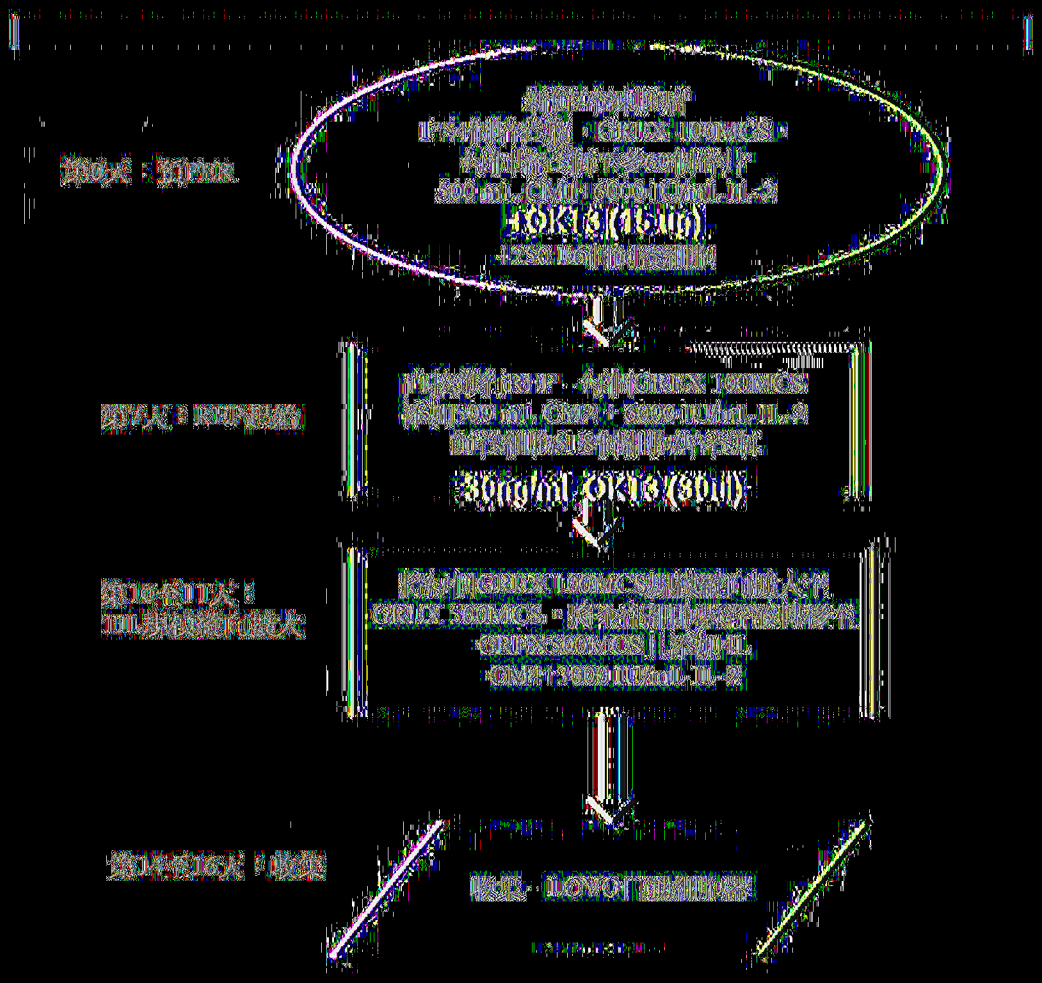
|(圖 21)|

圖 22

	Cer 2	Cer 3
總培養時間	22天	16至17天（或16天）
EB		
每戶/培養瓶	一個培養瓶≤60個每戶	三多4個培養瓶≤60個每戶
培養基體積	□ - 首次添加	□ - 2 × 500 mL添加
標記有EB紅色數三	<200 × 10^6 個	所有紅色均經由這種途徑獲得
篩選	六篩選	六篩選
培養液之選擇	沒有選擇	Bcd-二氧基生，污染物的三方檢查
EB/病毒總負擔大		
氣養紅色		減少≥ 40%
培養基	含有ESAB	成分天然培養基
病毒總負擔大	混合培養：第5天體積減少至500 mL， 分至5個瓶（2500 cm^2）	培養液經綠色綠放三枝元每次紅色
OKT3	150 ng	≤ 180 ng
IL-2	高劑量	高劑量
病毒數三	1-5	1-4
最後步驟		
次集/體積減少	密度10:1	密度10:1
濃縮/洗滌	LOVO 100:1	LOVO 1000:1
請記/冷凍	1:1 CS10 (5% DMSO)	1:1 CS10 (5% DMSO)
裝運/冷凍	氣相液氮	氣相液氮
設定	符合V型方	符合V型方

2023030360
111111478
修正替換頁 2023
第 28頁，共 217頁(發明專利說明書)
111361944-0

（24）



(圖 25)

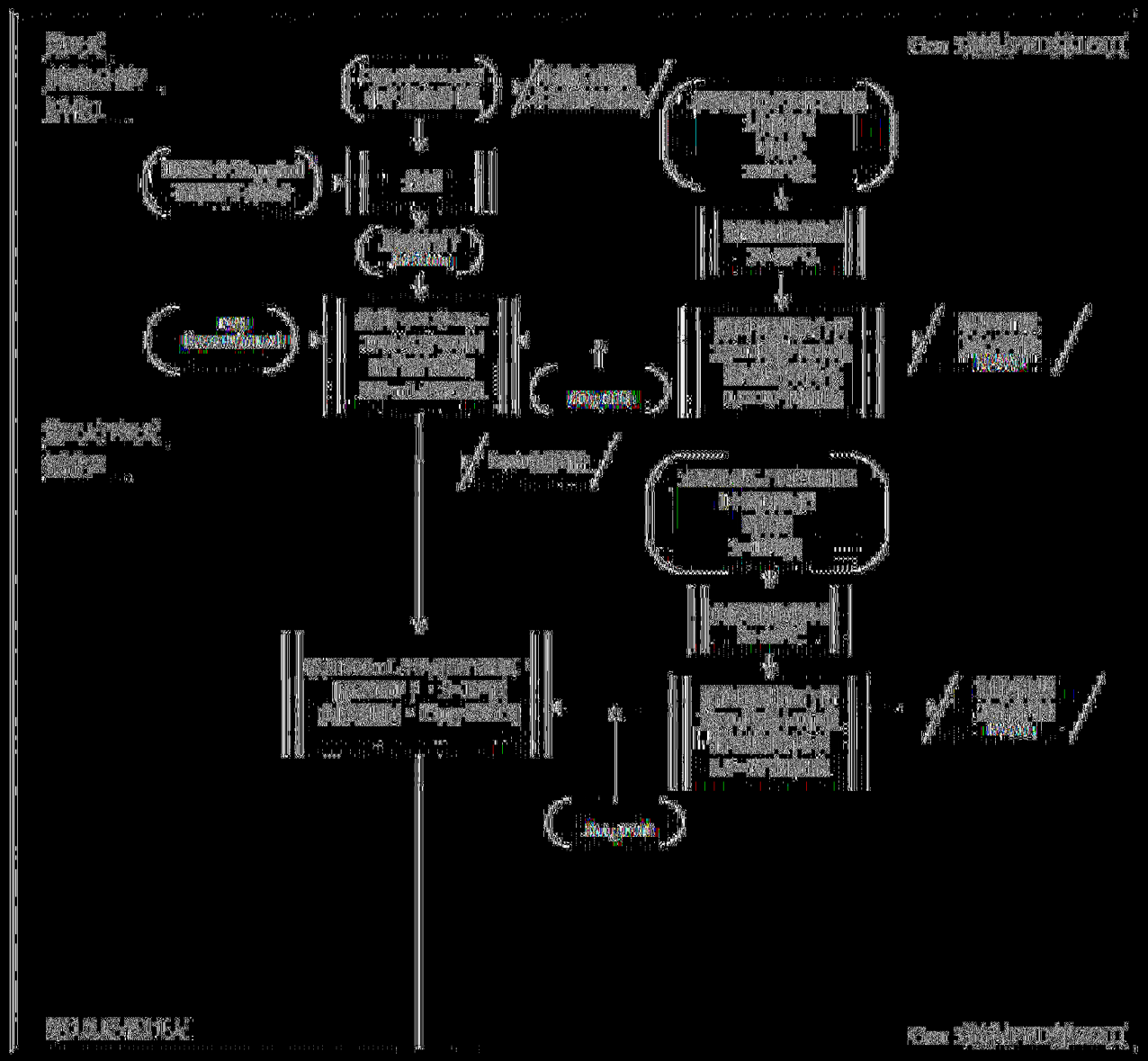


圖 26A

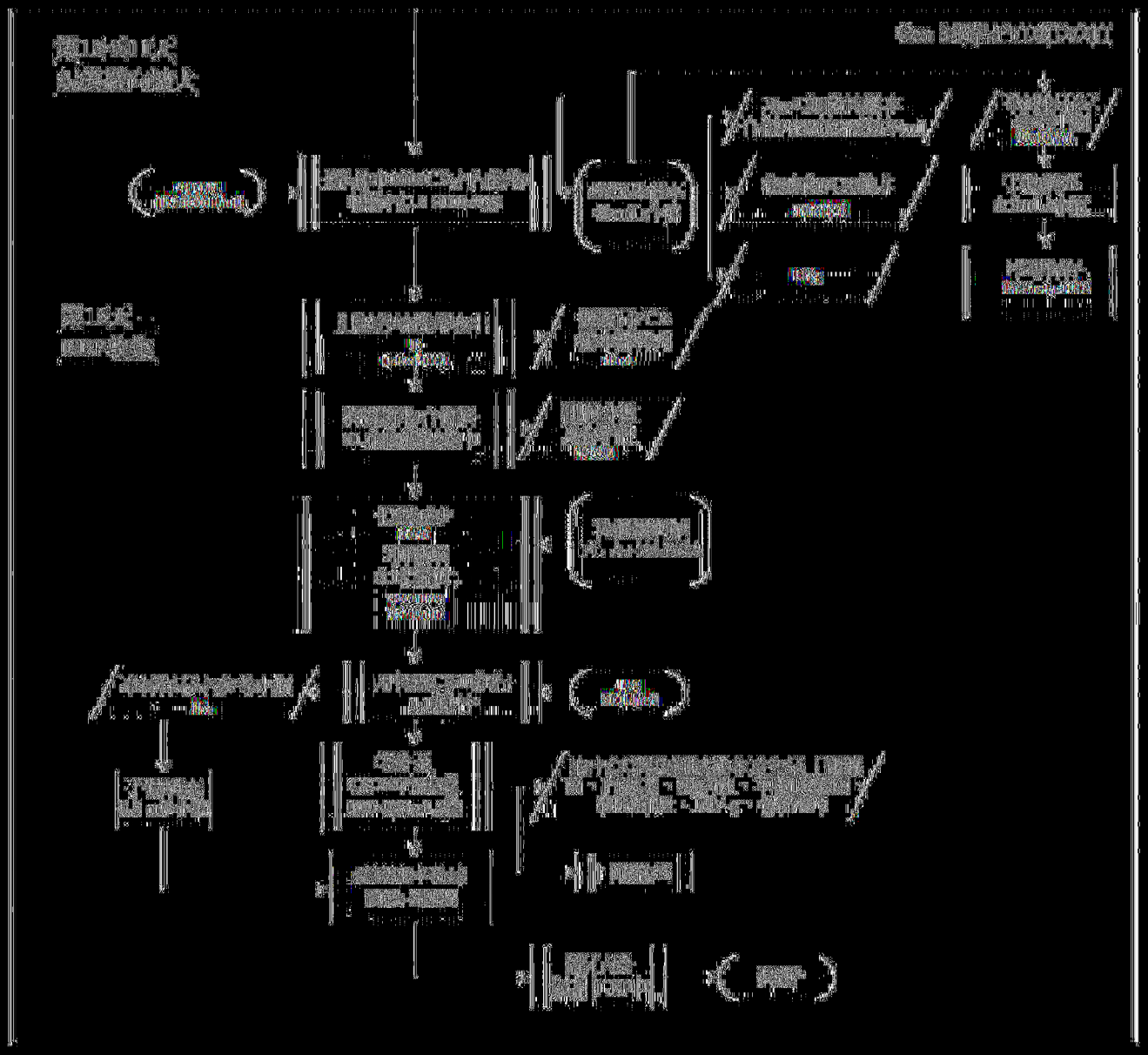
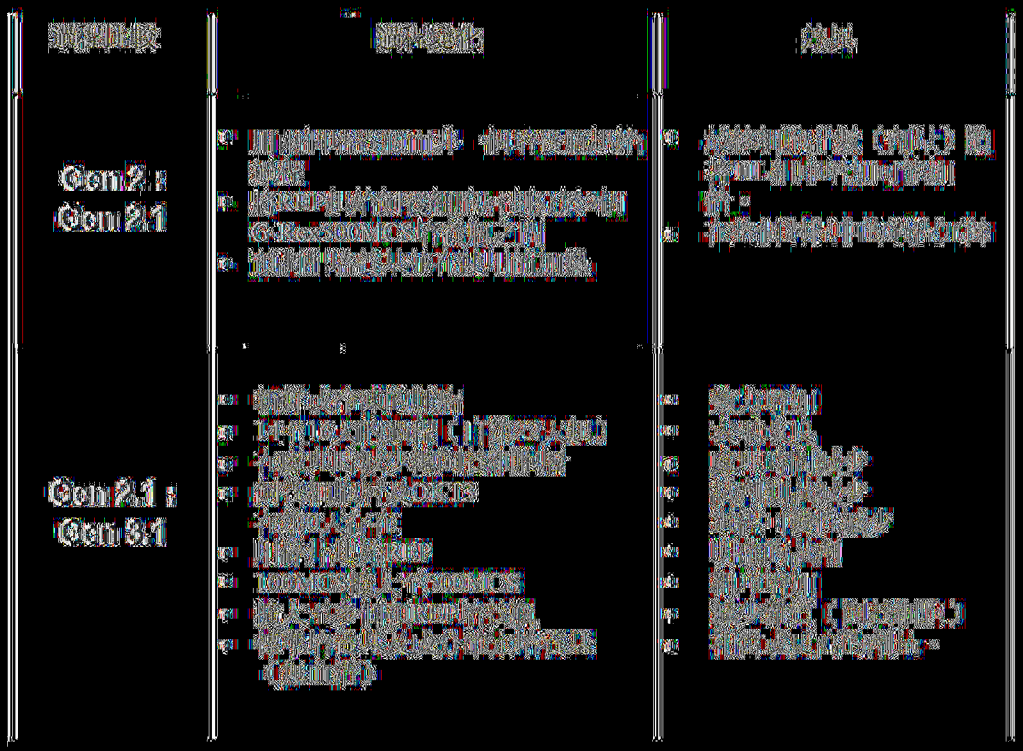
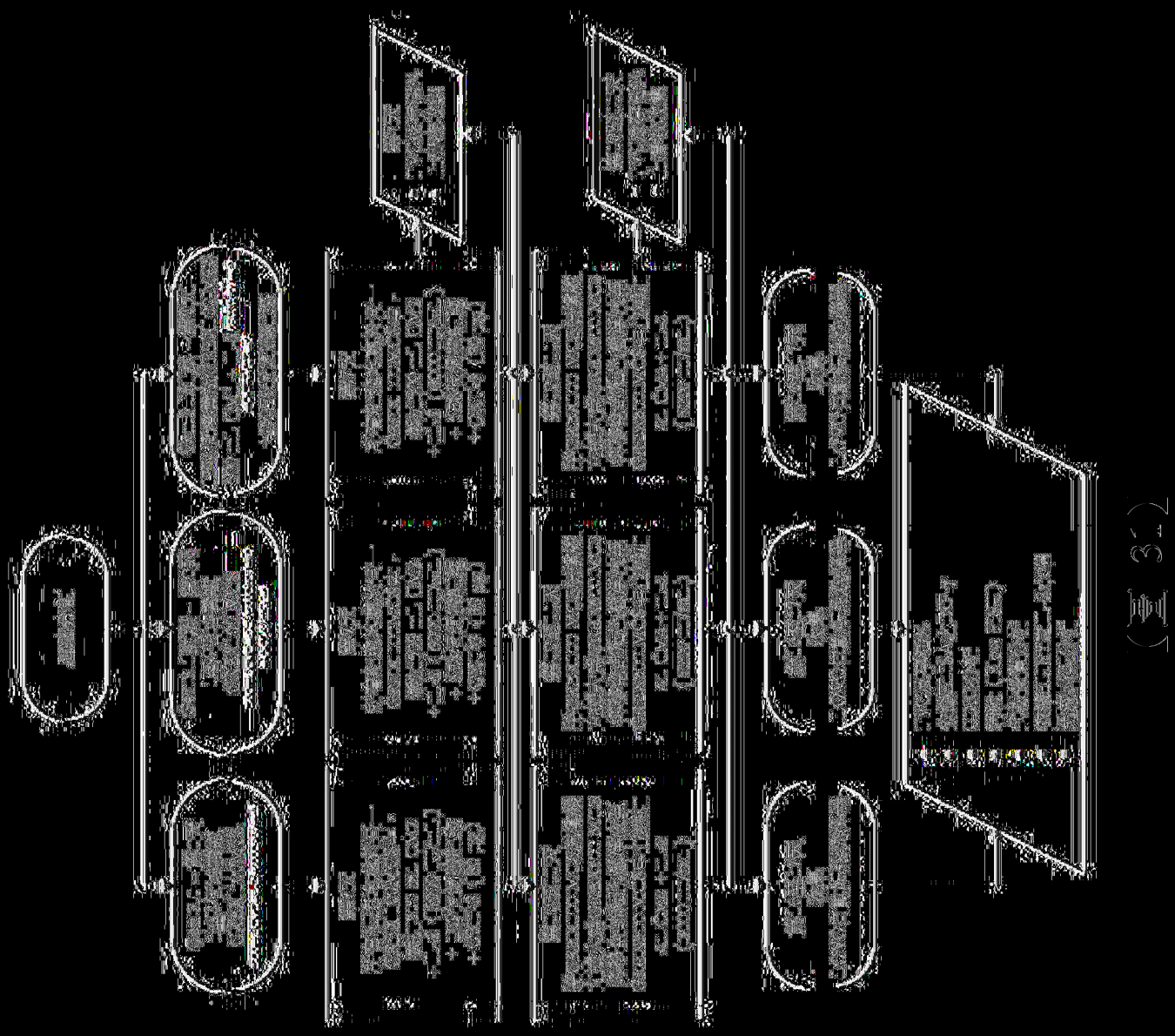


圖 26B



(圖 29)





|(圖 32)|

比較	[illegible]	[illegible]	[illegible]
比較	[illegible]	[illegible]	[illegible]
比較	[illegible]	[illegible]	[illegible]
比較	[illegible]	[illegible]	[illegible]

（表 33）

圖 34

圖 36

24小時
8小時
2小時
1小時
30分鐘
15分鐘
5分鐘
1分鐘
30秒
10秒
1秒
0.5秒
0.1秒
0.05秒
0.01秒
0.005秒
0.001秒
0.0005秒
0.0001秒
0.00005秒
0.00001秒
0.000005秒
0.000001秒
0.0000005秒
0.0000001秒
0.00000005秒
0.00000001秒
0.000000005秒
0.000000001秒
0.0000000005秒
0.0000000001秒
0.00000000005秒
0.00000000001秒
0.000000000005秒
0.000000000001秒
0.0000000000005秒
0.0000000000001秒
0.00000000000005秒
0.00000000000001秒
0.000000000000005秒
0.000000000000001秒
0.0000000000000005秒
0.0000000000000001秒
0.00000000000000005秒
0.00000000000000001秒
0.000000000000000005秒
0.000000000000000001秒
0.0000000000000000005秒
0.0000000000000000001秒
0.00000000000000000005秒
0.00000000000000000001秒
0.000000000000000000005秒
0.000000000000000000001秒
0.0000000000000000000005秒
0.0000000000000000000001秒
0.00000000000000000000005秒
0.00000000000000000000001秒
0.000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001秒
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000005秒
0.00000

圖 3C

圖 42

圖 43

（17）

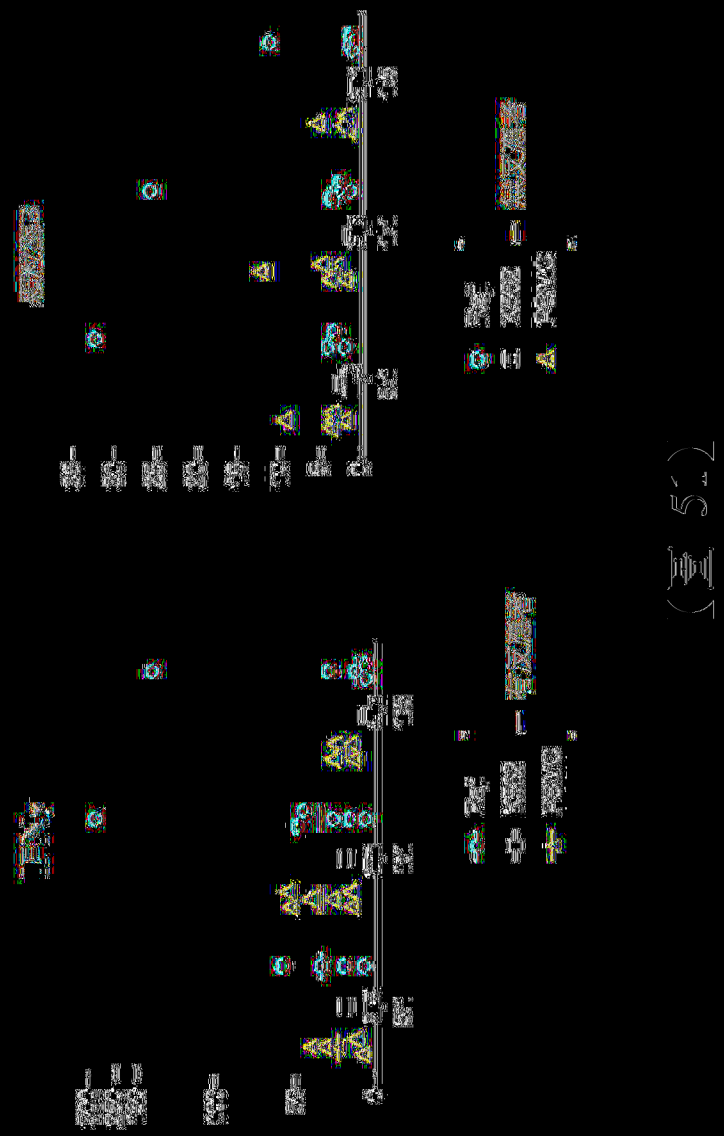
圖 5C

圖 (97)

（47）

圖 3-7

圖 (67)



（圖 52）

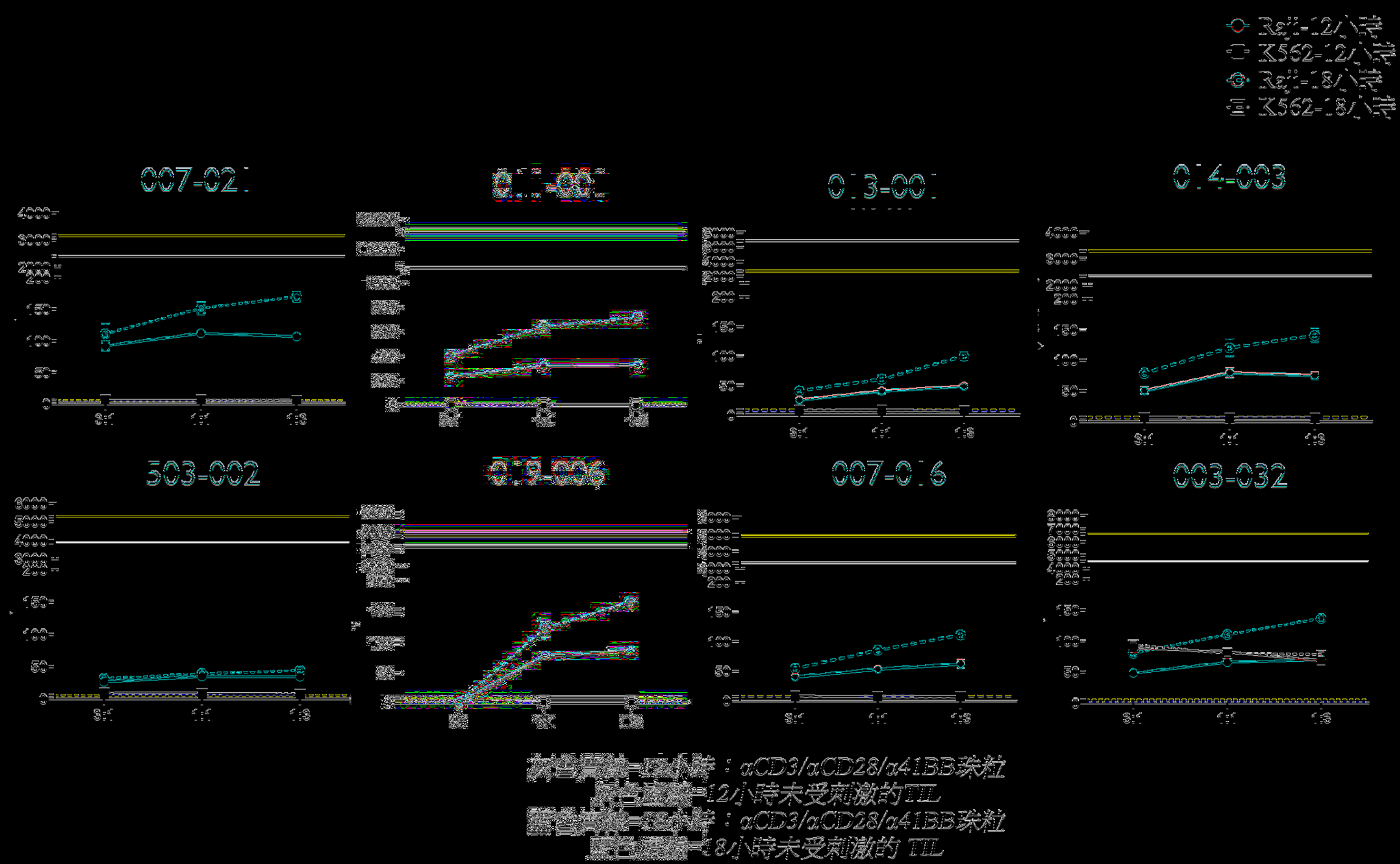
圖 (53)



圖 5

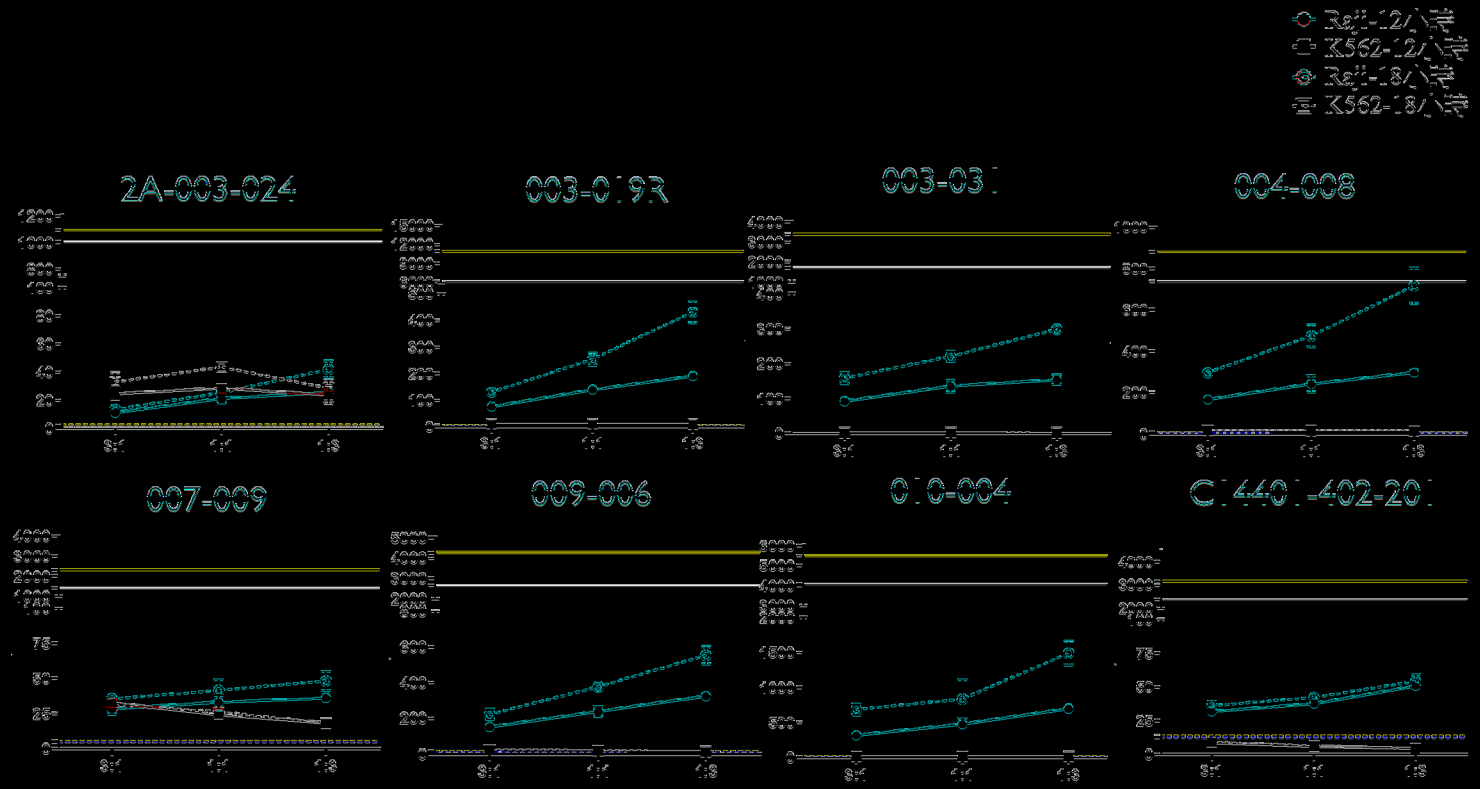
圖 6

圖 3


Raji-12小時
K562-12小時
Raji-18小時
K562-18小時
007-021
503-002
007-016
003-032
：αCD3/αCD28/α41BB珠粒
12小時未受刺激的TIL
：αCD3/αCD28/α41BB珠粒
18小時未受刺激的 TIL

（圖 59）

0033030202



灰色實線=12小時：αCD3/αCD28/α4IBB珠粒
灰色虛線=12小時未受刺激的 TIL
藍色實線=18小時：αCD3/αCD28/α4IBB珠粒
藍色虛線=18小時未受刺激的 TIL

（圖 60）

111111178 2020年6月2日 第651，頁 共159頁 CN111819442 A

圖 6

X52-2
X52-2
X52-8
X52-8
0-4-003
0-3-001
003-032
007-0-6
0-1-001
0-6-006
007-02
303-002

(62)

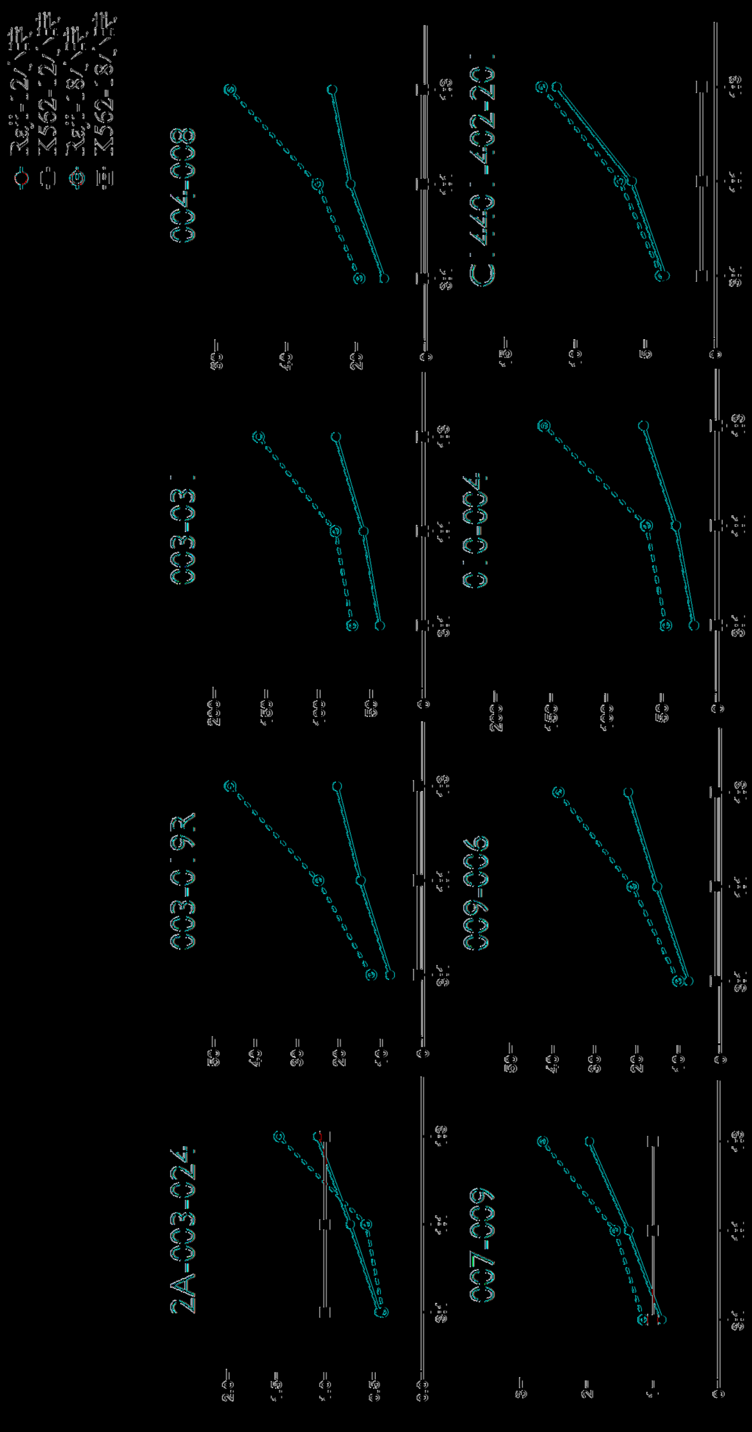
Rx1=-24.1°
X562=-24.1°
Rx1=-8.1°
X562=-8.1°
004-008
003-03
003-0.9R
009-009
007-009
006-006
007-007
006-0.0
007-0.0
007-007
006-006

圖 (63)

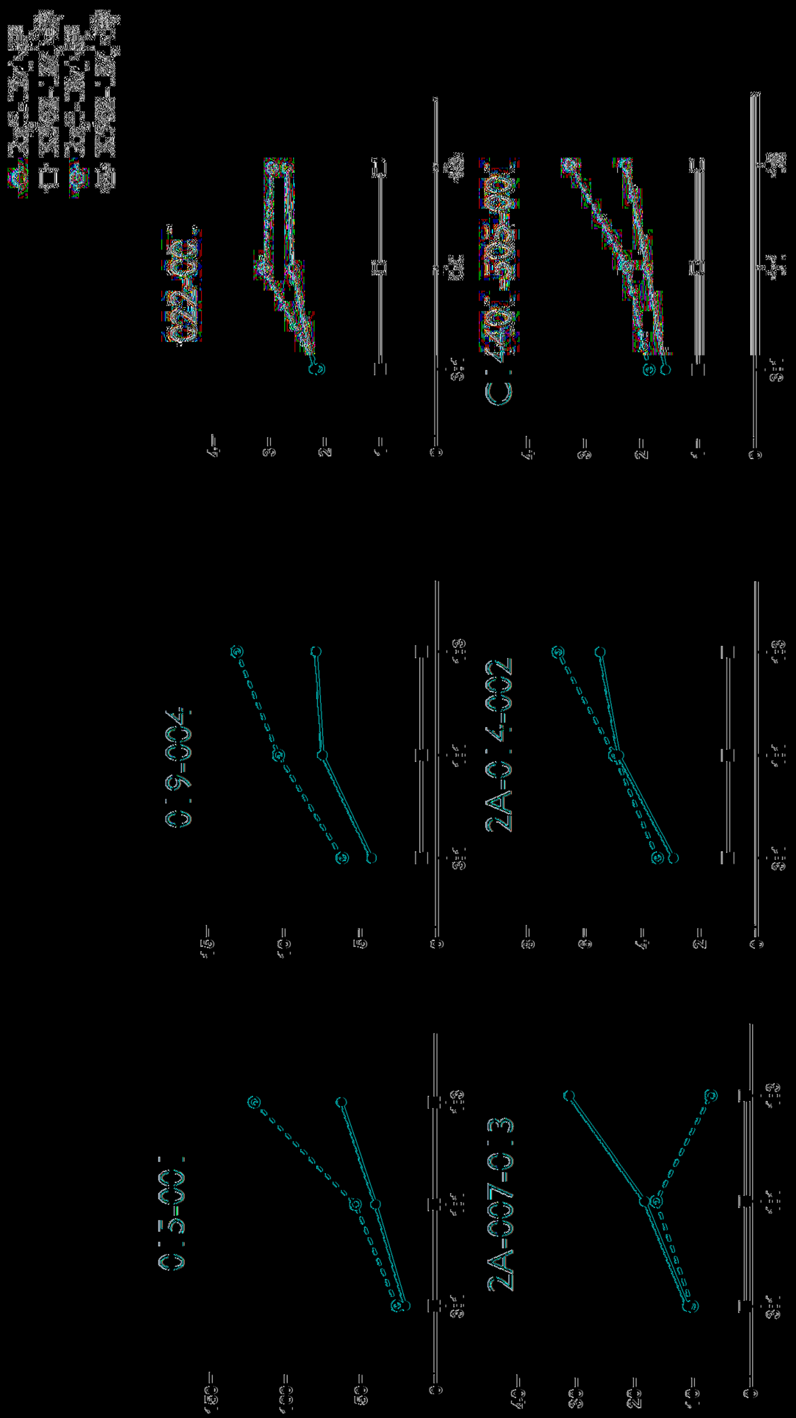
（79）

X552-2
X552-3
X552-4
007-02
003-02
007-01
003-01
007-06
003-06
007-03
003-03
007-04
003-04

圖 (65)



(圖 66)



（圖 67）

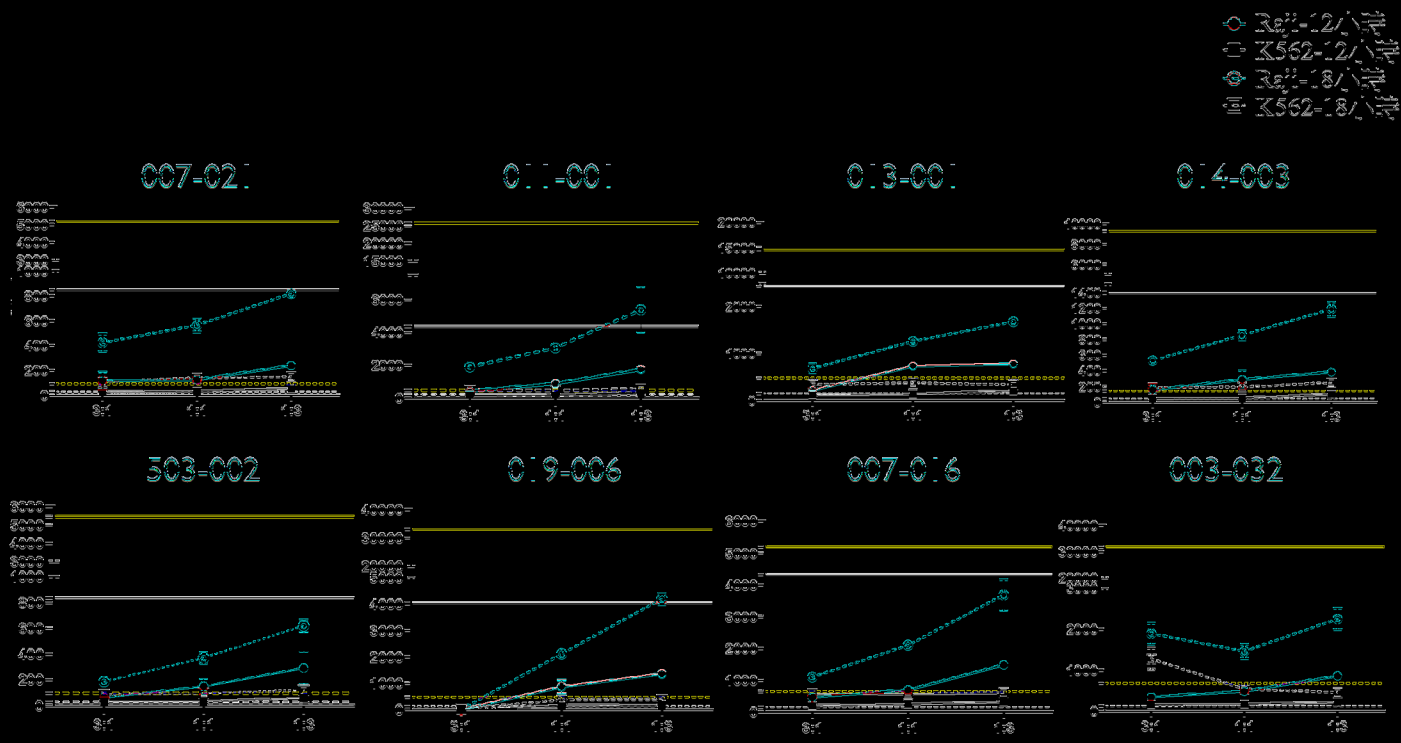
263x592
29.2"
(83)
圖
圖號：3-3 圖名：基地配置圖
北入口
南入口
基地範圍
建築物
道路
綠地
比例尺 1:500

圖 69
說明：
1.
2.
3.
4.
5.
6.
7.
8.
9.
10.
11.
12.
13.
14.
15.
16.
17.
18.
19.
20.
21.
22.
23.
24.
25.
26.
27.
28.
29.
30.
31.
32.
33.
34.
35.
36.
37.
38.
39.
40.
41.
42.
43.
44.
45.
46.
47.
48.
49.
50.
51.
52.
53.
54.
55.
56.
57.
58.
59.
60.
61.
62.
63.
64.
65.
66.
67.
68.
69.
70.
71.
72.
73.
74.
75.
76.
77.
78.
79.
80.
81.
82.
83.
84.
85.
86.
87.
88.
89.
90.
91.
92.
93.
94.
95.
96.
97.
98.
99.
100.
101.
102.
103.
104.
105.
106.
107.
108.
109.
110.
111.
112.
113.
114.
115.
116.
117.
118.
119.
120.
121.
122.
123.
124.
125.
126.
127.
128.
129.
130.
131.
132.
133.
134.
135.
136.
137.
138.
139.
140.
141.
142.
143.
144.
145.
146.
147.
148.
149.
150.
151.
152.
153.
154.
155.
156.
157.
158.
159.
160.
161.
162.
163.
164.
165.
166.
167.
168.
169.
170.
171.
172.
173.
174.
175.
176.
177.
178.
179.
180.
181.
182.
183.
184.
185.
186.
187.
188.
189.
190.
191.
192.
193.
194.
195.
196.
197.
198.
199.
200.
201.
202.
203.
204.
205.
206.
207.
208.
209.
210.
211.
212.
213.
214.
215.
216.
217.
218.
219.
220.
221.
222.
223.
224.
225.
226.
227.
228.
229.
230.
231.
232.
233.
234.
235.
236.
237.
238.
239.
240.
241.
242.
243.
244.
245.
246.
247.
248.
249.
250.
251.
252.
253.
254.
255.
256.
257.
258.
259.
260.
261.
262.
263.
264.
265.
266.
267.
268.
269.
270.
271.
272.
273.
274.
275.
276.
277.
278.
279.
280.
281.
282.
283.
284.
285.
286.
287.
288.
289.
290.
291.
292.
293.
294.
295.
296.
297.
298.
299.
300.
301.
302.
303.
304.
305.
306.
307.
308.
309.
310.
311.
312.
313.
314.
315.
316.
317.
318.
319.
320.
321.
322.
323.
324.
325.
326.
327.
328.
329.
330.
331.
332.
333.
334.
335.
336.
337.
338.
339.
340.
341.
342.
343.
344.
345.
346.
347.
348.
349.
350.
351.
352.
353.
354.
355.
356.
357.
358.
359.
360.
361.
362.
363.
364.
365.
366.
367.
368.
369.
370.
371.
372.
373.
374.
375.
376.
377.
378.
379.
380.
381.
382.
383.
384.
385.
386.
387.
388.
389.
390.
391.
392.
393.
394.
395.
396.
397.
398.
399.
400.
401.
402.
403.
404.
405.
406.
407.
408.
409.
410.
411.
412.
413.
414.
415.
416.
417.
418.
419.
420.
421.
422.
423.
424.
425.
426.
427.
428.
429.
430.
431.
432.
433.
434.
435.
436.
437.
438.
439.
440.
441.
442.
443.
444.
445.
446.
447.
448.
449.
450.
451.
452.
453.
454.
455.
456.
457.
458.
459.
460.
461.
462.
463.
464.
465.
466.
467.
468.
469.
470.
471.
472.
473.
474.
475.
476.
477.
478.
479.
480.
481.
482.
483.
484.
485.
486.
487.
488.
489.
490.
491.
492.
493.
494.
495.
496.
497.
498.
499.
500.
501.
502.
503.
504.
505.
506.
507.
508.
509.
510.
511.
512.
513.
514.
515.
516.
517.
518.
519.
520.
521.
522.
523.
524.
525.
526.
527.
528.
529.
530.
531.
532.
533.
534.
535.
536.
537.
538.
539.
540.
541.
542.
543.
544.
545.
546.
547.
548.
549.
550.
551.
552.
553.
554.
555.
556.
557.
558.
559.
560.
561.
562.
563.
564.
565.
566.
567.
568.
569.
570.
571.
572.
573.
574.
575.
576.
577.
578.
579.
580.
581.
582.
583.
584.
585.
586.
587.
588.
589.
590.
591.
592.
593.
594.
595.
596.
597.
598.
599.
600.
601.
602.
603.
604.
605.
606.
607.
608.
609.
610.
611.
612.
613.
614.
615.
616.
617.
618.
619.
620.
621.
622.
623.
624.
625.
626.
627.
628.
629.
630.
631.
632.
633.
634.
635.
636.
637.
638.
639.
640.
641.
642.
643.
644.
645.
646.
647.
648.
649.
650.
651.
652.
653.
654.
655.
656.
657.
658.
659.
660.
661.
662.
663.
664.
665.
666.
667.
668.
669.
670.
671.
672.
673.
674.
675.
676.
677.
678.
679.
680.
681.
682.
683.
684.
685.
686.
687.
688.
689.
690.
691.
692.
693.
694.
695.
696.
697.
698.
699.
700.
701.
702.
703.
704.
705.
706.
707.
708.
709.
710.
711.
712.
713.
714.
715.
716.
717.
718.
719.
720.
721.
722.
723.
724.
725.
726.
727.
728.
729.
730.
731.
732.
733.
734.
735.
736.
737.
738.
739.
740.
741.
742.
743.
744.
745.
746.
747.
748.
749.
750.
751.
752.
753.
754.
755.
756.
757.
758.
759.
760.
761.
762.
763.
764.
765.
766.
767.
768.
769.
770.
771.
772.
773.
774.
775.
776.
777.
778.
779.
780.
781.
782.
783.
784.
785.
786.
787.
788.
789.
790.
791.
792.
793.
794.
795.
796.
797.
798.
799.
800.
801.
802.
803.
804.
805.
806.
807.
808.
809.
810.
811.
812.
813.
814.
815.
816.
817.
818.
819.
820.
821.
822.
823.
824.
825.
826.
827.
828.
829.
830.
831.
832.
833.
834.
835.
836.
837.
838.
839.
840.
841.
842.
843.
844.
845.
846.
847.
848.
849.
850.
851.
852.
853.
854.
855.
856.
857.
858.
859.
860.
861.
862.
863.
864.
865.
866.
867.
868.
869.
870.
871.
872.
873.
874.
875.
876.
877.
878.
879.
880.
881.
882.
883.
884.
885.
886.
887.
888.
889.
890.
891.
892.
893.
894.
895.
896.
897.
898.
899.
900.
901.
902.
903.
904.
905.
906.
907.
908.
909.
910.
911.
912.
913.
914.
915.
916.
917.
918.
919.
920.
921.
922.
923.
924.
925.
926.
927.
928.
929.
930.
931.
932.
933.
934.
935.
936.
937.
938.
939.
940.
941.
942.
943.
944.
945.
946.
947.
948.
949.
950.
951.
952.
953.
954.
955.
956.
957.
958.
959.
960.
961.
962.
963.
964.
965.
966.
967.
968.
969.
970.
971.
972.
973.
974.
975.
976.
977.
978.
979.
980.
981.
982.
983.
984.
985.
986.
987.
988.
989.
990.
991.
992.
993.
994.
995.
996.
997.
998.
999.
1000.

圖 10
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360

圖7-2

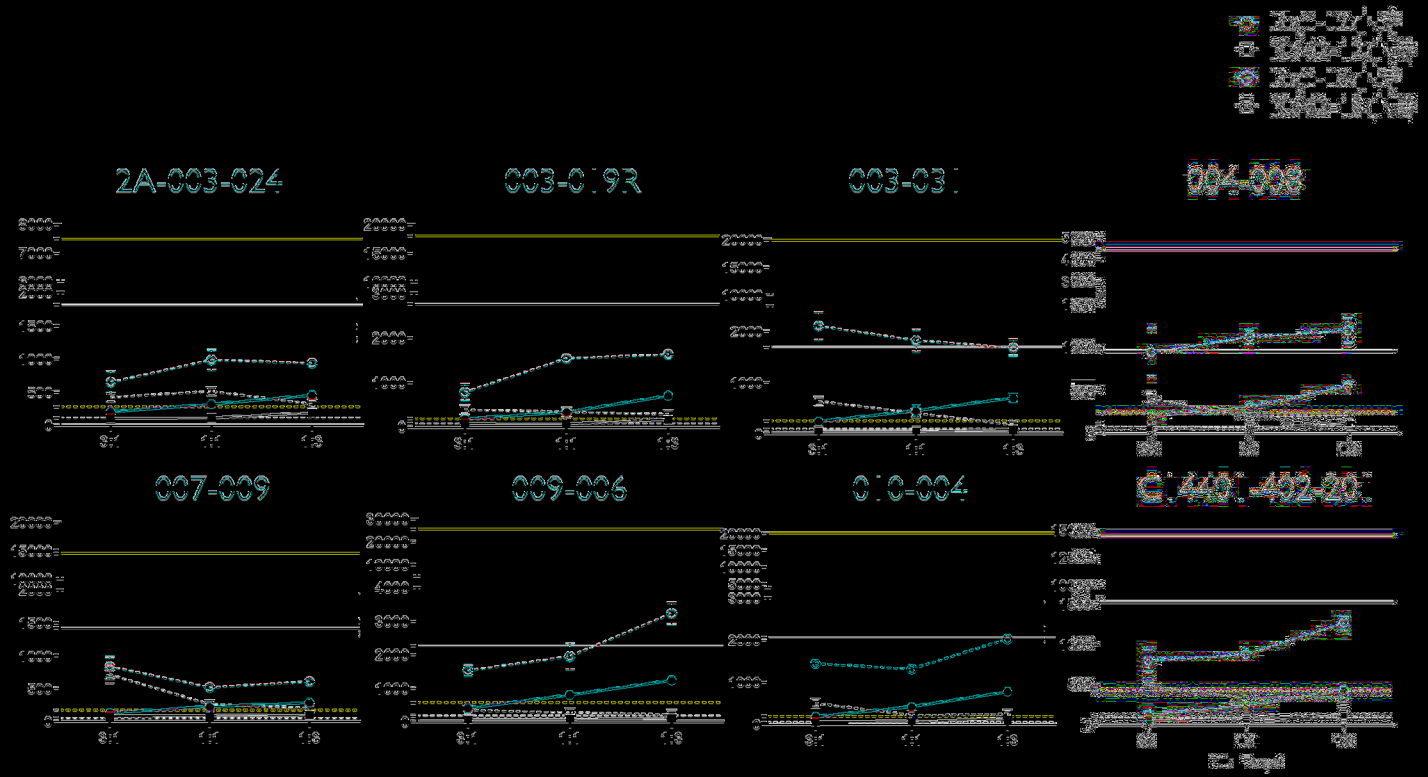
2023/03/30



灰色實線=12小時：αCD3/αCD28/α41BB珠粒
灰色虛線=12小時未受刺激的TIL
藍色實線=18小時：αCD3/αCD28/α41BB珠粒
藍色虛線=18小時未受刺激的 TIL

（圖 72）

2023/03/09



灰色實線=12小時：αCD3/αCD28/α41BB珠粒
灰色虛線=12小時未受刺激的TIL
藍色實線=18小時：αCD3/αCD28/α41BB珠粒
藍色虛線=18小時未受刺激的 TIL

C22-00
C440-300
C6-C4
2A-C4-002
C3-00
2A-007-013
(74)

第一實施例
第二實施例
第三實施例
0.00-0.03
0.03-0.06
0.06-0.09
0.09-0.12
0.12-0.15
0.15-0.18
0.18-0.21
0.21-0.24
0.24-0.27
0.27-0.30
0.30-0.33
0.33-0.36
0.36-0.39
0.39-0.42
0.42-0.45
0.45-0.48
0.48-0.51
0.51-0.54
0.54-0.57
0.57-0.60
0.60-0.63
0.63-0.66
0.66-0.69
0.69-0.72
0.72-0.75
0.75-0.78
0.78-0.81
0.81-0.84
0.84-0.87
0.87-0.90
0.90-0.93
0.93-0.96
0.96-0.99
0.99-1.02
1.02-1.05
1.05-1.08
1.08-1.11
1.11-1.14
1.14-1.17
1.17-1.20

K562-2
K562-2
K562-3
K562-3
2A-003-027
003-0-93
003-03-
004-008
007-009
009-006
0-0-004
C-470-402-20-

圖 (76)

（第 7 7 ）

R2=-2.1
Z552=-2.1
R2=-3.1
Z552=-3.1
0.4=003
003=032
0.3=001
007=0.6
0.1=001
0.6=006
007=021
503=002
700=003

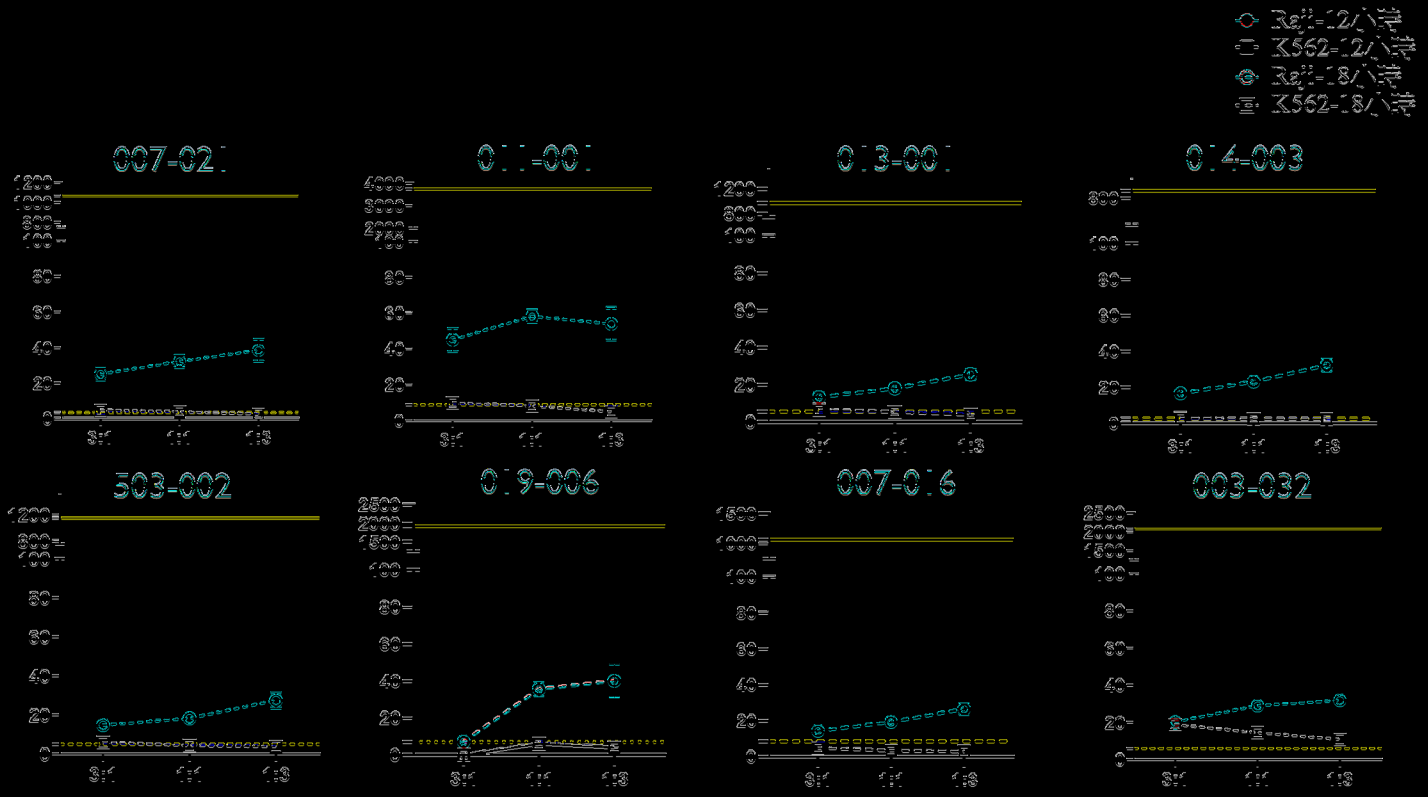
圖 (18)

X562-2
X562-2
X562-2
X562-2
2A-003-024
003-0.93
003-006
007-006
003-03
004-008
C.47-007-27-00
004-004

圖 (79)

圖 (82)
圖例：
圖例：
圖例：

圖 8
圖 8
圖 8

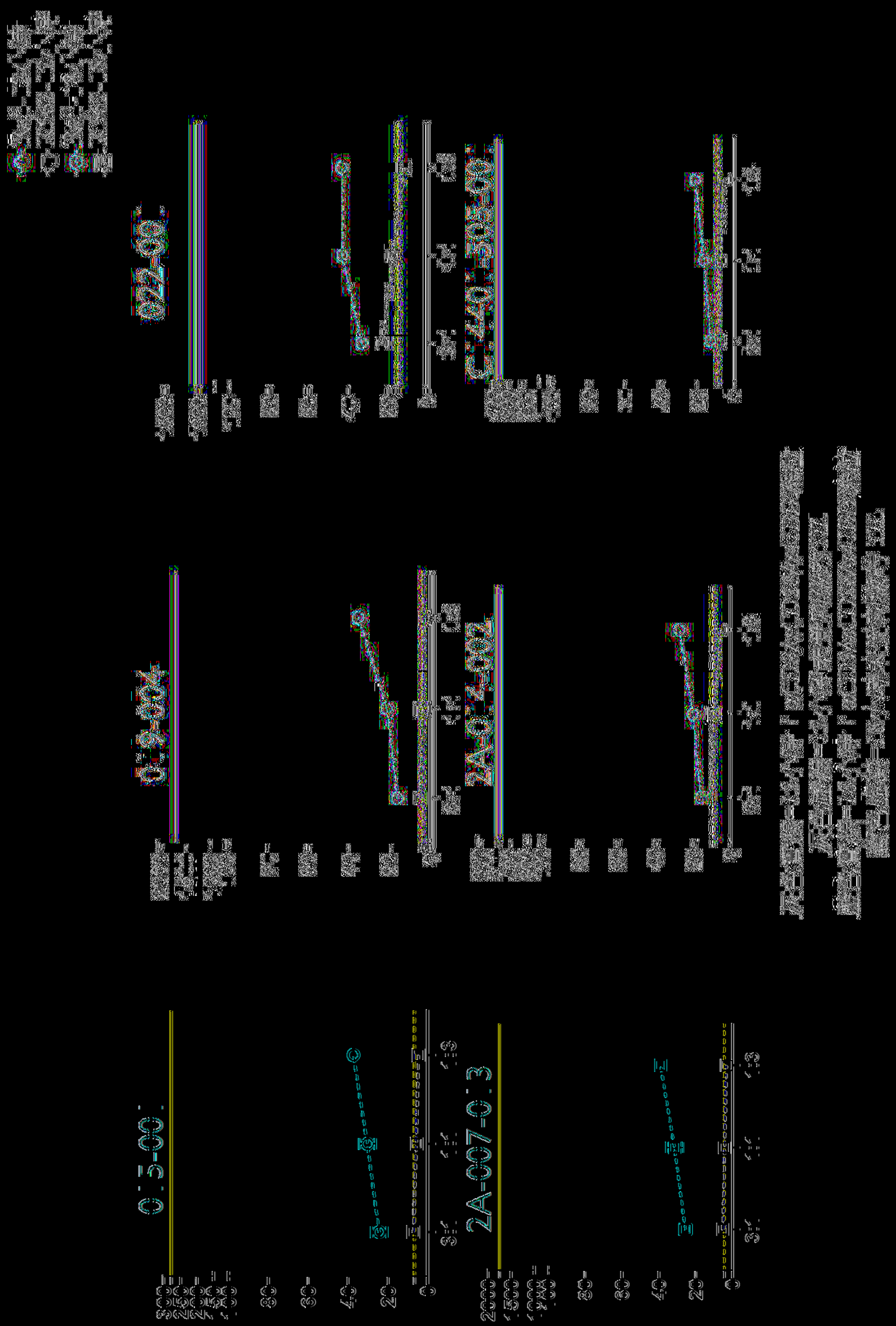


灰色實線=12小時：αCD3/αCD28/α4BB珠粒
灰色虛線=12小時未受刺激的TIL
藍色實線=18小時：αCD3/αCD28/α4BB珠粒
藍色虛線=18小時未受刺激的 TIL

（圖 85）

US 2021/0393711 A1 2021年12月23日 第911頁
111319442.0 111319442.0

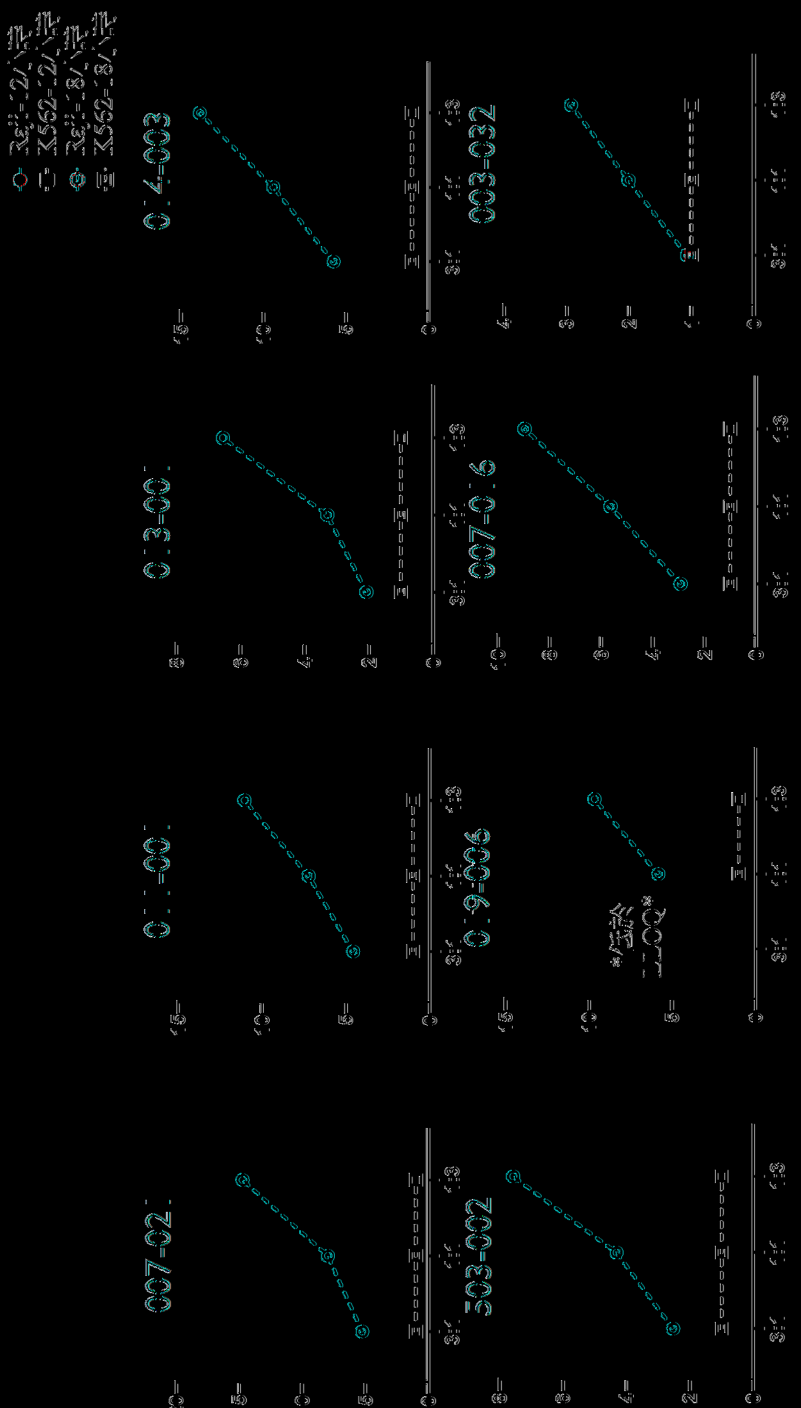
圖 (98)



（圖 87）

圖 8(a)

C22-00
C:44-:3C3=00
0:5-00:
2A-007-0:3
0:9-004:
2A-0:4-002
(60)



【圖 9】

圖 63

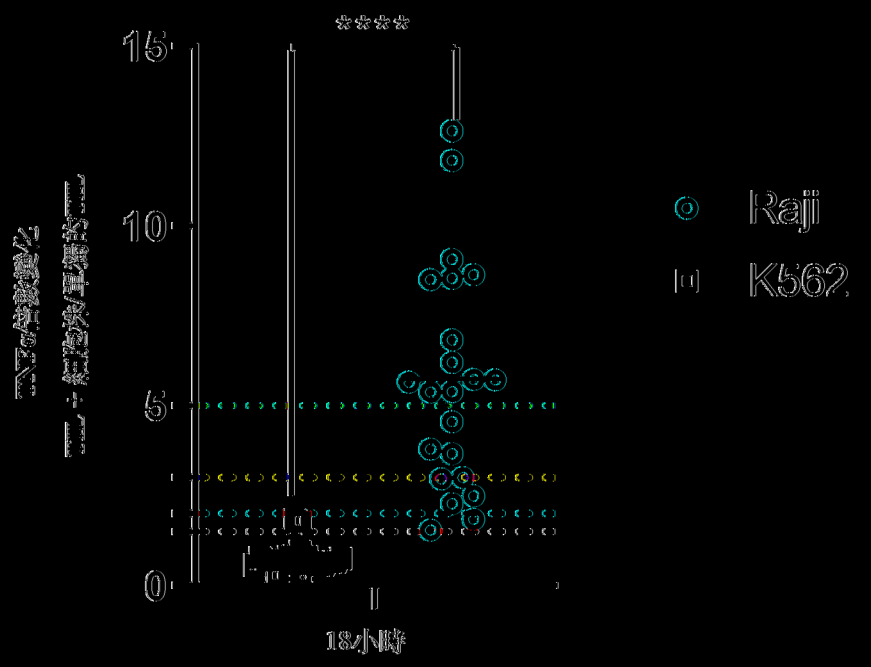


圖 94

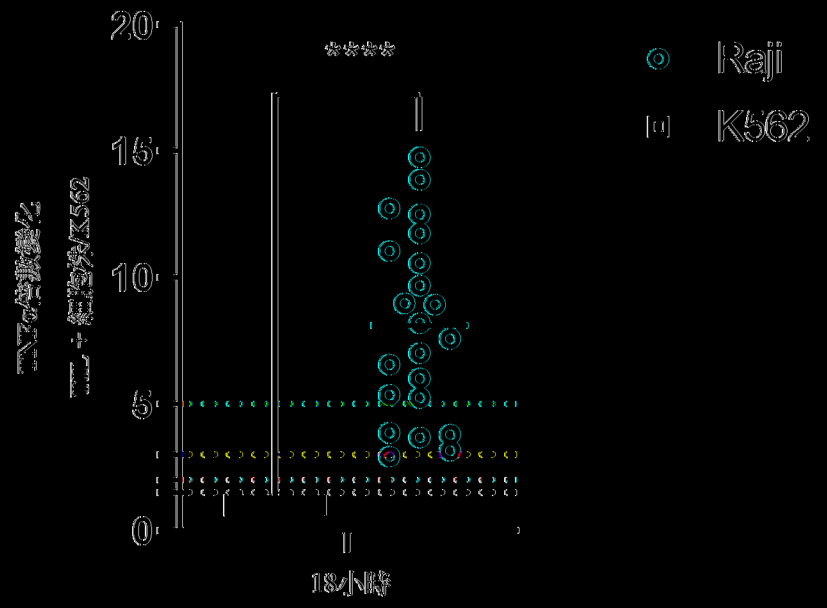


圖 95

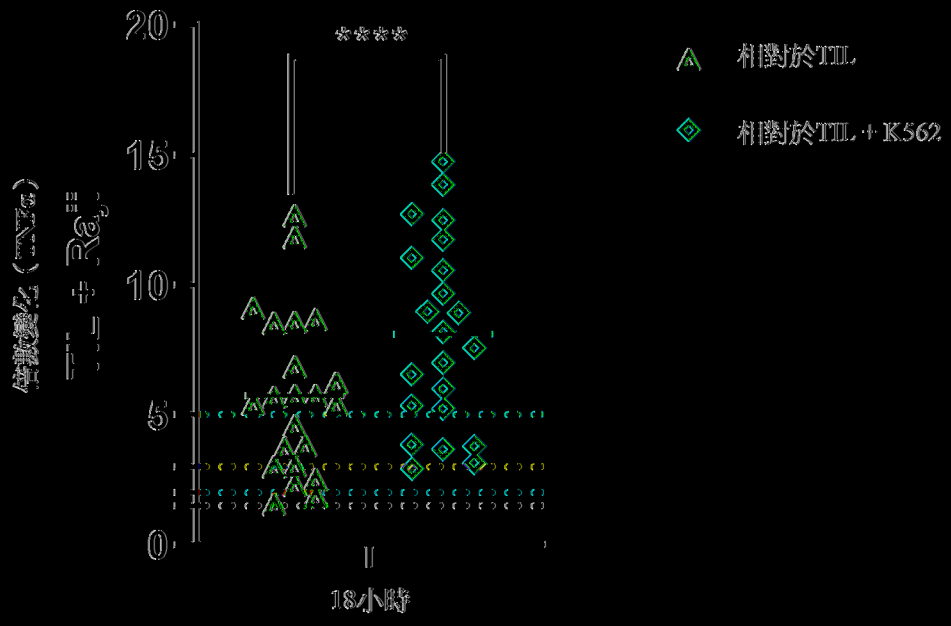


圖 96

細胞介素	時間點	群組	均值	STDEV	Min	LQ	中值	UQ	Max	CV (%)
顆粒酶B	12小時	K562 (pg/mL)	171.8	87.3	52.7	115.7	146.0	210.7	369.7	50.8
		Raji (pg/mL)	782.5	458.5	239.0	431.0	703.0	972.7	1746.3	40.4
		K562相對於TIL的倍數變化	1.6	0.7	0.4	1.1	1.5	2.0	2.9	58.6
		Raji相對於TIL的倍數變化	7.1	3.1	2.1	5.3	6.9	8.1	16.5	43.1
		K562相對於K562	1	0	1	1	1	1	1	0.0
		Raji相對於K562	4.8	1.9	2.2	3.7	4.6	4.9	10.8	39.4
	18小時	K562 (pg/mL)	337.8	175.8	119.0	217.0	311.5	378.0	853.0	52.0
		Raji (pg/mL)	2105.1	1297.4	603.3	1135.3	1672.7	3051.3	5383.7	54.6
		K562相對於TIL的倍數變化	0.9	0.5	0.3	0.5	0.9	1.2	2.3	61.6
		Raji相對於TIL的倍數變化	5.4	2.6	1.7	3.4	5.7	6.4	11.5	48.6
		K562相對於K562	1	0	1	1	1	1	1	0.0
		Raji相對於K562	6.4	3.0	2.8	4.8	5.5	8.2	14.6	46.2
IFN-γ	12小時	K562 (pg/mL)	16.0	18.4	1.8	6.3	10.5	15.2	69.1	114.8
		Raji (pg/mL)	198.4	245.3	19.5	50.7	106.5	196.0	1022.7	194.1
		K562相對於TIL的倍數變化	3.0	5.8	0.4	0.9	1.2	1.7	26.3	123.7
		Raji相對於TIL的倍數變化	26.7	26.2	2.0	7.9	14.1	46.2	92.9	97.8
		K562相對於K562	1	0	1	1	1	1	1	0.0
		Raji相對於K562	20.3	22.3	1.0	5.0	12.9	25.1	83.7	112.5
	18小時	K562 (pg/mL)	17.7	20.0	1.9	7.4	12.7	17.4	77.9	113.2
		Raji (pg/mL)	379.8	526.0	26.6	99.9	164.0	439.7	2112.7	194.0
		K562相對於TIL的倍數變化	3.1	6.0	0.3	0.9	1.0	2.0	27.1	193.5
		Raji相對於TIL的倍數變化	45.3	49.1	2.8	12.3	23.0	73.4	154.7	108.3
		K562相對於K562	1	0	1	1	1	1	1	0.0
		Raji相對於K562	35.8	47.7	1.5	6.2	14.4	44.1	157.5	129.7

111113/8 發明專利 A0202 第 103頁，共 217頁(發明專利)

1113191442-0

(36)
(34)
(32)
(30)
(28)
(26)
(24)
(22)
(20)
(18)
(16)
(14)
(12)
(10)
(8)
(6)
(4)
(2)

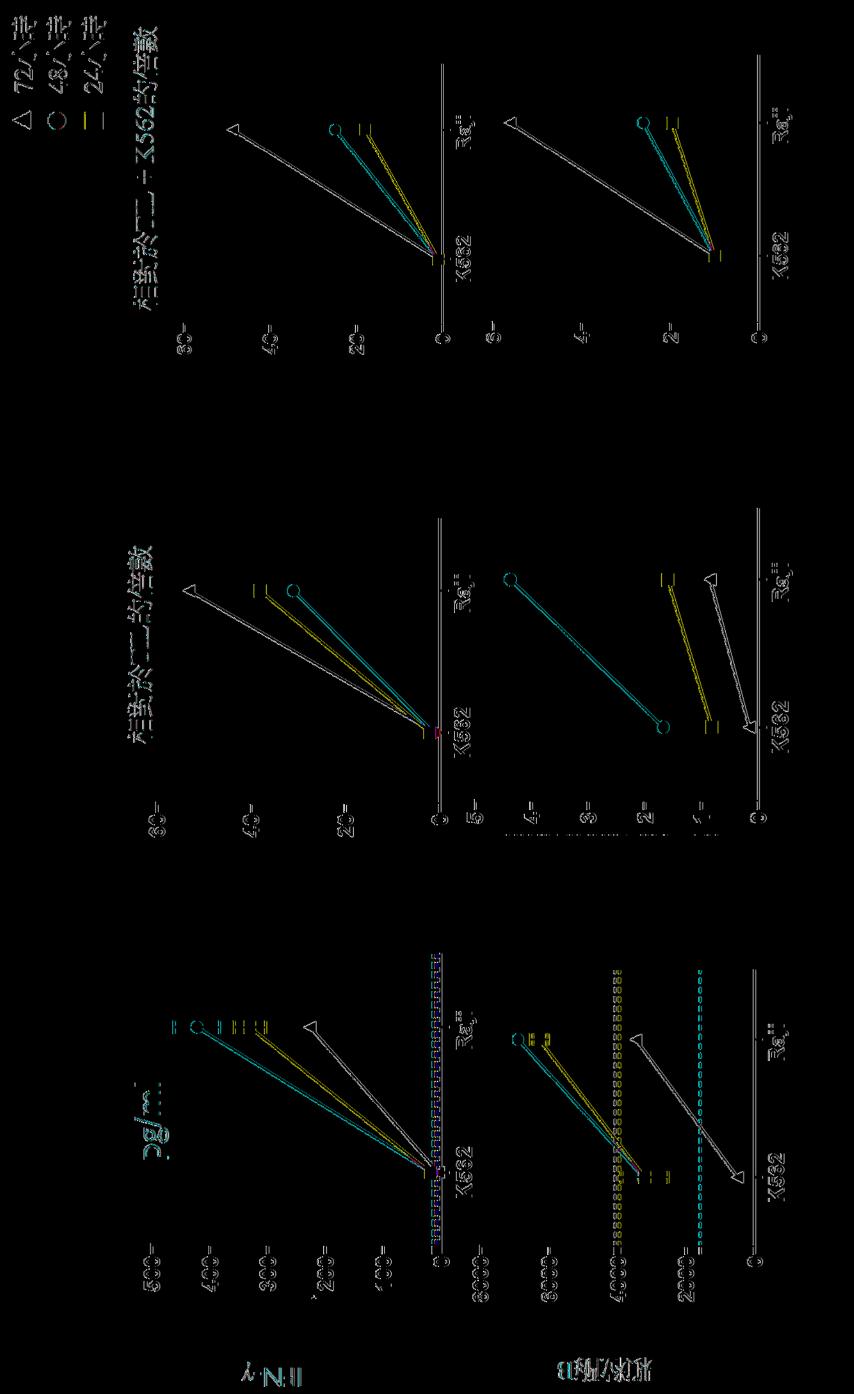
△ 72小時
○ 48小時
□ 24小時
相對於X562的基因表現量
X562
IL-2Rα
IL-2Rβ
IL-2Rγ
STAT5
pSTAT5
300
200
100
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

(圖 100)

△ 72小時
○ 48小時
□ 24小時
X562的抑制率
X562的抑制率
X562的抑制率
X562
X562
X562

△ 72小時
○ 48小時
24小時
相對於第一步驟的第一X562步驟數
相對於第一步驟的第一X562步驟數
相對於第一步驟的第一X562步驟數
相對於第一步驟的第一X562步驟數
X562
X562
X562
X562

圖 (2-02)



(圖103)

72小時
48小時
24小時
X532
X532
X532

(S05)
K562
K563
K564
K565

(第一圖)
1562
1563
1564
1565
1566
1567
1568
1569
1570
1571
1572
1573
1574
1575
1576
1577
1578
1579
1580
1581
1582
1583
1584
1585
1586
1587
1588
1589
1590
1591
1592
1593
1594
1595
1596
1597
1598
1599
1600
1601

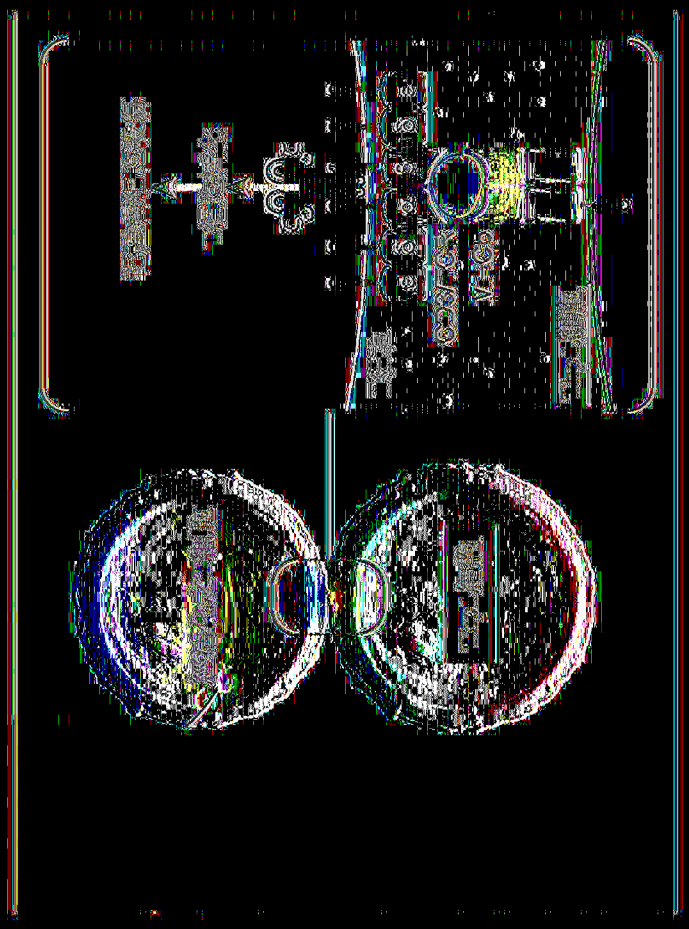


圖 8

圖 3-3

圖（一）
W'203
CV8778
細胞存活率（%）
0
20
40
60
80
100
圖例
C3
C4
C5
C6
C7
C8

圖 (一)

IL-2濃度
IL-2濃度
0 μg/mL
300 μg/mL
IL-2濃度 (pg/mL)
250
200
150
100
50
0
IL-2濃度
0 μg/mL
300 μg/mL
IL-2濃度 (pg/mL)
400
300
200
100
0

(17)

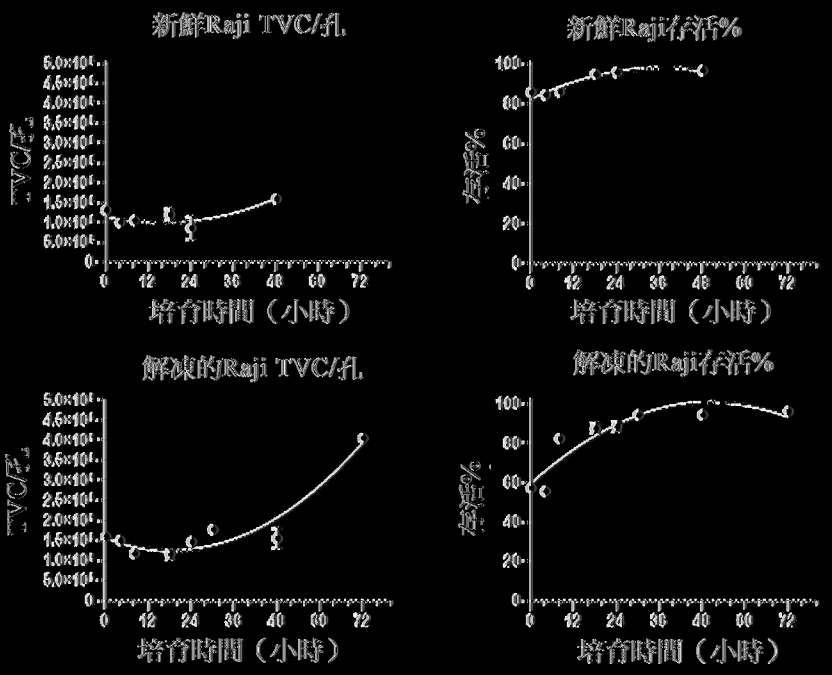
圖 15
0 μmL IL-2
300 μmL IL-2
N=179 名健康受試者之 IL-2 誘導的 pSTAT5 MFI
作圖參數化
0 μmL IL-2
300 μmL IL-2
N=179 名健康受試者之 IL-2 誘導的 pSTAT5 MFI
作圖參數化

圖 6
72小時後在CM-IL2中
72小時後在CM+IL2中
72小時後在AIM V+IL2中
0小時後
IL-2Rα (pg/ml)
72小時後在CM-IL2中
72小時後在CM+IL2中
72小時後在AIM V+IL2中
0小時後
IL-9 (pg/ml)

第一實施例
第二實施例
第三實施例
第四實施例
第五實施例
第六實施例
第七實施例
第八實施例
第九實施例
第十實施例
第十一實施例
第十二實施例
第十三實施例
第十四實施例
第十五實施例
第十六實施例
第十七實施例
第十八實施例
第十九實施例
第二十實施例
第二十一實施例
第二十二實施例
第二十三實施例
第二十四實施例
第二十五實施例
第二十六實施例
第二十七實施例
第二十八實施例
第二十九實施例
第三十實施例
第三十一實施例
第三十二實施例
第三十三實施例
第三十四實施例
第三十五實施例
第三十六實施例
第三十七實施例
第三十八實施例
第三十九實施例
第四十實施例
第四十一實施例
第四十二實施例
第四十三實施例
第四十四實施例
第四十五實施例
第四十六實施例
第四十七實施例
第四十八實施例
第四十九實施例
第五十實施例
第五十一實施例
第五十二實施例
第五十三實施例
第五十四實施例
第五十五實施例
第五十六實施例
第五十七實施例
第五十八實施例
第五十九實施例
第六十實施例
第六十一實施例
第六十二實施例
第六十三實施例
第六十四實施例
第六十五實施例
第六十六實施例
第六十七實施例
第六十八實施例
第六十九實施例
第七十實施例
第七十一實施例
第七十二實施例
第七十三實施例
第七十四實施例
第七十五實施例
第七十六實施例
第七十七實施例
第七十八實施例
第七十九實施例
第八十實施例
第八十一實施例
第八十二實施例
第八十三實施例
第八十四實施例
第八十五實施例
第八十六實施例
第八十七實施例
第八十八實施例
第八十九實施例
第九十實施例
第九十一實施例
第九十二實施例
第九十三實施例
第九十四實施例
第九十五實施例
第九十六實施例
第九十七實施例
第九十八實施例
第九十九實施例
第一百實施例
第一百一實施例
第一百二實施例
第一百三實施例
第一百四實施例
第一百五實施例
第一百六實施例
第一百七實施例
第一百八實施例
第一百九實施例
第一百十實施例
第一百十一實施例
第一百十二實施例
第一百十三實施例
第一百十四實施例
第一百十五實施例
第一百十六實施例
第一百十七實施例
第一百十八實施例
第一百十九實施例
第一百二十實施例
第一百二十一實施例
第一百二十二實施例
第一百二十三實施例
第一百二十四實施例
第一百二十五實施例
第一百二十六實施例
第一百二十七實施例
第一百二十八實施例
第一百二十九實施例
第一百三十實施例
第一百三十一實施例
第一百三十二實施例
第一百三十三實施例
第一百三十四實施例
第一百三十五實施例
第一百三十六實施例
第一百三十七實施例
第一百三十八實施例
第一百三十九實施例
第一百四十實施例
第一百四十一實施例
第一百四十二實施例
第一百四十三實施例
第一百四十四實施例
第一百四十五實施例
第一百四十六實施例
第一百四十七實施例
第一百四十八實施例
第一百四十九實施例
第一百五十實施例
第一百五十一實施例
第一百五十二實施例
第一百五十三實施例
第一百五十四實施例
第一百五十五實施例
第一百五十六實施例
第一百五十七實施例
第一百五十八實施例
第一百五十九實施例
第一百六十實施例
第一百六十一實施例
第一百六十二實施例
第一百六十三實施例
第一百六十四實施例
第一百六十五實施例
第一百六十六實施例
第一百六十七實施例
第一百六十八實施例
第一百六十九實施例
第一百七十實施例
第一百七十一實施例
第一百七十二實施例
第一百七十三實施例
第一百七十四實施例
第一百七十五實施例
第一百七十六實施例
第一百七十七實施例
第一百七十八實施例
第一百七十九實施例
第一百八十實施例
第一百八十一實施例
第一百八十二實施例
第一百八十三實施例
第一百八十四實施例
第一百八十五實施例
第一百八十六實施例
第一百八十七實施例
第一百八十八實施例
第一百八十九實施例
第一百九十實施例
第一百九十一實施例
第一百九十二實施例
第一百九十三實施例
第一百九十四實施例
第一百九十五實施例
第一百九十六實施例
第一百九十七實施例
第一百九十八實施例
第一百九十九實施例
第二百實施例
第二百一實施例
第二百二實施例
第二百三實施例
第二百四實施例
第二百五實施例
第二百六實施例
第二百七實施例
第二百八實施例
第二百九實施例
第二百十實施例
第二百十一實施例
第二百十二實施例
第二百十三實施例
第二百十四實施例
第二百十五實施例
第二百十六實施例
第二百十七實施例
第二百十八實施例
第二百十九實施例
第二百二十實施例
第二百二十一實施例
第二百二十二實施例
第二百二十三實施例
第二百二十四實施例
第二百二十五實施例
第二百二十六實施例
第二百二十七實施例
第二百二十八實施例
第二百二十九實施例
第二百三十實施例
第二百三十一實施例
第二百三十二實施例
第二百三十三實施例
第二百三十四實施例
第二百三十五實施例
第二百三十六實施例
第二百三十七實施例
第二百三十八實施例
第二百三十九實施例
第二百四十實施例
第二百四十一實施例
第二百四十二實施例
第二百四十三實施例
第二百四十四實施例
第二百四十五實施例
第二百四十六實施例
第二百四十七實施例
第二百四十八實施例
第二百四十九實施例
第二百五十實施例
第二百五十一實施例
第二百五十二實施例
第二百五十三實施例
第二百五十四實施例
第二百五十五實施例
第二百五十六實施例
第二百五十七實施例
第二百五十八實施例
第二百五十九實施例
第二百六十實施例
第二百六十一實施例
第二百六十二實施例
第二百六十三實施例
第二百六十四實施例
第二百六十五實施例
第二百六十六實施例
第二百六十七實施例
第二百六十八實施例
第二百六十九實施例
第二百七十實施例
第二百七十一實施例
第二百七十二實施例
第二百七十三實施例
第二百七十四實施例
第二百七十五實施例
第二百七十六實施例
第二百七十七實施例
第二百七十八實施例
第二百七十九實施例
第二百八十實施例
第二百八十一實施例
第二百八十二實施例
第二百八十三實施例
第二百八十四實施例
第二百八十五實施例
第二百八十六實施例
第二百八十七實施例
第二百八十八實施例
第二百八十九實施例
第二百九十實施例
第二百九十一實施例
第二百九十二實施例
第二百九十三實施例
第二百九十四實施例
第二百九十五實施例
第二百九十六實施例
第二百九十七實施例
第二百九十八實施例
第二百九十九實施例
第三百實施例
第三百一實施例
第三百二實施例
第三百三實施例
第三百四實施例
第三百五實施例
第三百六實施例
第三百七實施例
第三百八實施例
第三百九實施例
第三百十實施例
第三百十一實施例
第三百十二實施例
第三百十三實施例
第三百十四實施例
第三百十五實施例
第三百十六實施例
第三百十七實施例
第三百十八實施例
第三百十九實施例
第三百二十實施例
第三百二十一實施例
第三百二十二實施例
第三百二十三實施例
第三百二十四實施例
第三百二十五實施例
第三百二十六實施例
第三百二十七實施例
第三百二十八實施例
第三百二十九實施例
第三百三十實施例
第三百三十一實施例
第三百三十二實施例
第三百三十三實施例
第三百三十四實施例
第三百三十五實施例
第三百三十六實施例
第三百三十七實施例
第三百三十八實施例
第三百三十九實施例
第三百四十實施例
第三百四十一實施例
第三百四十二實施例
第三百四十三實施例
第三百四十四實施例
第三百四十五實施例
第三百四十六實施例
第三百四十七實施例
第三百四十八實施例
第三百四十九實施例
第三百五十實施例
第三百五十一實施例
第三百五十二實施例
第三百五十三實施例
第三百五十四實施例
第三百五十五實施例
第三百五十六實施例
第三百五十七實施例
第三百五十八實施例
第三百五十九實施例
第三百六十實施例
第三百六十一實施例
第三百六十二實施例
第三百六十三實施例
第三百六十四實施例
第三百六十五實施例
第三百六十六實施例
第三百六十七實施例
第三百六十八實施例
第三百六十九實施例
第三百七十實施例
第三百七十一實施例
第三百七十二實施例
第三百七十三實施例
第三百七十四實施例
第三百七十五實施例
第三百七十六實施例
第三百七十七實施例
第三百七十八實施例
第三百七十九實施例
第三百八十實施例
第三百八十一實施例
第三百八十二實施例
第三百八十三實施例
第三百八十四實施例
第三百八十五實施例
第三百八十六實施例
第三百八十七實施例
第三百八十八實施例
第三百八十九實施例
第三百九十實施例
第三百九十一實施例
第三百九十二實施例
第三百九十三實施例
第三百九十四實施例
第三百九十五實施例
第三百九十六實施例
第三百九十七實施例
第三百九十八實施例
第三百九十九實施例
第四百實施例
第四百一實施例
第四百二實施例
第四百三實施例
第四百四實施例
第四百五實施例
第四百六實施例
第四百七實施例
第四百八實施例
第四百九實施例
第四百十實施例
第四百十一實施例
第四百十二實施例
第四百十三實施例
第四百十四實施例
第四百十五實施例
第四百十六實施例
第四百十七實施例
第四百十八實施例
第四百十九實施例
第四百二十實施例
第四百二十一實施例
第四百二十二實施例
第四百二十三實施例
第四百二十四實施例
第四百二十五實施例
第四百二十六實施例
第四百二十七實施例
第四百二十八實施例
第四百二十九實施例
第四百三十實施例
第四百三十一實施例
第四百三十二實施例
第四百三十三實施例
第四百三十四實施例
第四百三十五實施例
第四百三十六實施例
第四百三十七實施例
第四百三十八實施例
第四百三十九實施例
第四百四十實施例
第四百四十一實施例
第四百四十二實施例
第四百四十三實施例
第四百四十四實施例
第四百四十五實施例
第四百四十六實施例
第四百四十七實施例
第四百四十八實施例
第四百四十九實施例
第四百五十實施例
第四百五十一實施例
第四百五十二實施例
第四百五十三實施例
第四百五十四實施例
第四百五十五實施例
第四百五十六實施例
第四百五十七實施例
第四百五十八實施例
第四百五十九實施例
第四百六十實施例
第四百六十一實施例
第四百六十二實施例
第四百六十三實施例
第四百六十四實施例
第四百六十五實施例
第四百六十六實施例
第四百六十七實施例
第四百六十八實施例
第四百六十九實施例
第四百七十實施例
第四百七十一實施例
第四百七十二實施例
第四百七十三實施例
第四百七十四實施例
第四百七十五實施例
第四百七十六實施例
第四百七十七實施例
第四百七十八實施例
第四百七十九實施例
第四百八十實施例
第四百八十一實施例
第四百八十二實施例
第四百八十三實施例
第四百八十四實施例
第四百八十五實施例
第四百八十六實施例
第四百八十七實施例
第四百八十八實施例
第四百八十九實施例
第四百九十實施例
第四百九十一實施例
第四百九十二實施例
第四百九十三實施例
第四百九十四實施例
第四百九十五實施例
第四百九十六實施例
第四百九十七實施例
第四百九十八實施例
第四百九十九實施例
第五百實施例
第五百一實施例
第五百二實施例
第五百三實施例
第五百四實施例
第五百五實施例
第五百六實施例
第五百七實施例
第五百八實施例
第五百九實施例
第五百十實施例
第五百十一實施例
第五百十二實施例
第五百十三實施例
第五百十四實施例
第五百十五實施例
第五百十六實施例
第五百十七實施例
第五百十八實施例
第五百十九實施例
第五百二十實施例
第五百二十一實施例
第五百二十二實施例
第五百二十三實施例
第五百二十四實施例
第五百二十五實施例
第五百二十六實施例
第五百二十七實施例
第五百二十八實施例
第五百二十九實施例
第五百三十實施例
第五百三十一實施例
第五百三十二實施例
第五百三十三實施例
第五百三十四實施例
第五百三十五實施例
第五百三十六實施例
第五百三十七實施例
第五百三十八實施例
第五百三十九實施例
第五百四十實施例
第五百四十一實施例
第五百四十二實施例
第五百四十三實施例
第五百四十四實施例
第五百四十五實施例
第五百四十六實施例
第五百四十七實施例
第五百四十八實施例
第五百四十九實施例
第五百五十實施例
第五百五十一實施例
第五百五十二實施例
第五百五十三實施例
第五百五十四實施例
第五百五十五實施例
第五百五十六實施例
第五百五十七實施例
第五百五十八實施例
第五百五十九實施例
第五百六十實施例
第五百六十一實施例
第五百六十二實施例
第五百六十三實施例
第五百六十四實施例
第五百六十五實施例
第五百六十六實施例
第五百六十七實施例
第五百六十八實施例
第五百六十九實施例
第五百七十實施例
第五百七十一實施例
第五百七十二實施例
第五百七十三實施例
第五百七十四實施例
第五百七十五實施例
第五百七十六實施例
第五百七十七實施例
第五百七十八實施例
第五百七十九實施例
第五百八十實施例
第五百八十一實施例
第五百八十二實施例
第五百八十三實施例
第五百八十四實施例
第五百八十五實施例
第五百八十六實施例
第五百八十七實施例
第五百八十八實施例
第五百八十九實施例
第五百九十實施例
第五百九十一實施例
第五百九十二實施例
第五百九十三實施例
第五百九十四實施例
第五百九十五實施例
第五百九十六實施例
第五百九十七實施例
第五百九十八實施例
第五百九十九實施例
第六百實施例
第六百一實施例
第六百二實施例
第六百三實施例
第六百四實施例
第六百五實施例
第六百六實施例
第六百七實施例
第六百八實施例
第六百九實施例
第六百十實施例
第六百十一實施例
第六百十二實施例
第六百十三實施例
第六百十四實施例
第六百十五實施例
第六百十六實施例
第六百十七實施例
第六百十八實施例
第六百十九實施例
第六百二十實施例
第六百二十一實施例
第六百二十二實施例
第六百二十三實施例
第六百二十四實施例
第六百二十五實施例
第六百二十六實施例
第六百二十七實施例
第六百二十八實施例
第六百二十九實施例
第六百三十實施例
第六百三十一實施例
第六百三十二實施例
第六百三十三實施例
第六百三十四實施例
第六百三十五實施例
第六百三十六實施例
第六百三十七實施例
第六百三十八實施例
第六百三十九實施例
第六百四十實施例
第六百四十一實施例
第六百四十二實施例
第六百四十三實施例
第六百四十四實施例
第六百四十五實施例
第六百四十六實施例
第六百四十七實施例
第六百四十八實施例
第六百四十九實施例
第六百五十實施例
第六百五十一實施例
第六百五十二實施例
第六百五十三實施例
第六百五十四實施例
第六百五十五實施例
第六百五十六實施例
第六百五十七實施例
第六百五十八實施例
第六百五十九實施例
第六百六十實施例
第六百六十一實施例
第六百六十二實施例
第六百六十三實施例
第六百六十四實施例
第六百六十五實施例
第六百六十六實施例
第六百六十七實施例
第六百六十八實施例
第六百六十九實施例
第六百七十實施例
第六百七十一實施例
第六百七十二實施例
第六百七十三實施例
第六百七十四實施例
第六百七十五實施例
第六百七十六實施例
第六百七十七實施例
第六百七十八實施例
第六百七十九實施例
第六百八十實施例
第六百八十一實施例
第六百八十二實施例
第六百八十三實施例
第六百八十四實施例
第六百八十五實施例
第六百八十六實施例
第六百八十七實施例
第六百八十八實施例
第六百八十九實施例
第六百九十實施例
第六百九十一實施例
第六百九十二實施例
第六百九十三實施例
第六百九十四實施例
第六百九十五實施例
第六百九十六實施例
第六百九十七實施例
第六百九十八實施例
第六百九十九實施例
第七百實施例
第七百一實施例
第七百二實施例
第七百三實施例
第七百四實施例
第七百五實施例
第七百六實施例
第七百七實施例
第七百八實施例
第七百九實施例
第七百十實施例
第七百十一實施例
第七百十二實施例
第七百十三實施例
第七百十四實施例
第七百十五實施例
第七百十六實施例
第七百十七實施例
第七百十八實施例
第七百十九實施例
第七百二十實施例
第七百二十一實施例
第七百二十二實施例
第七百二十三實施例
第七百二十四實施例
第七百二十五實施例
第七百二十六實施例
第七百二十七實施例
第七百二十八實施例
第七百二十九實施例
第七百三十實施例
第七百三十一實施例
第七百三十二實施例
第七百三十三實施例
第七百三十四實施例
第七百三十五實施例
第七百三十六實施例
第七百三十七實施例
第七百三十八實施例
第七百三十九實施例
第七百四十實施例
第七百四十一實施例
第七百四十二實施例
第七百四十三實施例
第七百四十四實施例
第七百四十五實施例
第七百四十六實施例
第七百四十七實施例
第七百四十八實施例
第七百四十九實施例
第七百五十實施例
第七百五十一實施例
第七百五十二實施例
第七百五十三實施例
第七百五十四實施例
第七百五十五實施例
第七百五十六實施例
第七百五十七實施例
第七百五十八實施例
第七百五十九實施例
第七百六十實施例
第七百六十一實施例
第七百六十二實施例
第七百六十三實施例
第七百六十四實施例
第七百六十五實施例
第七百六十六實施例
第七百六十七實施例
第七百六十八實施例
第七百六十九實施例
第七百七十實施例
第七百七十一實施例
第七百七十二實施例
第七百七十三實施例
第七百七十四實施例
第七百七十五實施例
第七百七十六實施例
第七百七十七實施例
第七百七十八實施例
第七百七十九實施例
第七百八十實施例
第七百八十一實施例
第七百八十二實施例
第七百八十三實施例
第七百八十四實施例
第七百八十五實施例
第七百八十六實施例
第七百八十七實施例
第七百八十八實施例
第七百八十九實施例
第七百九十實施例
第七百九十一實施例
第七百九十二實施例
第七百九十三實施例
第七百九十四實施例
第七百九十五實施例
第七百九十六實施例
第七百九十七實施例
第七百九十八實施例
第七百九十九實施例
第八百實施例
第八百一實施例
第八百二實施例
第八百三實施例
第八百四實施例
第八百五實施例
第八百六實施例
第八百七實施例
第八百八實施例
第八百九實施例
第八百十實施例
第八百十一實施例
第八百十二實施例
第八百十三實施例
第八百十四實施例
第八百十五實施例
第八百十六實施例
第八百十七實施例
第八百十八實施例
第八百十九實施例
第八百二十實施例
第八百二十一實施例
第八百二十二實施例
第八百二十三實施例
第八百二十四實施例
第八百二十五實施例
第八百二十六實施例
第八百二十七實施例
第八百二十八實施例
第八百二十九實施例
第八百三十實施例
第八百三十一實施例
第八百三十二實施例
第八百三十三實施例
第八百三十四實施例
第八百三十五實施例
第八百三十六實施例
第八百三十七實施例
第八百三十八實施例
第八百三十九實施例
第八百四十實施例
第八百四十一實施例
第八百四十二實施例
第八百四十三實施例
第八百四十四實施例
第八百四十五實施例
第八百四十六實施例
第八百四十七實施例
第八百四十八實施例
第八百四十九實施例
第八百五十實施例
第八百五十一實施例
第八百五十二實施例
第八百五十三實施例
第八百五十四實施例
第八百五十五實施例
第八百五十六實施例
第八百五十七實施例
第八百五十八實施例
第八百五十九實施例
第八百六十實施例
第八百六十一實施例
第八百六十二實施例
第八百六十三實施例
第八百六十四實施例
第八百六十五實施例
第八百六十六實施例
第八百六十七實施例
第八百六十八實施例
第八百六十九實施例
第八百七十實施例
第八百七十一實施例
第八百七十二實施例
第八百七十三實施例
第八百七十四實施例
第八百七十五實施例
第八百七十六實施例
第八百七十七實施例
第八百七十八實施例
第八百七十九實施例
第八百八十實施例
第八百八十一實施例
第八百八十二實施例
第八百八十三實施例
第八百八十四實施例
第八百八十五實施例
第八百八十六實施例
第八百八十七實施例
第八百八十八實施例
第八百八十九實施例
第八百九十實施例
第八百九十一實施例
第八百九十二實施例
第八百九十三實施例
第八百九十四實施例
第八百九十五實施例
第八百九十六實施例
第八百九十七實施例
第八百九十八實施例
第八百九十九實施例
第九百實施例
第九百一實施例
第九百二實施例
第九百三實施例
第九百四實施例
第九百五實施例
第九百六實施例
第九百七實施例
第九百八實施例
第九百九實施例
第九百十實施例
第九百十一實施例
第九百十二實施例
第九百十三實施例
第九百十四實施例
第九百十五實施例
第九百十六實施例
第九百十七實施例
第九百十八實施例
第九百十九實施例
第九百二十實施例
第九百二十一實施例
第九百二十二實施例
第九百二十三實施例
第九百二十四實施例
第九百二十五實施例
第九百二十六實施例
第九百二十七實施例
第九百二十八實施例
第九百二十九實施例
第九百三十實施例
第九百三十一實施例
第九百三十二實施例
第九百三十三實施例
第九百三十四實施例
第九百三十五實施例
第九百三十六實施例
第九百三十七實施例
第九百三十八實施例
第九百三十九實施例
第九百四十實施例
第九百四十一實施例
第九百四十二實施例
第九百四十三實施例
第九百四十四實施例
第九百四十五實施例
第九百四十六實施例
第九百四十七實施例
第九百四十八實施例
第九百四十九實施例
第九百五十實施例
第九百五十一實施例
第九百五十二實施例
第九百五十三實施例
第九百五十四實施例
第九百五十五實施例
第九百五十六實施例
第九百五十七實施例
第九百五十八實施例
第九百五十九實施例
第九百六十實施例
第九百六十一實施例
第九百六十二實施例
第九百六十三實施例
第九百六十四實施例
第九百六十五實施例
第九百六十六實施例
第九百六十七實施例
第九百六十八實施例
第九百六十九實施例
第九百七十實施例
第九百七十一實施例
第九百七十二實施例
第九百七十三實施例
第九百七十四實施例
第九百七十五實施例
第九百七十六實施例
第九百七十七實施例
第九百七十八實施例
第九百七十九實施例
第九百八十實施例
第九百八十一實施例
第九百八十二實施例
第九百八十三實施例
第九百八十四實施例
第九百八十五實施例
第九百八十六實施例
第九百八十七實施例
第九百八十八實施例
第九百八十九實施例
第九百九十實施例
第九百九十一實施例
第九百九十二實施例
第九百九十三實施例
第九百九十四實施例
第九百九十五實施例
第九百九十六實施例
第九百九十七實施例
第九百九十八實施例
第九百九十九實施例
第一千實施例

圖 3
(pg/ml) 濃度 IL-6
(pg/ml) 濃度 IL-8
(%) 細胞存活率
(%) 細胞存活率

第1圖
(先前技術)
(先前技術)
(先前技術)
(先前技術)


新鮮Raji TVC/孔
TVC/孔
培育時間（小時）
新鮮Raji存活%
存活%
培育時間（小時）
解凍的Raji TVC/孔
TVC/孔
培育時間（小時）
解凍的Raji存活%
存活%
培育時間（小時）

（圖 121）

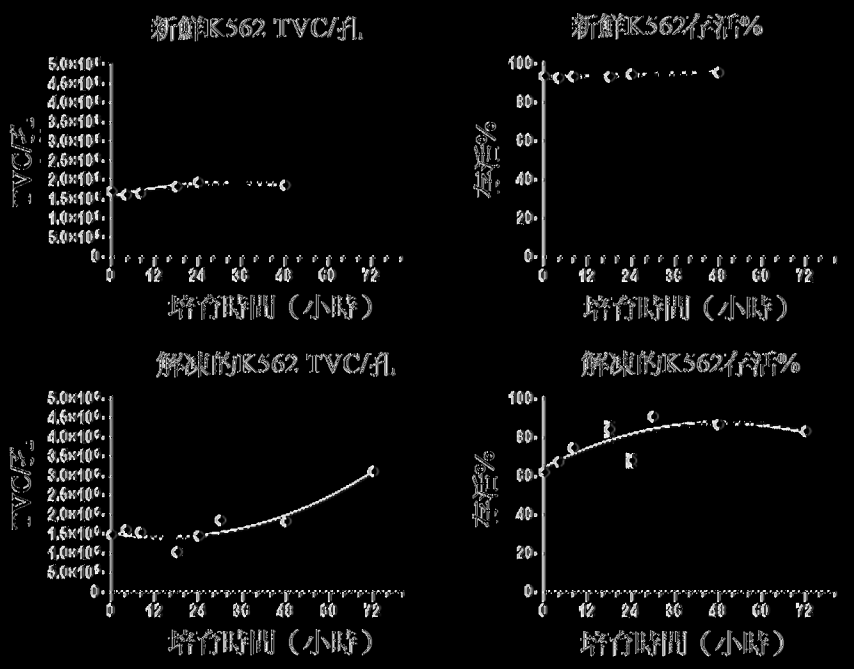
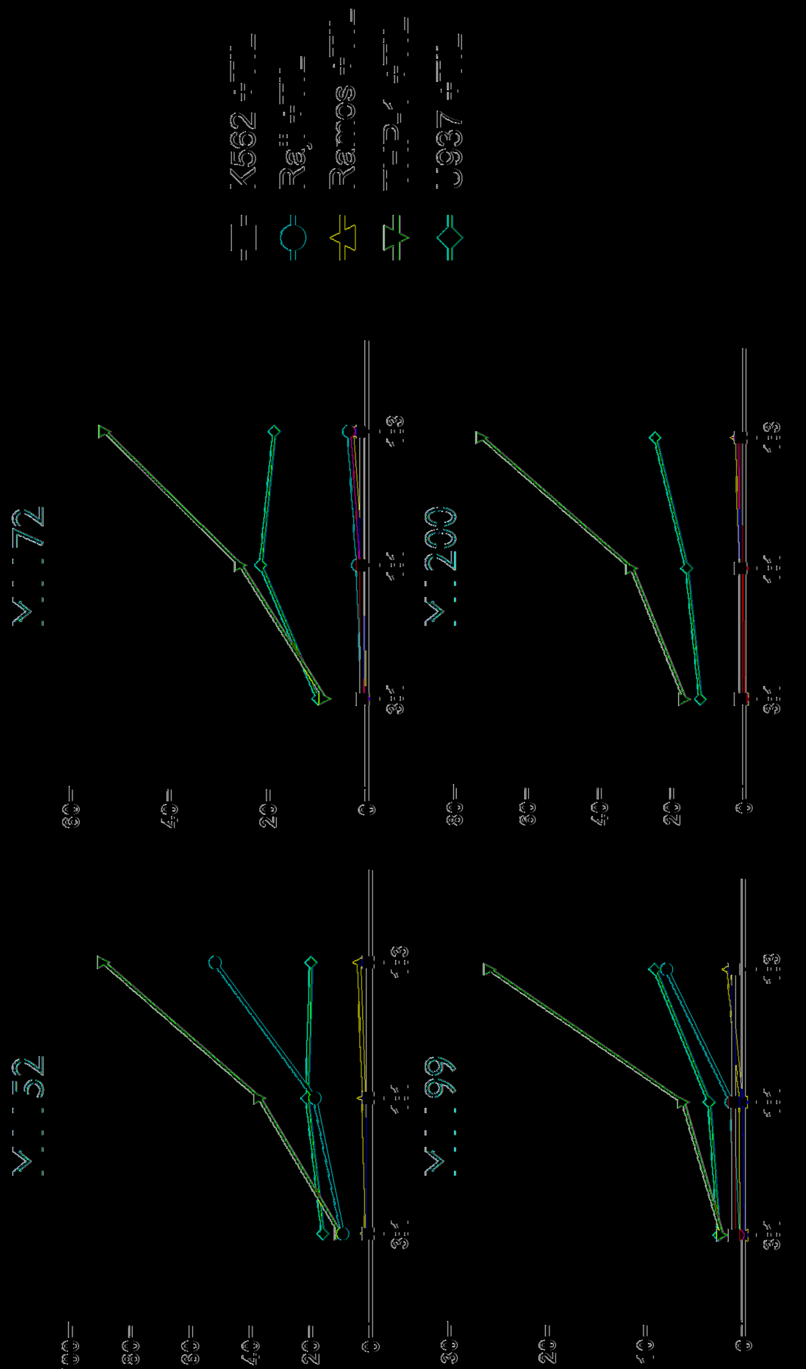

新鮮K562 TVC/孔
TVC/孔
培育時間（小時）
新鮮K562存活%
存活%
培育時間（小時）
解凍的K562 TVC/孔
TVC/孔
培育時間（小時）
解凍的K562存活%
存活%
培育時間（小時）

圖 122

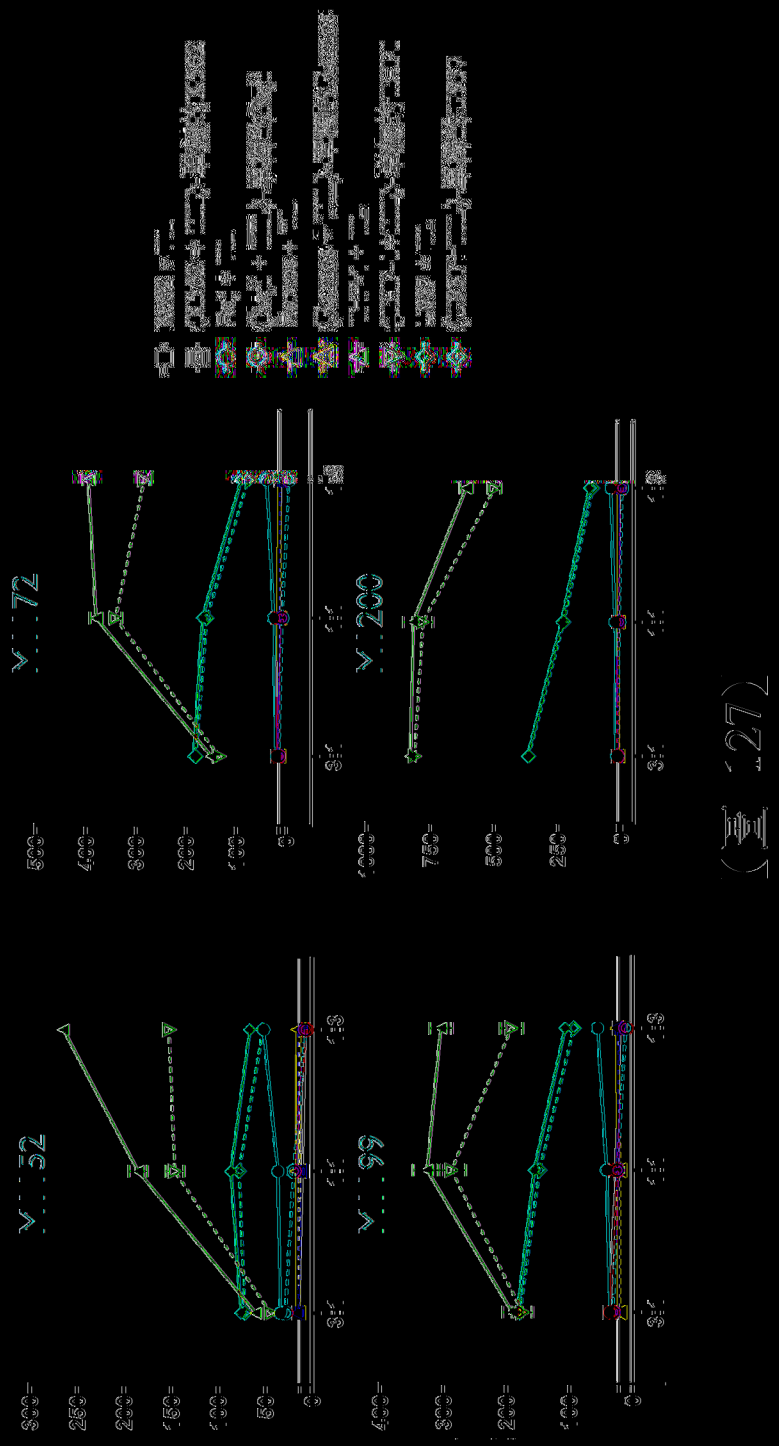
圖 (23)

圖 24

X562
X337
X72
X200
X32
X99
(圖 25)



(圖 126)


圖 27

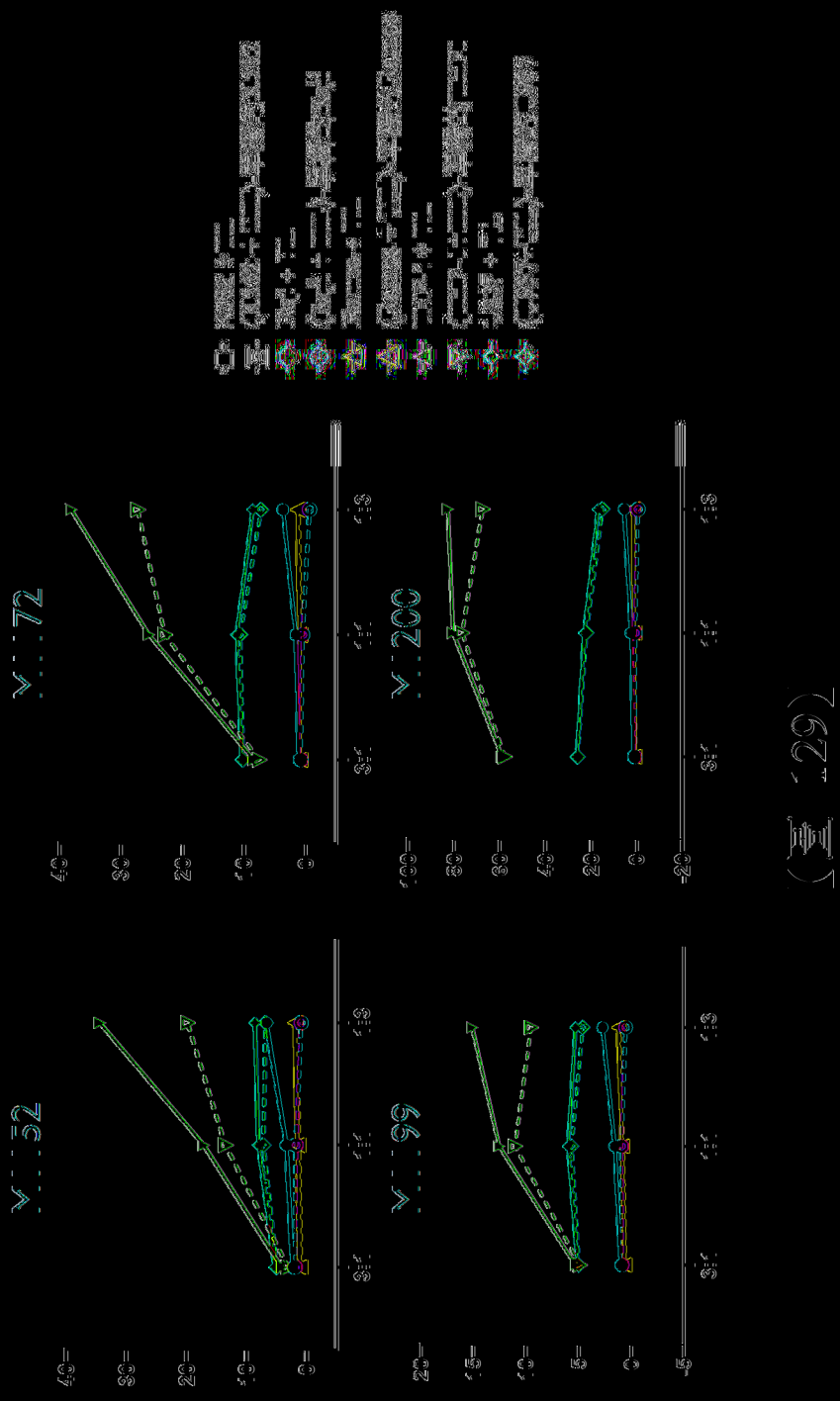
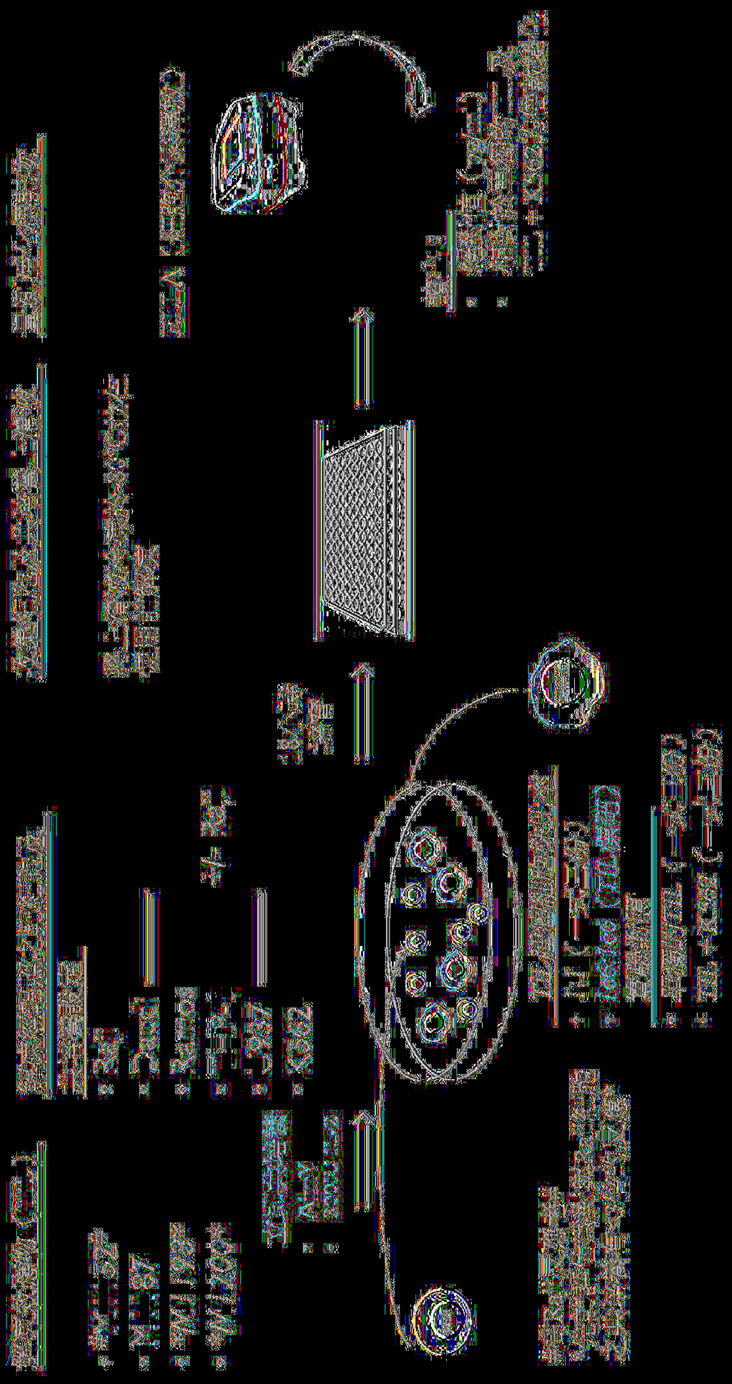
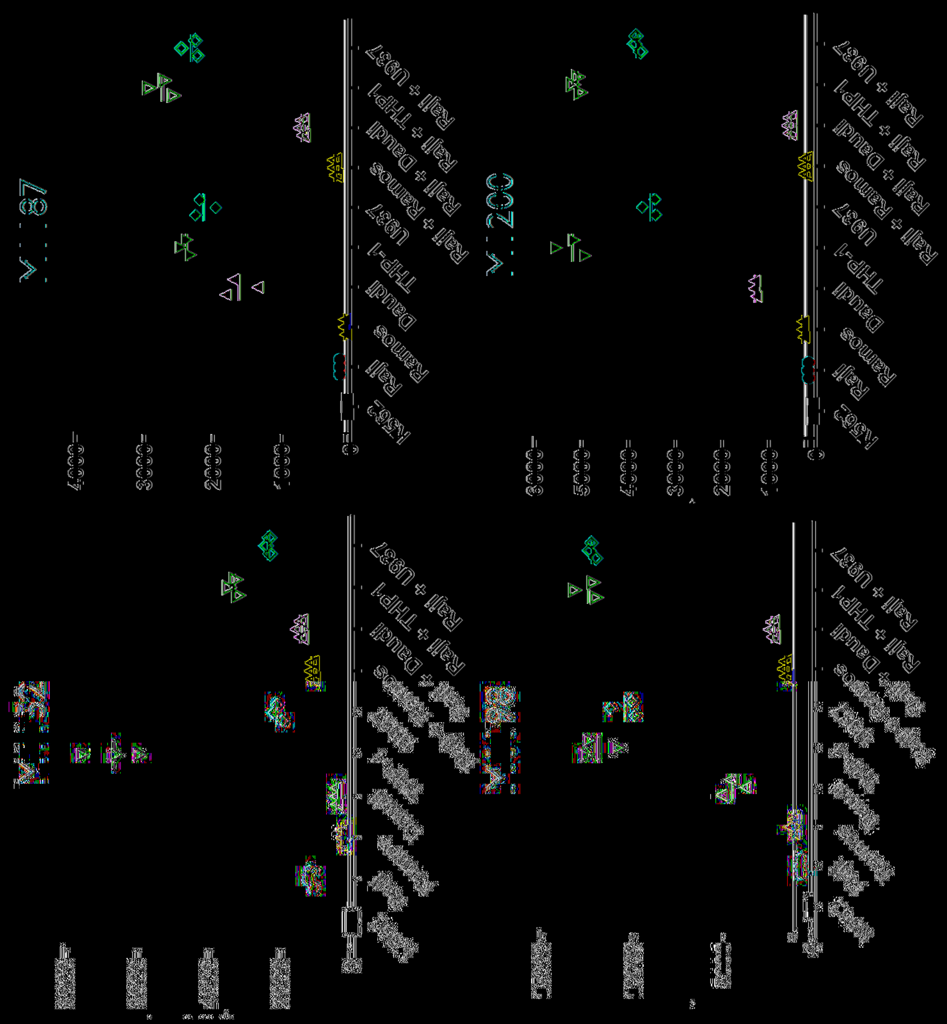


圖 29



（圖 30）



（圖131）

圖 3C
x 87
Rafi + Rey
Rafi + Ramos
Rafi + Daudi
Rafi + THP-1
Rafi + U937
Rafi
Ramos
Daudi
THP-1
U937
Rey
Vero
x 83
Rafi + Rey
Rafi + Ramos
Rafi + Daudi
Rafi + THP-1
Rafi + U937
Rafi
Ramos
Daudi
THP-1
U937
Rey
Vero
x 52
Rafi + Rey
Rafi + Ramos
Rafi + Daudi
Rafi + THP-1
Rafi + U937
Rafi
Ramos
Daudi
THP-1
U937
Rey
Vero
x 98
Rafi + Rey
Rafi + Ramos
Rafi + Daudi
Rafi + THP-1
Rafi + U937
Rafi
Ramos
Daudi
THP-1
U937
Rey
Vero

圖 33
x = 37
x = 203
x = 52
x = 86
A562
Rajl
Ramos
Dauul
THP-1
U937
Rajl + Ramos
Rajl + Dauul
Rajl + THP-1
Rajl + U937

Raft + U87
Raft + THP1
Raft + Daudi
Raft + Ramos
U87
THP-1
Daudi
Ramos
Raft
A562
25
20
15
10
5
0

Raft + U87
Raft + THP1
Raft + Daudi
Raft + Ramos
U87
THP-1
Daudi
Ramos
Raft
A562
30
20
10
0

(c)

圖 (35)

x 87
x 22
x 203
x 86
base
ramos
Daudi
THP-1
U937
Raji + Jiyoye
Raji + ramos
Raji + Daudi
Raji + THP-1
Raji + U937

圖 36

x = 37
x = 28
x = 32
x = 38
Raji
Ramos
Daudi
THP-1
U937
Raji + Ramos
Raji + Daudi
Raji + THP-1
Raji + U937

圖 37

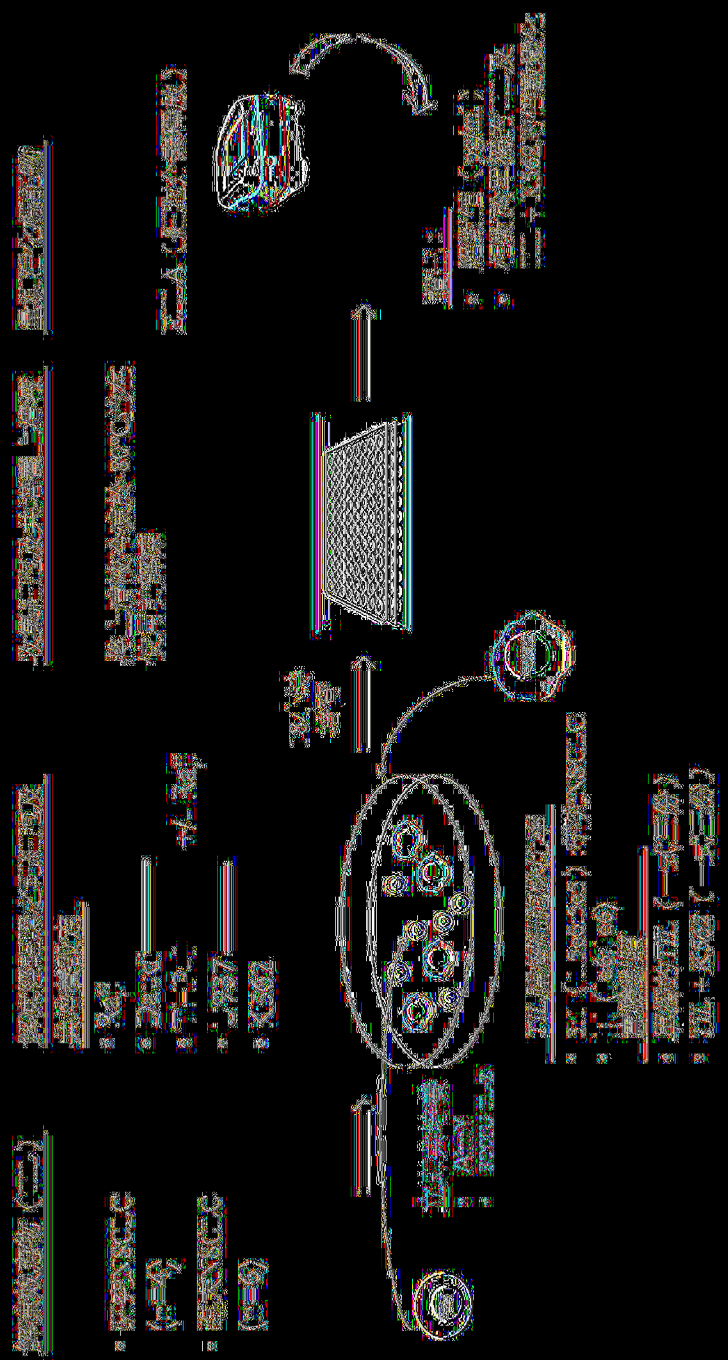
圖 38
y = 87
y = 88
y = 89
y = 90
Rail
Ramos
Daudi
THP-1
U937
Rail + Ramos
Rail + Daudi
Rail + THP-1
Rail + U937

x : 87
x : 32
x : 27
x : 38
Rail + Rey
Rail + Ramos
Rail + Daud
Rail + THP-1
Rail + U87
Rey
Ramos
Daud
THP-1
U87
Rail
Rey
Ramos
Daud
THP-1
U87

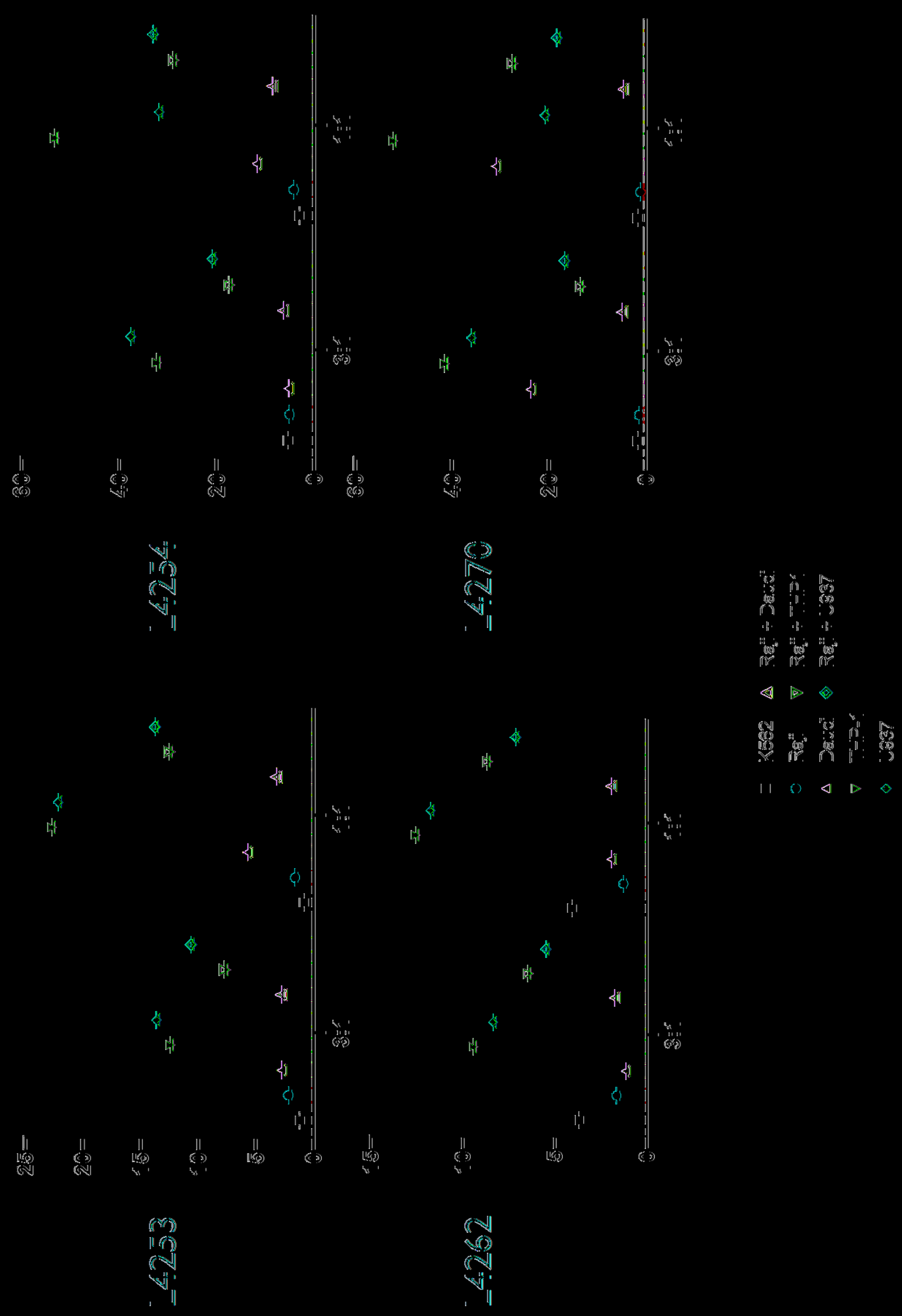
圖 3(c)

x = 87
x = 32
x = 293
x = 98
Rail
Ramos
Daudi
THP-1
U937
Rail + Ramos
Rail + Daudi
Rail + THP-1
Rail + U937

圖 (67)



(圖 42)



（圖43）

(圖 17)

圖 15

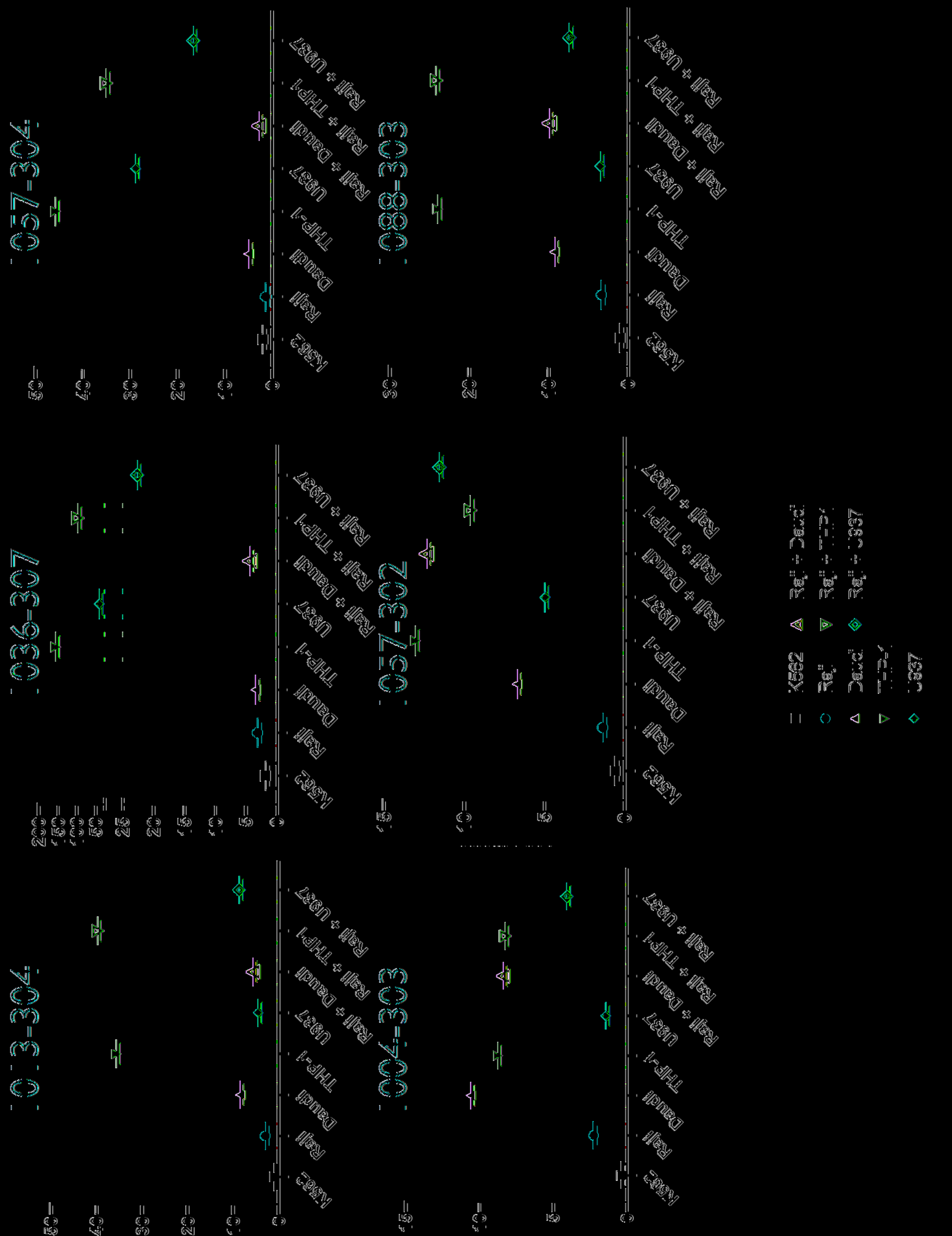
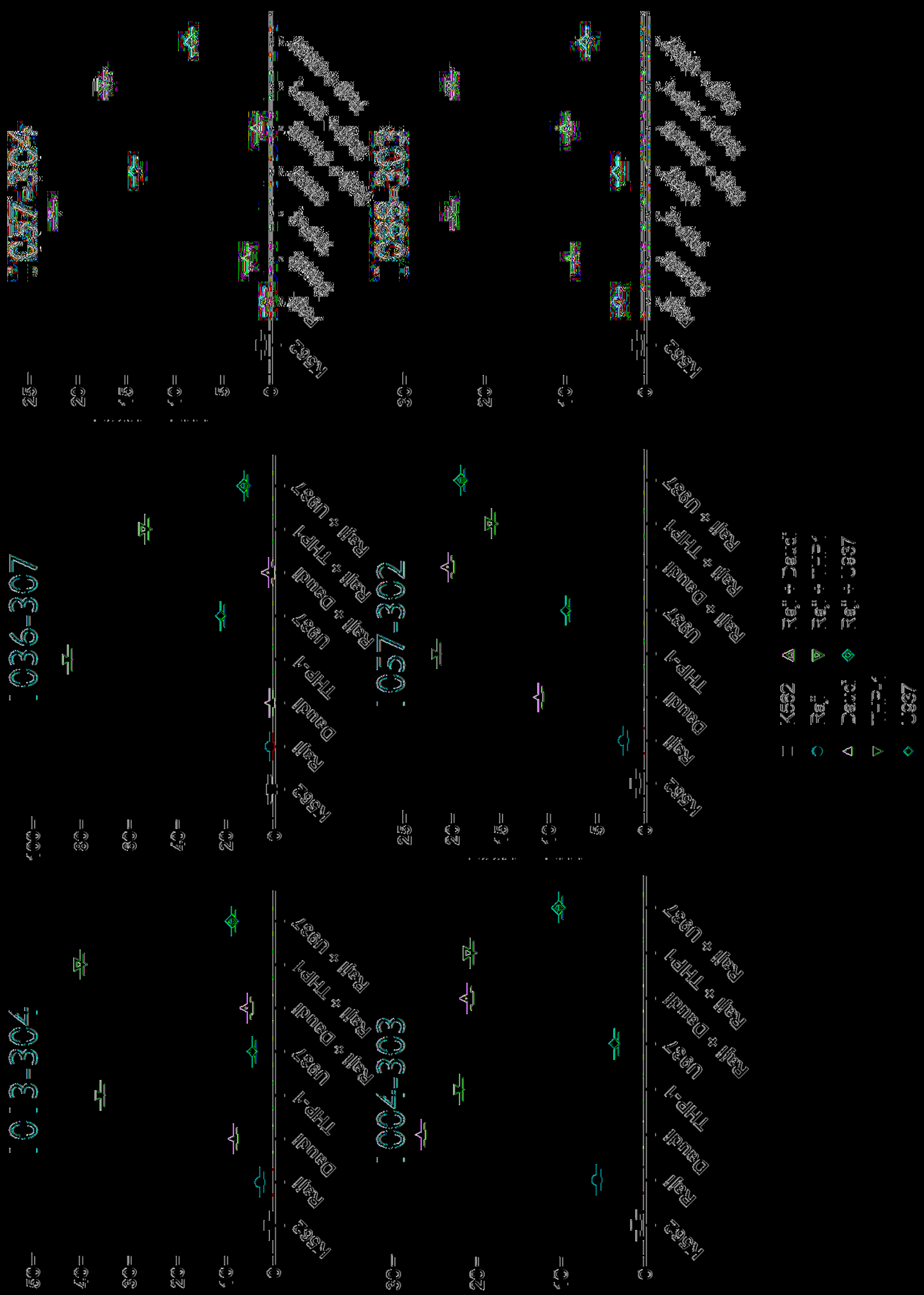
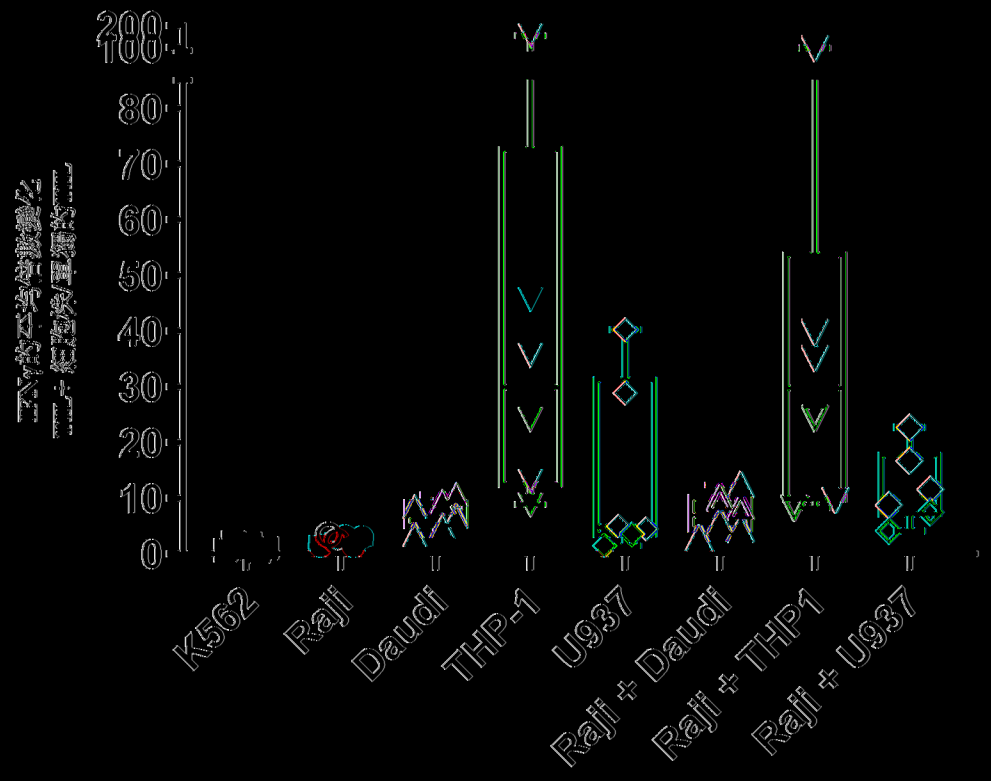

036-307
057-304
004-303
057-302
088-303
K562
Raji
Daudi
THP-1
U937
Raji + Daudi
Raji + THP-1
Raji + U937

圖 46



(圖 47)


200
100
80
70
60
50
40
30
20
10
0
K562
Raji
Daudi
THP-1
U937
Raji + Daudi
Raji + THP1
Raji + U937

|(圖 148)|

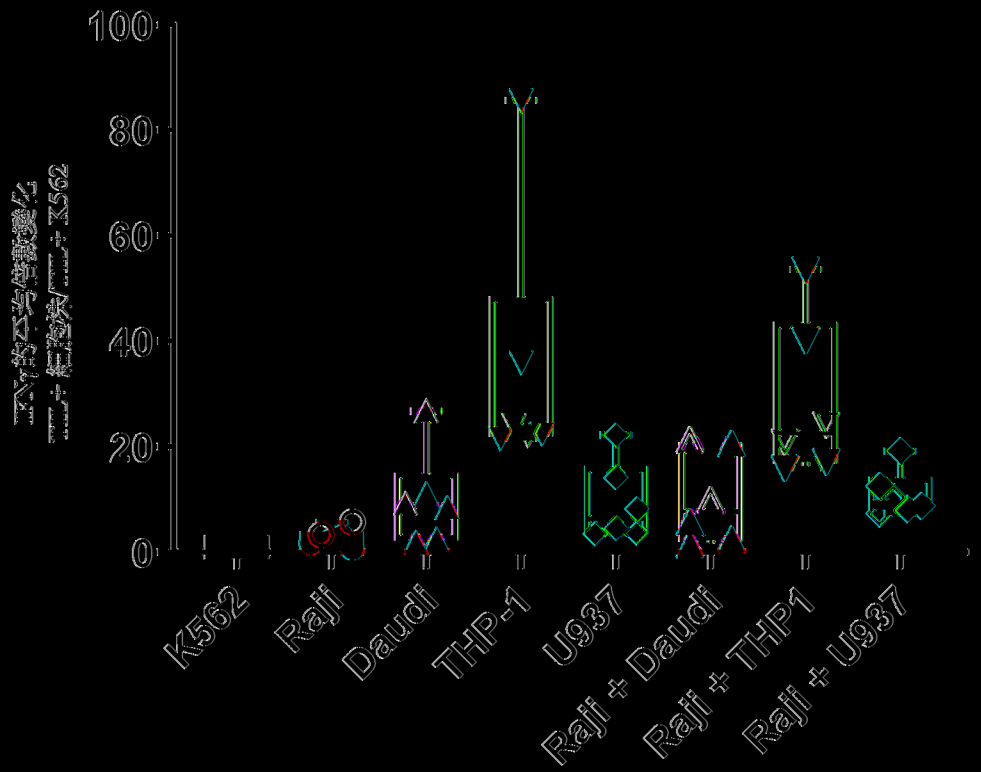
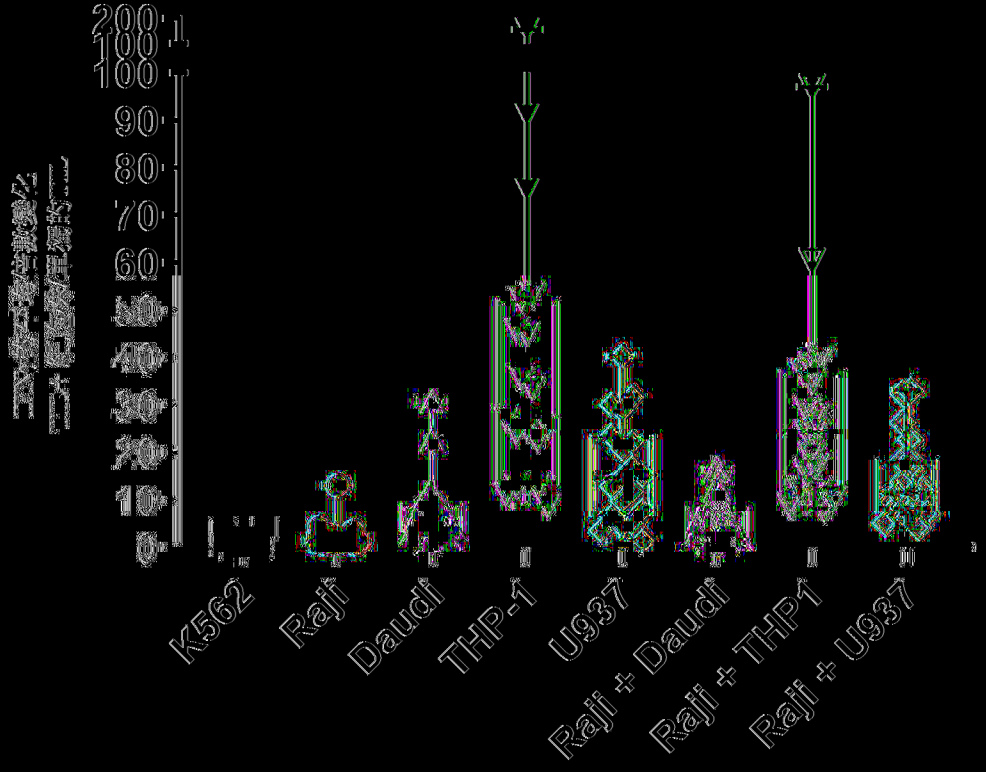

100
80
60
40
20
0
K562
Raji
Daudi
THP-1
U937
Raji + Daudi
Raji + THP1
Raji + U937

圖 149


200
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
K562
Raji
Daudi
THP-1
U937
Raji + Daudi
Raji + THP1
Raji + U937

|(圖 150)|

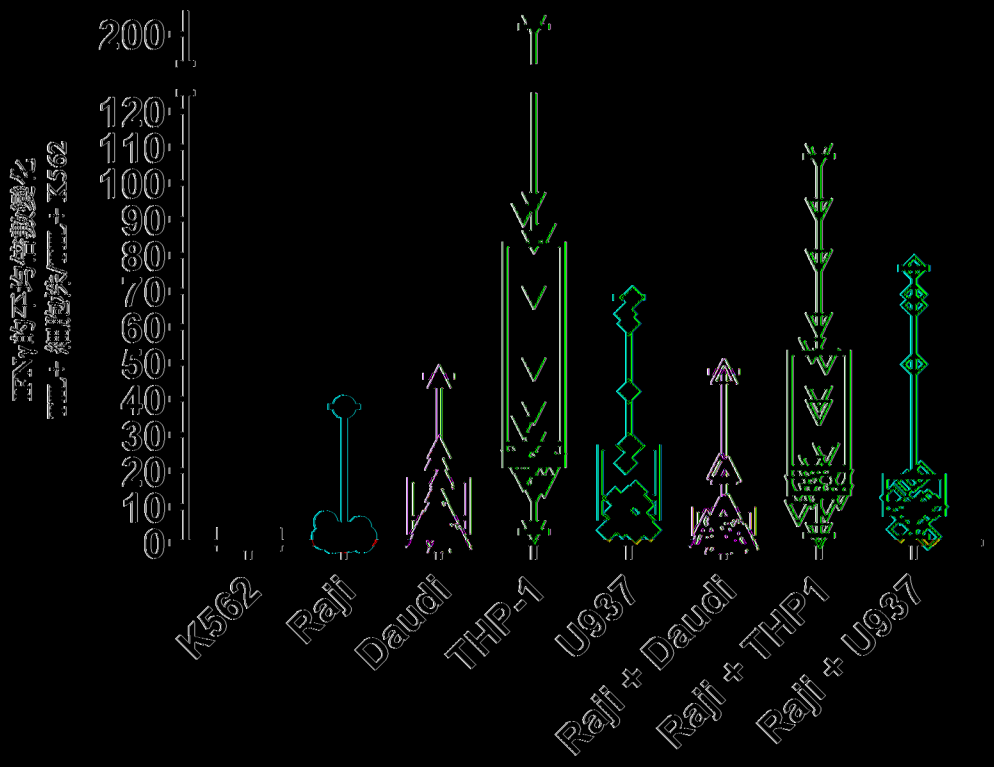

K562 + 細胞株
200
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
K562
Raji
Daudi
THP-1
U937
Raji + Daudi
Raji + THP1
Raji + U937

圖 151

(圖 52)

圖 3

第1圖
第1圖
第1圖

圖 (1-59)

(圖 57)

圖 3

第3圖
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)
(i)
(j)
(k)
(l)
(m)
(n)
(o)
(p)
(q)
(r)
(s)
(t)
(u)
(v)
(w)
(x)
(y)
(z)
(aa)
(ab)
(ac)
(ad)
(ae)
(af)
(ag)
(ah)
(ai)
(aj)
(ak)
(al)
(am)
(an)
(ao)
(ap)
(aq)
(ar)
(as)
(at)
(au)
(av)
(aw)
(ax)
(ay)
(az)
(ba)
(bb)
(bc)
(bd)
(be)
(bf)
(bg)
(bh)
(bi)
(bj)
(bk)
(bl)
(bm)
(bn)
(bo)
(bp)
(bq)
(br)
(bs)
(bt)
(bu)
(bv)
(bw)
(bx)
(by)
(bz)
(ca)
(cb)
(cc)
(cd)
(ce)
(cf)
(cg)
(ch)
(ci)
(cj)
(ck)
(cl)
(cm)
(cn)
(co)
(cp)
(cq)
(cr)
(cs)
(ct)
(cu)
(cv)
(cw)
(cx)
(cy)
(cz)
(da)
(db)
(dc)
(dd)
(de)
(df)
(dg)
(dh)
(di)
(dj)
(dk)
(dl)
(dm)
(dn)
(do)
(dp)
(dq)
(dr)
(ds)
(dt)
(du)
(dv)
(dw)
(dx)
(dy)
(dz)
(ea)
(eb)
(ec)
(ed)
(ee)
(ef)
(eg)
(eh)
(ei)
(ej)
(ek)
(el)
(em)
(en)
(eo)
(ep)
(eq)
(er)
(es)
(et)
(eu)
(ev)
(ew)
(ex)
(ey)
(ez)
(fa)
(fb)
(fc)
(fd)
(fe)
(ff)
(fg)
(fh)
(fi)
(fj)
(fk)
(fl)
(fm)
(fn)
(fo)
(fp)
(fq)
(fr)
(fs)
(ft)
(fu)
(fv)
(fw)
(fx)
(fy)
(fz)
(ga)
(gb)
(gc)
(gd)
(ge)
(gf)
(gg)
(gh)
(gi)
(gj)
(gk)
(gl)
(gm)
(gn)
(go)
(gp)
(gq)
(gr)
(gs)
(gt)
(gu)
(gv)
(gw)
(gx)
(gy)
(gz)
(ha)
(hb)
(hc)
(hd)
(he)
(hf)
(hg)
(hh)
(hi)
(hj)
(hk)
(hl)
(hm)
(hn)
(ho)
(hp)
(hq)
(hr)
(hs)
(ht)
(hu)
(hv)
(hw)
(hx)
(hy)
(hz)
(ia)
(ib)
(ic)
(id)
(ie)
(if)
(ig)
(ih)
(ii)
(ij)
(ik)
(il)
(im)
(in)
(io)
(ip)
(iq)
(ir)
(is)
(it)
(iu)
(iv)
(iw)
(ix)
(iy)
(iz)
(ja)
(jb)
(jc)
(jd)
(je)
(jf)
(jg)
(jh)
(ji)
(jj)
(jk)
(jl)
(jm)
(jn)
(jo)
(jp)
(jq)
(jr)
(js)
(jt)
(ju)
(jv)
(jw)
(jx)
(jy)
(jz)
(ka)
(kb)
(kc)
(kd)
(ke)
(kf)
(kg)
(kh)
(ki)
(kj)
(kk)
(kl)
(km)
(kn)
(ko)
(kp)
(kq)
(kr)
(ks)
(kt)
(ku)
(kv)
(kw)
(kx)
(ky)
(kz)
(la)
(lb)
(lc)
(ld)
(le)
(lf)
(lg)
(lh)
(li)
(lj)
(lk)
(ll)
(lm)
(ln)
(lo)
(lp)
(lq)
(lr)
(ls)
(lt)
(lu)
(lv)
(lw)
(lx)
(ly)
(lz)
(ma)
(mb)
(mc)
(md)
(me)
(mf)
(mg)
(mh)
(mi)
(mj)
(mk)
(ml)
(mm)
(mn)
(mo)
(mp)
(mq)
(mr)
(ms)
(mt)
(mu)
(mv)
(mw)
(mx)
(my)
(mz)
(na)
(nb)
(nc)
(nd)
(ne)
(nf)
(ng)
(nh)
(ni)
(nj)
(nk)
(nl)
(nm)
(nn)
(no)
(np)
(nq)
(nr)
(ns)
(nt)
(nu)
(nv)
(nw)
(nx)
(ny)
(nz)
(oa)
(ob)
(oc)
(od)
(oe)
(of)
(og)
(oh)
(oi)
(oj)
(ok)
(ol)
(om)
(on)
(oo)
(op)
(oq)
(or)
(os)
(ot)
(ou)
(ov)
(ow)
(ox)
(oy)
(oz)
(pa)
(pb)
(pc)
(pd)
(pe)
(pf)
(pg)
(ph)
(pi)
(pj)
(pk)
(pl)
(pm)
(pn)
(po)
(pp)
(pq)
(pr)
(ps)
(pt)
(pu)
(pv)
(pw)
(px)
(py)
(pz)
(qa)
(qb)
(qc)
(qd)
(qe)
(qf)
(qg)
(qh)
(qi)
(qj)
(qk)
(ql)
(qm)
(qn)
(qo)
(qp)
(qq)
(qr)
(qs)
(qt)
(qu)
(qv)
(qw)
(qx)
(qy)
(qz)
(ra)
(rb)
(rc)
(rd)
(re)
(rf)
(rg)
(rh)
(ri)
(rj)
(rk)
(rl)
(rm)
(rn)
(ro)
(rp)
(rq)
(rr)
(rs)
(rt)
(ru)
(rv)
(rw)
(rx)
(ry)
(rz)
(sa)
(sb)
(sc)
(sd)
(se)
(sf)
(sg)
(sh)
(si)
(sj)
(sk)
(sl)
(sm)
(sn)
(so)
(sp)
(sq)
(sr)
(ss)
(st)
(su)
(sv)
(sw)
(sx)
(sy)
(sz)
(ta)
(tb)
(tc)
(td)
(te)
(tf)
(tg)
(th)
(ti)
(tj)
(tk)
(tl)
(tm)
(tn)
(to)
(tp)
(tq)
(tr)
(ts)
(tt)
(tu)
(tv)
(tw)
(tx)
(ty)
(tz)
(ua)
(ub)
(uc)
(ud)
(ue)
(uf)
(ug)
(uh)
(ui)
(uj)
(uk)
(ul)
(um)
(un)
(uo)
(up)
(uq)
(ur)
(us)
(ut)
(uu)
(uv)
(uw)
(ux)
(uy)
(uz)
(va)
(vb)
(vc)
(vd)
(ve)
(vf)
(vg)
(vh)
(vi)
(vj)
(vk)
(vl)
(vm)
(vn)
(vo)
(vp)
(vq)
(vr)
(vs)
(vt)
(vu)
(vv)
(vw)
(vx)
(vy)
(vz)
(wa)
(wb)
(wc)
(wd)
(we)
(wf)
(wg)
(wh)
(wi)
(wj)
(wk)
(wl)
(wm)
(wn)
(wo)
(wp)
(wq)
(wr)
(ws)
(wt)
(wu)
(wv)
(ww)
(wx)
(wy)
(wz)
(xa)
(xb)
(xc)
(xd)
(xe)
(xf)
(xg)
(xh)
(xi)
(xj)
(xk)
(xl)
(xm)
(xn)
(xo)
(xp)
(xq)
(xr)
(xs)
(xt)
(xu)
(xv)
(xw)
(xx)
(xy)
(xz)
(ya)
(yb)
(yc)
(yd)
(ye)
(yf)
(yg)
(yh)
(yi)
(yj)
(yk)
(yl)
(ym)
(yn)
(yo)
(yp)
(yq)
(yr)
(ys)
(yt)
(yu)
(yv)
(yw)
(yx)
(yy)
(yz)
(za)
(zb)
(zc)
(zd)
(ze)
(zf)
(zg)
(zh)
(zi)
(zj)
(zk)
(zl)
(zm)
(zn)
(zo)
(zp)
(zq)
(zr)
(zs)
(zt)
(zu)
(zv)
(zw)
(zx)
(zy)
(zz)

(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)
(i)
(j)
(k)
(l)
(m)
(n)
(o)
(p)
(q)
(r)
(s)
(t)
(u)
(v)
(w)
(x)
(y)
(z)

V...72
V...74
V...73
V...63
V...69
V...63
V...23
V...63
V...6
V...72
V...74
V...73
V...63
V...69
V...63
V...23
V...63
V...6
V...72
V...74
V...73
V...63
V...69
V...63
V...23
V...63
V...6
V...72
V...74
V...73
V...63
V...69
V...63
V...23
V...63
V...6
V...72
V...74
V...73
V...63
V...69
V...63
V...23
V...63
V...6
V...72
V...74
V...73
V...63
V...69
V...63
V...23
V...63
V...6
V...72
V...74
V...73
V...63
V...69
V...63
V...23
V...63
V...6

（例）

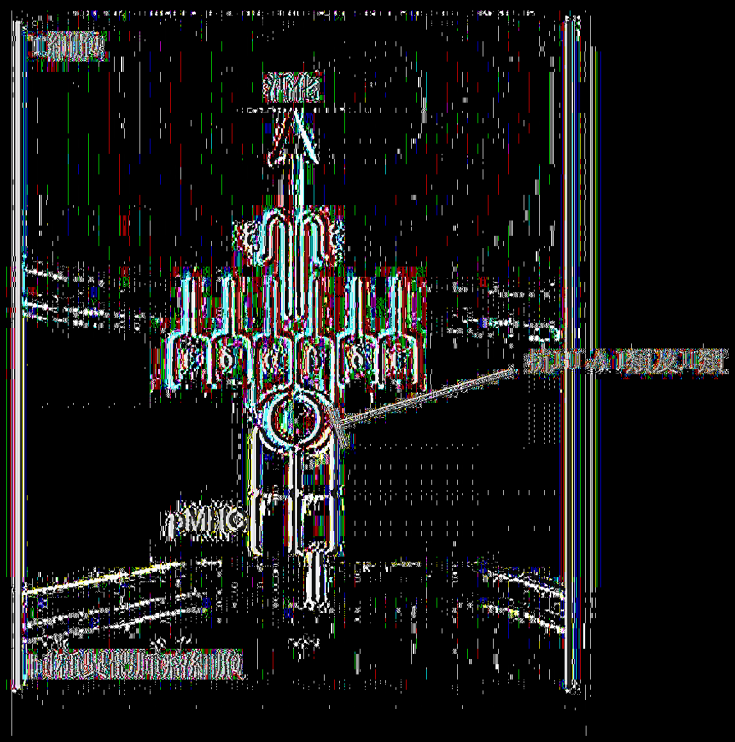


圖 164

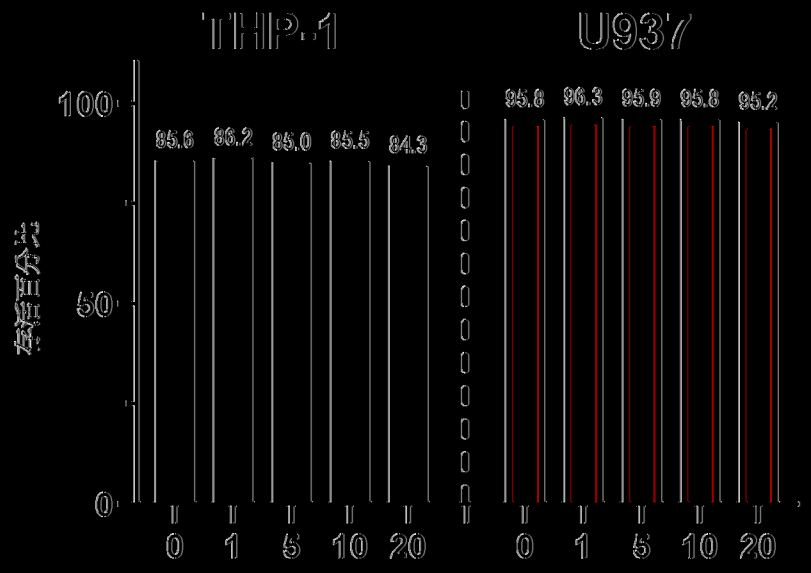

THP-1
U937
100
50
0
85.6
86.2
85.0
85.5
84.3
95.8
96.3
95.9
95.8
95.2
0
1
5
10
20
0
1
5
10
20
αHLA-I (μg)

圖 165

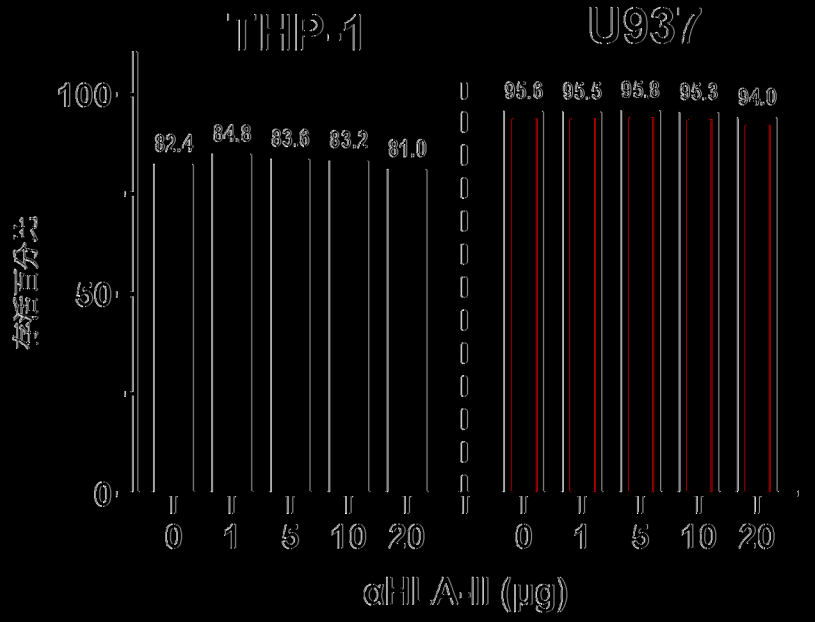

THP-1
U937
細胞存活率
100
50
0
82.4
84.8
83.6
83.2
81.0
95.6
95.5
95.8
95.3
94.0
0
1
5
10
20
0
1
5
10
20
αHL A-II (μg)

圖 166

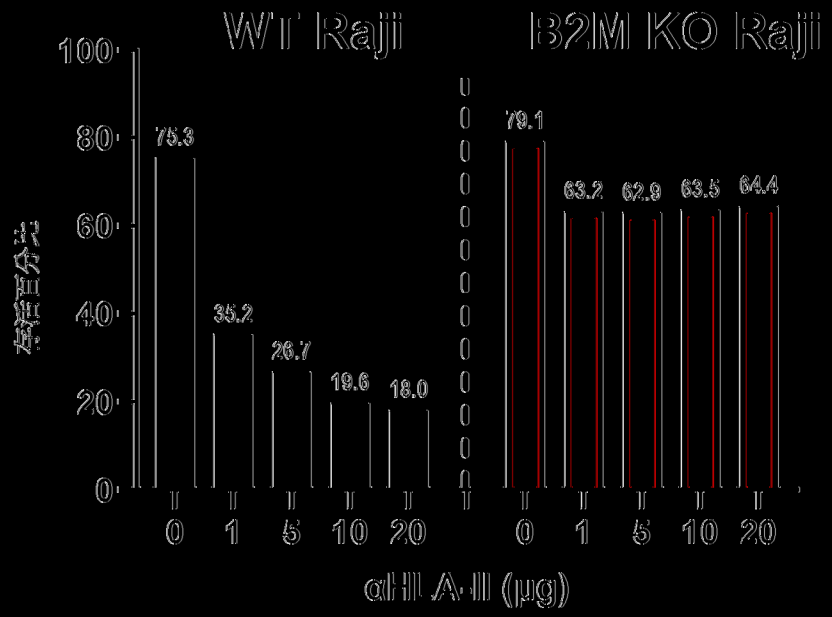

WT Raji
B2M KO Raji
細胞存活率
100
80
60
40
20
0
75.3
35.2
26.7
19.6
18.0
79.1
63.2
62.9
63.5
64.4
0
1
5
10
20
αHLA-II (μg)

圖 167

(第8圖)
第一組
第二組
第三組
第四組
第五組
第六組
第七組
第八組
第九組
第十組
第十一組
第十二組
細胞存活率
0%
50%
100%
MCF-7
MDA-MB-231
BxPC-3
HepG2
SK-Hep-1
Huh-7
SNU-449
SNU-475
SNU-387
SNU-423
SNU-182
SNU-398

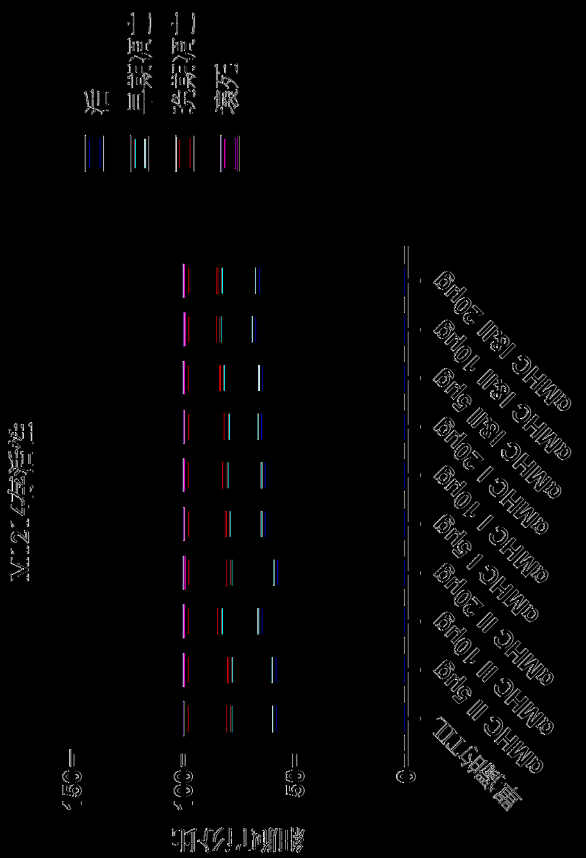
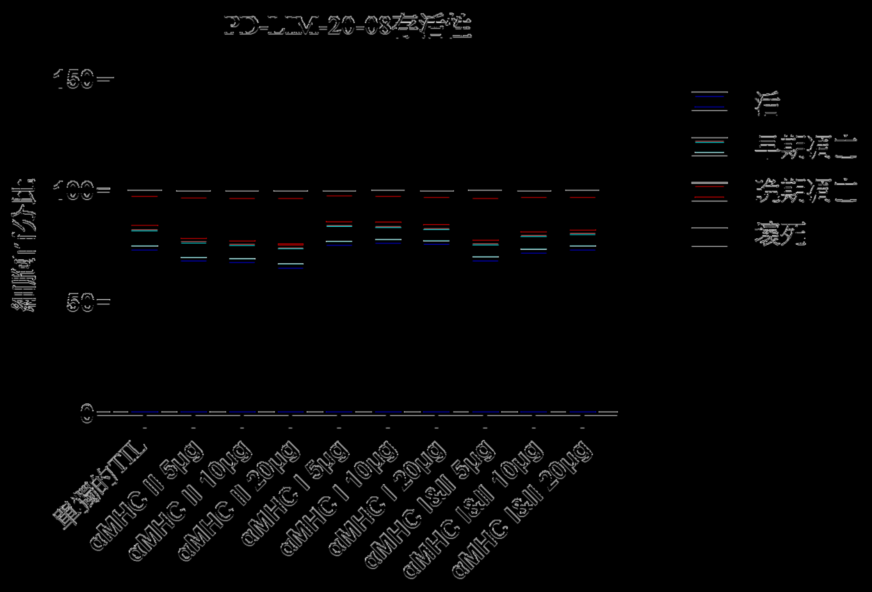

150
100
50
0
aMHC II 5µg
aMHC II 10µg
aMHC II 20µg
aMHC I 5µg
aMHC I 10µg
aMHC I 20µg
aMHC I&II 5µg
aMHC I&II 10µg
aMHC I&II 20µg

圖 169

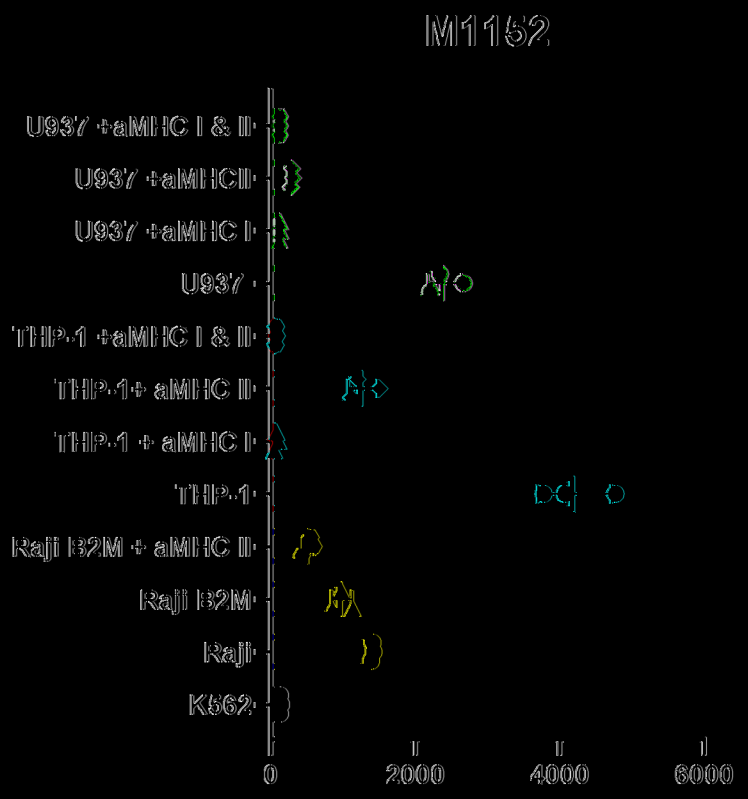

細胞百分比
150
100
50
0
活
早期凋亡
晚期凋亡
壞死
單獨的TIL
αMHC II 5μg
αMHC II 10μg
αMHC II 20μg
αMHC I 5μg
αMHC I 10μg
αMHC I 20μg
αMHC I&II 5μg
αMHC I&II 10μg
αMHC I&II 20μg

【圖 170】

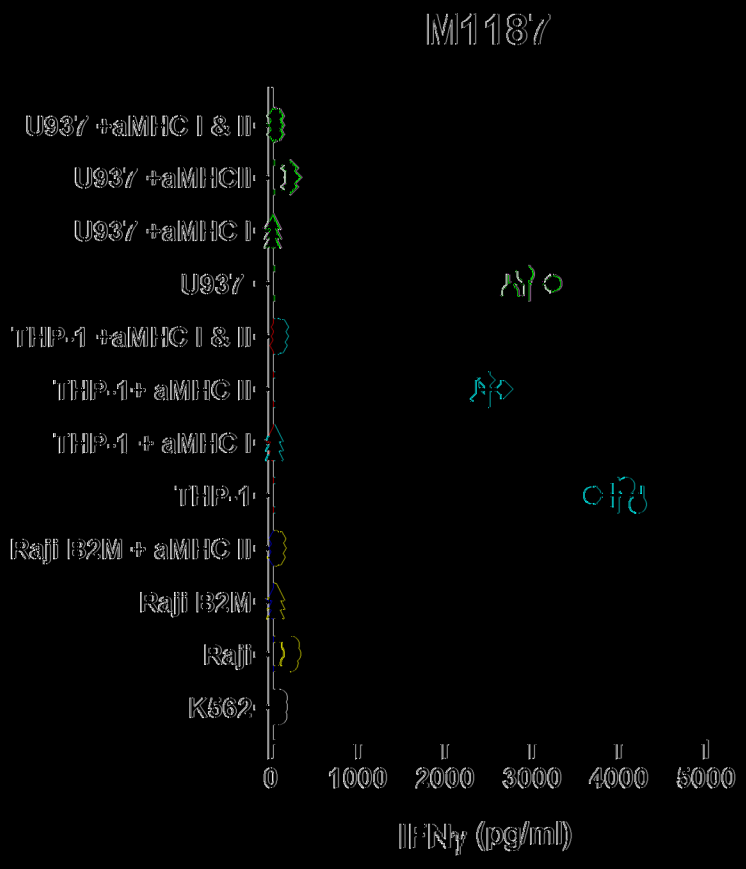
實施例 3-A-3-C (對照)
實施例 3-A-3-C (本發明)
實施例 3-A-3-C (對照)
實施例 3-A-3-C (本發明)
Mn:1
Mn:1
Mn:1
Mn:1

圖 7

(173)


M1152
U937 +aMHC I & II
U937 +aMHCII
U937 +aMHC I
U937
THP-1 +aMHC I & II
THP-1+ aMHC II
THP-1 + aMHC I
THP-1
Raji B2M + aMHC II
Raji B2M
Raji
K562
0
2000
4000
6000
IFNγ (pg/ml)

(圖 174)


M1187
U937 +aMHC I & II
U937 +aMHCII
U937 +aMHC I
U937
THP-1 +aMHC I & II
THP-1+ aMHC II
THP-1 + aMHC I
THP-1
Raji B2M + aMHC II
Raji B2M
Raji
K562
0
1000
2000
3000
4000
5000
IFNγ (pg/ml)

|(圖 1'5)|

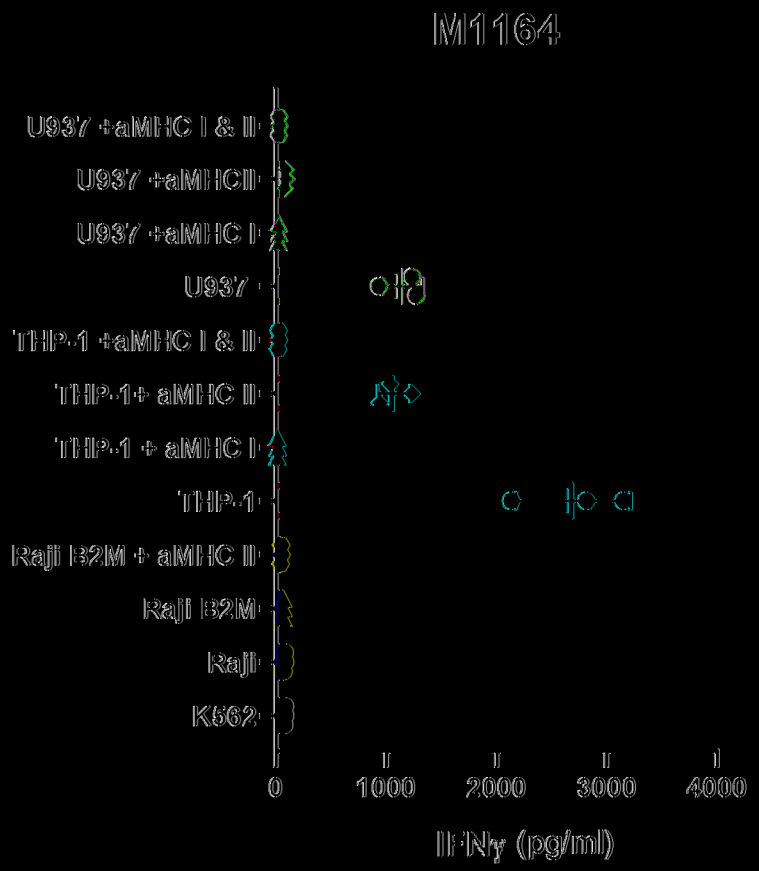
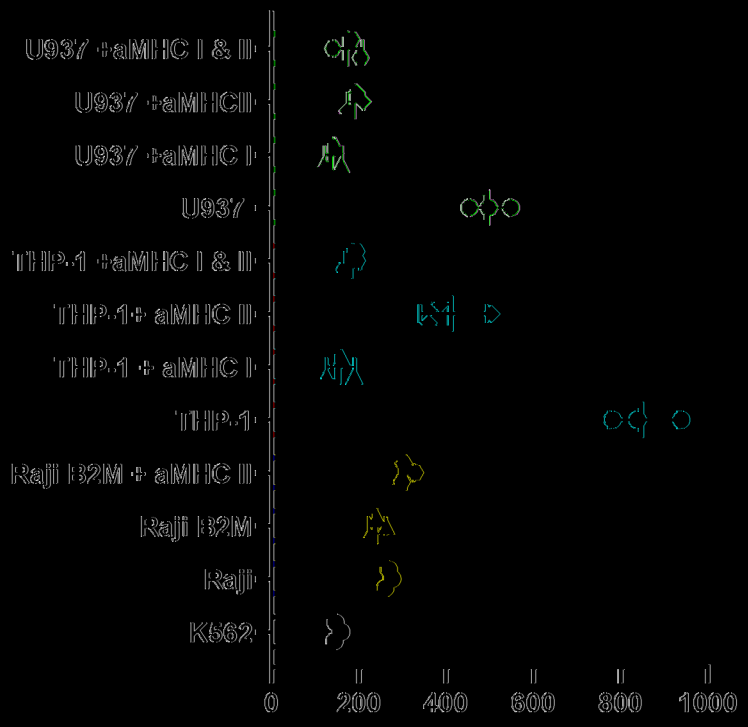
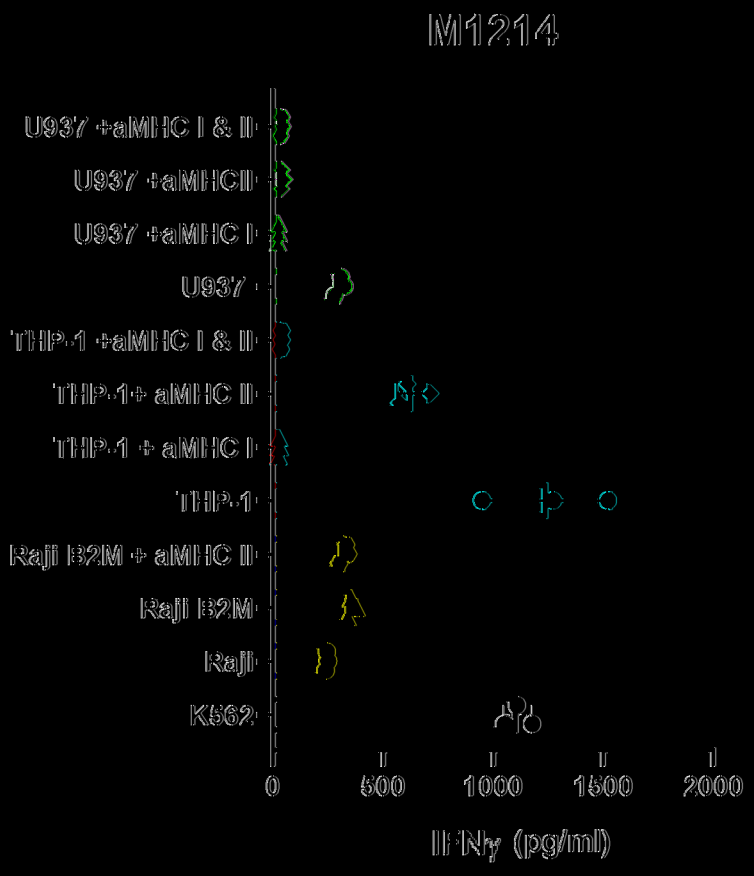

M1164
U937 +aMHC I & II
U937 +aMHC II
U937 +aMHC I
U937
THP-1 +aMHC I & II
THP-1+ aMHC II
THP-1 + aMHC I
THP-1
Raji B2M + aMHC II
Raji B2M
Raji
K562
0
1000
2000
3000
4000
IFNγ (pg/ml)

圖 1-6

M1213


U937 +aMHC I & II
U937 +aMHCII
U937 +aMHC I
U937
THP-1 +aMHC I & II
THP-1+ aMHC II
THP-1 + aMHC I
THP-1
Raji B2M + aMHC II
Raji B2M
Raji
K562
0
200
400
600
800
1000
IFNγ (pg/ml)

|(圖 1'/')|


M1214
U937 +aMHC I & II
U937 +aMHCII
U937 +aMHC I
U937
THP-1 +aMHC I & II
THP-1+ aMHC II
THP-1 + aMHC I
THP-1
Raji B2M + aMHC II
Raji B2M
Raji
K562
0
500
1000
1500
2000
IFNγ (pg/ml)

|(圖 1'8)|

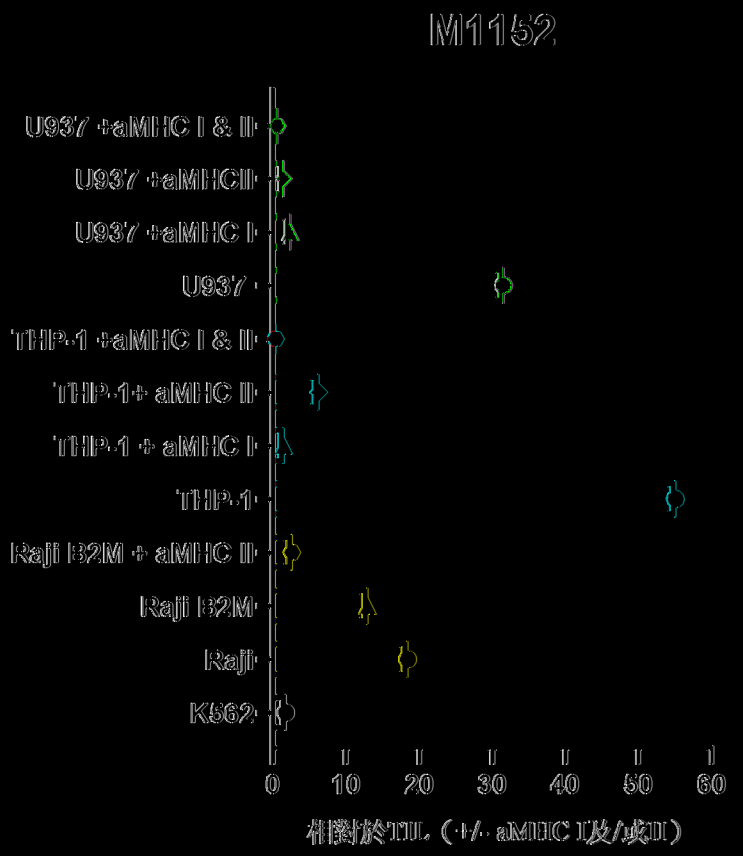
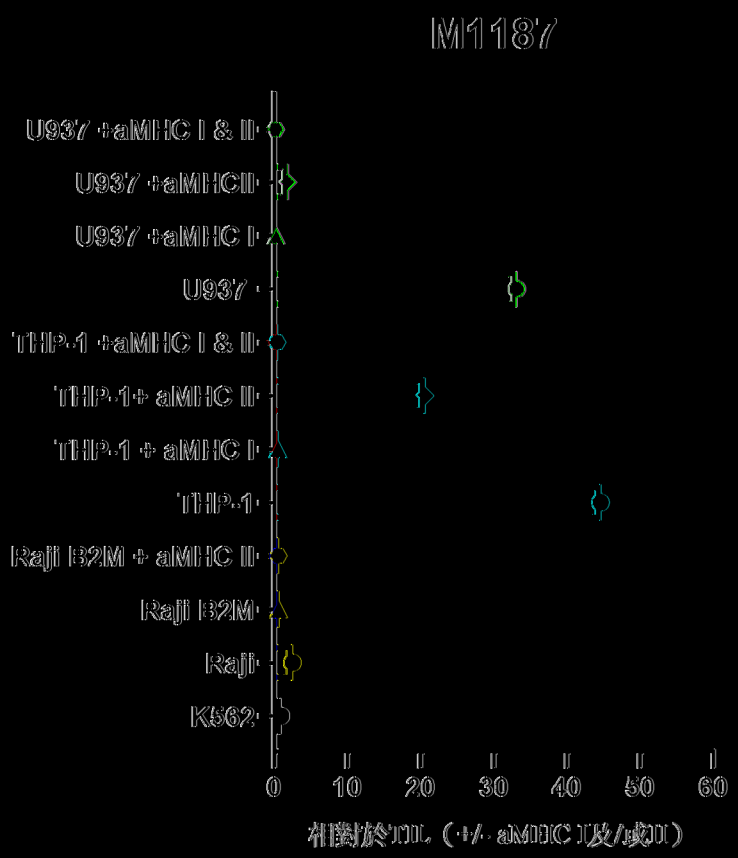
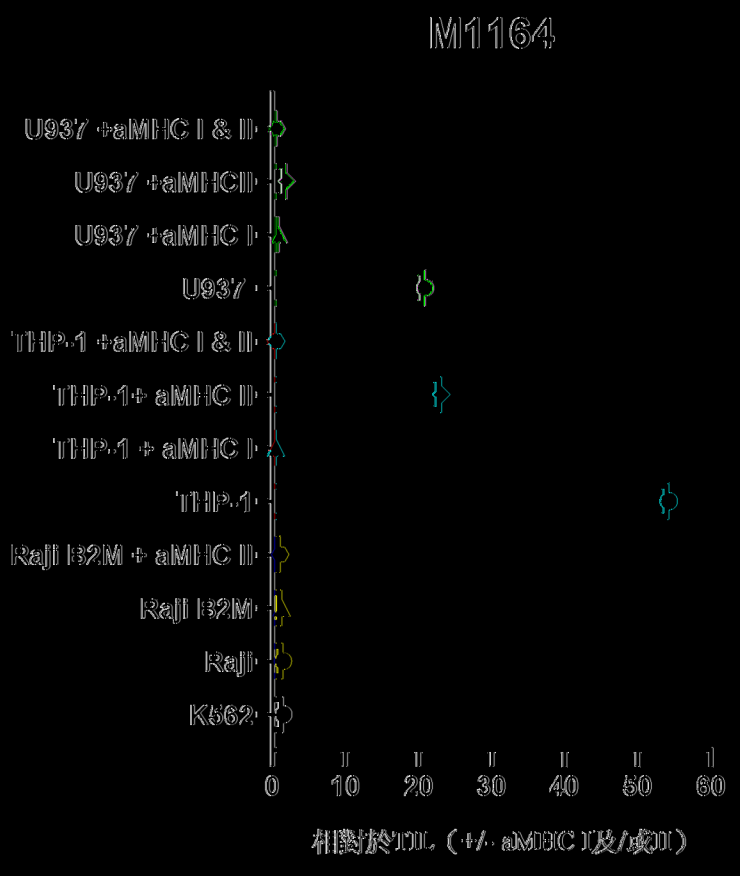

M1152
U937 +aMHC I & II
U937 +aMHCII
U937 +aMHC I
U937
THP-1 +aMHC I & II
THP-1+ aMHC II
THP-1 + aMHC I
THP-1
Raji B2M + aMHC II
Raji B2M
Raji
K562
0
10
20
30
40
50
60
相對於TIL（+/- aMHC I及/或II）

圖 1'79

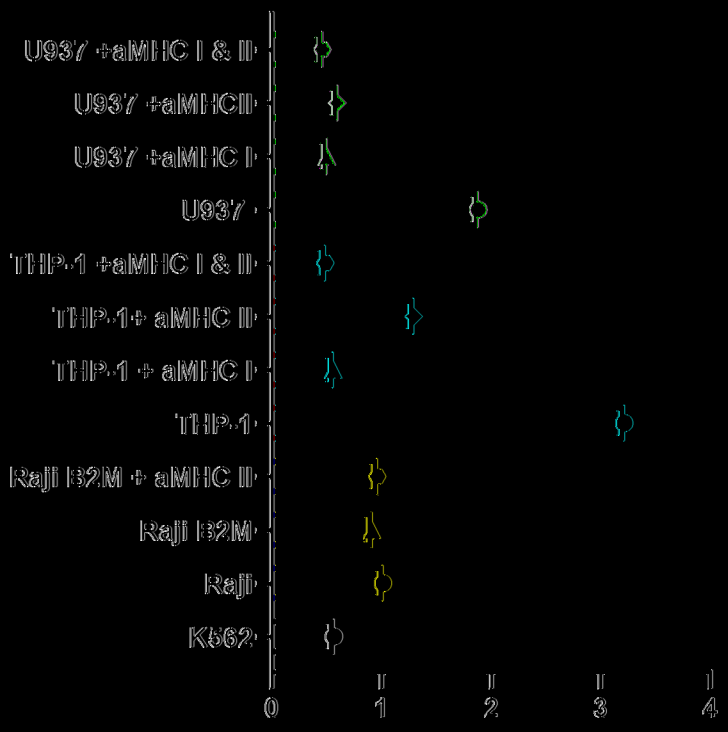

M1187
U937 +aMHC I & II
U937 +aMHCII
U937 +aMHC I
U937
THP-1 +aMHC I & II
THP-1+ aMHC II
THP-1 + aMHC I
THP-1
Raji B2M + aMHC II
Raji B2M
Raji
K562
0
10
20
30
40
50
60
相對於NL（+/- aMHC I及/或II）

|(圖 180)|


M1164
U937 +aMHC I & II
U937 +aMHCII
U937 +aMHC I
U937
THP-1 +aMHC I & II
THP-1+ aMHC II
THP-1 + aMHC I
THP-1
Raji B2M + aMHC II
Raji B2M
Raji
K562
0
10
20
30
40
50
60
相對於TIL（+/- aMHC I及/或II）

（圖 181）

M1213


U937 +aMHC I & II
U937 +aMHCII
U937 +aMHC I
U937
THP-1 +aMHC I & II
THP-1+ aMHC II
THP-1 + aMHC I
THP-1
Raji B2M + aMHC II
Raji B2M
Raji
K562
0
1
2
3
4
相對於DL（+/- aMHC I及/或II）

|(圖 182,)|

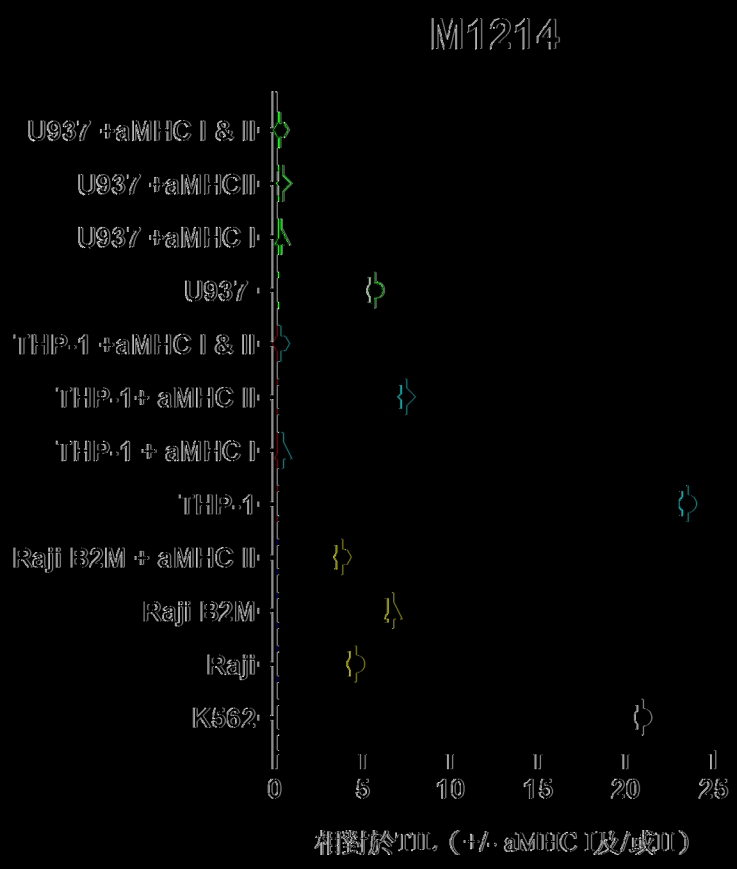

M1214
U937 +aMHC I & II
U937 +aMHCII
U937 +aMHC I
U937
THP-1 +aMHC I & II
THP-1+ aMHC II
THP-1 + aMHC I
THP-1
Raji B2M + aMHC II
Raji B2M
Raji
K562
0
5
10
15
20
25
相對於mL (+/- aMHC I及/或II)

圖 183

(圖 1.8)

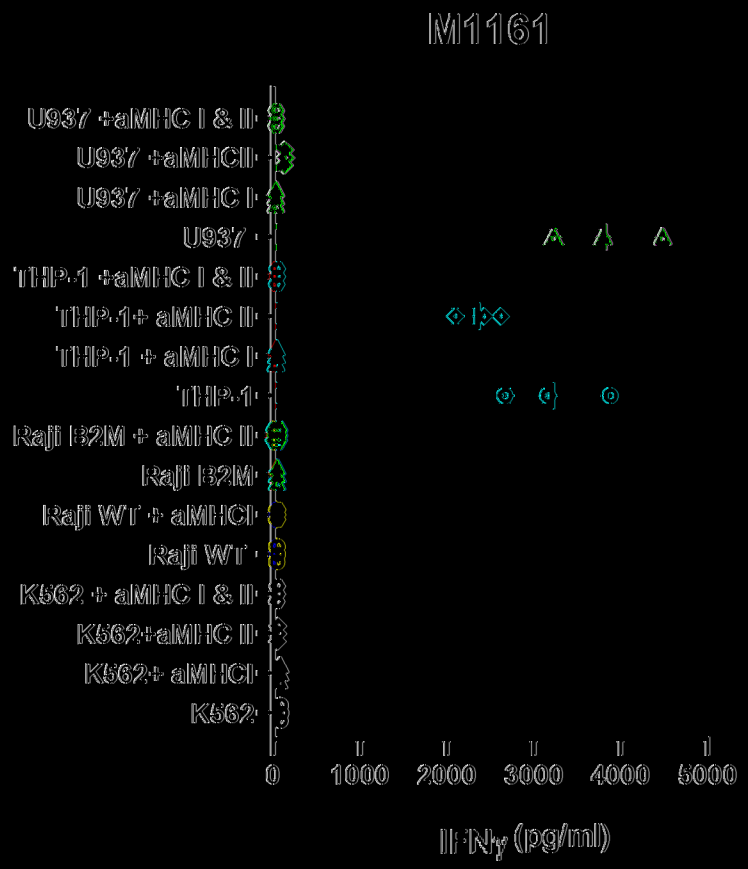

M1161
U937 +aMHC I & II
U937 +aMHCII
U937 +aMHC I
U937
THP-1 +aMHC I & II
THP-1+ aMHC II
THP-1 + aMHC I
THP-1
Raji B2M + aMHC II
Raji B2M
Raji WT + aMHCI
Raji WT
K562 + aMHC I & II
K562+aMHC II
K562+ aMHCI
K562
0
1000
2000
3000
4000
5000
IFN-γ (pg/ml)

圖 185

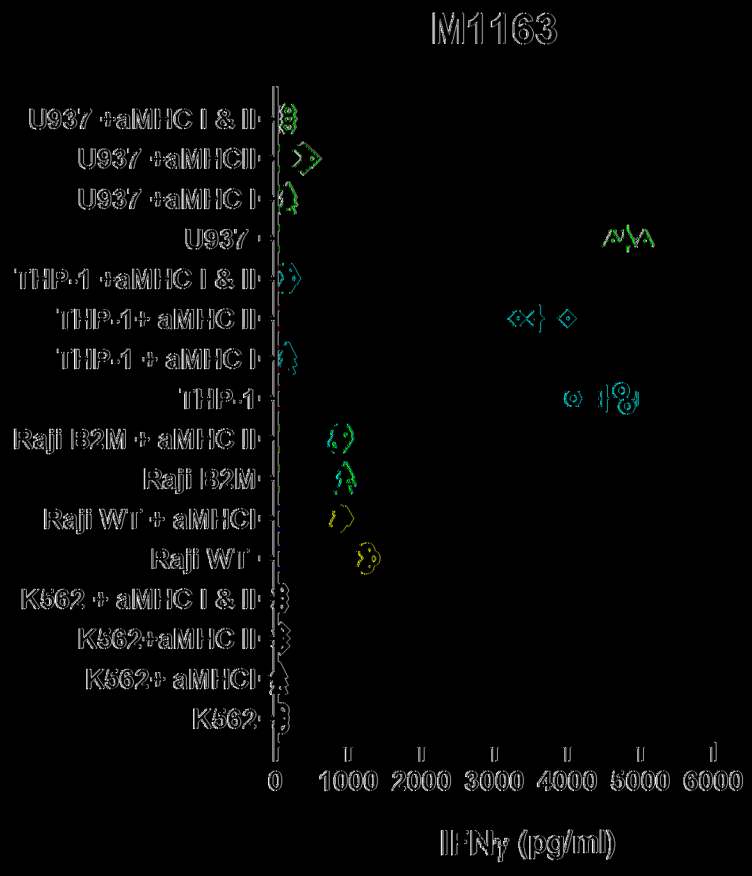
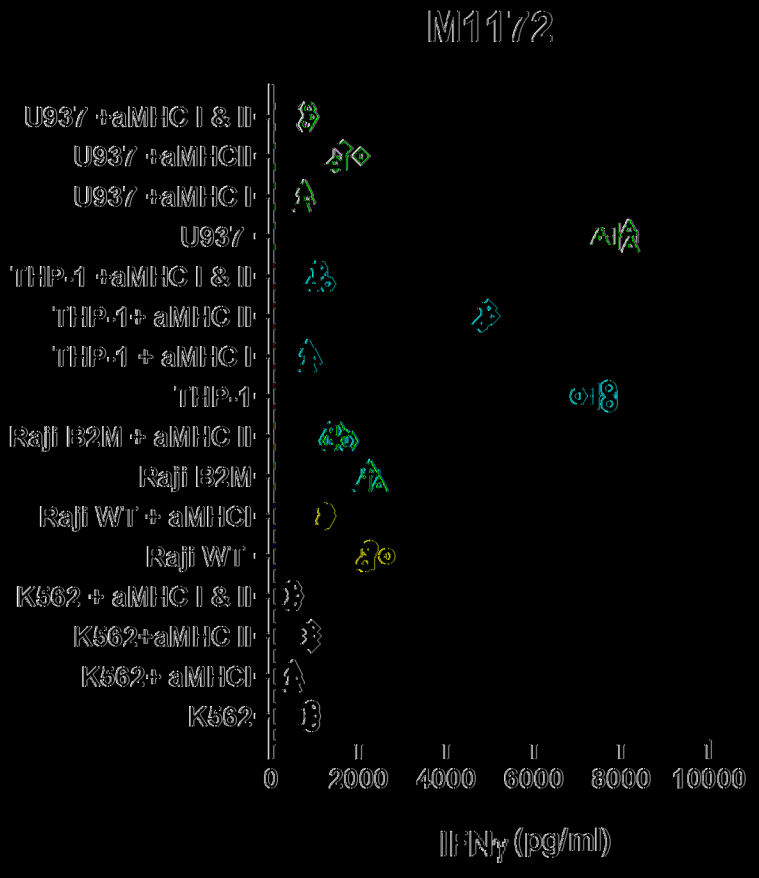
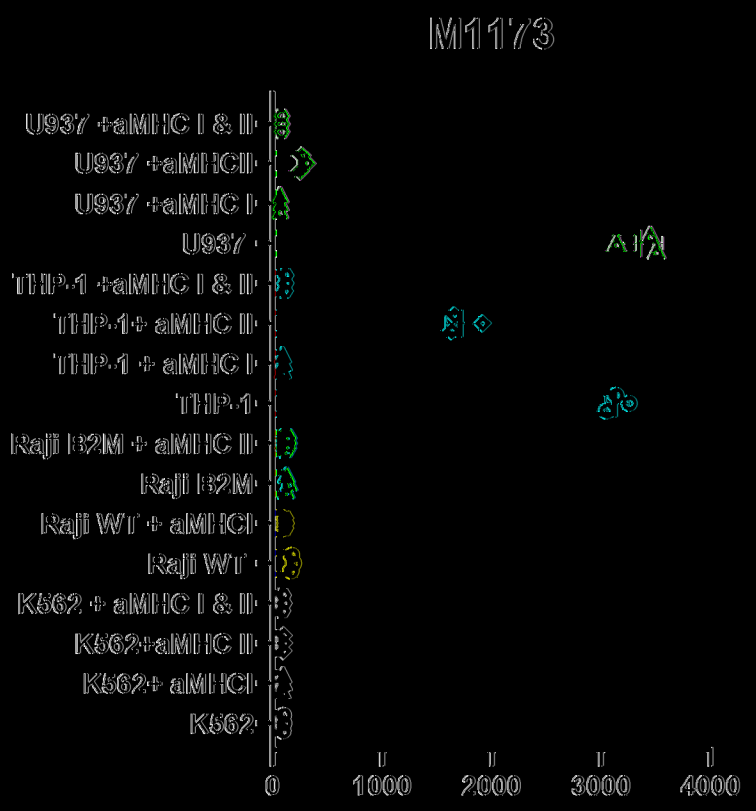

M1163
U937 +aMHC I & II
U937 +aMHCII
U937 +aMHC I
U937
THP-1 +aMHC I & II
THP-1+ aMHC II
THP-1 + aMHC I
THP-1
Raji B2M + aMHC II
Raji B2M
Raji WT + aMHCI
Raji WT
K562 + aMHC I & II
K562+aMHC II
K562+ aMHCI
K562
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
IFNγ (pg/ml)

圖 186


M1172
U937 +aMHC I & II
U937 +aMHCII
U937 +aMHC I
U937
THP-1 +aMHC I & II
THP-1+ aMHC II
THP-1 + aMHC I
THP-1
Raji B2M + aMHC II
Raji B2M
Raji WT + aMHCI
Raji WT
K562 + aMHC I & II
K562+aMHC II
K562+ aMHCI
K562
0
2000
4000
6000
8000
10000
IFNγ (pg/ml)

(圖 18)


M1173
U937 +aMHC I & II
U937 +aMHCII
U937 +aMHC I
U937
THP-1 +aMHC I & II
THP-1+ aMHC II
THP-1 + aMHC I
THP-1
Raji B2M + aMHC II
Raji B2M
Raji WT + aMHCII
Raji WT
K562 + aMHC I & II
K562+aMHC II
K562+ aMHCI
K562
0
1000
2000
3000
4000
IFNγ (pg/ml)

|(圖 188)|

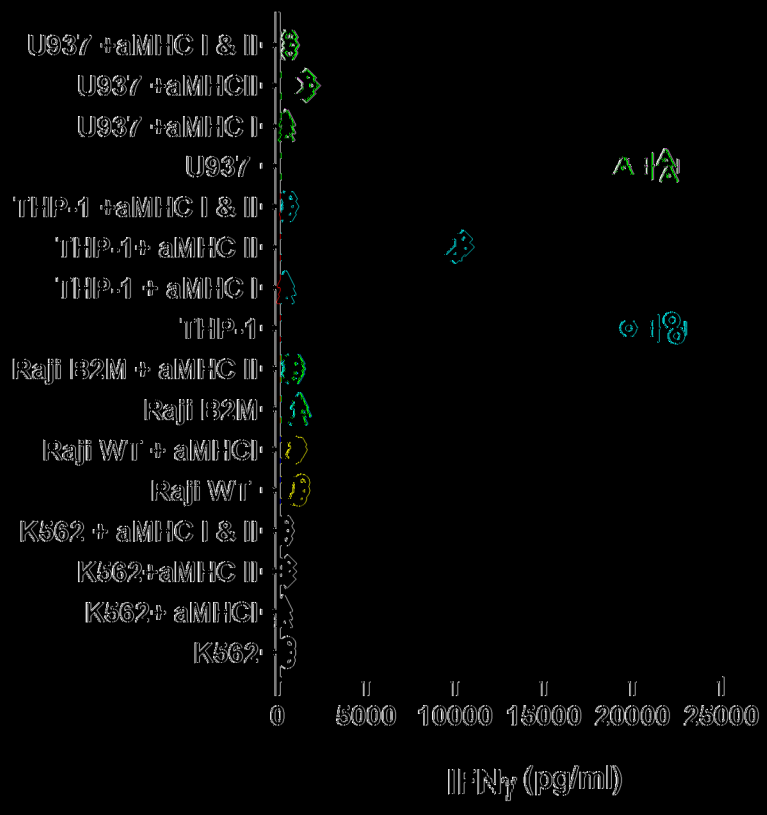

U937 +aMHC I & II
U937 +aMHCII
U937 +aMHC I
U937
THP-1 +aMHC I & II
THP-1+ aMHC II
THP-1 + aMHC I
THP-1
Raji B2M + aMHC II
Raji B2M
Raji WT + aMHCI
Raji WT
K562 + aMHC I & II
K562+aMHC II
K562+ aMHCI
K562
0
5000
10000
15000
20000
25000
IFNγ (pg/ml)

圖 189

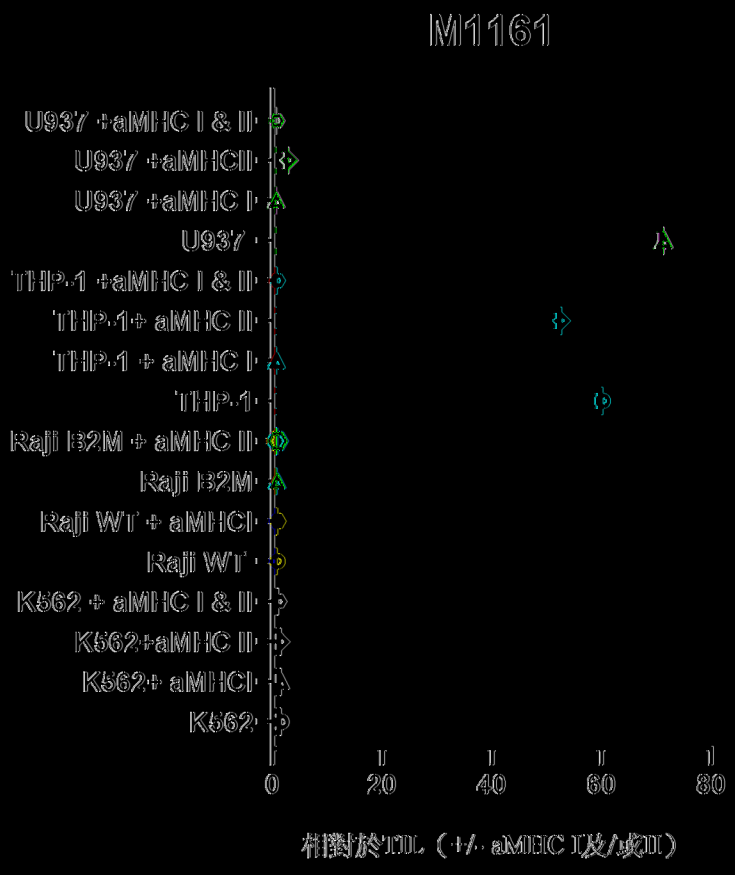

M1161
U937 +aMHC I & II
U937 +aMHCII
U937 +aMHC I
U937
THP-1 +aMHC I & II
THP-1+ aMHC II
THP-1 + aMHC I
THP-1
Raji B2M + aMHC II
Raji B2M
Raji W1 + aMHCI
Raji W1
K562 + aMHC I & II
K562+aMHC II
K562+ aMHCI
K562
0
20
40
60
80
相對於TDL（+/- aMHC I及/或II）

圖 190

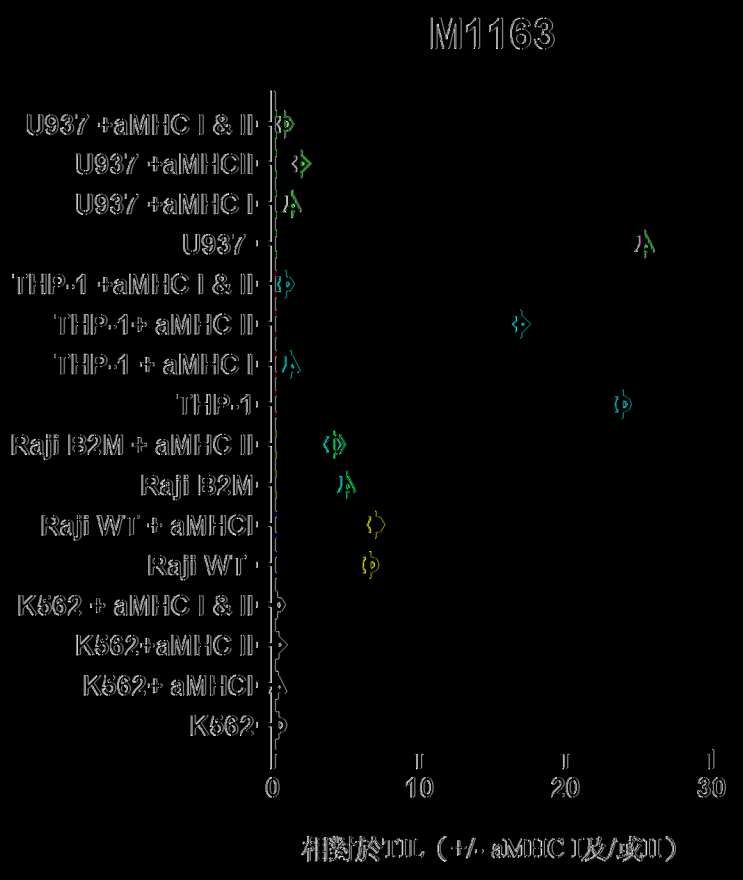
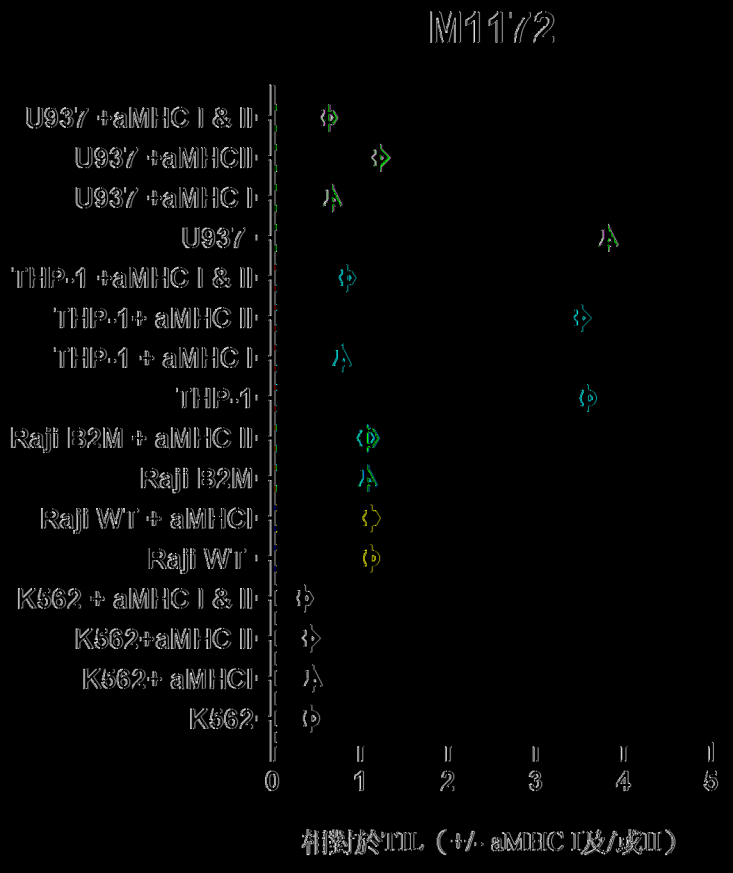

M1163
U937 + aMHC I & II
U937 + aMHC II
U937 + aMHC I
U937
THP-1 + aMHC I & II
THP-1 + aMHC II
THP-1 + aMHC I
THP-1
Raji B2M + aMHC II
Raji B2M
Raji WT + aMHC I
Raji WT
K562 + aMHC I & II
K562 + aMHC II
K562 + aMHC I
K562
0
10
20
30
相對於TIL（+/- aMHC I及/或II）

圖 191


M1172
U937 +aMHC I & II
U937 +aMHCII
U937 +aMHC I
U937
THP-1 +aMHC I & II
THP-1+ aMHC II
THP-1 + aMHC I
THP-1
Raji B2M + aMHC II
Raji B2M
Raji WT + aMHCI
Raji WT
K562 + aMHC I & II
K562+aMHC II
K562+ aMHCI
K562
0
1
2
3
4
5
相對於TIL（+/- aMHC I及/或II）

|(圖 192)|

M1173

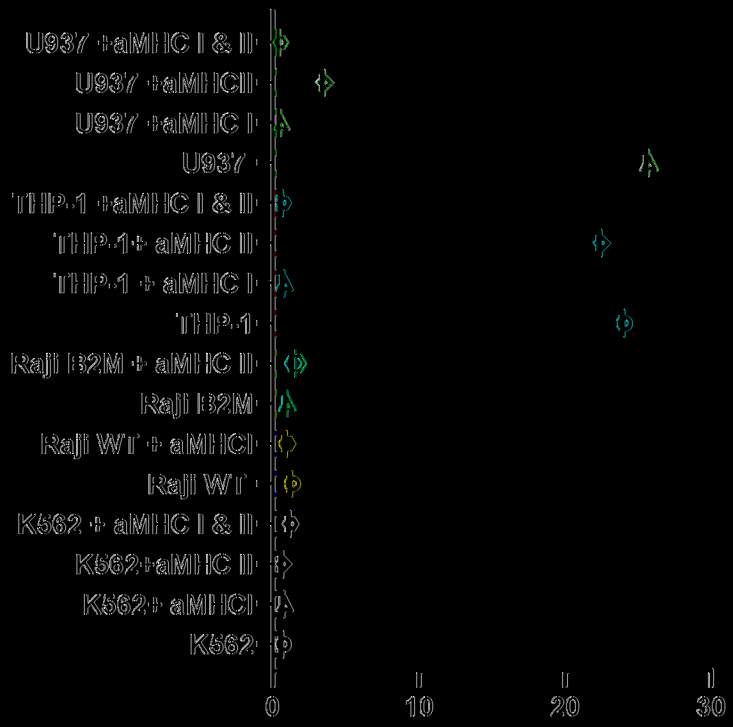
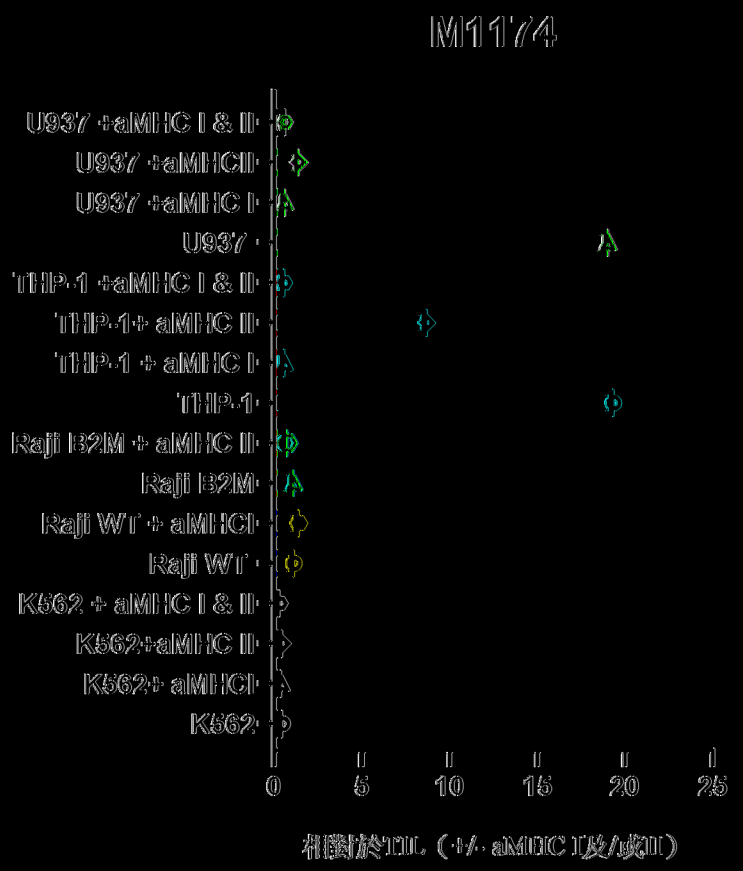

U937 + aMHC I & II
U937 + aMHC II
U937 + aMHC I
U937
THP-1 + aMHC I & II
THP-1 + aMHC II
THP-1 + aMHC I
THP-1
Raji B2M + aMHC II
Raji B2M
Raji WT + aMHC I
Raji WT
K562 + aMHC I & II
K562 + aMHC II
K562 + aMHC I
K562
0
10
20
30
相對於TDL（+/- aMHC I及/或II）

圖 193


M1174
U937 +aMHC I & II
U937 +aMHCII
U937 +aMHC I
U937
THP-1 +aMHC I & II
THP-1+ aMHC II
THP-1 + aMHC I
THP-1
Raji B2M + aMHC II
Raji B2M
Raji WT + aMHCI
Raji WT
K562 + aMHC I & II
K562+aMHC II
K562+ aMHCI
K562
0
5
10
15
20
25
相關於IL (+/- aMHC I及/或II)

(圖 194)

圖 (95)

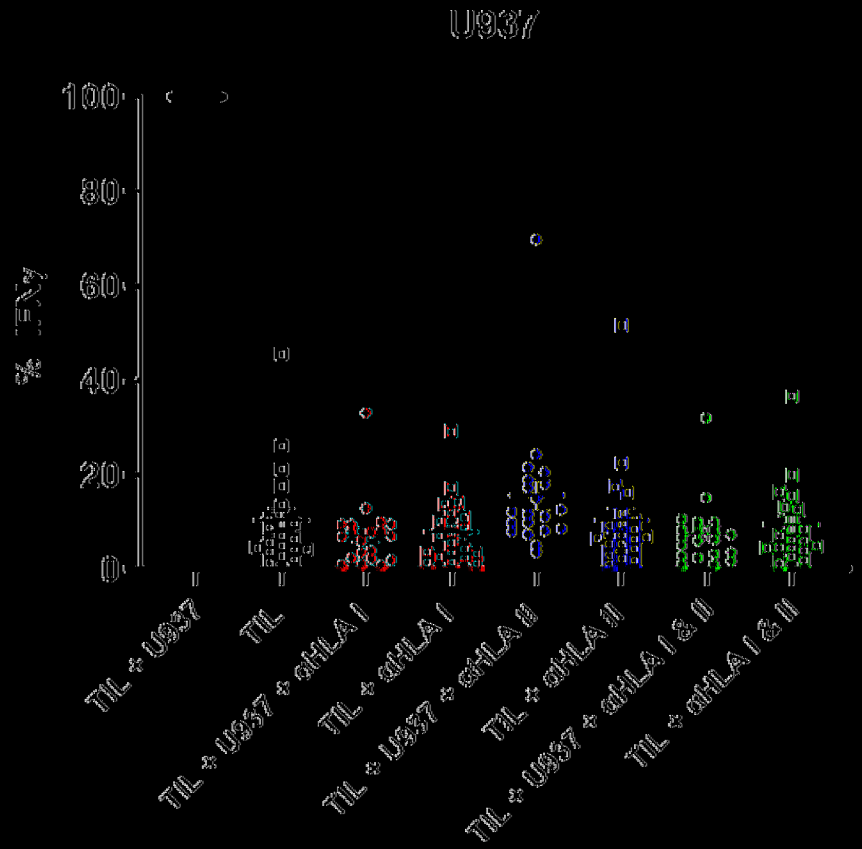
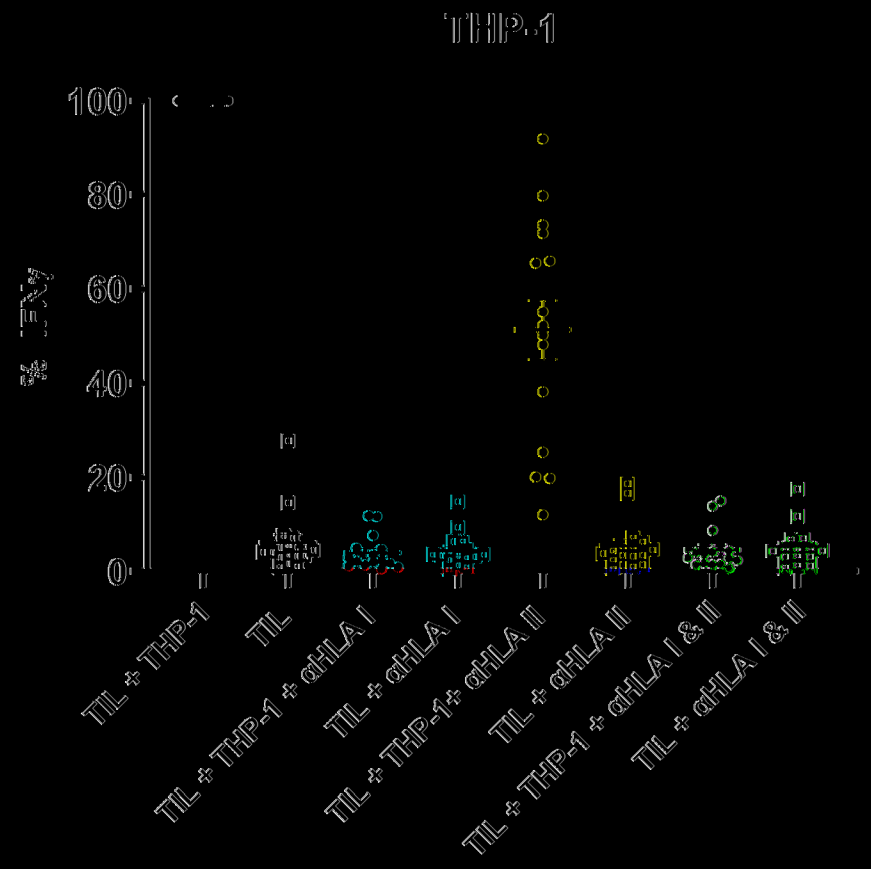

U937
100
80
60
40
20
0
% IFN-γ
TIL + U937
TIL
TIL + U937 + αHLA I
TIL + αHLA I
TIL + U937 + αHLA II
TIL + αHLA II
TIL + U937 + αHLA I & II
TIL + αHLA I & II

圖 196


THP-1
100
80
60
40
20
0
TIL + THP-1
TIL
TIL + THP-1 + αHLA I
TIL + αHLA I
TIL + THP-1 + αHLA II
TIL + αHLA II
TIL + THP-1 + αHLA I & II
TIL + αHLA I & II

(圖 19)

圖 200

實施例1
實施例2
比較例1
比較例2
比較例3
比較例4
比較例5
比較例6
比較例7
比較例8
比較例9
比較例10
比較例11
比較例12
比較例13
比較例14
比較例15
比較例16
比較例17
比較例18
比較例19
比較例20
比較例21
比較例22
比較例23
比較例24
比較例25
比較例26
比較例27
比較例28
比較例29
比較例30
比較例31
比較例32
比較例33
比較例34
比較例35
比較例36
比較例37
比較例38
比較例39
比較例40
比較例41
比較例42
比較例43
比較例44
比較例45
比較例46
比較例47
比較例48
比較例49
比較例50
比較例51
比較例52
比較例53
比較例54
比較例55
比較例56
比較例57
比較例58
比較例59
比較例60
比較例61
比較例62
比較例63
比較例64
比較例65
比較例66
比較例67
比較例68
比較例69
比較例70
比較例71
比較例72
比較例73
比較例74
比較例75
比較例76
比較例77
比較例78
比較例79
比較例80
比較例81
比較例82
比較例83
比較例84
比較例85
比較例86
比較例87
比較例88
比較例89
比較例90
比較例91
比較例92
比較例93
比較例94
比較例95
比較例96
比較例97
比較例98
比較例99
比較例100
比較例101
比較例102
比較例103
比較例104
比較例105
比較例106
比較例107
比較例108
比較例109
比較例110
比較例111
比較例112
比較例113
比較例114
比較例115
比較例116
比較例117
比較例118
比較例119
比較例120
比較例121
比較例122
比較例123
比較例124
比較例125
比較例126
比較例127
比較例128
比較例129
比較例130
比較例131
比較例132
比較例133
比較例134
比較例135
比較例136
比較例137
比較例138
比較例139
比較例140
比較例141
比較例142
比較例143
比較例144
比較例145
比較例146
比較例147
比較例148
比較例149
比較例150
比較例151
比較例152
比較例153
比較例154
比較例155
比較例156
比較例157
比較例158
比較例159
比較例160
比較例161
比較例162
比較例163
比較例164
比較例165
比較例166
比較例167
比較例168
比較例169
比較例170
比較例171
比較例172
比較例173
比較例174
比較例175
比較例176
比較例177
比較例178
比較例179
比較例180
比較例181
比較例182
比較例183
比較例184
比較例185
比較例186
比較例187
比較例188
比較例189
比較例190
比較例191
比較例192
比較例193
比較例194
比較例195
比較例196
比較例197
比較例198
比較例199
比較例200
比較例201
比較例202
比較例203
比較例204
比較例205
比較例206
比較例207
比較例208
比較例209
比較例210
比較例211
比較例212
比較例213
比較例214
比較例215
比較例216
比較例217
比較例218
比較例219
比較例220
比較例221
比較例222
比較例223
比較例224
比較例225
比較例226
比較例227
比較例228
比較例229
比較例230
比較例231
比較例232
比較例233
比較例234
比較例235
比較例236
比較例237
比較例238
比較例239
比較例240
比較例241
比較例242
比較例243
比較例244
比較例245
比較例246
比較例247
比較例248
比較例249
比較例250
比較例251
比較例252
比較例253
比較例254
比較例255
比較例256
比較例257
比較例258
比較例259
比較例260
比較例261
比較例262
比較例263
比較例264
比較例265
比較例266
比較例267
比較例268
比較例269
比較例270
比較例271
比較例272
比較例273
比較例274
比較例275
比較例276
比較例277
比較例278
比較例279
比較例280
比較例281
比較例282
比較例283
比較例284
比較例285
比較例286
比較例287
比較例288
比較例289
比較例290
比較例291
比較例292
比較例293
比較例294
比較例295
比較例296
比較例297
比較例298
比較例299
比較例300
比較例301
比較例302
比較例303
比較例304
比較例305
比較例306
比較例307
比較例308
比較例309
比較例310
比較例311
比較例312
比較例313
比較例314
比較例315
比較例316
比較例317
比較例318
比較例319
比較例320
比較例321
比較例322
比較例323
比較例324
比較例325
比較例326
比較例327
比較例328
比較例329
比較例330
比較例331
比較例332
比較例333
比較例334
比較例335
比較例336
比較例337
比較例338
比較例339
比較例340
比較例341
比較例342
比較例343
比較例344
比較例345
比較例346
比較例347
比較例348
比較例349
比較例350
比較例351
比較例352
比較例353
比較例354
比較例355
比較例356
比較例357
比較例358
比較例359
比較例360
比較例361
比較例362
比較例363
比較例364
比較例365
比較例366
比較例367
比較例368
比較例369
比較例370
比較例371
比較例372
比較例373
比較例374
比較例375
比較例376
比較例377
比較例378
比較例379
比較例380
比較例381
比較例382
比較例383
比較例384
比較例385
比較例386
比較例387
比較例388
比較例389
比較例390
比較例391
比較例392
比較例393
比較例394
比較例395
比較例396
比較例397
比較例398
比較例399
比較例400
比較例401
比較例402
比較例403
比較例404
比較例405
比較例406
比較例407
比較例408
比較例409
比較例410
比較例411
比較例412
比較例413
比較例414
比較例415
比較例416
比較例417
比較例418
比較例419
比較例420
比較例421
比較例422
比較例423
比較例424
比較例425
比較例426
比較例427
比較例428
比較例429
比較例430
比較例431
比較例432
比較例433
比較例434
比較例435
比較例436
比較例437
比較例438
比較例439
比較例440
比較例441
比較例442
比較例443
比較例444
比較例445
比較例446
比較例447
比較例448
比較例449
比較例450
比較例451
比較例452
比較例453
比較例454
比較例455
比較例456
比較例457
比較例458
比較例459
比較例460
比較例461
比較例462
比較例463
比較例464
比較例465
比較例466
比較例467
比較例468
比較例469
比較例470
比較例471
比較例472
比較例473
比較例474
比較例475
比較例476
比較例477
比較例478
比較例479
比較例480
比較例481
比較例482
比較例483
比較例484
比較例485
比較例486
比較例487
比較例488
比較例489
比較例490
比較例491
比較例492
比較例493
比較例494
比較例495
比較例496
比較例497
比較例498
比較例499
比較例500
比較例501
比較例502
比較例503
比較例504
比較例505
比較例506
比較例507
比較例508
比較例509
比較例510
比較例511
比較例512
比較例513
比較例514
比較例515
比較例516
比較例517
比較例518
比較例519
比較例520
比較例521
比較例522
比較例523
比較例524
比較例525
比較例526
比較例527
比較例528
比較例529
比較例530
比較例531
比較例532
比較例533
比較例534
比較例535
比較例536
比較例537
比較例538
比較例539
比較例540
比較例541
比較例542
比較例543
比較例544
比較例545
比較例546
比較例547
比較例548
比較例549
比較例550
比較例551
比較例552
比較例553
比較例554
比較例555
比較例556
比較例557
比較例558
比較例559
比較例560
比較例561
比較例562
比較例563
比較例564
比較例565
比較例566
比較例567
比較例568
比較例569
比較例570
比較例571
比較例572
比較例573
比較例574
比較例575
比較例576
比較例577
比較例578
比較例579
比較例580
比較例581
比較例582
比較例583
比較例584
比較例585
比較例586
比較例587
比較例588
比較例589
比較例590
比較例591
比較例592
比較例593
比較例594
比較例595
比較例596
比較例597
比較例598
比較例599
比較例600
比較例601
比較例602
比較例603
比較例604
比較例605
比較例606
比較例607
比較例608
比較例609
比較例610
比較例611
比較例612
比較例613
比較例614
比較例615
比較例616
比較例617
比較例618
比較例619
比較例620
比較例621
比較例622
比較例623
比較例624
比較例625
比較例626
比較例627
比較例628
比較例629
比較例630
比較例631
比較例632
比較例633
比較例634
比較例635
比較例636
比較例637
比較例638
比較例639
比較例640
比較例641
比較例642
比較例643
比較例644
比較例645
比較例646
比較例647
比較例648
比較例649
比較例650
比較例651
比較例652
比較例653
比較例654
比較例655
比較例656
比較例657
比較例658
比較例659
比較例660
比較例661
比較例662
比較例663
比較例664
比較例665
比較例666
比較例667
比較例668
比較例669
比較例670
比較例671
比較例672
比較例673
比較例674
比較例675
比較例676
比較例677
比較例678
比較例679
比較例680
比較例681
比較例682
比較例683
比較例684
比較例685
比較例686
比較例687
比較例688
比較例689
比較例690
比較例691
比較例692
比較例693
比較例694
比較例695
比較例696
比較例697
比較例698
比較例699
比較例700
比較例701
比較例702
比較例703
比較例704
比較例705
比較例706
比較例707
比較例708
比較例709
比較例710
比較例711
比較例712
比較例713
比較例714
比較例715
比較例716
比較例717
比較例718
比較例719
比較例720
比較例721
比較例722
比較例723
比較例724
比較例725
比較例726
比較例727
比較例728
比較例729
比較例730
比較例731
比較例732
比較例733
比較例734
比較例735
比較例736
比較例737
比較例738
比較例739
比較例740
比較例741
比較例742
比較例743
比較例744
比較例745
比較例746
比較例747
比較例748
比較例749
比較例750
比較例751
比較例752
比較例753
比較例754
比較例755
比較例756
比較例757
比較例758
比較例759
比較例760
比較例761
比較例762
比較例763
比較例764
比較例765
比較例766
比較例767
比較例768
比較例769
比較例770
比較例771
比較例772
比較例773
比較例774
比較例775
比較例776
比較例777
比較例778
比較例779
比較例780
比較例781
比較例782
比較例783
比較例784
比較例785
比較例786
比較例787
比較例788
比較例789
比較例790
比較例791
比較例792
比較例793
比較例794
比較例795
比較例796
比較例797
比較例798
比較例799
比較例800
比較例801
比較例802
比較例803
比較例804
比較例805
比較例806
比較例807
比較例808
比較例809
比較例810
比較例811
比較例812
比較例813
比較例814
比較例815
比較例816
比較例817
比較例818
比較例819
比較例820
比較例821
比較例822
比較例823
比較例824
比較例825
比較例826
比較例827
比較例828
比較例829
比較例830
比較例831
比較例832
比較例833
比較例834
比較例835
比較例836
比較例837
比較例838
比較例839
比較例840
比較例841
比較例842
比較例843
比較例844
比較例845
比較例846
比較例847
比較例848
比較例849
比較例850
比較例851
比較例852
比較例853
比較例854
比較例855
比較例856
比較例857
比較例858
比較例859
比較例860
比較例861
比較例862
比較例863
比較例864
比較例865
比較例866
比較例867
比較例868
比較例869
比較例870
比較例871
比較例872
比較例873
比較例874
比較例875
比較例876
比較例877
比較例878
比較例879
比較例880
比較例881
比較例882
比較例883
比較例884
比較例885
比較例886
比較例887
比較例888
比較例889
比較例890
比較例891
比較例892
比較例893
比較例894
比較例895
比較例896
比較例897
比較例898
比較例899
比較例900
比較例901
比較例902
比較例903
比較例904
比較例905
比較例906
比較例907
比較例908
比較例909
比較例910
比較例911
比較例912
比較例913
比較例914
比較例915
比較例916
比較例917
比較例918
比較例919
比較例920
比較例921
比較例922
比較例923
比較例924
比較例925
比較例926
比較例927
比較例928
比較例929
比較例930
比較例931
比較例932
比較例933
比較例934
比較例935
比較例936
比較例937
比較例938
比較例939
比較例940
比較例941
比較例942
比較例943
比較例944
比較例945
比較例946
比較例947
比較例948
比較例949
比較例950
比較例951
比較例952
比較例953
比較例954
比較例955
比較例956
比較例957
比較例958
比較例959
比較例960
比較例961
比較例962
比較例963
比較例964
比較例965
比較例966
比較例967
比較例968
比較例969
比較例970
比較例971
比較例972
比較例973
比較例974
比較例975
比較例976
比較例977
比較例978
比較例979
比較例980
比較例981
比較例982
比較例983
比較例984
比較例985
比較例986
比較例987
比較例988
比較例989
比較例990
比較例991
比較例992
比較例993
比較例994
比較例995
比較例996
比較例997
比較例998
比較例999
比較例1000

圖 20

(202)

圖（203）

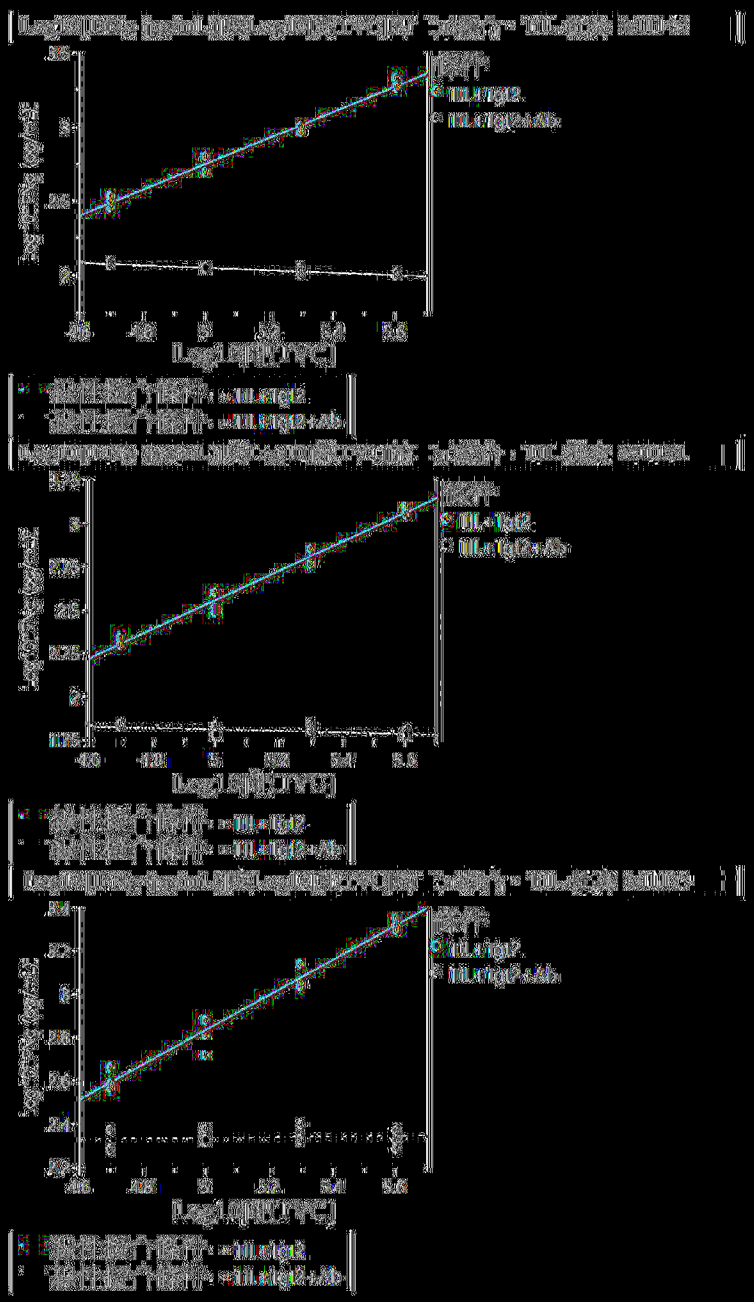
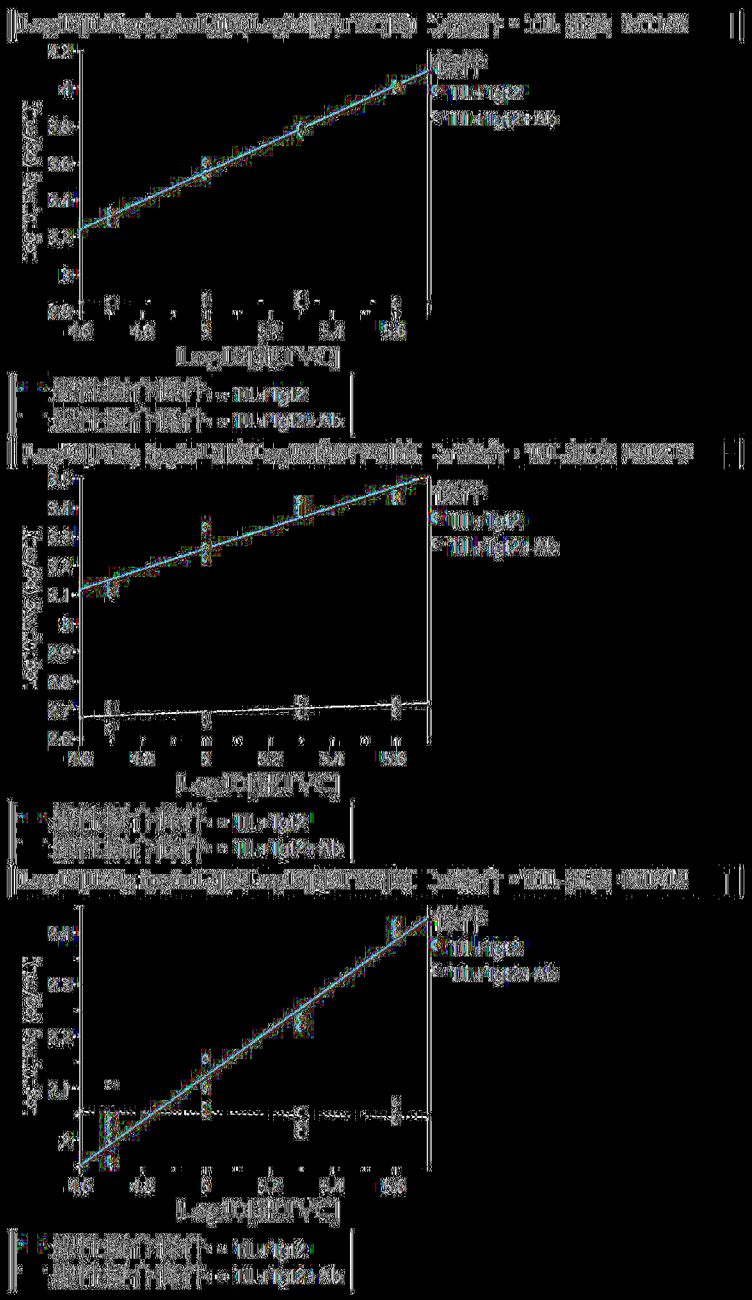
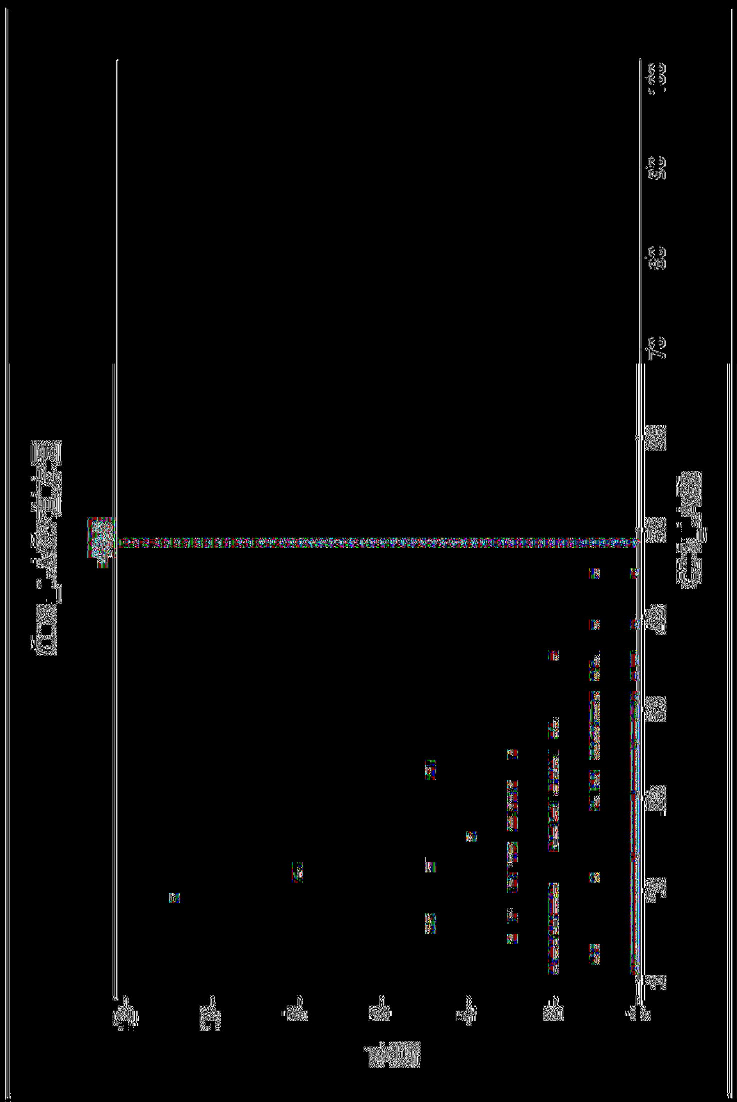


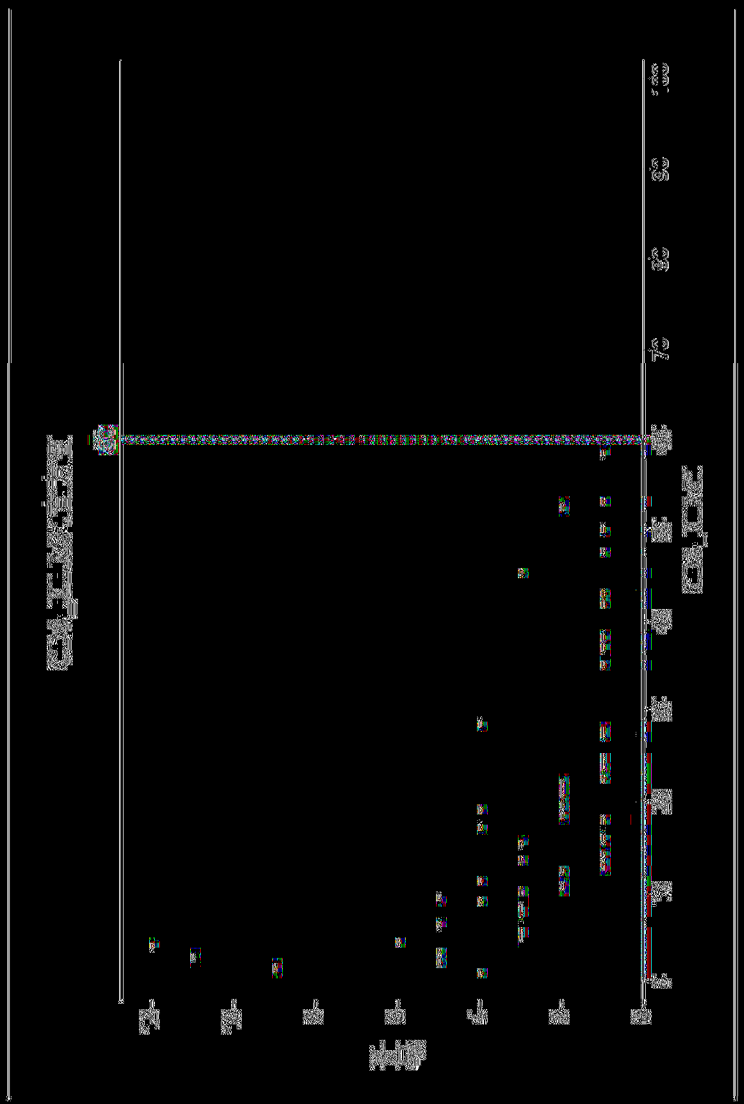
圖 204



|(圖 205)|



(圖206)


時間
(秒)
207

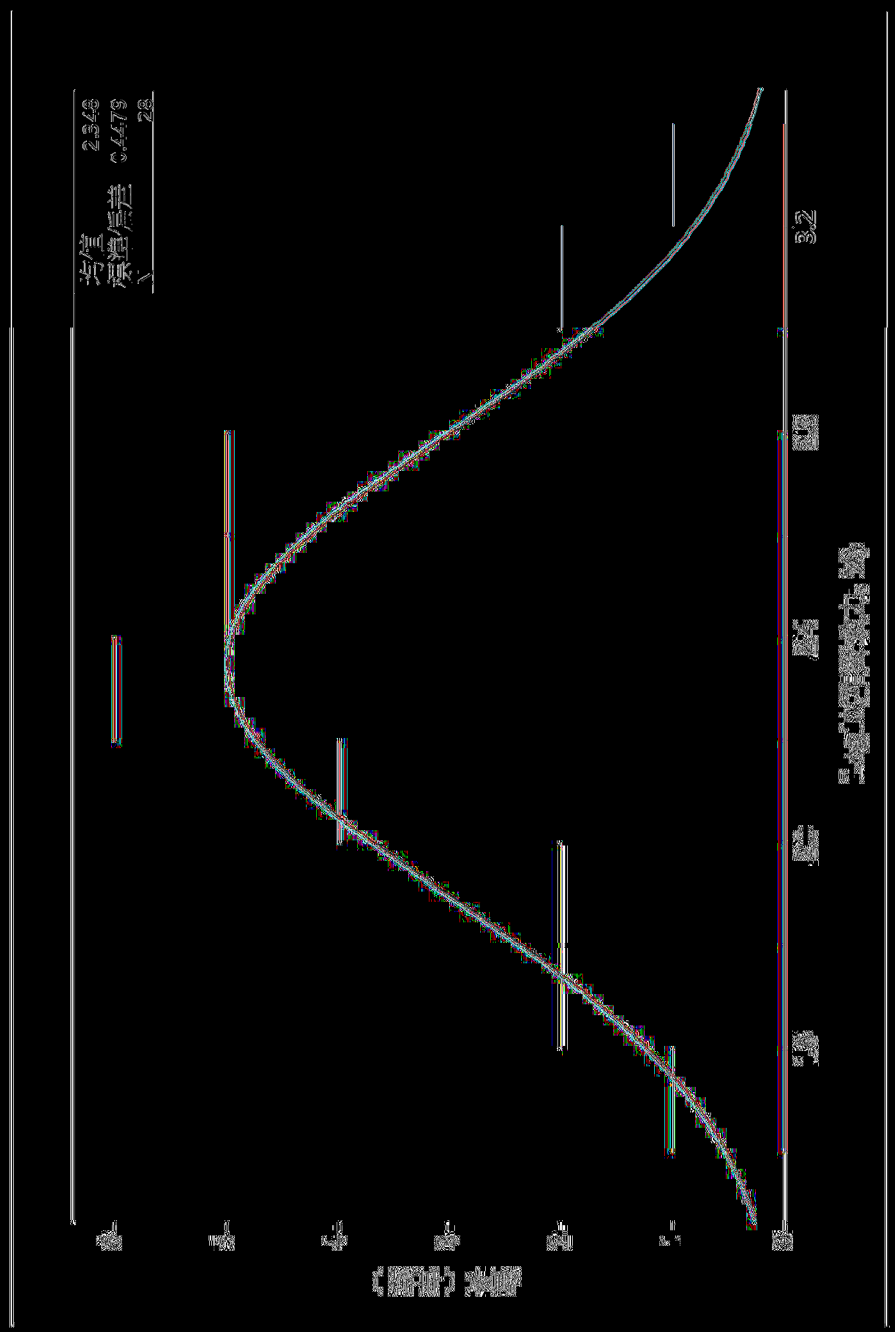
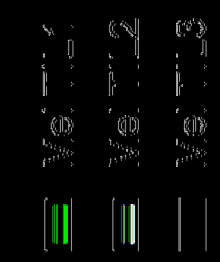


圖 28

(260)



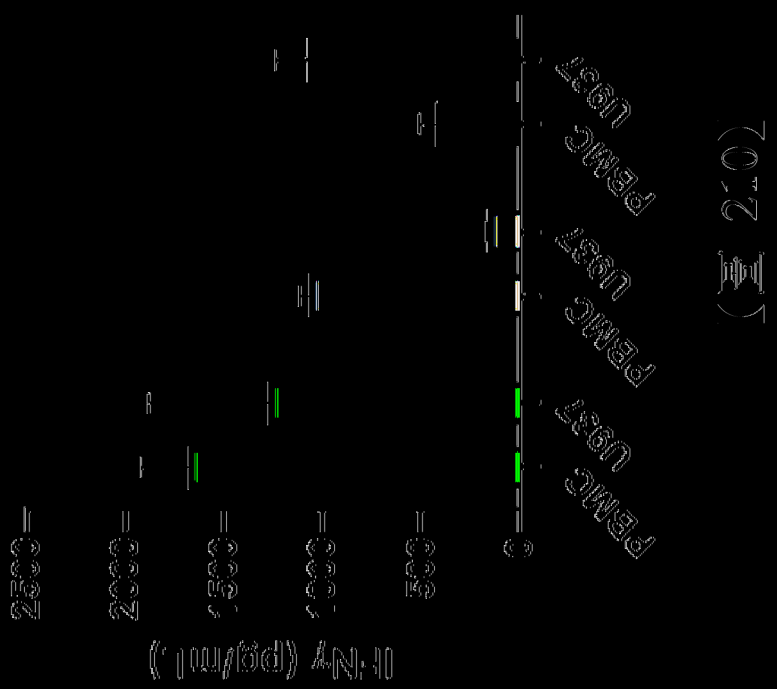

(0.2 噸)
PEMC 1.0X
PEMC 0.5X
PEMC 0.2X
0
20
30
40
50
(1w/6d) 小N: 11

圖2-2