(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111601883 B
(45)授权公告日 2024.06.21

(21)申请号 201880086659.X
(22)申请日 2018.11.19
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111601883 A
(43)申请公布日 2020.08.28
(30)优先权数据
62/588,044 2017.11.17 US
62/621,515 2018.01.24 US
62/756,038 2018.11.05 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.07.15
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/061865 2018.11.19
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/100023 EN 2019.05.23
(73)专利权人 艾欧凡斯生物治疗公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 M·辛普森-埃布尔森
C·夏尔提-考多
(74)专利代理机构 上海华诚知识产权代理有限公司 31300
专利代理师 李晓
(51)Int.Cl.
C12N 5/0783(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61K 35/17(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
(56)对比文件
Donia, M等.Characterization and comparision of ‘standard’ and ‘young’ tumor-infiltrating lymphocytes for adoptive cell therapy at a Danish translational research institution.《SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY》.2012,第75卷(第2期),第157-167页.
审查员 竹怀婷
权利要求书6页 说明书214页
序列表67页 附图137页

(54)发明名称

由细针抽吸物和小活检物扩增TIL

(57)摘要

本公开提供了包括在封闭系统中使用本文公开的方法,由包含少量TIL的细针抽吸物(FNA)或小活检物扩增TIL群的方法,该方法在更短的时间内使得TIL的表型改善和代谢健康增加。

CN 111601883 B

1.一种将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增为治疗性TIL群的方法,其中,所述方法包括:

(i)由来自患者肿瘤的至少一个细针抽吸物(FNA)或至少一个小活检物获得第一TIL群;

(ii)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养第一TIL群来进行第一次扩增,产生第二TIL群;其中,在第1天至第3天中的任一天向细胞培养基中补充OKT-3,或者,所述细胞培养基还包含OKT-3并且不进行在第1天至第3天中的任一天向细胞培养基中补充OKT-3;第一次扩增进行3天至10天以获得第二TIL群;当第一TIL群来自小活检物时,经过3天至12天,第二TIL群包含至少5×10^7个TIL;以及

(iii)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第三TIL群的数量比第二TIL群大至少25倍;第二次扩增进行3天至12天以获得第三TIL群;第三TIL群是治疗性TIL群。

2.根据权利要求1所述的方法,其中,步骤(ii)中包含IL-2的细胞培养基还包含OKT-3,并且不进行在第1天至第3天中的任一天向细胞培养基中补充OKT-3;步骤(ii)是启动第一次扩增步骤,步骤(iii)是快速第二次扩增。

3.根据权利要求1或2所述的方法,其中,在步骤(iii)之后,将细胞从细胞培养基中取出并冷冻保存在储存培养基中。

4.根据权利要求3所述的方法,其中,所述方法还包括解冻细胞的步骤。

5.根据权利要求1或2所述的方法,其中,重复步骤(iii)一至四次,以在治疗性TIL群中获得对于TIL的治疗有效剂量来说足够的TIL。

6.根据权利要求1或2所述的方法,其中,步骤(i)至(iii)进行17天至24天的时间。

7.根据权利要求1或2所述的方法,其中,步骤(i)至(iii)进行18天至22天的时间。

8.根据权利要求1或2所述的方法,其中,步骤(i)至(iii)进行20天至22天的时间。

9.根据权利要求1或2所述的方法,其中,步骤(i)至(iii)进行22天。

10.根据权利要求1或2所述的方法,其中,来自步骤(iii)的细胞表达CD4、CD8和TCRαβ的水平与新鲜收获的细胞相似。

11.根据权利要求1所述的方法,其中,所述APC是外周血单核细胞(PBMC)。

12.根据权利要求11所述的方法,其中,在步骤(ii)的第3天至第12天中的任一天和/或步骤(iii)的第11天至第14天中的任一天,将PBMC添加至细胞培养基中。

13.根据权利要求1至2、11至12中任一项所述的方法,其中,相对于第二TIL群,第三TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群;相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,治疗性TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

14.根据权利要求13所述的方法,其中,所述效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

15.根据权利要求1至2、11至12中任一项所述的方法,其中,所述APC是人工APC(aAPC)或自体APC。

16.根据权利要求1至2、11至12中任一项所述的方法,其中,将所述治疗性TIL群注入患者体内。

17.根据权利要求1至2、11至12中任一项所述的方法,其中,通过向第二TIL群的细胞培

养基中进一步补充OKT-3、IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(ii)中的第一次扩增。

18.根据权利要求1至2、11至12中任一项所述的方法,其中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(iii)中的第二次扩增。

19.根据权利要求1至2、11至12中任一项所述的方法,其中,步骤(i)中的FNA包含至少400,000个TIL。

20.根据权利要求1至2、11至12中任一项所述的方法,其中,所述小活检物从选自胰腺、黑色素瘤、乳腺和卵巢的肿瘤中获得。

21.根据权利要求1至2、11至12中任一项所述的方法,其中,所述FNA从选自肺、黑色素瘤、头颈、宫颈、卵巢、胰腺、胶质母细胞瘤、结直肠和肉瘤的肿瘤中获得。

22.根据权利要求21所述的方法,其中,所述肺肿瘤是非小细胞肺癌(NSCLC)。

23.根据权利要求1至2、11至12中任一项所述的方法,其中,所述患者先前已经历外科治疗。

24.根据权利要求1至2、11至12中任一项所述的方法,其中,步骤(i)中的TIL获自FNA。

25.根据权利要求1至2、11至12中任一项所述的方法,其中,所述FNA使用25-18号针头获得。

26.根据权利要求1至2、11至12中任一项所述的方法,其中,步骤(i)中的TIL获自小活检物。

27.根据权利要求1至2、11至12中任一项所述的方法,其中,所述小活检物使用16-11号针头获得。

28.根据权利要求1至2、11至12中任一项所述的方法,其中,重复步骤(iii)一至四次,以在治疗性TIL群中获得对于TIL的治疗有效剂量来说足够的TIL。

29.根据权利要求28所述的方法,其中,对于治疗有效剂量来说足够的TIL的数量为2.3×10^{10}至13.7×10^{10}。

30.一种将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增为治疗性TIL群的方法,其中,所述方法包括:

(i)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养来自患者肿瘤的细针抽吸物(FNA)或小活检物的第一TIL群进行第一次扩增,获得第二TIL群;其中,在第1天至第3天中的任一天向细胞培养基中补充OKT-3,或者,所述细胞培养基还包含OKT-3并且不进行在第1天至第3天中的任一天向细胞培养基中补充OKT-3;所述第一次扩增进行3天至12天以获得第二TIL群;当第一TIL群来自小活检物时,经过3天至12天,第二TIL群包含至少5×10^{7}个TIL;以及

(ii)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,获得第三TIL群;其中,第三TIL群的数量比第二TIL群大至少25倍;其中,第二次扩增进行3天至12天以获得第三TIL群;第三TIL群是治疗性TIL群。

31.根据权利要求30所述的方法,其中,在步骤(i)中包含IL-2的细胞培养基还包含OKT-3,并且不进行在第1天至第3天中的任一天向细胞培养基中补充OKT-3;步骤(i)是启动第一次扩增步骤,步骤(ii)是快速第二次扩增步骤。

32.根据权利要求30或31所述的方法,其中,将步骤(ii)中来自细胞培养基的细胞取出并冷冻保存在储存培养基中。

33.根据权利要求32所述的方法,其中,所述方法还包括解冻细胞的步骤。

34.根据权利要求30或31所述的方法,其中,所述APC是人工APC(aAPC)或自体APC。

35.根据权利要求30或31所述的方法,其中,将所述治疗性TIL群注入患者体内。

36.根据权利要求30或31所述的方法,其中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充OKT-3、IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(i)中的第一次扩增。

37.根据权利要求30或31所述的方法,其中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(ii)中的第二次扩增。

38.根据权利要求30或31所述的方法,其中,通过向第三TIL群的细胞培养基中进一步补充IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行另外的第二次扩增。

39.根据权利要求30或31所述的方法,其中,步骤(i)中的FNA包含至少400,000个TIL。

40.根据权利要求30或31所述的方法,其中,所述小活检物从选自胰腺、黑色素瘤、乳腺和卵巢的肿瘤中获得。

41.根据权利要求30或31所述的方法,其中,所述FNA从选自肺、黑色素瘤、头颈、宫颈、卵巢、胰腺、胶质母细胞瘤、结直肠和肉瘤的肿瘤中获得。

42.根据权利要求41所述的方法,其中,所述肺肿瘤是非小细胞肺癌(NSCLC)。

43.根据权利要求30或31所述的方法,其中,所述患者先前已经历外科治疗。

44.根据权利要求30或31所述的方法,其中,步骤(i)中的TIL获自FNA。

45.根据权利要求30或31所述的方法,其中,所述FNA使用25-18号针头获得。

46.根据权利要求30或31所述的方法,其中,步骤(i)中的TIL获自小活检物。

47.根据权利要求30或31所述的方法,其中,所述小活检物使用16-11号针头获得。

48.根据权利要求30或31所述的方法,其中,重复步骤(ii)一至四次,以在治疗性TIL群中获得对于TIL的治疗有效剂量来说足够的TIL。

49.根据权利要求48所述的方法,其中,对于治疗有效剂量来说足够的TIL的数量为2.3×10^{10}至13.7×10^{10}。

50.根据权利要求30或31所述的方法,其中,相对于第二TIL群,第三TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群;相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

51.根据权利要求50所述的方法,其中,所述效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

52.一种将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增为治疗性TIL群的方法,其中,所述方法包括:

(a)由获自患者肿瘤的细针抽吸物(FNA)或小活检物获得第一TIL群;

(b)将第一TIL群加到封闭系统中;

(c)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养第一TIL群来进行第一次扩增,产生第二TIL群;其中,在第1天至第3天中的任一天向细胞培养基中补充OKT-3,或者,所述细胞培养基还包含OKT-3并且不进行在第1天至第3天中的任一天向细胞培养基中补充OKT-3;第一次扩增进行3天至12天以获得第二TIL群;当第一TIL群来自小活检物时,经过3天至12天,第二TIL群包含至少5×10^{7}个TIL;第一次扩增在提供第一透气表面区域的封闭容器中进行,第一次

扩增进行3天至12天以获得第二TIL群,第二TIL群的数量比第一TIL群大至少25倍,步骤(b)向步骤(c)的过渡在不打开系统的情况下发生;

(d)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行3天至12天以获得第三TIL群;第三TIL群是治疗性TIL群;第二次扩增在提供第二透气表面区域的封闭容器中进行,步骤(c)向步骤(d)的过渡在不打开系统的情况下发生;

(e)收获由步骤(d)获得的治疗性TIL群,其中,步骤(d)向步骤(e)的过渡在不打开系统的情况下发生;以及

(f)将步骤(e)收获的TIL群转移至输液袋,其中,步骤(e)向步骤(f)的过渡在不打开系统的情况下发生。

53.根据权利要求52所述的方法,其中,步骤(c)中包含IL-2的细胞培养基还包含OKT-3,并且不进行在第1天至第3天中的任一天向细胞培养基中补充OKT-3;步骤(c)是启动第一次扩增步骤,步骤(d)是快速第二次扩增步骤。

54.根据权利要求52或53所述的方法,其中,所述方法还包括以下步骤:使用冷冻保存方法冷冻保存步骤(f)中包含收获的TIL群的输液袋。

55.根据权利要求54所述的方法,其中,使用1:1比率的收获的TIL群与CS10培养基进行冷冻保存方法。

56.根据权利要求52或53所述的方法,其中,所述APC是外周血单核细胞(PBMC)。

57.根据权利要求56所述的方法,其中,所述PBMC是经辐照且同种异体的。

58.根据权利要求56所述的方法,其中,在步骤(c)的第3天至第12天中的任一天和/或步骤(d)的第3天至第12天中的任一天,将PBMC添加至细胞培养基中。

59.根据权利要求52或53所述的方法,其中,所述抗原呈递细胞是人工抗原呈递细胞(aAPC)或自体APC。

60.根据权利要求52或53所述的方法,其中,将所述治疗性TIL群注入患者体内。

61.根据权利要求52或53所述的方法,其中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充OKT-3、IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(c)中的第一次扩增。

62.根据权利要求52或53所述的方法,其中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(d)中的第二次扩增。

63.根据权利要求52或53所述的方法,其中,步骤(a)中的所述FNA包括至少400,000个TIL。

64.根据权利要求52或53所述的方法,其中,所述小活检物从选自胰腺、黑色素瘤、乳腺和卵巢的肿瘤中获得。

65.根据权利要求52或53所述的方法,其中,所述FNA从选自肺、黑色素瘤、头颈、宫颈、卵巢、胰腺、胶质母细胞瘤、结直肠和肉瘤的肿瘤中获得。

66.根据权利要求65所述的方法,其中,所述肺肿瘤是非小细胞肺癌(NSCLC)。

67.根据权利要求52或53所述的方法,其中,所述患者先前已经历外科治疗。

68.根据权利要求52或53所述的方法,其中,步骤(a)中的TIL获自FNA。

69.根据权利要求52或53所述的方法,其中,所述FNA使用25-18号针头获得。

70.根据权利要求52或53所述的方法,其中,步骤(a)中的TIL获自小活检物。

71.根据权利要求52或53所述的方法,其中,所述小活检物使用16-11号针头获得。

72.根据权利要求52或53所述的方法,其中,步骤(e)中的收获使用LOVO细胞处理系统来进行。

73.根据权利要求52或53所述的方法,其中,所述细胞培养基装在选自G容器和Xuri细胞袋的容器中提供。

74.根据权利要求52或53所述的方法,其中,步骤(f)中的输液袋是HypoThermosol输液袋。

75.根据权利要求52或53所述的方法,其中,步骤(a)至(f)进行17天至24天的时间。

76.根据权利要求52或53所述的方法,其中,步骤(a)至(f)进行18天至22天的时间。

77.根据权利要求52或53所述的方法,其中,步骤(a)至(f)进行20天至22天的时间。

78.根据权利要求52或53所述的方法,其中,步骤(a)至(f)进行22天以下。

79.根据权利要求54所述的方法,其中,步骤(a)至(f)和冷冻保存进行22天以下。

80.根据权利要求52至53中任一项所述的方法,其中,步骤(e)中收获的治疗性TIL群包含对于TIL的治疗有效剂量来说足够的TIL。

81.根据权利要求80所述的方法,其中,对于治疗有效剂量来说足够的TIL的数量为2.3×10^{10}至13.7×10^{10}。

82.根据权利要求52至53中任一项所述的方法,其中,步骤(b)至(e)在单个容器中进行;与在超过一个的容器中进行步骤(b)至(e)相比,在单个容器中进行步骤(b)至(e)使得每个切除肿瘤的TIL产量增加。

83.根据权利要求52至53中任一项所述的方法,其中,在步骤(d)的第二次扩增期间,在不打开系统的情况下将抗原呈递细胞添加到TIL中。

84.根据权利要求52至53中任一项所述的方法,其中,相对于第二TIL群,第三TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群;相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,所述治疗性TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27+表达、CD28+表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

85.根据权利要求52至53中任一项所述的方法,其中,相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,获自第三TIL群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

86.根据权利要求52至53中任一项所述的方法,其中,与开放系统相比,所述封闭系统降低了微生物污染的风险。

87.根据权利要求52至53中任一项所述的方法,其中,将所述治疗性TIL群注入患者体内。

88.一种将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增为治疗性TIL群的方法,其中,所述方法包括:

(a)由患者肿瘤的细针抽吸物(FNA)、小活检物、空芯活检物或小活检物获得第一TIL群;

(b)通过在包含IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基中培养第一TIL群来进行启动第一次扩增,产生第二TIL群;其中,所述启动第一次扩增在具有第一透气表面区域的容器中进行1至14天的第一阶段,获得第二TIL群;第二TIL群的数量大于第一TIL群;

(c)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和APC进行快速第二次扩增,产生第三TIL群;其中,快速第二次扩增进行1至14天的第二阶段,获得第三TIL群;第三TIL群是治疗性TIL群;以及

(d)收获步骤(c)的治疗性TIL群。

89.根据权利要求88所述的方法,其中,所述第一阶段为6至12天。

90.根据权利要求88或89所述的方法,其中,所述第二阶段为6至12天。

91.根据权利要求88或89所述的方法,其中,所述第一阶段选自5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天或12天。

92.根据权利要求88或89所述的方法,其中,所述第二阶段选自5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天或12天。

93.根据权利要求88或89所述的方法,其中,所述APC是外周血单核细胞(PBMC)。

94.根据权利要求88或89所述的方法,其中,步骤(b)中所用的APC与步骤(c)中所用的APC的比率为1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2:1、2.1:1、2.2:1、2.3:1、2.4:1、2.5:1、2.6:1、2.7:1、2.8:1、2.9:1、3:1、3.1:1、3.2:1、3.3:1、3.4:1、3.5:1、3.6:1、3.7:1、3.8:1、3.9:1、4:1、4.1:1、4.2:1、4.3:1、4.4:1、4.5:1、4.6:1、4.7:1、4.8:1、4.9:1或5:1。

95.根据权利要求93所述的方法,其中,步骤(b)中所用的APC与步骤(c)中所用的APC的比率为1至2。

96.根据权利要求88或89所述的方法,其中,所述第一TIL群获自空芯活检物。

97.根据权利要求96所述的方法,其中,所述空芯活检物从选自下组的肿瘤中获得:黑色素瘤肿瘤、卵巢癌肿瘤、宫颈癌肿瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤、肺癌肿瘤、膀胱癌肿瘤、乳腺癌肿瘤、由人乳头状瘤病毒引起的癌症的肿瘤、头颈癌肿瘤、胶质母细胞瘤肿瘤、胃肠道癌肿瘤和肾癌肿瘤。

98.根据权利要求97所述的方法,其中,所述头颈癌肿瘤为头颈鳞状细胞癌(HNSCC)肿瘤。

由细针抽吸物和小活检物扩增TIL

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2017年11月17日提交的美国临时专利申请第62/588,044号、于2018年1月24日提交的美国临时专利申请第62/621,515号和于2018年11月5日提交美国临时专利申请第62/756,038的优先权,其全部内容通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 使用过继性转移的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL,tumor infiltrating lymphocyte)治疗大体积、难治性的癌症代表了一种治疗预后不良患者的有效方法。Gattinoni等,Nat.Rev.I mmunol.,2006,6,383-393。成功的免疫治疗需要大量的TIL,商业化需要稳健可靠的方法。由于细胞扩增的技术、物流和监管问题,这是一项需要实现的挑战。由于其速度和效率,基于IL-2的TIL扩增随后进行“快速扩增过程”(REP,rapid expansion process)已成为TIL扩增的优选方法。Dudley等,Science,2002,298,850-54;Dudley等,J.Clin.Oncol.,2005,23,2346-57;Dudley等,J.Clin.Oncol.,2008,26,5233-39;Riddell等,Science 1992,257,238-41;Dudley等,J.I mmunother.,2003,26,332-42。REP可在14天内使TIL扩增1000倍,尽管它需要通常来自多个供体的、大量过量(例如200倍)的经辐照的同种异体外周血单核细胞((PBMC,peripheral blood mononuclear cell),也称为单核细胞(MNC))作为饲养细胞(feeder cell),以及抗CD3抗体(OKT3)和高剂量的IL-2。Dudley等J.I mmunother.2003,26,332-42。经历REP程序的TIL在黑色素瘤患者的宿主免疫抑制后产生了成功的过继性细胞治疗。目前的输注接受参数(infusion acceptance parameter)依赖于TIL组成的读数(例如CD28、CD8或CD4阳性)以及REP产物的倍数扩增和活力。

[0004] 目前的TIL生产过程受到如何从患者获得TIL的限制。在某些情况下,如果肿瘤足够小或处于无法进行肿瘤切除的位置,则仍需要获得用于扩增和治疗的TIL的其他方法。本发明通过提供由细针抽吸物(FNA,fine needle aspirate)或芯针活检物(core needle biopsy)(其包含少量TIL)扩增TIL并在治疗方法中使用这些扩增的TIL的方法来满足此需求。

发明内容

[0005] 本发明提供了改进的和/或缩短的方法,用于扩增由细针抽吸物或核心活检物(core biopsy)分离的TIL并产生治疗性TIL群。

[0006] 本发明提供了将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增为治疗性TIL群的方法,该方法包括:

[0007] (i)由来自患者肿瘤的至少一个细针抽吸物(FNA)或至少一个小活检物(small biopsy)获得第一TIL群;

[0008] (ii)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养第一TIL群来进行第一次扩增,产生第二TIL群;可选地,在第1天至第3天中的任一天向细胞培养基中补充OKT-3;其中,第一次扩增进行约3天至约10天以获得第二TIL群;其中,当第一TIL群来自小活检物时,经过约3天至

约12天,第二TIL群包含至少5×10^7个TIL;以及

[0009] (iii)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第三TIL群的数量比第二TIL群大至少25倍;其中,第二次扩增进行约3天至约12天以获得第三TIL群;其中,第三TIL群是治疗性TIL群。

[0010] 在一些实施方式中,步骤(ii)中包含IL-2的细胞培养基还包含OKT-3,并且不进行可选的在第1天至第3天中的任一天向细胞培养基中补充OKT-3;其中,步骤(i)是启动第一次扩增(priming first expansion)步骤,步骤(ii)是快速第二次扩增(rapid second expansion)步骤。

[0011] 根据权利要求1或2所述的方法,在步骤(iii)之后,将细胞从细胞培养物中取出并在步骤(iv)之前冷冻保存在储存培养基中。

[0012] 在一些实施方式中,在进行步骤(iv)之前解冻细胞。

[0013] 重复步骤(iv)一至四次,以在治疗性TIL群中获得对于TIL的治疗有效剂量来说足够的TIL。

[0014] 在一些实施方式中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约17天至约24天的时间。

[0015] 在一些实施方式中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约18天至约22天的时间。

[0016] 在一些实施方式中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约20天至约22天的时间。

[0017] 在一些实施方式中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约22天。

[0018] 在一些实施方式中,来自步骤(iii)或(iv)的细胞表达CD4、CD8和TCRαβ的水平与新鲜收获的细胞相似。

[0019] 在一些实施方式中,APC是外周血单核细胞(PBMC)。

[0020] 在一些实施方式中,在步骤(ii)的第3天至第12天中的任一天和/或步骤(iii)的第11天至第14天中的任一天,将PBMC添加至细胞培养物中。

[0021] 在一些实施方式中,相对于第二TIL群,第三TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群;其中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,步骤(iv)的治疗性TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

[0022] 在一些实施方式中,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

[0023] 在一些实施方式中,APC是人工APC(aAPC)或自体APC。

[0024] 在一些实施方式中,将治疗性TIL群注入患者体内。

[0025] 在一些实施方式中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充OKT-3、IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(ii)中的第一次扩增。

[0026] 在一些实施方式中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(iii)中的第二次扩增。

[0027] 在一些实施方式中,步骤(i)中的FNA包含至少400,000个TIL。

[0028] 在一些实施方式中,小活检物从选自胰腺、黑色素瘤、乳腺和卵巢的肿瘤中获得。

[0029] 在一些实施方式中,FNA从选自肺、黑色素瘤、头颈、宫颈、卵巢、胰腺、胶质母细胞瘤、结直肠和肉瘤的肿瘤中获得。

[0030] 在一些实施方式中,所述肺肿瘤是非小细胞肺癌(NSCLC),可选地,所述患者先前

已经历外科治疗。

[0031] 在一些实施方式中,步骤(i)中的TIL获自FNA。

[0032] 在一些实施方式中,FNA使用25-18号针头获得。

[0033] 在一些实施方式中,步骤(i)中的TIL获自小活检物。

[0034] 在一些实施方式中,小活检物使用16-11号针头获得。

[0035] 在一些实施方式中,重复步骤(iii)一至四次,在治疗性TIL群中获得对于TIL的治疗有效剂量来说足够的TIL。

[0036] 在一些实施方式中,对于治疗有效剂量来说足够的TIL的数量为约2.3×10^{10}至约13.7×10^{10}。

[0037] 在一些实施方式中,本发明提供了将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增为治疗性TIL群的方法,该方法包括:

[0038] (i)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养来自患者肿瘤的细针抽吸物(FNA)或小活检物的第一TIL群进行第一次扩增,获得第二TIL群;其中,在第1天至第3天中的任一天向细胞培养基中补充OKT-3;其中,第一次扩增进行约3天至约12天以获得第二TIL群;其中,当第一TIL群来自小活检物时,经过约3天至约12天,第二TIL群包含至少5×10^{7}个TIL;以及

[0039] (ii)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,获得第三TIL群;其中,第三TIL群的数量比第二TIL群大至少25倍;其中,第二次扩增进行约3天至约12天以获得第三TIL群;其中,第三TIL群是治疗性TIL群。

[0040] 在一些实施方式中,步骤(ii)中包含IL-2的细胞培养基还包含OKT-3,并且不进行可选的在第1天至第3天中的任一天向细胞培养基中补充OKT-3;其中,步骤(i)是启动第一次扩增步骤,步骤(ii)是快速第二次扩增步骤。

[0041] 在一些实施方式中,在步骤(iii)之前,将步骤(ii)中来自细胞培养基的细胞取出并冷冻保存在储存培养基中。

[0042] 在一些实施方式中,在步骤(iii)之前解冻细胞。

[0043] 在一些实施方式中,APC是人工APC(aAPC)或自体APC。

[0044] 在一些实施方式中,将治疗性TIL群注入患者体内。

[0045] 在一些实施方式中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充OKT-3、IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(i)中的第一次扩增。

[0046] 在一些实施方式中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(ii)中的第二次扩增。

[0047] 在一些实施方式中,通过向第三TIL群的细胞培养基中进一步补充IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(iii)中的另外的第二次扩增。

[0048] 在一些实施方式中,步骤(i)中的FNA包含至少400,000个TIL。

[0049] 在一些实施方式中,小活检物从选自胰腺、黑色素瘤、乳腺和卵巢的肿瘤中获得。

[0050] 在一些实施方式中,FNA从选自肺、黑色素瘤、头颈、宫颈、卵巢、胰腺、胶质母细胞瘤、结直肠和肉瘤的肿瘤中获得。

[0051] 在一些实施方式中,所述肺肿瘤是非小细胞肺癌(NSCLC),可选地,所述患者先前已经历外科治疗。

[0052] 在一些实施方式中,步骤(i)中的TIL获自FNA。

[0053] 在一些实施方式中,FNA使用25-18号针头获得。

[0054] 在一些实施方式中,步骤(i)中的TIL获自小活检物。

[0055] 在一些实施方式中,小活检物使用16-11号针头获得。

[0056] 在一些实施方式中,重复步骤(ii)一至四次,以在治疗性TIL群中获得对于TIL的治疗有效剂量来说足够的TIL。

[0057] 在一些实施方式中,对于治疗有效剂量来说足够的TIL的数量为约2.3×10^{10}至约13.7×10^{10}。

[0058] 在一些实施方式中,相对于第二TIL群,第三TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群;其中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

[0059] 在一些实施方式中,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

[0060] 本发明还提供了治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括施用扩增的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),该方法包括:

[0061] (i)由获自患者肿瘤的细针抽吸物(FNA)或小活检物获得第一TIL群;

[0062] (ii)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养第一TIL群来进行第一次扩增,产生第二TIL群;其中,在第1天至第3天中的任一天向细胞培养基中补充OKT-3;其中,第一次扩增进行约3天至约12天以获得第二TIL群;其中,当第一TIL群来自小活检物时,经过约3天至约12天,第二TIL群包含至少5×10^{7}个TIL;

[0063] (iii)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第三TIL群的数量比第二TIL群大至少25倍;其中,第二次扩增进行约3天至约12天以获得第三TIL群;其中,第三TIL群是治疗性TIL群;以及

[0064] (iv)给患者施用治疗有效剂量的第三TIL群。

[0065] 在一些实施方式中,步骤(ii)中包含IL-2的细胞培养基还包含OKT-3,并且不进行可选的在第1天至第3天中的任一天向细胞培养基中补充OKT-3;其中,步骤(i)是启动第一次扩增步骤,步骤(ii)是快速第二次扩增步骤。

[0066] 在一些实施方式中,在步骤(ii)之后,将细胞从细胞培养物中取出并在步骤(iv)之前冷冻保存在储存培养基中。

[0067] 在一些实施方式中,在步骤(iv)之前解冻细胞。

[0068] 在一些实施方式中,重复步骤(iii)一至四次,以在治疗性TIL群中获得对于TIL的治疗有效剂量来说足够的TIL。

[0069] 在一些实施方式中,APC是人工APC(aAPC)或自体APC。

[0070] 在一些实施方式中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充OKT-3、IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(ii)中的第一次扩增。

[0071] 在一些实施方式中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(iii)中的第二次扩增。

[0072] 在一些实施方式中,步骤(i)中的FNA包含至少400,000个TIL。

[0073] 在一些实施方式中,FNA从选自肺、黑色素瘤、头颈、宫颈、卵巢、胰腺、胶质母细胞瘤、结直肠和肉瘤的肿瘤中获得。

[0074] 在一些实施方式中,所述肺肿瘤是非小细胞肺癌(NSCLC),可选地,受试者先前已经历外科治疗。

[0075] 在一些实施方式中,步骤(i)中的TIL获自FNA。

[0076] 在一些实施方式中,FNA使用25-18号针头获得。

[0077] 在一些实施方式中,步骤(i)中的TIL获自小活检物。

[0078] 在一些实施方式中,小活检物使用16-11号针头获得。

[0079] 在一些实施方式中,重复步骤(iv)一至四次,以在治疗性TIL群中获得对于TIL的治疗有效剂量来说足够的TIL。

[0080] 在一些实施方式中,对于治疗有效剂量来说足够的TIL的数量为约2.3×10^{10}至约13.7×10^{10}。

[0081] 本发明还提供了根据权利要求50至66中任一项所述的方法,其中,相对于第二TIL群,第三TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群;其中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

[0082] 在一些实施方式中,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

[0083] 在一些实施方式中,癌症选自黑色素瘤、宫颈癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、卵巢癌、肉瘤、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌和非小细胞肺癌。

[0084] 本发明还提供了治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括施用扩增的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),该方法包括:

[0085] (i)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养来自患者肿瘤的细针抽吸物(FNA)或小活检物的第一TIL群进行第一次扩增,获得第二TIL群;在第1天至第3天中的任一天向细胞培养基中补充OKT-3;其中,第一次扩增进行约3天至约12天以获得第二TIL群;其中,当第一TIL群来自小活检物时,经过约3天至约12天,第二TIL群包含至少5×10^{7}个TIL;

[0086] (ii)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,获得第三TIL群;其中,第三TIL群的数量比第二TIL群大至少25倍;其中,第二次扩增进行约3天至约12天以获得第三TIL群;其中,第三TIL群是治疗性TIL群;以及

[0087] (iii)给患者施用治疗有效剂量的治疗性TIL群。

[0088] 在一些实施方式中,步骤(ii)中包含IL-2的细胞培养基还包含OKT-3,并且不进行可选的在第1天至第3天中的任一天向细胞培养基中补充OKT-3;其中,步骤(i)是启动第一次扩增步骤,步骤(ii)是快速第二次扩增步骤。

[0089] 在一些实施方式中,在步骤(iii)之前,将步骤(ii)中来自细胞培养基的细胞取出并冷冻保存在储存培养基中。

[0090] 在一些实施方式中,在步骤(iii)之前解冻细胞。

[0091] 在一些实施方式中,APC是人工APC(aAPC)或自体APC。

[0092] 在一些实施方式中,APC是外周血单核细胞(PBMC)。

[0093] 在一些实施方式中,将治疗性TIL群注入患者体内。

[0094] 在一些实施方式中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充OKT-3、IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(i)中的第一次扩增。

[0095] 在一些实施方式中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(iii)中的第二次扩增。

[0096] 在一些实施方式中,步骤(i)中的FNA包含至少400,000个TIL。

[0097] 在一些实施方式中,小活检物从选自胰腺、黑色素瘤、乳腺和卵巢的肿瘤中获得。

[0098] 在一些实施方式中,FNA从选自肺、黑色素瘤、头颈、宫颈、卵巢、胰腺、胶质母细胞瘤、结直肠和肉瘤的肿瘤中获得。

[0099] 在一些实施方式中,所述肺肿瘤是非小细胞肺癌(NSCLC),可选地,受试者先前已经历外科治疗。

[0100] 在一些实施方式中,步骤(i)中的TIL获自FNA。

[0101] 在一些实施方式中,FNA使用25-18号针头获得。

[0102] 在一些实施方式中,步骤(i)中的TIL获自小活检物。

[0103] 在一些实施方式中,小活检物使用16-11号针头获得。

[0104] 在一些实施方式中,重复步骤(ii)一至四次,以在治疗性TIL群中获得对于TIL的治疗有效剂量来说足够的TIL。

[0105] 在一些实施方式中,对于治疗有效剂量来说足够的TIL的数量为约2.3×10^{10}至约13.7×10^{10}。

[0106] 在一些实施方式中,相对于第二TIL群,第三TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群;其中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

[0107] 在一些实施方式中,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

[0108] 本发明还提供了将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增为治疗性TIL群的方法,该方法包括:

[0109] (a)由获自患者肿瘤的细针抽吸物(FNA)或小活检物获得第一TIL群;

[0110] (b)将第一群加到封闭系统中;

[0111] (c)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养第一TIL群来进行第一次扩增,产生第二TIL群;其中,在第1天至第3天中的任一天向细胞培养基中补充OKT-3;其中,第一次扩增进行约3天至约12天以获得第二TIL群;其中,当第一TIL群来自小活检物时,经过约3天至约12天,第二TIL群包含至少5×10^{7}个TIL;其中,第一次扩增在提供第一透气表面区域的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约3天至约12天以获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量大至少25倍;其中,步骤(b)向步骤(c)的过渡在不打开系统的情况下发生;

[0112] (d)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约3天至约12天以获得第三TIL群;其中,第三TIL群是治疗性TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面区域的封闭

容器中进行;其中,步骤(c)向步骤(d)的过渡在不打开系统的情况下发生;

[0113] (e)收获由步骤(d)获得的治疗性TIL群,其中,步骤(d)向步骤(e)的过渡在不打开系统的情况下发生;以及

[0114] (f)将步骤(e)收获的TIL群转移至输液袋,其中,步骤(e)向步骤(f)的过渡在不打开系统的情况下发生。

[0115] 在一些实施方式中,步骤(ii)中包含IL-2的细胞培养基还包含OKT-3,并且不进行可选的在第1天至第3天中的任一天向细胞培养基中补充OKT-3;其中,步骤(i)是启动第一次扩增步骤,步骤(ii)是快速第二次扩增步骤。

[0116] 在一些实施方式中,该方法还包括以下步骤:使用冷冻保存方法冷冻保存步骤(f)中包含收获的TIL群的输液袋。

[0117] 在一些实施方式中,使用1:1比率的收获的TIL群与CS10培养基进行冷冻保存方法。

[0118] 在一些实施方式中,APC是外周血单核细胞(PBMC)。

[0119] 在一些实施方式中,PBMC是经辐照且同种异体的。

[0120] 在一些实施方式中,在步骤(c)的第3天至12天中的任一天和/或步骤(d)的第3天至12天中的任一天,将PBMC添加至细胞培养物中。

[0121] 在一些实施方式中,抗原呈递细胞是人工抗原呈递细胞(aAPC)或自体APC。

[0122] 在一些实施方式中,将治疗性TIL群注入患者体内。

[0123] 在一些实施方式中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充OKT-3、IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(c)中的第一次扩增。

[0124] 在一些实施方式中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(d)中的第二次扩增。

[0125] 在一些实施方式中,步骤(a)中的FNA包含至少400,000个TIL。

[0126] 在一些实施方式中,小活检物从选自胰腺、黑色素瘤、乳腺和卵巢的肿瘤中获得。

[0127] 在一些实施方式中,FNA从选自肺、黑色素瘤、头颈、宫颈、卵巢、胰腺、胶质母细胞瘤、结直肠和肉瘤的肿瘤中获得。

[0128] 在一些实施方式中,所述肺肿瘤是非小细胞肺癌(NSCLC),可选地,受试者先前已经历外科治疗。

[0129] 在一些实施方式中,步骤(a)中的TIL获自FNA。

[0130] 在一些实施方式中,FNA使用25-18号针头获得。

[0131] 在一些实施方式中,步骤(a)中的TIL获自小活检物。

[0132] 在一些实施方式中,小活检物使用16-11号针头获得。

[0133] 在一些实施方式中,步骤(e)中的收获使用LOVO细胞处理系统来进行。

[0134] 在一些实施方式中,细胞培养基装在选自G容器和Xuri细胞袋的容器中提供。

[0135] 在一些实施方式中,步骤(f)中的输液袋是HypoThermosol输液袋。

[0136] 在一些实施方式中,步骤(a)至(f)进行约17天至约24天的时间。

[0137] 在一些实施方式中,步骤(a)至(f)进行约18天至约22天的时间。

[0138] 在一些实施方式中,步骤(a)至(f)进行约20天至约22天的时间。

[0139] 在一些实施方式中,步骤(a)至(f)进行22天以下。

[0140] 在一些实施方式中,步骤(a)至步骤(f)和冷冻保存进行22天以下。

[0141] 在一些实施方式中,步骤(e)中收获的治疗性TIL群包含对于TIL的治疗有效剂量来说足够的TIL。

[0142] 在一些实施方式中,对于治疗有效剂量来说足够的TIL的数量为约2.3×10^{10}至约13.7×10^{10}。

[0143] 在一些实施方式中,步骤(b)至(e)在单个容器中进行;其中,与在超过一个的容器中进行步骤(b)至(e)相比,在单个容器中进行步骤(b)至(e)使得每个切除肿瘤的TIL产量增加。

[0144] 在一些实施方式中,在步骤(d)的第二阶段期间,在不打开系统的情况下将抗原呈递细胞添加到TIL中。

[0145] 在一些实施方式中,相对于第二TIL群,第三TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群;其中,相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,治疗性TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27+表达、CD28+表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

[0146] 在一些实施方式中,相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,获自第三TIL群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

[0147] 在一些实施方式中,与开放系统相比,所述方法降低了微生物污染的风险。

[0148] 在一些实施方式中,将来自步骤(g)的TIL注入患者体内。

[0149] 本发明还提供了治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括施用扩增的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),该方法包括以下步骤:

[0150] (a)由从受试者切除的肿瘤的细针抽吸物(FNA)或小活检物获得第一TIL群;

[0151] (b)将第一群加到封闭系统中;

[0152] (c)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养第一TIL群来进行第一次扩增,产生第二TIL群;其中,在第1天至第3天中的任一天向细胞培养基中补充OKT-3;其中,第一次扩增进行约3天至约12天以获得第二TIL群;其中,当第一TIL群来自小活检物时,经过约3天至约12天,第二TIL群包含至少5×10^{7}个TIL;其中,第一次扩增在提供第一透气表面区域的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约3至14天以获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量大至少25倍;其中,步骤(b)向步骤(c)的过渡在不打开系统的情况下发生;

[0153] (d)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约3至12天,获得第三TIL群;其中,第三TIL群是治疗性TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面区域的封闭容器中进行;其中,步骤(c)向步骤(d)的过渡在不打开系统的情况下发生;

[0154] (e)收获由步骤(d)获得的治疗性TIL群;其中,步骤(d)向步骤(e)的过渡在不打开系统的情况下发生;以及

[0155] (f)将步骤(e)收获的TIL群转移至输液袋,其中,步骤(e)向步骤(f)的过渡在不打开系统的情况下发生;

[0156] (g)可选地,使用冷冻保存方法冷冻保存来自步骤(f)的包含收获的TIL群的输液袋;以及

[0157] (h)给患者施用治疗有效剂量的第三TIL群,该第三TIL群来自步骤(g)的输液袋。

[0158] 在一些实施方式中,步骤(e)中收获的治疗性TIL群包含足够的TIL,用于在步骤(h)中施用治疗有效剂量的TIL。

[0159] 在一些实施方式中,步骤(ii)中包含IL-2的细胞培养基还包含OKT-3,并且不进行可选的在第1天至第3天中的任一天向细胞培养基中补充OKT-3;其中,步骤(i)是启动第一次扩增步骤,步骤(ii)是快速第二次扩增步骤。

[0160] 在一些实施方式中,APC是人工APC(aAPC)或自体APC。

[0161] 在一些实施方式中,将治疗性TIL群注入患者体内。

[0162] 在一些实施方式中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充OKT-3、IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(c)中的第一次扩增。

[0163] 在一些实施方式中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充OKT-3、IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(d)中的第二次扩增。

[0164] 在一些实施方式中,步骤(a)中的FNA包含至少400,000个TIL。

[0165] 在一些实施方式中,小活检物从选自胰腺、黑色素瘤、乳腺和卵巢的肿瘤中获得。

[0166] 在一些实施方式中,FNA从选自肺、黑色素瘤、头颈、宫颈、卵巢、胰腺、胶质母细胞瘤、结直肠和肉瘤的肿瘤中获得。

[0167] 在一些实施方式中,所述肺肿瘤是非小细胞肺癌(NSCLC),可选地,受试者先前已经历外科治疗。

[0168] 在一些实施方式中,步骤(i)中的TIL获自FNA。

[0169] 在一些实施方式中,FNA使用25-18号针头获得。

[0170] 在一些实施方式中,步骤(i)中的TIL获自小活检物。

[0171] 在一些实施方式中,小活检物使用16-11号针头获得。

[0172] 在一些实施方式中,足够用于在步骤(h)中施用治疗有效剂量的TIL的数量为约2.3×10^{10}至约13.7×10^{10}。

[0173] 在一些实施方式中,抗原呈递细胞(APC)是PBMC。

[0174] 在一些实施方式中,在步骤(c)的第3天至12天中的任一天和/或步骤(d)的第3天至12天中的任一天,将PBMC添加至细胞培养物中。

[0175] 在一些实施方式中,在步骤(h)中施用治疗有效剂量的TIL细胞之前,已给患者施用了非清髓性(non-myeloablative)淋巴细胞耗竭(lymphodepletion)方案。

[0176] 在一些实施方式中,非清髓性淋巴细胞耗竭方案包括以60mg/m^2/天的剂量施用环磷酰胺2天、然后以25mg/m^2/天的剂量施用氟达拉滨5天的步骤。

[0177] 在一些实施方式中,该方法还包括如下步骤:在步骤(h)中给患者施用TIL细胞后的第二天开始用高剂量IL-2方案治疗患者。

[0178] 在一些实施方式中,高剂量IL-2方案包括每8小时以15分钟静脉推注(bolus intravenous infusion)方式施用600,000或720,000IU/kg,直至耐受。

[0179] 在一些实施方式中,相对于第二TIL群,第三TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群;其中,相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,治疗性TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27+表达、CD28+表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

[0180] 在一些实施方式中,相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,治

疗性TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

[0181] 本发明还提供了将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增为治疗性TIL群的方法,该方法包括:

[0182] (a)由来自患者肿瘤的细针抽吸物(FNA)、小活检物、核心活检物或小活检物获得第一TIL群;

[0183] (b)通过在包含IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基中培养第一TIL群来进行启动第一次扩增,产生第二TIL群;其中,启动第一次扩增在具有第一透气表面区域的容器中进行约1至14天的第一阶段以获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量大于第一TIL群;

[0184] (c)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和APC进行快速第二次扩增,产生第三TIL群;其中,快速第二次扩增进行约1至约14天的第二阶段以获得第三TIL群;其中,第三TIL群是治疗性TIL群;以及

[0185] (d)收获步骤(c)的治疗性TIL群。

[0186] 在一些实施方式中,第一阶段为约6至12天。

[0187] 在一些实施方式中,第二阶段为约6至12天。

[0188] 在一些实施方式中,第一阶段选自5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天或12天。

[0189] 在一些实施方式中,第二阶段选自5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天或12天。

[0190] 在一些实施方式中,APC是外周血单核细胞(PBMC)。

[0191] 在一些实施方式中,步骤(b)中所用的APC与步骤(c)中所用的APC的比率为约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,优选为约1至2。

[0192] 在一些实施方式中,第一TIL群获自核心活检物。

[0193] 在一些实施方式中,核心活检物从选自下组的肿瘤中获得:黑色素瘤肿瘤、卵巢癌肿瘤、宫颈癌肿瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤、肺癌肿瘤、膀胱癌肿瘤、乳腺癌肿瘤、由人乳头状瘤病毒引起的癌症的肿瘤、头颈癌(包括头颈鳞状细胞癌(HNSCC))肿瘤、胶质母细胞瘤肿瘤、胃肠道癌肿瘤和肾癌肿瘤。

[0194] 本发明还提供了包含使用本文所述方法扩增的TIL的组合物。

[0195] 在一些实施方式中,组合物还包含冻存剂(cryopreservant)。

[0196] 在一些实施方式中,冻存剂包括二甲基亚砜。

[0197] 在一些实施方式中,组合物还包含冻存剂和等渗剂。

[0198] 在一些实施方式中,组合物还包含冻存剂和等渗剂,所述冻存剂包括二甲基亚砜,所述等渗剂包括氯化钠、葡萄糖酸钠和乙酸钠。

[0199] 在一些实施方式中,组合物还包含冻存剂和等渗剂,所述冻存剂包括二甲基亚砜和右旋糖酐40,所述等渗剂包括氯化钠、葡萄糖酸钠和乙酸钠。

[0200] 在一些实施方式中,包含TIL的组合物装在无菌输液袋中提供。

附图说明

[0201] 图1:概述了步骤A至F的示例性过程2A图。

[0202] 图2:过程2A的过程流程图。

[0203] 图3:显示了冷冻保存的TIL示例性生产过程(约22天)的实施方式的图。

[0204] 图4:显示了过程2A(22天的TIL生产过程)的实施方式的图。

[0205] 图5:过程1C和过程2A的示例性实施方式的步骤A至F的比较表。

[0206] 图6:过程1C的实施方式和过程2A的实施方式的详细比较。

[0207] 图7:概述了小活检物扩增过程的步骤A至F的示例性小活检图。

[0208] 图8:由取自胰腺癌患者(P7015)的核心活检物扩增的活细胞的图像。A)用IL-2处理的核心活检物;以及B)用IL-2、IL-15和IL-21的组合处理的核心活检物。

[0209] 图9:从胰腺核心活检物扩增的TIL的FACS分析。A)由用IL-2处理的核心活检物扩增得到的T细胞为CD4+和CD8+。B)由用IL-2处理的核心活检物扩增得到的CD8+T细胞为CD107a+。C)由用IL-2、IL-15和IL-21的组合处理的核心活检物扩增得到的T细胞为CD4+和CD8+。D)由用IL-2、IL-15和IL-21的组合处理的核心活检物扩增得到的CD8+T细胞为CD107a+。

[0210] 图10:由宫颈癌患者(C2005)的细针抽吸物扩增得到的TIL的FACS分析。A)用IL-2处理的细针抽吸物;以及B)用IL-2、IL-15和IL-21的组合处理的细针抽吸物。

[0211] 图11:由肺癌患者(L4032)的细针抽吸物扩增得到的TIL的FACS分析。A)用IL-2处理的细针抽吸物;以及B)用IL-2、IL-15和IL-21的组合处理的细针抽吸物。C)作为对照,肺肿瘤碎片用IL-2培养并扩增产生CD4+和CD8+T细胞。

[0212] 图12:使用快速扩增方案进一步扩增来自肺癌患者(L4032)的FNA样品的TIL。A)对由抽吸物扩增的TIL进行快速扩增之后的总细胞数,该抽吸物先用单独的IL-2处理、用IL-2、IL-15和IL-21的组合处理或先用IL-2、IL-15和IL-21的组合然后用单独的IL-2处理。B)CD4+和CD8+T细胞存在于用I1-2处理的扩增TIL群中。

[0213] 图13:由肺癌患者(L4033)的细针抽吸物扩增得到的TIL的FACS分析。A)来自用IL-2处理的细针抽吸物的T细胞;以及B)作为对照,来自用IL-2培养的肺肿瘤碎片的T细胞。

[0214] 图14:使用快速扩增方案进一步扩增由肺癌患者(L4033)的细针抽吸物扩增得到的TIL。A)对由经IL-2处理的细针抽吸物获得的TIL进行快速扩增之后的总细胞数。

[0215] 图15:取自卵巢癌患者(OV8011、OV8012和OV8013)的卵巢肿瘤的细针抽吸物的TIL。用IL-2或IL-2、IL-15和IL-21的组合对细针抽吸物进行培养之后的总细胞数。

[0216] 图16:由黑色素瘤患者(M1101)的细针抽吸物扩增的TIL的FACS分析。A)来自用IL-2处理的细针抽吸物的T细胞;以及B)作为对照,来自用IL-2培养的肺肿瘤碎片的T细胞。

[0217] 图17:通过核心活检获得的源自胰腺肿瘤样品的TIL的表型和功能状态。A)在具有IL-2的培养基或具有IL-2和细胞培养添加剂的培养基中培养的胰腺肿瘤的结果。B和C)在用佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)刺激之后,在不同培养基(补充IL-2的培养基与补充添加剂的培养基)中的CD4+细胞和CD8+细胞的CD107a表达的结果。

[0218] 图18:核心活检物和细针抽吸物的结果汇总表。A)胰腺癌和肺癌样品的结果。B)结肠直肠癌、卵巢癌、宫颈癌和黑色素瘤样品的结果。

[0219] 图19:通过细针抽吸活检物获得的源自黑色素瘤样品的TIL的表型和功能状态。A)

0天、11天,18天和21天后细胞培养物的总细胞数。B)源自碎片和抽吸物的细胞的表型分析。B)用PMA刺激后,源自碎片和抽吸物的细胞的功能分析(CD107a表达)。

[0220] 图20:显示可由UPMC(匹兹堡大学医学中心)获得的胰腺癌核心活检物扩增TIL的数据概述。

[0221] 图21:显示了源自胰腺肿瘤的TIL的一般表型的数据。

[0222] 图22:通过IFN-γ和CD107a测定,由胰核心物的pre-REP和REP分离的TIL是功能性的。

[0223] 图23:在低扩增的Pre-REP肺TIL中观察到CD3+/NK细胞群增加。

[0224] 图24:大多数Pre-REP肺TIL中的CD4/CD8比率高于1。

[0225] 图25:REP期间,高产量和低产量均观察到相当的倍数扩增。

[0226] 图26:关于肉瘤(UPMC 58)的数据。

[0227] 图27:关于宫颈癌(UPMC45)的数据。在G-REX 10中由4个碎片扩增Pre-REP TIL 21天。

[0228] 图28:关于ES19001(UPMC46)的数据。在G-REX 10中由4个碎片扩增Pre-REP TIL 21天。

[0229] 图29:关于硬腭(UPMC 67)和口腔癌(UPMC 68)的数据。在G-REX 10中由4个碎片扩增Pre-REP TIL 21天。

[0230] 图30:显示TIL可由UPMC提供的胰腺癌核心活检物扩增的数据概述。

[0231] 图31:胰腺核心活检物:可由胰腺癌的核心活检物扩增TIL。P7015实验概述和结果:将一个核心物放入24孔板的一个孔中,总共5个孔。将两个核心物放入两个孔中,但这些孔中几乎没有生长。用1)IL-2处理三个孔,用2)IL-2/IL-15/IL-21处理两个孔。

[0232] 图32:数据显示由胰腺核心物扩增的大多数细胞是CD4+T细胞和CD8+T细胞,且如通过CD107a表达(P7015)所测定地是功能性的。P7015实验结果:由胰腺核心活检物扩增的大多数细胞为T细胞(约80％为CD4+和CD8+)。PMA/I刺激显示CD8+脱粒的能力,如通过CD107a+表达所示,从而表明这些细胞是功能性的。与单独的IL-2相比,在IL-2/IL-15/IL-21三重混合物条件下,表达CD107a+的CD8+的百分比更高。

[0233] 图33:胰腺核心活检物:可由胰腺癌的核心活检物扩增TIL。P7028和P7031pre-REP实验概述和结果:将11个核心活检物与三重混合物(IL-2/IL-15/IL-21)放在G-Rex10中。在第12天评估P7028TIL,继续培养直至第19天。细胞计数:第21天＝1.61e6个活细胞;第21天＝3.49e7个活细胞。在第12天评估P7028TIL,继续培养直至第27天。细胞计数:第12天＝1.52e5个活细胞;第27天:1.14e7个活细胞。

[0234] 图34:胰腺核心活检物:可由经IL-2/IL-15/IL-21处理的来自胰腺癌的核心活检物和碎片扩增TIL。源自碎片的TIL的收获日为第11天至21天。源自核心物的TIL的收获日为第21至28天。

[0235] 图35:源自核心物和肿瘤活检物的TIL的表型表征。源自碎片的TIL的收获日为第11天至21天。源自核心物的TIL的收获日为第21至28天。

[0236] 图36:源自核心物和肿瘤活检物的TIL的表型表征。

[0237] 图37:与分离自碎片的TIL相似,来自核心活检物的TIL可表达CD107a并分泌IFNγ。

[0238] 图38:A)核心活检扩增程序的示例性过程。对1至2个核心活检物(3个胰腺、4个黑色素瘤、1个乳腺和1个卵巢)进行示例性处理,包括在第3天添加OKT3+饲养细胞。胰腺核心物扩增+/-IL-15和IL-21(REP1和REP2;即,第一次扩增和第二次扩增)。处理卵巢核心物+/-OX40(BMS)(n=1)。所有TIL均进行第二次REP(第二次扩增)。B)核心活检扩增程序的示例性过程。1至2个核心活检物需经历其中包括在第3天添加OKT3+饲养细胞的过程。

[0239] 图39:胰腺核心活检扩增程序的汇总表。

[0240] 图40:关于胰腺核心活检扩增的细胞数量的数据。

[0241] 图41:黑色素瘤核心活检扩增程序的汇总表。

[0242] 图42:关于黑色素瘤核心活检扩增的细胞数量的数据。

[0243] 图43:REP1和REP2(即,第一次扩增和第二次扩增)的耗竭标志物和活化标志物的表型表达相似。

[0244] 图44:与来自碎片的Gen2(即,过程2A)来源的TIL相比,在第3天向核心物添加OKT3+饲养细胞未显著改变TIL的表型。

[0245] 图45:乳腺核心(breast core)和卵巢核心(ovarian core)活检扩增程序的汇总表。

[0246] 图46:关于乳腺(左)和卵巢(右图)核心活检扩增的细胞数量的数据。

[0247] 图47:实验表明可由胰腺癌的核心活检物扩增TIL。P7028和P7031pre-REP的实验概述和结果。将核心活检物与三重混合物(IL-2/IL-15/IL-21)一起放入G-Rex 10。在第12天评估P7028TIL,继续培养直至第19天。细胞计数:第12天=1.61×10^{6}个活细胞;第21天=3.49×10^{7}个活细胞。在第12天评估P7030TIL,继续培养直至第27天。细胞计数:第12天=1.52×10^{5}个活细胞;第27天=1.14×10^{7}个活细胞。

[0248] 图48:可由经IL-2/IL-15/IL-21处理的来自胰腺癌的核心活检物和碎片扩增TIL。该图显示了碎片和核心物的细胞扩增数。来自碎片的TIL的收获日为第11天至21天。来自核心物的TIL的收获日为第21至28天。

[0249] 图49:源自核心物和碎片的TIL在表型上相似。来自碎片的TIL的收获日为第11天至21天。来自核心物的TIL的收获日为第21至28天。

[0250] 图50:当比较来自核心物和碎片的TIL时,“耗竭标志物”差异表达。

[0251] 图51:与从碎片分离的TIL相似,来自核心活检物的TIL可表达CD107a并分泌IFNγ。

[0252] 图52:无论初始培养条件(REP1;第一次扩增)如何,TC(三重混合物;IL-2/IL-15/IL-21)未显著改变REP2(第二次扩增)中胰腺核心物的总细胞数。

[0253] 图53:TC(三重混合物;IL-2/IL-15/IL-21)未显著改变胰腺核心物的REP2(第二次扩增)中CD4/CD8比率或记忆亚群。

[0254] 图54:在胰腺核心物的所有处理条件下,来自REP2(第二次扩增)的CD4群和CD8群的CD107a相似。

[0255] 图55:无论胰腺核心物的REP2(第二次扩增)处理条件如何,IFNγ分泌均相似。

[0256] 图56:与胰腺核心物的pre-REP条件相比,在第3天(REP1;第一次扩增)添加OKT3和饲养细胞未显著改变表型表达。

[0257] 图57:在第3天(REP1;第一次扩增)添加OKT3和饲养细胞未显著改变胰腺核心物中

“耗竭标志物”的表型表达。

[0258] 图58:在第3天(REP1;第一次扩增)添加OKT3和饲养细胞未显著改变胰腺核心物中活化标志物的表型表达。

[0259] 图59:胰腺核心物的pre-REP、REP1(第一次扩增)和REP2(第二次扩增)中CD4群和CD8群的CD107a相似。

[0260] 图60:与胰腺核心物的REP1(第一次扩增)相比,REP2(第二次扩增)中IFNγ的分泌减少。

[0261] 图61:在REP2(第二次扩增)中,TCM(中枢记忆T细胞)群增加,而TEM(效应记忆T细胞)减少;但在黑色素瘤中,CD27和CD28未改变。TEMRA:重新表达CD45RA的末端分化效应记忆细胞。TSCM:T记忆干细胞(Stem memory T cell)。

[0262] 图62:黑色素瘤核心物REP1(第一次扩增)和REP2(第二次扩增)中的IFNγ和CD107a相似。

[0263] 图63:显示黑色素瘤碎片vs黑色素瘤核心物的CD4和CD8表型标志物的数据。

[0264] 图64:显示黑色素瘤碎片vs黑色素瘤核心物的CD4和CD8表型标志物的数据。

[0265] 图65:显示黑色素瘤碎片vs黑色素瘤核心物的CD4和CD8的CD107a水平的数据。

[0266] 图66:OX40处理增加了卵巢核心物中CD8+细胞的百分比。

[0267] 图67:OX40处理的卵巢核心物的CD107a表达和IFNγ分泌相似。

[0268] 图68:乳腺核心物的REP1(第一次扩增)和REP2(第二次扩增)中增加的TCM以及耗竭标志物和活化标志物的差异表达。

[0269] 图69:乳腺核心物的REP1(第一次扩增)和REP2(第二次扩增)中CD107a和IFNγ相似。

[0270] 图70:示例性肿瘤核心活检TIL扩增程序的示意图。

[0271] 图71:经OKT3+饲养细胞处理的源自胰腺核心物的TIL经再刺激后分泌IFNγ。

[0272] 图72:源自黑色素瘤核心物的TIL经再刺激后表达CD107a并分泌IFNγ。

[0273] 图73:由乳腺核心活检物和卵巢核心活检物扩增TIL。

[0274] 图74:REP1期间经OKT3+饲养细胞处理的源自乳腺核心物的TIL的终产物表型与REP1期间仅用IL-2处理的核心物类似。

[0275] 图75:REP1期间经OKT3+饲养细胞处理的源自乳腺核心物的TIL的终产物表型与REP1期间仅用IL-2处理的核心物类似。

[0276] 图76:与REP1期间仅用IL-2处理的核心相比,REP1期间经OKT3+饲养细胞处理的乳腺核心物的IFNγ分泌表达增加。

[0277] 图77:REP2期间OX40处理增加了卵巢核心物的CD8+细胞的百分比。

[0278] 图78:两个REP期间的OX40处理改变了REP2中PD-1、KLRG1和CD25的表达。

[0279] 图79:终产物(REP2)中经OX40处理的卵巢核心物的IFNγ分泌略高。

[0280] 图80:经OX40处理的卵巢核心物的CD107a表达。

[0281] 图81:两个REP期间的OX40处理改变了与T细胞“年轻(youth)”有关的标志物的表达。

[0282] 图82:两个REP期间的OX40处理略微改变了REP2中PD-1、KLRG1和CD25的表达。

[0283] 图83:乳腺核心物的REP1和REP2中耗竭标志物和活化标志物的差异表达。

[0284] 图84:乳腺核心物的REP1和REP2中CD107a和IFNγ相似。

[0285] 图85A-85B:A)显示了2A过程(约22天的过程)和用于生产TIL的小活检Gen 3过程的一个实施方式(约17天至24天的过程)的比较。B)概述了步骤A至F(约17天至24天的过程)的Gen 3示例流程图。

[0286] 图86:提供了GEN 2(过程2A)vs GEN 3的可比性的实验流程图。

[0287] 图84A-87C:A)L4054-Gen 2过程和Gen 3过程的TIL产物的表型表征。B)L4055-Gen 2过程和Gen 3过程的TIL产物的表型表征。C)M1085T-Gen 2过程和Gen 3过程的TIL产物的表型表征。

[0288] 图88A-88C:A)L4054-GEN 2过程和GEN 3过程的TIL产物的记忆标志物分析。B)L4055-GEN 2过程和GEN 3过程的TIL产物的记忆标志物分析。C)M1085T-GEN2过程和GEN 3过程的TIL产物的记忆标志物分析。

[0289] 图89:L4054活化标志物和耗竭标志物(A)对CD4+门控和(B)对CD8+门控。

[0290] 图90:L4055活化标志物和耗竭标志物(A)对CD4+门控和(B)对CD8+门控。

[0291] 图91:IFNγ产量(pg/mL):Gen 2过程和Gen 3过程的(A)L4054、(B)L4055和(C)M1085T:此处表示的每个条形是刺激、无刺激和培养基对照的IFNγ水平的平均值+SEM。在450nm处测得光密度。

[0292] 图92:细胞培养上清液中IL-2浓度的ELISA分析:(A)L4054和(B)L4055。此处表示的每个条形是用过的培养基的IL-2水平的平均值+SEM。在450nm处测得光密度。

[0293] 图93:用过的培养基中葡萄糖和乳酸酯的定量(g/L):(A)葡萄糖和(B)乳酸酯:在两个肿瘤系和两个过程中,整个REP期间观察到葡萄糖减少。相反,如所预期的,观察到乳酸酯增加。GEN 2和GEN 3之间,葡萄糖减少和乳酸酯增加均相当。

[0294] 图94:A)L4054和L4055的用过的培养基中L-谷氨酰胺的定量。B)L4054和L4055的用过的培养基中Glutamax的定量。C)L4054和L4055的用过的培养基中氨的定量。

[0295] 图95:端粒长度分析:使用DAKO试剂盒,相对端粒长度(RTL)值指示了对照细胞系(1301白血病细胞系)中每个染色体/基因组的端粒荧光的GEN 2和GEN 3过程中每个染色体/基因组的平均端粒荧光。

[0296] 图96:在Gen 2过程和Gen 3过程下,L4054和L4055的TIL终产物的独特CDR3序列分析。条柱显示了在GEN 2(例如第22天)和GEN 3过程(例如第14至16天)收获日收集的1×10^6个细胞中鉴定出的独特TCR B克隆型的数量。基于样品中独特肽CDR的数量,与Gen 2相比,Gen 3显示出更高的克隆多样性。

[0297] 图97:L4054IL收获的最终细胞产物(GEN 2(例如第22天)和GEN 3过程(例如第14至16天))的独特CDR3序列的频率。

[0298] 图98:L4055TIL收获的最终细胞产物(GEN 2(例如第22天)和GEN 3过程(例如第14至16天))的独特CDR3序列的频率。

[0299] 图99:在Gen 2过程和Gen 3过程下,L4054和L4055的TIL终产物的多样性指数。香农熵多样性指数(Shanon entropy diversity index)是用于比较的更可靠和更通用的指标。Gen 3L4054和L4055显示出比Gen 2略高的多样性。

[0300] 图100:表37中所示的第7天-开始Gen 3REP的细胞计数的原始数据(参见下文实施例14)。

[0301] 图101:表37中所示的第11天-开始Gen 2REP和Gen 3按比例扩增(Scale Up)的细胞计数的原始数据(参见下文实施例14)。

[0302] 图102:表38中所示的第16天-Gen 2按比例扩增和Gen 3收获(例如第16天)的细胞计数的原始数据(参见下文实施例14)。

[0303] 图103:表38中所示的第22天-Gen 2收获(例如第22天)的细胞计数的原始数据(参见下文实施例14)。对于L4054Gen 2,将LOVO后的计数外推至4个烧瓶,因为这是研究总数。污染了1个烧瓶,进行外推得出总计=6.67×10^{10}。

[0304] 图104:图87A、87A和87B所示的流式细胞术结果的原始数据。

[0305] 图105:图87C和87C所示的流式细胞术结果的原始数据。

[0306] 图106:图89和90所示的流式细胞术结果的原始数据。

[0307] 图107:图91所示的L4054样品的IFNγ产生测定结果的原始数据。

[0308] 图108:图91所示的L4055样品的IFNγ产生测定结果的原始数据。

[0309] 图109:图91所示的M1085T样品的IFNγ产生测定结果的原始数据。

[0310] 图110:图92所示的IL-2ELISA测定结果的原始数据。

[0311] 图111:图93和94所示的代谢底物和代谢分析结果的原始数据。

[0312] 图112:图95所示的相对端粒长度分析结果的原始数据。

[0313] 图113:图96和99所示的独特CD3序列和克隆多样性分析结果的原始数据。

[0314] 图114:显示了各种Gen 2(2A过程)与Gen 3.1过程实施方式的比较。

[0315] 图115:描述Gen 2、Gen 2.1和Gen 3过程的实施方式的各种特征的表。

[0316] 图116:Gen 3过程(称为Gen 3.1)的实施方式的培养基条件的概述。

[0317] 图117:描述Gen 2、Gen 2.1和Gen 3过程的实施方式的各种特征的表。

[0318] 图118:比较了Gen 2和Gen 3.0过程的实施方式的各种特征的表。

[0319] 图119:提供了所述扩增过程的各个实施方式的培养基使用的表。

[0320] 图120:表型比较:该过程的Gen 3.0和Gen 3.1实施方式显示了相当的CD28、CD27和CD57表达。

[0321] 图121:Gen 3终产物的IFNγ产量更高。用培养的冷冻上清液评估IFNγ分析(通过ELISA)以比较两个过程。对于用包被的抗-CD3平板过夜刺激的每个肿瘤,使用新鲜的TIL产物进行每个Gen 2(例如第22天)和Gen 3过程(例如第16天)。每个条形代表刺激、未刺激和培养基对照的IFNγ水平。

[0322] 图122:上图:TIL终产物的独特CDR3序列分析:条柱显示了由Gen 2(例如第22天)和Gen 3过程(例如第14至16天)收集的1×10^6个细胞鉴定出的独特的TCR B克隆型的数量。基于样品中独特肽CDR的数量,与Gen 2相比,Gen 3显示出更高的克隆多样性。下图:TIL终产物的多样性指数:香农熵多样性指数是用于比较的更加可靠通用的度量。Gen 3显示出略高于Gen 2的多样性。

[0323] 图123:Gen 3和Gen 2终产物共享199个序列,对应于Gen 2的独特CDR3序列的前80%与Gen 3终产物共享97.07%。

[0324] 图124:Gen 3和Gen 2终产物共享1833个序列,对应于Gen 2的独特CDR3序列的前80%与Gen 3终产物共享99.45%。

[0325] 图125:Gen 3过程(16天过程)的示例性实施方式的示意图。

[0326] 图126:使用Gen 3扩增平台由造血系统恶性肿瘤扩增TIL的方法的示例性实施方式的示意图。

[0327] 图127:提供的数据显示,与Gen2相比,在第3天向核心物添加OKT3+饲养细胞并未显著改变TIL的表型,表明TIL是健康TIL。

[0328] 图128:提供的数据显示,黑色素瘤核心物来源的TIL的耗竭标志物和活化标志物的表达遵循与胰腺核心来源的TIL相似的趋势。在REP1和REP2中,IL-2和三重混合物的表型表达并无差异。

[0329] 图129:提供了关于由肺核心活检物扩增TIL的数据。

[0330] 图130:提供的数据显示,在第0天vs第3天(OKT3+饲养细胞)处理的肺核心物中观察到相似的表型概况。

[0331] 图131:提供的数据显示,在第3天用OKT3和饲养细胞处理的核心物中活化标志物和驻留T细胞标志物的表型表达增强。

[0332] 图132:如通过响应于非特异性刺激的IFNγ分泌和CD107a动员(mobilization)所确定的,来自肺核心物的TIL是功能性的。

[0333] 图133:与第0天处理的TIL相比,第3天处理的肺核心物的CD8+TIL是寡克隆的。

[0334] 序列表说明

[0335] SEQ ID NO:1是莫罗单抗(muromonab)的重链的氨基酸序列。

[0336] SEQ ID NO:2是莫罗单抗的轻链的氨基酸序列。

[0337] SEQ ID NO:3是重组人IL-2蛋白的氨基酸序列。

[0338] SEQ ID NO:4是阿地白介素的氨基酸序列。

[0339] SEQ ID NO:5是重组人IL-4蛋白的氨基酸序列。

[0340] SEQ ID NO:6是重组人IL-7蛋白的氨基酸序列。

[0341] SEQ ID NO:7是重组人IL-15蛋白的氨基酸序列。

[0342] SEQ ID NO:8是重组人IL-21蛋白的氨基酸序列。

[0343] SEQ ID NO:9是人4-1BB的氨基酸序列。

[0344] SEQ ID NO:10是鼠4-1BB的氨基酸序列。

[0345] SEQ ID NO:11是4-1BB激动剂单克隆抗体乌托鲁单抗(utomilumab)(PF-05082566)的重链。

[0346] SEQ ID NO:12是4-1BB激动剂单克隆抗体乌托鲁单抗(PF-05082566)的轻链。

[0347] SEQ ID NO:13是4-1BB激动剂单克隆抗体乌托鲁单抗(PF-05082566)的重链可变区(V_H)。

[0348] SEQ ID NO:14是4-1BB激动剂单克隆抗体乌托鲁单抗(PF-05082566)的轻链可变区(V_L)。

[0349] SEQ ID NO:15是4-1BB激动剂单克隆抗体乌托鲁单抗(PF-05082566)的重链CDR1。

[0350] SEQ ID NO:16是4-1BB激动剂单克隆抗体乌托鲁单抗(PF-05082566)的重链CDR2。

[0351] SEQ ID NO:17是4-1BB激动剂单克隆抗体乌托鲁单抗(PF-05082566)的重链CDR3。

[0352] SEQ ID NO:18是4-1BB激动剂单克隆抗体乌托鲁单抗(PF-05082566)的轻链CDR1。

[0353] SEQ ID NO:19是4-1BB激动剂单克隆抗体乌托鲁单抗(PF-05082566)的轻链CDR2。

[0354] SEQ ID NO:20是4-1BB激动剂单克隆抗体乌托鲁单抗(PF-05082566)的轻链CDR3。

[0355] SEQ ID NO:21是4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(urelumab)(BMS-663513)的重链。

[0356] SEQ ID NO:22是4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的轻链。

[0357] SEQ ID NO:23是4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的重链可变区(V_H)。

[0358] SEQ ID NO:24是4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的轻链可变区(V_L)。

[0359] SEQ ID NO:25是4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的重链CDR1。

[0360] SEQ ID NO:26是4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的重链CDR2。

[0361] SEQ ID NO:27是4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的重链CDR3。

[0362] SEQ ID NO:28是4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的轻链CDR1。

[0363] SEQ ID NO:29是4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的轻链CDR2。

[0364] SEQ ID NO:30是4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的轻链CDR3。

[0365] SEQ ID NO:31是TNFRSF激动剂融合蛋白的Fc结构域。

[0366] SEQ ID NO:32是TNFRSF激动剂融合蛋白的接头。

[0367] SEQ ID NO:33是TNFRSF激动剂融合蛋白的接头。

[0368] SEQ ID NO:34是TNFRSF激动剂融合蛋白的接头。

[0369] SEQ ID NO:35是TNFRSF激动剂融合蛋白的接头。

[0370] SEQ ID NO:36是TNFRSF激动剂融合蛋白的接头。

[0371] SEQ ID NO:37是TNFRSF激动剂融合蛋白的接头。

[0372] SEQ ID NO:38是TNFRSF激动剂融合蛋白的接头。

[0373] SEQ ID NO:39是TNFRSF激动剂融合蛋白的接头。

[0374] SEQ ID NO:40是TNFRSF激动剂融合蛋白的接头。

[0375] SEQ ID NO:41是TNFRSF激动剂融合蛋白的接头。

[0376] SEQ ID NO:42是TNFRSF激动剂融合蛋白的Fc结构域。

[0377] SEQ ID NO:43是TNFRSF激动剂融合蛋白的接头。

[0378] SEQ ID NO:44是TNFRSF激动剂融合蛋白的接头。

[0379] SEQ ID NO:45是TNFRSF激动剂融合蛋白的接头。

[0380] SEQ ID NO:46是4-1BB配体(4-1BBL)的氨基酸序列。

[0381] SEQ ID NO:47是4-1BBL多肽的可溶部分。

[0382] SEQ ID NO:48是4-1BB激动剂抗体4B4-1-1版本1的重链可变区(V_H)。

[0383] SEQ ID NO:49是4-1BB激动剂抗体4B4-1-1版本1的轻链可变区(V_L)。

[0384] SEQ ID NO:50是4-1BB激动剂抗体4B4-1-1版本2的重链可变区(V_H)。

[0385] SEQ ID NO:51是4-1BB激动剂抗体4B4-1-1版本2的轻链可变区(V_L)。

[0386] SEQ ID NO:52是4-1BB激动剂抗体H39E3-2的重链可变区(V_H)。

[0387] SEQ ID NO:53是4-1BB激动剂抗体H39E3-2的轻链可变区(V_L)。

[0388] SEQ ID NO:54是人OX40的氨基酸序列。

[0389] SEQ ID NO:55是鼠OX40的氨基酸序列。

[0390] SEQ ID NO:56是OX40激动剂单克隆抗体他利昔珠单抗(tavolixizumab)(MEDI-

0562)的重链。

[0391] SEQ ID NO:57是OX40激动剂单克隆抗体他利昔珠单抗(MEDI-0562)的轻链。

[0392] SEQ ID NO:58是OX40激动剂单克隆抗体他利昔珠单抗(MEDI-0562)的重链可变区(V_H)。

[0393] SEQ ID NO:59是OX40激动剂单克隆抗体他利昔珠单抗(MEDI-0562)的轻链可变区(V_L)。

[0394] SEQ ID NO:60是OX40激动剂单克隆抗体他利昔珠单抗(MEDI-0562)的重链CDR1。

[0395] SEQ ID NO:61是OX40激动剂单克隆抗体他利昔珠单抗(MEDI-0562)的重链CDR2。

[0396] SEQ ID NO:62是OX40激动剂单克隆抗体他利昔珠单抗(MEDI-0562)的重链CDR3。

[0397] SEQ ID NO:63是OX40激动剂单克隆抗体他利昔珠单抗(MEDI-0562)的轻链CDR1。

[0398] SEQ ID NO:64是OX40激动剂单克隆抗体他利昔珠单抗(MEDI-0562)的轻链CDR2。

[0399] SEQ ID NO:65是OX40激动剂单克隆抗体他利昔珠单抗(MEDI-0562)的轻链CDR3。

[0400] SEQ ID NO:66是OX40激动剂单克隆抗体11D4的重链。

[0401] SEQ ID NO:67是OX40激动剂单克隆抗体11D4的轻链。

[0402] SEQ ID NO:68是OX40激动剂单克隆抗体11D4的重链可变区(V_H)。

[0403] SEQ ID NO:69是OX40激动剂单克隆抗体11D4的轻链可变区(V_L)。

[0404] SEQ ID NO:70是OX40激动剂单克隆抗体11D4的重链CDR1。

[0405] SEQ ID NO:71是OX40激动剂单克隆抗体11D4的重链CDR2。

[0406] SEQ ID NO:72是OX40激动剂单克隆抗体11D4的重链CDR3。

[0407] SEQ ID NO:73是OX40激动剂单克隆抗体11D4的轻链CDR1。

[0408] SEQ ID NO:74是OX40激动剂单克隆抗体11D4的轻链CDR2。

[0409] SEQ ID NO:75是OX40激动剂单克隆抗体11D4的轻链CDR3。

[0410] SEQ ID NO:76是OX40激动剂单克隆抗体18D8的重链。

[0411] SEQ ID NO:77是OX40激动剂单克隆抗体18D8的轻链。

[0412] SEQ ID NO:78是OX40激动剂单克隆抗体18D8的重链可变区(V_H)。

[0413] SEQ ID NO:79是OX40激动剂单克隆抗体18D8的轻链可变区(V_L)。

[0414] SEQ ID NO:80是OX40激动剂单克隆抗体18D8的重链CDR1。

[0415] SEQ ID NO:81是OX40激动剂单克隆抗体18D8的重链CDR2。

[0416] SEQ ID NO:82是OX40激动剂单克隆抗体18D8的重链CDR3。

[0417] SEQ ID NO:83是OX40激动剂单克隆抗体18D8的轻链CDR1。

[0418] SEQ ID NO:84是OX40激动剂单克隆抗体18D8的轻链CDR2。

[0419] SEQ ID NO:85是OX40激动剂单克隆抗体18D8的轻链CDR3。

[0420] SEQ ID NO:86是OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的重链可变区(V_H)。

[0421] SEQ ID NO:87是OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的轻链可变区(V_L)。

[0422] SEQ ID NO:88是OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的重链CDR1。

[0423] SEQ ID NO:89是OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的重链CDR2。

[0424] SEQ ID NO:90是OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的重链CDR3。

[0425] SEQ ID NO:91是OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的轻链CDR1。

[0426] SEQ ID NO:92是OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的轻链CDR2。

[0427] SEQ ID NO:93是OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的轻链CDR3。

[0428] SEQ ID NO:94是OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的重链可变区(V_H)。

[0429] SEQ ID NO:95是OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的轻链可变区(V_L)。

[0430] SEQ ID NO:96是OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的重链CDR1。

[0431] SEQ ID NO:97是OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的重链CDR2。

[0432] SEQ ID NO:98是OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的重链CDR3。

[0433] SEQ ID NO:99是OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的轻链CDR1。

[0434] SEQ ID NO:100是OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的轻链CDR2。

[0435] SEQ ID NO:101是OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的轻链CDR3。

[0436] SEQ ID NO:102是OX40配体(OX40L)的氨基酸序列。

[0437] SEQ ID NO:103是OX40L多肽的可溶部分。

[0438] SEQ ID NO:104是OX40L多肽的替代性可溶部分。

[0439] SEQ ID NO:105是OX40激动剂单克隆抗体008的重链可变区(V_H)。

[0440] SEQ ID NO:106是OX40激动剂单克隆抗体008的轻链可变区(V_L)。

[0441] SEQ ID NO:107是OX40激动剂单克隆抗体011的重链可变区(V_H)。

[0442] SEQ ID NO:108是OX40激动剂单克隆抗体011的轻链可变区(V_L)。

[0443] SEQ ID NO:109是OX40激动剂单克隆抗体021的重链可变区(V_H)。

[0444] SEQ ID NO:110是OX40激动剂单克隆抗体021的轻链可变区(V_L)。

[0445] SEQ ID NO:111是OX40激动剂单克隆抗体023的重链可变区(V_H)。

[0446] SEQ ID NO:112是OX40激动剂单克隆抗体023的轻链可变区(V_L)。

[0447] SEQ ID NO:113是OX40激动剂单克隆抗体的重链可变区(V_H)。

[0448] SEQ ID NO:114是OX40激动剂单克隆抗体的轻链可变区(V_L)。

[0449] SEQ ID NO:115是OX40激动剂单克隆抗体的重链可变区(V_H)。

[0450] SEQ ID NO:116是OX40激动剂单克隆抗体的轻链可变区(V_L)。

[0451] SEQ ID NO:117是人源化的OX40激动剂单克隆抗体的重链可变区(V_H)。

[0452] SEQ ID NO:118是人源化的OX40激动剂单克隆抗体的重链可变区(V_H)。

[0453] SEQ ID NO:119是人源化的OX40激动剂单克隆抗体的轻链可变区(V_L)。

[0454] SEQ ID NO:120是人源化的OX40激动剂单克隆抗体的轻链可变区(V_L)。

[0455] SEQ ID NO:121是人源化的OX40激动剂单克隆抗体的重链可变区(V_H)。

[0456] SEQ ID NO:122是人源化的OX40激动剂单克隆抗体的重链可变区(V_H)。

[0457] SEQ ID NO:123是人源化的OX40激动剂单克隆抗体的轻链可变区(V_L)。

[0458] SEQ ID NO:124是人源化的OX40激动剂单克隆抗体的轻链可变区(V_L)。

[0459] SEQ ID NO:125是OX40激动剂单克隆抗体的重链可变区(V_H)。

[0460] SEQ ID NO:126是OX40激动剂单克隆抗体的轻链可变区(V_L)。

具体实施方式

[0461] I.引言

[0462] 利用通过快速扩增方案(REP)离体培养的TIL的过继性细胞治疗已经在黑色素瘤患者的宿主免疫抑制后产生了成功的过继性细胞治疗。目前的输注接受参数依赖于TIL组

成的读数(例如CD28、CD8或者CD4阳性)以及REP产物的扩增数值倍数和活力。

[0463] 目前的REP方案很少考虑将被注入患者体内的TIL的健康状况。T细胞在从幼稚T细胞到效应T细胞的成熟过程中经历了深刻的代谢转变(参见Chang等,Nat.I mmunol.2016,17,364,在此明确地整体并入,特别是对于厌氧和有氧代谢的讨论和标志物)。例如幼稚T细胞依靠线粒体呼吸产生ATP,而成熟、健康的效应T细胞如TIL是高度糖酵解的,依靠有氧糖酵解提供它们增殖、迁移、活化和抗肿瘤疗效所需的生物能量学底物。

[0464] 先前论文报道,在转移前限制TIL中的糖酵解和促进TIL中的线粒体代谢是期望的,因为严重依赖糖酵解的细胞在过继性转移时会遭受营养缺乏,这会导致大部分转移的细胞死亡。因此,本领域教导,促进线粒体代谢可能会促进体内寿命,并且事实上建议在诱导免疫应答之前使用糖酵解抑制剂。参见Chang等(Chang等,Nat.I mmunol.2016,17(364),574-582)。

[0465] 在一些实施方式中,本发明还涉及评价和量化代谢健康的此种增加的方法。因此,本发明提供了使用代谢的一种以上常规评价(包括但不限于糖酵解、氧化磷酸化、呼吸储备能力(SRC)和糖酵解储备的速率和量)来检测TIL群的相对健康的方法。

[0466] 此外,在一些实施方式中,本发明还涉及评价和量化代谢健康的此种增加的方法。因此,本发明提供了使用代谢的一种以上常规评价(包括但不限于糖酵解、氧化磷酸化、呼吸储备能力(SRC)和糖酵解储备的速率和量)来检测TIL群的相对健康的方法。

[0467] 此外,可选的其他评价包括但不限于ATP产生、线粒体质量和葡萄糖摄取。

[0468] III.定义

[0469] 术语“体内”指发生在受试者体内的事件。

[0470] 术语“体外”指在受试者体外发生的事件。体外检测包括使用活细胞或死细胞的基于细胞的检测,并且还可包括不使用完整细胞的无细胞检测。

[0471] 术语“快速扩增”指在一周的时间内抗原特异性TIL的数量增加至少约3倍(或者4倍、5倍、6倍、7倍、8倍或者9倍),更优选在一周的时间内增加至少约10倍(或者20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍或者90倍),或者最优选在一周的时间内增加至少约100倍。下文概述了一些快速扩增方案。

[0472] 本文中的“肿瘤浸润淋巴细胞”或者“TIL”指最初作为白细胞获得的细胞群,它们已经离开受试者的血流并迁移至肿瘤。TIL包括但不限于$CD8^+$细胞毒性T细胞(淋巴细胞)、Th1和Th17$CD4^+$T细胞、天然杀伤细胞、树突状细胞和M1巨噬细胞。TIL包括原代TIL和次代TIL。“原代TIL”是如本文所述由患者组织样品获得的那些(有时称为“新鲜收获的”),“次代TIL”是如本文所讨论的已经扩增或者增殖的任何TIL细胞群,包括但不限于大量TIL(bulk TIL)和扩增的TIL(“REP TIL”或者“post-REP TIL”)。

[0473] 本文的“细胞群”(包括TIL)指具有共同特征的许多细胞。通常,群的数量通常为1×10^6至1×10^{10},不同的TIL群包含不同的数量。例如,在IL-2存在下,原代TIL的初始增长产生约1×10^8个细胞的大量TIL群。通常,进行REP扩增以提供1.5×10^9至1.5×10^{10}个细胞的群用于输注。

[0474] 本文的“小活检”指实现从肿瘤中取出一定体积的组织的活检,其体积通常小于肿瘤体积,在一些实施方式中其体积实质上小于肿瘤体积。小活检包括核心活检、钻取活检(punch biopsy)等。包括任何小活检,例如体积小于约1mm^3、2mm^3、约5mm^3、约10mm^3、约25mm^3、

约50mm^{3}或约100mm^{3}或横截面积小于约1mm^2、2mm^2、约5mm^2、约10mm^2、约25mm^2、约50mm^{2}或约100mm^{2}的任何活检。小活检还可包括从体内相同或多个位置进行的多个活检,包括转移性疾病的不同癌灶。

[0475] 本文的“冷冻保存的TIL”指在约-150℃至-60℃进行处理和储存的原代、大量或扩增的TIL(REP TIL)。用于冷冻保存的一般方法也在本文其他地方描述,包括在实施例中。为清楚起见,“冷冻保存的TIL”能够与可用作原代TIL来源的冷冻组织样品区分开。

[0476] 本文的“解冻的冷冻保存的TIL”指先前被冷冻保存然后被处理而恢复至室温以上温度(包括但不限于细胞培养温度或可将TIL施用于患者的温度)的TIL群。

[0477] TIL通常可以利用细胞表面标志物在生物化学上定义,或者通过其浸润肿瘤和影响治疗的能力在功能上来定义。TIL通常可通过表达以下生物标志物中的一种以上来分类:CD4、CD8、TCRαβ、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1和CD25。另外,或者,TIL可通过其在重新引入患者后浸润实体瘤的能力在功能上定义。

[0478] 术语“冷冻保存培养基(cryopreservation media)”或者“冷冻保存培养基(cryopreservation medium)”指可用于细胞的冷冻保存的任何培养基。此类培养基可包括包含7%至10%DMSO的培养基。示例性的培养基包括CryoStor CS10、Hyperthermasol以及它们的组合。术语“CS10”指从Stemcell Technologies或者Biolife Solutions商购的冷冻保存培养基。CS10培养基可以用商品名“CryoStor®CS10”来指代。CS10培养基是包含DMSO的无血清无动物成分的培养基。

[0479] 本文中的“细胞群”(包括TIL)指具有共同特征的许多细胞。通常,群的数量通常在1×10^6到1×10^{10}之间,不同的TIL群包含不同的数量。例如,在IL-2存在下,原代TIL的初始增长产生约1×10^8个细胞的大量TIL群。通常进行REP扩增以提供1.5×10^9至1.5×10^{10}个细胞的群用于输注。

[0480] 术语“中枢记忆T细胞”指人细胞中CD45RO+并且组成性地表达CCR7(CCR7^{高})和CD62L(CD62^{高})的T细胞亚群。中枢记忆T细胞的表面表型还包括TCR、CD3、CD127(IL-7R)和IL-15R。中枢记忆T细胞的转录因子包括BCL-6、BCL-6B、MBD2和BMI1。在TCR触发后,中枢记忆T细胞主要分泌IL-2和CD40L作为效应分子。中枢记忆T细胞在血液中的CD4区室(compartment)中占优势,并且在人体中按比率富集在淋巴结和扁桃体。

[0481] 术语“效应记忆T细胞”指人或哺乳动物T细胞的亚群,其与中枢记忆T细胞一样,为CD45RO+,但丧失CCR7的组成型表达(CCR7^{低}),并且异质性或CD62L的表达低(CD62L^{低})。中枢记忆T细胞的表面表型还包括TCR、CD3、CD127(IL-7R)和IL-15R。中枢记忆T细胞的转录因子包括BLIMP1。效应记忆T细胞在抗原刺激后迅速分泌高水平的炎性细胞因子,包括干扰素-γ、IL-4和IL-5。效应记忆T细胞在血液的CD8区室中占优势,并且在人体中在肺、肝和肠中按比率富集。CD8$^+$效应记忆T细胞携带大量的穿孔素。术语“封闭系统”指的是对外部环境封闭的系统。适用于细胞培养方法的任何封闭系统均可用于本发明的方法。封闭系统包括例如但不限于封闭的G容器。一旦将肿瘤碎片加入封闭系统中,系统就不会向外部环境开放,直至TIL准备好施用于患者。

[0482] 本文用于描述破坏肿瘤的方法的术语“碎片化”(fragmenting)、“碎片化”(fragment)和“经碎片化”(fragmented)包括机械破碎方法,例如破碎、切片、分割和粉碎肿瘤组织,以及任何其他破坏肿瘤组织的物理结构的方法。

[0483] 术语“外周血单核细胞”和“PBMC”指具有圆形细胞核的外周血细胞,包括淋巴细胞(T细胞、B细胞、NK细胞)和单核细胞。当用作抗原呈递细胞(PBMC是一种抗原呈递细胞)时,外周血单核细胞是辐照的同种异体外周血单核细胞。

[0484] 术语“外周血淋巴细胞”和“PBL”指由外周血扩增的T细胞。在一些实施方式中,PBL分离自供体的全血或单采血液(apheresis)产品。在一些实施方式中,通过对T细胞表型(例如CD3+CD45+的T细胞表型)进行正向或负向选择,PBL分离自供体的全血或单采血液产品。

[0485] 术语“抗CD3抗体”指抗体或者它的变体(例如单克隆抗体),包括:针对成熟T细胞的T细胞抗原受体中CD3受体的人、人源化、嵌合或者鼠抗体。抗CD3抗体包括OKT-3,也称为莫罗单抗。其他抗CD3抗体包括例如奥特昔珠单抗(otelixizumab)、特普利珠单抗(teplizumab)和威司利珠单抗(visilizumab)。

[0486] 术语“OKT-3”(本文也称为“OKT3”)指单克隆抗体或者其生物仿制药或者变体,包括针对成熟T细胞的T细胞抗原受体中CD3受体的人、人源化、嵌合或者鼠抗体,还包括市售形式,如OKT-3(30ng/mL,纯MACS GMP CD3,Miltenyi Biotech,Inc.,圣地亚哥,加利福尼亚州,美国)和莫罗单抗或者其变体、保守性氨基酸取代、糖型(glycoform)或者生物仿制药。莫罗单抗的重链和轻链的氨基酸序列在表1中给出(SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2)。能够产生OKT-3的杂交瘤保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC,American Type Culture Collection),并且其分配的ATCC登录号为CRL 8001。能够产生OKT-3的杂交瘤也保藏在欧洲认证细胞培养物保藏中心(ECACC,European Collection of Authenticated Cell Cultures)中,并且其分配的目录号为86022706。

[0487] 表1:莫罗单抗的氨基酸序列

[0488]

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

[0489] 术语“IL-2”(本文也称为“IL2”)指称为白细胞介素-2的T细胞生长因子,包括所有形式的IL-2,包括人和哺乳动物形式,保守性氨基酸取代、糖型、生物仿制药及其变体。IL-2描述于例如Nelson,J.I mmunol.2004,172,3983-88和Malek,Annu.Rev.I mmunol.2008,26,453-79,其公开内容在此引入作为参考。适用于本发明的重组人IL-2的氨基酸序列在表2中给出(SEQ ID NO:3)。例如,术语IL-2包括人类重组形式的IL-2,例如,阿地白介素(PROLEUKIN,可从多个供应商商购,每个单独使用的小瓶2200万IU),以及可从美国新罕布什尔州朴茨茅斯的CellGenix,Inc.(CELLGRO GMP)或美国新泽西州东布朗士维克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目录号CYT-209-b)商购的重组形式的IL-2和其他供应商的其他商业等价物。阿地白介素(des-alanyl-1,丝氨酸-125人IL-2)是IL-2的非糖基化人

重组形式,分子量为约15kDa。适用于本发明的阿地白介素的氨基酸序列在表2中给出(SEQ ID NO:4)。术语IL-2还包括如本文所述的聚乙二醇化形式的IL-2,包括聚乙二醇化的IL2前药NKTR-214,可从美国加利福尼亚州南旧金山的Nektar Therapeutics公司商购。适用于本发明的NKTR-214和聚乙二醇化IL-2描述于美国专利申请公开号US2014/0328791A1和国际专利申请公开号WO2012/065086A1中,其公开内容在此引入作为参考。适用于本发明的缀合的IL-2的替代形式描述于美国专利4,766,106、5,206,344、5,089,261和4,902,502中,其公开内容在此引入作为参考。适用于本发明的IL-2制剂描述于美国专利号6,706,289中,其公开内容在此引入作为参考。

[0490] 表2:白细胞介素的氨基酸序列

[0491]

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

[0492] 术语“IL-4”(本文也称为“IL4”)指称为白细胞介素4的细胞因子,其由Th2T细胞和嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和肥大细胞产生。IL-4调节幼稚辅助性T细胞(Th0细胞)向Th2T细胞的分化。Steinke和Borish,Respir.Res.2001,2,66-70。在被IL-4活化后,Th2T细胞随后在正反馈环中产生另外的IL-4。IL-4还刺激B细胞增殖和II类MHC表达,并诱导B细胞转换为IgE和IgG1表达。适用于本发明的重组人IL-4可从多个供应商商购,包括美国新泽西州东布朗士维克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目录号CYT-211)和美国Waltham,MA的ThermoFisher Scientific,Inc.(人IL-15重组蛋白,目录号Gibco CTP0043)。适用于本发明的重组人IL-4的氨基酸序列在表2中给出(SEQ ID NO:5)。

[0493] 术语“IL-7”(本文也称为“IL7”)指称为白细胞介素7的糖基化组织衍生细胞因子,其可从基质细胞和上皮细胞以及树突状细胞中获得。Fry和Mackall,Blood 2002,99,3892-904。IL-7可以刺激T细胞的生长。IL-7与IL-7受体结合,IL-7受体是由IL-7受体α和共用γ链受体(common gamma chain receptor)组成的异二聚体,其在一系列信号中对T细胞的胸腺内发育和外周存活具有重要作用。适用于本发明的重组人IL-7可从多个供应商商购,包括美国新泽西州东布朗士维克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目录号CYT-254)和美国Waltham,MA的ThermoFisher Scientific,Inc.(人IL-15重组蛋白,目录号Gibco PHC0071)。适用于本发明的重组人IL-7的氨基酸序列在表2中给出(SEQ ID NO:6)。

[0494] 术语“IL-15”(本文也称为“IL15”)指称为白细胞介素-15的T细胞生长因子,并且

包括所有形式的IL-2,包括人和哺乳动物形式,保守性氨基酸取代、糖型、生物仿制药及其变体。IL-15描述于例如Fehniger和Caligiuri,Blood 2001,97,14-32中,其公开内容在此引入作为参考。IL-15与IL-2共享β和γ信号传导受体亚单位。重组人IL-15是非糖基化多肽单链,含有114个氨基酸(和N-末端甲硫氨酸),分子量为12.8kDa。重组人IL-15可从多个供应商商购,包括美国新泽西州东布朗士维克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目录号CYT-230-b)和美国Waltham,MA的ThermoFisher Scientific,Inc.(人IL-15重组蛋白,目录号34-8159-82)。适用于本发明的重组人IL-15的氨基酸序列在表2中给出(SEQ ID NO:7)。

[0495] 术语“IL-21”(本文也称为“IL21”)指称为白细胞介素-21的多效细胞因子蛋白,并且包括所有形式的IL-21,包括人和哺乳动物形式,保守性氨基酸取代、糖型、生物仿制药及其变体。IL-21描述于例如Spolski和Leonard,Nat.Rev.Drug.Disc.2014,13,379-95,其公开内容在此引入作为参考。IL-21主要由天然杀伤T细胞和活化的人$CD4^+$T细胞产生。重组人IL-21是非糖基化多肽单链,含有132个氨基酸,分子量为15.4kDa。重组人IL-21可从多个供应商商购,包括美国新泽西州东布朗士维克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目录号CYT-408-b)和美国Waltham,MA的ThermoFisher Scientific,Inc.(人IL-21重组蛋白,目录号14-8219-80)。适用于本发明的重组人IL-21的氨基酸序列在表2中给出(SEQ ID NO:8)。

[0496] 当指示“抗肿瘤有效量”、“肿瘤抑制有效量”或“治疗量”时,待施用的本发明组合物的精确量可由医生确定,考虑年龄、体重、肿瘤大小、感染或转移程度以及患者(受试者)状况的个体差异。通常可以说,包含本文所述的经基因修饰的药物组合物可以10^4至10^{11}个细胞/kg体重(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}个细胞/kg体重)的剂量施用,包括这些范围内的所有整数值。经基因修饰的细胞毒性淋巴细胞组合物也可以这些剂量多次施用。经基因修饰的细胞毒性淋巴细胞可通过使用免疫治疗中通常已知的输注技术来施用(参见例如Rosenberg et al.,“新的”Eng.J.of Med.319:1676,1988)。通过监测患者的疾病迹象并相应地调整治疗,医学领域的技术人员可以容易地确定特定患者的最佳剂量和治疗方案。

[0497] 术语“血液恶性肿瘤(hematological malignancy)”、“血液恶性肿瘤(hematologic malignancy)”或相关含义的术语指造血和淋巴组织(包括但不限于血液、骨髓、淋巴结和淋巴系统的组织)的哺乳动物癌症和肿瘤。血液恶性肿瘤也称为“液体肿瘤”。血液恶性肿瘤包括但不限于急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞淋巴瘤(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、急性髓样白血病(A ML)、慢性粒细胞白血病(CML)、急性单核细胞白血病(AMoL)、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤。术语“B细胞血液恶性肿瘤”指影响B细胞的血液恶性肿瘤。

[0498] 术语“实体瘤”指通常不包含囊肿或液体区域的异常组织块。实体瘤可为良性或恶性的。术语实体瘤癌症指恶性、肿瘤性或癌性实体瘤。实体瘤癌症包括但不限于肉瘤、恶性上皮肿瘤和淋巴瘤,例如肺癌、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、直肠癌和膀胱癌。实体瘤的组织结构包括相互依赖的组织隔室,包括实质(癌细胞)和支持的基质细胞(癌细胞分散在其中并且可以提供支持的微环境)。

[0499] 术语“细针抽吸”或FNA指可用于取样或诊断程序(包括肿瘤取样)的活检程序类型,其中提取样品但未去除或切除肿瘤。如本文所述,在细针抽吸中,将核芯针(例如25-18号针)插入肿瘤或包含肿瘤的区域,获取流体和细胞(包括组织)用于进一步分析或扩增。使

用FNA,可在不保留组织细胞的组织学结构的情况下取出细胞。FNA可包含TIL。在某些情况下,使用超声引导的细针抽吸活检针进行细针抽吸活检。FNA针可从Becton Dickinson、Covidien等商购。

[0500] 术语“核心活检”或“芯针活检(core needle biopsy)”指可用于采样或诊断程序(包括肿瘤采样)的活检程序类型,其中提取样品但未去除或切除肿瘤。如本文所述,在核心活检中,将核芯针(例如16-11号针)插入肿瘤或包含肿瘤的区域,获取液体和细胞(包括组织)用于进一步分析或扩增。使用核心活检,鉴于与FNA相比针头尺寸更大,可在保留一些组织细胞的组织学结构的情况下取出细胞。核心活检针通常具有能够保留肿瘤的至少一部分组织学结构的规格尺寸。核心活检可包含TIL。在某些情况下,使用可从Bard Medical、Becton Dickinson等商购的活检仪、真空辅助的芯针活检仪、立体定向引导的芯针活检仪、超声引导的芯针活检仪、MRI引导的核心活检仪进行芯针活检。

[0501] 术语“液体肿瘤”指本质上是流体的异常细胞团。液体肿瘤癌症包括但不限于白血病、骨髓瘤和淋巴瘤,以及其他血液恶性肿瘤。从液体肿瘤获得的TIL在本文中也可称为骨髓浸润淋巴细胞(MIL)。获自液体肿瘤(包括在外周血中循环的液体肿瘤)的TIL在本文中也可以称为PBL。本文的术语MIL、TIL和PBL可互换使用,且仅基于来源细胞的组织类型而不同。

[0502] 如本文所用,术语“微环境”可以指整个实体瘤或血液肿瘤微环境,或指微环境内的单个细胞亚群。如本文所用,肿瘤微环境指“细胞、可溶性因子、信号分子、细胞外基质,以及促进肿瘤转化、支持肿瘤生长和侵袭、保护肿瘤免受宿主免疫、促进对治疗的抵抗并为显性转移灶的繁殖提供利基的机制线索”的复杂混合物,如Swartz等,Cancer Res.,2012,72,2473中所述。尽管肿瘤表达应该被T细胞识别到的抗原,但由于微环境的免疫抑制,免疫系统很少清除肿瘤。

[0503] 在一个实施方式中,本发明包括用残余TIL(rTIL,remnant TIL)群治疗癌症的方法;其中,在输注本发明的rTIL之前用非清髓性化学治疗预处理患者。在一些实施方式中,可以向rTIL群提供正常移栖性TIL(eTIL,emigrant TIL)群;其中,在输注本发明的rTIL和eTIL之前,用非清髓性化疗对患者进行预处理。在一个实施方式中,非清髓性化学治疗是环磷酰胺60mg/kg/天、持续2天(rTIL输注前第27和第26天)和氟达拉滨25mg/m^2/天、持续5天(rTIL输注前第27至第23天)。在一个实施方式中,在根据本发明的非清髓性化学治疗和rTIL输注(在第0天)后,患者以720,000IU/kg每8小时接受一次IL-2的静脉输注,直至生理耐受。

[0504] 实验发现表明,过继性转移肿瘤特异性T淋巴细胞之前的淋巴细胞耗竭(lymphodepletion)通过消除调节性T细胞和免疫系统的竞争成分(“细胞因子沉降”)而在增强治疗疗效中起关键作用。因此,本发明的一些实施方式在引入本发明的rTIL之前对患者使用淋巴细胞耗竭步骤(有时也称为“免疫抑制调节”)。

[0505] 如本文所用,术语“共同施用”、“共同施用”、“与...组合施用”、“与...组合施用”、“同时”和“共同”包括向受试者施用两种以上活性药物成分(在本发明的一个优选实施方式中,例如至少一种钾通道激动剂与多个TIL组合),使得活性药物成分和/或它们的代谢物同时存在于受试者体内。共同施用包括:同时施用不同的组合物、在不同时间施用不同的组合物,或者施用其中存在两种以上活性药物成分的组合物。优选同时施用不同的组合物和施

用其中存在两种药剂的组合物。

[0506] 术语“有效量”或者“治疗有效量”指如本文所述的化合物或者化合物组合的量足够实现预期应用,包括但不限于疾病治疗。治疗有效量可根据预期应用(体外或者体内)或者所治疗的受试者和疾病状况(例如受试者的体重、年龄和性别)、疾病状况的严重程度或者施用方式而变化。该术语还适用于会在靶细胞中诱导特定应答(例如血小板粘附和/或细胞迁移的减少)的剂量。具体剂量将取决于所选择的具体化合物、要遵循的施用方案、化合物是否与其他化合物联合施用、施用时间、施用组织以及携带化合物的物理递送系统。

[0507] 术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”、“治疗(treat)”等指获得所需的药理学和/或生理学作用。就完全或部分预防疾病或其症状而言,该作用可为预防性的,和/或就部分或完全治愈疾病和/或由疾病引起的不良反应而言,该作用可为治疗性的。如本文所用,“治疗”包括哺乳动物,特别是人类中疾病的任何治疗,包括:(a)在可能易患该疾病但尚未被诊断为患有该疾病的受试者中防止疾病发生;(b)抑制疾病,即阻止其发展或进展;以及(c)缓解疾病,即引起疾病消退和/或缓解一种以上疾病症状。“治疗”还意味着包括递送药剂以提供药理学作用,即使在没有疾病或病症的情况下也是如此。例如,“治疗”包括递送可在没有疾病的情况下引发免疫应答或赋予免疫力的组合物,例如在疫苗的情况下。

[0508] 当涉及核酸或者蛋白质部分的使用时,术语“异源”表示核酸或者蛋白质包含两个以上在自然界中彼此不存在相同关系的子序列。例如核酸通常是重组产生的,具有来自无关基因的两个以上序列,它被排列以产生新的功能性核酸,例如来自一个来源的启动子和来自另一个来源的编码区,或者来自不同来源的编码区。类似地,异源蛋白质表示该蛋白质包含两个以上在自然界中彼此不存在相同关系的子序列(例如融合蛋白)。

[0509] 在两个以上核酸或多肽的情况下,术语“序列同一性”,“百分比同一性”和“序列百分比同一性”(或其同义词,例如“99%相同”)指,当比较和比对(如果需要的话,引入空位)以获得最大对应性时,两个以上序列或子序列相同或具有指定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基,不考虑任何保守性氨基酸取代作为序列同一性的一部分。可使用序列比较软件或算法或通过目视检查,来测量同一性百分比。本领域已知各种算法和软件可用于获得氨基酸或核苷酸序列的比对。测定序列同一性百分比的合适程序包括,例如可从美国政府的国家生物技术信息中心BLAST网站获得的BLAST程序套件。可使用BLASTN或BLASTP算法进行两个序列之间的比较。BLASTN用于比较核酸序列,而BLASTP用于比较氨基酸序列。ALIGN、ALIGN-2(加利福尼亚州南旧金山的Genentech)或可从DNASTAR获得的MegAlign是可用于比对序列的其他公共可用软件程序。本领域技术人员可通过特定的比对软件确定用于最大比对的适当参数。在某些实施例中,使用比对软件的默认参数。

[0510] 如本文所用,术语“变体”包括但不限于如下的抗体或融合蛋白:其通过在参考抗体的氨基酸序列内或附近的某些位置处的一个以上取代、缺失和/或添加而包含与参考抗体的氨基酸序列不同的氨基酸序列。与参考抗体的氨基酸序列相比,变体在其氨基酸序列中可包含一个以上保守性取代。保守性取代可涉及例如取代相似带电荷或不带电荷的氨基酸。该变体保留了特异性结合参考抗体的抗原的能力。术语“变体”还包括聚乙二醇化的抗体或蛋白质。

[0511] 术语“体内”指发生在受试者体内的事件。

[0512] 术语“体外”指发生在受试者体外的事件。体外检测包括使用活细胞或死细胞的基

于细胞的检测,并且还可包括不使用完整细胞的无细胞检测。

[0513] 术语“快速扩增”意指在一周的时间内抗原特异性TIL的数量增加至少约3倍(或4倍、5倍、6倍、7倍、8倍或9倍),更优选在一周的时间内增加至少约10倍(或20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍或90倍),或者最优选在一周的时间内增加至少约100倍。下文概述了一些快速扩增方案。

[0514] 本文中的“肿瘤浸润淋巴细胞”或者“TIL”指最初作为白细胞获得的细胞群,它们已经离开受试者的血流并迁移至肿瘤。TIL包括但不限于$CD8^+$细胞毒性T细胞(淋巴细胞)、Th1和Th17$CD4^+$T细胞、天然杀伤细胞、树突状细胞和M1巨噬细胞。TIL包括原代TIL和次代TIL。“原代TIL”是如本文所述由患者组织样品获得的那些(有时称为“新鲜收获的”),“次代TIL”是如本文所讨论的已经扩增或者增殖的任何TIL细胞群,包括但不限于大量TIL、扩增的TIL(“REP TIL”)以及“reREP TIL”。例如,reREP TIL可包括第二次扩增TIL或者另外的第二次扩增TIL(例如,图7的步骤D中所描述的那些,包括称为reREP TIL的TIL)。

[0515] TIL通常可以利用细胞表面标志物在生物化学上定义,或者通过其浸润肿瘤和影响治疗的能力在功能上来定义。TIL通常可通过表达以下生物标志物中的一种以上来分类:CD4、CD8、TCRαβ、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1和CD25。另外,或者,TIL可通过在其重新引入患者后浸润实体瘤的能力在功能上定义。TIL还可通过效价强度来表征——例如,如果例如干扰素(IFN)的释放大于约50pg/mL、大于约100pg/mL、大于约150pg/mL或大于约200pg/mL,则TIL可被认为是有效的。

[0516] 本文的“细胞群”(包括TIL)指具有共同特征的许多细胞。通常,群的数量通常为1×10^6到1×10^{10},不同的TIL群包含不同的数量。例如,在IL-2存在下,原代TIL的初始增长会得到约1×10^8个细胞的大量TIL群。通常进行REP扩增以提供1.5×10^9至1.5×10^{10}个细胞的群用于输注。

[0517] 术语“药学上可接受的盐”指源自本领域已知的多种有机和无机抗衡离子的盐。可用无机酸和有机酸形成药学上可接受的酸加成盐。可衍生盐的优选无机酸包括:例如,盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸和磷酸。可衍生盐的优选有机酸包括:例如,乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸和水杨酸。可用无机碱和有机碱形成药学上可接受的碱加成盐。可以衍生盐的无机碱包括:例如,钠、钾、锂、铵、钙、镁、铁、锌、铜、锰和铝。可衍生盐的有机碱包括:例如,伯胺、仲胺和叔胺、取代的胺(包括天然存在的取代的胺)、环胺和碱性离子交换树脂。具体实例包括:异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺和乙醇胺。在一些实施方式中,药学上可接受的碱加成盐选自:铵盐、钾盐、钠盐、钙盐和镁盐。术语“共晶”指源自本领域已知的许多共晶形成体的分子复合物。与盐不同,共晶通常不涉及共晶和药物之间的氢转移,而是涉及晶体结构中共晶形成体和药物的分子间相互作用,例如氢键键合、芳环堆积或分散力。

[0518] 术语“药学上可接受的载体”或者“药学上可接受的赋形剂”旨在包括任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂,以及惰性成分。此种药学上可接受的载体或者药学上可接受的赋形剂对活性药物成分的用途是本领域熟知的。除非任何常规的药学上可接受的载体或者药学上可接受的赋形剂与活性药物成分不相容,否则可预期其在本发明的治疗性组合物中的应用。其他活性药物成分(例如其他药物)也可以掺

入所描述的组合物和方法中。

[0519] 术语“约”和“大约”表示在统计上有意义的数值范围内。这样的范围可在给定值或者范围的一个数量级内，优选在50％内，更优选在20％内，更优选在10％内，甚至更优选在5％内。术语“约”或者“大约”所包含的可允许变化取决于所研究的特定系统，并且本领域普通技术人员可以容易地理解。此外，如本文所用，术语“约”和“大约”表示大小、尺寸、配方、参数、形状和其他性质和特性不是、也不必是精确的，但可以视需要是近似的和/或更大的或者更小的，反映公差、转换因子、四舍五入、测量误差等，以及本领域技术人员已知的其他因素。通常，大小、尺寸、配方、参数、形状或者其他性质或者特性是“约”或者“近似”的，无论是否明确说明如此。应注意，具有非常不同的尺寸、形状和大小的实施方式可采用所述安排。

[0520] 当在所附权利要求中以原始和修改的形式使用时，过渡术语“包含”、“基本上由...组成”和“由...组成”定义了关于被排除在权利要求的范围之外的未列举的另外的权利要求要素或者步骤(如果有的话)的权利要求范围。术语“包含”旨在是包含性的或者开放式的，并且不排除任何另外的、未列举的要素、方法、步骤或者材料。术语“由.....组成”不包括除权利要求中所述那些之外的任何元素、步骤或者材料，并且在材料的情况下，术语“由...组成”不包括与指定材料相关的普通杂质。术语“基本上由.....组成”将权利要求的范围限制为指定的元素、步骤或者材料以及不会实质上影响所要求保护的发明的基本和新颖特征的那些。在替代实施方式中，本文所述的体现本发明的所有组合物、方法和试剂盒可以更具体地由任意过渡术语“包含”、“基本上由.....组成”和“由.....组成”定义。

[0521] III.TIL生产过程-过程2A(Gen 2过程)

[0522] 在一些实施方式中，本发明提供了任一GEN 2过程(例如过程2A过程)的方法，其被修改为使用小活检物、核心活检物或细针抽吸物作为T细胞的来源，以在任何此种GEN 2过程的第一次扩增中进行扩增；其中，(1)延长第一次扩增的持续时间，以在此种GEN 2过程的第二次扩增之后收获的TIL群中达到所需的TIL细胞计数，或者(2)延长此种GEN 2过程的第二次扩增的持续时间，以在第二次扩增之后收获的TIL群中达到所需的TIL细胞计数，或者(3)延长第一次扩增的持续时间和此种GEN 2过程的第二次扩增的持续时间，以在第二次扩增之后收获的TIL群中达到所需的TIL细胞计数。

[0523] 在一些实施方式中，本发明提供了通过任一GEN 2过程(例如过程2A过程)的方法制备的TIL群，其被修改为使用小活检物、核心活检物或细针抽吸物作为T细胞来源，以在任何此种GEN 2过程的第一次扩增中进行扩增；其中，(1)延长第一次扩增的持续时间，以在此种GEN 2过程的第二次扩增之后收获的TIL群中达到所需的TIL细胞计数，或者(2)延长此种GEN 2过程的第二次扩增的持续时间，以在第二次扩增之后收获的TIL群中达到所需的TIL细胞计数，或者(3)延长第一次扩增的持续时间和此种GEN 2过程的第二次扩增的持续时间，以在第二次扩增之后收获的TIL群中达到所需的TIL细胞计数。

[0524] 图7描述了称为过程2A的示例性TIL过程和包含这些特征其中一些的小活检过程，图5和图6中描述了本发明的此实施方式相对于过程1C的一些优点。图1显示了过程2A的实施方式。此外，图7中提供了关于示例性核心活检过程的概述以及与过程2A的比较。如下文和整个本申请中所述，过程2A(Gen 2)、使用来自过程2A的TIL的治疗方法以及由过程2A制备的TIL的组合物可与小活检/核心活检结合使用，并视需要调整扩增阶段的持续时间以实

现必要的细胞计数。

[0525] 如本文所述,本发明可包括与冷冻保存的TIL的再刺激有关的步骤,以在移植入患者之前增加其代谢活性并因此增加相对健康,以及测试所述代谢健康的方法。如本文一般概述的,TIL通常取自患者样品并在移植入患者之前进行操作以扩增其数量。在一些实施方式中,可选地,TIL可以进行如下所述的遗传操作。

[0526] 在一些实施方式中,可以冷冻保存TIL。一旦解冻,在输注给患者之前,也可对它们进行再刺激以增加它们的代谢。

[0527] 在一些实施方式中,如下文详述以及实施例和附图中所述,第一次扩增(包括称为pre-REP的过程以及图7中步骤A所示的过程)为1至19天,而第二次扩增(包括称为REP的过程以及图7中步骤B所示的过程)缩短为11至14天,如下文以及实施例和附图中详细讨论的。在一些实施方式中,第一次扩增(例如图7中描述为步骤B的扩增)分为1至2天和3至19天两个阶段,或者在某些情况下分为1至2天和3至10天两个阶段;如实例中所述以及图4、5和7所示,第二次扩增(例如图7中步骤D所述的扩增)为11至14天。在一些实施方式中,如下文以及实施例和附图中详细讨论的,第一次扩增和第二次扩增的组合(例如图7中描述为步骤B和步骤D的扩增)缩短为22天。

[0528] 以下标记A、B、C等的“步骤”参考图7。下述的和图7中步骤的顺序是示例性的,本申请和本文公开的方法预期步骤的任何组合或顺序,以及附加步骤、步骤的重复和/或步骤的省略。

[0529] A.步骤A:获取患者肿瘤样品

[0530] 通常,TIL最初通过核心活检或类似程序由患者肿瘤样品获得(“原代TIL”),然后如本文所述地扩增为更大的群用于进一步操作,可选地冷冻保存,并可选地评估表型和代谢参数。

[0531] 可使用本领域已知的方法获得患者肿瘤样品,通常通过小活检、核心活检、针吸活检或用于获得含有肿瘤和TIL细胞混合物的样品的其他手段。通常,肿瘤样品可以来自任何实体瘤,包括原发性肿瘤、侵袭性肿瘤或转移性肿瘤。肿瘤样品也可为液体肿瘤,例如从血液恶性肿瘤获得的肿瘤。在一些实施方式中,样品可来自多个小肿瘤样品或活检样品。在一些实施方式中,样品可包含来自同一患者的单个肿瘤的多个肿瘤样品。在一些实施方式中,样品可包含来自同一患者的一个、两个、三个或四个肿瘤的多个肿瘤样品。在一些实施方式中,样品可包含来自同一患者的多个肿瘤的多个肿瘤样品。实体瘤可为任何癌症类型,包括但不限于乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、肺癌、脑癌、肾癌、胃癌和皮肤癌(包括但不限于鳞状细胞癌、基底细胞癌和黑色素瘤)。在一些实施方式中,癌症选自:宫颈癌、头颈癌(包括例如头颈鳞状细胞癌(HNSCC))、胶质母细胞瘤(GBM)、胃肠道癌、卵巢癌、肉瘤、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌和非小细胞肺癌(NSCLC)。在一些实施方式中,有用的TIL获自恶性黑色素瘤肿瘤,因为据报道其具有特别高水平的TIL。

[0532] 通常,将由肿瘤核心物或碎片获得的细胞悬液称为“原代细胞群”或“新鲜获得”或“新鲜分离”的细胞群。在某些实施方式中,将新鲜获得的TIL细胞群暴露于包含抗原呈递细胞IL-2和OKT-3的细胞培养基。

[0533] 在一些实施方式中,如果肿瘤是转移性的,且原发性病变在过去已被有效治疗/去除,则可能需要取出转移性病变之一。在一些实施方式中,微创方法(least invasive

approach)用于取出皮肤病变或颈部或腋窝区域上的淋巴结(如果可以)。在一些实施方式中,取出皮肤病变或取出其小活检物。在一些实施方式中,取出淋巴结或其小活检物。在一些实施方式中,可以采用肺或肝转移病灶或其腹内或胸腔淋巴结或其小活检物。

[0534] 在一些实施方式中,肿瘤是黑色素瘤。在一些实施方式中,黑色素瘤的小活检包括痣或痣的一部分。

[0535] 在一些实施方式中,小活检是钻取活检。在一些实施方式中,用圆形刀片压入皮肤中获得钻取活检。在一些实施方式中,用圆形刀片压入周围有可疑的痣的皮肤中获得钻取活检。在一些实施方式中,用圆形刀片压入皮肤中来获得钻取活检,取下圆形皮肤。在一些实施方式中,小活检是钻取活检且取下肿瘤的圆形部分。

[0536] 在一些实施方式中,小活检是切除活检(excisional biopsy)。在一些实施方式中,小活检是切除活检,且取下整个痣或生长物。在一些实施方式中,小活检是切除活检,且取下整个痣或生长物以及正常出现的皮肤的小边界。

[0537] 在一些实施方式中,小活检是切口活检(incisional biopsy)。在一些实施方式中,小活检是切口活检,且仅取下痣或生长物的最不规则部分。在一些实施方式中,小活检是切口活检,当无法采取其他技术(例如可疑痣非常大)时,使用切口活检。

[0538] 在一些实施方式中,小活检是肺活检。在一些实施方式中,小活检通过支气管镜检查获得。通常,在支气管镜检查中,使患者处于麻醉状态,用一个小工具穿过鼻子或嘴巴从咽喉向下进入支气管通道,使用小工具在支气管通道取出一些组织。在一些实施方式中,在不能通过支气管镜检查达到肿瘤或生长物的情况下,可采用经皮肺穿刺活检(transthoracic needle biopsy)。通常,对于经皮肺穿刺活检,也使患者处于麻醉状态,将针头通过皮肤直接插入可疑部位,以取下少量组织样品。在一些实施方式中,经皮肺穿刺活检可能需要介入放射学(例如使用X射线或CT扫描来引导针)。在一些实施方式中,小活检通过针头活检获得。在一些实施方式中,小活检通过内窥镜超声获得(例如具有光的内窥镜且通过口腔置入食道)。在一些实施方式中,通过手术获得小活检物。

[0539] 在一些实施方式中,小活检是头颈活检。在一些实施方式中,小活检是切口活检。在一些实施方式中,小活检是切口活检,其中从看起来异常的区域切下一小块组织。在一些实施方式中,如果容易接近异常区域,则可在不住院的情况下获取样品。在一些实施方式中,如果肿瘤在口腔或咽喉内部更深处,则活检可能需要在手术室中全身麻醉下进行。在一些实施方式中,小活检是切除活检。在一些实施方式中,小活检是切除活检,其中切除整个区域。在一些实施方式中,小活检是细针抽吸(FNA)。在一些实施方式中,小活检是细针抽吸(FNA),其中,使用连接至注射器的非常细的针从肿瘤或肿块中提取(抽吸)细胞。在一些实施方式中,小活检是钻取活检。在一些实施方式中,小活检是钻取活检,其中使用咬取钳取下一块可疑区域。

[0540] 在一些实施方式中,小活检是宫颈活检。在一些实施方式中,小活检通过阴道镜进行。通常,阴道镜方法使用连接到放大镜的照明放大工具(阴道镜),然后将其用于活检子宫颈表面的一小部分。在一些实施方式中,小活检是锥切/圆锥活检(conization/cone biopsy)。在一些实施方式中,小活检是锥切/圆锥活检,其中,可能需要门诊手术以从子宫颈取下较大的组织。在一些实施方式中,除了有助于确认诊断之外,锥形活检还可用作初始治疗。

[0541] 术语“实体瘤”指通常不包含囊肿或者液体区域的异常组织块。实体瘤可为良性或者恶性的。术语“实体瘤癌”指恶性、肿瘤性或者癌性实体瘤。实体瘤癌症包括但不限于肉瘤、恶性上皮肿瘤(carcinoma)和淋巴瘤,例如肺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、直肠癌和膀胱癌。在一些实施方式中,癌症选自宫颈癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、卵巢癌、肉瘤、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌和非小细胞肺癌。实体瘤的组织结构包括相互依赖的组织隔室,包括实质(癌细胞)和支持的基质细胞(癌细胞分散在其中并且可以提供支持的微环境)。

[0542] 在一些实施方式中,以细针抽吸物(FNA)、核心活检物、小活检物(包括例如钻取活检物)的形式获得来自肿瘤的样品。在一些实施方式中,将样品首先放入G-Rex10。在一些实施方式中,当存在1或2个核心活检和/或小活检样品时,将样品首先放入G-Rex 10。在一些实施方式中,当存在3、4、5、6、8、9或10个或更多个核心活检和/或小活检样品时,将样品首先放入G-Rex 100。在一些实施方式中,当存在3、4、5、6、8、9或10个或更多个核心活检和/或小活检样品时,将样品首先放入G-Rex 500。

[0543] FNA可获自选自以下的肿瘤:肺、黑色素瘤、头颈、宫颈、卵巢、胰腺、胶质母细胞瘤、结直肠和肉瘤。在一些实施方式中,FNA获自肺肿瘤,例如获自非小细胞肺癌(NSCLC)患者的肺肿瘤。在某些情况下,NSCLC患者以前曾接受过外科手术治疗。

[0544] 本文所述TIL可获自FNA样品。在某些情况下,可使用18号针至25号针的细针从患者获取或分离FNA样品。细针可为18号、19号、20号、21号、22号、23号、24号或25号。在一些实施方式中,来自患者的FNA样品可包含至少400,000个TIL,例如400,000个TIL、450,000个TIL、500,000个TIL、550,000个TIL、600,000个TIL、650,000个TIL、700,000个TIL、750,000个TIL、800,000个TIL、850,000个TIL、900,000个TIL,950,000个TIL或更多个TIL。

[0545] 在一些情况下,本文所述的TIL获自核心活检样品。在某些情况下,可使用11号针头至16号针头的手术或医用针头从患者获得或分离出核心活检样品。针可为11号、12号、13号、14号、15号或16号。在一些实施方式中,来自患者的核心活检样品可包含至少400,000个TIL,例如400,000个TIL、450,000个TIL、500,000个TIL、550,000个TIL、600,000个TIL、650,000个TIL、700,000个TIL、750,000个TIL、800,000个TIL、850,000个TIL、900,000个TIL,950,000个TIL或更多个TIL。

[0546] 通常,收获的细胞悬液称为“原代细胞群”或者“新鲜收获的”细胞群。

[0547] 在一些实施方式中,TIL并非获自肿瘤消化物。在一些实施方式中,不对实体瘤核心物进行碎片化。

[0548] 在一些实施方式中,TIL获自肿瘤消化物。在一些实施方式中,通过在酶培养基(例如但不限于RPMI 1640、2mm GlutaMAX、10mg/mL庆大霉素、30U/mL DNase和1.0mg/mL胶原酶)中孵育,然后机械解离(GentleMACS,MiltenyiBiotec,Aubum,加利福尼亚州),来产生肿瘤消化物。将肿瘤置于酶培养基中后,可以机械解离肿瘤约1分钟。然后将溶液在37℃、5%CO_2中孵育30分钟,然后再次机械破碎约1分钟。在37℃、5%CO_2中再次孵育30分钟后,可以第三次机械破碎肿瘤约1分钟。在一些实施方式中,在第三次机械破碎后,如果存在大块组织,则对样品施加1或者2次另外的机械解离,进行或不进行在37℃、5%CO_2下的另外的30分钟孵育。在一些实施方式中,在最终孵育结束时,如果细胞悬液含有大量红细胞或者死细胞,则可使用Ficoll进行密度梯度分离以除去这些细胞。

[0549] 在一些实施方式中,在第一次扩增步骤之前收获的细胞悬液称为“原代细胞群”或者“新鲜收获的”细胞群。

[0550] 在一些实施方式中,可选地,可在收获样品后将细胞冷冻,并在进入步骤B所述扩增之前冷冻保存,这将在下文进一步详细描述,并在图7中进行示例性说明。

[0551] B.步骤B:第一次扩增

[0552] 在一些实施方式中,本发明方法提供获得年轻TIL,相对于较老TIL(即,在施用给受试者/患者之前进一步经历了更多轮复制的TIL),年轻TIL能够在施用给受试者/患者后增加复制周期,因此可以提供额外治疗益处。文献中已经描述了年轻TIL的特征,例如Donia等,Scandinavian Journalof Immunology,75:157-167(2012);Dudley等,Clin Cancer Res,16:6122-6131(2010);Huang等,J Immunother,28(3):258-267(2005);Besser等,Clin Cancer Res,19(17):OF1-OF9(2013);Besser等,J Immunother,32:415-423(2009);Bunds等,J Immunother,32:415-423(2009);Robbins等,J Immunol,2004;173:7125-7130;Shen等,J Immunother,30:123-129(2007);Zhou等,J Immunother,28:53-62(2005)和Tran等,J Immunother,31:742-751(2008),其全部内容通过引用整体并入本文。

[0553] T和B淋巴细胞的多种抗原受体通过有限但大量的基因片段的体细胞重组来产生。这些基因片段:V(可变段)、D(多样段)、J(连接段)和C(恒定段)确定免疫球蛋白和T细胞受体(TCR)的结合特异性和下游应用。本发明提供了产生TIL的方法,其显示并增加T细胞库(T-cell repertoire)的多样性。在一些实施方式中,通过本方法获得的TIL显示出T细胞库多样性的增加。在一些实施方式中,与新鲜收获的TIL和/或使用除本文提供的方法之外的其他方法(例如包括除了图1中所示那些之外的方法)制备的TIL相比,通过本发明方法获得的TIL显示出T细胞库多样性的增加。在一些实施方式中,与新鲜收获的TIL和/或使用如图3和/或图4所示的称为过程1C的方法制备的TIL相比,通过本方法获得的TIL显示出T细胞库多样性的增加。在一些实施方式中,第一次扩增获得的TIL显示出T细胞库多样性的增加。在一些实施方式中,多样性的增加是免疫球蛋白多样性和/或T细胞受体多样性的增加。在一些实施方式中,免疫球蛋白多样性是免疫球蛋白重链多样性。在一些实施方式中,免疫球蛋白多样性是免疫球蛋白轻链多样性。在一些实施方式中,多样性是T细胞受体多样性。在一些实施方式中,多样性是选自α、β、γ和δ受体之一的T细胞受体的多样性。在一些实施方式中,T细胞受体(TCR)α和/或β的表达增加。在一些实施方式中,T细胞受体(TCR)α的表达增加。在一些实施方式中,T细胞受体(TCR)β的表达增加。在一些实施方式中,TCRab(即TCRα/β)的表达增加。

[0554] 例如,如图7的步骤A中所述,在获得小活检、核心活检或细针抽吸的肿瘤碎片(可以称为“核心物”或“碎片”)后,在与肿瘤和其他细胞相比更有利于TIL生长的条件下,在含有IL-2的血清中培养所得细胞。在一些实施方式中,在2mL孔中的包含灭活的人AB血清和6000IU/mL IL-2的培养基中孵育肿瘤消化物。培养此原代细胞群一段时间,通常为3至14天,产生大量TIL群,通常为约1×10^8个大量TIL细胞。在一些实施方式中,培养此原代细胞群7至14天,产生大量TIL群,通常约1×10^8个大量TIL细胞。在一些实施方式中,培养此原代细胞群1至19天,产生大量TIL群,通常约1×10^8个大量TIL细胞。在一些实施方式中,培养此原代细胞群约3至19天,产生大量TIL群,通常约1×10^8个大量TIL细胞。在一些实施方式中,在第一次扩增的第1至2天期间包括IL-2,在第一次扩增的第3天添加OKT3和饲养细胞。在一

些实施方式中,第3天至19天包括OKT3和饲养细胞。在一些实施方式中,第3天至18天包括OKT3和饲养细胞。在一些实施方式中,第3天至17天包括OKT3和饲养细胞。在一些实施方式中,第3天至16天包括OKT3和饲养细胞。在一些实施方式中,第3天至15天包括OKT3和饲养细胞。在一些实施方式中,第3天至14天包括OKT3和饲养细胞。在一些实施方式中,第3天至13天包括OKT3和饲养细胞。在一些实施方式中,第3天至12天包括OKT3和饲养细胞。在一些实施方式中,第3天至11天包括OKT3和饲养细胞。在一些实施方式中,第3天至10天包括OKT3和饲养细胞。在一些实施方式中,第3天至9天包括OKT3和饲养细胞。在一个优选的实施方式中,TIL的扩增可以如下进行:使用如下文和此处所述的初始大量TIL扩增步骤(例如,如图7的步骤B中所述的那些,其可包括称为pre-REP的过程),然后进行如下文步骤D和此处所述的第二次扩增(步骤D,包括称为快速扩增方案(REP)步骤的过程),随后可选地进行冷冻保存,然后进行如下文和此处所述的第二次步骤D(包括称为再刺激REP步骤的过程)。可选地,可对从该过程获得的TIL进行如本文所述的表型特征和代谢参数的表征。

[0555] 在用24孔板开始TIL培养的实施方式中,例如,使用Costar 24孔细胞培养板、平底(康宁公司,康宁,纽约),可在每个孔接种在2mL含IL-2的完全培养基(CM)(6000IU/mL;Chiron Corp.,Emeryville,CA)中的1×10^6个小活检、核心活检或细针抽吸的肿瘤细胞或者一个小活检、核心活检或细针抽吸的肿瘤碎片。

[0556] 在一些实施方式中,第一次扩增培养基被称为“CM”,其中,CM是培养基的缩写。在一些实施方式中,步骤B的CM由含有GlutaMAX的RPMI 1640组成,补充有10%人AB血清、25mM HEPES和10mg/mL庆大霉素。在用容量为40mL、透气性硅底为10cm^2的透气性烧瓶(例如,G-Rex10;Wilson Wolf Manufacturing,新布莱顿,MN)开始培养的实施方式中(图1),各个烧瓶装有在10至40mL含有IL-2的CM中的10×10^6至40×10^6个活小活检、核心活检或细针抽吸的肿瘤活细胞或5至30个小活检、核心活检或细针抽吸的肿瘤碎片。在37℃、5%CO_2的湿润培养箱中孵育G-Rex10和24孔板,培养开始5天后,移除一半培养基,换上新鲜的CM和IL-2,在第5天后,每2至3天更换一半的培养基。

[0557] 在收获小活检、核心活检或细针抽吸的肿瘤碎片之后,在与肿瘤和其他细胞相比更有利于TIL生长的条件下,在含有IL-2的血清中培养所得细胞(即碎片)。在一些实施方式中,肿瘤碎片在含有灭活的人AB血清(或在一些情况下,如本文所述,在aAPC细胞群存在下)和6000IU/mL IL-2的培养基的2mL孔中孵育。将该原代细胞群培养一段时间,通常为10至14天,产生大量TIL群,通常约1×10^8个大量TIL细胞。在一些实施方式中,第一次扩增期间的生长培养基包含IL-2或其变体。在一些实施方式中,IL是重组人IL-2(rhIL-2)。在一些实施方式中,1mg小瓶的IL-2储备溶液具有20×10^6IU/mg至30×10^6IU/mg的比活性。在一些实施方式中,1mg小瓶的IL-2储备溶液具有20×10^6IU/mg至30×10^6IU/mg的比活性。在一些实施方式中,1mg小瓶的IL-2储备溶液具有25×10^6IU/mg的比活性。在一些实施方式中,1mg小瓶的IL-2储备溶液具有30×10^6IU/mg的比活性。在一些实施方式中,IL-2储备溶液的终浓度为4×10^6IU/mg至8×10^6IU/mg IL-2。在一些实施方式中,IL-2储备溶液的终浓度为5×10^6IU/mg至7×10^6IU/mg IL-2。在一些实施方式中,IL-2储备溶液的终浓度为6×10^6IU/mg IL-2。在一些实施方式中,如实施例4中所述制备IL-2储备溶液。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约10,000IU/mL IL-2,约9,000IU/mL IL-2、约8,000IU/mL IL-2、约7,000IU/mL IL-2、约6000IU/mL IL-2或约5,000IU/mL IL-2。在一些实施方式中,第一次扩增

培养基包含约9,000IU/mL至约5,000IU/mL IL-2。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约8,000IU/mL至约6,000IU/mL IL-2。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约7,000IU/mL至约6,000IU/mL IL-2。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约6,000IU/mL IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基还包含IL-2。在一些实施方式中,细胞培养基包含约3000IU/mL IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基还包含IL-2。在一个优选的实施方式中,细胞培养基包含约3000IU/mL IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基包含约1000IU/mL、约1500IU/mL、约2000IU/mL、约2500IU/mL、约3000IU/mL、约3500IU/mL、约4000IU/mL、约4500IU/mL、约5000IU/mL、约5500IU/mL、约6000IU/mL、约6500IU/mL、约7000IU/mL、约7500IU/mL或约8000IU/mL IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基包含1000至2000IU/mL、2000至3000IU/mL、3000至4000IU/mL、4000至5000IU/mL、5000至6000IU/mL、6000至7000IU/mL、7000至8000IU/mL或约8000IU/mL IL-2。

[0558] 在一些实施方式中,通过向第二TIL群的细胞培养基进一步补充OKT-3、IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行第一次扩增。例如,向第二TIL群的细胞培养基中补充:OKT3、IL-15、OX40激动性抗体、4-1BB激动性抗体、OKT3和IL-15的组合、OKT3和OX40激动性抗体的组合、OKT3和4-1BB激动性抗体的组合、IL-15和OX40激动性抗体的组合、IL-15和4-1BB激动性抗体的组合、OX40激动性抗体和4-1BB激动性抗体的组合、OKT3、IL-15和OX40激动性抗体的组合、OKT3、IL-15和4-1BB激动性抗体的组合、OKT3,OX40激动性抗体的组合以及4-1BB激动性抗体、IL-15、OX40激动性抗体和4-1BB激动性抗体的组合、OKT3、IL-15、OX40激动性抗体和4-1BB激动性抗体的组合,以及它们的任何组合。在一些实施方式中,不包括IL-15。

[0559] 例如如图7A的步骤A中所述,在获得小活检、核心活检或细针抽吸的肿瘤碎片之后,在与肿瘤和其他细胞相比更有利于TIL生长的条件下,在含有IL-2的血清中培养所得细胞。在一些实施方式中,在含有灭活人AB血清和6000IU/mL IL-2的培养基的2mL孔中孵育肿瘤碎片。培养该原代细胞群数天,通常为1至19天,到至少第11天至第19天产生至少5×10^7(即5,000万)个TIL细胞的TIL群。在一些实施方式中,培养该原代细胞群1至18天,到至少第18天产生至少5×10^7(即5,000万)个TIL细胞的大量TIL群。在一些实施方式中,培养该原代细胞群1至17天,到至少第17天产生至少5×10^7(即5,000万)个TIL细胞的大量TIL群。在一些实施方式中,培养该原代细胞群1至16天,到至少第16天产生至少5×10^7(即5,000万)个TIL细胞的大量TIL群。在一些实施方式中,培养该原代细胞群1至15天,到至少第15天产生至少5×10^7(即5000万)个TIL细胞的大量TIL群。在一些实施方式中,培养该原代细胞群1至14天,到至少第14天产生至少5×10^7(即5000万)个TIL细胞的大量TIL群。在一些实施方式中,培养该原代细胞群1至13天,到至少第13天产生至少5×10^7(即5000万)个TIL细胞的大量TIL群。培养该原代细胞群1至12天,到至少第12天产生至少5×10^7(即5000万)个TIL细胞的大量TIL群。在一些实施方式中,培养该原代细胞群1至11天,到至少第11天产生至少5×10^7(即5,000万)个TIL细胞的大量TIL群。到第一次扩增步骤(例如,图7的步骤B中所述的步骤,其可包括称作pre-REP的过程)结束,TIL群为至少约5×10^7(即5,000万)个TIL细胞。

[0560] 在一个优选实施方式中,可使用如下文和此处所述的初始大量TIL扩增步骤(例如图7的步骤B所述的步骤,其可包括称为pre-REP的过程)来进行TIL扩增,然后进行如下文步骤D和此处所述的第二次扩增(步骤D,包括称为快速扩增方案(REP)步骤的过程),然后进行

可选的冷冻保存,然后进行如下文和此处所述的第二次步骤D(包括称为再刺激REP步骤的过程)。如本文所述,可选地,可以表征由此过程获得的TIL的表型特征和代谢参数。

[0561] 在一些实施方式中,第一次扩增培养基被称为"CM(培养基的缩写)"。在一些实施方式中,用于步骤B的CM由RPMI 1640和GlutaMAX组成,补充有10%人AB血清、25mM Hepes和10mg/mL庆大霉素。在具有40mL容量和10cm^2透气性硅底的透气性烧瓶(例如,G-Rex10;Wilson Wolf Manufacturing,New Brighton,MN)中开始培养的实施方式中,每个烧瓶中装有1至2个活检核心物(在加有IL-2的10-40mL CM中)。G-Rex10和24孔板均在37℃、5%CO_2的湿润培养箱中孵育,在培养开始后5天,除去一半培养基并用新鲜的CM和IL-2代替,第2天后,每2至3天更换一半的培养基。在一些实施方式中,当核心活检物来自卵巢肿瘤(例如卵巢来源)时,在CM和IL-2中孵育核心物1至2天。在一些实施方式中,当核心活检物来自胰腺肿瘤细胞(例如胰腺来源)时,在CM和IL-2/IL-15/IL-21中孵育核心物1至2天。在一些实施方式中,在第3天,将OKT3和饲养细胞添加至核心物。在一些实施方式中,在第3天,将30ng OKT3和10^6个饲养细胞添加至核心物。

[0562] 在与肿瘤和其他细胞相比更有利于TIL生长的条件下,在含有IL-2的血清中培养小活检碎片或核心物。在一些实施方式中,将小活检碎片或核心物在含有灭活的人AB血清(或在某些情况下,如本文所述,在aAPC细胞群存在下)和6000IU/mL IL-的培养基的2mL孔中孵育。培养该原代细胞群数天,通常为1至19天,在第11天产生至少约5×10^7个TIL细胞的大量TIL群,在一些实施方式中,在第19至28天产生1×10^8个TIL。在一些实施方式中,第一次扩增期间的生长培养基包含IL-2或其变体。在一些实施方式中,IL是重组人IL-2(rhIL-2)。在一些实施方式中,1mg小瓶的IL-2储备溶液具有20-30$\times10^6$IU/mg的比活性。在一些实施方式中,1mg小瓶的IL-2储备溶液具有20$\times10^6$IU/mg的比活性。在一些实施方式中,1mg小瓶的IL-2储备溶液具有25$\times10^6$IU/mg的比活性。在一些实施方式中,1mg小瓶的IL-2储备溶液具有30$\times10^6$IU/mg的比活性。在一些实施方式中,IL-2储备溶液的终浓度为4-8$\times10^6$IU/mg IL-2。在一些实施方式中,IL-2储备溶液的终浓度为5-7$\times10^6$IU/mg IL-2。在一些实施方式中,IL-2储备溶液的终浓度为6$\times10^6$IU/mg IL-2。在一些实施方式中,如实施例E中所述制备IL-2储备溶液。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约10,000IU/mL IL-2,约9,000IU/mL IL-2,约8,000I U/mL的IL-2,约7,000IU/mL IL-2,约6000IU/mL IL-2或约5,000IU/mL IL-2。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约9,000IU/mL IL-2至约5,000IU/mL IL-2。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约8,000IU/mL IL-2至约6,000IU/mL IL-2。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约7,000IU/mL IL-2至约6,000IU/mL IL-2。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约6,000IU/mL IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基还包含IL-2。在一些实施方式中,细胞培养基包含约3000IU/mL IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基还包含IL-2。在一个优选的实施方式中,细胞培养基包含约3000IU/mL IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基包含约1000IU/mL、约1500IU/mL、约2000IU/mL、约2500IU/mL、约3000IU/mL、约3500IU/mL、约4000IU/mL、约4500IU/mL、约5000IU/mL、约5500IU/mL、约6000IU/mL、约6500IU/mL、约7000IU/mL、约7500IU/mL或者约8000IU/mL IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基包含1000至2000IU/mL、2000至3000IU/mL、3000至4000IU/mL、4000至5000IU/mL、5000至6000IU/mL、6000至7000IU/mL、7000至8000IU/mL或者约8000IU/mL IL-2。

[0563] 在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约500IU/mL IL-15、约400IU/mL IL-15、约300IU/mL IL-15、约200IU/mL IL-15、约300IU/mL IL-15、180IU/mL IL-15、约160IU/mL IL-15、约140IU/mL IL-15、约120IU/mL IL-15或者约100IU/mL IL-15。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约500IU/mL IL-15至约100IU/mL IL-15。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约400IU/mL IL-15至约100IU/mL IL-15。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约300IU/mL IL-15至约100IU/mL IL-15。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约200IU/mL IL-15。在一些实施方式中,细胞培养基包含约180IU/mL IL-15。在一个实施方式中,细胞培养基还包含IL-15。在一个优选的实施方式中,细胞培养基包含约180IU/mL IL-15。在一些实施方式中,当核心物来自胰腺肿瘤(例如胰腺来源)时,包括IL-15。

[0564] 在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约20IU/mL IL-21、约15IU/mL IL-21、约12IU/mL IL-21、约10IU/mL IL-21、约5IU/mL IL-21、约4IU/mL IL-21、约3IU/mL IL-21、约2IU/mL IL-21、约1IU/mL IL-21或者约0.5IU/mL IL-21。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约20IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约15IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约12IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约10IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约5IU/mL IL-21至约1IU/mL IL-21。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约2IU/mL IL-21。在一些实施方式中,细胞培养基包含约1IU/mL IL-21。在一些实施方式中,细胞培养基包含约0.5IU/mL IL-21。在一个实施方式中,细胞培养基还包含IL-21。在一个优选的实施方式中,细胞培养基包含约1IU/mL IL-21。在一些实施方式中,当核心物来自胰腺肿瘤(例如胰腺来源)时,包括IL-21。

[0565] 在一个实施方式中,细胞培养基包含OKT-3抗体。在一个优选的实施方式中,细胞培养基包含约30ng/mL的OKT3抗体。在一个实施方式中,细胞培养基包含约0.1ng/mL、约0.5ng/mL、约1ng/mL、约2.5ng/mL、约5ng/mL、约7.5ng/mL、约10ng/mL、约15ng/mL、约20ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200ng/mL、约500ng/mL和约1μg/mL的OKT3抗体。在一个实施方式中,细胞培养基包含0.1ng/mL至1ng/mL、1ng/mL至5ng/mL、5ng/mL至10ng/mL、10ng/mL至20ng/mL,20ng/mL至30ng/mL、30ng/mL至40ng/mL、40ng/mL至50ng/mL、50ng/mL至100ng/mL的OKT3抗体。在一些实施方式中,细胞培养基不包含OKT-3抗体。在一些实施方式中,OKT-3抗体是莫罗单抗。

[0566] 表3:莫罗单抗的氨基酸序列(示例性OKT-3抗体)

[0567]

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

[0568] 在一些实施方式中,细胞培养基包含一种以上TNFRSF激动剂。在一些实施方式中,TNFRSF激动剂包括4-1BB激动剂。在一些实施方式中,TNFRSF激动剂是4-1BB激动剂,4-1BB激动剂选自由乌瑞鲁单抗、乌托鲁单抗、EU-101、融合蛋白以及它们的片段、衍生物、变体、生物类似物和组合。在一些实施方式中,以足以在细胞培养基中达到0.1μg/mL至100μg/mL的浓度添加TNFRSF激动剂。在一些实施方式中,以足以在细胞培养基中达到20μg/mL至40μg/mL的浓度添加TNFRSF激动剂。

[0569] 在一些实施方式中,除一种以上TNFRSF激动剂之外,细胞培养基还包含初始浓度为约3000IU/mL的IL-2和初始浓度为约30ng/mL的OKT-3抗体,其中,一种以上TNFRSF激动剂包括4-1BB激动剂。

[0570] 在一些实施方式中,第一次扩增培养基被称为“CM(培养基的缩写)”。在一些实施方式中,其被称为CM1(培养基1)。在一些实施方式中,CM由RPMI 1640和GlutaMAX组成,补充有10％人AB血清、25mM Hepes和10mg/mL庆大霉素。在一些实施方式中,在具有40mL容量和10cm^{2}的可透气硅底的可透气烧瓶(例如,G-Rex10;Wilson Wolf Manufacturing,New Brighton,MN)中开始培养。在一些实施方式中,CM是实施例中所述的CM1,参见实施例1。在一些实施方式中,第一次扩增发生在初始细胞培养基或第一细胞培养基中。在一些实施方式中,初始细胞培养基或第一细胞培养基包含IL-2。

[0571] 在一些实施方式中,如实施例和附图中所述,第一次扩增(包括例如图7的步骤B中所述的那些过程,其可包括有时称为pre-REP的那些过程)过程为约1至19天,一个足以获得5×10^7(即5,000万)个TIL的时间段。在一些实施方式中,如图7和38所示,第一次扩增(包括例如图7的步骤B中所述的那些过程,其可包括有时被称为pre-REP的那些过程)分为两个阶段,即1至2天和3至19天。在一些实施方式中,如图7和38所示,步骤B的第一次扩增分为两个阶段:1至2天(用IL-2或IL2/IL-15/IL-21培养)和3至19天(用OKT3和饲养细胞培养)。

[0572] 在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、14天、14天、14天、14天、14天,以获得至少5×10^7(即5,000万)个TIL。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行1天至19天,以获得至少5×10^7(即5000万)个TIL。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行2天至19天,以获得至少5×10^7(即5000万)个TIL。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行3天至19天,以获得至少5×

10^7(即5000万)个TIL。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行6天至19天,以获得至少5×10^7(即5000万)个TIL。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行7天至19天,以获得至少5×10^7(即5000万)个TIL。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行8天至19天,以获得至少5×10^7(即5000万)个TIL。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行9天至19天,以获得至少5×10^7(即5000万)个TIL。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行10天至19天,以获得至少5×10^7(即5000万)个TIL。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行11天至19天,以获得至少5×10^7(即5000万)个TIL。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行12天至19天,以获得至少5×10^7(即5000万)个TIL。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行13天至19天,以获得至少5×10^7(即5000万)个TIL。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行16天,以获得至少5×10^7(即5000万)个TIL。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行17天,以获得至少5×10^7(即5000万)个TIL。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行18天,以获得至少5×10^7(即5000万)个TIL。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行19天,以获得至少5×10^7(即5000万)个TIL。在一些实施方式中,在约第1、2或3天从培养物中取出小活检物(例如核心活检物)。在一些实施方式中,在第3天从培养物中取出小活检物(例如核心活检物)。

[0573] 在一些实施方式中,在第一次扩增期间,采用IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21的组合作为组合。在一些实施方式中,在第一次扩增期间,包括例如在根据图7的步骤B期间以及如此处所述,可包括IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21以及它们的任何组合。在一些实施方式中,在第一次扩增期间,采用IL-2、IL-15和IL-21的组合作为组合。在一些实施方式中,在根据图7的步骤B期间以及如此处所述,可包括IL-2、IL-15和IL-21以及它们的任何组合。在一些实施方式中,在第1天添加IL-15和/或IL-21。在一些实施方式中,如果核心活检物来自胰腺肿瘤(例如胰腺来源),在第1天添加IL-15和/或IL-21。在一些实施方式中,不包含IL-15。在一些实施方式中,不包含IL-21。在一些实施方式中,不包含IL-15和IL-21。

[0574] 在一些实施方式中,第一次扩增(例如根据图7的步骤B)在封闭系统生物反应器中进行。在一些实施方式中,如此处所述,采用封闭系统进行TIL扩增。在一些实施方式中,采用单个生物反应器。在一些实施方式中,例如,采用的单个生物反应器是GREX-10或者GREX-100。在一些实施方式中,封闭系统生物反应器是单个生物反应器。

[0575] 在一些实施方式中,第一次TIL扩增产生至少50×10^6TIL,例如50×10^6(即5×10^7)、55×10^6、60×10^6、65×10^6、70×10^6、75×10^6、80×10^6、85×10^6、90×10^6、95×10^6、100×10^6、105×10^6、110×10^6、115×10^6、120×10^6、125×10^6、150×10^6、200×10^6,300×10^6、400×10^6个或更多个TIL。

[0576] C.步骤C:第一次扩增向第二次扩增过渡

[0577] 在一些情况下,可使用下文讨论的方案,立即冷冻保存从第一次扩增获得的大量TIL群,包括例如从例如图7所示的步骤B获得的TIL群。可选地,可对第一次扩增收获的TIL群(称为第二TIL群)进行第二次扩增(其可包括有时被称为REP的扩增),然后如下文所述冷冻保存。类似地,在基因修饰的TIL将被用于治疗的情况下,第一TIL群(有时被称为大量TIL群)或者第二TIL群(在一些实施方式中可包括被称为REP TIL群的群)可在扩增之前或者在第一次扩增之后且第二次扩增之前进行基因修饰,以用于合适的治疗。

[0578] 在一些实施方式中,储存从第一次扩增(例如,如图7所示的步骤B)获得的TIL直至进行表型选择。在一些实施方式中,从第一次扩增(例如,如图7所示的步骤B)获得的TIL不

储存而是直接进行第二次扩增。在一些实施方式中,在第一次扩增之后且在第二次扩增之前,不冷冻保存从第一次扩增获得的TIL。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天或19天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约3天至19天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约4天至19天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约4天至19天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约7天至19天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约10天至19天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约11天至19天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约12天至19天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约13天至19天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约14天至19天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约15天至19天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约16天至19天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约17天至19天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约18天至19天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约10天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约11天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约12天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约13天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约14天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约15天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约16天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约17天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约18天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将核心物添加到培养基中进行第一次扩增起的约19天。

[0579] 在一些实施方式中,在第一次扩增之后和第二次扩增之前不储存TIL,并且TIL直接进行第二次扩增(例如,在一些实施方式中,如图7所示,从步骤B向步骤D过渡的期间不进行储存)。在一些实施方式中,如本文所述,过渡在封闭系统中发生。在一些实施方式中,来自第一次扩增的TIL(即第二TIL群)不经历过渡期而直接进入第二次扩增。

[0580] 在一些实施方式中,在封闭系统生物反应器中进行第一次扩增向第二次扩增的过渡(例如根据图7的步骤C)。在一些实施方式中,如本文所述,采用封闭系统进行TIL扩增。在一些实施方式中,采用单个生物反应器。在一些实施方式中,例如,采用的单个生物反应器是GREX-10或者GREX-100。在一些实施方式中,封闭系统生物反应器是单个生物反应器。

[0581] D.步骤D:第二次扩增

[0582] 在一些实施方式中,在收获和初始大量处理之后,例如在步骤A和步骤B之后,TIL细胞群的数量增加,该过渡称为步骤C,如图7所示。此种进一步的扩增在本文中称为第二次扩增,其可包括本领域中通常称为快速扩增过程(REP;以及图7的步骤D所示的过程)的扩增过程。通常在透气性容器中使用包含多种组分的培养基来完成第二次扩增,所述组分包括饲养细胞、细胞因子源(cytokine source)和抗CD3抗体。

[0583] 在一些实施方式中,第二次扩增或第二次TIL扩增(其可包括有时称为REP的扩增;以及图7的步骤D中所示的过程)可使用本领域技术人员已知的任何TIL烧瓶或容器进行。在一些实施方式中,第二TIL扩增可进行10天、11天、12天、13天或者14天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可进行约10天至约14天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可进行约11天至约14天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可进行约12天至约14天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可进行约13天至约14天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可进行约14天。

[0584] 在一个实施方式中,第二次扩增可使用本公开的方法在透气性容器中进行(包括例如称为REP的扩增;以及如图7的步骤D中所示的过程)。例如,可在白细胞介素2(IL-2)或白细胞介素-15(IL-15)的存在下,使用非特异性T细胞受体刺激来快速扩增TIL。非特异性T细胞受体刺激可包括例如约30ng/mL的OKT3,一种小鼠单克隆抗CD3抗体(可从Ortho-McNeil,Raritan,NJ或Miltenyi Biotech,Auburn,CA商购)。在第二次扩增期间,可通过在体外用包括一种以上癌症抗原(包括其抗原性部分,例如表位)诱导TIL的进一步刺激来快速扩增TIL,该抗原可可选地由载体表达,例如人白细胞抗原A2(HLA-A2)结合肽,例如0.3μM MART-L26-35(27L)或gp 100:209-217(210M)。其他合适的抗原可包括例如NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶癌抗原、MAGE-A3、SSX-2和VEGFR2,或其抗原性部分。也可通过用表达HLA-A2的抗原呈递细胞脉冲的相同癌症抗原再刺激,来快速扩增TIL。或者,可以用例如经辐照的自体淋巴细胞或用经辐照的HLA-A2+同种异体淋巴细胞和IL-2进一步再刺激TIL。在一些实施方式中,再刺激作为第二次扩增的一部分发生。在一些实施方式中,在经辐照的自体淋巴细胞或者经辐照的HLA-A2+同种异体淋巴细胞和IL-2的存在下,发生第二次扩增。在一些实施方式中,第二次扩增期间添加了13×10^6个饲养细胞。在一些实施方式中,在第二次扩增开始时添加了13×10^6个饲养细胞。

[0585] 在一个实施方式中,细胞培养基还包含IL-2。在一些实施方式中,细胞培养基包含约3000IU/mL IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基包含约1000IU/mL、约1500IU/mL、约2000IU/mL、约2500IU/mL、约3000IU/mL、约3500IU/mL、约4000IU/mL、约4500IU/mL、约5000IU/mL、约5500IU/mL、约6000IU/mL、约6500IU/mL、约7000IU/mL、约7500IU/mL,或约8000IU/mL IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基包含1000至2000IU/mL、2000至3000IU/mL、3000至4000IU/mL、4000至5000IU/mL、5000至6000IU/mL、6000至7000IU/mL、7000至8000IU/mL,或8000IU/mL IL-2。

[0586] 在一个实施方式中,细胞培养基包含OKT3抗体。在一些实施方式中,细胞培养基包

含约30ng/mL的OKT3抗体。在一个实施方式中,细胞培养基包含约0.1ng/mL、约0.5ng/mL、约1ng/mL、约2.5ng/mL、约5ng/mL、约7.5ng/mL、约10ng/mL、约15ng/mL、约20ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200ng/mL、约500ng/mL和约1μg/mL的OKT3抗体。在一个实施方式中,细胞培养基包含0.1ng/mL至1ng/mL、1ng/mL至5ng/mL、5ng/mL至10ng/mL、10ng/mL至20ng/mL,20ng/mL至30ng/mL、30ng/mL至40ng/mL、40ng/mL至50ng/mL、50ng/mL至100ng/mL的OKT3抗体。

[0587] 在一些实施方式中,在第二次扩增期间采用IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21的组合作为组合。在一些实施方式中,第二次扩增期间(包括例如根据图7的步骤D过程,以及如此处所述)可包括IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21以及它们的任何组合。在一些实施方式中,在第二次扩增期间采用IL-2、IL-15和IL-21的组合作为组合。在一些实施方式中,在根据图7的步骤D过程中,以及如此处所述,可包括IL-2、IL-15和IL-21及它们的任何组合。

[0588] 在一些实施方式中,第二次扩增可在包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞的补充细胞培养基中进行。在一些实施方式中,第二次扩增发生在补充细胞培养基中。在一些实施方式中,补充细胞培养基包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞。在一些实施方式中,第二细胞培养基包含IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC;本文也称为抗原呈递饲养细胞、饲养细胞(feeder cell)或饲养细胞(feeder))。在一些实施方式中,第二次扩增在包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞(即抗原呈递细胞)的细胞培养基中发生。

[0589] 在一些实施方式中,通过向第二次扩增的TIL群的细胞培养基中进一步补充IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体(有时称为第二TIL群)来进行第二次扩增。例如,第二次扩增的TIL群的细胞培养基中补充有:IL-15、OX40激动性抗体、4-1BB激动性抗体、IL-15和OX40激动性抗体的组合、IL-15和4-1BB激动性抗体的组合、OX40激动性抗体和4-1BB激动性抗体的组合、IL-15、OX40激动性抗体和4-1BB激动性抗体的组合,以及它们的任何组合。在一些实施方式中,当核心物来自卵巢肿瘤(例如卵巢来源)时,包含OX40。在一些实施方式中,在第一次扩增和/或第二次扩增期间添加OKT-3。在一些实施方式中,在第3天添加OKT-3以及抗原呈递饲养细胞(APC)。在一些实施方式中,当样品来自FNA时,在第1天添加OKT-3以及抗原呈递饲养细胞(APC)。

[0590] 在一些实施方式中,抗原呈递饲养细胞(APC)是PBMC。在一个实施方式中,在快速扩增和/或第二次扩增中,TIL比PBMC和/或抗原呈递细胞的比率为约1:25、约1:50、约1:100、约1:125、约1:150、约1:175、约1:200、约1:225、约1:250、约1:275、约1:300、约1:325、约1:350、约1:375、约1:400,或约1:500。在一个实施方式中,在快速扩增和/或第二次扩增中,TIL比PBMC的比率在1:50至1:300之间。在一个实施方式中,在快速扩增和/或第二次扩增中,TIL比PBMC的比率在1:100至1:200之间。

[0591] 在一个实施方式中,REP和/或第二次扩增在烧瓶中进行;其中,大量TIL与100或200倍过量的灭活饲养细胞、30mg/mL的OKT3抗CD3抗体和3000IU/mL IL-2混合于150mL培养基中。进行培养基更换(通常通过吸入新鲜培养基替换2/3培养基),直至细胞转移至替代生长室。如下文更充分讨论的,替代生长室包括GREX烧瓶和透气性容器。

[0592] 在一些实施方式中,如实施例和附图中所述,第二次扩增(可包括称为REP过程的过程)为11至14天。在一些实施方式中,第二次扩增为11天。在一些实施方式中,第二次扩增

为12天。在一些实施方式中,第二次扩增为13天。在一些实施方式中,第二次扩增为14天。

[0593] 在一个实施方式中,REP和/或第二次扩增可使用如前所述的T-175烧瓶和透气袋(Tran等,J.I mmunother.,2008,31,742-51;Dudley等,J.I mmunother.,2003,26,332-42)或透气性培养皿(G-REX烧瓶)进行。在一些实施方式中,第二次扩增(包括称为快速扩增的扩增)在T-175烧瓶中进行,并且可将悬浮于150mL培养基中的约1×10^6TIL添加至每个T-175烧瓶中。TIL可在CM和AFM-V培养基的1:1混合物中培养,补充有3000IU/mL IL-2和30ng/mL的抗CD3。T-175烧瓶可在37℃、5%CO_2中孵育。在第5天,可使用含有3000IU/mL IL-2的50/50培养基更换一半培养基。在一些实施方式中,在第7天,可将来自两个T-175烧瓶的细胞合并在3L袋中,将含有5%人AB血清和3000IU/mL IL-2的300mL AIM V添加至300mL TIL悬液中。每天或每2天计数各个袋中的细胞数,并添加新鲜培养基以使细胞计数保持为0.5×10^6至2.0×10^6个细胞/mL。

[0594] 在一个实施方式中,第二次扩增(其可包括称为REP的扩增,以及图7的步骤D中提到的那些)可在容量为500mL、透气性硅底为100cm^2的透气性烧瓶(G-Rex 100,可从Wilson Wolf Manufacturing Corporation,新布莱顿,MN,美国商购)中进行,5×10^6或10×10^6TIL可与PBMC一起培养在400mL的50/50培养基中,补充有5%人AB血清、3000IU/mL IL-2和30ng/mL抗CD3(OKT3)。G-REX 100烧瓶可在37℃、5%CO_2中孵育。在第5天,可以取出250mL上清液并置于离心瓶中并以1500rpm(491×g)离心10分钟。可以用含有5%人AB血清、3000IU/mL IL-2的150mL新鲜培养基重新悬浮TIL沉淀,并加回到原来的G-REX 100烧瓶中。当TIL在G-REX 100烧瓶中连续扩增时,在第7天,可将每个G-REX 100中的TIL悬浮于各个烧瓶中存在的300mL培养基中,并且可将细胞悬液分成可用于接种3个G-REX 100烧瓶的3个100mL等分试样。然后可以向各个烧瓶中添加150mL含有5%人AB血清和3000IU/mL IL-2的AIM-V。G-Rex 100烧瓶可在37℃、5%CO_2中孵育,4天后,可以向每个G-REX 100烧瓶中添加150mL含有3000IU/mL IL-2的AIM-V。可在培养的第11天收获细胞。可在培养的第12天收获细胞。可在培养的第13天收获细胞。可在培养的第14天收获细胞。在一些实施方式中,将培养物扩增至G-Rex 500中。

[0595] 在一个实施方式中,第二次扩增(包括称为REP的扩增)在烧瓶中进行;其中,大量TIL与100或200倍过量的灭活饲养细胞、30mg/mL OKT3抗CD3抗体和3000IU/mL IL-2混合于150mL培养基中。在一些实施方式中,进行培养基更换,直至细胞转移至替代生长室。在一些实施方式中,通过吸出用过的培养基并更换等体积的新鲜培养基来更换2/3的培养基。在一些实施方式中,如下文更充分地讨论,替代生长室包括GRex烧瓶和透气性容器。

[0596] 在一个实施方式中,进行第二次扩增(包括称为REP的扩增),并且还包括选择肿瘤反应性优异的TIL的步骤。可使用本领域已知的任何选择方法。例如,美国专利申请公开号2016/0010058A1(其公开内容通过引用并入本文)中描述的方法可用于选择肿瘤反应性优异的TIL。

[0597] 可选地,可使用本领域已知的标准检测法,在第二次扩增(包括称为REP扩增的扩增)之后进行细胞活力检测。例如,可对大量TIL样品进行台盼蓝拒染试验实验(trypan blue exclusion assay),其选择性地标记死细胞并允许活力评估。在一些实施方式中,可使用Cellometer K2自动细胞计数器(Nexcelom Bioscience,Lawrence,MA)对TIL样品进行计数和检测活力。在一些实施方式中,根据Cellometer K2Image Cytometer Automatic

Cell Counter方案测定活力。

[0598] 在一些实施方式中,TIL的第二次扩增(包括称为REP的扩增)可使用如前所述的T-175烧瓶和透气袋(Tran KQ、Zhou J、Durflinger KH等,2008,J.Immunother.,31:742-751和Dudley ME、Wunderlich JR、Shelton TE等,2003,J.Immunother.,26:332-342)或透气性G-Rex烧瓶进行。在一些实施方式中,第二次扩增使用烧瓶进行。在一些实施方式中,第二次扩增使用透气性G-Rex烧瓶进行。在一些实施方式中,第二次扩增在T-175烧瓶中进行,将约1×10^6TIL悬浮于约150mL培养基中,将它加至每个T-175烧瓶中。将TIL与经辐照的(50Gy)同种异体PBMC(作为"饲养"细胞)以1:100比率一起培养,将细胞在CM和AIM-V培养基的1:1混合物(50/50培养基)中培养,补充有3000IU/mL IL-2和30ng/mL的抗CD3。将T-175烧瓶在37℃、5%CO_2中孵育。在一些实施方式中,在第5天,使用含有3000IU/mL IL-2的50/50培养基更换一半培养基。在一些实施方式中,在第7天,将来自2个T-175烧瓶的细胞合并于3L袋中,将含有5%人AB血清和3000IU/mL IL-2的300mL AIM-V添加至300mL TIL悬液中。可以每天或每2天计数各个袋中的细胞数,并且可以添加新鲜培养基以使细胞计数保持为约0.5×10^6至约2.0×10^6个细胞/mL。在一些实施方式中,将培养物扩增至G-Rex 500中。

[0599] 在一些实施方式中,第二次扩增(包括称为REP的扩增)在具有100cm^2透气性硅底的500mL容量的烧瓶(G-REX 100,Wilson Wolf)中进行(图1),约5×10^6或10×10^6TIL与经辐照同种异体PBMC以1:100的比率在400mL的50/50培养基中培养,该50/50培养基补充有3000IU/mL IL-2和30ng/mL的抗CD3。将G-Rex 100烧瓶在37℃、5%CO_2中孵育。在一些实施方式中,在第5天,取出250mL上清液并置于离心瓶中并以1500rpm(491g)离心10分钟。然后可以用150mL含有3000IU/mL IL-2的新鲜50/50培养基重新悬浮TIL沉淀,并加回到原来的G-Rex 100烧瓶中。在TIL在G-REX 100烧瓶中连续扩增的实施方式中,在第7天,将每个G-Rex 100中的TIL悬浮于各个烧瓶中存在的300mL培养基中,将细胞悬液分成用于接种3个G-Rex 100烧瓶的3个100mL等分试样。然后向各个烧瓶中添加含有5%人AB血清和3000IU/mL IL-2的150mL AIM-V。G-REX100烧瓶在37℃、5%CO_2中孵育,4天后,向每个G-REX 100烧瓶中添加含有3000IU/mL IL-2的150mL AIM-V。在培养的第14天收获细胞。在一些实施方式中,将培养物扩增至G-Rex 500中。

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

[0601] 在一些实施方式中,第二次扩增(例如根据图7的步骤D)在封闭系统生物反应器中进行。在一些实施方式中,如本文所述,采用封闭系统进行TIL扩增。在一些实施方式中,采用单个生物反应器。在一些实施方式中,例如,采用的单个生物反应器是GREX-10或者GREX-100。在一些实施方式中,封闭系统生物反应器是单个生物反应器。

[0602] 1、饲养细胞和抗原呈递细胞

[0603] 在一个实施方式中,在REP TIL扩增期间和/或在第二次扩增期间,本文所述的第二次扩增步骤(例如,包括例如图7的步骤D中所述的那些以及称为REP的那些扩增)需要过量的饲养细胞。在许多实施方式中,饲养细胞是从健康献血者的标准全血单位获得的外周血单核细胞(PBMC)。使用标准方法(如Ficoll-Paque梯度分离)获得PBMC。

[0604] 通常,同种异体PBMC通过辐照或热处理被灭活并用于REP步骤,如实施例(特别是实施例4)所述,它提供了评估经辐照的同种异体PBMC的复制机能不全(replication

incompetence)的示例性方案。

[0605] 在一些实施方式中,如果第14天的活细胞总数小于在REP的第0天和/或第二次扩增的第0天(即第二次扩增的开始日)投入培养的初始活细胞数,则认为PBMC复制机能不全并接受PBMC用于本文所述的TIL扩增步骤。参见例如实施例3和/或实施例4。

[0606] 在一些实施方式中,如果与REP的第0天和/或第二次扩增的第0天(即第二次扩增的开始日)投入培养的初始活细胞数相比,第7天和第14天在OKT3和IL-2存在下培养的活细胞的总数没有增加,则认为PBMC复制机能不全并接受PBMC用于本文所述的TIL扩增步骤。在一些实施方式中,PBMC在30ng/mL OKT3抗体和3000IU/mL IL-2的存在下培养。参见例如实施例3和/或实施例4。

[0607] 在一些实施方式中,如果与REP的第0天和/或第二次扩增的第0天(即第二次扩增的开始日)投入培养的初始活细胞数相比,第7天和第14天在OKT3和IL-2存在下培养的活细胞的总数没有增加,则认为PBMC复制机能不全并接受PBMC用于本文所述的TIL扩增步骤。在一些实施方式中,PBMC在5ng/mL至60ng/mL OKT3抗体和1000IU/mL至6000IU/mL IL-2的存在下培养。在一些实施方式中,PBMC在10ng/mL至50ng/mL的OKT3抗体和2000IU/mL至5000IU/mL IL-2的存在下培养。在一些实施方式中,PBMC在20ng/mL至40ng/mL OKT3抗体和2000IU/mL至4000IU/mL IL-2的存在下培养。在一些实施方式中,PBMC在25ng/mL至35ng/mL OKT3抗体和2500IU/mL至3500IU/mL IL-2的存在下培养。

[0608] 在一些实施方式中,抗原呈递饲养细胞是PBMC。在一些实施方式中,抗原呈递饲养细胞是人工抗原呈递饲养细胞。在一个实施方式中,第二次扩增中TIL与抗原呈递饲养细胞的比率为约1:25、约1:50、约1:100、约1:125、约1:150、约1:175、约1:200、约1:225、约1:250、约1:275、约1:300、约1:325、约1:350、约1:375、约1:400,或者约1:500。在一个实施方式中,第二次扩增中TIL与抗原呈递饲养细胞的比率为1:50至1:300。在一个实施方式中,第二次扩增中TIL与抗原呈递饲养细胞的比率为1:100至1:200。

[0609] 在一个实施方式中,本文所述的第二次扩增步骤在第二次扩增期间需要过量的饲养细胞。在许多实施方式中,饲养细胞是从健康献血者的标准全血单位获得的外周血单核细胞(PBMC)。使用标准方法如Ficoll-Paque梯度分离获得PBMC。在一个实施方式中,使用人工抗原呈递(aAPC)细胞代替PBMC。

[0610] 通常,同种异体PBMC通过辐照或者热处理被灭活,并用于本文所述的TIL扩增步骤,包括例如图7中所述的示例性步骤。

[0611] 在一个实施方式中,在第二次扩增中使用人工抗原呈递细胞替代PBMC或者与PBMC组合。

[0612] 如本领域已知,本文所述的扩增方法通常使用具有高剂量细胞因子(特别是IL-2)的培养基。

[0613] 或者,另外可使用细胞因子的组合进行TIL的快速扩增和/或第二次扩增;其中,IL-2、IL-15和IL-21中的两种以上的组合如国际公开号WO2015/189356和国际公开号WO2015/189357中概述的那样,其全部内容通过引用明确并入本文。因此,可能的组合包括IL-2和IL-15、IL-2和IL-21、IL-15和IL-21,以及IL-2、IL-15和IL-21,发现后者在许多实施方式中特别有用。使用细胞因子的组合特别有利于淋巴细胞(特别是本文所述的T细胞)的产生。

[0614] E、步骤E:收获TIL

[0615] 在第二次扩增步骤后,可以收获细胞。在一些实施方式中,例如,在如图7中所提供的一个、两个、三个、四个或者更多次扩增步骤之后收获TIL。在一些实施方式中,例如,在如图7中所提供的两次扩增步骤之后收获TIL。

[0616] 可以以任何适当和无菌的方式收获TIL,包括例如通过离心。收获TIL的方法是本领域熟知的,并且任何这样的已知方法可与本发明方法一起使用。在一些实施方式中,使用自动化系统收获TIL。

[0617] 在一些实施方式中,收获(例如根据图7的步骤E)在封闭系统生物反应器中进行。在一些实施方式中,如本文所述,采用封闭系统进行TIL扩增。在一些实施方式中,采用单个生物反应器。在一些实施方式中,例如,采用的单个生物反应器是GREX-10或者GREX-100。在一些实施方式中,封闭系统生物反应器是单个生物反应器。

[0618] F、步骤F:最终制剂/转移至输液袋

[0619] 在如图7中示例性顺序提供的步骤A至E之后以及如上述和于此详述的概述完成后,将细胞转移至容器以用于对患者施用。在一些实施方式中,一旦使用上述扩增方法获得治疗足够数量的TIL,则将它们转移至容器以用于对患者施用。

[0620] 在一个实施方式中,使用本公开方法扩增的TIL作为药物组合物施用于患者。在一个实施方式中,药物组合物是TIL在无菌缓冲液中的悬液。使用本公开方法扩增的TIL可通过本领域已知的任何合适的途径施用。在一些实施方式中,T细胞以单次动脉内或静脉内输注施用,输注优选持续约30至60分钟。其他合适的施用途径包括腹膜内、鞘内和淋巴管内。

[0621] 在一个实施方式中,可将使用前述公开内容的方法扩增的TIL作为还包含冻存剂的组合物来施用。在一个实施方式中,使用前述公开内容的方法扩增的TIL可作为还包含冻存剂和等渗剂的组合物施用。在一个实施方式中,使用前述公开内容的方法扩增的TIL可作为组合物施用,所述组合物还包含冻存剂和等渗剂,所述冻存剂包括二甲基亚砜,所述等渗剂包括氯化钠、葡萄糖酸钠和乙酸钠。在一个实施方式中,使用前述公开内容的方法扩增的TIL可作为组合物施用,所述组合物还包含冻存剂和等渗剂,所述冻存剂包括二甲基亚砜和右旋糖酐40,所述等渗剂包括氯化钠、葡萄糖酸钠和乙酸钠。在一个实施方式中,使用前述公开的方法扩增的TIL可作为用无菌输液袋递送的组合物施用,此类组合物还包含冻存剂和等渗剂,所述冻存剂包括二甲基亚砜和右旋糖酐40,所述等渗剂包括氯化钠、葡萄糖酸钠和乙酸钠。

[0622] 1、药物组合物、剂量和施用方案

[0623] 在一个实施方式中,将使用本公开的方法扩增的TIL作为药物组合物施用于患者。在一个实施方式中,药物组合物是TIL在无菌缓冲液中的悬液。使用本公开的方法扩增的TIL可通过本领域已知的任何合适途径施用。在一些实施方式中,T细胞以单次动脉内或静脉内输注施用,输注优选持续约30至60分钟。其他合适的施用途径包括腹膜内、鞘内和淋巴管内施用。

[0624] 可以施用任何合适剂量的TIL。在一些实施方式中,合适剂量需要在治疗上足够数量的TIL。在一些实施方式中,特别是当癌是黑色素瘤时,施用约2.3×10^{10}至约13.7×10^{10}个TIL,平均约7.8×10^{10}个TIL。在一个实施方式中,施用约1.2×10^{10}至约4.3×10^{10}个TIL。在一些实施方式中,施用约3×10^{10}至约12×10^{10}个TIL。在一些实施方式中,施用约4×10^{10}

至约10×10^10个TIL。在一些实施方式中,施用约5×10^10至约8×10^10个TIL。在一些实施方式中,施用约6×10^10至约8×10^10个TIL。在一些实施方式中,施用约7×10^10至约8×10^10个TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约2.3×10^10至约13.7×10^10。在一些实施方式中,特别是当癌是黑色素瘤时,治疗有效剂量为约7.8×10^10个TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约1.2×10^10至约4.3×10^10个TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约3×10^10至约12×10^10个TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约4×10^10至约10×10^10个TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约5×10^10至约8×10^10个TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约6×10^10至约8×10^10个TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约7×10^10至约8×10^10个TIL。

[0625] 在一些实施方式中,本发明的药物组合物中提供的TIL的数量为约1×10^6、2×10^6、3×10^6、4×10^6、5×10^6、6×10^6、7×10^6、8×10^6、9×10^6、1×10^7、2×10^7、3×10^7、4×10^7、5×10^7、6×10^7、7×10^7、8×10^7、9×10^7、1×10^8、2×10^8、3×10^8、4×10^8、5×10^8、6×10^8、7×10^8、8×10^8、9×10^8、1×10^9、2×10^9、3×10^9、4×10^9、5×10^9、6×10^9、7×10^9、8×10^9、9×10^9、1×10^10、2×10^10、3×10^10、4×10^10、5×10^10、6×10^10、7×10^10、8×10^10、9×10^10、1×10^11、2×10^11、3×10^11、4×10^11、5×10^11、6×10^11、7×10^11、8×10^11、9×10^11、1×10^12、2×10^12、3×10^12、4×10^12、5×10^12、6×10^12、7×10^12、8×10^12、9×10^12、1×10^13、2×10^13、3×10^13、4×10^13、5×10^13、6×10^13、7×10^13、8×10^13,以及9×10^13。在一个实施方式中,本发明的药物组合物中提供的TIL数量的范围为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,以及5×10^12至1×10^13。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约1×10^6、2×10^6、3×10^6、4×10^6、5×10^6、6×10^6、7×10^6、8×10^6、9×10^6、1×10^7、2×10^7、3×10^7、4×10^7、5×10^7、6×10^7、7×10^7、8×10^7、9×10^7、1×10^8、2×10^8、3×10^8、4×10^8、5×10^8、6×10^8、7×10^8、8×10^8、9×10^8、1×10^9、2×10^9、3×10^9、4×10^9、5×10^9、6×10^9、7×10^9、8×10^9、9×10^9、1×10^10、2×10^10、3×10^10、4×10^10、5×10^10、6×10^10、7×10^10、8×10^10、9×10^10、1×10^11、2×10^11、3×10^11、4×10^11、5×10^11、6×10^11、7×10^11、8×10^11、9×10^11、1×10^12、2×10^12、3×10^12、4×10^12、5×10^12、6×10^12、7×10^12、8×10^12、9×10^12、1×10^13、2×10^13、3×10^13、4×10^13、5×10^13、6×10^13、7×10^13、8×10^13,以及9×10^13。

[0626] 在一些实施方式中,本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度小于药物组合物的例如100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%,或0.0001%w/w、w/v或v/v。

[0627] 在一些实施方式中,本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度大于药物组合物的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。

[0628] 在一些实施方式中,本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度范围为药物组合物的约0.0001%至约50%、约0.001%至约40%、约0.01%至约30%、约0.02%至约29%、约0.03%至约28%、约0.04%至约27%、约0.05%至约26%、约0.06%至约25%、约0.07%至约24%、约0.08%至约23%、约0.09%至约22%、约0.1%至约21%、约0.2%至约20%、约0.3%至约19%、约0.4%至约18%、约0.5%至约17%、约0.6%至约16%、约0.7%至约15%、约0.8%至约14%、约0.9%至约12%,或约1%至约10%w/w、w/v或v/v。

[0629] 在一些实施方式中,本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度范围为药物组合物的约0.001%至约10%、约0.01%至约5%、约0.02%至约4.5%、约0.03%至约4%、约0.04%至约3.5%、约0.05%至约3%、约0.06%至约2.5%、约0.07%至约2%、约0.08%至约1.5%、约0.09%至约1%、约0.1%至约0.9%w/w、w/v或v/v。

[0630] 在一些实施方式中,本发明的药物组合物中提供的TIL的量等于或小于10g、9.5g、9.0g、8.5g、8.0g、7.5g、7.0g、6.5g、6.0g、5.5g、5.0g、4.5g、4.0g、3.5g、3.0g、2.5g、2.0g、1.5g、1.0g、0.95g、0.9g、0.85g、0.8g、0.75g、0.7g、0.65g、0.6g、0.55g、0.5g、0.45g、0.4g、0.35g、0.3g、0.25g、0.2g、0.15g、0.1g、0.09g、0.08g、0.07g、0.06g、0.05g、0.04g、0.03g、0.02g、0.01g、0.009g、0.008g、0.007g、0.006g、0.005g、0.004g、0.003g、0.002g、0.001g、0.0009g、0.0008g、0.0007g、0.0006g、0.0005g、0.0004g、0.0003g、0.0002g,或0.0001g。

[0631] 在一些实施方式中,本发明的药物组合物中提供的TIL的量大于0.0001g、0.0002g、0.0003g、0.0004g、0.0005g、0.0006g、0.0007g、0.0008g、0.0009g、0.001g、0.0015g、0.002g、0.0025g、0.003g、0.0035g、0.004g、0.0045g、0.005g、0.0055g、0.006g、0.0065g、0.007g、0.0075g、0.008g、0.0085g、0.009g、0.0095g、0.01g、0.015g、0.02g、0.025g、0.03g、0.035g、0.04g、0.045g、0.05g、0.055g、0.06g、0.065g、0.07g、0.075g、0.08g、0.085g、0.09g、0.095g、0.1g、0.15g、0.2g、0.25g、0.3g、0.35g、0.4g、0.45g、0.5g、0.55g、0.6g、0.65g、0.7g、0.75g、0.8g、0.85g、0.9g、0.95g、1g、1.5g、2g、2.5g、3g、3.5g、4g、4.5g、5g、5.5g、6g、6.5g、7g、7.5g、8g、8.5g、9g、9.5g,或10g。

[0632] 本发明的药物组合物中提供的TIL在宽剂量范围内有效。精确的剂量取决于施用途径、施用化合物的形式、待治疗对象的性别和年龄、待治疗对象的体重,以及主治医师的偏好和经验。如果合适,也可使用临床确定的TIL剂量。使用本文方法施用的药物组合物的量(例如TIL的剂量)将取决于所治疗的人或哺乳动物、病症或病症的严重程度、施用率、活性药物成分的配置和处方医生的自由裁量权。

[0633] 在一些实施方式中,TIL可以单剂量施用。此种施用可通过注射,例如静脉内注射。在一些实施方式中,TIL可以多剂量施用。剂量可为每年一次、两次、三次、四次、五次、六次

或超过六次。剂量可为每月一次、每两周一次、每周一次或每2天一次。只要有必要,TIL的施用可以继续。

[0634] 在一些实施方式中,TIL的有效剂量为约1×10^6、2×10^6、3×10^6、4×10^6、5×10^6、6×10^6、7×10^6、8×10^6、9×10^6、1×10^7、2×10^7、3×10^7、4×10^7、5×10^7、6×10^7、7×10^7、8×10^7、9×10^7、1×10^8、2×10^8、3×10^8、4×10^8、5×10^8、6×10^8、7×10^8、8×10^8、9×10^8、1×10^9、2×10^9、3×10^9、4×10^9、5×10^9、6×10^9、7×10^9、8×10^9、9×10^9、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13},以及9×10^{13}。在一些实施方式中,TIL的有效剂量的范围为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},以及5×10^{12}至1×10^{13}。

[0635] 在一些实施方式中,TIL的有效剂量的范围为约0.01mg/kg至约4.3mg/kg、约0.15mg/kg至约3.6mg/kg、约0.3mg/kg至约3.2mg/kg、约0.35mg/kg至约2.85mg/kg、约0.15mg/kg至约2.85mg/kg、约0.3mg至约2.15mg/kg、约0.45mg/kg至约1.7mg/kg、约0.15mg/kg至约1.3mg/kg、约0.3mg/kg至约1.15mg/kg、约0.45mg/kg至约1mg/kg、约0.55mg/kg至约0.85mg/kg、约0.65mg/kg至约0.8mg/kg、约0.7mg/kg至约0.75mg/kg、约0.7mg/kg至约2.15mg/kg、约0.85mg/kg至约2mg/kg、约1mg/kg至约1.85mg/kg、约1.15mg/kg至约1.7mg/kg、约1.3mg/kg至约1.6mg/kg、约1.35mg/kg至约1.5mg/kg、约2.15mg/kg至约3.6mg/kg、约2.3mg/kg至约3.4mg/kg、约2.4mg/kg至约3.3mg/kg、约2.6mg/kg至约3.15mg/kg、约2.7mg/kg至约3mg/kg、约2.8mg/kg至约3mg/kg,或者约2.85mg/kg至约2.95mg/kg。

[0636] 在一些实施方式中,TIL的有效剂量的范围为约1mg至约500mg、约10mg至约300mg、约20mg至约250mg、约25mg至约200mg、约1mg至约50mg、约5mg至约45mg、约10mg至约40mg、约15mg至约35mg、约20mg至约30mg、约23mg至约28mg、约50mg约150mg、约60mg至约140mg、约70mg至约130mg、约80mg至约120mg、约90mg至约110mg、约95mg至约105mg、约98mg至约102mg、约150mg至约250mg、约160mg至约240mg、约170mg至约230mg、约180mg至约220mg、约190mg至约210mg、约195mg至约205mg,或者约198至约207mg。

[0637] 有效量的TIL可通过具有类似用途的药剂的任何可接受的施用方式以单剂量或多剂量施用,包括鼻内和透皮途径,通过动脉内注射、静脉内、腹膜内、肠胃外、肌内、皮下、局部,通过移植或通过吸入。

[0638] IV.TIL生产过程-Gen 3过程

[0639] 在一些实施方式中,本发明提供了通过任一GEN 3过程的方法制备的TIL群,该方法被修改为使用小活检、核心活检或细针抽吸。在一些实施方式中,本发明提供了通过任一GEN 3过程的方法,该方法被修改为使用小活检物、核心活检物或细针抽吸物作为T细胞的来源,以在任何此类GEN 3过程的启动第一次扩增中进行扩增;其中,(1)延长启动第一次扩增的持续时间,以在此种GEN 3过程的快速第二次扩增之后收获的TIL群中达到所需的TIL细胞计数,或(2)延长此种GEN 3过程的快速第二次扩增的持续时间,以在快速第二次扩增之后收获的TIL群中达到所需的TIL细胞计数,或(3)延长启动第一次扩增的持续时间和GEN

3过程的快速第二次扩增的持续时间,以在快速第二次扩增之后收获的TIL群中达到所需的TIL细胞计数。

[0640] 在一些实施方式中,本发明提供了通过任一GEN 3过程的方法制备的TIL群,该方法被修改为使用小活检物、核心活检物或细针抽吸物作为T细胞的来源,以在任何此类GEN 3过程的启动第一次扩增中进行扩增;其中,(1)延长启动第一次扩增的持续时间,以在此种GEN 3过程的快速第二次扩增之后收获的TIL群中达到所需的TIL细胞计数,或(2)延长此种GEN 3过程的快速第二次扩增的持续时间,以在快速第二次扩增之后收获的TIL群中达到所需的TIL细胞计数,或(3)延长启动第一次扩增的持续时间和GEN 3过程的快速第二次扩增的持续时间,以在快速第二次扩增之后收获的TIL群中达到所需的TIL细胞计数。

[0641] 不受限于任何特定理论,认为启动第一次扩增(其引发获自供体的肿瘤核心物或碎片的T细胞的活化)之后进行快速第二次扩增(其加强(boost)如本发明一些方法中所述的T细胞活化)允许制备扩增的T细胞(其保留“更年轻”表型),因此,与通过其他方法扩增的T细胞相比,预期本发明的扩增的T细胞对癌细胞显示出更大的细胞毒性。特别地,认为:如本发明方法所教导的,T细胞的活化通过暴露于抗CD3抗体(例如OKT-3)、IL-2和可选的抗原呈递细胞(APC)而引发,并通过随后暴露于另外的抗CD-3抗体(例如OKT-3)、IL-2和APC而加强,T细胞的活化限制或避免了培养物中T细胞的成熟,从而产生具有较不成熟表型的T细胞群,这样的T细胞因培养物扩增而耗竭较少并对癌细胞表现出更大的细胞毒性。因此,在一些实施方式中,本发明提供了扩增TIL的方法,该方法包括:(a)通过培养第一T细胞群对获自供体的肿瘤核心物或碎片的第一T细胞群进行启动第一次扩增,影响第一T细胞群生长并引发第一T细胞群活化;(b)在步骤(a)中引发的第一T细胞群的活化开始衰减之后,通过培养第一T细胞群对第一T细胞群进行快速第二次扩增,影响第一T细胞群生长并加强第一T细胞群活化,获得第二T细胞群;以及(c)收获第二T细胞群。如下文和本申请全文所述,GEN 3过程、使用来自GEN 3过程的TIL的治疗方法以及由GEN 3生产的TIL的组合物可与小活检/核心活检结合使用,并视需要调整扩增时间以达到必要的细胞计数。

[0642] 在一些实施方式中,快速第二次扩增的步骤被分成多个步骤以实现培养物的按比例扩增,其通过:(a)通过在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中在小规模培养物中培养T细胞约3至4天来进行快速二次扩增,然后(b)将小规模培养物中的T细胞转移到比第一容器大的第二容器(例如G-REX 500MCS容器)中,在第二容器中在更大规模培养物中培养小规模培养物中的T细胞约4至7天。在一些实施方式中,快速扩增的步骤被分成多个步骤以实现培养物的按比例扩增,其通过:(a)通过在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中在小规模培养物中培养T细胞约3至4天来进行快速二次扩增,然后(b)将小规模培养物中的T细胞转移和分配到至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个第二容器中,第二容器的尺寸与第一容器相同,其中,在每个第二容器中,在第二小规模培养物中培养从第一小规模培养物转移至此种第二容器的T细胞的一部分约4至7天。在一些实施方式中,快速扩增的步骤被分成多个步骤以实现培养物的横向扩增(scale out)和纵向扩增(scale up),其通过:(a)通过在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中在小规模培养物中培养T细胞约3至4天来进行快速二次扩增,(b)将小规模培养物中的T细胞转移和分配到至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个第二容器(例如G-REX 500MCS容器)中,第二容器的尺寸大于第一容器,其中,在每个第二容器中,在更大规模培养物中培养从第一小

规模培养物转移至此种第二容器的T细胞的一部分约4至7天。在一些实施方式中,快速扩增的步骤被分成多个步骤以实现培养物的横向扩增和纵向扩增,其通过:(a)通过在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中在小规模培养物中培养T细胞约4天来进行快速二次扩增,然后(b)将小规模培养的T细胞转移和分配到至少2、3或4个第二容器(例如G-REX 500MCS容器)中,第二容器的尺寸大于第一容器,其中,在每个第二容器中,在更大规模培养物中培养从第一小规模培养物转移至此种第二容器的T细胞的一部分约5天。

[0643] 在一些实施方式中,在由启动第一次扩增实现的T细胞的活化开始减少、减弱、衰减或消退之后,进行快速第二次扩增。

[0644] 在一些实施方式中,在由启动第一次扩增实现的T细胞的活化降低约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之后,进行快速第二次扩增。

[0645] 在一些实施方式中,在由启动第一次扩增实现的T细胞的活化降低约1%至约100%的百分比之后,进行快速第二次扩增。

[0646] 在一些实施方式中,在由启动第一次扩增实现的T细胞的活化降低约1%至10%、10%至20%、20%、30%、30%至40%、40%至50%、50%至60%、60%至70%、70%至80%、80%至90%或90%至100%的百分比之后,进行快速第二次扩增。

[0647] 在一些实施方式中,在由启动第一次扩增实现的T细胞的活化降低至少或约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之后,进行快速第二次扩增。

[0648] 在一些实施方式中,在由启动第一次扩增实现的T细胞的活化降低至多或约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之后,进行快速第二次扩增。

[0649] 在一些实施方式中,由启动第一次扩增实现的T细胞活化的降低由T细胞响应于抗原刺激所释放的干扰素γ的量的减少所决定。

[0650] 在一些实施方式中,T细胞的启动第一次扩增进行至多或约7天的时间。

[0651] 在一些实施方式中,T细胞的启动第一次扩增进行至多或约1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天的时间。

[0652] 在一些实施方式中,T细胞的启动第一次扩增进行1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天的时间。

[0653] 在一些实施方式中,T细胞的快速第二次扩增进行至多或约11天的时间。

[0654] 在一些实施方式中,T细胞的快速第二次扩增进行至多或约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天的时间。

[0655] 在一些实施方式中,T细胞的快速第二次扩增进行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天的时间。

[0656] 在一些实施方式中,T细胞的启动第一次扩增进行约1天至约7天的时间,并且T细胞的快速第二次扩增进行约1天至约11天的时间。

[0657] 在一些实施方式中,T细胞的启动第一次扩增进行至多或约1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天的时间,并且T细胞的快速第二次扩增进行至多或约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天的时间。

[0658] 在一些实施方式中,T细胞的启动第一次扩增进行约1天至约7天的时间,并且T细胞的快速第二次扩增进行约1天至约9天的时间。

[0659] 在一些实施方式中,T细胞的启动第一次扩增进行7天的时间,并且T细胞的快速第二次扩增进行9天的时间。

[0660] 在一些实施方式中,T细胞是肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

[0661] 在一些实施方式中,T细胞是骨髓浸润淋巴细胞(MIL)。

[0662] 在一些实施方式中,T细胞获自患有癌症的供体。

[0663] 在一些实施方式中,T细胞是获自癌症患者的肿瘤的核心活检物或细针抽吸物的TIL。

[0664] 在一些实施方式中,T细胞是获自血液恶性肿瘤患者的骨髓的MIL。

[0665] 在一些实施方式中,供体患有癌症。在一些实施方式中,癌症选自下组的癌症:黑色素瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、由人乳头状瘤病毒引起的癌症的癌症、头颈癌(包括头颈鳞状细胞癌(HNSCC))、胶质母细胞瘤(包括GBM)、胃肠道癌、肾癌和肾脏上皮肾细胞癌(renal cell carcinoma)。在一些实施方式中,癌症选自:黑色素瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、由人乳头状瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包括头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、胶质母细胞瘤(包括GBM)、胃肠道癌、肾癌和肾脏上皮肾细胞癌。在某些实施方式中,供体患有肿瘤。在一些实施方式中,肿瘤是液体肿瘤。在一些实施方式中,肿瘤是实体瘤。在一些实施方式中,供体患有血液系统恶性肿瘤。

[0666] 图85(特别是例如图85B)中描述了包含这些特征中的一些特征的称为过程3(本文中也称为GEN 3)的示例性TIL过程,图1、2、30和31(特别是例如图85B)描述了相对于过程2A的本发明此实施方式的一些优点。过程3的两个实施方式显示于图1和30(特别是例如图85B)。过程2A或Gen 2也描述于美国专利公开号2018/0280436,其全部内容通过引用整体并入本文。Gen 3过程也描述于2018年11月5日提交的USSN62/755,954(116983-5045-PR)。

[0667] 如本文所讨论和总体概述的,使用本文所述的称为Gen 3的TIL扩增方法,由患者样品获取TIL并对其进行处理以扩增其数量,然后再移植到患者体内。在一些实施方式中,可如下文所述,可以可选地对TIL进行基因操作。在一些实施方式中,可在扩增之前或之后冷冻保存TIL。一旦解冻,在输注患者之前,也可再刺激TIL以增加其代谢。

[0668] 在一些实施方式中,如下文以及实施例和附图详细讨论的,启动第一次扩增(包括本文称为pre-快速扩增(Pre-REP)的过程以及图85(特别是例如图85B)步骤B所示的过程)缩短为1至7天,快速第二次扩增(包括本文称为快速扩增方案(REP)的过程以及图85(特别是图85B)步骤D所示的过程)缩短为1至9天。在一些实施方式中,启动第一次扩增(例如图85(特别是例如图85B)步骤B所述的扩增)缩短至7天,快速第二次扩增(例如图85(特别是例如图85B)步骤D所述的扩增)缩短为7至9天。在一些实施方式中,如下文以及实施例和附图中详细讨论的,启动第一次扩增和快速第二次扩增(例如图85(特别是图85B)步骤B和步骤D的扩增)总共为14至16天。特别地,认为本发明的某些实施方式包括启动第一次扩增步骤,在启动第一次扩增步骤中,通过在IL-2存在下暴露于抗CD3抗体(例如OKT-3)或在至少IL-2和抗CD3抗体(例如OKT-3)存在下暴露于抗原来活化TIL。在某些实施方式中,在如上所述的启动第一次扩增步骤中活化的TIL是第一TIL群(即原代细胞群)。

[0669] 下文“步骤”名称A、B、C等参考图85(特别是例如图85B)中的非限制性实例,并参考本文所述的某些非限制性实施方式。下文和图85(特别是例如图85B)中步骤的顺序是示例性的,步骤顺序的任何组合以及附加步骤、步骤的重复和/或步骤的省略为本申请和本文公开方法所预期。

[0670] 在一些实施方式中,如果肿瘤是转移性的且原发性病变在过去已被有效地治疗/去除,则可能需要取出转移性病变之一。在一些实施方式中,微创方法用于取出皮肤病变或颈部或腋窝区域上的淋巴结(如果可以)。在一些实施方式中,取出皮肤病变或取出其小活检物。在一些实施方式中,取出淋巴结或其小活检物。在一些实施方式中,可以使用肺或肝转移病灶或其腹内或胸腔淋巴结或其小活检物。

[0671] 在一些实施方式中,肿瘤是黑色素瘤。在一些实施方式中,黑色素瘤的小活检包括痣或痣的一部分。

[0672] 在一些实施方式中,小活检是钻取活检。在一些实施方式中,用圆形刀片压入皮肤中获得钻取活检。在一些实施方式中,用圆形刀片压入周围有可疑的痣的皮肤中获得钻取活检。在一些实施方式中,通过将圆形刀片压入皮肤中来获得钻取活检并取下圆形皮肤。在一些实施方式中,小活检是钻取活检,且取下肿瘤的圆形部分。

[0673] 在一些实施方式中,小活检是切除活检。在一些实施方式中,小活检是切除活检,且取下整个痣或生长物。在一些实施方式中,小活检是切除活检,且取下去整个痣或生长物以及正常出现的皮肤的小边界。

[0674] 在一些实施方式中,小活检是切口活检。在一些实施方式中,小活检是切口活检,且仅取下痣或生长物的最不规则部分。在一些实施方式中,小活检是切口活检,当其他技术无法完成时,例如可疑痣非常大时,使用切口活检。

[0675] 在一些实施方式中,小活检是肺活检。在一些实施方式中,小活检通过支气管镜检查获得。通常,在支气管镜检查中,使患者处于麻醉状态,用一个小工具穿过鼻子或嘴巴从咽喉向下进入支气管通道,使用小工具在支气管通道取出一些组织。在一些实施方式中,在

不能通过支气管镜检查达到肿瘤或生长物的情况下,可采用经皮肺穿刺活检。通常,对于经皮肺穿刺活检,也使患者处于麻醉状态,将针头通过皮肤直接插入可疑部位,以取下少量组织样品。在一些实施方式中,经皮肺穿刺活检可能需要介入放射学(例如使用X射线或CT扫描来引导针)。在一些实施方式中,小活检通过针头活检获得。在一些实施方式中,小活检通过内窥镜超声获得(例如具有光的内窥镜且通过口腔置入食道)。在一些实施方式中,通过手术获得小活检物。

[0676] 在一些实施方式中,小活检是头颈活检。在一些实施方式中,小活检是切口活检。在一些实施方式中,小活检是切口活检,其中从看起来异常的区域切下一小块组织。在一些实施方式中,如果容易接近异常区域,则可在不住院的情况下获取样品。在一些实施方式中,如果肿瘤在口腔或咽喉内部更深处,则活检可能需要在手术室中全身麻醉下进行。在一些实施方式中,小活检是切除活检。在一些实施方式中,小活检是切除活检,其中切除整个区域。在一些实施方式中,小活检是细针抽吸(FNA)。在一些实施方式中,小活检是细针抽吸(FNA),其中,使用连接至注射器的非常细的针头从肿瘤或肿块中提取(抽吸)细胞。在一些实施方式中,小活检是钻取活检。在一些实施方式中,小活检是钻取活检,其中使用咬取钳取下一块可疑区域。

[0677] 在一些实施方式中,小活检是宫颈活检。在一些实施方式中,小活检通过阴道镜进行。通常,阴道镜方法使用连接到放大镜的照明放大工具(阴道镜),然后将其用于活检子宫颈表面的一小部分。在一些实施方式中,小活检是锥切/圆锥活检。在一些实施方式中,小活检是锥切/圆锥活检,其中,可能需要门诊手术以从子宫颈取下较大的组织。在一些实施方式中,除了有助于确认诊断之外,锥形活检还可用作初始治疗。

[0678] 术语“实体瘤”指通常不包含囊肿或者液体区域的异常组织块。实体瘤可为良性或者恶性的。术语“实体瘤癌”指恶性、肿瘤性或者癌性实体瘤。实体瘤癌症包括但不限于肉瘤、恶性上皮肿瘤和淋巴瘤,例如肺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、直肠癌和膀胱癌。在一些实施方式中,癌症选自宫颈癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、卵巢癌、肉瘤、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌和非小细胞肺癌。实体瘤的组织结构包括相互依赖的组织隔室,包括实质(癌细胞)和支持的基质细胞(癌细胞分散在其中并且可以提供支持的微环境)。

[0679] 在一些实施方式中,以细针抽吸(FNA)物、核心活检物或小活检物(包括例如钻取活检物)的形式获得来自肿瘤的样品。在一些实施方式中,将样品首先放入G-Rex10。在一些实施方式中,当存在1或2个核心活检和/或小活检样品时,将样品首先放入G-Rex 10。在一些实施方式中,当存在3、4、5、6、8、9或10个或更多个核心活检和/或小活检样品时,将样品首先放入G-Rex 100。在一些实施方式中,当存在3、4、5、6、8、9或10个或更多个核心活检和/或小活检样品时,将样品首先放入G-Rex 500。

[0680] FNA可获自选自以下的肿瘤:肺、黑色素瘤、头颈、宫颈、卵巢、胰腺、胶质母细胞瘤、结直肠和肉瘤。在一些实施方式中,FNA获自肺肿瘤,例如获自非小细胞肺癌(NSCLC)患者的肺肿瘤。在某些情况下,NSCLC患者以前曾接受过外科手术治疗。

[0681] 本文所述TIL可获自FNA样品。在某些情况下,可使用18号针至25号针的细针从患者获取或分离FNA样品。细针可为18号、19号、20号、21号、22号、23号、24号或25号。在一些实施方式中,来自患者的FNA样品可包含至少400,000个TIL,例如400,000个TIL、450,000个

TIL、500,000个TIL、550,000个TIL、600,000个TIL、650,000个TIL、700,000个TIL、750,000个TIL、800,000个TIL、850,000个TIL、900,000个TIL,950,000个TIL或更多个TIL。

[0682] 在一些情况下,本文所述的TIL获自核心活检样品。在某些情况下,可使用11号针头至16号针头的手术或医用针头从患者获得或分离出小活检或核心活检样品。针可为11号、12号、13号、14号、15号或16号。在一些实施方式中,来自患者的核心活检样品可包含至少400,000个TIL,例如400,000个TIL、450,000个TIL、500,000个TIL、550,000个TIL、600,000个TIL、650,000个TIL、700,000个TIL、750,000个TIL、800,000个TIL、850,000个TIL、900,000个TIL,950,000个TIL或更多个TIL。

[0683] 在一些实施方式中,TIL获自肿瘤消化物。在一些实施方式中,通过在酶培养基(例如但不限于RPMI 1640、2mm GlutaMAX、10μg/mL庆大霉素、30U/mL DNase和1.0mg/mL胶原酶)中孵育,然后机械解离(GentleMACS,MiltenyiBiotec,Aubum,加利福尼亚州),来产生肿瘤消化物。将肿瘤置于酶培养基中后,可以机械解离肿瘤约1分钟。然后将溶液在37℃、5%CO_2中孵育30分钟,然后再次机械破碎约1分钟。在37℃、5%CO_2中再次孵育30分钟后,可以第三次机械破碎肿瘤约1分钟。在一些实施方式中,在第三次机械破碎后,如果存在大块组织,则对样品施加1或者2次另外的机械解离,进行或不进行在37℃、5%CO_2下的另外的30分钟孵育。在一些实施方式中,在最终孵育结束时,如果细胞悬液含有大量红细胞或者死细胞,则可使用Ficoll进行密度梯度分离以除去这些细胞。

[0684] 在一些实施方式中,在第一次扩增步骤之前收获的细胞悬液称为“原代细胞群”或者“新鲜收获的”细胞群。

[0685] 在一些实施方式中,可选地,可在收获样品后将细胞冷冻,并在进入步骤B所述扩增之前冷冻保存,这将在下文进一步详细描述,并在图85中进行示例性说明。

[0686] A、步骤A:获取患者肿瘤样品

[0687] 通常,TIL最初通过核心活检或类似程序由患者肿瘤样品获得(“原代TIL”),然后如本文所述地扩增为更大的群用于进一步操作,可选地冷冻保存,并可选地评估表型和代谢参数。

[0688] 可使用本领域已知的方法获得患者肿瘤样品,通常通过手术切除、核心活检、针吸活检或用于获得含有肿瘤和TIL细胞混合物的样品的其他手段。通常,肿瘤样品可以来自任何实体瘤,包括原发性肿瘤、侵袭性肿瘤或转移性肿瘤。在一些实施方式中,样品可来自多个小肿瘤样品或活检样品。在一些实施方式中,样品可包含来自同一患者的单个肿瘤的多个肿瘤样品(例如多个核心)。在一些实施方式中,样品可包含来自同一患者的一个、两个、三个或四个肿瘤的多个肿瘤样品(例如获自转移性疾病的多个病变的核心活检)。在一些实施方式中,样品可包含来自同一患者的多个肿瘤的多个肿瘤样品。肿瘤样品也可为液体肿瘤,例如从血液恶性肿瘤获得的肿瘤。实体瘤可为任何癌症类型,包括但不限于乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、肺癌、脑癌、肾癌、胃癌和皮肤癌(包括但不限于鳞状细胞癌、基底细胞癌和黑色素瘤)。在一些实施方式中,癌症选自:宫颈癌、头颈癌(包括例如头颈鳞状细胞癌(HNSCC))、胶质母细胞瘤(GBM)、胃肠道癌、卵巢癌、肉瘤、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌和非小细胞肺癌。在一些实施方式中,有用的TIL获自恶性黑色素瘤肿瘤,因为据报道其具有特别高水平的TIL。

[0689] 如上所述,在一些实施方式中,TIL源自实肿瘤核心物或碎片。在一些实施方式中,

将实体瘤核心物或碎片进行酶消化。在一些实施方式中,将肿瘤核心物或碎片在包含胶原酶、DNase和透明质酸酶的酶混合物中消化。在一些实施方式中,将肿瘤核心物或碎片在包含胶原酶、DNase和透明质酸酶的酶混合物中消化1至2小时。在一些实施方式中,将肿瘤在包含胶原酶、DNase和透明质酸酶的酶混合物中在37℃、5%CO_2下消化1至2小时。在一些实施方式中,将肿瘤核心物或碎片在包含胶原酶、DNase和透明质酸酶的酶混合物中在37℃、5%CO_2下在旋转下消化1至2小时。在一些实施方式中,肿瘤核心物或碎片在恒定旋转下消化过夜。在一些实施方式中,将肿瘤核心物或碎片在37℃、5%CO_2下恒定旋转消化过夜。在一些实施方式中,将肿瘤核心物或碎片与酶混合以形成肿瘤消化反应混合物。

[0690] 在一些实施方式中,不由肿瘤消化物获得TIL。在一些实施方式中,不破碎实体瘤核心物。

[0691] 在一些实施方式中,用冻干的酶在无菌缓冲液中重构肿瘤核心物或碎片。在一些实施方式中,缓冲液是无菌HBSS。

[0692] 在一些实施方式中,酶混合物包含胶原酶。在一些实施方式中,胶原酶是胶原酶IV。在一些实施方式中,胶原酶的工作储备液为100mg/mL的10X工作储备液。

[0693] 在一些实施方式中,酶混合物包含DNAse。在一些实施方式中,DNAse的工作储备液为10,000IU/mL的10X工作储备液。

[0694] 在一些实施方式中,酶混合物包含透明质酸酶。在一些实施方式中,透明质酸酶的工作储备液为10mg/mL 10X工作储备液。

[0695] 在一些实施方式中,酶混合物包含10mg/mL胶原酶、1000IU/mL DNAse和1mg/mL透明质酸酶。

[0696] 在一些实施方式中,酶混合物包含10mg/mL胶原酶、500IU/mL DNAse和1mg/mL透明质酸酶。

[0697] 通常,将由肿瘤核心物或碎片获得的细胞悬液称为“原代细胞群”或“新鲜获得”或“新鲜分离”的细胞群。在某些实施方式中,将新鲜获得的TIL细胞群暴露于包含抗原呈递细胞IL-2和OKT-3的细胞培养基。

[0698] 在一些实施方式中,可由获自患者的酶促肿瘤核心或碎片消化物和肿瘤核心物或碎片初始培养TIL。在一个实施方式中,可由获自患者的酶促肿瘤核心或碎片消化物和肿瘤核心物或碎片初始培养TIL。

[0699] 在一些实施方式中,TIL获自肿瘤碎片或核心消化物。在一些实施方式中,肿瘤碎片或核心消化物通过在酶培养基(例如但不限于RPMI 1640、2mm GlutaMAX、10mg/mL庆大霉素、30U/mL DNase和1.0mg/mL胶原酶)中孵育,然后机械解离(GentleMACS,MiltenyiBiotec,Aubum,加利福尼亚州)来产生。将肿瘤碎片或核心物置于酶培养基中后,可以机械解离肿瘤碎片或核心物约1分钟。然后将溶液在37℃、5%CO_2中孵育30分钟,然后再次机械破碎约1分钟。在37℃、5%CO_2中再次孵育30分钟后,可以第三次机械破碎肿瘤碎片或核心物约1分钟。在一些实施方式中,在第三次机械破碎后,如果存在大块组织,则对样品施加1或者2次另外的机械解离,进行或不进行在37℃、5%CO_2下的另外的30分钟孵育。在一些实施方式中,在最终孵育结束时,如果细胞悬液含有大量红细胞或者死细胞,则可使用Ficoll进行密度梯度分离以除去这些细胞。

[0700] 在一些实施方式中,如果肿瘤是转移性的,且原发性病变在过去已被有效治疗/去

除,则可能需要取出转移性病变之一。在一些实施方式中,微创方法(least invasive approach)用于取出皮肤病变或颈部或腋窝区域上的淋巴结(如果可以)。在一些实施方式中,取出皮肤病变或取出其小活检物。在一些实施方式中,取出淋巴结或其小活检物。在一些实施方式中,可以采用肺或肝转移病灶或其腹内或胸腔淋巴结或其小活检物。

[0701] 在一些实施方式中,肿瘤是黑色素瘤。在一些实施方式中,黑色素瘤的小活检包括痣或痣的一部分。

[0702] 在一些实施方式中,小活检是钻取活检。在一些实施方式中,用圆形刀片压入皮肤中获得钻取活检。在一些实施方式中,用圆形刀片压入周围有可疑的痣的皮肤中获得钻取活检。在一些实施方式中,用圆形刀片压入皮肤中来获得钻取活检,取下圆形皮肤。在一些实施方式中,小活检是钻取活检且取下肿瘤的圆形部分。

[0703] 在一些实施方式中,小活检是切除活检。在一些实施方式中,小活检是切除活检,且取下整个痣或生长物。在一些实施方式中,小活检是切除活检,且取下整个痣或生长物以及正常出现的皮肤的小边界。

[0704] 在一些实施方式中,小活检是切口活检。在一些实施方式中,小活检是切口活检,且仅取下痣或生长物的最不规则部分。在一些实施方式中,小活检是切口活检,当无法采取其他技术(例如可疑痣非常大)时,使用切口活检。

[0705] 在一些实施方式中,小活检是肺活检。在一些实施方式中,小活检通过支气管镜检查获得。通常,在支气管镜检查中,使患者处于麻醉状态,用一个小工具穿过鼻子或嘴巴从咽喉向下进入支气管通道,使用小工具在支气管通道取出一些组织。在一些实施方式中,在不能通过支气管镜检查达到肿瘤或生长物的情况下,可采用经皮肺穿刺活检。通常,对于经皮肺穿刺活检,也使患者处于麻醉状态,将针头通过皮肤直接插入可疑部位,以取下少量组织样品。在一些实施方式中,经皮肺穿刺活检可能需要介入放射学(例如使用X射线或CT扫描来引导针)。在一些实施方式中,小活检通过针头活检获得。在一些实施方式中,小活检通过内窥镜超声获得(例如具有光的内窥镜且通过口腔置入食道)。在一些实施方式中,通过手术获得小活检物。

[0706] 在一些实施方式中,小活检是头颈活检。在一些实施方式中,小活检是切口活检。在一些实施方式中,小活检是切口活检,其中从看起来异常的区域切下一小块组织。在一些实施方式中,如果容易接近异常区域,则可在不住院的情况下获取样品。在一些实施方式中,如果肿瘤在口腔或咽喉内部更深处,则活检可能需要在手术室中全身麻醉下进行。在一些实施方式中,小活检是切除活检。在一些实施方式中,小活检是切除活检,其中切除整个区域。在一些实施方式中,小活检是细针抽吸(FNA)。在一些实施方式中,小活检是细针抽吸(FNA),其中,使用连接至注射器的非常细的针头从肿瘤或肿块中提取(抽吸)细胞。在一些实施方式中,小活检是钻取活检。在一些实施方式中,小活检是钻取活检,其中使用咬取钳取下一块可疑区域。

[0707] 在一些实施方式中,小活检是宫颈活检。在一些实施方式中,小活检通过阴道镜进行。通常,阴道镜方法使用连接到放大镜的照明放大工具(阴道镜),然后将其用于活检子宫颈表面的一小部分。在一些实施方式中,小活检是锥切/圆锥活检。在一些实施方式中,小活检是锥切/圆锥活检,其中,可能需要门诊手术以从子宫颈取下较大的组织。在一些实施方式中,除了有助于确认诊断之外,锥形活检还可用作初始治疗。

[0708] 术语“实体瘤”指通常不包含囊肿或者液体区域的异常组织块。实体瘤可为良性或者恶性的。术语“实体瘤癌”指恶性、肿瘤性或者癌性实体瘤。实体瘤癌症包括但不限于肉瘤、恶性上皮肿瘤和淋巴瘤,例如肺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、直肠癌和膀胱癌。在一些实施方式中,癌症选自宫颈癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、卵巢癌、肉瘤、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌和非小细胞肺癌。实体瘤的组织结构包括相互依赖的组织隔室,包括实质(癌细胞)和支持的基质细胞(癌细胞分散在其中并且可以提供支持的微环境)。

[0709] 在一些实施方式中,以细针抽吸物(FNA)、核心活检物、小活检物(包括例如钻取活检物)的形式获得来自肿瘤的样品。在一些实施方式中,将样品首先放入G-Rex10。在一些实施方式中,当存在1或2个核心活检和/或小活检样品时,将样品首先放入G-Rex 10。在一些实施方式中,当存在3、4、5、6、8、9或10个或更多个核心活检和/或小活检样品时,将样品首先放入G-Rex 100。在一些实施方式中,当存在3、4、5、6、8、9或10个或更多个核心活检和/或小活检样品时,将样品首先放入G-Rex 500。

[0710] FNA可获自选自以下的肿瘤:肺、黑色素瘤、头颈、宫颈、卵巢、胰腺、胶质母细胞瘤、结直肠和肉瘤。在一些实施方式中,FNA获自肺肿瘤,例如获自非小细胞肺癌(NSCLC)患者的肺肿瘤。在某些情况下,NSCLC患者以前曾接受过外科手术治疗。

[0711] 本文所述TIL可获自FNA样品。在某些情况下,可使用18号针至25号针的细针从患者获取或分离FNA样品。细针可为18号、19号、20号、21号、22号、23号、24号或25号。在一些实施方式中,来自患者的FNA样品可包含至少400,000个TIL,例如400,000个TIL、450,000个TIL、500,000个TIL、550,000个TIL、600,000个TIL、650,000个TIL、700,000个TIL、750,000个TIL、800,000个TIL、850,000个TIL、900,000个TIL,950,000个TIL或更多个TIL。

[0712] 在一些情况下,本文所述的TIL获自核心活检样品。在某些情况下,可使用11号针头至16号针头的手术或医用针头从患者获得或分离出核心活检或小活检样品。针可为11号、12号、13号、14号、15号或16号。在一些实施方式中,来自患者的核心活检样品可包含至少400,000个TIL,例如400,000个TIL、450,000个TIL、500,000个TIL、550,000个TIL、600,000个TIL、650,000个TIL、700,000个TIL、750,000个TIL、800,000个TIL、850,000个TIL、900,000个TIL,950,000个TIL或更多个TIL。

[0713] 在一些实施方式中,TIL获自肿瘤核心或碎片消化物。在一些实施方式中,肿瘤核心或碎片消化物通过在酶培养基(例如但不限于RPMI 1640、2mm GlutaMAX、10μg/mL庆大霉素、30U/mL DNase和1.0mg/mL胶原酶)中孵育,然后机械解离(GentleMACS,MiltenyiBiotec,Aubum,加利福尼亚州)来产生。将肿瘤核心物或碎片置于酶培养基中后,可以机械解离肿瘤约1分钟。然后将溶液在37℃、5%CO_2中孵育30分钟,然后再次机械破碎约1分钟。在37℃、5%CO_2中再次孵育30分钟后,可以第三次机械破碎肿瘤核心物或碎片约1分钟。在一些实施方式中,在第三次机械破碎后,如果存在大块组织,则对样品施加1或者2次另外的机械解离,进行或不进行在37℃、5%CO_2下的另外的30分钟孵育。在一些实施方式中,在最终孵育结束时,如果细胞悬液含有大量红细胞或者死细胞,则可使用Ficoll进行密度梯度分离以除去这些细胞。

[0714] 在一些实施方式中,在启动第一次扩增步骤之前的细胞悬液称为“原代细胞群”或者“新鲜收获的”或者“新鲜分离的”细胞群。

[0715] 在一些实施方式中,可选地,可在样品分离之后(例如在获得肿瘤样品之后和/或由肿瘤样品获得细胞悬液之后)冷冻细胞,并在进入步骤B所述扩增之前冷冻保存,这将在下文进一步详细描述,并在图85(特别是图85B)中进行示例性说明。

[0716] B、步骤B:启动第一次扩增

[0717] 在一些实施方式中,本发明的方法提供了更年轻的TIL,其相对于更老的TIL(即,在施用于受试者/患者之前已经历更多轮复制的TIL)可提供额外的治疗益处。年轻TIL的特征描述于文献,例如Donia等,Scandinavian Journal of Immunology,75:157-167(2012);Dudley等,Clin Cancer Res,16:6122-6131(2010);Huang等,J Immunother,28(3):258-267(2005);Besser等,Clin Cancer Res,19(17):OF1-OF9(2013);Besser等,J Immunother 32:415-423(2009);Robbins等,J Immunol 2004;173:7125-7130;Shen等,J Immunother,30:123-129(2007);Zhou等,J Immunother,28:53-62(2005);以及Tran等,J Immunother,31:742-751(2008年),其全部内容通过引用整体并入本文。

[0718] 例如如图85(特别是图85B)的步骤A所述,在活检或消化肿瘤碎片和/或肿瘤核心物之后,在与肿瘤和其他细胞相比更有利于TIL生长的条件下,在含有IL-2、OKT-3和饲养细胞(例如抗原呈递饲养细胞)的血清中培养所得细胞。在一些实施方式中,在培养开始(例如在第0天)时,将IL-2、OKT-3和饲养细胞与肿瘤碎片或核心消化物和/或肿瘤碎片或核心物一起添加。在一些实施方式中,在具有6000IU/mL IL-2的容器中孵育肿瘤碎片或核心消化物和/或肿瘤碎片或核心物,每个容器装有至多60个碎片或核心物。培养该原代细胞数天,通常为1至7天,产生大量TIL群,通常为约1×10^8个大量TIL细胞。在一些实施方式中,启动第一次扩增发生1至7天的时间,得到大量TIL群,通常为约1×10^8个大量TIL细胞。在一些实施方式中,启动第一次扩增发生5至7天的时间,得到大量TIL群,通常为约1×10^8个大量TIL细胞。在一些实施方式中,启动第一次扩增发生约6至7天的时间,得到大量TIL群,通常约1×10^8个大量TIL细胞。在一些实施方式中,该启动第一次扩增发生约7天的时间,得到大量TIL群,通常为约1×10^8个大量TIL细胞。

[0719] 在一个优选实施方式中,可使用如下文和此处所述的启动第一次扩增步骤(例如图85(特别是例如图85B)步骤B所述的步骤,该步骤可包括称为pre-REP或启动REP的过程且该步骤从第0天和/或培养开始包含饲养细胞)进行TIL的扩增,然后进行如下文步骤D和此处所述的快速第二次扩增(步骤D,包括称为快速扩增方案(REP)步骤的过程),然后进行可选的冷冻保存,然后进行如下文和此处所述的第二步骤D(包括称为再刺激REP步骤的过程)。如本文所述,可以可选地表征从该方法获得的TIL的表型特征和代谢参数。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约$1mm^3$至$10mm^3$。

[0720] 在一些实施方式中,第一次扩增培养基被称为“CM(培养基的缩写)”。在一些实施方式中,步骤B的CM由RPMI 1640和GlutaMAX组成,补充有10%人AB血清、25mM Hepes和10μg/mL庆大霉素。

[0721] 在一些实施方式中,肿瘤碎片或核心物少于或等于240个。在一些实施方式中,置于少于或等于4个容器中的肿瘤碎片或核心物小于或等于240个。在一些实施方式中,容器是GREX100MCS烧瓶。在一些实施方式中,将少于或等于60个肿瘤碎片或核心物置于1个容器中。在一些实施方式中,每个容器包含少于或等于500mL的培养基。在一些实施方式中,培养基包含IL-2。在一些实施方式中,培养基包含6000IU/mL IL-2。在一些实施方式中,培养基

包含抗原呈递饲养细胞(本文也称为“抗原呈递细胞”)。在一些实施方式中,每个容器中的培养基包含2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施方式中,培养基包含OKT-3。在一些实施方式中,每个容器的培养基包含30ng/mL OKT-3。在一些实施方式中,容器是GREX100MCS烧瓶。在一些实施方式中,培养基包含6000IU/mL IL-2、30ng/mL OKT-3和2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施方式中,每个容器中的培养基包含6000IU/mL IL-2、30ng/mL OKT-3和2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。

[0722] 在制备肿瘤碎片或核心物之后,在与肿瘤和其他细胞相比更有利于TIL生长且允许从培养开始的第0天起引发TIL和加速培养的条件下,在含有IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞的培养基中培养所得细胞(即,其来自碎片或核心物且构成原代细胞群)。在一些实施方式中,用6000IU/mL IL-2以及抗原呈递饲养细胞和OKT-3孵育肿瘤碎片或核心消化物和/或肿瘤碎片或核心物。培养该原代细胞群数天,通常1至7天,得到大量TIL群,通常约1×10^8个大量TIL细胞。在一些实施方式中,启动第一次扩增期间的生长培养基包含IL-2或其变体以及抗原呈递饲养细胞和OKT-3。在一些实施方式中,IL-2是重组人IL-2(rhIL-2)。在一些实施方式中,1mg小瓶的IL-2储备溶液具有20-30×10^6IU/mg的比活性。在一些实施方式中,1mg小瓶的IL-2储备溶液具有20×10^6IU/mg的比活性。在一些实施方式中,1mg小瓶的IL-2储备溶液具有25×10^6IU/mg的比活性。在一些实施方式中,1mg小瓶的IL-2储备溶液具有30×10^6IU/mg的比活性。在一些实施方式中,IL-2储备溶液的终浓度为4-8×10^6IU/mg IL-2。在一些实施方式中,IL-2储备溶液的终浓度为5-7×10^6IU/mg IL-2。在一些实施方式中,IL-2储备溶液的终浓度为6×10^6IU/mg IL-2。在一些实施方式中,如实施例5中所述制备IL-2储备溶液。在一些实施方式中,启动第一次扩增培养基包含约10,000IU/mL IL-2、约9,000IU/mL IL-2、8,000IU/mL IL-2、约7,000IU/mL IL-2、约6000IU/mL IL-2或约5,000IU/mL IL-2。在一些实施方式中,启动第一次扩增培养基包含约9,000IU/mL至约5,000IU/mL IL-2。在一些实施方式中,启动第一次扩增培养基包含约8,000IU/mL至约6,000IU/mL IL-2。在一些实施方式中,启动第一次扩增培养基包含约7,000IU/mL至约6,000IU/mL IL-2。在一些实施方式中,启动第一次扩增培养基包含约6,000IU/mL IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基还包含IL-2。在一些实施方式中,启动第一次扩增细胞培养基包含约3000IU/mL IL-2。在一个实施方式中,启动第一次扩增细胞培养基还包含IL-2。在一个优选的实施方式中,启动第一次扩增细胞培养基包含约3000IU/mL IL-2。在一个实施方式中,启动第一次扩增细胞培养基包含约1000IU/mL、约1500IU/mL、约2000IU/mL、约2500IU/mL、约3000IU/mL、约3500IU/mL、约4000IU/mL、约4500IU/mL、约5000IU/mL、约5500IU/mL、约6000IU/mL、约6500IU/mL、约7000IU/mL、约7500IU/mL或约8000IU/mL IL-2。在一个实施方式中,启动第一次扩增细胞培养基包含1000IU/mL至2000IU/mL、2000IU/mL至3000IU/mL、3000IU/mL至4000IU/mL、4000IU/mL至5000IU/mL、5000IU/mL至6000IU/mL、6000IU/mL至7000IU/mL、7000IU/mL至8000IU/mL或约8000IU/mL IL-2。

[0723] 在一些实施方式中,启动第一次扩增培养基包含约500IU/mL IL-15、约400IU/mL IL-15、约300IU/mL IL-15、约200IU/mL IL-15、约180IU/mL IL-15、约160IU/mL IL-15、约140IU/mL IL-15、约120IU/mL IL-15或约100IU/mL IL-15。在一些实施方式中,启动第一次扩增培养基包含约500IU/mL至约100IU/mL IL-15。在一些实施方式中,启动第一次扩增培养基包含约400IU/mL至约100IU/mL IL-15。在一些实施方式中,启动第一次扩增培养基包

含约300IU/mL至约100IU/mL IL-15。在一些实施方式中,启动第一次扩增培养基包含约200IU/mL IL-15。在一些实施方式中,启动第一次扩增细胞培养基包含约180IU/mL IL-15。在一个实施方式中,启动第一次扩增细胞培养基还包含IL-15。在一个优选的实施方式中,启动第一次扩增细胞培养基包含约180IU/mL IL-15。

[0724] 在一些实施方式中,启动第一次扩增培养基包含约20IU/mL IL-21、约15IU/mL IL-21、约12IU/mL IL-21、约10IU/mL IL-21、约5IU/mL IL-21、约4IU/mL IL-21、约3IU/mL IL-21、约2IU/mL IL-21、约1IU/mL IL-21或约0.5IU/mL IL-21。在一些实施方式中,启动第一次扩增培养基包含约20IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施方式中,启动第一次扩增培养基包含约15IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施方式中,启动第一次扩增培养基包含约12IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施方式中,启动第一次扩增培养基包含约10IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施方式中,启动第一次扩增培养基包含约5IU/mL IL-21至约1IU/mL IL-21。在一些实施方式中,启动第一次扩增培养基包含约2IU/mL IL-21。在一些实施方式中,启动第一次扩增细胞培养基包含约1IU/mL IL-21。在一些实施方式中,启动第一次扩增细胞培养基包含约0.5IU/mL IL-21。在一个实施方式中,细胞培养基还包含IL-21。在一个优选的实施方式中,启动第一次扩增细胞培养基包含约1IU/mL IL-21。

[0725] 在一个实施方式中,启动第一次扩增细胞培养基包含OKT-3抗体。在一些实施方式中,启动第一次扩增细胞培养基包含约30ng/mL OKT-3抗体。在一个实施方式中,启动第一次扩增细胞培养基包含约0.1ng/mL、约0.5ng/mL、约1ng/mL、约2.5ng/mL、约5ng/mL、约7.5ng/mL、约10ng/mL、约15ng/mL、约20ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200ng/mL、约500ng/mL和约1μg/mL的OKT-3抗体。在一个实施方式中,细胞培养基包含0.1ng/mL至1ng/mL、1ng/mL至5ng/mL、5ng/mL至10ng/mL、10ng/mL至20ng。/mL、介于20ng/mL和30ng/mL、30ng/mL至40ng/mL之间、40ng/mL和50ng/mL以及50ng/mL至100ng/mL的OKT-3抗体。在一个实施方式中,细胞培养基包含15ng/mL至30ng/mL OKT-3抗体。在一个实施方式中,细胞培养基包含30ng/mL OKT-3抗体。在一些实施方式中,OKT-3抗体是莫罗单抗。

[0726] 表18:莫罗单抗(示例性OKT-3抗体)的氨基酸序列

[0727]

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

[0728] 在一些实施方式中,启动第一次扩增细胞培养基在细胞培养基中包含一种以上TNFRSF激动剂。在一些实施方式中,TNFRSF激动剂包括4-1BB激动剂。在一些实施方式中,TNFRSF激动剂是4-1BB激动剂,4-1BB激动剂选自:乌瑞鲁单抗、乌托鲁单抗、EU-101、融合蛋白以及片段、衍生物、变体、生物类似物及它们的组合。在一些实施方式中,以足以在细胞培养基中达到0.1μg/mL至100μg/mL的浓度添加TNFRSF激动剂。在一些实施方式中,以足以在细胞培养基中达到20μg/mL至40μg/mL的浓度添加TNFRSF激动剂。

[0729] 在一些实施方式中,除一种以上TNFRSF激动剂之外,启动第一次扩增的第一次扩增细胞培养基还包含初始浓度为约3000IU/mL的IL-2和初始浓度为约30IU/mL的OKT-3抗体,其中,一种以上TNFRSF激动剂包括4-1BB激动剂。在一些实施方式中,除一种以上TNFRSF激动剂之外,所述启动第一次扩增细胞培养基还包含初始浓度为约6000IU/mL的IL-2和初始浓度为约30ng/mL的OKT-3抗体,其中,一种以上TNFRSF激动剂包括4-1BB激动剂。

[0730] 在一些实施方式中,启动第一次扩增培养基被称为“CM(培养基的缩写)”。在一些实施方式中,它被称为CM1(培养基1)。在一些实施方式中,CM由RPMI 1640和GlutaMAX组成,补充有10％人AB血清、25mM Hepes和10μg/mL庆大霉素。在一些实施方式中,CM是实施例中所述的CM1,参见实施例1和14。在一些实施方式中,启动第一次扩增发生在初始细胞培养基或第一细胞培养基中。在一些实施方式中,启动第一次扩增培养基或初始细胞培养基或第一细胞培养基包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞(本文也称为饲养细胞)。

[0731] 在一些实施方式中,如实施例和附图中所述,启动第一次扩增(包括例如图85(特别是例如图85B)步骤B所述的那些过程,其可包括有时称为pre-REP或启动REP的那些)过程为1到7天。在一些实施方式中,启动第一次扩增(包括例如图85(特别是例如图85B)步骤B所述的那些过程,其可包括有时称为pre-REP或启动REP的那些)过程为2到7天。在一些实施方式中,启动第一次扩增(包括例如图85(特别是例如图85B)步骤B所述的那些过程,其可包括有时称为pre-REP或启动REP的那些)过程为3到7天。在一些实施方式中,启动第一次扩增(包括例如图85(特别是例如图85B)步骤B所述的那些过程,其可包括有时称为pre-REP或启动REP的那些)过程为4到7天。在一些实施方式中,启动第一次扩增(包括例如图85(特别是例如图85B)步骤B所述的那些过程,其可包括有时称为pre-REP或启动REP的那些)过程为5到7天。在一些实施方式中,启动第一次扩增(包括例如图85(特别是例如图85B)步骤B所述的那些过程,其可包括有时称为pre-REP或启动REP的那些)过程为6到7天。在一些实施方式中,启动第一次扩增(包括例如图85(特别是例如图85B)步骤B所述的那些过程,其可包括有时称为pre-REP或启动REP的那些)过程为7天。

[0732] 在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行1天至7天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行2天至7天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行3天至7天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行4天至7天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行5天至7天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤

起,启动第一次TIL扩增可进行6天至7天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行7天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行1天至10天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行2天至10天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行3天至10天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行4天至7天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行5天至10天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行6天至10天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行8天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行9天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行10天。在一些实施方式中,在约第1、2或3天从培养物中取出小活检物(例如核心活检物)。在一些实施方式中,在第6天从培养物中取出小活检物(例如核心活检物)。

[0733] 在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行8天至17天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行9天至17天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行10天至17天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行11天至17天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行12天至17天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行13天至17天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行14天至17天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行15天至17天。在一些实施方式中,从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或从开始第一次启动扩增步骤起,启动第一次TIL扩增可进行16天至17天。

[0734] 在一些实施方式中,TIL的启动第一次扩增可进行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行1天至7天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行2天至7天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行3天至7天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行4天至7天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行5天至7天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行6天至7天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行1天至10天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行2天至10天。在一

些实施方式中,第一次TIL扩增可进行3天至10天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行4天至10天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行5天至10天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行6天至10天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行7天至10天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行8天至10天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行9天至10天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行7天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行8天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行9天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行10天。

[0735] 在一些实施方式中,TIL的启动第一次扩增可进行8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天或17天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行8天至17天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行9天至17天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行10天至17天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行11天至17天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行12天至17天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行13天至17天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行14天至17天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行15天至17天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行16天至17天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可进行17天。

[0736] 在一些实施方式中,启动第一次扩增期间采用IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21的组合作为组合。在一些实施方式中,IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21以及它们的任何组合可包括在启动第一次扩增期间,包括例如根据图85(特别是例如图85B)以及如此处所述的步骤B过程期间。在一些实施方式中,启动第一次扩增期间采用IL-2、IL-15和IL-21的组合作为组合。在一些实施方式中,根据图85(特别是例如图85B)以及如此处所述的步骤B期间可包括IL-2、IL-15和IL-21及它们的任何组合。

[0737] 在一些实施方式中,启动第一次扩增(例如图85(特别是图85B)的步骤B)在封闭系统生物反应器中进行。在一些实施方式中,如本文所述,将封闭系统用于TIL扩增。在一些实施方式中,采用生物反应器。在一些实施方式中,生物反应器用作容器。在一些实施方式中,例如,采用的生物反应器是G-REX-10或G-REX-100。在一些实施方式中,采用的生物反应器是G-REX-100。在一些实施方式中,采用的生物反应器是G-REX-10。

[0738] 1、饲养细胞和抗原呈递细胞

[0739] 在一个实施方式中,此处所述的启动第一次扩增程序(例如包括图85(特别是例如图85B)步骤B所述的那些扩增以及称为pre-REP或启动REP的那些)在TIL扩增开始时和启动第一次扩增期间需要饲养细胞(本文也称为“抗原呈递细胞”)。在许多实施方式中,饲养细胞是获自同种异体健康献血者的标准全血单位的外周血单核细胞(PBMC)。PBMC使用标准方法(例如Ficoll-Paque梯度分离)获得。在一些实施方式中,在启动第一次扩增期间使用2.5×10^8个饲养细胞。在一些实施方式中,在启动第一次扩增期间,每个容器使用2.5×10^8个饲养细胞。在一些实施方式中,在启动第一次扩增期间,每个GREX-10使用2.5×10^8个饲养细胞。在一些实施方式中,在启动第一次扩增期间,每个GRAX-100使用2.5×10^8个饲养细胞。

[0740] 通常,如实施例中所述,通过辐射或热处理使同种异体PBMC失活,并用于REP程序中,实施例提供了评估辐照同种异体PBMC的复制机能不全的示例性方案。

[0741] 在一些实施方式中,如果第14天的活细胞总数小于启动第一次扩增的第0天投入培养的初始活细胞数,则认为PBMC复制机能不全并接受PBMC用于本文所述的TIL扩增程序。

[0742] 在一些实施方式中,如果与启动第一次扩增的第0天投入培养的初始活细胞数相比,在第7天在OKT3和IL-2存在下培养的活细胞总数没有增加,则认为PBMC复制机能不全并接受PBMC用于本文所述的TIL扩增程序。在一些实施方式中,在30ng/mL OKT3抗体和3000IU/mL IL-2的存在下培养PBMC。在一些实施方式中,在30ng/mL OKT3抗体和6000IU/mL IL-2的存在下培养PBMC。

[0743] 在一些实施方式中,如果与启动第一次扩增的第0天投入培养的初始活细胞数相比,在第7天在OKT3和IL-2存在下培养的活细胞总数没有增加,则认为PBMC复制机能不全并接受PBMC用于本文所述的TIL扩增程序。在一些实施方式中,在5ng/mL至60ng/mL OKT3抗体和1000IU/mL至6000IU/mL IL-2的存在下培养PBMC。在一些实施方式中,在10ng/mL至50ng/mL OKT3抗体和2000IU/mL至5000IU/mL IL-2的存在下培养PBMC。在一些实施方式中,在20ng/mL至40ng/mL OKT3抗体和2000IU/mL至4000IU/mL IL-2的存在下培养PBMC。在一些实施方式中,在25ng/mL至35ng/mL OKT3抗体和2500IU/mL至3500IU/mL IL-2的存在下培养PBMC。在一些实施方式中,在30ng/mL OKT3抗体和6000IU/mL IL-2的存在下培养PBMC。在一些实施方式中,在15ng/mL OKT3抗体和3000IU/mL IL-2的存在下培养PBMC。在一些实施方式中,在15ng/mL OKT3抗体和6000IU/mL IL-2的存在下培养PBMC。

[0744] 在一些实施方式中,抗原呈递饲养细胞是PBMC。在一些实施方式中,抗原呈递饲养细胞是人工抗原呈递饲养细胞。在一个实施方式中,第二次扩增中TIL与抗原呈递饲养细胞的比率为约1:25,约1:50,约1:100,约1:125,约1:150,约1:175,1:200,约1:225,约1:250,约1:275,约1:300,约1:325,约1:350,约1:375,约1:400或约1:500。在一个实施方式中,第二次扩增中TIL与抗原呈递饲养细胞的比率为1:50至1:300。在一个实施方式中,第二次扩增中TIL与抗原呈递饲养细胞的比率为1:100至1:200。

[0745] 在一个实施方式中,本文所述的启动第一次扩增程序需要约2.5×10^8个饲养细胞:约100×10^6个TIL的比率。在另一个实施方式中,本文所述的启动第一次扩增程序需要约2.5×10^8个饲养细胞:约50×10^6个TIL的比率。在又一个实施方式中,本文所述的启动第一次扩增需要约2.5×10^8个饲养细胞:约25×10^6个TIL的比率。在又一个实施方式中,本文所述的启动第一次扩增需要约2.5×10^8个饲养细胞。在又一个实施方式中,启动第一次扩增需要快速第二次扩增中使用的饲养细胞数量的四分之一、三分之一、五分之二或二分之一。

[0746] 在一些实施方式中,启动第一次扩增中的培养基包含IL-2。在一些实施方式中,启动第一次扩增中的培养基包含6000IU/mL IL-2。在一些实施方式中,启动第一次扩增中的培养基包含抗原呈递饲养细胞。在一些实施方式中,启动第一次扩增中的培养基每个容器包含2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施方式中,启动第一次扩增中的培养基包含OKT-3。在一些实施方式中,培养基包含30ng OKT-3/容器。在一些实施方式中,容器是GREX100MCS烧瓶。在一些实施方式中,培养基包含6000IU/mL IL-2、30ng/mL OKT-3和2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施方式中,培养基包含6000IU/mL IL-2、30ng/mL OKT-3和2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞/容器。在一些实施方式中,培养基包含500mL培养基和15ug OKT-3/2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞/容器。在一些实施方式中,培养基包含500mL培养基和15ug OKT-3/容器。在一些实施方式中,容器是GREX100MCS烧瓶。在一些实施方式中,培养基包含500mL培养基和6000IU/mL IL-2、30ng/mL OKT-3和2.5×10^8抗原呈递饲养细

胞。在一些实施方式中,培养基包含500mL培养基和6000IU/mL IL-2、15ug OKT-3和2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞/容器。在一些实施方式中,培养基包含500mL培养基和15ug OKT-3/2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞/容器。

[0747] 在一个实施方式中,第二次扩增期间,本文所述的启动第一次扩增程序需要相对于TIL过量的饲养细胞。在许多实施方式中,饲养细胞是获自同种异体健康献血者的标准全血单位的外周血单核细胞(PBMC)。PBMC使用标准方法(例如Ficoll-Paque梯度分离)获得。在一个实施方式中,使用人工抗原呈递(aAPC)细胞代替PBMC。

[0748] 通常,同种异体PBMC经辐射或热处理灭活,并用于本文所述的TIL扩增程序,包括附图和实施例中所述的示例性程序。

[0749] 在一个实施方式中,人工抗原呈递细胞用于启动第一次扩增中以替代PBMC或与PBMC组合。

[0750] 2、细胞因子

[0751] 如本领域已知,本文所述扩增方法通常使用具有高剂量细胞因子(特别是IL-2)的培养基。

[0752] 或者,另外可使用细胞因子的组合(IL-2、IL-15和IL-21中的两种或更多种的组合)用于TIL的启动第一次扩增,如国际公开号WO2015/189356和WO2015/189357所述,在此明确地全文引入作为参考。因此,可能的组合包括IL-2和IL-15、IL-2和IL-21、IL-15和IL-21以及IL-2、IL-15和IL-21,其中,后者在许多实施方式中有特定用途。细胞因子组合的使用特别有利于淋巴细胞的产生,特别是本文所述T细胞的产生。

[0753] 表19:白介素的氨基酸序列

[0754]

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

[0755] C、步骤C:启动第一次扩增向快速第二次扩增过渡

[0756] 在一些情况下,从启动第一次扩增获得的大量TIL群(其可包括有时称为pre-REP的扩增),包括例如由例如图85(特别是例如图85B)所示步骤B获得的TIL群,可进行快速第

二次扩增(其可能包括有时称为快速扩增方案(REP)的扩增),然后如下文所述进行冷冻保存。类似地,在将基因修饰的TIL用于治疗的情况下,可在扩增步骤之前或在启动第一次扩增之后且快速第二次扩增之前,对来自启动第一次扩增的TIL群或来自快速第二次扩增的TIL群进行基因修饰,以用于合适的治疗。

[0757] 在一些实施方式中,储存从启动第一次扩增(例如图85(特别是例如图85B)所示的步骤B)获得的TIL直至表型被选择。在一些实施方式中,启动第一次扩增(例如图85(特别是例如图85B)所示的步骤B)获得的TIL不储存而是直接进行快速第二次扩增。在一些实施方式中,在启动第一次扩增之后且在快速第二次扩增之前,不冷冻保存获自启动第一次扩增的TIL。在一些实施方式中,启动第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或开始第一次启动扩增步骤起的约2天、3天、4天、5天、6天或7天。在一些实施方式中,启动第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或开始第一次启动扩增步骤起的约3天到7天。在一些实施方式中,启动第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或开始第一次启动扩增步骤起的约4天到7天。在一些实施方式中,启动第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或开始第一次启动扩增步骤起的约5天至7天。在一些实施方式中,启动第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或开始第一次启动扩增步骤起的约6天到7天。在一些实施方式中,启动第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或开始第一次启动扩增步骤起的约7天。

[0758] 在一些实施方式中,启动第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或开始第一次启动扩增步骤起的1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天,至多10天。在一些实施方式中,启动第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或开始第一次启动扩增步骤起的1天至7天。在一些实施方式中,启动第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或开始第一次启动扩增步骤起的2天至7天。在一些实施方式中,启动第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或开始第一次启动扩增步骤起的3天至7天。在一些实施方式中,启动第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或开始第一次启动扩增步骤起的4天至7天。在一些实施方式中,启动第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或开始第一次启动扩增步骤起的5天至7天。在一些实施方式中,启动第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或开始第一次启动扩增步骤起的6天至7天。在一些实施方式中,启动第一次扩增向第二次扩增的过渡发生在从将肿瘤核心物或碎片添加到细胞培养基中和/或开始第一次启动扩增步骤起的7天。

[0759] 在一些实施方式中,在原代第一次扩增(primary first expansion)之后且在快速第二次扩增之前不储存TIL,TIL直接进行快速第二次扩增(例如,在一些实施方式中,在如图85所示(特别是例如图85B)步骤B至步骤D的过渡期间不进行储存)。在一些实施方式中,如本文所述,过渡在封闭系统中发生。在一些实施方式中,来自启动第一次扩增的TIL,即第二TIL群,直接进入快速第二次扩增而没有过渡期。

[0760] 在一些实施方式中,启动第一次扩增向快速第二次扩增的过渡(例如,根据图85(特别是例如图85B)的步骤C)在封闭系统生物反应器中进行。在一些实施方式中,如本文所述,将封闭系统用于TIL扩增。在一些实施方式中,采用单个生物反应器。在一些实施方式中,例如,采用的单个生物反应器是GREX-10或GREX-100。在一些实施方式中,封闭系统生物反应器是单个生物反应器。在一些实施方式中,启动第一次扩增向快速第二次扩增的过渡涉及容器尺寸的扩大。在一些实施方式中,启动第一次扩增在比快速第二次扩增小的容器中进行。在一些实施方式中,启动第一次扩增在GREX-100中进行,快速第二次扩增在GREX-500中进行。

[0761] D、步骤D:快速第二次扩增

[0762] 在一些实施方式中,在收获和启动第一次扩增之后、在如图85(特别是图85B)所示的步骤A和步骤B以及称为步骤C的过渡之后,TIL细胞群的数量进一步扩大。此种进一步扩增在本文中称为快速第二次扩增,其可包括本领域中通常称为快速扩增过程的扩增过程(快速扩增方案或REP;以及图85(特别是例如图85B)步骤D所示过程)。通常,在透气性容器中使用包含多种成分的培养基来完成快速第二次扩增,所述成分包括饲养细胞、细胞因子源和抗CD3抗体。在一些实施方式中,在快速第二次扩增开始后1天、2天、3天或4天(即在整个Gen 3过程的第8天、9天、10天或11天),将TIL转移至更大容量的容器。

[0763] 在一些实施方式中,可使用本领域技术人员已知的任何TIL烧瓶或容器来进行TIL的快速第二次扩增(其可包括有时称为REP的扩增;以及图85(特别是例如图85B)的步骤D所示的过程)。在一些实施方式中,第二TIL扩增可在快速第二次扩增开始后进行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天或9天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可在快速第二次扩增开始后进行约1天至约9天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可在快速第二次扩增开始后进行约2天至约9天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可在快速第二次扩增开始后进行约3天至约9天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可在快速第二次扩增开始后进行约4天至约9天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可在快速第二次扩增开始后进行约5天至约9天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可在快速第二次扩增开始后进行约6天至约9天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可在快速第二次扩增开始后进行约7天至约9天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可在快速第二次扩增开始后进行约7天至约10天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可在快速第二次扩增开始后进行约1天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可在快速第二次扩增开始后进行约2天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可在快速第二次扩增开始后进行约3天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可在快速第二次扩增开始后进行约4天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可在快速第二次扩增开始后进行约5天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可在快速第二次扩增开始后进行约6天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可在快速第二次扩增开始后进行约7天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可在快速第二次扩增开始后进行约8天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可在快速第二次扩增开始后进行约9天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可在快速第二次扩增开始后进行约10天。

[0764] 在一个实施方式中,快速第二次扩增可使用本公开的方法在透气性容器中进行(包括例如称为REP的扩增;以及图85(特别是例如图85B)的步骤D中所示的过程))。在一个实施方式中,可使用本公开方法在透气性容器中进行快速第二次扩增(包括例如称为REP的扩增;以及图85(特别是例如图85B)的步骤D中所示的过程)。在一些实施方式中,在IL-2、

OKT-3和饲养细胞(本文也称为“抗原呈递细胞”)的存在下,以快速第二次扩增来扩增TIL。在一些实施方式中,在IL-2、OKT-3和饲养细胞的存在下,以快速第二次扩增来扩增TIL,其中,添加饲养细胞至其终浓度为启动第一次扩增中存在的饲养细胞浓度的2倍、2.4倍、2.5倍、3倍、3.5倍或4倍。例如,可在白细胞介素2(IL-2)或白细胞介素-15(IL-15)的存在下,使用非特异性T细胞受体刺激快速扩增TIL。非特异性T细胞受体刺激可包括例如抗CD3抗体,例如约30ng/mL OKT3,小鼠单克隆抗CD3抗体(可从Ortho-McNeil,Raritan,NJ或Miltenyi Biotech,Auburn,CA商购)或UHCT-1(可从BioLegend,San Diego,CA,USA商购)。在第二次扩增期间,可通过在体外用包括一种以上癌症抗原(包括其抗原性部分,例如表位)诱导TIL的进一步刺激来快速扩增TIL,该抗原可可选地由载体表达,例如人白细胞抗原A2(HLA-A2)结合肽,例如0.3μM MART-L26-35(27L)或gp 100:209-217(210M)。其他合适的抗原可包括例如NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶癌抗原、MAGE-A3、SSX-2和VEGFR2,或其抗原性部分。也可通过用表达HLA-A2的抗原呈递细胞脉冲的相同癌症抗原再刺激,来快速扩增TIL。或者,可以用例如经辐照的自体淋巴细胞或用经辐照的HLA-A2+同种异体淋巴细胞和IL-2进一步再刺激TIL。在一些实施方式中,再刺激作为第二次扩增的一部分发生。在一些实施方式中,在经辐照的自体淋巴细胞或者经辐照的HLA-A2+同种异体淋巴细胞和IL-2的存在下,发生第二次扩增。

[0765] 在一个实施方式中,细胞培养基还包含IL-2。在一些实施方式中,细胞培养基包含约3000IU/mL IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基包含约1000IU/mL、约1500IU/mL、约2000IU/mL、约2500IU/mL、约3000IU/mL、约3500IU/mL、约4000IU/mL、约4500IU/mL、约5000IU/mL、约5500IU/mL、约6000IU/mL、约6500IU/mL、约7000IU/mL、约7500IU/mL,或约8000IU/mL IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基包含1000至2000IU/mL、2000至3000IU/mL、3000至4000IU/mL、4000至5000IU/mL、5000至6000IU/mL、6000至7000IU/mL、7000至8000IU/mL,或8000IU/mL IL-2。

[0766] 在一个实施方式中,细胞培养基包含OKT3抗体。在一个优选的实施方式中,细胞培养基包含约30ng/mL的OKT3抗体。在一个实施方式中,细胞培养基包含约0.1ng/mL、约0.5ng/mL、约1ng/mL、约2.5ng/mL、约5ng/mL、约7.5ng/mL、约10ng/mL、约15ng/mL、约20ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200ng/mL、约500ng/mL和约1μg/mL的OKT3抗体。在一个实施方式中,细胞培养基包含0.1ng/mL至1ng/mL、1ng/mL至5ng/mL、5ng/mL至10ng/mL、10ng/mL至20ng/mL,20ng/mL至30ng/mL、30ng/mL至40ng/mL、40ng/mL至50ng/mL、50ng/mL至100ng/mL的OKT3抗体。在一个实施方式中,细胞培养基包含30ng/mL至60ng/mL OKT-3抗体。在一个实施方式中,细胞培养基包含约30ng/mL的OKT-3。在一个实施方式中,细胞培养基包含约60ng/mL的OKT-3。在一些实施方式中,OKT-3抗体是莫罗单抗。

[0767] 在一些实施方式中,快速第二次扩增中的培养基包含IL-2。在一些实施方式中,培养基包含6000IU/mL IL-2。在一些实施方式中,快速第二次扩增中的培养基包含抗原呈递饲养细胞。在一些实施方式中,快速第二次扩增中的培养基每个容器包含7.5×10^{8}个抗原呈递饲养细胞。在一些实施方式中,快速第二次扩增中的培养基包含OKT-3。在一些实施方式中,快速第二次扩增培养基在每个容器中包含500mL培养基和30ug OKT-3。在一些实施方式中,容器是GREX100MCS烧瓶。在一些实施方式中,快速第二次扩增培养基中包含6000IU/

mL IL-2、60ng/mL OKT-3和7.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施方式中,每个容器包含500mL培养基和6000IU/mL IL-2、30μg OKT-3和7.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。

[0768] 在一些实施方式中,快速第二次扩增中的培养基包含IL-2。在一些实施方式中,培养基包含6000IU/mL IL-2。在一些实施方式中,快速第二次扩增中的培养基包含抗原呈递饲养细胞。在一些实施方式中,培养基包含5×10^8至7.5×10^8抗原呈递饲养细胞/容器。在一些实施方式中,快速第二次扩增中的培养基包含OKT-3。在一些实施方式中,快速第二次扩增中的培养基包含500mL培养基和30μg OKT-3/容器。在一些实施方式中,容器是GREX100MCS烧瓶。在一些实施方式中,快速第二次扩增中的培养基包含6000IU/mL IL-2、60ng/mL OKT-3以及5×10^8至7.5×10^8的抗原呈递饲养细胞。在某些实施方式中,快速第二次扩增中的培养基包含500mL培养基和6000IU/mL IL-2、30L-2L次-3,以及5×10^8至7.5×10^8的抗原呈递饲养细胞/容器。

[0769] 在一些实施方式中,细胞培养基在细胞培养基中包含一种以上TNFRSF激动剂。在一些实施方式中,TNFRSF激动剂包括4-1BB激动剂。在一些实施方式中,TNFRSF激动剂是4-1BB激动剂,4-1BB激动剂选自:乌瑞鲁单抗、乌托鲁单抗、EU-101、融合蛋白以及它们的片段、衍生物、变体、生物类似物以及它们的组合。在一些实施方式中,以足以在细胞培养基中达到0.1μg/mL至100μg/mL的浓度添加TNFRSF激动剂。在一些实施方式中,以足以在细胞培养基中达到20μg/mL至40μg/mL的浓度添加TNFRSF激动剂。

[0770] 在一些实施方式中,除一种以上TNFRSF激动剂之外,细胞培养基还包含初始浓度为约3000IU/mL的IL-2和初始浓度为约30ng/mL的OKT-3抗体,其中,一种以上TNFRSF激动剂包括4-1BB激动剂。

[0771] 在一些实施方式中,第二次扩增期间采用IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21的组合作为组合。在一些实施方式中,IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21以及它们的任何组合可包括于第二次扩增期间,包括例如根据图85(特别是例如图85B)步骤D以及此处所述的过程。在一些实施方式中,在第二次扩增期间采用IL-2、IL-15和IL-21的组合作为组合。在一些实施方式中,IL-2、IL-15和IL-21及它们的任何组合可包括于根据图85(特别是例如图85B)且如此处所述的步骤D过程期间。

[0772] 在一些实施方式中,第二次扩增可在包含IL-2、OKT-3、抗原呈递饲养细胞和可选的TNFRSF激动剂的补充细胞培养基中进行。在一些实施方式中,第二次扩增发生在补充的细胞培养基中。在一些实施方式中,补充的细胞培养基包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞。在一些实施方式中,第二细胞培养基包含IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC;也称为抗原呈递饲养细胞)。在一些实施方式中,第二次扩增在包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞(即,抗原呈递细胞)的细胞培养基中发生。

[0773] 在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约500IU/mL IL-15、约400IU/mL IL-15、约300IU/mL IL-15、约200IU/mL IL-15、约180IU/mL IL-15、约160IU/mL IL-15、约140IU/mL IL-15、约120IU/mL IL-15或约100IU/mL IL-15IL-15。在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约500IU/mL IL-15至约100IU/mL IL-15。在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约400IU/mL IL-15至约100IU/mL IL-15。在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约300IU/mL IL-15至约100IU/mL IL-15。在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约200IU/mL IL-15。在一些实施方式中,细胞培养基包含约180IU/mL IL-15。在一个实

施方式中,细胞培养基还包含IL-15。在一个优选的实施方式中,细胞培养基包含约180IU/mL IL-15。

[0774] 在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约20IU/mL IL-21、约15IU/mL IL-21、约12IU/mL IL-21、约10IU/mL IL-21、约5IU/mL IL-21、约4IU/mL IL-21、约3IU/mL IL-21、约2IU/mL IL-21、约1IU/mL IL-21或约0.5IU/mL IL-21。在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约20IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约15IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约12IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约10IU/mL IL-21至约0.5IU/mL IL-21。在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约5IU/mL IL-21至约1IU/mL IL-21。在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约2IU/mL IL-21。在一些实施方式中,细胞培养基包含约1IU/mL IL-21。在一些实施方式中,细胞培养基包含约0.5IU/mL IL-21。在一个实施方式中,细胞培养基还包含IL-21。在一个优选的实施方式中,细胞培养基包含约1IU/mL IL-21。

[0775] 在一些实施方式中,抗原呈递饲养细胞(APC)是PBMC。在一个实施方式中,在快速扩增和/或第二次扩增中TIL与PBMC和/或抗原呈递细胞的比率为约1:10、约1:15、约1:20、约1:25、约1。至30、约1:35、约1:40、约1:45、约1:50、约1:75、约1:100、约1:125、约1:150、约1:175、约1:200、约1:225、约1:250、约1:275、约1:300、约1:325、约1:350、约1:375、约1:400或约1:500。在一个实施方式中,快速扩增和/或第二次扩增中TIL与PBMC的比率为1:50至1:300。在一个实施方式中,快速扩增和/或第二次扩增中TIL与PBMC的比率为1:100至1:200。

[0776] 在一个实施方式中,REP和/或快速第二次扩增在烧瓶中进行,其中,将大量TIL与在150mL培养基中的100倍或200倍过量的灭活饲养细胞、30ng/mL OKT3抗CD3抗体和6000IU/mL IL-2混合;其中,饲养细胞浓度为启动第一次扩增中饲养细胞浓度的至少1.1倍(1.1X)、1.2X、1.3X、1.4X、1.5X、1.6X、1.7X、1.8X、1.8X、2X、2.1X、2.2X、2.3X、2.4X、2.5X、2.6X、2.7X、2.8X、2.9X、3.0X、3.1X、3.2X、3.3X、3.4X、3.5X、3.6X、3.7X、3.8X、3.9X或4.0X。进行培养基更换(通常通过抽吸2/3用过的培养基并用等体积的新鲜培养基进行更换,来进行2/3培养基更换),直至将细胞转移到替代生长室中。替代生长室包括G-REX烧瓶和透气性容器,下文将对此进行更全面的讨论。

[0777] 在一些实施方式中,如实例和附图中所述,快速第二次扩增(可包括称为REP过程的过程)为7至10天。在一些实施方式中,如实施例和附图中所述,快速第二次扩增(可包括称为REP过程的过程)为7至9天。在一些实施方式中,第二次扩增为7天。在一些实施方式中,第二次扩增为8天。在一些实施方式中,第二次扩增是为9天。在一些实施方式中,第二次扩增为10天。

[0778] 在一个实施方式中,可在500mL容量、具有100cm透气性硅底的透气性烧瓶(G-Rex 100,可从Wilson Wolf Manufacturing Corporation,New Brighton,MN,USA商购)中进行第二次扩增(其可包括称为REP的扩增以及图85(特别是例如图85B)步骤D中所述的那些),5×10^6或10×10^6TIL可用在400mL 50/50培养基中的PBMC进行培养,该培养基补充有5%人AB血清、3000IU/mL IL-2和30ng/mL抗CD3(OKT3)。G-Rex 100烧瓶可在37℃、5%CO_2中孵育。在第5天,可取出250mL上清液,将其放入离心瓶中,以1500rpm(491×g)速度离心10分钟。可将TIL沉淀物重新悬浮于150mL含5%人AB血清、6000IU/mL IL-2的新鲜培养基中,然后加回到

原来的GREX-100烧瓶中。当TIL在GREX-100烧瓶中连续扩增时,可在第10天或第11天将TIL移至更大的烧瓶(例如GREX-500)中。可在培养的第14天收获细胞。可在培养的第15天收获细胞。可在培养的第16天收获细胞。在一些实施方式中,更换培养基,直至将细胞转移至替代生长室。在一些实施方式中,通过抽吸用过的培养基并用等体积的新鲜培养基替代来更换2/3的培养基。在一些实施方式中,替代生长室包括GREX烧瓶和透气性容器,如下文更全面地讨论的。

[0779] 在一个实施方式中,进行快速第二次扩增(包括称为REP的扩增),快速第二次扩增还包括选择肿瘤反应性优异的TIL的步骤。可使用本领域中已知的任何选择方法。例如,美国专利申请公开号2016/0010058A1(其公开内容通过引用并入本文)中描述的方法可用于选择具有优异肿瘤反应性的TIL。

[0780] 可选地,可使用本领域已知的标准检测法,在快速第二次扩增(包括称为REP扩增的扩增)之后进行细胞活力检测。例如,可对大量TIL样品进行台盼蓝拒染试验实验,其选择性地标记死细胞并允许活力评估。在一些实施方式中,可使用Cellometer K2自动细胞计数器(Nexcelom Bioscience,Lawrence,MA)对TIL样品进行计数和检测活力。在一些实施方式中,根据Cellometer K2Image Cytometer Automatic Cell Counter方案测定活力。

[0781] T和B淋巴细胞的多种抗原受体通过有限但大量的基因片段的体细胞重组来产生。这些基因片段:V(可变段)、D(多样段)、J(连接段)和C(恒定段)确定免疫球蛋白和T细胞受体(TCR)的结合特异性和下游应用。本发明提供了产生TIL的方法,其显示并增加T细胞库的多样性。在一些实施方式中,通过本方法获得的TIL显示出T细胞库多样性的增加。在一些实施方式中,第二次扩增获得的TIL显示出T细胞库多样性的增加。在一些实施方式中,多样性的增加是免疫球蛋白多样性和/或T细胞受体多样性的增加。在一些实施方式中,免疫球蛋白多样性是免疫球蛋白重链多样性。在一些实施方式中,免疫球蛋白多样性是免疫球蛋白轻链多样性。在一些实施方式中,多样性是T细胞受体多样性。在一些实施方式中,多样性是选自α、β、γ和δ受体之一的T细胞受体的多样性。在一些实施方式中,T细胞受体(TCR)α和/或β的表达增加。在一些实施方式中,T细胞受体(TCR)α的表达增加。在一些实施方式中,T细胞受体(TCR)β的表达增加。在一些实施方式中,TCRab(即TCRα/β)的表达增加。

[0782] 在一些实施方式中,如下文所详述,快速第二次扩增培养基(例如有时称为CM2或第二细胞培养基)包含IL-2、OKT-3以及抗原呈递饲养细胞(APC)。在一些实施方式中,如下文所详述,快速第二次扩增培养基(例如有时称为CM2或第二细胞培养基)包含6000IU/mL IL-2、30μg/瓶OKT-3以及7.5×10^8个抗原呈递饲养细胞(APC)。在一些实施方式中,如下文所详述,快速第二次扩增培养基(例如有时称为CM2或第二细胞培养基)包含IL-2、OKT-3以及抗原呈递饲养细胞(APC)。在一些实施方式中,如下文所详述,快速第二次扩增培养基(例如有时称为CM2或第二细胞培养基)包含6000IU/mL IL-2、30μg/瓶OKT-3以及5×10^8个抗原呈递饲养细胞(APC)。

[0783] 在一些实施方式中,快速第二次扩增(例如根据图85(特别是例如图85B)的步骤D)在封闭系统生物反应器中进行。在一些实施方式中,如本文所述,将封闭系统用于TIL扩增。在一些实施方式中,采用生物反应器。在一些实施方式中,生物反应器用作容器。在一些实施方式中,例如,采用的生物反应器是G-REX-100或G-REX-500。在一些实施方式中,采用的生物反应器是G-REX-100。在一些实施方式中,采用的生物反应器是G-REX-500。

[0784] 1、饲养细胞和抗原呈递细胞

[0785] 在一个实施方式中,在REP TIL扩增期间和/或快速第二次扩增期间,本文所述的快速第二次扩增程序(例如包括图85(特别是例如图85B)步骤D中所述的扩增以及称为REP的扩增)需要过量的饲养细胞。在许多实施方式中,饲养细胞是获自健康献血者的标准全血单位的外周血单核细胞(PBMC)。PBMC使用标准方法(例如Ficoll-Paque梯度分离)获得。

[0786] 通常,如实施例中所述,通过辐射或热处理使同种异体PBMC失活并用于REP程序中,实施例提供了评估辐照同种异体PBMC的复制机能不全的示例性方案。

[0787] 在一些实施方式中,如果第7天或第14天的活细胞总数小于REP第0天和/或第二次扩增第0天(即第二次扩增的开始日)投入培养的初始活细胞数,则认为PBMC复制机能不全并接受PBMC用于本文所述的TIL扩增程序。

[0788] 在一些实施方式中,如果在第7天或第14天在OKT3和IL-2存在下培养的活细胞总数与REP第0天和/或第二次扩增第0天(即第二次扩增的开始日)投入培养的初始活细胞数相比没有增加,则认为PBMC复制机能不全并接受PBMC用于本文所述的TIL扩增程序。在一些实施方式中,在30ng/mL OKT3抗体和3000IU/mL IL-2的存在下培养PBMC。在一些实施方式中,在30ng/mL OKT3抗体和6000IU/mL IL-2的存在下培养PBMC。在一些实施方式中,在15ng/mL OKT3抗体和3000IU/mL IL-2的存在下培养PBMC。在一些实施方式中,在15ng/mL OKT3抗体和6000IU/mL IL-2的存在下培养PBMC。在一些实施方式中,在60ng/mL OKT3抗体和3000IU/mL IL-2的存在下培养PBMC。在一些实施方式中,在60ng/mL OKT3抗体和6000IU/mL IL-2的存在下培养PBMC。

[0789] 在一些实施方式中,如果在第7天或第14天在OKT3和IL-2存在下培养的活细胞总数与REP第0天和/或第二次扩增第0天(即第二次扩增的开始日)投入培养的初始活细胞数相比没有增加,则认为PBMC复制机能不全并接受PBMC用于本文所述的TIL扩增程序。在一些实施方式中,在30ng/mL至60ng/mL OKT3抗体和1000IU/mL至6000IU/mL IL-2的存在下培养PBMC。在一些实施方式中,在30ng/mL至60ng/mL OKT3抗体和2000IU/mL至5000IU/mL IL-2的存在下培养PBMC。在一些实施方式中,在30ng/mL至60ng/mL OKT3抗体和2000IU/mL至4000IU/mL IL-2的存在下培养PBMC。在一些实施方式中,在30ng/mL至60ng/mL OKT3抗体和2500IU/mL至3500IU/mL IL-2的存在下培养PBMC。在一些实施方式中,在30ng/mL至60ng/mL OKT3抗体和6000IU/mL IL-2的存在下培养PBMC。

[0790] 在一些实施方式中,抗原呈递饲养细胞是PBMC。在一些实施方案中,抗原呈递饲养细胞是人工抗原呈递饲养细胞。在一个实施方式中,在第二次扩增中,TIL比抗原呈递饲养细胞的比率为约1:25、约1:50、约1:100、约1:125、约1:150、约1:175、约1:200、约1:225、约1:250、约1:275、约1:300、约1:325、约1:350、约1:375、约1:400,或约1:500。在一个实施方式中,在第二次扩增中,TIL比抗原呈递饲养细胞的比率为1:50至1:300。在一个实施方式中,在第二次扩增中,TIL比抗原呈递饲养细胞的比率为1:100至1:200。

[0791] 在一个实施方式中,本文所述的第二次扩增程序需要约5×10^8个饲养细胞:约100×10^6个TIL的比率。在一个实施方式中,本文所述的第二次扩增程序需要约7.5×10^8个饲养细胞:约100×10^6个TIL的比率。在另一个实施方式中,本文所述的第二次扩增程序需要约5×10^8个饲养细胞:约50×10^6个TIL的比率。在另一个实施方式中,本文所述的第二次扩增程序需要约7.5×10^8个饲养细胞:约50×10^6个TIL的比率。在又一个实施方式中,本文所述的

第二次扩增程序需要约5×10^8个饲养细胞:约25×10^6个TIL。在又一个实施方式中,本文所述的第二次扩增程序需要约7.5×10^8个饲养细胞:约25×10^6个TIL。在又一个实施方式中,快速第二次扩增需要的饲养细胞数量是快速第二次扩增的两倍。在又一个实施方式中,当本文所述的启动第一次扩增需要约2.5×10^8个饲养细胞时,快速第二次扩增需要约5×10^8个饲养细胞。在又一个实施方式中,当本文所述的启动第一次扩增需要约2.5×10^8个饲养细胞时,快速第二次扩增需要约7.5×10^8个饲养细胞。在又一个实施方式中,快速第二次扩增需要启动第一次扩增的两倍(2.0X)、2.5X、3.0X,3.5X或4.0X的饲养细胞数量。

[0792] 在一个实施方式中,在快速第二次扩增期间,本文所述的快速第二次扩增程序需要过量的饲养细胞。在许多实施方式中,饲养细胞是获自同种异体健康献血者的标准全血单位的外周血单核细胞(PBMC)。PBMC使用标准方法(例如Ficoll-Paque梯度分离)获得。在一个实施方式中,使用人工抗原呈递(aAPC)细胞代替PBMC。在一些实施方式中,将PBMC以两倍于被添加至启动第一次扩增的PBMC的浓度添加至快速第二次扩增。

[0793] 通常,同种异体PBMC经辐射或热处理灭活,用于本文所述的TIL扩增程序,包括附图和实施例中所述的示例性程序。

[0794] 在一个实施方式中,在快速第二次扩增中使用人工抗原呈递细胞替代PBMC或与PBMC组合。

[0795] 2、细胞因子

[0796] 如本领域中已知的,本文所述的快速第二次扩增方法通常使用具有高剂量细胞因子(特别是IL-2)的培养基。

[0797] 或者,如WO2015/189356和WO2015/189357(在此明确地全文引入作为参考)中所通常概述的,另外还可使用细胞因子的组合(IL-2、IL-15和IL-21中的两种或更多种的组合)进行TIL的快速第二次扩增。因此,可能的组合包括IL-2和IL-15、IL-2和IL-21、IL-15和IL-21以及IL-2、IL-15和IL-21,其中,后者在许多实施方式中均有特定用途。细胞因子组合的使用特别有利于淋巴细胞的产生,特别是本文所述T细胞的产生。

[0798] E、步骤E:收获TIL

[0799] 在快速第二次扩增步骤之后,可以收获细胞。在一些实施方式中,例如如图85(特别是例如图85B)中所述,在一次、两次、三次、四次或更多次扩增步骤之后收获TIL。在一些实施方式中,例如如图85(特别是例如图85B)中所述,在两次扩增步骤之后收获TIL。在一些实施方式中,例如如图85(特别是例如图85B)中所述,在两次扩增步骤、一次启动第一次扩增和一次快速第二次扩增之后收获TIL。

[0800] TIL可以任何适当和无菌的方式收获,包括例如通过离心。TIL收获的方法在本领域中是众所周知的,本过程可采用任何此类已知方法。在一些实施方式中,使用自动化系统收获TIL。

[0801] 细胞收集器(Cell harvester)和/或细胞处理系统可从多种来源商购,包括例如Fresenius Kabi、Tomtec Life Science、Perkin Elmer和Inotech Biosystems International,Inc.。任何基于细胞的收集器均可用于本发明方法。在一些实施方式中,细胞收集器和/或细胞处理系统是基于膜的细胞收集器。在一些实施方式中,通过细胞处理系统,例如LOVO系统(Fresenius Kabi制造),收获细胞。术语“LOVO细胞处理系统”还指任何供应商制造的可在无菌和/或封闭系统环境中泵送包含细胞的溶液通过膜或过滤器(如旋转

膜或旋转过滤器)的任何仪器或设备,允许用于连续流动和细胞处理,以去除不含沉淀的上清液或细胞培养基。在一些实施方式中,细胞收集器和/或细胞处理系统可在封闭的无菌系统中进行细胞分离、洗涤、流体交换、浓缩和/或其他细胞处理步骤。

[0802] 在一些实施方式中,快速第二次扩增(例如根据图85(特别是例如图85B)的步骤D)在封闭系统生物反应器中进行。在一些实施方式中,如本文所述,将封闭系统用于TIL扩增。在一些实施方式中,采用生物反应器。在一些实施方式中,生物反应器用作容器。在一些实施方式中,例如,采用的生物反应器是G-REX-100或G-REX-500。在一些实施方式中,采用的生物反应器是G-REX-100。在一些实施方式中,采用的生物反应器是G-REX-500。

[0803] 在一些实施方式中,根据本文所述过程进行根据图85(特别是例如图85B)的步骤E。在一些实施方式中,在无菌条件下通过注射器连接封闭系统,以维持系统的无菌性和封闭性。在一些实施方式中,采用如本文所述的封闭系统。

[0804] 在一些实施方式中,根据本文所述的方法收获TIL。在一些实施方式中,使用本文所述的方法收获第14天至第16天的TIL。在一些实施方式中,使用本文所述的方法在第14天时收获TIL。在一些实施方式中,使用本文所述的方法在第15天时收获TIL。在一些实施方式中,使用本文所述的方法在第16天时收获TIL。

[0805] F、步骤F:最终制剂/转移至输液袋

[0806] 在以图85(特别是例如图85B)中的示例性顺序提供的步骤A至E且如上文和此处所详述地那样完成之后,将细胞转移至用于给患者施用的容器中。在一些实施方式中,一旦使用上述扩增方法获得了治疗上足够数量的TIL,就将它们转移到容器中以用于向患者施用。

[0807] 在一个实施方式中,使用本公开的方法扩增的TIL作为药物组合物施用于患者。在一个实施方式中,药物组合物是TIL在无菌缓冲液中的悬液。如本文公开的扩增的TIL可通过本领域已知的任何合适的途径施用。在一些实施方式中,TIL以单次动脉内或静脉内输注的形式施用,其优选持续约30至60分钟。其他合适的施用途径包括腹膜内、鞘内和淋巴管内。

[0808] 在一个实施方式中,使用前述公开内容的方法扩增的TIL可作为还包含冻存剂的组合物来施用。在一个实施方式中,使用前述公开内容的方法扩增的TIL可作为还包含冻存剂和等渗剂的组合物施用。在一个实施方式中,使用前述公开内容的方法扩增的TIL可作为还包含冻存剂和等渗剂组合物施用,所述冻存剂包括二甲基亚砜,所述等渗剂包括氯化钠、葡萄糖酸钠和乙酸钠。在一个实施方式中,使用前述公开内容的方法扩增的TIL可作为还包含冻存剂和等渗剂组合物施用,所述冻存剂包括二甲基亚砜和右旋糖酐40,所述等渗剂包括氯化钠、葡萄糖酸钠和乙酸钠。在一个实施方式中,使用前述公开的方法扩增的TIL可作为在无菌输液袋中递送的组合物施用,这种组合物还包含冻存剂和等渗剂,所述冻存剂包括二甲基亚砜和右旋糖酐40的冻存剂,所述等渗剂包括氯化钠、葡萄糖酸钠和乙酸钠。

[0809] G、PBMC饲养细胞比率

[0810] 在一些实施方式中,在本文所述的扩增方法中使用的培养基(例如参见图85(特别是例如图85B))包括抗CD3抗体,例如OKT-3。抗CD3抗体与IL-2结合可诱导TIL群中T细胞活化和细胞分裂。全长抗体以及Fab和F(ab′)2片段均可观察到此种效果,前者通常是优选的。参见例如Tsoukas等,J.Immunol.1985,135,1719,其全部内容通过引用整体并入本文。

[0811] 在一个实施方式中,PBMC饲养细胞层的数量计算如下:

[0812] A.T细胞的体积(直径10μm):V＝(4/3)πr^3＝523.6μm^3

[0813] B.G-Rex 100(M)圆柱,高度为40μm(4个细胞):V＝(4/3)πr^3＝4×10^{12}μm^3

[0814] C.填充B圆柱所需的细胞数量:4×10^{12}μm^3/523.6μm^3＝7.6x108μm^3*0.64＝4.86×10^8

[0815] D.可在4D空间中最佳活化的细胞数量:4.86×10^8/24＝20.25×10^6

[0816] E.推出G-Rex 500的饲养细胞和TIL的数量:TIL:100×10^6,饲养细胞:2.5×10^9

[0817] 在该计算中,使用了提供圆柱(底面为100cm^2)中活化TIL的二十面体几何体所需的单核细胞的近似数量。计算得出了T细胞阈值活化的实验结果(~5×10^8),该结果与NCI实验数据(1)非常相似。(C)乘数(0.64)是Jaeger和Nagel在1992年(2)计算的等效球体的随机堆积密度。(D)除数24是可在4维空间中接触相似物体的等效球体的数量“牛顿数”(3)。

[0818] (1)Jin,Jianjian,et.al.,Simplified Method of the Growth of Human Tumor Infiltrating Lymphocytes(TIL)in Gas-Permeable Flasks to Numbers Needed for Patient Treatment.J Immunother.2012Apr;35(3):283-292.

[0819] (2)Jaeger HM,Nagel SR.Physics of the granular state.Science.1992Mar 20;255(5051):1523-31.

[0820] (3)O.R.Musin(2003).“The problem of the twenty-five spheres”.Russ.Math.Surv.58(4):794-795.

[0821] 在一个实施方式中,启动第一次扩增期间外源提供的抗原呈递饲养细胞的数量为快速第二次扩增期间外源提供的抗原呈递饲养细胞的约一半。在某些实施方式中,该方法包括在包含与快速第二次扩增的细胞培养基相比少约50％的抗原呈递细胞的细胞培养基中进行启动第一次扩增。

[0822] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的抗原呈递饲养细胞(APC)的数量大于在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量。

[0823] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约20:1。

[0824] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约10:1。

[0825] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约9:1。

[0826] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约8:1。

[0827] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约7:1。

[0828] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约6:1。

[0829] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约5:1。

[0830] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约4:1。

[0831] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约3:1。

[0832] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.9:1。

[0833] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.8:1。

[0834] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.7:1。

[0835] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.6:1。

[0836] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.5:1。

[0837] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.4:1。

[0838] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.3:1。

[0839] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.2:1。

[0840] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.1:1。

[0841] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2:1。

[0842] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约10:1。

[0843] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约5:1。

[0844] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约4:1。

[0845] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约3:1。

[0846] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.9:1。

[0847] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.8:1。

[0848] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.7:1。

[0849] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.6:1。

[0850] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第

一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.5:1。

[0851] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.4:1。

[0852] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.3:1。

[0853] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.2:1。

[0854] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.1:1。

[0855] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率为等于或约2:1。

[0856] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量与在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量的比率为等于或约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。

[0857] 在另一个实施方式中,在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量为等于或约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、2.9×108、3×10^8、3.1×10^8、3.2×10^8、3.3×10^8、3.4×10^8或3.5×10^8APC,在快速第二次扩增期间外源提供的APC数量等于或为约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1×10^9APC。

[0858] 在另一个实施方式中,在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量选自等于或约1.5×10^8APC至等于或约3×10^8APC,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量选自等于或约4×10^8APC至等于或约7.5×10^8APC。

[0859] 在另一个实施方式中,在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量选自等于或约2×10^8APC至等于或约2.5×10^8APC,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量选自等于或约4.5×10^8APC至等于或约5.5×10^8APC。

[0860] 在另一个实施方式中,在启动第一次扩增期间外源提供的APC的数量为等于或约2.5×10^8APC,在快速第二次扩增期间外源提供的APC的数量为等于或约5×10^8APC。

[0861] 在一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天添加的APC(包括例如PBMC)的数量为启动第一次扩增的第7天(例如该方法的第7天)添加的PBMC数量的约一半。在某些实施方式中,该方法包括在启动第一次扩增的第0天将抗原呈递细胞添加到第一TIL群中,在第7天将

抗原呈递细胞添加到第二TIL群中,其中,在第0天添加的抗原呈递细胞的数量为在启动第一次扩增的第7天(例如该方法的第7天)添加的抗原呈递细胞数量的约50%。

[0862] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量大于在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量。

[0863] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增中外源提供的APC以选自等于或约1.0×10^6APC/cm^2至等于或约4.5×10^6APC/cm^2的密度接种到培养瓶中。

[0864] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增中外源提供的APC以选自等于或约1.5×10^6APC/cm^2至等于或约3.5×10^6APC/cm^2的密度接种到培养瓶中。

[0865] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增中外源提供的APC以选自等于或约2×10^6APC/cm^2至等于或约3×10^6APC/cm^2的密度接种到培养瓶中。

[0866] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增中外源提供的APC以等于或约2×10^6APC/cm^2的密度接种到培养瓶中。

[0867] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增中外源提供的APC以等于或约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4.5×10^6APC/cm^2的密度接种到培养瓶中。

[0868] 在另一个实施方式中,快速第二次扩增中外源提供的APC以选自等于或约2.5×10^6APC/cm^2至等于或约7.5×10^6APC/cm^2的密度接种到培养瓶中。

[0869] 在另一个实施方式中,快速第二次扩增中外源提供的APC以选自等于或约3.5×10^6APC/cm^2至等于或约6.0×10^6APC/cm^2的密度接种到培养瓶中。

[0870] 在另一个实施方式中,快速第二次扩增外源提供的APC以选自等于或约4.0×10^6APC/cm^2至等于或约5.5×10^6APC/cm^2的密度接种到培养瓶中。

[0871] 在另一个实施方式中,快速第二次扩增外源提供的APC以等于或约4.0×10^6APC/cm^2的密度接种到培养瓶中。

[0872] 在另一个实施方式中,快速第二次扩增中外源提供的APC以等于或约2.5×10^6APC/cm^2、2.6×10^6APC/cm^2、2.7×10^6APC/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、4×106、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、6.5×106、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7.5×10^6APC/cm^2的密度接种到培养瓶中。

[0873] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增中外源提供的APC以等于或约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4.5×10^6APC/

cm^2的密度接种到培养瓶中;快速第二次扩增中外源提供的APC以等于或约2.5×10^6APC/cm^2、2.6×10^6APC/cm^2、2.7×10^6APC/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7.5×10^6APC/cm^2的密度接种到培养瓶中。

[0874] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增中外源提供的APC以选自等于或约1.0×10^6APC/cm^2至等于或约4.5×10^6APC/cm^2的密度接种到培养瓶中,快速第二次扩增中外源提供的APC以选自等于或约2.5×10^6APC/cm^2至等于或约7.5×10^6APC/cm^2的密度接种到培养瓶中。

[0875] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增中外源提供的APC以选自等于或约1.5×10^6APC/cm^2至等于或约3.5×10^6APC/cm^2的密度接种到培养瓶中,快速第二次扩增中外源提供的APC以选自等于或约3.5×10^6APC/cm^2至等于或约6×10^6APC/cm^2的密度接种到培养瓶中。

[0876] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增中外源提供的APC以选自等于或约2×10^6APC/cm^2至等于或约3×10^6APC/cm^2的密度接种到培养瓶中,快速第二次扩增中外源提供的APC以选自等于或约4×10^6APC/cm^2至等于或约5.5×10^6APC/cm^2的密度接种到培养瓶中。

[0877] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增中外源提供的APC以等于或约2×10^6APC/cm^2的密度接种在培养瓶中,快速第二次扩增中外源提供的APC以等于或约4×10^6APC/cm^2的密度接种在培养瓶中。

[0878] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约20:1。

[0879] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约1.11:1至等于或约10:1。

[0880] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约9:1。

[0881] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约8:1。

[0882] 在另一实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约7:1。

[0883] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约1.1:1至

等于或约6:1。

[0884] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约5:1。

[0885] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约4:1。

[0886] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约3:1。

[0887] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.9:1。

[0888] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.8:1。

[0889] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.7:1。

[0890] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.6:1。

[0891] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.5:1。

[0892] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.4:1。

[0893] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.3:1。

[0894] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.2:1。

[0895] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.1:1。

[0896] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约1.1:1至

等于或约2:1。

[0897] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约10:1。

[0898] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约5:1。

[0899] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约4:1。

[0900] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约3:1。

[0901] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.9:1。

[0902] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.8:1。

[0903] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.7:1。

[0904] 在另一实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.6:1。

[0905] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.5:1。

[0906] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.4:1。

[0907] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.3:1。

[0908] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.2:1。

[0909] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率选自等于或约2:1至等

于或约2.1:1。

[0910] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率为等于或约2:1。

[0911] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量与在启动第一次扩增的第0天外源提供的PBMC的数量的比率为等于或约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。

[0912] 在另一个实施方式中,在启动第一次扩增的第0天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量为等于或约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3.5×10^8APC(包括例如PBMC);在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量为等于或约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、7.1×108、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、9.6×108、9.7×10^8、9.8×10^8、9.9×10^8或1×10^9APC(包括例如PBMC)。

[0913] 在另一个实施方式中,在启动第一次扩增的第0天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量选自等于或约1×10^8APC(包括例如PBMC)至等于或约3.5×10^8APC(包括例如PBMC),在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量选自等于或约3.5×10^8APC(包括例如PBMC)至等于或约1×10^9APC(包括例如PBMC)。

[0914] 在另一个实施方式中,在启动第一次扩增的第0天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量选自等于或约1.5×10^8APC(包括例如PBMC)至等于或约3×10^8APC(包括例如PBMC),在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量选自等于或约4×10^8APC(包括例如PBMC)至等于或约7.5×10^8APC(包括例如PBMC)。

[0915] 在另一个实施方式中,在启动第一次扩增的第0天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量选自等于或约2×10^8APC(包括例如PBMC)至等于或约2.5×10^8APC(包括例如PBMC),在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量选自等于或约4.5×10^8APC(包括例如PBMC)至等于或约5.5×10^8APC(包括例如PBMC)。

[0916] 在另一个实施方式中,在启动第一次扩增的第0天外源提供的APC(包括例如PBMC)的数量为等于或约2.5×10^8APC(包括例如PBMC),在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)为等于或约5×10^8APC(包括例如PBMC)。

[0917] 在一个实施方式中,在启动第一次扩增的第0天添加的APC(包括例如PBMC)层的数量为在快速第二次扩增的第7天添加的APC(包括例如PBMC)层的数量的约一半。在某些实施方式中,该方法包括:在启动第一次扩增的第0天将抗原呈递细胞层添加到第一TIL群中,在

第7天将抗原呈递细胞层添加到第二TIL群中,其中,在第0天添加的抗原呈递细胞层的数量为在第7天添加的抗原呈递细胞层的数量的约50%。

[0918] 在另一个实施方式中,在快速第二次扩增的第7天外源提供的APC(包括例如PBMC)层的数量大于在启动第一次扩增的第0天外源提供的APC(包括例如PBMC)层的数量。

[0919] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在平均厚度为等于或约2个细胞层的层状APC(包括例如PBMC)的存在下,快速第二次扩增的第7天发生在平均厚度为等于或约4个细胞层的层状APC(包括例如PBMC)的存在下。

[0920] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在平均厚度为等于或约1个细胞层的层状APC(包括例如PBMC)的存在下,快速第二次扩增的第7天发生在平均厚度为等于或约3个细胞层的层状APC(包括例如PBMC)的存在下。

[0921] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在平均厚度为等于或约1.5个细胞层至等于或约2.5个细胞层的层状APC(包括例如PBMC)的存在下,快速第二次扩增的第7天发生在平均厚度为等于或约3个细胞层的层状APC(包括例如PBMC)的存在下。

[0922] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在平均厚度为等于或约1个细胞层的层状APC(包括例如PBMC)的存在下,快速第二次扩增的第7天发生在平均厚度为等于或约2个细胞层的层状APC(包括例如PBMC)的存在下。

[0923] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在平均厚度为等于或约1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3个细胞层的层状APC(包括例如PBMC)的存在下,快速第二次扩增的第7天发生在平均厚度为等于或约3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8个细胞层的层状APC(包括例如PBMC)的存在下。

[0924] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在平均厚度为等于或约1个细胞层至等于或约2个细胞层的层状APC(包括例如PBMC)的存在下,快速第二次扩增的第7天发生在平均厚度为等于或约3个细胞层至等于或约10个细胞层的层状APC(包括例如PBMC)的存在下。

[0925] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在平均厚度为等于或约2个细胞层至等于或约3个细胞层的层状APC(包括例如PBMC)的存在下,快速第二次扩增的第7天发生在平均厚度为等于或约4个细胞层至等于或约8个细胞层的层状APC(包括例如PBMC)的存在下。

[0926] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在平均厚度为等于或约2个细胞层的层状APC(包括例如PBMC)的存在下,快速第二次扩增的第7天发生在平均厚度为等于或约4个细胞层至等于或约8个细胞层的层状APC(包括例如PBMC)的存在下。

[0927] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在平均厚度为等于或约1、2或3个细胞层的层状APC(包括例如PBMC)的存在下,快速第二次扩增的第7天发生在平均厚度为等于或约3、4、5、6、7、8、9或10个细胞层的层状APC(包括例如PBMC)的存在下。

[0928] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第一层数量的第一平均厚度;并且,快速第

二次扩增的第7天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第二层数量的第二平均厚度;其中,APC(包括例如PBMC)第一层数量与APC(包括例如PBMC)第二层数量的比率选自等于或约1:1.1至等于或约1:10。

[0929] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第一层数量的第一平均厚度;并且,快速第二次扩增的第7天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第二层数量的第二平均厚度;其中,APC(包括例如PBMC)第一层数量与APC(包括例如PBMC)第二层数量的比率选自等于或约1:1.1至等于或约1:8。

[0930] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第一层数量的第一平均厚度;并且,快速第二次扩增的第7天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第二层数量的第二平均厚度;其中,APC(包括例如PBMC)第一层数量与APC(包括例如PBMC)第二层数量的比率选自等于或约1:1.1至等于或约1:7。

[0931] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第一层数量的第一平均厚度;并且,快速第二次扩增的第7天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第二层数量的第二平均厚度;其中,APC(包括例如PBMC)第一层数量与APC(包括例如PBMC)第二层数量的比率选自等于或约1:1.1至等于或约1:6。

[0932] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第一层数量的第一平均厚度;并且,快速第二次扩增的第7天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第二层数量的第二平均厚度;其中,APC(包括例如PBMC)第一层数量与APC(包括例如PBMC)第二层数量的比率选自等于或约1:1.1至等于或约1:5。

[0933] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第一层数量的第一平均厚度;并且,快速第二次扩增的第7天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第二层数量的第二平均厚度;其中,APC(包括例如PBMC)第一层数量与APC(包括例如PBMC)第二层数量的比率选自等于或约1:1.1至等于或约1:4。

[0934] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第一层数量的第一平均厚度;并且,快速第二次扩增的第7天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第二层数量的第二平均厚度;其中,APC(包括例如PBMC)第一层数量与APC(包括例如PBMC)第二层数量的比率选自等于或约1:1.1至等于或约1:3。

[0935] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第一层数量的第一平均厚度;并且,快速第二次扩增的第7天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第二层数量的第二平均厚度;其中,APC(包括例如PBMC)第一层数量与APC(包括例如PBMC)第二层数量的比率选自等于或约1:1.1至等于或约1:2。

[0936] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在层状APC(包括例如PBMC)的

存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第一层数量的第一平均厚度;并且,快速第二次扩增的第7天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第二层数量的第二平均厚度;其中,APC(包括例如PBMC)第一层数量与APC(包括例如PBMC)第二层数量的比率选自等于或约1:1.2至等于或约1:8。

[0937] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第一层数量的第一平均厚度;并且,快速第二次扩增的第7天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第二层数量的第二平均厚度;其中,APC(包括例如PBMC)第一层数量与APC(包括例如PBMC)第二层数量的比率选自等于或约1:1.3至等于或约1:7。

[0938] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第一层数量的第一平均厚度;并且,快速第二次扩增的第7天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第二层数量的第二平均厚度;其中,APC(包括例如PBMC)第一层数量与APC(包括例如PBMC)第二层数量的比率选自等于或约1:1.4至等于或约1:6。

[0939] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第一层数量的第一平均厚度;并且,快速第二次扩增的第7天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第二层数量的第二平均厚度;其中,APC(包括例如PBMC)第一层数量与APC(包括例如PBMC)第二层数量的比率选自等于或约1:1.5至等于或约1:5。

[0940] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第一层数量的第一平均厚度;并且,快速第二次扩增的第7天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第二层数量的第二平均厚度;其中,APC(包括例如PBMC)第一层数量与APC(包括例如PBMC)第二层数量的比率选自等于或约1:1.6至等于或约1:4。

[0941] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第一层数量的第一平均厚度;并且,快速第二次扩增的第7天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第二层数量的第二平均厚度;其中,APC(包括例如PBMC)第一层数量与APC(包括例如PBMC)第二层数量的比率选自等于或约1:1.7至等于或约1:3.5。

[0942] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第一层数量的第一平均厚度;并且,快速第二次扩增的第7天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第二层数量的第二平均厚度;其中,APC(包括例如PBMC)第一层数量与APC(包括例如PBMC)第二层数量的比率选自等于或约1:1.8至等于或约1:3。

[0943] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第一层数量的第一平均厚度;并且,快速第二次扩增的第7天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第二层数量的第二平均厚度;其中,APC(包括例如PBMC)第一层数量与APC(包括例如PBMC)第二层数量的比率选自等于或约1:1.9至等于或约1:2.5。

[0944] 在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第一层数量的第一平均厚度;并且,快速第二次扩增的第7天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第二层数量的第二平均厚度;其中,APC(包括例如PBMC)第一层数量与APC(包括例如PBMC)第二层数量的比率等于或约1:2。在另一个实施方式中,启动第一次扩增的第0天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第一层数量的第一平均厚度;并且,快速第二次扩增的第7天发生在层状APC(包括例如PBMC)的存在下,该层状APC具有等于APC(包括例如PBMC)第二层数量的第二平均厚度;其中,APC(包括例如PBMC)第一层数量与APC(包括例如PBMC)第二层数量的比率等于或约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。

[0945] V.可选的细胞培养基成分

[0946] 1、抗CD3抗体

[0947] 在过程2A的一些实施方式中,本文所述扩增方法(包括称为REP的那些,参见例如图1)中使用的培养基也包含抗CD3抗体。抗CD3抗体与IL-2结合可诱导TIL群中的T细胞活化和细胞分裂。全长抗体以及Fab和F(ab')2片段均可看到这种效果,前者通常是优选的。参见例如Tsoukas等,J.Immunol.1985,135,1719,其全部内容通过引用整体并入本文。

[0948] 如本领域技术人员将理解的,有许多可用于本发明的合适的抗人CD3抗体,包括来自各种哺乳动物的抗人CD3多克隆和单克隆抗体,包括但不限于鼠科、人类、灵长目动物、大鼠和犬科抗体。在具体实施方式中,使用OKT3抗CD3抗体(可从Ortho-McNeil,Raritan,NJ或Miltenyi Biotech,Aubum,CA商购)。

[0949] 表4:莫罗单抗(示例性OKT-3抗体)的氨基酸序列

[0950]

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

[0951] 2、4-1BB(CD137)激动剂

[0952] 在一个实施方式中,TNFRSF激动剂是4-1BB(CD137)激动剂。4-1BB激动剂可为本领域已知的任何4-1BB结合分子。4-1BB结合分子可为能够结合人或哺乳动物4-1BB的单克隆抗体或融合蛋白。4-1BB激动剂或4-1BB结合分子可包含免疫球蛋白分子的任何同种型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、任何类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或任何亚类的免疫球蛋白重链。4-1BB激动剂或4-1BB结合分子可同时具有重链和轻链。如本文所用,术语“结合分子”还包括与4-1BB结合的抗体(包括全长抗体)、单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体或嵌合抗体以及抗体片段(例如,Fab片段、F(ab')片段、由Fab表达文库产生的片段、以上任一项的表位结合片段)以及抗体的工程形式(例如scFv分子)。在一个实施方式中,4-1BB激动剂是抗原结合蛋白,其是全人抗体。在一个实施方式中,4-1BB激动剂是抗原结合蛋白,其是人源化抗体。在一些实施方式中,用于本公开的方法和组合物中的4-1BB激动剂包括:抗4-1BB抗体、人抗4-1BB抗体、小鼠抗4-1BB抗体、哺乳动物抗4-1BB抗体、单克隆抗4-1BB抗体、多克隆抗4-1BB抗体、嵌合抗4-1BB抗体、抗4-1BB纤连蛋白(Adnectin)、抗4-1BB域抗体、单链抗4-1BB片段、重链抗-4-1BB片段、轻链抗4-1BB片段、抗4-1BB融合蛋白,以及它们的片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物。已知激动性抗4-1BB抗体诱导强烈的免疫反应。Lee等,PLOS One 2013,8,e69677。在一个优选的实施方式中,4-1BB激动剂是激动性抗4-1BB人源化或全人单克隆抗体(即,源自单个细胞系的抗体)。在一个实施方式中,4-1BB激动剂是EU-101(Eutilex Co.Ltd.)、乌托鲁单抗或乌瑞鲁单抗或其片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物。在一个优选的实施方式中,4-1BB激动剂是乌托鲁单抗或乌瑞鲁单抗或其片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物。

[0953] 在一个优选的实施方式中,4-1BB激动剂或4-1BB结合分子也可为融合蛋白。在一个优选的实施方式中,与激动性单克隆抗体(其通常具有两个配体结合结构域)相比,多聚体4-1BB激动剂(例如,(具有三个或六个配体结合结构域的)三聚体或六聚体4-1BB激动剂)可诱导优异的受体(4-1BBL)聚集和内部细胞信号复合物形成。包含三个TNFRSF结合结构域和IgG1-Fc和可选地进一步连接两个以上这些融合蛋白的三聚体(三价)或六聚体(或六价)或更大的融合蛋白描述于例如Gieffers等,Mol.Cancer Therapeutics 2013,12,2735-47。

[0954] 已知激动性4-1BB抗体和融合蛋白诱导强烈的免疫应答。在一个优选的实施方式中,4-1BB激动剂是以足以减少毒性的方式特异性结合4-1BB抗原的单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方式中,4-1BB激动剂是消除抗体依赖性细胞毒性(ADCC)(例如NK细胞的细胞毒性)的激动性4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方式中,4-1BB激动剂是消除抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的激动性4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方式中,4-1BB激动剂是消除补体依赖性细胞毒性(CDC)的激动性4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方式中,4-1BB激动剂是消除Fc区功能性的激动性4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。

[0955] 在一些实施方式中,4-1BB激动剂的特征在于以高亲和力和激动性活性结合人4-1BB(SEQ ID NO:9)。在一个实施方式中,4-1BB激动剂是与人4-1BB(SEQ ID NO:9)结合的结合分子。在一个实施方式中,4-1BB激动剂是与鼠4-1BB(SEQ ID NO:10)结合的结合分子。表DD总结了与4-1BB激动剂或结合分子结合的4-1BB抗原的氨基酸序列。

[0956] 表5:4-1BB抗原的氨基酸序列

[0957]

识别号	序列（单字母氨基酸符号）
SEQ ID NO：9 人4-1BB，肿瘤坏死因子受体超家族，成员9（智人）	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRFPEEEE GGCEL 255
SEQ ID NO：10 鼠4-1BB，肿瘤坏死因子受体超家族，成员9（小家鼠）	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 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

[0958] 在一些实施方式中,所述的组合物、过程和方法包括K_D为约100pM以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、K_D为约100pM以下的结合人或鼠4-1BB、K_D为90pM以下、K_D为约80pM以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、K_D为约70pM以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、K_D为约60pM以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、K_D为约50pM以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、K_D为约40pM以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂或K_D为约30pM以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂。

[0959] 在一些实施方式中,所述的组合物、过程和方法包括k_{assoc}为约7.5×10^5 1/M·s以上的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、k_{assoc}为约7.5×10^5 1/M·s以上的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、k_{assoc}为约8×10^5 1/M·s以上的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、k_{assoc}为约8.5×10^5 1/M·s以上的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、k_{assoc}为约$9\times10^5$1/M·s以上的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、k_{assoc}为约9.5×10^5 1/M·s以上的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂或k_{assoc}为约1×10^6 1/M·s以上的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂。

[0960] 在一些实施方式中,所述的组合物、过程和方法包括k_{dissoc}为约2×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、k_{dissoc}为约2.1×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、k_{dissoc}为约2.2×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、k_{dissoc}为约2.3×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、k_{dissoc}为约2.4×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、k_{dissoc}为约2.5×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、k_{dissoc}为约2.6×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、k_{dissoc}为约2.7×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、k_{dissoc}为约2.8×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、k_{dissoc}为约2.9×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂或k_{dissoc}为约3×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂。

[0961] 在一些实施方式中,所述的组合物、过程和方法包括IC_{50}为约10nM以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、IC_{50}为约9nM以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、IC_{50}为约8nM以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、IC_{50}为约7nM以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、IC_{50}为约6nM以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、IC_{50}为约5nM以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、IC_{50}为约4nM以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、IC_{50}为约3nM以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂、IC_{50}为约2nM以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂或IC_{50}为约1nM以下的结合人或鼠4-1BB的4-1BB激动剂。

[0962] 在一个优选的实施方式中,4-1BB激动剂是乌托鲁单抗(也称为PF-05082566或

MOR-7480)或其片段、衍生物、变体或生物类似物。乌托鲁单抗可从Pfizer,Inc.商购。乌托鲁单抗是免疫球蛋白G2-λ、抗[智人TNFRSF9(肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员9,4-1BB,T细胞抗原ILA,CD137)]、智人(全人)单克隆抗体。乌托鲁单抗的氨基酸序列于表EE。乌托鲁单抗包含:在Asn59和Asn292处的糖基化位点;在22-96位(V_H-V_L)、143-199位(C_H1-C_L)、256-316位(C_H2)和362-420位(C_H3)的重链链内二硫键;在22'-87'位(V_H-V_L)和136'-195'位(C_H1-C_L)的轻链链内二硫键;在IgG2A同工型218-218位、219-219位、222-222位和225-225位,在IgG2A/B同工型218-130位、219-219位、222-222位和225-225位,以及在IgG2B同工型219-130(2)位、222-222位和225-225位的链间重链-重链二硫键;以及在IgG2A同工型130-213′(2)位、IgG2A/B同工型218-213′位和130-213′以及IgG2B同工型218-213′(2)位的链间重链-轻链二硫键。乌托鲁单抗及其变体和片段的制备和性质描述于美国专利号8,821,867、8,337,850和9,468,678;以及国际专利申请公开号WO2012/032433A1,其各自公开内容通过引用并入本文。乌托鲁单抗的临床前特征描述于Fisher等,Cancer Immunolog.& Immunother.2012,61,1721-33。乌托鲁单抗在各种血液学和实体瘤适应症中的当前临床试验包括U.S.National Institutes of Health clinicaltrials.gov标识符NCT02444793、NCT01307267、NCT02315066和NCT02554812。

[0963] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含SEQ ID NO:11给出的重链和SEQ ID NO:12给出的轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包括分别具有SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所示序列或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、其变体或缀合物的重链和轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所示序列具有至少99%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所示序列具有至少98%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所示序列具有至少97%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所示序列具有至少96%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所示序列具有至少95%同一性的重链和轻链。

[0964] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂包括乌托鲁单抗的重链CDR和轻链CDR或可变区(VR)。在一个实施方式中,4-1BB激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:13所示的序列,4-1BB激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:14所示的序列,及它们的保守性氨基酸取代。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示序列具有至少99%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示序列具有至少98%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示序列具有至少97%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示序列具有至少96%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示序列具有至少95%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含scFv抗体,该scFv抗体包含分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示序列具有至少99%同一性的V_H和V_L区。

[0965] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别具有SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17所示序列及它们的保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及

分别具有SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20所示序列及它们的保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域。

[0966] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂是由药物监管机构参考乌托鲁单抗批准的4-1BB激动剂生物仿制药单克隆抗体。在一个实施方式中,生物仿制药单克隆抗体包括4-1BB抗体,该4-1BB抗体包含与参考药物产品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97%序列同一性(例如97%、98%、99%或100%序列同一性)且与参考药物产品或参考生物产品相比包含一种以上翻译后修饰的氨基酸序列,其中,参考药物产品或参考生物产品是乌托鲁单抗。在一些实施方式中,一种以上翻译后修饰选自糖基化、氧化、脱酰胺和截短中的一种以上。在一些实施方式中,生物仿制药是已授权或已提交授权的4-1BB激动剂抗体,其中,4-1BB激动剂抗体以不同于参考药物产品或参考生物产品制剂的制剂提供,其中,参考药物产品或参考生物产品是乌托鲁单抗。4-1BB激动剂抗体可得到药品监管机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)的授权。在一些实施方式中,生物仿制药以还包含一种以上赋形剂的组合物的形式提供,其中,一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中,参考药物产品或参考生物产品是乌托鲁单抗。在一些实施方式中,生物仿制药以还包含一种以上赋形剂的组合物的形式提供,其中,一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中,参考药物产品或参考生物产品是乌托鲁单抗。

[0967] 表6:与乌托鲁单抗有关的4-1BB激动剂抗体的氨基酸序列

[0968]

识别号	序列(单字母氨基酸符号)
SEQ ID NO:11 乌托鲁单抗的重链	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTNY 60 SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK 120 GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS 180 LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP 240 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV 300 LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL 360 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP P MLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC 420 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G 441
SEQ ID NO:12 乌托鲁单抗的轻链	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF 120 PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL 180 SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS 214
SEQ ID NO:13 乌托	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN 60

[0969]

鲁单抗的重链可变区	YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS	118
SEQ ID NO：14 乌托鲁单抗的轻链可变区	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL	60 108
SEQ ID NO：15 乌托鲁单抗的重链 CDR1	STYWIS	6
SEQ ID NO：16 乌托鲁单抗的重链 CDR2	KIYPGDSYTN YSPSFQG	17
SEQ ID NO：17 乌托鲁单抗的重链 CDR3	RGYGIFDY	8
SEQ ID NO：18 乌托鲁单抗的轻链 CDR1	SGDNIGDQYA H	11
SEQ ID NO：19 乌托鲁单抗的轻链 CDR2	QDKNRPS	7
SEQ ID NO：20 乌托鲁单抗的轻链 CDR3	ATYTGFGSLA V	11

[0970] 在一个优选的实施方式中,4-1BB激动剂是单克隆抗体乌瑞鲁单抗(也称为BMS-663513和20H4.9.h4a)或其片段、衍生物、变体或生物类似物。乌瑞鲁单抗可从Bristol-Myers Squibb,Inc.和Creative Biolabs,Inc.商购。乌瑞鲁单抗是免疫球蛋白G4-κ、抗[智人TNFRSF9(肿瘤坏死因子受体超家族成员9,4-1BB,T细胞抗原ILA,CD137)]、智人(全人)单克隆抗体。乌瑞鲁单抗的氨基酸序列列于表EE。乌瑞鲁单抗包含:在298(和298')位的N-糖基化位点;在22-95位(V_H-V_L)、148-204位(C_H1-C_L)、262-322位(C_H2)和368-426位(C_H3)(以及22"-95"位、148"-204"位、262"-322"位和368"-426"位)的重链链内二硫键;在23'-88'位(V_H-V_L)和136'-196'位(C_H1-C_L)(以及23"'-88"'位和136"'-196"'位的轻链链内二硫桥;在227-227'位和230-230"位的链间重链-重链二硫键;以及在135-216'和135'-216"位的链间重链-轻链二硫键。乌瑞鲁单抗及其变体和片段的制备和性质描述于美国专利号7,288,638和8,962,804中,其公开内容通过引用并入本文。乌瑞鲁单抗的临床前和临床特征描述于Segal等,Clin.Cancer Res.2016,可获自http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1272。乌瑞鲁单抗在多种血液学和实体瘤适应症中的当前临床试验包括U.S.National Institutes of Health clinicaltrials.gov标识符NCT01775631、NCT02110082、NCT02253992和NCT01471210。

[0971] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含SEQ ID NO:21给出的重链和SEQ ID NO:22给出的轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别具有SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所示序列或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或缀合物的重链和轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所示序列具有至少99%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所示序列具有至少98%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所示序列具有至少97%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所示序列具有至少96%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所示序列具有至少95%同一性的重链和轻链。

[0972] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含乌瑞鲁单抗的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一个实施方式中,4-1BB激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:23所示的序列,4-

1BB激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:24所示的序列,及其保守的氨基酸取代。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24所示序列具有至少99%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24所示序列具有至少98%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24所示序列具有至少97%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24所示序列具有至少96%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24所示序列具有至少95%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包括scFv抗体,该scFv抗体分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24所示序列具有至少99%同一性的V_H和V_L区。

[0973] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别具有SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27所示序列且和其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及分别具有SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30所示序列和其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域。

[0974] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂是药物监管机构参考乌瑞鲁单抗批准的4-1BB激动剂生物仿制药单克隆抗体。在一个实施方式中,生物仿制药单克隆抗体包括4-1BB抗体,该4-1BB抗体包含与参考药物产品或参考生物产品具有至少97%序列同一性(例如97%、98%、99%或100%序列同一性)且与参考药物产品或参考生物产品相比包含一种以上翻译后修饰的氨基酸序列,其中,参考药物产品或参考生物产品是乌瑞鲁单抗。在一些实施方式中,一种以上翻译后修饰选自糖基化、氧化、脱酰胺和截短中的一种以上。在一些实施方式中,生物仿制药是已授权或已提交授权的4-1BB激动剂抗体,其中,4-1BB激动剂抗体制剂不同于参考药物产品或参考生物产品制剂,其中,参考药物产品或参考生物产品为乌瑞鲁单抗。4-1BB激动剂抗体可得到药品监管机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)的授权。在一些实施方式中,生物仿制药以还包含一种以上赋形剂的组合物的形式提供,其中,一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中,参考药物产品或参考生物产品是乌瑞鲁单抗。在一些实施方式中,生物仿制药以还包含一种以上赋形剂的组合物的形式提供,其中,一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中,参考药物产品或参考生物产品是乌瑞鲁单抗。

[0975] 表7:与乌瑞鲁单抗有关的4-1BB激动剂抗体的氨基酸序列

[0976]

识别号	序列（单字母氨基酸符号）
SEQ ID NO：21 乌瑞鲁单抗的重链	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN 60 PSLESRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK 448
SEQ ID NO：22 乌瑞鲁单抗的轻链	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF 120 PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST 180 LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC 216
SEQ ID NO：23 乌瑞鲁单抗的重链可变区	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP 60 EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP 120
SEQ ID NO：24 乌瑞鲁单抗轻链可变区	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP 60 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ 110
SEQ ID NO：25 乌瑞鲁单抗的重链 CDR1	GYYWS 5
SEQ ID NO：26 乌瑞鲁单抗的重链 CDR2	EINHGGYVTY NPSLES 16
SEQ ID NO：27 乌瑞鲁单抗的重链 CDR3	DYGPGNYDWY FDL 13
SEQ ID NO：28 乌瑞鲁单抗的轻链 CDR1	RASQSVSSYL A 11
SEQ ID NO：29 乌瑞鲁单抗的轻链 CDR2	DASNRAT 7
SEQ ID NO：30 乌瑞鲁单抗的轻链 CDR3	QQRSDWPPAL T 11

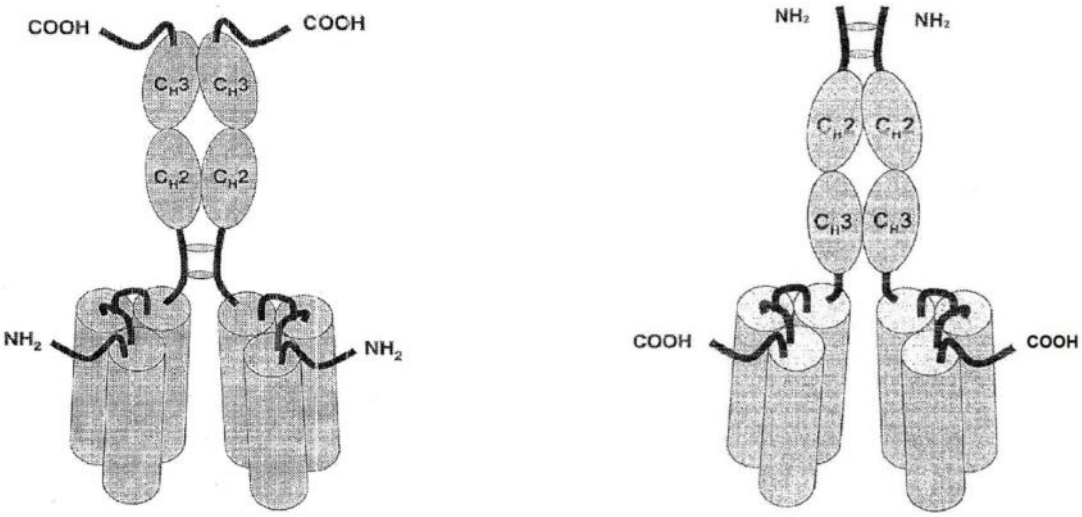
[0977] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂选自:1D8、3Elor、4B4(BioLegend 309809)、H4-1BB-M127(BD Pharmingen 552532)、BBK2(Thermo Fisher MS621PABX)、145501(Leinco Technologies B591)、保藏于ATCC号HB-11248的细胞系产生并公开于美国专利号6,974,863的抗体、5F4(BioLegend 31 1503)、C65-485(BD Pharmingen 559446)、美国专利申请公开号US2005/0095244中公开的抗体、美国专利号7,288,638中公开的抗体(例如20H4.9-IgG1(BMS-663031))、美国专利号6,887,673中公开的抗体(例如4E9或BMS-554271)、美国专利号7,214,493中公开的抗体、美国专利号6,303,121中公开的抗体、美国专利号6,569,997中公开的抗体、美国专利号6,905,685中公开的抗体(例如4E9或BMS-554271)、美国专利号6,362,325中公开的抗体(例如1D8或BMS-469492;3H3或BMS-469497;或3E1)、美国专利号6,974,863中公开的抗体(例如53A2);美国专利6,210,669中公开的抗体(例如1D8、3B8或3E1)、美国专利5,928,893中描述的抗体、美国专利6,303,121中公开的抗体、美国专利6,569,997中公开的抗体、国际专利申请公开号WO2012/177788、WO2015/119923和WO2010/042433中公开的抗体,及它们的片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物,其中,前述专利或专利申请出版物中的各自公开内容通过引用整体并入本文。

[0978] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂是描述于国际专利申请公开号WO2008/

025516A1、WO2009/007120A1、WO2010/003766A1、WO2010/010051A1和WO2010/078966A1;美国专利申请公开号US2011/0027218A1、US2015/0126709A1、US2011/0111494A1、US2015/0110734A1和US2015/0126710A1;以及美国专利号9,359,420、9,340,599、8,921,519和8,450,460的4-1BB激动性融合蛋白,其公开内容通过引用并入本文。

[0979] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂是如结构I-A(C末端Fc抗体片段融合蛋白)或结构I-B(N末端Fc抗体片段融合蛋白)所描述的4-1BB激动性融合蛋白,或其片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物:

[0980] (I-A) (I-B)



[0981] 在结构I-A和I-B中,圆柱体指单个多肽结合结构域。结构I-A和I-B包含三个线性连接的TNFRSF结合结构域,该结合结构域源自例如4-1BBL或与4-1BB结合的抗体,它们折叠形成三价蛋白,然后通过IgG1-Fc(包括C_H3和C_H2结构域)与第二个三价蛋白连接,然后用于通过二硫键(小的细长椭圆)将两个三价蛋白连接在一起,从而稳定结构并提供能够将六个受体的细胞内信号传导域和信号蛋白结合在一起形成信号复合体的激动剂。TNFRSF结合结构域(表示为圆柱体)可为scFv结构域,该scFv结构域包括例如通过接头连接的V_H和V_L链,该接头可包含亲水性残基和用于柔韧性的Gly和Ser序列以及用于溶解性的Glu和Lys。可使用任何scFv结构域设计,例如描述于de Marco,Microbial Cell Factories,2011,10,44;Ahmad等,Clin.&Dev.Immunol.2012,980250;Monnier等,Antibodies,2013,2,193-208;以及通过引用并入本文其他地方的那些。此种形式的融合蛋白结构描述于美国专利号9,359,420、9,340,599、8,921,519和8,450,460,其公开内容通过引用并入本文。

[0982] 表GG给出了结构I-A的其他多肽结构域的氨基酸序列。Fc结构域优选包含完整的恒定结构域(SEQ ID NO:31的氨基酸17-230)、完整的铰链结构域(SEQ ID NO:31的氨基酸1-16)或铰链结构域的一部分(例如SEQ ID NO:31的氨基酸4-16)。用于连接C末端Fc抗体的优选的接头可选自SEQ ID NO:32至SEQ ID NO:41给出的实施方式,包括适合于融合其他多肽的接头。

[0983] 表8:具有C末端Fc-抗体片段融合蛋白设计(结构I-A)的TNFRSF融合蛋白(包括4-1BB融合蛋白)的氨基酸序列

[0984]

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

[0985] 表9中给出了结构I-B的其他多肽结构域的氨基酸序列。如果Fc抗体片段融合至TNRFSF融合蛋白的N-末端(如结构I-B),则Fc模块的序列优选为SED ID NO:42所示的序列,接头序列优选选自SED ID NO:43至SEQ ID NO:45所示的那些实施方式。

[0986] 表9:具有N末端Fc抗体片段融合蛋白设计(结构I-B)的TNFRSF融合蛋白(包括4-1BB融合蛋白)的氨基酸序列

[0987]

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

[0988] 在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一个以上选自下组的4-1BB结合结构域:乌托鲁单抗的可变重链和可变轻链、乌瑞鲁单抗的可变重链和可变轻链、乌托鲁单抗的可变重链和可变轻链、选自表GG中所述可变重链和可变轻链的可变重链和可变轻链,前述可变重链和可变链的任一组合,以及它们的片段、衍生物、缀合物、变体和生物类似物。

[0989] 在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一个以上包含4-1BBL序列的4-1BB结合结构域。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一个以上包含根据SEQ ID NO:46的序列的4-1BB结合结构域。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一个以上包含可溶性4-1BBL序列的4-1BB结合结构域。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一

个以上包含根据SEQ ID NO:47的序列的4-1BB结合结构域。

[0990] 在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一个以上4-1BB结合结构域,该4-1BB结合结构域是包含FH和VL区的scFv结构域,该V_H和V_L区分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示序列具有至少95%同一性,其中,V_H和V_L结构域通过接头连接。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一个以上4-1BB结合结构域,该4-1BB结合结构域是包含V_H和V_L区的scFv结构域,该V_H和V_L区分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24所示序列具有至少95%同一性,其中,V_H和V_L结构域通过接头连接。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一个以上4-1BB结合结构域,该4-1BB结合结构域是包含V_H和V_L区的scFv结构域,该V_H和V_L区分别与表II中给出的V_H和V_L序列具有至少95%同一性,其中,V_H和V_L结构域通过接头连接。

[0991] 表10:用作融合蛋白中4-1BB结合结构域或用作scFv 4-1BB激动剂抗体的其他多肽结构域

[0992]

识别号	序列(单字母氨基酸符号)
SEQ ID NO: 46 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA 60 SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL 120 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA 180 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV 240 TPEIPAGLPS PRSE 254
SEQ ID NO: 47 4-1BBL可溶性结构域	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ 60 LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL 120 SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE 168
SEQ ID NO: 48 4B4-1-1版本1的重链可变区	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS 118

[0993]

SEQ ID NO: 49 4B4-1-1版本1的轻链可变区	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO: 50 4B4-1-1版本2的重链可变区	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA 119
SEQ ID NO: 51 4B4-1-1版本2的轻链可变区	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO: 52可变区H39E3-2的重链	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP 60 GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT 120
SEQ ID NO: 53 H39E3-2的轻链可变区	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL 60 WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA 110

[0994] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂是4-1BB激动性单链融合多肽,其包含(i)第一可溶性4-1BB结合结构域、(ii)第一肽接头、(iii)第二可溶性4-1BB结合结构域、(iv)第二肽接头和(v)第三可溶性4-1BB结合结构域,其还包含位于N末端和/或C末端的其他结构域,其中,该其他结构域是Fab或Fc片段结构域。在一个实施方式中,4-1BB激动剂是4-1BB激动性单链融合多肽,其包含(i)第一可溶性4-1BB结合结构域、(ii)第一肽接头、(iii)第二可溶

性4-1BB结合结构域、(iv)第二肽接头和(v)第三可溶性4-1BB结合结构域,其在N末端和/或C末端还包含一个其他结构域,其中,该其他结构域是Fab或Fc片段结构域;其中,每个可溶性4-1BB结构域均缺少茎(stalk)区(这有助于三聚作用并提供与细胞膜的一定距离,但不是4-1BB结合结构域的一部分),第一肽接头和第二个接头独立地具有3至8个氨基酸的长度。

[0995] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂是4-1BB激动性单链融合多肽,其包含(i)第一可溶性肿瘤坏死因子(TNF)超家族细胞因子结构域、(ii)第一肽接头,(iii)第二可溶性TNF超家族细胞因子结构域、(iv)第二肽接头和(v)第三可溶性TNF超家族细胞因子结构域,其中,每个可溶性TNF超家族细胞因子结构域均缺少茎区,第一肽接头和第二肽接头独立地具有3至8个氨基酸的长度,其中每个TNF超家族细胞因子结构域是4-1BB结合结构域。

[0996] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂是4-1BB激动性scFv抗体,其包含与任何前述V_L结构域连接的任何前述V_H结构域。

[0997] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂是BPS Bioscience目录号79097-2的4-1BB激动剂抗体,可从BPS Bioscience(San Diego,CA,USA)商购。在一个实施方式中,4-1BB激动剂是Creative Biolabs目录号MOM-18179的4-1BB激动剂抗体,可从的Creative Biolabs(Shirley,NY,USA)商购。

[0998] 3、OX40(CD134)激动剂

[0999] 在一个实施方式中,TNFRSF激动剂是OX40(CD134)激动剂。OX40激动剂可为本领域已知的任何OX40结合分子。OX40结合分子可为能够结合人或哺乳动物OX40的单克隆抗体或融合蛋白。OX40激动剂或OX40结合分子可包含免疫球蛋白分子的任何同种型(例如IgG1、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、任何类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或任何亚类的免疫球蛋白重链。OX40激动剂或OX40结合分子可同时具有重链和轻链。如本文所用,术语“结合分子”还包括与OX40结合的抗体(包括全长抗体)、单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体或嵌合抗体以及抗体片段(例如,Fab片段、F(ab')片段、由Fab表达文库产生的片段,以上任一项的表位结合片段)以及抗体的工程形式(例如scFv分子)。在一个实施方式中,OX40激动剂是抗原结合蛋白,其是全人抗体。在一个实施方式中,OX40激动剂是抗原结合蛋白,其是人源化抗体。在一些实施方式中,用于本公开的方法和组合物中的OX40激动剂包括:抗OX40抗体、人抗OX40抗体、小鼠抗OX40抗体、哺乳动物抗OX40抗体、单克隆抗OX40抗体、多克隆抗OX40抗体、嵌合抗OX40抗体、抗OX40纤连蛋白、抗OX40域抗体、单链抗OX40片段、重链抗OX40片段、轻链抗OX40片段、抗OX40融合蛋白,以及它们的片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物。在一个优选的实施方式中,OX40激动剂是激动性抗OX40人源化或全人单克隆抗体(即,源自单个细胞系的抗体)。

[1000] 在一个优选的实施方式中,OX40激动剂或OX40结合分子也可为融合蛋白。包含与OX40L融合的Fc结构域的OX40融合蛋白描述于例如Sadun等,J.Immunother.J.Immunol.2009,182,1481-89。在一个优选的实施方式中,与激动性单克隆抗体(其通常具有两个配体结合结构域)相比,多聚体OX40激动剂(例如,(具有三个或六个配体结合结构域的)三聚体或六聚体OX40激动剂)可诱导优异的受体(OX40L)聚类和内部细胞信号复合物形成。包含三个TNFRSF结合结构域和IgG1-Fc并且可选地进一步连接两个以

上这些融合蛋白的三聚体(三价)或六聚体(或六价)或更大的融合蛋白描述于例如Gieffers等,Mol.Cancer Therapeutics 2013,12,2735-47。

[1001] 已知激动性OX40抗体和融合蛋白诱导强烈的免疫应答。Curti等,Cancer Res.2013,73,7189-98。在一个优选的实施方式中,OX40激动剂是以足以减少毒性的方式特异性结合OX40抗原的单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方式中,OX40激动剂是激动性OX40单克隆抗体或融合蛋白,其消除了抗体依赖性细胞毒性(ADCC)(例如NK细胞的细胞毒性)。在一些实施方式中,OX40激动剂是消除抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的激动性OX40单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方式中,OX40激动剂是消除补体依赖性细胞毒性(CDC)的激动性OX40单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方式中,OX40激动剂是消除Fc区功能性的激动性OX40单克隆抗体或融合蛋白。

[1002] 在一些实施方式中,OX40激动剂的特征在于以高亲和力和激动性活性结合人OX40(SEQ ID NO:54)。在一个实施方式中,OX40激动剂是与人OX40(SEQ ID NO:54)结合的结合分子。在一个实施方式中,OX40激动剂是与鼠OX40(SEQ ID NO:55)结合的结合分子。表11总结了与OX40激动剂或结合分子结合的OX40抗原的氨基酸序列。

[1003] 表11:OX40抗原的氨基酸序列

[1004]

识别号	序列(单字母氨基酸符号)
SEQ ID NO:54人OX40(智人)	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ 60 NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK 120 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ 180 GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL 240 RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI 277
SEQ ID NO:55鼠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

[1005] 在一些实施方式中,所述的组合物、过程和方法包括K_D为约100pM以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、K_D为约90pM以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、K_D为约80pM以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、K_D为约70pM以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、K_D为约60pM以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、K_D为约50pM以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、K_D为约40pM以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂或K_D为约30pM以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂.

[1006] 在一些实施方式中,所述的组合物、过程和方法包括k_{assoc}为约7.5×10^5 1/M·s以上的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、k_{assoc}为约8×10^5 1/M·s以上的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、k_{assoc}为约8.5×10^5 1/M·s以上的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、k_{assoc}为约9×10^5 1/M·s以上的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、k_{assoc}为约9.5×10^5 1/M·s以上的结合人或鼠OX40的OX40激动剂或k_{assoc}为约1×10^6 1/M·s以上的结合人或鼠OX40的OX40激动剂。

[1007] 在一些实施方式中,所述的组合物、过程和方法包括k_{dissoc}为约2×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、k_{dissoc}为约2.1×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠OX40的OX40激

动剂、k_{dissoc}为约2.2×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、k_{dissoc}为约2.3×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、k_{dissoc}为约2.4×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、k_{dissoc}为约2.5×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、k_{dissoc}为约2.6×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、k_{dissoc}为约2.7×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、k_{dissoc}为约2.8×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、k_{dissoc}为约2.9×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂或k_{dissoc}为约3×10^{-5} 1/s以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂。

[1008] 在一些实施方式中,所述的组合物、过程和方法包括IC_{50}为约10nM以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、IC_{50}为约9nM以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、IC_{50}为约8nM以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、IC_{50}为约7nM以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、IC_{50}为约6nM以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、IC_{50}为约5nM以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、IC_{50}为约4nM以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、IC_{50}为约3nM以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂、IC_{50}为约2nM以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂或IC_{50}为约1nM以下的结合人或鼠OX40的OX40激动剂。

[1009] 在一些实施方式中,OX40激动剂是他利昔珠单抗(也被称为MEDI0562或MEDI-0562)。他利昔珠单抗可从AstraZeneca,Inc.的MedImmune子公司商购。他利昔珠单抗是免疫球蛋白G1-kappa、抗[智人TNFRSF4(肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员4,OX40,CD134)]、人源化和嵌合单克隆抗体。他利昔珠单抗的氨基酸序列列于表KK。他利昔珠单抗包含:在301和301”位的N-糖基化位点,具有岩藻糖基化的复合双触角CHO型聚糖;在22-95位(V_H-V_L)、148-204位(C_H1-C_L)、265-325位(C_H2)和371-429位(C_H3)(以及22”-95”位、148”-204”位、265”-325”位和371”-429”位)的重链链内二硫键;在23’-88’位(V_H-V_L)和134’-194’位(C_H1-C_L)(以及23”’-88”’位和134”’-194”’位)的轻链内二硫键;在230-230’位和233-233”位的链间重链-重链二硫键;以及在224-214’位和224’-214”’位的链间重链-轻链二硫键。目前他利昔珠单抗在多种实体瘤适应症中的临床试验包括U.S.National Institutes of Health clinicaltrials.gov识别码NCT02318394和NCT02705482。

[1010] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含由SEQ ID NO:56给出的重链和由SEQ ID NO:57给出的轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包括分别具有SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57中所示序列或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或缀合物的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57所示序列具有至少99%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57所示序列具有至少98%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57所示序列具有至少97%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57所示序列具有至少96%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57所示序列具有至少95%同一性的重链和轻链。

[1011] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含他利昔珠单抗的重链CDR和轻链CDR或可变区(VR)。在一个实施方式中,OX40激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:58所示的序列及其保守氨基酸酸取代,OX40激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:59所示的序列及其保守氨基酸酸取代。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59所

示序列具有至少99％同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59所示序列具有至少98％同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59所示序列具有至少97％同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59所示序列具有至少96％同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59所示序列具有至少95％同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,OX40激动剂包含scFv抗体,该scFv抗体包含分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59所示序列具有至少99％同一性的V_H和V_L区。

[1012] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含:分别具有SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61和SEQ ID NO:62所示序列及其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及分别具有SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64和SEQ ID NO:65所示序列及其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域。

[1013] 在一个实施方式中,OX40激动剂是由药物监管机构参考他利昔珠单抗批准的OXA40激动剂生物仿制药单克隆抗体。在一个实施方式中,生物仿制药单克隆抗体包含OX40抗体,该OX40抗体包含与参考药物产品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97％序列同一性(例如97％、98％、99％或100％序列同一性)且与参考药物产品或参考生物产品相比包含一种以上翻译后修饰的氨基酸序列,其中,参考药物产品或参考生物产品是他利昔珠单抗。在一些实施方式中,一种以上翻译后修饰选自糖基化、氧化、脱酰胺和截短中的一种以上。在一些实施方式中,生物仿制药是已授权或已提交授权的OX40激动剂抗体,其中,以不同于参考药物产品或参考生物产品的制剂的制剂提供OX40激动剂抗体,其中,参考药物产品或参考生物制剂产品是他利昔珠单抗。OX40激动剂抗体可得到药品监管机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)的授权。在一些实施方式中,生物仿制药以还包含一种以上赋形剂的组合物的形式提供,其中,一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中,参考药物产品或参考生物产品是他利昔珠单抗。在一些实施方式中,生物仿制药以还包含一种以上赋形剂的组合物的形式提供,其中,一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中,参考药物产品或参考生物产品是他利昔珠单抗。

[1014] 表12:与他利昔珠单抗相关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列

[1015]

识别号	序列（单字母氨基酸符号）
SEQ ID NO：56 他利昔珠单抗的重链	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
SEQ ID NO：57 他利昔珠单抗的轻链	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO：58 他利昔珠单抗的重链可变区	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT 118
SEQ ID NO：59 他利昔珠单抗的轻链可变区	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR 108
SEQ ID NO：60 他利昔珠单抗的重链 CDR1	GSFSSGYWN 9
SEQ ID NO：61 他利昔珠单抗的重链 CDR2	YIGYISYNGI TYH 13

[1016]

SEQ ID NO：62 他利昔珠单抗的重链 CDR3	RYKYDYDGGH AMDY 14
SEQ ID NO：63 他利昔珠单抗的轻链 CDR1	QDISNYLN 8
SEQ ID NO：64 他利昔珠单抗的轻链 CDR2	LLIYYTSKLH S 11
SEQ ID NO：65 他利昔珠单抗的轻链 CDR3	QQGSALPW 8

[1017] 在一些实施方式中,OX40激动剂是11D4,其是可从Pfizer,Inc.商购的全人抗体。11D4的制备和性质描述于美国专利号7,960,515、8,236,930和9,028,824,其公开内容通过引用并入本文。表13列出了11D4的氨基酸序列。

[1018] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含由SEQ ID NO:66给出的重链和由SEQ ID NO:67给出的轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67中所示的序列或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或缀合物的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67所示的序列具有至少99％序列同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67所示的序列具有至少98％序列同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67所示的序列具有至少97％序列同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67所示的序列具有至少96％序列同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67所示的序列具有至少95％序列同一

性的重链和轻链。

[1019] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含11D4的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一个实施方式中,OX40激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:68所示的序列,OX40激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:69所示的序列,及其保守性氨基酸取代。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69所示序列具有至少99%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69所示序列具有至少98%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69所示序列具有至少97%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69所示序列具有至少96%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69所示序列具有至少95%同一性的V_H和V_L区。

[1020] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:70,SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72所示序列及其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及分别具有SEQ ID NO:73,SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:75所示序列及其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域。

[1021] 在一个实施方式中,OX40激动剂是药物监管机构参考11D4批准的OX40激动剂生物仿制药单克隆抗体。在一个实施方式中,生物仿制药单克隆抗体包含OX40抗体,该OX40抗体包含与参考药物产品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97%序列同一性(例如97%、98%、99%或100%序列同一性)且与参考药物产品或参考生物产品相比包含一种以上翻译后修饰的氨基酸序列,其中,参考药物产品或参考生物产品为11D4。在一些实施方式中,一种以上翻译后修饰选自糖基化、氧化、脱酰胺和截短中的一种以上。在一些实施方式中,生物仿制药是已授权或已提交授权的OX40激动剂抗体,其中,以不同于参考药物产品或参考生物产品的制剂的制剂提供OX40激动剂抗体,其中,参考药物产品或参考生物制剂产品是11D4。OX40激动剂抗体可得到药品监管机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)的授权。在一些实施方式中,生物仿制药以还包含一种以上赋形剂的组合物的形式提供,其中,一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中,参考药物产品或参考生物产品是11D4。在一些实施方式中,生物仿制药以还包含一种以上赋形剂的组合物的形式提供,其中,一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中,参考药物产品或参考生物产品是11D4。

[1022] 表13:与11D4有关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列

[1023]

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

[1024]

[1025] 在一些实施方式中,OX40激动剂是18D8,其是可从Pfizer,Inc.商购的全人抗体。18D8的制备和性质描述于美国专利号7,960,515、8,236,930和9,028,824,其公开内容通过引用并入本文。表14列出了18D8的氨基酸序列。

[1026] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含由SEQ ID NO:76给出的重链和由SEQ ID NO:77给出的轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包括分别具有SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77中所示的序列或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或缀合物的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77所示的序列具有至少99%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77所示的序列具有至少98%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77所示的序列具有至少97%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77所示的序列具有至少96%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77所示的序列具有至少95%同一性的重链和轻链。

[1027] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含18D8的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一个

实施方式中,OX40激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:78所示的序列,OX40激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:79所示的序列,及其保守性氨基酸取代。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79所示序列具有至少99%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79所示序列具有至少98%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79所示序列具有至少97%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79所示序列具有至少96%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79所示序列具有至少95%同一性的V_H和V_L区。

[1028] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81和SEQ ID NO:82所示序列及其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及分别具有SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84和SEQ ID NO:85所示序列及其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域。

[1029] 在一个实施方式中,OX40激动剂是药物监管机构参考18D8批准的OX40激动剂生物仿制药单克隆抗体。在一个实施方式中,生物仿制药单克隆抗体包含OX40抗体,该OX40抗体包含与参考药物产品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97%序列同一性(例如97%、98%、99%或100%序列同一性)且与参考药物产品或参考生物产品相比包含一种以上翻译后修饰的氨基酸序列,其中,参考药物产品或参考生物产品是18D8。在一些实施方式中,一种以上翻译后修饰选自糖基化、氧化、脱酰胺和截短中的一种以上。在一些实施方式中,生物仿制药是已授权或已提交授权的OX40激动剂抗体,其中,以不同于参考药物产品或参考生物产品的制剂的制剂提供OX40激动剂抗体,其中,参考药物产品或参考生物制剂产品是18D8。OX40激动剂抗体可得到药品监管机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)的授权。在一些实施方式中,生物仿制药以还包含一种以上赋形剂的组合物的形式提供,其中,一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中,参考药物产品或参考生物产品是18D8。在一些实施方式中,生物仿制药以还包含一种以上赋形剂的组合物的形式提供,其中,一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中,参考药物产品或参考生物产品是18D8。

[1030] 表14:与18D8有关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列

[1031]

识别号	序列(单字母氨基酸符号)
SEQ ID NO: 76 18D8的重链	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV 120 TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV 180 LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN 300

[1032]

	STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE 360 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO: 77 18D8的轻链	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213
SEQ ID NO: 78 18D8的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV 120 TVSS 124
SEQ ID NO: 79 18D8的轻链可变区	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK 106
SEQ ID NO: 80 18D8的重链CDR1	DYAMH 5
SEQ ID NO: 81 18D8的重链CDR2	GISWNSGSIG YADSVKG 17
SEQ ID NO: 82 18D8的重链CDR3	DQSTADYYFY YGMDV 15
SEQ ID NO: 83 18D8的轻链CDR1	RASQSVSSYL A 11
SEQ ID NO: 84 18D8的轻链CDR2	DASNRAT 7
SEQ ID NO: 85 18D8的轻链CDR3	QQRSNWPT 8

[1033] 在一些实施方式中,OX40激动剂是Hu119-122,其是可从GlaxoSmithKline plc.商购的人源化抗体。Hu119-122的制备和性质描述于美国专利号9,006,399和9,163,085以及国际专利公开号WO2012/027328中,其公开内容通过引用并入本文。表15列出了Hu119-122的氨基酸序列。

[1034] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含Hu119-122的重链CDR和轻链CDR或可变区(VR)。在一个实施方式中,OX40激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:86所示的序列,OX40激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:87所示的序列及其保守性氨基酸取代。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87所示序列具有至少99%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87所示序列具有至少98%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87所示序列具有至少97%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87所示序列具有至少96%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87所示序列具有至少95%同一性的V_H和V_L区。

[1035] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90所示序列及其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及分别具有SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93所示序列及其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域。

[1036] 在一个实施方式中,OX40激动剂是药物监管机构参考Hu119-122批准的OX40激动剂生物仿制药单克隆抗体。在一个实施方式中,生物仿制药单克隆抗体包含OX40抗体,该

OX40抗体包含与参考药物产品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97％序列同一性(例如97％、98％、99％或100％序列同一性)且与参考药物产品或参考生物产品相比包含一种以上翻译后修饰的氨基酸序列,其中,参考药物产品或参考生物产品为Hu119-122。在一些实施方式中,一种以上翻译后修饰选自糖基化、氧化、脱酰胺和截短中的一种以上。在一些实施方式中,生物仿制药是已授权或已提交授权的OX40激动剂抗体,其中,以不同于参考药物产品或参考生物产品的制剂的制剂提供OX40激动剂抗体,其中,参考药物产品或参考生物制剂产品是Hu119-122。OX40激动剂抗体可得到药品监管机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)的授权。在一些实施方式中,生物仿制药以还包含一种以上赋形剂的组合物的形式提供,其中,一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中,参考药物产品或参考生物产品是Hu119-122。在一些实施方式中,生物仿制药以还包含一种以上赋形剂的组合物的形式提供,其中,一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中,参考药物产品或参考生物产品是Hu119-122。

[1037] 表15:与Hu119-122有关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列

[1038]

识别号	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO: 86 Hu119-122 的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
SEQ ID NO: 87 Hu119-122 的轻链可变区	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
SEQ ID NO: 88 Hu119-122 的重链 CDR1	SHDMS	5
SEQ ID NO: 89	AINSDGGSTY YPDTMER	17

[1039]

Hu119-122 的重链 CDR2		
SEQ ID NO: 90 Hu119-122 的重链 CDR3	HYDDYYAWFA Y	11
SEQ ID NO: 91 Hu119-122 的轻链 CDR1	RASKSVSTSG YSYMH	15
SEQ ID NO: 92 Hu119-122 的轻链 CDR2	LASNLES	7
SEQ ID NO: 93 Hu119-122 的轻链 CDR3	QHSRELPLT	9

[1040] 在一些实施方式中,OX40激动剂是Hu106-222,其是可从GlaxoSmithKline plc.商购的人源化抗体。Hu106-222的制备和性质描述于美国专利号9,006,399和9,163,085以及国际专利公开号WO2012/027328中,其公开内容通过引用并入本文。Hu106-222的氨基酸序列在表16中列出。

[1041] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含Hu106-222的重链CDR和轻链CDR或可变区

(VR)。在一个实施方式中,OX40激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:94所示的序列,OX40激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:95所示的序列,及其保守性氨基酸取代。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95所示序列具有至少99%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95所示序列具有至少98%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95所示序列具有至少97%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95所示序列具有至少96%同一性的V_H和V_L区。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95所示序列具有至少95%同一性的V_H和V_L区。

[1042] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:96,SEQ ID NO:97和SEQ ID NO:98所示序列及其保守性氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及分别具有SEQ ID NO:99,SEQ ID NO:100和SEQ ID NO:101所示序列及其保守性氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域。

[1043] 在一个实施方式中,OX40激动剂是药物监管机构参考Hu106-222批准的OX40激动剂生物仿制药单克隆抗体。在一个实施方式中,生物仿制药单克隆抗体包含OX40抗体,该OX40抗体包含与参考药物产品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97%序列同一性(例如97%、98%、99%或100%序列同一性)且与参考药物产品或参考生物产品相比包含一种以上翻译后修饰的氨基酸序列,其中,参考药物产品或参考生物产品是Hu106-222。在一些实施方式中,一种以上翻译后修饰选自糖基化、氧化、脱酰胺和截短中的一种以上。在一些实施方式中,生物仿制药是已授权或已提交授权的OX40激动剂抗体,其中,OX40激动剂抗体以不同于参考药物产品或参考生物产品的制剂的形式提供,其中,参考药物产品或参考生物产品是Hu106-222。OX40激动剂抗体可得到药品监管机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)的授权。在一些实施方式中,生物仿制药以还包含一种以上赋形剂的组合物的形式提供,其中,一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中,参考药物产品或参考生物产品是Hu106-222。在一些实施方式中,生物仿制药以还包含一种以上赋形剂的组合物的形式提供,其中,一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中,参考药物产品或参考生物产品是Hu106-222。

[1044] 表16:与Hu106-222有关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列

[1045]

识别号	序列（单字母氨基酸符号）
SEQ ID NO：94 Hu106-222 的重链可变区	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV 120 SS 122
SEQ ID NO：95 Hu106-222 的轻链可变区	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS 60 RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK 107
SEQ ID NO：96 Hu106-22 的重链 CDR12	DYSMH 5
SEQ ID NO：97 Hu106-222 的重链 CDR2	WINTETGEPT YADDFKG 17
SEQ ID NO：98 Hu106-222 的重链 CDR3	PYYDYVSYYA MDY 13
SEQ ID NO：99 Hu106-222 的轻链 CDR1	KASQDVSTAV A 11
SEQ ID NO：100 Hu106-222 的轻链 CDR2	SASYLYT 7
SEQ ID NO：101	QQHYSTPRT 9

[1046]

Hu106-222 的轻链 CDR3	

[1047] 在一些实施方式中,OX40激动剂抗体是MEDI6469(也称为9B12)。MEDI6469是鼠单克隆抗体。Weinberg等,J.Immunother.2006,29,575-585。在一些实施方式中,OX40激动剂是由Biovest Inc.(Malvern,MA,USA)保藏的9B12杂交瘤产生的抗体,如在Weinberg等,J.Immunother.2006,29,575-585中所述,其公开内容通过引用整体并入本文。在一些实施方式中,抗体包含MEDI6469的CDR序列。在一些实施方式中,抗体包含MEDI6469的重链可变区序列和/或轻链可变区序列。

[1048] 在一个实施方式中,OX40激动剂是L106BD(Pharmingen产品#340420)。在一些实施方式中,OX40激动剂包含抗体L106(BD Pharmingen产品#340420)的CDR。在一些实施方式中,OX40激动剂包含抗体L106(BD Pharmingen产品#340420)的重链可变区序列和/或轻链可变区序列。在一个实施方式中,OX40激动剂是ACT35(Santa Cruz Biotechnology,目录号20073)。在一些实施方式中,OX40激动剂包含抗体ACT35(Santa Cruz Biotechnology,目录号20073)的CDR。在一些实施方式中,OX40激动剂包含抗体ACT35(Santa Cruz Biotechnology,目录号20073)的重链可变区序列和/或轻链可变区序列。在一个实施方式中,OX40激动剂是鼠单克隆抗体抗mCD134/mOX40(克隆OX86),可从InVivoMAb,BioXcell Inc,West Lebanon,NH商购。

[1049] 在一个实施方式中,OX40激动剂选自国际专利申请公开号WO95/12673、WO95/21925、WO2006/121810、WO2012/027328、WO2013/028231、WO2013/038191和WO2014/148895;欧洲专利申请EP0672141;美国专利申请公开号US2010/136030、US2014/377284、US2015/

190506和US2015/132288(包括克隆20E5和12H3);以及美国专利号7,504,101、7,550,140、7,622,444、7,696,175、7,960,515、7,961,515、8,133,983、9,006,399和9,163,085中描述的OX40激动剂,其各自公开内容均通过引用整体并入本文。

[1050] 在一个实施方式中,OX40激动剂是如结构I-A(C末端Fc抗体片段融合蛋白)或结构I-B(N末端Fc抗体片段融合蛋白)中所述的OX40激动性融合蛋白,或其片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物。结构I-A和I-B的性质如上所述和描述于美国专利号9,359,420、9,340,599、8,921,519和8,450,460,其公开内容通过引用并入本文。表GG给出了结构I-A的多肽结构域的氨基酸序列。Fc结构域优选包含完整的恒定结构域(SEQ ID NO:31的氨基酸17-230)、完整的铰链结构域(SEQ ID NO:31的氨基酸1-16)或铰链结构域的一部分(例如SEQ ID NO:31的氨基酸4-16)。用于连接C末端Fc抗体的优选的接头可以选自SEQ ID NO:32至SEQ ID NO:41给出的实施方式,包括适合于融合其他多肽的接头。同样,表9中给出了结构I-B的多肽结构域的氨基酸序列。如果Fc抗体片段融合至TNRFSF融合蛋白的N-末端(如结构I-B),则Fc模块的序列优选为SED ID NO:42所示的序列,接头序列优选选自SED ID NO:43至SEQ ID NO:45所示的那些实施方式。

[1051] 在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上选自下组的OX40结合结构域:他利昔珠单抗的可变重链和可变轻链、11D4的可变重链和可变轻链、18D8的可变重链和可变轻链、Hu119-122的可变重链和可变轻链、Hu106-222的可变重链和可变轻链、选自表OO中所述可变重链和可变轻链的可变重链和可变轻链,前述可变重链和可变轻链的任何组合,及它们的片段、衍生物、缀合物、变体和生物类似物。

[1052] 在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上包含OX40L序列的OX40结合结构域。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上包含序列SEQ ID NO:102的OX40结合结构域。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上包含可溶性OX40L序列的OX40结合结构域。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上包含序列SEQ ID NO:103的OX40结合结构域。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上包含序列SEQ ID NO:104的OX40结合结构域。

[1053] 在一个实施方式中,根据结构1A或1B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上OX40结合结构域,该OX40结合结构域为包含V_H和V_L区的scFv结构域,V_H和V_L区分别与SEQ ID NO:NO:58和SEQ ID NO:59中所示序列具有至少95%同一性,其中,V_H和V_L结构域通过接头连接。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上OX40结合结构域,该OX40结合结构域是包含F_H和V_L区的scFv结构域,V_H和V_L区分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69所示序列具有至少95%同一性,其中,V_H和V_L结构域通过接头连接。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上OX40结合结构域,该OX40结合结构域是包含V_H和V_L区的scFv结构域,该V_H和V_L区分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79所示序列具有至少95%同一性,其中,V_H和V_L结构域通过接头连接。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上OX40结合结构域,该OX40结合结构域是包含F_H和V_L区的scFv结构域,V_H和V_L区分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87所示序列具有至少95%同一性,其中,V_H和V_L结构域通过接头连接。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上OX40结合结构域,该OX40结合结构域是包含V_H和V_L区

的scFv结构域,V_H和V_L区分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95所示序列具有至少95%同一性,其中,V_H和V_L结构域通过接头连接。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上OX40结合结构域,该OX40结合结构域是包含F_H和V_L区的scFv结构域,V_H和V_L区与表17中所示V_H和V_L序列具有至少95%同一性,其中,V_H和V_L结构域通过接头连接。

[1054] 表17:用作融合蛋白中OX40结合结构域(例如结构I-A和I-B)或用作scFv OX40激动剂抗体的其他多肽结构域

[1055]

识别号	序列(单字母氨基酸符号)
SEQ ID NO:102 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ 60 SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ 120 KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF 180 CVL 183
SEQ ID NO:103 OX40L可溶性结构域	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE 60 VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL 120 IHQNPGEFCV L 131
SEQ ID NO:104 OX40L可溶性结构域(备选的)	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI 60 SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ 120 NPGEFCVL 128
SEQ ID NO:105 008的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS 120
SEQ ID NO:106 008的轻链可变区	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO:107 011的重链可变区	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD 60 SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA 120
SEQ ID NO:108 011的轻链可变区	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO:109 021的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS 120
SEQ ID NO:110 021的轻链可变区	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK 108
SEQ ID NO:111 023的重链可变区	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA 60 DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS 120
SEQ ID NO:112 023的轻链可变区	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR 108
SEQ ID NO:113 重链可变区	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY 60 NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS 119
SEQ ID NO:114 轻	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS 60

[1056]

链可变区	RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO：115 重链可变区	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY 60 NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS 120 P 121
SEQ ID NO：116 轻链可变区	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD 60 RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO：117 人源化抗体的重链可变区	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV 120 SS 122
SEQ ID NO：118 人源化抗体的重链可变区	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV 120 SS 122
SEQ ID NO：119 人源化抗体的轻链可变区	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO：120 人源化抗体的轻链可变区	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO：121 人源化抗体的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA 120
SEQ ID NO：122 人源化抗体的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS 120
SEQ ID NO：123 人源化抗体的轻链可变区	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K 111
SEQ ID NO：124 人源化抗体的轻链可变区	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO：125 重链可变区	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP 60 EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG 120 EVFYFDYWGQ GTTLTVSS 138
SEQ ID NO：126 轻链可变区	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP 60 GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG 120 TKLELK 126

[1057] 在一个实施方式中,OX40激动剂是OX40激动性单链融合多肽,其包含(i)第一可溶性OX40结合结构域、(ii)第一肽接头、(iii)第二可溶性OX40结合结构域、(iv)第二肽接头和(v)第三可溶性OX40结合结构域,其在N-末端和/或C-末端还包含其他结构域,其中所述其他结构域是Fab或Fc片段结构域。在一个实施方式中,OX40激动剂是OX40激动性单链融合多肽,其包含(i)第一可溶性OX40结合结构域、(ii)第一肽接头、(iii)第二可溶性OX40结合结构域、(iv)第二肽接头和(v)第三可溶性OX40结合结构域,还包含在N末端和/或C末端的其他结构域,其中,该其他结构域是Fab或Fc片段结构域,其中,每个可溶性OX40结合结构域缺少茎区域(有助于三聚作用并提供到细胞膜的一定距离,但不是OX40结合结构域的一部分),并且第一肽接头和第二肽接头独立地具有3至8个氨基酸的长度。

[1058] 在一个实施方式中,OX40激动剂是OX40激动性单链融合多肽,其包含(i)第一可溶性肿瘤坏死因子(TNF)超家族细胞因子结构域、(ii)第一肽接头、(iii)第二可溶性TNF超家族细胞因子结构域、(iv)第二肽接头和(v)第三可溶性TNF超家族细胞因子结构域,其中,每个可溶性TNF超家族细胞因子结构域缺少茎区域,并且第一肽接头和第二肽接头独立地具有3至8个氨基酸的长度,其中TNF超家族细胞因子结构域是OX40结合结构域。

[1059] 在一些实施方式中,OX40激动剂是MEDI6383。MEDI6383是OX40激动性融合蛋白,可

如美国专利号6,312,700中所述制备,其公开内容通过引用并入本文。

[1060] 在一个实施方式中,OX40激动剂是OX40激动性scFv抗体,其包含与任何前述V_L结构域连接的任何前述V_H结构域。

[1061] 在一个实施方式中,OX40激动剂是Creative Biolabs OX40激动剂单克隆抗体MOM-18455,可从Shirley,NY,USA的Creative Biolabs,Inc.商购。

[1062] 在一个实施方式中,OX40激动剂是OX40激动性抗体克隆Ber-ACT35,可从BioLegend,Inc.(San Diego,CA,USA)商购。

[1063] VI.可选的细胞活力分析

[1064] 可选地,可使用本领域已知的标准测定法,在过程2A(Gen 2)或Gen 3过程的步骤B第一次扩增后进行细胞活力测定。例如,可对大量TIL样品进行台盼蓝排除试验,该试验选择性标记死细胞并允许活力评估。用于测试活力的其他测定法可包括但不限于Alamar blue测定法;以及MTT分析。

[1065] 1、细胞计数、活力、流式细胞术

[1066] 在过程2A(Gen 2)或Gen 3的一些实施方式中,测量细胞计数和/或活力。可用抗体通过流式细胞术来测量标志物(例如但不限于CD3、CD4、CD8和CD56)以及本文公开或描述的任何其他标志物的表达,例如但不限于使用FACSCanto™流式细胞仪(BD Biosciences)从BD Bio-Sciences(BD Biosciences,San Jose,CA)商购的那些。可使用一次性c-芯片血细胞计数器(VWR,Batavia,IL)手动对细胞进行计数,可使用本领域已知的任何方法评估活力,包括但不限于台盼蓝染色。在过程2A(Gen 2)和/或Gen 3的一些实施方式中,在第一次扩增、第二次扩增、启动第一次扩增或快速第二次扩增之后,TIL显示出CD8+细胞的增加。在过程2A(Gen 2)的一些实施方式中,在第一次扩增和/或第二次扩增后,TIL显示出CD8+细胞的增加。在Gen 3的一些实施方式中,在启动第一次扩增或快速第二次扩增后,TIL显示出CD8+细胞的增加。

[1067] 在某些情况下,可使用下文所述方案立即冷冻保存大量TIL群。或者,可如下对大量TIL群进行REP,然后冷冻保存。类似地,在将基因修饰的TIL用于治疗的情况下,可对大量或REP TIL群进行基因修饰以进行适当的治疗。

[1068] 2、细胞培养

[1069] 在一个实施方式中,用于扩增TIL的方法可包括使用约5,000mL至约25,000mL的细胞培养基、约5,000mL至约10,000mL的细胞培养基或约5,800mL至约8,700mL的细胞培养基。在一个实施方式中,使用不超过一种类型的细胞培养基扩增TIL的数量。可使用任何合适的细胞培养基,例如AIM-V细胞培养基(L-谷氨酰胺、50μM硫酸链霉素和10μM硫酸庆大霉素)细胞培养基(Invitrogen,Carlsbad CA)。在此方面,本发明的方法有利地减少了扩增TIL数量所需的培养基量和培养基类型的数量。在一个实施方式中,扩增TIL的数量可包括以不超过每三一次或每四天一次的频率向细胞添加新鲜细胞培养基(也称为饲养细胞)。用透气性容器扩增细胞数量通过降低扩增细胞所需的饲养频率,简化了扩增细胞数量所需的步骤。

[1070] 在一个实施方式中,第一和/或第二透气性容器中的细胞培养基未经过滤。使用未经过滤的细胞培养基可以简化扩增细胞数量所需步骤。在一个实施方式中,第一和/或第二透气性容器中的细胞培养基没有β-巯基乙醇(BME)。

[1071] 在一个实施方案中,在透气性容器中扩增TIL。使用本领域已知的方法、组成和装

置,包括在美国专利申请公开号US2005/0106717A1中描述的那些(其公开内容通过引用并入本文),使用透气性容器,用PBMC来扩增TIL。在一个实施方案中,TIL在透气袋中扩增。在一个实施方案中,使用细胞扩增系统扩增TIL,所述细胞扩增系统在透气袋中扩增TIL,例如Xuri细胞扩增系统W25(Xuri Cell Expansion System W25)(GE Healthcare)。在一个实施方案中,使用细胞扩增系统扩增TIL,所述细胞扩增系统在透气袋中扩增TIL,例如WAVE生物反应器系统,也称为Xuri细胞扩增系统W5(GE Healthcare)。在一个实施方案中,细胞扩增系统包括选自下组体积的透气性细胞袋:约100mL、约200mL、约300mL、约400mL、约500mL、约600mL、约700mL、约800mL、约900mL、约1L、约2L、约3L、约4L、约5L、约6L、约7L、约8L、约9L和约10L。在一个实施方式中,可在G-Rex烧瓶(可从Wilson Wolf Manufacturing商购)中扩增TIL。此类实施方式允许细胞群从约5×10^5个细胞/cm^2扩增到10×10^6至30×10^6个细胞/cm^2。在一个实施方式中,进行该扩增而无需向细胞添加新鲜细胞培养基(也称为饲养细胞)。在一个实施方式中,只要培养基停留在GRex烧瓶中位于约10cm的高度,就无需进料。在一个实施方式中,不进行进料但是添加一种以上细胞因子。在一个实施方式中,细胞因子可作为推注添加,无需将细胞因子与培养基混合。此种容器、装置和方法在本领域中是已知的并且已经用于扩增TIL,并且包括在美国专利申请公开号US2014/0377739A1、国际专利申请公开号WO2014/210036A1、美国专利申请公开号US2013/0115617A1、国际公开号WO2013/188427A1、美国专利申请公开号US2011/0136228A1、美国专利号8,809,050、国际专利申请公开号WO2011/072088A2、美国专利申请公开号US2016/0208216A1、美国专利申请公开号US2012/0244133A1、国际专利申请公开号WO2012/129201A1、美国专利申请公开号US2013/0102075A1、美国专利号8,956,860、国际专利申请公开号WO2013/173835A1和美国专利申请公开号US2015/0175966A1所述的那些,其公开内容通过引用并入本文。此类方法也描述于Jin等,J.I mmunotherapy 2012,35,283-292,其公开内容通过引用并入本文。

[1072] VII.扩增的TIL的代谢健康

[1073] 可评估用本文公开的方法扩增的TIL的呼吸储备能力(SRC)和糖酵解储备。Seahorse XF细胞Mito应力测试(Seahorse XF Cell Mito Stress Test)通过使用呼吸作用调节剂直接测量细胞的耗氧率(OCR)来测量线粒体功能,所述呼吸作用调节剂针对线粒体中电子传递链的组分。连续注射测试化合物(寡霉素、FCCP、以及鱼藤酮和抗霉素A的混合物,如下所述)以分别测量ATP产生、最大呼吸和非线粒体呼吸。然后使用这些参数和基础呼吸计算质子泄漏和呼吸储备能力。每个调节剂靶向电子传递链的一种特定组分。寡霉素抑制ATP合酶(复合物V),并且注射寡霉素后OCR的减少与细胞ATP产生相关的线粒体呼吸有关。羰基氰-4(三氟甲氧基)苯腙(FCCP)是一种解偶联剂,其可破坏质子梯度并破坏线粒体膜电位。结果是,通过电子传递链的电子流不受抑制,并且复合物IV最大程度地消耗氧。然后,FCCP刺激的OCR可用于计算呼吸储备能力,该呼吸储备能力被定义为最大呼吸和基础呼吸之间的差异。呼吸储备能力(SRC)是细胞响应于增加的能量需求的能力的量度。第三次注射是鱼藤酮(一种复合物I抑制剂)和抗霉素A(一种复合物III抑制剂)的混合物。这种组合可以关闭线粒体呼吸,并能够计算由线粒体之外的过程驱动的非线粒体呼吸。

[1074] 在一些实施方式中,代谢测定是基础呼吸。

[1075] 通常,TIL的基础呼吸率为新鲜收获的TIL的基础呼吸率的至少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%、至少95%、至少

97％、至少98％或至少99％。在一些实施方式中,基础呼吸速率是新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约50％至约99％。在一些实施方式中,基础呼吸率是新鲜收获的TIL的基础呼吸率的约60％至约99％。在一些实施方式中,基础呼吸率是新鲜收获的TIL的基础呼吸率的约70％至约99％。在一些实施方式中,基础呼吸率是新鲜收获的TIL的基础呼吸率的约80％至约99％。在一些实施方式中,基础呼吸率是新鲜收获的TIL的基础呼吸率的约90％至约99％。在一些实施方式中,基础呼吸率是新鲜收获的TIL的基础呼吸率的约95％至约99％。在一些实施方式中,TIL具有的基础呼吸速率与新鲜收获的TIL的基础呼吸速率在统计学上无显著差异。

[1076] 在一些实施方式中,代谢测定是呼吸储备能力。

[1077] 在一些实施方式中,代谢测定是糖酵解储备。在一些实施方式中,代谢测定是呼吸储备能力。为测量细胞(呼吸)代谢,用线粒体呼吸和糖酵解抑制剂处理细胞,以确定TIL的代谢谱,包括以下指标:基线氧化磷酸化(通过OCR测量)、呼吸储备能力、基线糖酵解活性(通过ECAR测量)和糖酵解储备。使用Seahorse Combination Mitochondrial/Glycolysis Stress Test Assay(包括可从Agilent®商购的试剂盒)进行代谢谱分析,其可确定细胞在线粒体ATP生成受阻时进行糖酵解的能力。在一些实施方式中,细胞缺乏葡萄糖,然后注射葡萄糖,随后注射应激剂。在一些实施方式中,应激剂选自寡霉素、FCCP、鱼藤酮、抗霉素A和/或2-脱氧葡萄糖(2-DG)及它们的组合。在一些实施方式中,添加10mM寡霉素。在一些实施方式中,添加10mM FCCP。在一些实施方式中,添加2.5mM鱼藤酮。在一些实施方式中,添加2.5mM抗霉素A。在一些实施方式中,添加500mM 2-脱氧葡萄糖(2-DG)。在一些实施方式中,测量糖酵解能力、糖酵解储备和/或非糖酵解酸化。通常,TIL的糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸率的至少50％、至少55％、至少60％、至少65％、至少70％,、至少75％、至少80％、至少85％、至少为90％、至少95％、至少97％、至少98％或至少99％。在一些实施方式中,糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸率的约50％至约99％。在一些实施方式中,糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸率的约60％至约99％。在一些实施方式中,糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸率的约70％至约99％。在一些实施方式中,糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸率的约80％至约99％。在一些实施方式中,糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸率的约90％至约99％。在一些实施方式中,糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸率的约95％至约99％。

[1078] 在一些实施方式中,代谢测定是基础糖酵解。一些第二次扩增TIL或第二次另外的扩增TIL(例如图7步骤D中描述的那些,包括称为reREP TIL的TIL)的基础糖酵解增加了至少两倍、至少三倍、至少四倍、至少五倍、至少六倍、至少七倍、至少八倍、至少九倍或至少十倍。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或第二次另外的扩增TIL(例如图7步骤D中描述的那些,包括称为reREP TIL的TIL)的基础糖酵解增加了约两倍至约十倍。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或第二次另外的扩增TIL(例如图7步骤D中描述的那些,包括称为reREP TIL的TIL)的基础糖酵解增加了约两倍至约八倍。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或第二次另外的扩增TIL(例如图7步骤D中描述的那些,包括称为reREP TIL的TIL)的基础糖酵解增加了约三倍至约七倍。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或第二次另外的扩增TIL(例如图7步骤D中描述的那些,包括称为reREP TIL的TIL)的基础糖酵解增加了约两倍至约四倍。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或第二次另外的扩增TIL(例如图7步骤D中描述的那些,包

括称为reREP TIL的TIL)的基础糖酵解增加约两倍至约三倍。

[1079] 通常,第二次扩增TIL或第二次另外的扩增TIL(例如图7步骤D中描述的扩增TIL,包括称为reREP TIL的TIL)的呼吸储备能力为新鲜收获的TIL的基础呼吸率的至少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%、至少95%至少97%、至少98%或至少99%。在一些实施方式中,呼吸储备能力是新鲜收获的TIL的基础呼吸率的约50%至约99%。在一些实施方式中,呼吸储备能力是新鲜收获的TIL的基础呼吸率的约50%至约99%。在一些实施方式中,呼吸储备能力是新鲜收获的TIL的基础呼吸率的约60%至约99%。在一些实施方式中,呼吸储备能力是新鲜收获的TIL的基础呼吸率的约70%至约99%。在一些实施方式中,呼吸储备能力是新鲜收获的TIL的基础呼吸率的约80%至约99%。在一些实施方式中,呼吸储备能力是新鲜收获的TIL的基础呼吸率的约90%至约99%。在一些实施方式中,呼吸储备能力是新鲜收获的TIL的基础呼吸率的约95%至约99%。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或第二次另外的扩增TIL(例如图7步骤D中描述的那些,包括被称为reREP TIL的TIL)的呼吸储备能力与新鲜收获的TIL的基础呼吸率在统计上无显著差异。

[1080] VIII.TIL的功能表征

[1081] 颗粒酶B的产生:颗粒酶B是TIL杀死靶细胞的能力的另一种量度。根据制造商的指示,使用人颗粒酶B DuoSet ELISA试剂盒(R&D Systems,Minneapolis,MN),使用CD3、CD28和CD137/4-1BB的抗体评估如上所述再刺激的培养基上清液的颗粒酶B的水平。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或第二次另外的扩增TIL(例如图7步骤D中描述的那些,包括称为reREP TIL的TIL)具有增加的颗粒酶B产生。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或第二次另外的扩增TIL(例如图7步骤D中描述的那些,包括称为reREP TIL的TIL)具有增加的细胞毒活性。

[1082] 在一些实施方式中,端粒长度可以用作细胞活力和/或细胞功能的量度。端粒长度测量:已经使用多种方法来测量基因组DNA和细胞制剂中端粒的长度。端粒限制性片段(TRF)分析是测量端粒长度的黄金标准(de Lange等,1990)。但是,TRF的主要局限性是需要大量的DNA(1.5μg)。本发明可使用两种广泛使用的测量端粒长度的技术,即荧光原位杂交(FISH;Agilent Technologies,Santa Clara,CA)和定量PCR。在一些实施方式中,如图7中所述,步骤A中最初收获的TIL和例如步骤D的扩增的TIL的端粒长度没有变化。

[1083] 在一些实施方式中,通过IFN-γ分泌来测量TIL健康。在一些实施方式中,采用IFN-γ产生的效价测定。IFN-γ产生是细胞毒性潜力的另一种度量。IFN-γ的产生可通过测定用CD3、CD28和CD137/4-1BB抗体刺激的TIL培养基中细胞因子IFN-γ的水平来测量。可通过测量IFN-γ释放来确定这些刺激的TIL培养基中的IFN-γ水平。在一些实施方式中,与图7中提供的例如步骤A中最初收获的TIL相比,图7中提供的例如步骤D中的IFN-γ产生增加,表明步骤D TIL的细胞毒性潜力增加。

[1084] 在一些实施方式中,生物发光重定向裂解测定:根据TIL测定的生物发光重定向裂解测定(效价测定)(其以高度灵敏的剂量依赖性方式测量TIL的细胞毒性),使用TIL与生物发光细胞系P815(克隆G6)的共培养测定,评估TIL裂解靶细胞的细胞毒性潜力。

[1085] 在一些实施方式中,本方法包括使用上文和本文所述的方法(包括例如实施例和附图中所述)的评估TIL活力的测定法。在一些实施方式中,如上文(包括例如图7中所述)所

述地扩增TIL。在一些实施方式中,在评估活力之前冷冻保存TIL。在一些实施方式中,活力评估包括在进行第一次扩增、第二次扩增和另外的第二次扩增之前解冻TIL。在一些实施方式中,本方法提供了评估细胞增殖、细胞毒性、细胞死亡和/或与TIL群的活力有关的其他术语的测定。可通过上述任何TIL代谢测定以及本领域已知的任何已知的评估细胞活力的方法来测量活力。在一些实施方式中,本方法提供了评估细胞增殖、细胞毒性、细胞死亡和/或与使用本文所述方法扩增的TIL的生存能力相关的其他术语的分析方法,包括图7所示的方法。

[1086] 在一些实施方式中,代谢测定是基础呼吸。通常,第二次扩增TIL的基础呼吸率为2A过程TIL的基础呼吸率的至少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%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,基础呼吸率是2A过程TIL的基础呼吸率的约50%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,基础呼吸速率是2A过程TIL的基础呼吸速率的约60%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,基础呼吸速率是2A过程TIL的基础呼吸速率的约70%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,基础呼吸速率是2A过程TIL的基础呼吸速率的约80%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,基础呼吸速率是2A过程TIL的基础呼吸速率的约90%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,基础呼吸速率是2A过程TIL的基础呼吸速率的约95%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或第二次另外的扩增TIL(例如图7步骤D中描述的那些,包括被称为reREP TIL的TIL)的基本呼吸速率与2A过程TIL的基本呼吸速率在统计学上无显著差异(参见例如图7)。

[1087] 通常,第二次扩增TIL或第二次另外的扩增TIL(例如,图7的步骤D中所述的那些,包括称为reREP TIL的TIL)的基础呼吸速率是2A过程TIL的基础呼吸速率的至少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%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,呼吸储备能力是新鲜收获的TIL的基础呼吸率的约50%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,呼吸储备能力是2A过程TIL的基础呼吸率的约50%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,呼吸储备能力是2A过程TIL的基础呼吸率的约60%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,呼吸储备能力是2A过程TIL的基础呼吸率的约70%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,呼吸储备能力是2A过程TIL的基础呼吸率的约80%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,呼吸储备能力是2A过程TIL的基础呼吸率的约90%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,呼吸储备能力是2A过程TIL的基础呼吸率的约95%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或第二次另外的扩增TIL(例如图7步骤D中描述的那些,包括被称为reREP TIL的TIL)的呼吸储备能力与2A过程TIL的基本呼吸速率在统计上无显著差异(参见例如图7)。

[1088] 通常,第二次扩增TIL或第二次另外的扩增TIL(例如,图7的步骤D中所述的那些、包括称为reREP TIL的TIL)的基础呼吸速率为2A过程TIL的基础呼吸速率的至少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%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,所测量的代谢测定是糖酵解储备。在一些实施方式中,代谢测定是呼吸储备能力。为了测量细胞(呼吸)代谢,用线粒体呼吸和糖酵解抑制剂处理细胞,以确定TIL的代谢概况,包括以下指标:基线氧化磷

酸化(通过OCR测量)、呼吸储备能力,基线糖酵解活性(通过ECAR测量)和糖酵解储备。使用Seahorse Combination Mitochondrial/Glycolysis Stress Test Assay(包括可从Agilent®商购的试剂盒)进行代谢谱分析,其可确定细胞在线粒体ATP生成受阻时进行糖酵解的能力。在一些实施方式中,细胞缺乏葡萄糖,然后注射葡萄糖,随后注射应激剂。在一些实施方式中,应激剂选自寡霉素、FCCP、鱼藤酮、抗霉素A和/或2-脱氧葡萄糖(2-DG)及它们的组合。在一些实施方式中,加入10mM寡霉素。在一些实施方式中,以10mM添加FCCP。在一些实施方式中,加入2.5mM鱼藤酮。在一些实施方式中,加入2.5mM抗霉素A。在一些实施方式中,加入500mM 2-脱氧葡萄糖(2-DG)。在一些实施方式中,测量糖酵解能力、糖酵解储备和/或非糖酵解酸化。通常,TIL的糖酵解储备是2A过程TIL的基础呼吸速率的至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%,、至少75%、至少80%、至少85%至少是至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,糖酵解储备为2A过程TIL的基础呼吸率的约50%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸率的约60%至约99%。在一些实施方式中,糖酵解储备为2A过程TIL的基础呼吸率的约70%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,糖酵解储备为2A过程TIL的基础呼吸率的约80%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,糖酵解储备为2A过程TIL的基础呼吸率的约90%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,糖酵解储备为2A过程TIL的基础呼吸率的约95%至约99%(参见例如图7)。

[1089] 在一些实施方式中,代谢测定是基础糖酵解。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或第二次另外的扩增TIL(例如图7步骤D中描述的那些、包括称为reREP TIL的TIL)的基础糖酵解增加至少两倍、至少三倍、至少四倍、至少五倍、至少六倍、至少七倍、至少八倍、至少九倍或至少十倍。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或第二次另外的扩增TIL(例如图7步骤D中描述的那些,包括称为reREP TIL的TIL)的基础糖酵解增加约两倍至约十倍。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或第二次另外的扩增TIL(例如图7步骤D中描述的那些,包括称为reREP TIL的TIL)的基础糖酵解增加约两倍至约八倍。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或第二次另外的扩增TIL(例如图7步骤D中描述的那些,包括称为reREP TIL的TIL)的基础糖酵解增加约三倍至约七倍。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或第二次另外的扩增TIL(例如图7步骤D中描述的那些,包括称为reREP TIL的TIL)的基础糖酵解增加约两倍至约四倍。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或第二次另外的扩增TIL(例如图7步骤D中描述的那些,包括称为reREP TIL的TIL)的基础糖酵解增加约两倍至约三倍。

[1090] 通常,第二次扩增TIL或第二次另外的扩增TIL(例如图7步骤D中描述的那些,包括称为reREP TIL的TIL)的糖酵解储备是2A过程TIL的基础呼吸率的至少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%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,糖酵解储备为2A过程TIL的基础呼吸率的约50%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,糖酵解储备为2A过程TIL的基础呼吸率的约60%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,糖酵解储备为2A过程TIL的基础呼吸率的约70%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,糖酵解储备为2A过程TIL的基础呼吸率的约80%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,糖酵解储备为2A过程TIL的基础呼吸率的约90%至约99%(参见例如图7)。在一些实施方式中,糖酵解储备为2A过程TIL的基础呼吸率的约95%至约99%(参见例如图7)。

[1091] 颗粒酶B的产生:颗粒酶B是TIL杀死靶细胞的能力的另一种量度。根据制造商的指示,使用人颗粒酶B DuoSet ELISA试剂盒(R&D Systems,Minneapolis,MN),使用CD3、CD28和CD137/4-1BB的抗体评估如上所述的再刺激的培养基上清液的颗粒酶B的水平。

[1092] 在一些实施方式中,本方法提供了使用上述方法评估TIL活力的测定法。在一些实施方式中,如上文所述(包括例如图7中所述)地扩增TIL。在一些实施方式中,在评估活力之前冷冻保存TIL。在一些实施方式中,活力评估包括在进行第一次扩增、第二次扩增和另外的第二次扩增之前解冻TIL。在一些实施方式中,本方法提供了用于评估细胞增殖、细胞毒性、细胞死亡和/或与TIL群的活力有关的其他术语的测定法。可通过上述任何TIL代谢测定以及本领域已知的任何已知的评估细胞活力的方法来测量活力。在一些实施方式中,本方法提供了用于评估细胞增殖、细胞毒性、细胞死亡和/或与使用本文所述方法扩增的TIL的生存能力相关的其他术语的分析方法,包括图7所示的方法。

[1093] 本发明还提供了测定TIL活力的测定方法。本公开提供了通过将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增为更大的TIL群来测定TIL的活力的方法,该方法包括:

[1094] (i)获得先前已扩增的第一TIL群;

[1095] (ii)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养第一TIL群来进行第一次扩增,产生第二TIL群;其中,在第3天向细胞培养基补充OKT-3;其中,第一次扩增进行约3天至约19天以获得第二TIL群;其中,当第一TIL群来自核心活检物时,经过约10天至约19天,第二TIL群包含至少5×10^7个TIL;以及

[1096] (iii)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第三TIL群的数量比第二TIL群大至少100倍;其中,第二次扩增进行约11天至约14天以获得第三TIL群,其中,相对于第二TIL群,第三TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群;其中,进一步检测第三群的活力。在一些实施方式中,该方法还包括:

[1097] (iv)通过用另外的IL-2、另外的OKT-3和另外的APC补充第三TIL群的细胞培养基进行另外的第二次扩增,其中,另外的第二次扩增进行至少14天,获得比步骤(iii)中所得更大的TIL群,其中,相对于第三TIL群,所述更大的TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群,其中,进一步检测第三群的活力。

[1098] 在一些实施方式中,在步骤(i)之前,将细胞冷冻保存。

[1099] 在一些实施方式中,在进行步骤(i)之前解冻细胞。

[1100] 在一些实施方式中,重复步骤(iv)一至四次,以获得足够的TIL用于分析。

[1101] 在一些实施方式中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约21天至约33天的时间。

[1102] 在一些实施方式中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约21天至约30天的时间。

[1103] 在一些实施方式中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约21天至约28天的时间。

[1104] 在一些实施方式中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约24天。

[1105] 在一些实施方式中,来自步骤(iii)或(iv)的细胞表达CD4、CD8和TCRαβ的水平与新鲜收获的细胞相似。

[1106] 在一些实施方式中,抗原呈递细胞是外周血单核细胞(PBMC)。

[1107] 在一些实施方式中,在步骤(iii)的第9天至第17天中的任一天将PBMC添加至细胞培养物中。

[1108] 在一些实施方式中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,步骤(iv)中的更大的TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

[1109] 在一些实施方式中,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

[1110] 在一些实施方式中,APC是人工APC(aAPC)。

[1111] 在一些实施方式中,该方法还包括用表达载体转导第一TIL群的步骤,所述表达载体包含编码高亲和力T细胞受体的核酸。

[1112] 在一些实施方式中,转导步骤发生在步骤(i)之前。

[1113] 在一些实施方式中,该方法还包括用表达载体转导第一TIL群的步骤,所述表达载体包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸,所述嵌合抗原受体包含与T细胞信号传导分子的至少一个内结构域融合的单链可变片段抗体。

[1114] 在一些实施方式中,转导步骤发生在步骤(i)之前。

[1115] 在一些实施方式中,检测TIL的活力。

[1116] 在一些实施方式中,在冷冻保存后检测TIL的活力。

[1117] 在一些实施方式中,在冷冻保存后和步骤(iv)后,检测TIL的活力。

[1118] 在一些实施方式中,本公开提供了治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括施用扩增的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),包括:(i)由获自患者肿瘤的细针抽吸物(FNA)或核心活检物获得第一TIL群;(ii)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养第一TIL群来进行第一次扩增,产生第二TIL群;其中,在第3天向细胞培养基补充OKT-3;其中,第一次扩增进行约3天至约19天以获得第二TIL群;其中,当第一TIL群来自核心活检物时,经过约10天至约19天,第二TIL群包含至少5×10^7个TIL;(iii)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第三TIL群的数量比第二TIL群大至少25倍;其中第二次扩增进行约11天至约14天以获得第三TIL群,其中,第三TIL群是治疗性TIL群;(iv)给患者施用治疗有效剂量的第三TIL群。

[1119] 根据本公开,测定TIL的活力的方法和/或进一步用于给受试者施用。在一些实施方式中,测定肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的方法包括:

[1120] (i)获得第一TIL群;

[1121] (ii)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养第一TIL群来进行第一次扩增,产生第二TIL群;其中,在第3天向细胞培养基补充OKT-3;其中,第一次扩增进行约3天至约19天以获得第二TIL群;其中,当第一TIL群来自核心活检物时,经过约10天至约19天,第二TIL群包含至少5×10^7个TIL;以及

[1122] (iii)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第三TIL群的数量比第二TIL群至少大50倍;其中,第二次扩增进行约11天至约14天以获得第三TIL群;

[1123] (iv)收获、清洗和冷冻保存第三TIL群;

[1124] (v)将冷冻保存的TIL储存在低温(cryogenic temperature)下;

[1125] (vi)解冻第三TIL群,提供解冻的第三TIL群;以及

[1126] (vii)通过用IL-2、OKT-3和APC补充第三TIL群的细胞培养基以用于至少3天的

reREP期,来对解冻的第三TIL群的一部分进行另外的第二次扩增,其中,进行第三次扩增,获得第四TIL群,其中,将第四TIL群中TIL数量与第三TIL群中TIL数量进行比较以获得比率;

[1127] (viii)基于步骤(vii)中的比率,确定解冻的TIL群是否适合施用于患者;

[1128] (ix)当步骤(viii)中确定第四TIL群中TIL数量与第三TIL群中TIL数量的比率大于5:1时,给患者施用治疗有效剂量的解冻的TIL群。

[1129] 在一些实施方式中,进行reREP期直至第四TIL群中TIL数量与第三TIL群中TIL数量的比率大于50:1。

[1130] 在一些实施方式中,对于治疗有效剂量来说足够的TIL的数量为约2.3×10^{10}至约13.7×10^{10}。

[1131] 在一些实施方式中,步骤(i)至(vii)进行约21天至约33天的时间。在一些实施方式中,步骤(i)至(vii)进行约21天至约30天的时间。在一些实施方式中,步骤(i)至(vii)进行约21天至约28天的时间。在一些实施方式中,步骤(i)至(vii)进行约24天。在一些实施方式中,来自步骤(iii)或(vii)的细胞表达CD4、CD8和TCRαβ的水平与新鲜收获的细胞相似。在一些实施方式中,细胞是TIL。

[1132] 在一些实施方式中,抗原呈递细胞是外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方式中,在步骤(ii)的第3天至12天中的任一天和/或步骤(iii)的第11天至14天中的任一天将PBMC添加到细胞培养物中。

[1133] 在一些实施方式中,相对于第三TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,步骤(iii)或(vii)中的更大的TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

[1134] 在一些实施方式中,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

[1135] 在一些实施方式中,APC是人造APC(aAPC)。

[1136] 在一些实施方式中,用表达载体转导第一TIL群的步骤,所述表达载体包含编码高亲和力T细胞受体的核酸。

[1137] 在一些实施方式中,转导步骤发生在步骤(i)之前。

[1138] 在一些实施方式中,用表达载体转导第一TIL群的步骤,所述表达载体包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸,所述嵌合抗原受体包含与T细胞信号传导分子的至少一个内结构域融合的单链可变片段抗体。

[1139] 在一些实施方式中,转导步骤发生在步骤(i)之前。

[1140] 在一些实施方式中,在步骤(vii)之后测定TIL的活力。

[1141] 本公开还提供了测定TIL的其他方法。在一些实施方式中,本公开提供了测定TIL的方法,该方法包括:

[1142] (i)由核心活检样品获得冷冻保存的第一TIL群的一部分;

[1143] (ii)解冻冷冻保存的第一TIL群的该部分;

[1144] (iii)通过在包含IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基中培养第一TIL群的该部分持续至少3天的reREP阶段来进行第一次扩增,产生第二TIL群;其中,将第一TIL群的该部分与第二TIL群进行比较,获得TIL数量的比率;其中,第二TIL群的TIL数量与第一

TIL群的该部分的TIL数量的比率大于5:1;其中,经过约10天至约19天,第二TIL群包含至少5×10^7个TIL;

[1145] (iv)基于步骤(iii)中的比率和步骤(iii)中的TIL的数量,确定第一TIL群是否适合用于对患者的治疗性施用;以及

[1146] (v)当确定第二TIL群中的TIL数量与第一TIL群中的TIL数量的比率大于5:1时,确定第一TIL群适合用于步骤(iv)中的治疗性施用。

[1147] 在一些实施方式中,第二TIL群中的TIL数量与第一TIL群的该部分的TIL数量的比率大于50:1。

[1148] 在一些实施方式中,该方法还包括根据如本文提供的任何实施方式中所述的方法,对步骤(i)的冷冻保存的整个第一TIL群进行扩增。

[1149] 在一些实施方式中,该方法还包括将来自步骤(i)的冷冻保存的整个第一TIL群施用给患者。

[1150] IX.用于TIL生产的封闭系统

[1151] 本发明提供了在使用Gen 2过程或Gen 3过程的TIL培养过程中使用封闭系统。此类封闭系统允许预防和/或减少微生物污染,允许使用更少的烧瓶,并允许降低成本。在一些实施方式中,封闭系统使用两个容器。

[1152] 此类封闭系统在本领域中是众所周知的,且可见于例如http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm和https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm。

[1153] 无菌连接装置(STCD)在两根兼容管之间产生无菌焊缝。该程序允许无菌连接各种容器和管径。在一些实施方式中,封闭系统包括鲁尔锁和热密封系统。在一些实施方式中,在无菌条件下通过注射器接近封闭系统,以维持系统的无菌性和封闭性。在一些实施方式中,采用封闭系统。在一些实施方式中,将TIL配制到终产物制剂容器中。

[1154] 在一些实施方式中,从获得肿瘤碎片的时间直至TIL准备好施用于患者或冷冻保存之前,封闭系统使用一个容器。在一些实施方式中,当使用两个容器时,第一容器是封闭的G容器,TIL群被离心并转移到输液袋而不打开第一封闭的G容器。在一些实施方式中,当使用两个容器时,输液袋是含有HypoThermosol的输液袋。封闭系统或封闭TIL细胞培养系统的特征在于,一旦添加了肿瘤样品和/或肿瘤碎片,该系统就与外界紧密密封,形成了一个不受细菌、真菌和/或任何其他微生物污染物入侵的封闭环境。

[1155] 在一些实施方式中,微生物污染减少约5%至约100%。在一些实施方式中,微生物污染减少约5%至约95%。在一些实施方式中,微生物污染减少约5%至约90%。在一些实施方式中,微生物污染减少约10%至约90%。在一些实施方式中,微生物污染减少约15%至约85%。在一些实施方式中,微生物污染减少约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约97%、约98%、约99%或约100%。

[1156] 封闭的系统允许在不存在和/或微生物污染显著减少的情况下生长TIL。

[1157] 此外,TIL细胞培养环境的pH、二氧化碳分压和氧分压均随着细胞的培养而变化。因此,即使循环了适合于细胞培养的培养基,仍需要使封闭的环境不断保持为TIL增殖的最佳环境。为此,期望通过传感器来监测封闭环境的培养液中的物理因素pH、二氧化碳分压和

氧气分压,该传感器的信号用于控制安装在培养环境入口处的气体交换器,根据培养液的变化实时调节封闭环境的气体分压,以优化细胞培养环境。在一些实施方式中,本发明提供了封闭细胞培养系统,该系统在封闭环境的入口处结合有配备有监测装置的气体交换器,该监测装置测量封闭环境的pH、二氧化碳分压和氧气分压,并通过根据来自监测设备的信号自动调节气体浓度来优化细胞培养环境。

[1158] 在一些实施方式中,封闭环境中的压力被连续地或间歇地控制。即,例如可通过压力维持装置来改变封闭环境中的压力,从而确保该空间在正压状态下适合于TIL的生长,或者在负压状态下促进流体的渗出,从而促进细胞增殖。此外,通过间歇地施加负压,可通过封闭环境的体积的暂时收缩来均匀且有效地替换封闭环境中的循环液体。

[1159] 在一些实施方式中,可以替代或添加用于TIL增殖的最佳培养组分,可添加因子(例如IL-2和/或OKT3以及它们的组合)。

[1160] X.可选的TIL的基因工程

[1161] 在Gen 2或Gen 3方法的一些实施方式中,各自如本文所述,在扩增步骤之前、期间或之后(包括在封闭的无菌制造期间),对本发明的扩增的TIL进行进一步处理,以便于以瞬时(transient)方式改变蛋白质表达。在一些实施方式中,瞬时改变的蛋白质表达是由瞬时基因编辑所引起。在一些实施方式中,用转录因子(TF)和/或能够瞬时改变TIL中蛋白质表达的其他分子处理本发明的扩增的TIL。在一些实施方式中,能够瞬时改变蛋白质表达的TF和/或其他分子提供了改变的肿瘤抗原表达和/或改变了TIL群中肿瘤抗原特异性T细胞的数量。

[1162] 在某些实施方式中,该方法包括基因编辑TIL群。在某些实施方式中,该方法包括基因编辑第一TIL群、第二TIL群和/或第三TIL群。

[1163] 在一些实施方式中,本发明包括通过核苷酸插入(例如通过核糖核酸(RNA)插入,包括信使RNA(mRNA)或小(或短)干扰RNA(siRNA)插入)TIL群进行基因编辑,以促进一种以上蛋白质表达或抑制一种以上蛋白质表达,以及同时促进一组蛋白质与抑制另一组蛋白质的组合。

[1164] 在一些实施方式中,本发明的扩增的TIL经历蛋白质表达的瞬时改变。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变在第一次扩增之前发生于大量TIL群,包括例如在由例如图85(特别是图85B)所示步骤A获得的TIL群。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变发生于第一次扩增期间,包括例如图85(例如图85B)所示步骤B扩增的TIL群。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变发生于第一次扩增后,包括例如第一次扩增至第二次扩增之间过渡的TIL群(例如本文所述的第二TIL群),例如由图85所示步骤B获得并包括在图85所示步骤C中的TIL群。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变发生在第二次扩增之前的大量TIL群中,包括例如由例如图85所示步骤C获得且在步骤D中扩增之前的TIL群。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变发生在第二次扩增期间,包括例如在如图85所示的步骤D中扩增的TIL群(例如第三TIL群)。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变发生在第二次扩增之后,包括例如由例如图85中所示的步骤D扩增获得的TIL群。

[1165] 在一个实施方式中,瞬时改变TIL群中的蛋白质表达的方法包括电穿孔的步骤。电穿孔方法是本领域已知的且描述于例如Tsong,Biophys.J.1991,60,297-306和美国专利申请公开号2014/0227237A1,其各自公开内容通过引用并入本文。在一个实施方式中,瞬时改

变TIL群中蛋白质表达的方法包括磷酸钙转染的步骤。磷酸钙转染方法(磷酸钙DNA沉淀、细胞表面包被和内吞作用)在本领域中是已知的且描述于Graham和van der Eb,Virology 1973,52,456-467;Wigler等,Proc.Natl.Acad.Sci.1979,76,1373-1376;Chen和Okayarea,Mol.Cell.Biol.1987,7,2745-2752;以及美国专利号5,593,875,其各自公开内容通过引用并入本文。在一个实施方式中,瞬时改变TIL群中蛋白质表达的方法包括脂质体转染的步骤。脂质体转染方法,例如在过滤水中采用阳离子脂质N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-n,n,n-三甲基氯化铵(DOTMA)和二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)的1:1(w/w)脂质制剂的方法是本领域已知的,并描述于Rose等,Biotechniques 1991,10,520-525和Felgner等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1987,84,7413-7417以及美国专利号5279833;5,908,635;6,056,938;6,110,490;6,534,484和7,687,070,其各自公开内容通过引用并入本文。在一个实施方式中,瞬时改变TIL群中的蛋白质表达的方法包括使用美国专利号5,766,902;6,025,337;6,410,517;6,475,994和7,189,705中所述的方法进行转染的步骤,其各自公开内容通过引用并入本文。

[1166] 在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变导致T记忆干细胞(TSCM)增加。TSCM是经历过抗原的中枢记忆T细胞的早期祖细胞。TSCM通常显示出定义干细胞的长期存活、自我更新和多效价能力,通常是产生有效的TIL产物所需的。与过继细胞转移的小鼠模型中的其他T细胞亚群相比,TSCM已显示出增强的抗肿瘤活性(Gattinoni等,Nat Med 2009,2011;Gattinoni,Nature Rev.Cancer,2012;Cieri等,Blood 2013)。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得TIL群具有包含高比例TSCM的组成。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得TSCM百分比增加至少5%、至少10%、至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得TIL群中TSCM增加至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍或10倍。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得TIL群的TSCM为至少5%、至少10%、至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得治疗性TIL群的TSCM为至少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%。

[1167] 在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得经历抗原的T细胞恢复活力(rejuvenation)。在一些实施方式中,恢复活力包括例如增殖增加、T细胞活化增加和/或抗原识别增加。

[1168] 在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变改变了大部分T细胞中的表达,以保留肿瘤来源的TCR库(TCR repertoire)。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变不改变肿瘤来源的TCR库。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变维持肿瘤来源的TCR库。

[1169] 在一些实施方式中,蛋白质的瞬时改变导致特定基因的表达改变。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向的基因包括但不限于PD-1(也称为PDCD1或CC279)、TGFBR2、CCR4/5、CBLB(CBL-B)、CISH、CCR(嵌合共刺激受体)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TGFβ、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2(MCP-

1)、CCL3(MIP-1α)、CCL4(MIP1-β)、CCL5(RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1和/或cAMP蛋白激酶A(PKA)。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向的基因选自PD-1、TGFBR2、CCR4/5、CBLB(CBL-B)、CISH、CCR(嵌合共刺激受体)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TGFβ、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1α)、CCL4(MIP1-β)、CCL5(RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1和/或cAMP蛋白激酶A(PKA)。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向PD-1。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向TGFBR2。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCR4/5。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CBLB。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CISH。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCR(嵌合共刺激受体)。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向IL-2。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向IL-12。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向IL-15。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向IL-21。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向NOTCH 1/2ICD。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向TIM3。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向LAG3。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向TIGIT。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向TGFβ。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCR1。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCR2。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCR4。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCR5。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CXCR1。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CXCR2。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CSCR3。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCL2(MCP-1)。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCL3(MIP-1α)。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCL4(MIP1-β)。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCL5(RANTES)。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CXCL1。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CXCL8。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCL22。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CCL17。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向VHL。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向CD44。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向PIK3CD。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变靶向SOCS1。在一些实施方式中,蛋白表达的瞬时改变靶向cAMP蛋白激酶A(PKA)。

[1170] 在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得趋化因子受体增加和/或过表达。在一些实施方式中,由瞬时蛋白表达过度表达的趋化因子受体包括具有配体的受体,该配体包括但不限于CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1α)、CCL4(MIP1-β)、CCL5(RANTES)、CXCL1、CXCL8、CCL22和/或CCL17。

[1171] 在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变导致PD-1、CTLA-4、TIM-3、LAG-3、TIGIT、TGFβR2和/或TGFβ的表达降低和/或减少(包括例如导致TGFβ通路阻滞)。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变导致CBLB(CBL-B)表达降低和/或减少。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变导致CISH表达降低和/或减少。

[1172] 在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变导致趋化因子受体的增加和/或过表达,以例如改善TIL运输或向肿瘤部位的运动。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变

导致CCR(嵌合共刺激受体)增加和/或过表达。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变导致选自CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2和/或CSCR3的趋化因子受体增加和/或过表达。

[1173] 在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变导致白介素增加和/或过表达。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变导致选自IL-2、IL-12、IL-15和/或IL-21的白介素增加和/或过表达。

[1174] 在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变导致NOTCH 1/2ICD增加和/或过表达。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变导致VHL增加和/或过表达。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变导致CD44增加和/或过表达。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变导致PIK3CD增加和/或过表达。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变导致SOCS1增加和/或过表达,

[1175] 在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变导致cAMP蛋白激酶A(PKA)表达降低和/或减少。

[1176] 在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得选自PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及它们的组合的一种分子表达降低和/或减少。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得选自PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及它们的组合的两种分子表达降低和/或减少。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得PD-1和选自LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及它们的组合的一种分子的表达降低和/或减少。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得PD-1、LAG-3、CISH、CBLB、TIM3及它们的组合的表达降低和/或减少。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得PD-1以及LAG3、CISH、CBLB、TIM3及它们的组合之一的表达降低和/或减少。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得PD-1和LAG3的表达降低和/或减少。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得PD-1和CISH的表达降低和/或减少。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得PD-1和CBLB的表达降低和/或减少。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得LAG3和CISH的表达降低和/或减少。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得LAG3和CBLB的表达降低和/或减少。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得CISH和CBLB的表达降低和/或减少。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得TIM3和PD-1的表达降低和/或减少。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得TIM3和LAG3的表达降低和/或减少。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得TIM3和CISH的表达降低和/或减少。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得TIM3和CBLB的表达降低和/或减少。

[1177] 在一些实施方式中,通过γ-逆转录病毒或慢病毒方法将选自CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及它们的组合的粘附分子插入第一TIL群、第二TIL群或收获的TIL群(例如粘附分子表达增加)。

[1178] 在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得选自PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及它们的组合的分子的表达降低和/或减少,以及CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及它们的组合的表达增加和/或增强。在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变使得选自PD-1、LAG3、TIM3、CISH、CBLB及它们的组合的分子的表达降低和/或减少,以及CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及它们的组合的表达增

加和/或增强。

[1179] 在一些实施方式中,表达降低约5%、约10%、约10%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施方式中,表达降低至少约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施方式中,表达降低至少约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施方式中,表达降低至少约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施方式中,表达降低至少约85%、约90%或约95%。在一些实施方式中,表达降低至少约80%。在一些实施方式中,表达降低至少约85%。在一些实施方式中,表达降低至少约90%。在一些实施方式中,表达降低至少约95%。在一些实施方式中,表达降低至少约99%。

[1180] 在一些实施方式中,表达增加约5%、约10%、约10%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施方式中,表达增加至少约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施方式中,表达增加至少约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施方式中,表达增加至少约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施方式中,表达增加至少约85%、约90%或约95%。在一些实施方式中,表达增加至少约80%。在一些实施方式中,表达增加至少约85%。在一些实施方式中,表达增加至少约90%。在一些实施方式中,表达增加至少约95%。在一些实施方式中,表达增加至少约99%。

[1181] 在一些实施方式中,通过用转录因子(TF)和/或能够瞬时改变TIL中的蛋白质表达的其他分子处理TIL来诱导蛋白质表达的瞬时改变。在一些实施方式中,无SQZ载体的微流体平台用于转录因子(TF)和/或能够瞬时改变蛋白质表达的其他分子的细胞内递送。此类方法证明了将包括转录因子在内的蛋白质递送至包括T细胞在内的多种原代人类细胞的能力,已描述于(Sharei等,PNAS 2013,以及Sharei等,PLOS ONE 2015和Greisbeck等,J.Immunology 2015,第195卷);参见例如国际专利公开号WO2013/059343A1、WO2017/008063A1和WO2017/123663A1,所有这些文献均通过引用整体并入本文。如国际专利公开文本WO2013/059343A1、WO2017/008063A1和WO2017/123663A1所述的方法可与本发明一起使用,以使TIL群暴露于转录因子(TF)和/或其他能够诱导瞬时蛋白表达的分子,其中,所述TF和/或能够诱导瞬时蛋白表达的其他分子提供增加的肿瘤抗原表达和/或增加TIL群中肿瘤抗原特异性T细胞的数量,从而导致TIL群的重编程(reprogramming),并且与未重编程的TIL群相比,重编程的TIL群重编程的治疗功效提高。在一些实施方式中,如本文所述,相对于起始TIL群或先前(即在重编程之前)的TIL群,重编程使得效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群增加。

[1182] 在一些实施方式中,转录因子(TF)包括但不限于TCF-1、NOTCH 1/2ICD和/或MYB。在一些实施方式中,转录因子(TF)是TCF-1。在一些实施方式中,转录因子(TF)是NOTCH 1/2ICD。在一些实施方式中,转录因子(TF)是MYB。在一些实施方式中,将转录因子(TF)与诱导的多能干细胞培养物(iPSC)(例如市售的KNOCKOUT血清替代品(Gibco/ThermoFisher))一起施用,以诱导另外的TIL重编程。在一些实施方式中,将转录因子(TF)与iPSC混合物一起施用以诱导另外的TIL重编程。在一些实施方式中,在没有iPSC混合物的情况下施用转录因子(TF)。在一些实施方式中,重编程导致TSCM的百分比增加。在一些实施方式中,重编程导致TSCM百分比增加约5%、约10%、约10%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约

45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％或约95％TSCM。

[1183] 在一些实施方式中,如上所述的瞬时改变蛋白质表达的方法可与基因修饰TIL群的方法结合,该方法包括稳定掺入用于产生一种以上蛋白质的基因的步骤。在某些实施方式中,该方法包括基因修饰TIL群的步骤。在某些实施方式中,该方法包括基因修饰第一TIL群、第二TIL群和/或第三TIL群。在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括逆转录病毒转导的步骤。在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括慢病毒转导的步骤。慢病毒转导系统在本领域中是已知的,并描述于例如Levine等,Proc.Nat'l Acad.Sci.2006,103,17372-77;Zufferey等,Nat.Biotechnol.1997,15,871-75;Dull等,J.Virology1998,72,8463-71和美国专利号6,627,442,其各自公开内容通过引用并入本文。在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括γ-逆转录病毒转导的步骤。γ-逆转录病毒转导系统在本领域中是已知的,并描述于例如Cepko和Pear,Cur.Prot.Mol.Biol.1996,9.9.1-9.9.16,其公开内容通过引用并入本文。在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括转座子介导的基因转移的步骤。转座子介导的基因转移系统是本领域已知的,且包括如下系统:其中,所述转座酶以DNA表达载体或可表达的RNA或蛋白质的形式提供,使得转座酶不会在转基因细胞中长期表达,例如以mRNA(例如包含帽和poly-A尾巴的mRNA)形式提供的转座酶。合适的转座子介导的基因转移系统,包括鲑鱼型(salmonid-type)Tel样转座酶(SB或Sleeping Beauty转座酶),例如SB10、SB11和SB100x以及酶活性提高的工程化酶,描述于例如Hackett等,Mol.Therapy 2010,18,674-83和美国专利号6,489,458,其各自公开内容通过引用并入本文。

[1184] 在一些实施方式中,蛋白质表达的瞬时改变是由自递送RNA干扰(sdRNA,self-delivering RNA interference)诱导的表达的降低,所述sdRNA是具有高百分比的2'-OH取代(通常是氟或-OCH_3)的化学合成的不对称siRNA双链体,所述sdRNA包含一个20个核苷酸的反义(引导)链和一个在其3'端使用四乙基乙二醇(TEG)接头缀合至胆固醇的13至15个碱基的正义(随从)链。在一些实施方式中,该方法包括TIL群中蛋白质表达的瞬时改变,包括使用自递送RNA干扰(sdRNA),所述sdRNA是具有高百分比的2'-OH取代(通常是氟或-OCH_3)的化学合成的不对称siRNA双链体,所述sdRNA包含一个20个核苷酸的反义(引导)链和一个在其3'端使用四乙基乙二醇(TEG)接头缀合至胆固醇的13至15个碱基的正义(随从)链。使用sdRNA的方法已描述于Khvorova和Watts,Nat.Biotechnol.2017,35,238-248;Byrne等,J.Ocul.Pharmacol.Ther.2013,29,855-864;以及Ligtenberg等,Mol.Therapy,2018,in press,,其公开内容通过引用并入本文。在一个实施方式中,将sdRNA递送至TIL群无需使用电穿孔、SQZ或其他方法即可完成,而是使用1至3天的时间,其中,在培养基中将TIL群暴露于浓度为1μM/10,000TIL的sdRNA。在某些实施方式中,该方法包括将sdRNA递送至TIL群,包括在培养基中将TIL群暴露于浓度为1μM/10,000TIL的sdRNA,持续1至3天。在一个实施方式中,将sdRNA递送至TIL群使用1至3天的时间来完成,在该时间内,在培养基中将TIL群暴露于浓度为10μM/10,000TIL的sdRNA。在一个实施方式中,将sdRNA递送至TIL群使用1至3天的时间来完成,其中,在培养基中将TIL群暴露于浓度为50μM/10,000TIL的sdRNA。在一个实施方式中,将sdRNA递送至TIL群使用1至3天的时间来完成,其中,在培养基中将TIL群暴露于浓度为0.1μM/10,000TIL至50μM/10,000TIL的sdRNA。在一个实施方式中,将sdRNA递送至

TIL群使用1至3天的时间来完成,其中,在培养基中将TIL群暴露于浓度为0.1μM/10,000TIL至50μM/10,000TIL的sdRNA;其中,通过向培养基中添加新鲜的sdRNA,暴露于sdRNA进行两次、三次、四次或五次。其他合适的方法描述于例如美国专利申请公开号US2011/0039914A1、US2013/0131141A1和US2013/0131142A1以及美国专利号9,080,171,其公开内容通过引用并入本文。

[1185] 在一些实施方式中,在制造过程中将sdRNA插入TIL群。在一些实施方式中,sdRNA编码干扰NOTCH 1/2ICD、PD-1、CTLA-4TIM-3、LAG-3、TIGIT、TGFβ、TGFBR2、cAMP蛋白激酶A(PKA)、BAFF BR3、CISH和/或CBLB的RNA。在一些实施方式中,基于基因沉默的百分比来确定表达的减少,例如通过流式细胞术和/或qPCR来评估。在一些实施方式中,表达降低约5%、约10%、约10%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施方式中,表达降低至少约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施方式中,表达降低至少约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施方式中,表达降低至少约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施方式中,表达降低至少约85%、约90%或约95%。在一些实施方式中,表达降低至少约80%。在一些实施方式中,表达降低至少约85%。在一些实施方式中,表达降低至少约90%。在一些实施方式中,表达降低至少约95%。在一些实施方式中,表达降低至少约99%。

[1186] 基于siRNA的化学修饰的自递送RNAi技术可与本发明的方法一起使用,以成功地将sdRNA递送至本文所述的TIL。骨架修饰与不对称siRNA结构和疏水配体的结合(参见例如Ligtenberg等,Mol.Therapy,2018和US20160304873)使sdRNA利用sdRNA的核酸酶稳定性通过简单的添加至培养基而无需其他制剂和方法即可穿透到培养的哺乳动物细胞中。仅通过保持培养基中sdRNA的活性浓度,此种稳定性就可以支持恒定水平的RNAi介导的靶基因活性降低。不受理论的束缚,sdRNA的主链稳定作用可延长基因表达效应的降低,在非分裂细胞中可持续数月。

[1187] 在一些实施方式中,发生超过95%的TIL转染效率和各种特异性sdRNA的靶标表达降低。在一些实施方式中,含有几个未修饰的核糖残基的sdRNA用完全修饰的序列代替,以增加RNAi作用的效价和/或寿命。在一些实施方式中,表达效果的降低维持12小时、24小时、36小时、48小时、5天、6天、7天或8天或更长时间。在一些实施方式中,在TIL的sdRNA处理后10天或更长时间,表达降低的效果下降。在一些实施方式中,维持目标表达的表达减少超过70%。在一些实施方式中,维持TIL目标表达的表达减少超过70%。在一些实施方式中,PD-1/PD-L1通路中表达的减少允许TIL表现出更有效的体内作用,这在一些实施方式中是由于避免了PD-1/PD-L1通路的抑制作用。在一些实施方式中,通过sdRNA的PD-1表达的减少导致TIL增殖的增加。

[1188] 小干扰RNA(siRNA,small interfering RNA),有时也称为短干扰RNA或沉默RNA,是双链RNA分子,其长度通常为19-25个碱基对。siRNA用于RNA干扰(RNAi),在其中siRNA干扰具有互补核苷酸序列的特定基因的表达。

[1189] 双链DNA(dsRNA)通常可用于定义包含一对RNA互补链的任何分子,所述互补链通常是有义(随从)和反义(引导)链,并且可包括单链突出端区域。与siRNA相反,术语dsRNA通常指包含siRNA分子序列的前体分子,该序列通过切割酶系统(包括Dicer)的作用从较大的

dsRNA分子中释放出来。

[1190] sdRNA(自递送RNA)是一类新的共价修饰的RNAi化合物,其进入细胞不需要递送载体并且与传统的siRNA相比具有改善的药理学。“自递送RNA”或“sdRNA”是疏水修饰的RNA干扰-反义杂合体,其在体外在原代细胞中和在局部施用时在体内被证明是高效的。已证明了无毒的稳健摄取和/或沉默。sdRNA通常是具有最小双链区的不对称化学修饰核酸分子。sdRNA分子通常包含单链区域和双链区域,并且可在分子的单链和双链区域内包含多种化学修饰。另外,如本文所述,sdRNA分子可以连接至疏水缀合物,例如常规和高级固醇型分子。sdRNA及其制备方法也已广泛描述于例如US20160304873、WO2010033246、WO2017070151、WO2009102427、WO2011119887、WO2010033247A2、WO2009045457、WO2011119852,出于所有目的将其全部内容通过引用并入本文。为优化sdRNA的结构、化学性质、靶向位置、序列偏好等,已开发了专有算法并将其用于sdRNA效价预测(参见例如US20160304873)。基于这些分析,通常将功能性sdRNA序列定义为在1μM浓度下具有超过70%的表达降低,其概率超过40%。

[1191] 在一些实施方式中,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低70%。在一些实施方式中,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低75%。在一些实施方式中,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低80%。在一些实施方式中,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低85%。在一些实施方式中,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低90%。在一些实施方式中,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低95%。在一些实施方式中,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低99%。在一些实施方式中,当以约0.25μM至约4μM的浓度递送时,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低。在一些实施方式中,当以约0.25μM的浓度递送时,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低。在一些实施方式中,当以约0.5μM的浓度递送时,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低。在一些实施方式中,当以约0.75μM的浓度递送时,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低。在一些实施方式中,当以约1.0μM的浓度递送时,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低。在一些实施方式中,当以约1.25μM的浓度递送时,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低。在一些实施方式中,当以约1.5μM的浓度递送时,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低。在一些实施方式中,当以约1.75μM的浓度递送时,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低。在一些实施方式中,当以约2.0μM的浓度递送时,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低。在一些实施方式中,当以约2.25μM的浓度递送时,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低。在一些实施方式中,当以约2.5μM的浓度递送时,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低。在一些实施方式中,当以约2.75μM的浓度递送时,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低。在一些实施方式中,当以约3.0μM的浓度递送时,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低。在一些实施方式中,当以约3.25μM的浓度递送时,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低。在一些实施方式中,当以约3.5μM的浓度递送时,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低。在一些实施方式中,当以约3.75μM的浓度递送时,本发明所用sdRNA序列表现出靶基因表达降低。在一些实施方式中,当以约4.0μM的浓度递送时,本发明所用sdRNA序列显示靶基因表达降低。

[1192] 在一些实施方式中,寡核苷酸试剂包含一种以上修饰,以增加治疗剂的稳定性和/或有效性,并实现寡核苷酸向待治疗细胞或组织的有效递送。此类修饰可包括2'-O-甲基修

饰、2'-O-氟代修饰、二硫代磷酸酯修饰、2'F修饰的核苷酸、a2'-O-甲基修饰的核苷酸和/或2'脱氧核苷酸。在一些实施方式中,寡核苷酸被修饰以包括一种以上疏水性修饰,包括例如固醇、胆固醇、维生素D、萘基、异丁基、苄基、吲哚、色氨酸和/或苯基。在另一个特定的实施方式中,化学修饰的核苷酸是硫代磷酸酯、2'-O-甲基、2'脱氧、疏水性修饰和硫代磷酸酯的组合。在一些实施方式中,可对糖进行修饰,修饰的糖可包括但不限于D-核糖、2'-O-烷基(包括2'-O-甲基和2'-O-乙基)、即2'-烷氧基、2'-氨基、2'-S-烷基、2'-卤代(包括2'-氟)、T-甲氧基乙氧基、2'-烯丙氧基($-OCH_2CH=CH_2$)、2'-炔丙基、2'-丙基、乙炔基、乙烯基、丙烯基和氰基等。在一个实施方式中,糖部分可为己糖,并如所述被掺入寡核苷酸中(Augustyns,K.等,Nucl.Acids.Res.18:4711(1992))。

[1193] 在一些实施方式中,本发明的双链寡核苷酸在其整个长度上是双链,即在分子的任一端没有突出的单链序列,即,为平末端的。在一些实施方式中,各个核酸分子可具有不同的长度。换言之,本发明的双链寡核苷酸在其整个长度上不是双链。例如,当使用两个单独的核酸分子时,分子之一(例如包含反义序列的第一分子)可以比与其杂交的第二分子更长(导致分子的一部分是单链)。在一些实施方式中,当使用单个核酸分子时,该分子在任一端的一部分可保持单链。

[1194] 在一些实施方式中,本发明的双链寡核苷酸含有错配和/或环或凸起,但寡核苷酸的长度的至少约70%是双链。在一些实施方式中,本发明的双链寡核苷酸在寡核苷酸的长度的至少约80%是双链。在另一个实施方式中,本发明的双链寡核苷酸在寡核苷酸的长度的至少约90%-95%是双链。在一些实施方式中,本发明的双链寡核苷酸在寡核苷酸的长度的至少约96%-98%是双链。在一些实施方式中,本发明的双链寡核苷酸包含至少或至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个错配。

[1195] 在一些实施方式中,例如可通过修饰3'或5'键来保护寡核苷酸基本上免受核酸酶的影响(例如美国专利号5,849,902和WO98/13526)。例如,可通过包含"阻断基团"使寡核苷酸具有抗性。如本文所用,术语"阻断基团"指可以作为用于合成的保护基或偶联基团(例如FITC、丙基($CH_2-CH_2-CH_3$)、乙二醇($-O-CH_2-CH_2-O-$)磷酸盐(PO_3^{2+})、膦酸氢盐或亚磷酰胺)连接到寡核苷酸或核苷酸单体(nucleomonomer)上的取代基(例如,OH基以外的基团)。"阻断基团"还可包括"末端阻断基团"或"核酸外切酶阻断基团",其保护寡核苷酸的5'和3'末端,包括修饰的核苷酸和非核苷酸核酸外切酶抗性结构。

[1196] 在一些实施方式中,sdRNA内的至少一部分连续多核苷酸通过替代键(例如硫代磷酸酯键)连接。

[1197] 在一些实施方式中,化学修饰可导致细胞摄取增强至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55,60,65,70,75,80,85,90,95,100,105,110,115,120,125,130,135,140,145,150,155,160,165,170,175、180、185、190、195、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500。在一些实施方式中,C或U残基中的至少一个包括疏水性修饰。在一些实施方式中,多个C和U包含疏水性修饰。在一些实施方式中,至少10%,15%,20%,30%,40%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%或至少95%的C和U可包含疏水性修饰。在一些实施方式中,所有的C和U均包含疏水性修饰。

[1198] 在一些实施方式中,sdRNA或sd-rxRNA通过掺入可质子化的胺表现出增强的sd-rxRNA分子的核内体释放。在一些实施方式中,将可质子化的胺掺入有义链中(在RISC加载

后被丢弃的分子的一部分中)。在一些实施方式中,本发明的sdRNA化合物包含不对称化合物,该不对称化合物包含双链体区域(10-15个碱基长的有效RISC条目(entry)所需的)和4-12个核苷酸长的单链区域;具有13个核苷酸的双链体。在一些实施方式中,采用6个核苷酸的单链区。在一些实施方式中,sdRNA的单链区包含2-12个硫代磷酸酯核苷酸间键(称为硫代磷酸酯修饰)。在一些实施方式中,采用6-8个硫代磷酸酯核苷酸间键。在一些实施方式中,本发明的sdRNA化合物还包括独特的化学修饰模式,其提供稳定性并与RISC条目相容。

[1199] 例如,引导链还可通过任何化学修饰来修饰,该化学修饰在不干扰RISC条目的情况下巩固稳定性。在一些实施方式中,引导链中的化学修饰模式包括:大部分的C和U核苷酸为2'F修饰的且5'端为磷酸化的。

[1200] 在一些实施方式中,sdRNA或sd-rxRNA中至少30%的核苷酸被修饰。在一些实施方式中,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%的核苷酸被修饰。在一些实施方式中,sdRNA或sd-rxRNA中100%核苷酸被修饰。

[1201] 在一些实施方式中,sdRNA分子具有最小的双链区。在一些实施方式中,分子的双链区的长度为8-15个核苷酸。在一些实施方式中,分子的双链区为8、9、10、11、12、13、14或15个核苷酸长。在一些实施方式中,双链区为13个核苷酸长。引导链和随从链之间可以有100%的互补性,或者引导链和随从链之间可能存在一个以上错配。在一些实施方式中,在双链分子的一端,该分子是平末端的或具有一个核苷酸的突出端。在一些实施方式中,分子的单链区为4-12个核苷酸长。在一些实施方式中,单链区可为4、5、6、7、8、9、10、11或12个核苷酸长。在一些实施方式中,单链区也可小于4个核苷酸或大于12个核苷酸长。在某些实施方式中,单链区为6或7个核苷酸长。

[1202] 在一些实施方式中,sdRNA分子具有增加的稳定性。在某些情况下,化学修饰的sdRNA或sd-rxRNA分子在介质中的半衰期长于1、2、3、4、5、6、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或超过24小时,包括任何中间值。在一些实施方式中,sd-rxRNA在介质中的半衰期长于12小时。

[1203] 在一些实施方式中,对sdRNA进行优化以提高效价和/或降低毒性。在一些实施方式中,引导链和/或随从链的核苷酸长度和/或引导链和/或随从链中硫代磷酸酯修饰的数目可在某些方面影响RNA分子的效价,而用2'-O-甲基(2'OMe)修饰替换2'-氟(2'F)修饰可在某些方面影响分子的毒性。在一些实施方式中,预测分子中2'F含量的减少会降低分子的毒性。在一些实施方式中,RNA分子中硫代磷酸酯修饰的数量可以影响该分子被摄取到细胞中,例如,该分子被被动摄取到细胞中的效率。在一些实施方式中,该sdRNA没有2'F修饰,但其特征在于在细胞摄取和组织渗透方面的功效相等。

[1204] 在一些实施方式中,引导链的长度是约18-19个核苷酸,并且具有约2-14个磷酸酯修饰。例如,引导链可包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或多于14个经磷酸修饰的核苷酸。引导链可包含一种以上修饰,其赋予增加的稳定性而不干扰RISC条目。磷酸修饰的核苷酸,例如硫代磷酸酯修饰的核苷酸,可位于3'端,5'端或遍布整个引导链。在一些实施方

式中,引导链的3'末端10个核苷酸包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个硫代磷酸酯修饰的核苷酸。引导链还可包含2'F和/或2'OMe修饰,其可位于整个分子中。在一些实施方式中,在引导链之一的位置的核苷酸(在引导链的最5'位置的核苷酸)是2'OMe修饰的和/或磷酸化的。引导链内的C和U核苷酸可以为2'F修饰的。例如,在19nt的引导链的2-10位(或在不同长度的引导链中的相应位置)的C和U核苷酸可以为2'F修饰的。引导链内的C和U核苷酸也可以为2'OMe修饰的。例如,在19nt的引导链的11-18位(或在不同长度的引导链中的相应位置)的C和U核苷酸可以为2'OMe修饰的。在一些实施方式中,在引导链的最3'端的核苷酸未修饰。在某些实施方式中,引导链内的大多数C和U为2'F修饰的,并且引导链的5'端为磷酸化的。在其他实施方式中,1位和11-18位的C或U为2'OMe修饰的,并且引导链的5'端为磷酸化的。在其他实施方式中,1位和11-18位的C或U为2'OMe修饰的,引导链的5'末端为磷酸化的,并且2-10位的C或U为2'F修饰的。

[1205] 自递送RNAi技术提供了用RNAi剂直接转染细胞的方法,无需额外制剂或技术。转染难以转染的细胞系的能力、高体内活性和使用简便是组合物和方法的特征,与传统的基于siRNA的技术相比,它们具有明显的功能优势,因此,在一些实施方式中采用了sdRNA方法,涉及在本发明的TIL中减少靶基因表达的方法。sdRNAi方法可将化学合成的化合物直接递送至多种原代和体内的原代细胞和组织。本文在本发明的一些实施方式中描述的sdRNA可购自Advirna LLC(Worcester,MA,USA)。

[1206] sdRNA形成为疏水修饰的siRNA-反义寡核苷酸杂合结构,公开于例如Byrne等,2013年12月,J.Ocular Pharmacology and Therapeutics,29(10):855-864,其内容通过引用并入本文。

[1207] 在一些实施方式中,可使用无菌电穿孔将sdRNA寡核苷酸递送至本文所述的TIL。在某些实施方式中,该方法包括TIL群的无菌电穿孔以递送sdRNA寡核苷酸。

[1208] 在一些实施方式中,寡核苷酸可与跨膜递送系统结合递送至细胞。在一些实施方式中,该跨膜递送系统包含脂质、病毒载体等。在一些实施方式中,寡核苷酸剂是无需任何递送剂的自递送RNAi剂。在某些实施方式中,该方法包括使用跨膜递送系统将sdRNA寡核苷酸递送至TIL群。

[1209] 寡核苷酸和寡核苷酸组合物与本文所述的TIL接触(例如,与之接触,本文也称为施用或递送至)并被其吸收,包括通过TIL的被动摄取。可在第一次扩增期间(例如图7和/或图85,步骤B)、在第一次扩增之后(例如步骤C期间)、在第二次扩增之前或期间(在步骤D期间、在步骤D之后、在步骤E中的收获之前、在步骤F中的收获期间或之后、在步骤F中最终制剂和/或转移到输液袋之前或期间,以及步骤F中的任何可选的冷冻保存步骤之前),将sdRNA如本文所述添加到TIL中。此外,可在步骤F中的任何冷冻保存步骤解冻之后添加sdRNA。在一个实施方式中,一种以上靶向本文所述基因(包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH和CBLB)的sdRNA可以100nM至20mM、200nM至10mM、500nm至1mM、1μM至100μM和1μM至100μM的浓度添加到包含TIL和其他试剂的细胞培养基中。在一个实施方式中,可以选自以下组的量将一种以上靶向本文所述基因(包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH和CBLB)的sdRNA添加至包含TIL和其他试剂的细胞培养基中:0.1μM sdRNA/10,000TIL/100μL培养基、0.5μM sdRNA/10,000TIL/100μL培养基、0.75μM sdRNA/10,000TIL/100μL培养基、1μM sdRNA/10,000TIL/100μL培养基、1.25μM sdRNA/10,000TIL/100μL培养基、1.5μM sdRNA/10,000TIL/100μL培养

基、2μM sdRNA/10,000TIL/100μL培养基、5μM sdRNA/10,000TIL/100μL培养基或10μM sdRNA/10,000TIL/100μL培养基。在一个实施方式中,可以每天两次、每天一次、每两天一次、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,在pre-REP或REP阶段期间将一种以上靶向本文所述基因(包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH和CBLB)的sdRN添加至TIL培养物中。

[1210] 本发明的包括sdRNA的寡核苷酸组合物可以如本文所述在扩增过程中与TIL接触,例如通过将高浓度的sdRNA溶解在细胞培养基中并留有足够的时间进行被动摄取。在某些实施方式中,本发明的方法包括使TIL群与本文所述的寡核苷酸组合物接触。在某些实施方式中,该方法包括将寡核苷酸(例如sdRNA)溶解在细胞培养基中,使细胞培养基与TIL群接触。如本文所述,TIL可为第一群、第二群和/或第三群。

[1211] 在一些实施方式中,可使用本领域已知的方法(参见例如WO90/14074;WO91/16024;WO91/17424;美国专利号4,897,355;Bergan等,Nucleic Acids Research 1993,21:3567)通过合适的本领域公认的方法(包括磷酸钙、DMSO、甘油或葡聚糖、电穿孔或通过转染,例如使用阳离子、阴离子或中性脂质组合物或脂质体)来增强寡核苷酸向细胞内的递送。

[1212] 在一些实施方式中,使用超过一种sdRNA来减少靶基因的表达。在一些实施方式中,PD-1、TIM-3、CBLB、LAG3和/或CISH靶向sdRNA中的一种以上一起使用。在一些实施方式中,PD-1sdRNA与TIM-3、CBLB、LAG3和/或CISH中的一种以上一起使用,以减少一种以上基因靶的表达。在一些实施方式中,将LAG3sdRNA与靶向CISH的sdRNA组合使用以减少两个靶标的基因表达。在一些实施方式中,靶向本文中PD-1、TIM-3、CBLB、LAG3和/或CISH中的一种以上的sdRNA可商购自Advirna LLC(Worcester,MA,USA)。

[1213] 在一些实施方式中,sdRNA靶向选自PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及它们的组合的基因。在一些实施方式中,sdRNA靶向选自PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及它们的组合的基因。在一些实施方式中,一种sdRNA靶向PD-1,另一种sdRNA靶向选自LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及它们的组合的基因。在一些实施方式中,sdRNA靶向选自PD-1、LAG-3、CISH、CBLB、TIM3及它们的组合的基因。在一些实施方式中,sdRNA靶向选自PD-1和LAG3、CISH、CBLB、TIM3及它们的组合的基因。在一些实施方式中,一种sdRNA靶向PD-1,一种sdRNA靶向LAG3。在一些实施方式中,一种sdRNA靶向PD-1,一种sdRNA靶向CISH。在一些实施方式中,一种sdRNA靶向PD-1,一种sdRNA靶向CBLB。在一些实施方式中,一种sdRNA靶向LAG3,一种sdRNA靶向CISH。在一些实施方式中,一种sdRNA靶向LAG3,一种sdRNA靶向CBLB。在一些实施方式中,一种sdRNA靶向CISH,一种sdRNA靶向CBLB。在一些实施方式中,一种sdRNA靶向TIM3,一种sdRNA靶向PD-1。在一些实施方式中,一种sdRNA靶向TIM3,一种sdRNA靶向LAG3。在一些实施方式中,一种sdRNA靶向TIM3,一种sdRNA靶向CISH。在一些实施方式中,一种sdRNA靶向TIM3,一种sdRNA靶向CBLB。

[1214] 如上所述,本发明的实施方式提供了已通过基因编辑基因修饰增强其治疗效果的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。本发明的实施方式包括将核苷酸插入(RNA或DNA)到TIL群中的基因编辑,以促进一种以上蛋白质的表达和抑制一种以上蛋白质的表达以及它们的组合。本发明的实施方式还提供了将TIL扩增为治疗群的方法,其中,所述方法包括对TIL进行基因

编辑。有几种可用于基因修饰TIL群的基因编辑技术,其适合于根据本发明使用。

[1215] 在一些实施方式中,该方法包括基因修饰TIL群的方法,该方法包括稳定掺入用于产生一种以上蛋白质的基因的步骤。在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括逆转录病毒转导的步骤。在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括慢病毒转导的步骤。慢病毒转导系统在本领域中是已知的,并描述于例如Levine等,Proc.Nat'l Acad.Sci.2006,103,17372-77;Zufferey等,Nat.Biotechnol.1997,15,871-75;Dull等,J.Virology 1998,72,8463-71和美国专利号6,627,442,其各自公开内容通过引用并入本文。在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括γ-逆转录病毒转导的步骤。γ-逆转录病毒转导系统在本领域中是已知的,并描述于例如Cepko和Pear,Cur.Prot.Mol.Biol.1996,9.9.1-9.9.16,其公开内容通过引用并入本文。在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括转座子介导的基因转移的步骤。转座子介导的基因转移系统是本领域已知的,并且包括其中转座酶以DNA表达载体或可表达的RNA或蛋白质的形式提供,使得转座酶不会在转基因细胞中长期表达,例如,以mRNA(例如包含帽和poly-A尾巴的mRNA)形式提供的转座酶。合适的转座子介导的基因转移系统,包括鲑鱼型Tel样转座酶(SB或Sleeping Beauty转座酶),例如SB10、SB11和SB100x以及酶活性提高的工程化酶,描述于例如Hackett等,Mol.Therapy 2010,18,674-83和美国专利号6,489,458,其各自公开内容通过引用并入本文。

[1216] 在一个实施方式中,该方法包括基因修饰TIL群(例如本文所述的第一群、第二群和/或第三群)的方法。在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括稳定掺入用于产生或抑制(例如沉默)一种以上蛋白质的基因的步骤。在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括电穿孔的步骤。电穿孔方法是本领域已知的,并描述于例如Tsong,Biophys.J.1991,60,297-306和美国专利申请公开号2014/0227237A1,其各自公开内容通过引用并入本文。本领域中已知的其他电穿孔方法,例如美国专利号5,019,034;5,128,257;5,137,817;5,173,158;5,232,856;5,273,525;5,304,120;5,318,514;6,010,613和6,078,490中所述的那些,其公开内容通过引用并入本文。在一个实施方式中,电穿孔方法是无菌电穿孔方法。在一个实施方式中,电穿孔方法是脉冲电穿孔方法。在一个实施方式中,电穿孔方法是脉冲电穿孔方法,其包括用脉冲电场处理TIL以改变、操纵或引起TIL中确定和受控的永久或暂时变化的步骤,该步骤包括应用以下序列:对TIL的场强等于或大于100V/cm的至少三个操作员控制的独立编程的DC电脉冲,其中,至少三个DC电脉冲的序列具有以下特征中的一个、两个或三个:(1)至少三个脉冲中的至少两个脉冲幅度彼此不同;(2)至少三个脉冲中的至少两个脉冲宽度彼此不同;以及(3)至少三个脉冲中的两个的第一组的第一脉冲间隔不同于至少三个脉冲中的两个的第二组的第二脉冲间隔。在一个实施方式中,电穿孔方法是脉冲电穿孔方法,其包括用脉冲电场处理TIL以改变、操纵或引起TIL中确定和受控的永久或暂时变化的步骤,包括将至少三个场强等于或大于100V/cm、由操作员控制的独立编程的DC电脉冲序列施加到TIL的步骤,其中,至少三个脉冲中的至少两个脉冲幅度彼此不同。在一个实施方式中,电穿孔方法是脉冲电穿孔方法,其包括用脉冲电场处理TIL以改变、操纵或引起TIL中确定和受控的永久或暂时变化的步骤,包括将至少三个场强等于或大于100V/cm、由操作员控制的独立编程的DC电脉冲序列施加到TIL的步骤,其中,至少三个脉冲中的至少两个脉冲宽度彼此不同。在一个实施方式中,电穿孔方法是脉冲电穿孔方法,其包括用脉冲电场处理TIL以改变、操纵或引起TIL中确定和受控的永久或暂时变化的步骤,包括将

至少三个场强等于或大于100V/cm、由操作员控制的独立编程的DC电脉冲序列施加到TIL的步骤,其中,至少三个脉冲中的两个脉冲的第一组的第一脉冲间隔为与至少三个脉冲中的两个的第二集合的第二脉冲间隔不同。在一个实施方式中,电穿孔方法是脉冲电穿孔方法,其包括用脉冲电场处理TIL以在TIL中引起孔形成的步骤,包括施加至少三个场强等于或大于100V/cm的DC电脉冲序列的步骤,其中,至少三个DC电脉冲序列具有以下特征中的一个、两个或三个:(1)至少三个脉冲中的至少两个的脉冲幅度彼此不同;(2)至少三个脉冲中的至少两个的脉冲宽度彼此不同;(3)至少三个脉冲中的两个的第一组的第一脉冲间隔不同于至少三个脉冲中的两个的第二组的第二脉冲间隔,从而使诱导的毛孔维持相对较长的时间时间段,以确保TIL的生存能力。在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括磷酸钙转染的步骤。磷酸钙转染方法(磷酸钙DNA沉淀、细胞表面包被和内吞作用)在本领域中是已知的,并描述于Graham和van der Eb,Virology 1973,52,456-467;Wigler等,Proc.Natl.Acad.Sci.1979,76,1373-1376;Chen和Okayarea,Mol.Cell.Biol.1987,7,2745-2752以及美国专利号5,593,875,其各自公开内容通过引用并入本文。在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括脂质体转染的步骤。脂质体转染方法,例如采用在过滤水中的1:1(w/w)脂质脂质制剂的阳离子脂质N-[1-(2,3-二环氧乙烷氧基)丙基]-n,n,n-三甲基氯化铵(DOTMA)和二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)的方法,是本领域已知的,并描述于Rose等,Biotechniques 1991,10,520-525和Felgner等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1987,84,7413-7417以及美国专利号5279833;5,908,635;6,056,938;6,110,490;6,534,484和7,687,070,其各自公开内容通过引用并入本文。在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括使用描述于美国专利号5,766,902;6,025,337;6,410,517;6,475,994和7,189,705的方法,其各自公开内容通过引用并入本文。如本文所述,TIL可为TIL的第一群、第二群和/或第三群。

[1217] 根据一个实施方式,基因编辑过程可包括使用可编程核酸酶,其在一个以上免疫检查点基因处介导双链或单链断裂的产生。此类可编程核酸酶通过在特定基因组位点处引入断裂来实现精确的基因组编辑,即,它们依靠基因组内特定DNA序列的识别将核酸酶结构域靶向此位置并介导产生目标序列的双链断裂。DNA中的双链断裂随后将内源性修复机制募集到断裂位点,以通过非同源末端连接(NHEJ)或同源性定向修复(HDR)来介导基因组编辑。因此,断裂的修复可导致引入插入/缺失突变,所述插入/缺失突变破坏(例如沉默,抑制或增强)靶基因产物。

[1218] 已开发的能够进行位点特异性基因组编辑的主要核酸酶包括锌指核酸酶(ZFN)、转录活化子样核酸酶(TALEN)和CRISPR相关的核酸酶(例如CRISPR/Cas9)。这些核酸酶系统可根据其DNA识别方式大致分为两类:ZFN和TALEN通过蛋白质-DNA相互作用实现特定的DNA结合,而CRISPR系统(例如Cas9)通过简短的RNA引导分子(其通过蛋白质-DNA相互作用直接与目标DNA碱基配对)靶向特定的DNA序列。参见例如Cox等,Nature Medicine,2015,第21卷,第2期。

[1219] 可根据本发明的TIL扩增方法使用的基因编辑方法的非限制性实例包括CRISPR方法、TALE方法和ZFN方法,其详细描述于下文。根据一个实施方式,可根据本文所述方法(例如GEN 3方法)或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所述的任何实施方式,进行将TIL扩增为治疗群的方法;其中,该方法还包括通过CRISPR方法、

TALE方法和ZFN方法中的一种以上对至少一部分TIL进行基因编辑,以产生可提供增强治疗效果的TIL。根据一个实施方式,可通过在体外将基因编辑的TIL与未修饰的TIL进行比较来评估基因编辑的TIL,例如通过与未修饰的TIL相比在体外评估效应子功能、细胞因子概况等。在某些实施方式中,该方法包括使用CRISPR方法、TALE方法和ZFN方法对TIL群进行基因编辑。

[1220] 在本发明的一些实施方式中,使用电穿孔递送基因编辑系统,例如CRISPR、TALEN和ZFN系统。在本发明的一些实施方式中,电穿孔系统是流式电穿孔系统。适用于本发明的一些实施方式的合适的流动电穿孔系统的实例是可商购的MaxCyte STX系统。有几种可供选择的可用于本发明的可商购的电穿孔仪器,例如可从BTX-Harvard Apparatus、Cellaxess Elektra(Cellectricon)、Nucleofector(Lonza/Amaxa)、GenePulser MXcell(BIORAD)、iPorator-96(Primax)或siPORTer96(Ambion)商购的AgilePulse系统或ECM 830。在本发明的一些实施方式中,电穿孔系统与其余的TIL扩增方法一起形成封闭的无菌系统。在本发明的一些实施方式中,电穿孔系统是如本文所述的脉冲电穿孔系统,并与其余的TIL扩增方法一起形成封闭的无菌系统。

[1221] 可根据本文所述方法(例如过程GEN 3)或如PCT/US2017/058610,PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633所述的任何实施方式将TIL扩增为治疗性群,其中,该方法还包括通过CRISPR方法(例如,CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1)对至少一部分TIL进行基因编辑。根据特定的实施方式,在TIL扩增过程中使用CRISPR方法导致在至少一部分治疗性TIL群中一种以上免疫检查点基因的表达沉默或减少。或者,在TIL扩增过程中使用CRISPR方法导致在至少一部分治疗性TIL群中一种以上免疫检查点基因的表达增强。

[1222] CRISPR代表“成簇规则间隔的短回文重复序列”。使用CRISPR系统进行基因编辑的方法本文也称为CRISPR方法。包含RNA和Cas蛋白的三种类型的CRISPR系统可根据本发明使用:I型、II型和III型。II型CRISPR(以Cas9为例)是最具特征的系统之一。

[1223] CRISPR技术从细菌和古细菌(单细胞微生物的域)的天然防御机制改编而来。这些生物利用CRISPR衍生的RNA和各种Cas蛋白(包括Cas9),通过切碎并破坏外来入侵者的DNA来阻止病毒和其他异物的攻击。CRISPR是具有两个不同特征的DNA特化区域:核苷酸重复序列和间隔区的存在。核苷酸的重复序列分布在整个CRISPR区域,外来DNA的短片段(间隔子)散布在重复序列之间。在II型CRISPR/Cas系统中,间隔子整合到CRISPR基因组基因座中,被转录并加工成短CRISPR RNA(crRNA)。这些crRNA与反式活化的crRNA(tracrRNA)退火,并通过Cas蛋白直接指导致病DNA的序列特异性切割和沉默。Cas9蛋白的目标识别需要crRNA内的“种子”序列和crRNA结合区上游的保守的含二核苷酸的原间隔子相邻基序(PAM)序列。通过重新设计crRNA,可将CRISPR/Cas系统重新靶向以切割几乎任何DNA序列。可将天然系统中的crRNA和tracrRNA简化为约100个核苷酸的单个向导RNA(sgRNA),用于基因工程。通过共同递送表达Cas9内切核酸酶和必要的crRNA成分的质粒,CRISPR/Cas系统可直接移植到人细胞。Cas蛋白的不同变体可用于减少靶向限制(例如,Cas9的直系同源物,如Cpf1)。

[1224] 可通过经由CRISPR方法的永久性基因编辑TIL而沉默或抑制的基因的非限制性实例包括PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP7、CASP6、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、

SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2和GUCY1B3。

[1225] 可通过CRISPR方法通过永久性基因编辑TIL而增强的基因的非限制性实例包括CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15和IL-21。

[1226] 通过CRISPR方法改变靶基因序列的表达的系统、方法和组合物的实例描述于美国专利号8,697,359;8,993,233;8,795,965;8,771,945;8,889,356;8,865,406;8,999,641;8,945,839;8,932,814;8,871,445;8,906,616和8,895,308(其通过引用并入本文),其可根据本发明的实施方案使用。进行CRISPR方法的资源,例如表达CRISPR/Cas9和CRISPR/Cpf1的质粒,可从GenScript等公司商购。

[1227] 在一个实施方式中,如本文所述,可使用如美国专利号US9790490中所述的CRISPR/Cpf1系统进行TIL群的基因修饰,该文献的公开内容通过引用并入本文。

[1228] 将TIL扩增为治疗群的方法可根据本文所述方法(例如过程2A)或如PCT/US2017/058610,PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所述的任何实施方式来进行;其中,该方法还包括通过TALE方法对至少一部分TIL进行基因编辑。根据特定的实施方式,在TIL扩增过程中使用TALE方法导致至少一部分治疗性TIL群中一个以上免疫检查点基因的表达被沉默或减少。或者,在TIL扩增过程中使用TALE方法导致至少一部分TIL治疗群中一种以上免疫检查点基因的表达增强。

[1229] TALE表示“转录激活因子样效应子”蛋白,其包括TALEN(“转录激活因子样效应子核酸酶”)。在本文中也可将使用TALE系统进行基因编辑的方法称为TALE方法。TALE是植物病原细菌黄单胞菌属(Xanthomonas)的天然蛋白质,包含由一系列33-35个氨基酸重复结构域(每个结构域可识别一个碱基对)组成的DNA结合结构域。TALE特异性由两个称为重复可变双残基(RVD)的高变氨基酸确定。模块化的TALE重复序列连接在一起以识别连续的DNA序列。DNA结合结构域中的特定RVD识别目标基因座中的碱基,从而提供了组装可预测的DNA结合结构域的结构特征。TALE的DNA结合结构域与IIS FokI型核酸内切酶的催化结构域融合,形成可靶向的TALE核酸酶。为了诱导位点特异性突变,两个单独的TALEN臂(由14-20个碱基对的间隔区隔开)使FokI单体紧密接近以进行二聚化并产生目标双链断裂。

[1230] 利用各种组装方法的数项大型系统化的研究表明,TALE重复序列可以组合以识别几乎任何用户定义的序列。定制设计的TALE阵列也可从Cellectis Bioresearch(Paris,France)、Transposagen Biopharmaceuticals(Lexington,KY,USA)和Life Technologies(Grand Island,NY,USA)商购。适用于本发明的TALE和TALEN方法描述于美国专利申请公开号US2011/0201118A1;以及US2013/0117869A1;US2013/0315884A1;US2015/0203871A1和US2016/0120906A1,其公开内容通过引用并入本文。

[1231] 可通过TALE方法被永久性基因编辑TIL被沉默或抑制的基因的非限制性实例包括PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP7、CASP6、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2和GUCY1B3。

[1232] 可通过TALE方法通过永久基因编辑TIL被增强的基因的非限制性实例包括CCR2、

CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15和IL-21。

[1233] 通过TALE方法改变靶基因序列的表达的系统、方法和组合物的实例(其可根据本发明的实施方式使用)描述于美国专利号8,586,526,其内容通过引用并入本文。

[1234] 可根据本文所述方法(例如过程GEN 3)或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633所述的任何实施方式进行将TIL扩增为治疗性群的方法,其中,该方法还包括通过锌指或锌指核酸酶方法对至少一部分TIL进行基因编辑。根据特定的实施方式,在TIL扩增过程中锌指法的使用导致在至少一部分治疗性TIL群中沉默或减少一种以上免疫检查点基因的表达。或者,在TIL扩增过程中使用锌指法导致在至少一部分TIL治疗群中增强一种以上免疫检查点基因的表达。

[1235] 单个锌指以保守的ββα构型包含约30个氨基酸。α-螺旋表面上的几个氨基酸通常在DNA主槽中接触3bp,选择性水平不同。锌指具有两个蛋白质结构域。第一结构域是DNA结合结构域,其包括真核转录因子并包含锌指。第二个结构域是核酸酶结构域(其包括FokI限制酶),负责DNA的催化切割。

[1236] 单个ZFN的DNA结合结构域通常包含三个至六个单个锌指重复序列,每个可识别9至18个碱基对。如果锌指结构域对它们的预期靶位点具有特异性,那么理论上,甚至一对识别总共18个碱基对的3指ZFN可靶向哺乳动物基因组中的单个基因座。产生新的锌指阵列的一种方法是结合已知特异性的较小的锌指“模块”。最常见的模块化组装过程涉及组合三个单独的锌指,每个锌指可以识别3个碱基对的DNA序列,以生成可以识别9个碱基对的目标位点的3指阵列。或者,可使用基于选择的方法(例如寡聚化池工程(OPEN))从随机库中选择新的锌指阵列,该库考虑了相邻指之间的上下文相关交互作用。工程锌指可商购;Sangamo Biosciences(Richmond,CA,USA)与Sigma-Aldrich(St.Louis,MO,USA)合作开发了用于锌指结构的专有平台(CompoZr®)。

[1237] 可通过锌指法通过永久性基因编辑TIL被沉默或抑制的基因的非限制性实例包括PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP7、CASP3、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2和GUCY1B3。

[1238] 可通过锌指方法通过永久性基因编辑TIL被增强的基因的非限制性实例包括CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15和IL-21。

[1239] 可根据本发明的实施方式使用的通过锌指法改变靶基因序列的表达的系统、方法和组合物的实例描述于美国专利号6,534,261、6,607,882、6,746,838、6,794,136、6,824,978、6,866,997、6,933,113、6,979,539、7,013,219、7,030,215、7,220,719、7,241,573、7,241,574、7,585,849、7,595,376、6,903,185和6,479,626,其内容通过引用并入本文。

[1240] 通过锌指法改变靶基因序列的表达的系统、方法和组合物的其他实例(其可根据本发明的实施方式使用)描述于Beane等,Mol.Therapy,2015,23 1380-1390,其公开内容通过引用并入本文。

[1241] 在一些实施方式中,可选地对TIL进行基因工程以包括其他功能,包括但不限于:高亲和力T细胞受体(TCR),例如靶向肿瘤相关抗原(例如MAGE、HER2或NY-ESO-1)的TCR;或

与肿瘤相关细胞表面分子(例如间皮素)或谱系受限细胞表面分子(例如CD19)结合的嵌合抗原受体(CAR)。在某些实施方式中,该方法包括对TIL群进行基因工程以包括高亲和力T细胞受体(TCR),例如靶向肿瘤相关抗原(例如MAGE-1、HER2或NY-ESO-1)的TCR或与肿瘤相关细胞表面分子(例如间皮素)或谱系受限细胞表面分子(例如CD19)结合的嵌合抗原受体(CAR)。适当地,TIL的群可为本文所述的第一群、第二群和/或第三群。

[1242] XI.用于生产TIL的封闭系统

[1243] 本发明提供了在TIL培养过程中(例如与Gen 2或Gen 3过程结合)使用封闭系统的方法。此类封闭系统允许预防和/或减少微生物污染、允许使用更少的烧瓶,并允许降低成本。在一些实施方式中,封闭系统使用两个容器。

[1244] 此类封闭系统在本领域中是众所周知的,并且可见于例如http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm和https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm。

[1245] 无菌连接装置(STCD)在两根兼容管之间产生无菌焊缝。该程序允许无菌连接各种容器和管径。在一些实施方式中,封闭系统包括所述的鲁尔锁和热密封系统。在一些实施方式中,在无菌条件下通过注射器接近封闭系统,以维持系统的无菌性和封闭性。在一些实施方式中,采用了本文所述的封闭系统。在一些实施方式中,根据本文所述的方法将TIL配制到终产物制剂容器中。

[1246] 在一些实施方式中,从获得肿瘤碎片的时间直至TIL准备好施用于患者或冷冻保存之前,封闭系统使用一个容器。在一些实施方式中,当使用两个容器时,第一容器是封闭的G容器,将TIL群离心并转移到输液袋中而不打开第一封闭的G容器。在一些实施方式中,当使用两个容器时,输液袋是含有HypoThermosol的输液袋。封闭系统或封闭TIL细胞培养系统的特征在于,一旦添加了肿瘤样品和/或肿瘤碎片,该系统就与外界紧密密封,形成了一个不受细菌、真菌和/或任何其他微生物污染物入侵的封闭环境。

[1247] 在一些实施方式中,微生物污染的减少约5%至约100%。在一些实施方式中,微生物污染减少约5%至约95%。在一些实施方式中,微生物污染减少约5%至约90%。在一些实施方式中,微生物污染减少约10%至约90%。在一些实施方式中,微生物污染减少约15%至约85%。在一些实施方式中,微生物污染减少约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约97%、约98%、约99%或约100%。

[1248] 封闭的系统允许在不存在和/或微生物污染显著减少的情况下生长TIL。

[1249] 此外,TIL细胞培养环境的pH、二氧化碳分压和氧分压均随着细胞的培养而变化。因此,即使循环了适合于细胞培养的培养基,仍需要使封闭的环境不断保持为TIL增殖的最佳环境。为此,期望通过传感器来监测封闭环境的培养液中的pH、二氧化碳分压和氧气分压的物理因素,该传感器的信号用于控制安装在培养环境入口处的气体交换器。根据培养液的变化实时调节封闭环境的气体分压,以优化细胞培养环境。在一些实施方式中,本发明提供了封闭细胞培养系统,该系统在封闭环境的入口处结合有配备有监测装置的气体交换器,该监测装置测量封闭环境的pH、二氧化碳分压和氧气分压,并通过根据来自监测设备的信号自动调节气体浓度来优化细胞培养环境。

[1250] 在一些实施方式中,封闭环境中的压力被连续地或间歇地控制。即,例如可通过压

力维持装置来改变封闭环境中的压力,从而确保该空间在正压状态下适合于TIL的生长,或者在负压状态下促进流体的渗出,并且从而促进细胞增殖。此外,通过间歇地施加负压,可通过封闭环境的体积的暂时收缩来均匀且有效地替换封闭环境中的循环液体。

[1251] 在一些实施方式中,可以替代或添加用于TIL增殖的最佳培养成分,且可以添加因子,例如IL-2和/或OKT3及它们的组合。

[1252] XII.可选的TIL冷冻保存

[1253] 通过Gen 2或Gen 3方法制备的大的TIL群(例如,第二TIL群)或扩增的TIL群(例如,第三TIL群)可以可选地冷冻保存。在一些实施方式中,对治疗性TIL群进行冷冻保存。在一些实施方式中,对第二次扩增后收获的TIL进行冷冻保存。在一些实施方式中,在图85(特别是例如图85B)的示例性步骤F中,对TIL进行冷冻保存。在一些实施方式中,将TIL冷冻保存于输液袋。在一些实施方式中,将TIL在放入输液袋中之前冷冻保存。在一些实施方式中,冷冻保存TIL并且不置于输液袋。在一些实施方式中,使用冷冻保存培养基进行冷冻保存。在一些实施方式中,冷冻保存培养基包含二甲基亚砜(DMSO)。这通常通过将TIL群放入冷冻溶液(例如85%补体失活的AB血清和15%的二甲亚砜(DMSO))来完成。将溶液中的细胞放入低温小瓶中,并在-80℃下保存24小时,并可以选择转移到气态氮气冷冻机中进行冷冻保存。参见Sadeghi等,Acta Oncologica2013,52,978-986。

[1254] 适当时,将细胞从冰箱中取出并在37℃水浴中解冻,直至解冻约4/5的溶液。通常将细胞重悬于完全培养基中,并可选地洗涤一次或多次。在一些实施方式中,如本领域中已知的,可对解冻的TIL进行计数和评估活力。

[1255] 在一个优选的实施方式中,使用CS10冷冻保存培养基(CryoStor 10,BioLife Solutions)将TIL群冷冻保存。在一个优选的实施方式中,使用包含二甲基亚砜(DMSO)的冷冻保存培养基将TIL群冷冻保存。在一个优选的实施方式中,使用CS10和细胞培养基的1:1(体积:体积)比率将TIL群冷冻保存。在一个优选的实施方式中,使用CS10和细胞培养基的约10:1(vol:vol)比率将TIL群冷冻保存,所述细胞培养基还包含另外的IL-2。

[1256] 如上所述,并且如在图85(特别是例如图85B)中提供的步骤A至E中举例说明,冷冻保存可在整个TIL扩增过程中的许多时间点发生。在一些实施方式中,可以冷冻保存第二次扩增后的扩增的TIL群(例如,根据图85(特别是例如图85B)的步骤D提供)。冷冻保存通常可通过将TIL群放入冷冻溶液(例如85%补体失活的AB血清和15%的二甲亚砜(DMSO))来完成。将溶液中的细胞放入低温小瓶中,并在-80℃下保存24小时,并可以选择转移到气态氮气冷冻机中进行冷冻保存。参见Sadeghi等,Acta Oncologica2013,52,978-986。在一些实施方式中,冷冻保存TIL在5%DMSO中。在一些实施方式中,冷冻保存TIL在加5%DMSO的细胞培养基中。在一些实施方式中,根据本文提供的方法冷冻保存TIL。

[1257] 适当时,将细胞从冰箱中取出并在37℃水浴中解冻,直至解冻约4/5的溶液。通常将细胞重悬于完全培养基中,并可选洗涤一次或多次。在一些实施方式中,如本领域中已知的,可对解冻的TIL进行计数和评估活力。

[1258] 在某些情况下,可使用如下所述方案立即将步骤B TIL群冷冻保存。或者,可对大TIL群群进行步骤C和步骤D,然后在步骤D之后进行冷冻保存。类似地,在将基因修饰的TIL用于治疗的情况下,可对步骤B或D步骤的TIL群进行遗传修饰以进行适当治疗。

[1259] XIII.扩增TIL的表型特征

[1260] 在一些实施方式中,分析TIL在扩增后多种表型标志物的表达,包括本文和实施例中描述的那些。在一个实施方式中,研究一种以上表型标志物的表达。在一些实施方式中,在步骤B中的第一次扩增后,分析TIL的表型特征。在一些实施方式中,在步骤C的过渡期间,分析TIL的表型特征。在一些实施方式中,在根据步骤C的过渡期间和冷冻保存后,分析TIL的表型特征。在一些实施方式中,在根据步骤D的第二次扩增后,分析TIL的表型特征。在一些实施方式中,在根据步骤D的两次以上扩增后,分析TIL的表型特征。

[1261] 在一些实施方式中,标志物选自CD8和CD28。在一些实施方式中,研究CD8的表达。在一些实施方式中,研究CD28的表达。在一些实施方式中,与其他过程(例如图85(特别是例如图85B)中提供的Gen 3方法)相比,与例如图85(特别是例如图85B)中提供的2A过程相比,根据本发明方法产生的TIL的CD8和/或CD28的表达更高。在一些实施方式中,与其他过程(例如图85(特别是例如图85B)中提供的Gen 3方法)相比,与例如图85(特别是例如图85B)中提供的2A过程相比,根据本发明方法产生的TIL的CD8的表达更高。在一些实施方式中,与其他过程(例如图85(特别是例如图85B)中提供的Gen 3方法)相比,与例如图85(特别是例如图85B)中提供的2A过程相比,根据本发明方法产生的TIL的CD28的表达更高。在一个实施方式中,检测一种以上调节标志物的表达。

[1262] 在一个实施方式中,在本文所述的扩增肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的方法的任何步骤期间,不进行基于CD8和/或CD28表达的第一TIL群、第二TIL群、第三TIL群或收获的TIL群的选择。

[1263] 在一些实施方式中,与其他过程(例如,例如图85中提供的Gen 3过程(例如,图85中的Gen 3过程)相比,与例如图85(特别是例如图85A)中提供的2A过程相比,根据本发明过程产生的TIL的中枢记忆细胞的百分比更高。在一些实施方式中,中枢记忆细胞的记忆标志物选自CCR7和CD62L。

[1264] 在一个实施方式中,还可使用细胞因子释放测定法评估再刺激的TIL的细胞因子释放。在一些实施方式中,可以评估TIL的干扰素-γ(IFN-γ)分泌。在一些实施方式中,通过ELISA测定法测量IFN-γ分泌。在一些实施方式中,在快速第二次扩增步骤之后,在例如图85(特别是,图85B)中提供的步骤D之后,通过ELISA测定法测量IFN-γ的分泌。在一些实施方式中,通过IFN-gamma(IFN-γ)分泌来测量TIL健康。在一些实施方式中,IFN-γ分泌指示活性TIL。在一些实施方式中,采用IFN-γ产生的效价测定。IFN-γ的产生是细胞毒性潜力的另一种度量。IFN-γ的产生可通过测定用CD3、CD28和CD137/4-1BB抗体刺激的TIL培养基中细胞因子IFN-γ的水平来测量。可通过测量IFN-γ释放来确定这些刺激的TIL培养基中的IFN-γ水平。在一些实施方式中,与例如图8中提供的2A方法中的步骤D相比,例如图85(特别是例如图85B)提供的Gen 3过程中的步骤D中的IFN-γ产生增加,这表明步骤D TIL的细胞毒性潜力增加。在一些实施方式中,IFN-γ的分泌增加一倍、两倍、三倍、四倍或五倍或更多。在一些实施方式中,IFN-γ分泌增加了一倍。在一些实施方式中,IFN-γ分泌增加了两倍。在一些实施方式中,IFN-γ分泌增加了三倍。在一些实施方式中,IFN-γ分泌增加了四倍。在一些实施方式中,IFN-γ分泌增加了五倍。在一些实施方式中,使用Quantikine ELISA试剂盒测量IFN-γ。在一些实施方式中,测量离体TIL的IFN-γ。在一些实施方式中,测量离体TIL的IFN-γ,该离体TIL包括通过本发明的方法(包括例如图85B的方法)产生的TIL。

[1265] T和B淋巴细胞的多种抗原受体通过有限但大量的基因片段的体细胞重组来产生。这些基因片段:V(可变段)、D(多样段)、J(连接段)和C(恒定段)确定免疫球蛋白和T细胞受体(TCR)的结合特异性和下游应用。本发明提供了产生TIL的方法,其显示并增加T细胞库的多样性。在一些实施方式中,通过本方法获得的TIL显示出T细胞库多样性的增加。在一些实施方式中,与新鲜收获的TIL和/或使用除本文提供的方法之外的其他方法(例如包括除了图85(特别是例如图85B)中所示那些之外的方法)制备的TIL相比,通过本发明方法获得的TIL显示出T细胞库多样性的增加。在一些实施方式中,与新鲜收获的TIL和/或使用如图85(特别是例如图85A)所示的称为过程2A的方法制备的TIL相比,通过本方法获得的TIL显示出T细胞库多样性的增加。在一些实施方式中,第一次扩增获得的TIL显示出T细胞库多样性的增加。在一些实施方式中,多样性的增加是免疫球蛋白多样性和/或T细胞受体多样性的增加。在一些实施方式中,免疫球蛋白多样性是免疫球蛋白重链多样性。在一些实施方式中,免疫球蛋白多样性是免疫球蛋白轻链多样性。在一些实施方式中,多样性是T细胞受体多样性。在一些实施方式中,多样性是选自α、β、γ和δ受体之一的T细胞受体的多样性。在一些实施方式中,T细胞受体(TCR)α和/或β的表达增加。在一些实施方式中,T细胞受体(TCR)α的表达增加。在一些实施方式中,T细胞受体(TCR)β的表达增加。在一些实施方式中,TCRab(即TCRα/β)的表达增加。在一些实施方式中,基于样品内独特肽CDR的数量,与其他过程(例如称为Gen 2的过程)相比,本文所述的过程(例如Gen 3过程)显示出更高的克隆多样性(参见例如图12-14)。

[1266] 在一些实施方式中,在冷冻保存之后检查表型特征。

[1267] XIV.其他过程实施方式

[1268] 在一些实施方式中,本发明提供了将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增为治疗性TIL群的方法,该方法包括:(a)由受试者的一个以上肿瘤碎片或核心物获得第一TIL群;(b)通过在包含IL-2和OKT-3的细胞培养基中培养第一TIL群来进行启动第一次扩增,其中,启动第一次扩增进行约1至17天以获得第二TIL群,其中,第二TIL群的数量大于第一TIL群的数量;(c)通过使第二TIL群与包含IL-2、OKT-3和外源抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基接触来进行快速第二次扩增,产生第三TIL群,其中,快速第二次扩增进行约1至11天以获得第三TIL群,其中,第三TIL群是治疗性TIL群;以及(d)收获从步骤(c)获得的治疗性TIL群。在一些实施方式中,快速第二次扩增的步骤被分成多个步骤以实现培养物的按比例扩增,其通过:(1)通过在第一容器(例如G-REX100MCS容器)中在小规模培养物中培养第二TIL群约3至4天来进行快速第二次扩增,然后(2)将第二TIL群从小规模培养物转移到比第一容器大的第二容器(例如G-REX500MCS容器)中,其中,在第二容器中在更大规模培养物中培养来自小规模培养物的第二TIL群约4至7天。在一些实施方式中,快速扩增的步骤被分成多个步骤以实现培养物的按比例扩增,其通过:(1)通过在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中在小规模培养物中培养第二TIL群约3至4天来进行快速第二次扩增,然后(2)将第二TIL群从第一小规模培养物转移并分配到至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个第二容器中,第二容器的尺寸与第一容器相同,其中,在每个第二容器中,在第二小规模培养物中培养从第一小规模培养物转移至该第二容器的第二TIL群的一部分约4至7天。在一些实施方式中,快速扩增的步骤被分成多个步骤以实现培养物的横向扩增和纵向扩增,其通过:(1)通过在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中在小规模培养物中培养第二TIL群约3-

4天来进行快速二次扩增,然后(2)将第二TIL群从第一个小规模培养物中转移并分配到至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个第二容器(例如G-REX 500MCS容器),该第二容器的尺寸大于第一容器,其中,在每个第二容器中,在更大规模培养物中培养从小规模培养物转移至第二容器的第二TIL群的一部分约4至7天。在一些实施方式中,快速扩增的步骤被分成多个步骤以实现培养物的横向扩增和纵向扩增,其通过:(1)通过在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中在小规模培养物中培养第二TIL群约4天来进行快速二次扩增,然后(2)将第二TIL群从第一个小规模培养物转移并分配到2、3或4个第二容器(例如G-REX 500MCS容器)中,该第二容器的尺寸大于第一容器,其中,在每个第二容器中,在更大规模培养物中培养从小规模培养物转移到第二容器的第二TIL群的一部分约5天。

[1269] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中通过使第一TIL群与培养基接触来进行原代第一次扩增,该培养基还包含外来抗原呈递细胞(APC),其中,步骤(c)中培养基中APC的数量大于步骤(b)中培养基中APC的数量。

[1270] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(c)中向培养基补充了其他外源APC。

[1271] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约20:1。

[1272] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约10:1。

[1273] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约9:1。

[1274] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约8:1。

[1275] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约7:1。

[1276] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约6:1。

[1277] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约5:1。

[1278] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的

数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约4:1。

[1279] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约3:1。

[1280] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.9:1。

[1281] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.8:1。

[1282] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.7:1。

[1283] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.6:1。

[1284] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.5:1。

[1285] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.4:1。

[1286] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.3:1。

[1287] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.2:1。

[1288] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2.1:1。

[1289] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约1.1:1至等于或约2:1。

[1290] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约10:1。

[1291] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的

数量的比率选自等于或约2:1至等于或约5:1。

[1292] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约4:1。

[1293] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约3:1。

[1294] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约2:1或等于或约2.9:1。

[1295] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.8:1。

[1296] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.7:1。

[1297] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.6:1。

[1298] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.5:1。

[1299] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.4:1。

[1300] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.3:1。

[1301] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约约2.2:1。

[1302] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自等于或约2:1至等于或约2.1:1。

[1303] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率为等于或约2:1。

[1304] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在快速第二次扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的

数量的比率为等于或约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。

[1305] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得原代第一次扩增中添加的APC的数量选自等于或约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3.5×10^8APC,使得快速第二次扩增中添加的APC选自等于或约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1×10^9APC。

[1306] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得原代第一次扩增中添加的APC的数量选自等于或约1×10^8APC至等于或约3.5×10^8APC,其中快速第二次扩增中添加的APC的数量选自等于或约3.5×10^8APC至等于或约1×10^9APC。

[1307] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得原代第一次扩增中添加的APC的数量选自等于或约1.5×10^8APC至等于或约3×10^8APC,其中快速第二次扩增中添加的APC的数量选自等于或约4×10^8APC至等于或约7.5×10^8APC。

[1308] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得原代第一次扩增中添加的APC的数量选自等于或约2×10^8APC至等于或约约2.5×10^8APC,其中快速第二次扩增中添加的APC的数量选自等于或约4.5×10^8APC至等于或约5.5×10^8APC。

[1309] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得原代第一次扩增中添加的APC的数量为等于或约2.5×10^8APC,其中快速第二次扩增中添加的APC的数量为等于或约5×10^8APC。

[1310] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得抗原呈递细胞是外周血单核细胞(PBMC)。

[1311] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得多个肿瘤碎片被分配到多个单独的容器中,在每个单独的容器中,第一TIL群获自步骤(a),第二TIL群获自步骤(b),第三TIL群获自步骤(c),合并来自步骤(c)中多个容器的治疗性TIL得到步骤(d)中收获的TIL群。

[1312] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,

对其进行了修改,使得在步骤(a)中从受试者的多个肿瘤碎片或核心物获得第一TIL群。

[1313] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得多个肿瘤被均匀地分配到多个单独的容器中。

[1314] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得多个单独的容器包括至少两个单独的容器。

[1315] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得多个单独的容器包括两个至二十个单独的容器。

[1316] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得多个单独的容器包括两个至十五个单独的容器。

[1317] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得多个单独的容器包括两个到十个单独的容器。

[1318] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得多个单独的容器包括两个至五个单独的容器。

[1319] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得多个单独的容器包括2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个单独的容器。

[1320] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得:对于每个容器,其中在步骤(b)中对第一TIL群进行启动第一次扩增,在步骤(c)中在同一容器中对由这种第一TIL群产生的第二TIL群进行快速第二次扩增。

[1321] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得每个单独的容器包括第一透气表面区域。

[1322] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得多个肿瘤碎片被分配到单个容器中。

[1323] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得单个容器包括第一透气表面区域。

[1324] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得:在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中补充额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增;其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量;其中,在步骤(b)中以等于或约1个细胞层至等于或约3个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1325] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中以等于或约1.5个细胞层至等于或约2.5个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1326] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中以等于或约2个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1327] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中以等于或约1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一

透气表面区域。

[1328] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(c)中以等于或约3个细胞层至约10个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1329] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(c)中以等于或约4个细胞层至约8个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1330] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(c)中以等于或约3、4、5、6、7、8、9或10个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1331] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(c)中,使得在步骤(c)中以等于或约4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1332] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得:在步骤(b)中,在具有第一透气表面区域的第一容器中进行启动第一次扩增,在步骤(c)中,在具有第二透气表面区域的第二容器中进行快速第二次扩增。

[1333] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得第二容器大于第一容器。

[1334] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中补充额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增,其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量,其中在步骤(b)中以等于或约1个细胞层至等于或约3个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1335] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中以等于或约1.5个细胞层至等于或约2.5个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1336] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中以等于或约2个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1337] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中以等于或约1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1338] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(c)中以等于或约3个细胞层至等于或约10个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1339] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,

对其进行了修改,使得在步骤(c)中以等于或约4个细胞层至等于或约8个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1340] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(c)中以等于或约3、4、5、6、7、8、9或10个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1341] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(c)中以等于或约4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1342] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得:在步骤(b)中,在具有第一透气表面区域的第一容器中进行启动第一次扩增,并且在步骤(c),在第一容器中进行快速第二次扩增。

[1343] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得:在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中添加额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增,其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量,其中在步骤(b)中以等于或约1个细胞层至等于或约3个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1344] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中以等于或约1.5个细胞层至等于或约2.5个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1345] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中以等于或约2个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1346] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中以等于或约1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1347] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(c)中以等于或约3个细胞层至等于或约10个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1348] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(c)中以等于或约4个细胞层至等于或约8个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1349] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(c)中以等于或约3、4、5、6、7、8、9或10个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1350] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(c)中以等于或约4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、

4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8个细胞层的平均厚度将APC层叠到第一透气表面区域。

[1351] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中补充额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增,其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量,其中步骤(b)中层叠的APC的平均层数与步骤(c)中层叠的APC的平均层数的比率选自等于或约1:1.1至等于或约1:10。

[1352] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中补充额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增,其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量,其中步骤(b)中层叠的APC的平均层数与步骤(c)中层叠的APC的平均层数的比率选自等于或约1:1.1至等于或约1:9。

[1353] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中补充额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增,其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量,其中步骤(b)中层叠的APC的平均层数与步骤(c)中层叠的APC的平均层数的比率选自等于或约1:1.1至等于或约1:8。

[1354] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中补充额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增,其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量,其中步骤(b)中层叠的APC的平均层数与步骤(c)中层叠的APC的平均层数的比率选自等于或约1:1.1至等于或约1:7。

[1355] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中补充额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增,其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量,其中步骤(b)中层叠的APC的平均层数与步骤(c)中层叠的APC的平均层数的比率选自等于或约1:1.1至等于或约1:6。

[1356] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中补充额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增,其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量,其中步骤(b)中层叠的APC的平均层数与步骤(c)中层叠的APC的平均层数的比率选自等于或约1:1.1至等于或约1:5。

[1357] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中补充额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增,其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量,其中步骤(b)中层叠的APC的平均层数与步骤(c)中层叠的APC的平均层数的比率选自等于或约1:1.1至等于或约1:4。

[1358] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,

对其进行了修改,使得在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中补充额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增,其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量,其中步骤(b)中层叠的APC的平均层数与步骤(c)中层叠的APC的平均层数的比率选自等于或约1:1.1至等于或约1:3。

[1359] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中补充额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增,其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量,其中步骤(b)中层叠的APC的平均层数与步骤(c)中层叠的APC的平均层数的比率选自等于或约1:1.1至等于或约1:2。

[1360] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中补充额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增,其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量,其中步骤(b)中层叠的APC的平均层数与步骤(c)中层叠的APC的平均层数的比率选自等于或约1:1.2至等于或约1:8。

[1361] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中补充额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增,其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量,其中步骤(b)中层叠的APC的平均层数与步骤(c)中层叠的APC的平均层数的比率选自等于或约1:1.3至等于或约1:7。

[1362] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中补充额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增,其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量,其中步骤(b)中层叠的APC的平均层数与步骤(c)中层叠的APC的平均层数的比率选自等于或约1:1.4至等于或约1:6。

[1363] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中补充额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增,其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量,其中步骤(b)中层叠的APC的平均层数与步骤(c)中层叠的APC的平均层数的比率选自等于或约1:1.5至等于或约1:5。

[1364] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中补充额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增,其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量,其中步骤(b)中层叠的APC的平均层数与步骤(c)中层叠的APC的平均层数的比率选自等于或约1:1.6至等于或约1:4。

[1365] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中补充额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增,其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量,其中步骤(b)中层叠的APC的平均层数与步骤(c)中层叠的APC的平均层数的比率选自等于或约1:1.7至等于或约1:3.5。

[1366] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中补充额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增,其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量,其中步骤(b)中层叠的APC的平均层数与步骤(c)中层叠的APC的平均层数的比率选自等于或约1:1.8至等于或约1:3。

[1367] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中补充额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增,其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量,其中步骤(b)中层叠的APC的平均层数与步骤(c)中层叠的APC的平均层数的比率选自等于或约1:1.9至等于或约1:2.5。

[1368] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中补充额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增,其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量,其中步骤(b)中层叠的APC的平均层数与步骤(c)中层叠的APC的平均层数的比率选自等于或约1:2至等于或约约1:2。

[1369] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,通过向第一TIL群的细胞培养基中补充额外的抗原呈递细胞(APC)来进行原代第一次扩增,其中,在步骤(c)中添加的APC数量大于在步骤(b)中添加的APC数量,其中步骤(b)中层叠的APC的平均层数与步骤(c)中层叠的APC的平均层数的比率选自等于或约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。

[1370] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得第二TIL群中的TIL数量与第一TIL群中的TIL数量的比率为等于或约1.5:1至等于或约100:1。

[1371] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得第二TIL群中的TIL数量与第一TIL群中的TIL数量的比率为等于或约50:1。

[1372] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得第二TIL群中的TIL数量与第一TIL群中的TIL数量的比率为等于或约25:1。

[1373] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得第二TIL群中的TIL数量与第一TIL群中的TIL数量的比率为等于或约20:1。

[1374] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得第二TIL群中的TIL数量与第一TIL群中的TIL数量的比率为等于或约10:1。

[1375] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得第二TIL群的数量比第一TIL群的数量大至少或约50倍。

[1376] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得第二TIL群的数量比第一TIL群的数量大至少或约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、21倍、22倍、23倍、24倍、25倍、26倍、27倍、28倍、29倍、30倍、31倍、32倍、33倍、34倍、35倍、36倍、37倍、38倍、39倍、40倍、41倍、42倍、43倍、44倍、45倍、46倍、47倍、48倍、49倍或50倍。

[1377] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(c)中的第二阶段开始约2天或约3天之后,向细胞培养基中补充额外的IL-2。

[1378] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得进一步包括以下步骤:使用冷冻保存方法来冷冻保存步骤(d)中收获的TIL群。

[1379] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改以包括:在步骤(d)之后进行附加步骤(e),将收获的TIL群从步骤(d)转移到输液袋,该输液袋可选地含有HypoThermosol。

[1380] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改以包括以下步骤:使用冷冻保存方法来冷冻保存步骤(e)中包含收获的TIL群的输液袋。

[1381] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得使用1:1比率的收获的TIL群与冷冻保存培养基进行冷冻保存方法。

[1382] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得抗原呈递细胞是外周血单核细胞(PBMC)。

[1383] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得PBMC是经辐照且同种异体的。

[1384] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中添加到细胞培养物中的APC总数为2.5×10^{8}。

[1385] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(c)中添加到细胞培养物中的APC总数为5×10^{8}。

[1386] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得APC是PBMC。

[1387] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得PBMC是经辐照且同种异体的。

[1388] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得抗原呈递细胞是人工抗原呈递细胞。

[1389] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,

对其进行了修改,使得使用基于膜的细胞处理系统进行步骤(d)中的收获。

[1390] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得使用LOVO细胞处理系统进行步骤(d)中的收获。

[1391] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在上述任何段落中描述的方法,使得在步骤(b)中多个碎片包括等于或约5个至等于或约60个核心物或碎片/容器。

[1392] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在上述任何段落中描述的方法,使得在步骤(b)中多个碎片包括等于或约10个至等于或约60个核心物或碎片/容器。

[1393] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在上述任何段落中描述的方法,使得在步骤(b)中多个碎片包括等于或约15个至等于或约60个核心物或碎片/容器。

[1394] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在上述任何段落中描述的方法,使得在步骤(b)中多个碎片包括等于或约20个至等于或约60个核心物或碎片/容器。

[1395] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在上述任何段落中描述的方法,使得在步骤(b)中多个碎片包括等于或约25个至等于或约60个核心物或碎片/容器。

[1396] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在上述任何段落中描述的方法,使得在步骤(b)中多个碎片包括等于或约30个至等于或约60个核心物或碎片/容器。

[1397] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在上述任何段落中描述的方法,使得在步骤(b)中多个碎片包括等于或约35个至等于或约60个核心物或碎片/容器。

[1398] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在上述任何段落中描述的方法,使得在步骤(b)中多个碎片包括等于或约40个至等于或约60个核心物或碎片/容器。

[1399] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在上述任何段落中描述的方法,使得在步骤(b)中多个碎片包括等于或约55个至等于或约60个核心物或碎片/容器。

[1400] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在上述任何段落中描述的方法,使得在步骤(b)中多个碎片包括等于或约50个至等于或约60个核心物或碎片/容器。

[1401] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在上述任何段落中描述的方法,使得在步骤(b)中多个核心物或碎片包括等于或约2、3、4、5、6、7、8、9,10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34,35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59或60个核心物或碎片/容器。

[1402] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得每个核心物或碎片的体积为等于或约1mm^3。

[1403] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得每个核心物或碎片的体积为等于或约1mm^{3}至等于或约10mm^3。

[1404] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得每个核心物或碎片的体积为等于或约1mm^{3}至等于或约9mm^3。

[1405] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得每个核心物或碎片的体积为等于或约1mm^{3}至等于或约8mm^3。

[1406] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得每个核心物或碎片的体积为等于或约1mm^{3}至等于或约7mm^3。

[1407] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,

对其进行了修改,使得每个核心物或碎片的体积为等于或约1mm^{3}至等于或约6mm^3。

[1408] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得每个核心物或碎片的体积为等于或约1mm^{3}至等于或约5mm^3。

[1409] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得每个核心物或碎片的体积为等于或约1mm^{3}至等于或约4mm^3。

[1410] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得每个核心物或碎片的体积为等于或约1mm^{3}至等于或约3mm^3。

[1411] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得每个核心物或碎片的体积为等于或约1mm^{3}至等于或约2mm^3。

[1412] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得每个核心物或碎片的体积为等于或约1、2、3、4、5、6、7、8,9或10mm^3。

[1413] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得细胞培养基被提供在容器中,该容器是G容器或Xuri细胞袋。

[1414] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得细胞培养基中的IL-2浓度为约10,000IU/mL至约5,000IU/mL。

[1415] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得细胞培养基中的IL-2浓度为约6,000IU/mL。

[1416] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得冷冻保存培养基包含二甲基亚砜(DMSO)。

[1417] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得冷冻保存培养基包含7%至10%的DMSO。

[1418] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(b)中的第一阶段进行约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、14天、15天、16天或17天的时间。

[1419] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(c)中的第二阶段进行约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天的时间。

[1420] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(b)中的第一阶段和步骤(c)中的第二阶段分别进行约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天或12天的时间。

[1421] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(b)中的第一阶段和步骤(c)中的第二阶段分别进行约5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天或12天的时间。

[1422] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述段落中描述的方法,其被修改为使得步骤(b)中的第一阶段和步骤(c)中的第二阶段分别进行约7天的时间。

[1423] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约14天至等于或约28天。

[1424] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约15天至等于或约28天。

[1425] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约16天至等于或约28天。

[1426] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约17天至等于或约28天。

[1427] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约18天至等于或约28天。

[1428] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约19天至等于或约28天。

[1429] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约20天至等于或约28天。

[1430] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约21天至等于或约28天。

[1431] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约22天至等于或约28天。

[1432] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约23天至等于或约28天。

[1433] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约24天至等于或约28天。

[1434] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约25天至等于或约28天。

[1435] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约26天至等于或约28天。

[1436] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约27天至等于或约28天。

[1437] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约14天。

[1438] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约15天。

[1439] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约16天。

[1440] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约17天。

[1441] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约18天。

[1442] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约19天。

[1443] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约20天。

[1444] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,

对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约21天。

[1445] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约22天。

[1446] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约23天。

[1447] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约24天。

[1448] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约25天。

[1449] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约26天。

[1450] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约27天。

[1451] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行等于或约28天。

[1452] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行约16天以下。

[1453] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行约20天以下。

[1454] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行约24天以下。

[1455] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)至(d)总共进行约28天以下。

[1456] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(d)中收获的治疗性TIL群包含对于TIL的治疗有效剂量来说足够的TIL。

[1457] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得对于治疗有效剂量来说足够的TIL的数量为2.3×10^{10}或约13.7×10^{10}。

[1458] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(c)中的第三TIL群提供增加的功效、增加的干扰素-γ产生和/或增加的多克隆性。

[1459] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得通过超过16天的方法制备的TIL相比,步骤(c)中的第三TIL群提供至少一倍至五倍或更多的干扰素-γ产生。

[1460] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得相对于获自步骤(b)第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,获自步骤(c)第三TIL群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出增加的CD8和CD28表达。

[1461] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,

对其进行了修改,使得该方法中所述的每个容器是封闭容器。

[1462] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得该方法中所述的每个容器是G容器。

[1463] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得该方法中所述的每个容器是GREX-10。

[1464] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得该方法中所述的每个容器是GREX-100。

[1465] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得该方法中所述的每个容器是GREX-500。

[1466] 在另一个实施方式中,本发明提供了由如上适用的前述任一段落中所述方法制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群。

[1467] 在另一个实施方式中,本发明提供了由患者的肿瘤组织制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群,其中,与由不添加抗原呈递细胞(APC)或OKT3进行TIL第一次扩增的方法制备的TIL相比,该治疗性TLL群提供了增加的功效、增加的干扰素-γ产生和/或增加的多克隆性。

[1468] 在另一个实施方式中,本发明提供了由患者的肿瘤组织制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群,其中,与由不添加抗原呈递细胞(APC)进行TIL第一次扩增的方法制备的TIL相比,该治疗性TLL群提供了增加的功效、增加的干扰素-γ产生和/或增加的多克隆性。

[1469] 在另一个实施方式中,本发明提供了由患者的肿瘤组织制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群,其中,与由不添加OKT3进行TIL第一次扩增的方法制备的TIL相比,该治疗性TLL群提供了增加的功效、增加的干扰素-γ产生和/或增加的多克隆性。

[1470] 在另一个实施方式中,本发明提供了由患者的肿瘤组织制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群,其中,与由不添加抗原呈递细胞(APC)且不添加OKT3进行TIL第一次扩增的方法制备的TIL相比,该治疗性TLL群提供了增加的功效、增加的干扰素-γ产生和/或增加的多克隆性。

[1471] 在另一个实施方式中,本发明提供了由患者的肿瘤组织制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群,其中,与由超过16天的方法制备的TIL相比,该治疗性TLL群提供了增加的功效、增加的干扰素-γ产生和/或增加的多克隆性。

[1472] 在另一个实施方式中,本发明提供了由如上适用的前述任一段落中所述方法制备的治疗性TIL群,该治疗性TIL群提供了增加的干扰素-γ产生。

[1473] 在另一个实施方式中,本发明提供了由如上适用的前述任一段落中所述方法制备的治疗性TIL群,该治疗性TIL群提供了增加的多克隆性。

[1474] 在另一个实施方式中,本发明提供了由如上适用的前述任一段落中所述方法制备的治疗性TIL群,该治疗性TIL群提供了增加的功效。

[1475] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群,对其进行了修改,使得与由超过16天的方法制备的TIL相比,该治疗性TIL群能产生至少1倍更多的干扰素-γ。

[1476] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群,对其进行了修改,使得与由超过16天的方法制备的TIL相比,该治疗性TIL群能产生

至少2倍更多的干扰素-γ。

[1477] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群,对其进行了修改,使得与由超过16天的方法制备的TIL相比,该治疗性TIL群能产生至少3倍更多的干扰素-γ。

[1478] 在另一个实施方式中,本发明提供了治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群,与由不添加抗原呈递细胞(APC)进行TIL第一次扩增的方法制备的TIL相比,该治疗性TIL群能产生至少1倍更多的干扰素-γ。

[1479] 在另一个实施方式中,本发明提供了治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群,与由不添加OKT3进行TIL第一次扩增的方法制备的TIL相比,该治疗性TIL群能产生至少1倍更多的干扰素-γ。

[1480] 在另一个实施方式中,本发明提供了治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群,与由不添加APC进行TIL第一次扩增的方法制备的TIL相比,该治疗性TIL群能产生至少2倍更多的干扰素-γ。

[1481] 在另一个实施方式中,本发明提供了治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群,与由不添加OKT3进行TIL第一次扩增的方法制备的TIL相比,该治疗性TIL群能产生至少2倍更多的干扰素-γ。

[1482] 在另一个实施方式中,本发明提供了治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群,与由不添加APC进行TIL第一次扩增的方法制备的TIL相比,该治疗性TIL群能产生至少3倍更多的干扰素-γ。

[1483] 在另一个实施方式中,本发明提供了治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群,与由不添加OKT3进行TIL第一次扩增的方法制备的TIL相比,该治疗性TIL群能产生至少3倍更多的干扰素-γ。

[1484] 在另一个实施方式中,本发明提供了扩增T细胞的方法,该方法包括:(a)通过培养第一T细胞群对获自供体的肿瘤碎片或核心物的第一T细胞群进行启动第一次扩增,影响第一T细胞群生长并引发第一T细胞群活化;(b)在步骤(a)中引发的第一T细胞群的活化开始衰减之后,通过培养第一T细胞群对第一T细胞群进行快速第二次扩增,影响第一T细胞群生长并加强第一T细胞群活化,获得第二T细胞群;以及(c)收获第二T细胞群。在另一个实施方式中,快速第二次扩增的步骤被分成多个步骤以实现培养物的按比例扩增,其通过:(a)通过在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)在小规模培养物中培养第一T细胞群约3-4天来进行快速第二次扩增,然后(b)将第一T细胞群从小规模培养物转移到比第一容器大的第二容器(例如G-REX 500MCS容器)中,并在第二容器中在更大规模培养物中培养来自小规模培养物的第一T细胞群约4至7天。在另一个实施方式中,快速扩增的步骤被分成多个步骤以实现培养物的按比例扩增,其通过:通过在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中在小规模培养物中培养第一T细胞群约3-4天来进行快速第二次扩增,然后(b)将第一T细胞群从第一小规模培养物转移并分配到至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个第二容器,该第二容器的尺寸与第一容器相同,其中,在每个第二容器中,在第二小规模培养物中培养从第一小规模培养物转移至该第二容器的第一T细胞群的一部分约4至7天。在另一个实施方式中,快速扩增的步骤被分成多个步骤以实现培养物的横向扩增和纵向扩增,其通过:(a)通过在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中在小规模培养物中培养第一T细胞

群约3-4天来进行快速第二次扩增,然后(b)将第一T细胞群从小规模培养物中转移并分配到至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个第二容器(例如G-REX 500MCS容器),该第二容器的尺寸大于第一容器,其中,在每个第二容器中,在更大规模培养物中培养从小规模培养物转移到该第二容器的第一T细胞群的一部分约4至7天。在另一个实施方式中,快速扩增的步骤被分成多个步骤以实现培养物的横向扩增和纵向扩增,其通过:(a)通过在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中在小规模培养物中培养第一T细胞群约4天来进行快速第二次扩增,然后(b)将第一T细胞群从小规模培养物中转移并分配到2、3或4个比第一容器大的第二容器(例如G-REX 500MCS容器),其中,在每个第二容器中,在更大规模培养物中培养从小规模培养物转移到该第二容器的第一T细胞群的一部分约5天

[1485] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)的启动第一次扩增进行至多17天的时间。

[1486] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)的启动第一次扩增进行至多11天的时间。

[1487] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得步骤(a)的启动第一次扩增进行17天的时间,步骤(b)的快速第二次扩增进行至多9天的时间。

[1488] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(a)中,将第一T细胞群在包含OKT-3和IL-2的培养基中培养。

[1489] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得第一培养基包含OKT-3、IL-2和抗原呈递细胞(APC)。

[1490] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,第一T细胞群在包含OKT-3、IL-2和抗原呈递细胞(APC)的第二培养基中培养。

[1491] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(a)中,将第一T细胞群在包含第一透气表面的容器中的第一培养基中进行培养,其中,第一培养基包含OKT-3、IL-2和第一抗原呈递细胞群(APC),其中,第一APC群对于第一T细胞群的供体是外源的,将第一APC群层叠在第一层透气表面上,其中,在步骤(b)中,将第一T细胞群在容器中的第二培养基中培养,其中,第二培养基包含OKT-3、IL-2和第二APC群,其中,第二APC群对第一T细胞群的供体是外源的,第二APC群层叠在第一透气表面上,其中,第二APC群大于第一APC群。

[1492] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得第二APC群中的APC数量与第一APC群中的APC数量的比率为约2:1。

[1493] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得第一APC群中的APC数量为约2.5×10^8,第二APC群中的APC数量为约5×10^8。

[1494] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(a)中,以2层APC的平均厚度将第一APC群层叠到第一透气表面。

[1495] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,

对其进行了修改,使得在步骤(b)中,以4层至8层APC的平均厚度将第二APC群层叠到第一透气表面。

[1496] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中层叠在第一透气性表面上的APC的平均层数与在步骤(a)中层叠在第一透气表面上的APC的平均层数的比率为2:1。

[1497] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(a)中,第一APC群以选自等于或约1.0×10^6APC/cm^2至等于或约4.5×10^6APC/cm^2的密度接种在第一透气表面上。

[1498] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(a)中,第一APC群以选自等于或约1.5×10^6APC/cm^2至等于或约3.5×10^6APC/cm^2的密度接种在第一透气表面上。

[1499] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(a)中,第一APC群以选自等于或约2.0×10^6APC/cm^2至等于或约3.0×10^6APC/cm^2的密度接种在第一透气表面上。

[1500] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(a)中,第一APC群以等于或约2.0×10^6APC/cm^2的密度接种在第一透气表面上。

[1501] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,第二APC群以选自等于或约2.5×10^6APC/cm^2至等于或约7.5×10^6APC/cm^2的密度接种在第一透气表面上。

[1502] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,第二APC群以选自等于或约3.5×10^6APC/cm^2至等于或约6.0×10^6APC/cm^2的密度接种在第一透气表面上。

[1503] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,第二APC群以选自等于或约4.0×10^6APC/cm^2至等于或约5.5×10^6APC/cm^2的密度接种在第一透气表面上。

[1504] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(b)中,第二APC群以等于或约4.0×10^6APC/cm^2的密度接种在第一透气表面上。

[1505] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(a)中,第一APC群以选自等于或约1.0×10^6APC/cm^2至等于或约4.5×10^6APC/cm^2的密度接种在第一透气表面上;在步骤(b)中,第二APC群以选自等于或约2.5×10^6APC/cm^2至等于或约7.5×10^6APC/cm^2的密度接种在第一透气表面上。

[1506] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(a)中,第一APC群以选自等于或约1.5×10^6APC/cm^2至等于或约3.5×10^6APC/cm^2的密度接种在第一透气表面上;在步骤(b)中,第二APC群以选自等于或约3.5×10^6APC/cm^2至等于或约6.0×10^6APC/cm^2的密度接种在第一透气表面上。

[1507] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(a)中,第一APC群以选自等于或约2.0×10^6APC/cm^2至等于或

约3.0×10^{6}APC/cm^{2}的密度接种在第一透气表面上;在步骤(b)中,第二APC群以选自等于或约4.0×10^{6}APC/cm^{2}至等于或约5.5×10^{6}APC/cm^{2}的密度接种在第一透气表面上。

[1508] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得在步骤(a)中,第一APC群以选自等于或约2.0×10^{6}APC/cm^{2}的密度接种在第一透气表面上;在步骤(b)中,第二APC群以选自等于或约4.0×10^{6}APC/cm^{2}的密度接种在第一透气表面上。

[1509] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得APC是外周血单核细胞(PBMC)。

[1510] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得PBMC是经辐照的且相对于第一T细胞群的供体是外源的。

[1511] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得T细胞是肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),第一T细胞群是步骤(a)中的第一TIL群,第二T细胞群是步骤(b)中的第二TIL群,第二TIL群是治疗性TIL群,并且治疗性TIL群在步骤(c)中收获。

[1512] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得T细胞是骨髓浸润淋巴细胞(MIL)。

[1513] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的在前述任何段落中描述的方法,对其进行了修改,使得T细胞表型为CD3+和CD45+。

[1514] XV.药物组合物、剂量和施用方案

[1515] 在一个实施方式中,使用本公开的方法扩增的TIL作为药物组合物施用于患者。在一个实施方式中,药物组合物是TIL在无菌缓冲液中的悬液。使用本公开的PBMC扩增的TIL可通过本领域已知的任何合适的途径施用。在一些实施方式中,T细胞以单次动脉内或静脉内输注的方式施用,优选持续约30至60分钟。其他合适的施用途径包括腹膜内、鞘内和淋巴内施用。

[1516] 可以施用任何合适剂量的TIL。在一些实施方式中,施用约2.3×10^{10}至约13.7×10^{10}TIL,平均约7.8×10^{10}TIL,特别是如果癌症是黑色素瘤。在一个实施方式中,施用约1.2×10^{10}至约4.3×10^{10}TIL。在一些实施方式中,施用约3×10^{10}至约12×10^{10}TIL。在一些实施方式中,施用约4×10^{10}至约10×10^{10}TIL。在一些实施方式中,施用约5×10^{10}至约8×10^{10}TIL。在一些实施方式中,施用约6×10^{10}至约8×10^{10}TIL。在一些实施方式中,施用约7×10^{10}至约8×10^{10}TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约2.3×10^{10}至约13.7×10^{10}TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约7.8×10^{10}TIL,特别是癌症为黑色素瘤。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约1.2×10^{10}至约4.3×10^{10}TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约3×10^{10}至约12×10^{10}TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约4×10^{10}至约10×10^{10}TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约5×10^{10}至约8×10^{10}TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约6×10^{10}至约8×10^{10}TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约7×10^{10}至约8×10^{10}TIL。

[1517] 在一些实施方式中,本发明的药物组合物中提供的TIL的数量为约1×10^6、2×10^6、3×10^6、4×10^6、5×10^6、6×10^6、7×10^6、8×10^6、9×10^6、1×10^7、2×10^7、3×10^7、4×10^7、5×10^7、6×10^7、7×10^7、8×10^7、9×10^7、1×10^8、2×108、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}、9×1010、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}和9×10^{13}。在一个实施方式中，在本发明的药物组合物中提供的TIL的数量为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1×1011、5×10^{11}至1×10^{12}、1×10^{12}至5×10^{12}以及5×10^{12}至1×10^{13}。

[1518] 在一些实施方式中，本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度小于药物组合物的例如100％、90％、80％、70％、60％、50％、40％、30％、20％、19％、18％、17％、16％、15％、14％、13％、12％、11％、10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％、1％、0.5％、0.4％、0.3％、0.2％、0.1％、0.09％、0.08％、0.07％、0.06％、0.05％、0.04％、0.03％、0.02％、0.01％、0.009％、0.008％、0.007％、0.006％、0.005％、0.004％、0.003％、0.002％、0.001％、0.0009％、0.0008％、0.0007％、0.0006％、0.0005％、0.0004％、0.0003％、0.0002％或0.0001％w/w、w/v或v/v。

[1519] 在一些实施方式中，本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度大于药物组合物的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。

[1520] 在一些实施方式中，本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度为药物组合物的约0.0001％至约50％、约0.001％至约40％、约0.01％至约30％、约0.02％至约29％、约0.03％至约28％、约0.04％至约27％、约0.05％至约26％、约0.06％至约25％、约0.07％至约24％、约0.08％至约23％、约0.09％至约22％、约0.1％至约21％、约0.2％至约20％、约0.3％至约19％、约0.4％至约18％、约0.5％至约17％、约0.6％至约16％、约0.7％至约15％、约0.8％至约14％、约0.9％至约12％或约1％至约10％w/w、w/v或v/v。

[1521] 在一些实施方式中，本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度为药物组合物的约0.001％至约10％、约0.01％至约5％、约0.02％至约4.5％、0.03％至约4％、约0.04％至约3.5％、约0.05％至约3％、约0.06％至约2.5％、约0.07％至约2％、约0.08％至约1.5％、约0.09％约1％、约0.1％至约0.9％w/w、w/v或v/v。

[1522] 在一些实施方式中，本发明的药物组合物中提供的TIL的量等于或小于10g、9.5g、9.0g、8.5g、8.0g、7.5g、7.0g、6.5g、6.0g、5.5g、5.0g、4.5g、4.0g、3.5g、3.0g、2.5g、2.0g、

1.5g、1.0g、0.95g、0.9g、0.85g、0.8g、0.75g、0.7g、0.65g、0.6g、0.55g、0.5g、0.45g、0.4g、0.35g、0.3g、0.25g、0.2g、0.15g、0.1g、0.09g、0.08g、0.07g、0.06g、0.05g、0.04g、0.03g、0.02g、0.01g、0.009g、0.008g、0.007g、0.006g、0.005g、0.004g、0.003g、0.002g、0.001g、0.0009g、0.0008g、0.0007g、0.0006g、0.0005g、0.0004g、0.0003g、0.0002g或0.0001g。

[1523] 在一些实施方式中,在本发明的药物组合物中提供的TIL的量大于0.0001g、0.0002g、0.0003g、0.0004g、0.0005g、0.0006g、0.0007g、0.0008g、0.0009g、0.001g、0.0015g、0.002g、0.0025g、0.003g、0.0035g、0.004g、0.0045g、0.005g、0.0055g、0.006g、0.0065g、0.007g、0.0075g、0.008g、0.0085g、0.009g、0.0095g、0.01g、0.015g、0.02g、0.025g、0.03g、0.035g、0.04g、0.045g、0.05g、0.055g、0.06g、0.065g、0.07g、0.075g、0.08g、0.085g、0.09g、0.095g、0.1g、0.15g、0.2g、0.25g、0.3g、0.35g、0.4g、0.45g、0.5g、0.55g、0.6g、0.65g、0.7g、0.75g、0.8g、0.85g、0.9g、0.95g、1g、1.5g、2g、2.5、3g、3.5、4g、4.5g、5g、5.5g、6g、6.5g、7g、7.5g、8g、8.5g、9g、9.5g或10g。

[1524] 本发明药物组合物中提供的TIL在宽剂量范围内有效。确切剂量将取决于施用途径、化合物的施用形式、待治疗受试者的性别和年龄、待治疗受试者的体重以及主治医师的偏好和经验。如果合适,也可使用临床确定的TIL剂量。使用本文的方法施用的药物组合物的量(例如TIL的剂量)将取决于所治疗的人或哺乳动物、疾病或病症的严重程度、施用率、活性药物成分的配置以及处方医师的酌处权。

[1525] 在一些实施方式中,TIL可以单剂量施用。此种施用可通过注射,例如静脉内注射。在一些实施方式中,可以多剂量施用TIL。施用可为每年一次、两次、三次、四次、五次、六次或六次以上。施用可为每月一次、每两周一次、每周一次或隔天一次。必要时,可以继续施用TIL。

[1526] 在一些实施方式中,TIL的有效剂量为约1×10^6、2×10^6、3×10^6、4×10^6、5×10^6、6×10^6、7×10^6、8×10^6、9×10^6,1×10^7、2×10^7、3×10^7、4×10^7、5×10^7、6×10^7、7×10^7、8×10^7、9×10^7、1×10^8、2×10^8、3×10^8、4×108、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}、2×1011、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12},6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}和9×10^{13}。在一些实施方式中,TIL的有效剂量为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1×1012、1×10^{12}至5×10^{12}和5×10^{12}至1×10^{13}。

[1527] 在一些实施方式中,TIL的有效剂量为约0.01mg/kg至约4.3mg/kg、约0.15mg/kg至约3.6mg/kg、约0.3mg/kg至约3.2mg/kg、约0.35mg/kg至约2.85mg/kg、约0.15mg/kg至约2.85mg/kg、约0.3mg至约2.15mg/kg、约0.45mg/kg至约1.7mg/kg、约0.15mg/kg至约1.3mg/kg、约0.3mg/kg至约1.15mg/kg、约0.45mg/kg至约1mg/kg、约0.55mg/kg至约0.85mg/kg、约0.65mg/kg至约0.8mg/kg、约0.7mg/kg至约0.75mg/kg、约0.7mg/kg至约2.15mg/kg、约0.85mg/kg至约2mg/kg、约1mg/kg至约1.85mg/kg、约1.15mg/kg至约1.7mg/kg、约1.3mg/kg mg至约1.6mg/kg、约1.35mg/kg至约1.5mg/kg、约2.15mg/kg约3.6mg/kg、约2.3mg/kg至约

3.4mg/kg、约2.4mg/kg至约3.3mg/kg、约2.6mg/kg至约3.15mg/kg、约2.7mg/kg至约3mg/kg、约2.8mg/kg至约3mg/kg或约2.85mg/kg至约2.95mg/kg。

[1528] 在一些实施方式中,TIL的有效剂量为约1mg至约500mg、约10mg至约300mg、约20mg至约250mg、约25mg至约200mg、1mg至约50mg、约5mg至约45mg、约10mg至约40mg、约15mg至约35mg、约20mg至约30mg、约23mg至约28mg、约50mg至约150mg、约60mg至约140mg、约70mg至约130mg、约80mg至约120mg、约90mg至约110mg、或约95mg至约105mg、约98mg至约102mg、约150mg至约250mg、约160mg至约240mg、约170mg至约230mg、约180mg至约220mg、约190mg至约210mg、约195mg至约205mg或约198mg至约207mg。

[1529] 有效量的TIL可通过具有相似效用的试剂的任何可接受的施用方式(包括鼻内和透皮途径)通过动脉内注射、静脉内、腹膜内、肠胃外、肌内、皮下、局部、通过移植或吸入以单剂量或多剂量施用。

[1530] 在另一个实施方式中,本发明提供了输液袋,其包含如上适用的前述段落中任一项所述的治疗性TIL群。

[1531] 在另一个实施方式中,本发明提供了肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)组合物,其包含如上适用的前述段落中任一项所述的治疗性TIL群和药学上可接受的载体。

[1532] 在另一个实施方式中,本发明提供了输液袋,其包含如上适用的前述段落中任一项所述的TIL组合物。

[1533] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述段落中任一项所述的治疗性TIL群的冷冻保存制剂。

[1534] 在另一个实施方式中,本发明提供了肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)组合物,其包含如上适用的前述段落中任一项所述的治疗性TIL群和冷冻保存培养基。

[1535] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的TIL组合物,对其进行了修改使得冷冻保存培养基包含DMSO。

[1536] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的TIL组合物,对其进行了修改使得冷冻保存培养基包含7-10%的DMSO。

[1537] 在另一个实施方式中,如上适用的前述段落中任一项所述的冷冻保存的TIL组合物制剂。

[1538] XVI.治疗患者的方法

[1539] 治疗方法从初始TIL的收集和TIL的培养开始。这些方法在本领域中已经由例如Jin等(J.Immunotherapy,2012,35(3):283-292)描述,其全部内容通过引用整体并入本文。下文整个部分(包括实施例)描述了治疗方法的实施方式。

[1540] 根据本文所述的方法(包括例如上文步骤A至F所述或根据以上步骤A至F所述(例如也如图85(特别是例如图85B)所示))生产的扩增的TIL在治疗癌症患者中有特定用途(例如描述于Goff等,J.Clinical Oncology 2016,34(20):2389-239以及补充内容;其内容通过引用并入本文)。在一些实施方式中,如先前描述的,从切除的转移性黑色素瘤沉积物生长TIL(参见Dudley等,J Immunother.,2003,26:332-342;其全部内容通过引用整体并入本文)。可在无菌条件下解剖新鲜肿瘤。可以收集代表性样品用于正式病理分析。可以使用2mm^{3}至3mm^{3}的单个碎片。在一些实施方式中,每位患者获得5、10、15、20、25或30个样品。在一些实施方式中,每位患者获得20、25或30个样品。在一些实施方式中,每位患者获得20、22、

24、26或28个样品。在一些实施方式中,每位患者获得24个样品。可将样品置于24孔板的各个孔中,维持在具有高剂量IL-2(6,000IU/mL)的生长培养基中,并监测肿瘤的破坏和/或TIL的增殖。可将处理后具有剩余活细胞的任何肿瘤酶促消化成单细胞悬液并如本文所述地冷冻保存。

[1541] 在一些实施方式中,可对成功生长的TIL进行取样以进行表型分析(CD3、CD4、CD8和CD56),并在适当时针对自体肿瘤进行测试。如果过夜共培养产生的干扰素-γ(IFN-γ)水平>200pg/mL和两倍背景,则可认为TIL是反应性的。(Goff等,J Immunother.,2010,33:840-847;其全部内容通过引用整体并入本文)。在一些实施方式中,可以选择具有自体反应性迹象或充分的生长模式的培养物,用于第二次扩增(例如根据图85(特别是例如图85B)的步骤D提供的第二次扩增),包括有时称为快速扩增(REP)的第二次扩增。在一些实施方式中,选择具有高自体反应性(例如在第二次扩增期间的高增殖)的扩增的TIL,用于另外的第二次扩增。在一些实施方式中,选择具有高自体反应性(例如如图85(特别是例如图85B)的步骤D中提供的第二次扩增期间的高增殖)的TIL,用于根据图85(特别是例如图85B)的步骤D的另外的第二次扩增。

[1542] 在一些实施方式中,患者不直接进行ACT(过继细胞转移),例如在一些实施方式中,在肿瘤收获和/或第一次扩增后,不立即使用细胞。在一些实施方式中,可冷冻保存TIL并在给患者施用前2天解冻。在一些实施方式中,可冷冻保存TIL并在给患者施用前1天解冻。在一些实施方式中,可冷冻保存TIL并在给患者施用之前即刻解冻。

[1543] 可通过流式细胞术(例如,FlowJo™)以及通过本文所述的任何方法,分析输液袋TIL的冷冻保存样品的细胞表型的表面标志物CD3、CD4、CD8、CCR7和CD45RA(BD BioSciences)。通过使用标准酶联免疫吸附检测技术,测量血清细胞因子。血清IFN-g的升高定义为≥100pg/mL且大于4 3基线水平。

[1544] 在一些实施方式中,通过本文提供的方法(例如图85(特别是例如图85B)中举例说明的那些)产生的TIL提供了TIL的临床功效的令人惊讶的改善。在一些实施方式中,与通过本文所述之外的方法(例如除图85(特别是例如图85B)中所示方法之外的方法)产生的TIL相比,通过本文提供的方法产生的TIL(例如图85(特别是图85B)所示的那些)显示出增加的临床功效。在一些实施方式中,不同于本文所述那些方法的方法包括被称为过程1C和/或第一代(第一代)的方法。在一些实施方式中,增加的功效通过DCR、ORR和/或其他临床反应来测量。在一些实施方式中,与通过本文所述之外的方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)中所示那些之外的方法,例如Gen 1过程)产生的TIL相比,通过本文提供的方法产生的TIL(例如图85(特别是例如图85B)所示的TIL)表现出相似的响应时间和安全性。

[1545] 在一些实施方式中,IFN-伽马(IFN-γ)指示治疗功效和/或增加的临床功效。在一些实施方式中,用TIL治疗的受试者的血液中的IFN-γ指示活性TIL。在一些实施方式中,采用IFN-γ产生的效价测定法。IFN-γ的产生是细胞毒性潜力的另一种度量。IFN-γ产生可通过确定用本发明方法制备的TIL治疗的受试者的血液、血清或TIL中的细胞因子IFN-γ的水平来测量,所述TIL通过本发明的方法制备,包括例如图85(特别是例如图85B)所示的那些。在一些实施方式中,IFN-γ的增加指示在用通过本发明的方法产生的TIL治疗的患者中的治疗功效。在一些实施方式中,与未治疗的患者和/或与使用除本文提供的方法之外的其他方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)所述那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者

相比,IFN-γ增加了1倍、2倍、3倍、4倍或5倍或更多。在一些实施方式中,与未治疗的患者和/或与使用除本文提供的方法之外的其他方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)所述那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,IFN-γ增加了1倍。在一些实施方式中,与未治疗的患者和/或与使用除本文提供的方法之外的其他方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)所述那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,IFN-γ增加了2倍。在一些实施方式中,与未治疗的患者和/或与使用除本文提供的方法之外的其他方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)所述那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,IFN-γ增加了3倍。在一些实施方式中,与未治疗的患者和/或与使用除本文提供的方法之外的其他方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)所述那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,IFN-γ增加了4倍。在一些实施方式中,与未治疗的患者和/或与使用除本文提供的方法之外的其他方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)所述那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,IFN-γ增加了5倍。在一些实施方式中,使用Quantikine ELISA试剂盒测量IFN-γ。在一些实施方式中,测量经TIL治疗的受试者的离体TIL的IFN-γ,该TIL通过本发明的方法(包括例如图85(特别是例如图85B)中所述的那些)制备。在一些实施方式中,测量经TIL治疗的受试者的血液中的IFN-γ,该TIL通过本发明的方法(包括例如图85(特别是例如图85B)中所述的那些)制备。在一些实施方式中,测量经TIL治疗的受试者的血清中的IFN-γ,该TIL通过本发明的方法(包括例如图85(特别是例如图85B)中所述的那些)制备。

[1546] 在一些实施方式中,与通过其他方法(包括非图85(特别是例如图85B)中所示的那些方法,例如被称为过程1C方法的方法)产生的TIL相比,通过本发明的方法(包括例如图85(特别是例如图85B)中所述的那些)制备的TIL表现出增加的多克隆性。在一些实施方式中,明显改善的多克隆性和/或增加的多克隆性指示治疗功效和/或临床功效的增加。在一些实施方式中,多克隆性指T细胞库多样性。在一些实施方式中,多克隆性的增加可以指示就施用本发明的方法产生的TIL而言的治疗功效。在一些实施方式中,使用除本文提供的方法之外的方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)所述那些之外的方法)制备的TIL相比,多克隆性增加了1倍、2倍、10倍、100倍、500倍或1000倍。在一些实施方式中,使用除本文提供的方法之外的方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)所述那些之外的方法)制备的TIL相比,多克隆性增加了1倍。在一些实施方式中,使用除本文提供的方法之外的方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)所述那些之外的方法)制备的TIL相比,多克隆性增加了2倍。在一些实施方式中,使用除本文提供的方法之外的方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)所述那些之外的方法)制备的TIL相比,多克隆性增加了10倍。在一些实施方式中,使用除本文提供的方法之外的方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)所述那些之外的方法)制备的TIL相比,多克隆性增加了100倍。在一些实施方式中,使用除本文提供的方法之外的方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)所述那些之外的方法)制备的TIL相比,多克隆性增加了500倍。在一些实施方式中,使用除本文提供的方法之外的方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)所述那些之外的方法)制备的TIL相比,多克隆性增加了1000倍。

[1547] 如本领域已知的以及如本文所述,功效的量度可包括疾病控制率(DCR)以及总反应率(ORR)。

[1548] 1、治疗癌症和其他疾病的方法

[1549] 本文所述的组合物和方法可用于治疗疾病的方法。在一个实施方式中,它们用于

治疗过度增殖性疾病。它们还可用于治疗本文和以下段落中描述的其他疾病。

[1550] 在一些实施方式中,过度增殖性疾病是癌症。在一些实施方式中,过度增殖性疾病是实体瘤癌症。在一些实施方式中,实体瘤癌选自胶质母细胞瘤(GBM)、胃肠道癌、黑色素瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、由人乳头状瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包括头颈鳞状细胞癌(HNSCC))、肾癌和肾脏上皮肾细胞癌。在一些实施方式中,过度增殖性疾病是血液系统恶性肿瘤。在一些实施方式中,实体瘤癌症选自慢性淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤和套细胞淋巴瘤。

[1551] 在一些实施方式中,癌症是超突变的(hypermutated)癌症表型。超突变的癌症大量描述于Campbell等(Cell,171:1042-1056(2017);出于所有目的通过引用整体并入本文)。在一些实施方式中,超突变的肿瘤每兆碱基(Mb)包含9至10个突变。在一些实施方式中,小儿超突变肿瘤每兆碱基(Mb)包含9.91个突变。在一些实施方式中,成人超突变肿瘤每兆碱基(Mb)包含9个突变。在一些实施方式中,增强的超突变肿瘤每兆碱基(Mb)包含10至100个突变。在一些实施方式中,增强的小儿超突变肿瘤每兆碱基(Mb)包含10至100个突变。在一些实施方式中,增强的成人超突变肿瘤每兆碱基(Mb)包含10至100个突变。在一些实施方式中,超高突变的(ultra-hypermutated)肿瘤每兆碱基(Mb)包含大于100个突变。在一些实施方式中,小儿超高突变的肿瘤每兆碱基(Mb)包含大于100个突变。在一些实施方式中,成人超高突变的肿瘤每兆碱基(Mb)包含大于100个突变。

[1552] 在一些实施方式中,超突变的肿瘤在复制修复通路中具有突变。在一些实施方式中,超突变的肿瘤在复制修复相关的DNA聚合酶中具有突变。在一些实施方式中,超突变的肿瘤具有微卫星不稳定性。在一些实施方式中,超高突变的肿瘤在复制修复相关的DNA聚合酶中具有突变并且具有微卫星不稳定性。在一些实施方式中,肿瘤中的超突变与对免疫检查点抑制剂的应答相关。在一些实施方式中,超突变的肿瘤对免疫检查点抑制剂的治疗有抗性。在一些实施方式中,可使用本发明的TIL治疗超突变的肿瘤。在一些实施方式中,肿瘤中的超突变由环境因素(外在暴露)引起。例如,紫外线可能是恶性黑色素瘤中大量突变的主要原因(参见例如Pfeifer,GP,You,YH和Besaratinia,A.(2005).Mutat.Res.571,19-31;Sage,E.(1993).Photochem.Photobiol.57,163-174)。在一些实施方式中,由于直接诱变剂暴露,可能由烟草烟雾中针对肺和喉肿瘤以及其他肿瘤的大于60种致癌物引起肿瘤中的超突变(参见例如Pleasance,E.D.,Stephens,P.J.,O'Meara,S.,McBride,D.J.,Meynert,A.,Jones,D.,Lin,M.L.,Beare,D.,Lau,K.W.,Greenman,C.,et al.(2010).Nature 463,184-190)。在一些实施方式中,肿瘤中的超突变是由载脂蛋白B mRNA编辑酶、催化性多肽样(APOBEC)家族成员的失调引起的,已显示其在多种癌症中导致C到T转换的水平增加(参见例如Roberts,SA,Lawrence,MS,Klimczak,LJ,Grimm,SA,Fargo,D.,Stojanov,P.,Kiezun,A.,Kryukov,GV,Carter,SL,Saksena,G.等(2013)Nat.Genet.45,970-976)。在一些实施方式中,肿瘤中的超突变由DNA缺陷的复制修复缺陷引起,所述DNA缺陷的复制修复由主要的复制酶Pol3和Pold1进行的危及校对的突变引起。在一些实施方式中,肿瘤中的超突变由DNA错配修复的缺陷引起,其与结直肠癌、子宫内膜癌和其他癌症的超突变有关(参见例如Kandoth,C.,Schultz,N.,Cherniack,A.D.,Akbani,R.,Liu,Y.,Shen,H.,Robertson,A.G.,Pashtan,I.,Shen,R.,Benz,C.C.等,(2013)Nature 497,67-73;Muzny,D.M.,Bainbridge,

M.N.,Chang,K.,Dinh,H.H.,Drummond,J.A.,Fowler,G.,Kovar,C.L.,Lewis,L.R.,Morgan,M.B.,Newsham,I.F.等,(2012)Nature 487,330-337)。在一些实施方式中,在癌症易感综合症(例如体质或双等位基因错配修复缺陷(CMMRD))、林奇综合症和聚合酶校对相关息肉病(PPAP)中也发现了DNA复制修复突变。

[1553] 在一个实施方式中,本发明包括用TIL群治疗癌症的方法,其中,所述癌症是超突变的癌症。在一个实施方式中,本发明包括用TIL群治疗癌症的方法,其中,所述癌症是增强的超突变癌症。在一个实施方式中,本发明包括一种用TIL群治疗癌症的方法,其中,所述癌症是超高突变癌症。

[1554] 在一个实施方式中,本发明提供了用TIL群治疗癌症的方法,其中,根据本公开内容,在输注TIL之前用非清髓性化疗对患者进行预治疗。在一个实施方式中,非清髓性化治疗为施用环磷酰胺60mg/kg/天,持续2天(TIL输注前第27和26天)和氟达拉滨25mg/m^2/天,持续5天(TIL输注前第27至23天)。在一个实施方式中,在根据本公开内容的非清髓性化治疗和TIL输注(在第0天)后,患者以720,000IU/kg每8小时接受一次IL-2的静脉输注,直至生理耐受。

[1555] 可使用本领域已知的各种模型来测试本文所述的化合物和化合物的组合在治疗、预防和/或控制所示疾病或病症中的功效,所述模型为治疗人类疾病提供指导。例如,确定卵巢癌治疗功效的模型描述于例如Mullany等,Endocrinology 2012,153,1585-92;和Fong等,J.Ovarian Res.2009,2,12。确定胰腺癌的治疗功效的模型描述于Herreros-Villanueva等,World J.Gastroenterol 2012,18,1286-1294。确定乳腺癌治疗功效的模型描述于例如Fantozzi,Breast Cancer Res.2006,8,212。确定黑色素瘤治疗功效的模型描述于例如Damsky等,Pigment Cell&Melanoma Res.2010,23,853-859。确定肺癌治疗功效的模型描述于例如Meuwissen等,Genes&Development,2005,19,643-664。确定肺癌治疗功效的模型描述于例如Kim,Clin.Exp.Otorhinolaryngol.2009,2,55-60;以及Sano,Head Neck Oncol.2009,1,32。

[1556] 在一些实施方式中,IFN-gamma(IFN-γ)指示过度增殖性疾病治疗的治疗功效。在一些实施方式中,用TIL治疗的受试者的血液中的IFN-γ指示活性TIL。在一些实施方式中,采用了IFN-γ产生的效价测定法。IFN-γ产生是细胞毒性潜力的另一种度量。可通过测定用通过本发明的方法制备的TIL治疗的受试者的血液中细胞因子IFN-γ的水平来测量IFN-γ的产生,本发明的方法包括例如图85中所描述的那些(特别是例如图85B)。在一些实施方式中,与用使用称为Gen 3过程的方法制备的TIL治疗的受试者相比,本发明方法获得的TIL提供了用本发明方法的TIL治疗的受试者的血液中的IFN-γ增加,如图85(特别是例如图85B)和整个本申请所示。在一些实施方式中,IFN-γ的增加指示在用本发明的方法产生的TIL治疗的患者中的治疗功效。在一些实施方式中,与未治疗的患者和/或与用除本文所述方法之外的其他方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)所示方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,IFN-γ增加了1倍、2倍、3倍、4倍或5倍或更多。在一些实施方式中,与未治疗的患者和/或与用除本文所述方法之外的其他方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)所示方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,IFN-γ增加了1倍。在一些实施方式中,与未治疗的患者和/或与用除本文所述方法之外的其他方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)所示方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,IFN-γ增加了2倍。在一些实

施方式中,与未治疗的患者和/或与用除本文所述方法之外的其他方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)所示方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,IFN-γ增加了3倍。在一些实施方式中,与未治疗的患者和/或

[1557] 与用除本文所述方法之外的其他方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)所示方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,IFN-γ增加了4倍。在一些实施方式中,与未治疗的患者和/或与用除本文所述方法之外的其他方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)所示方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,IFN-γ增加了5倍。在一些实施方式中,使用Quantikine ELISA试剂盒测量IFN-γ。在一些实施方式中,使用Quantikine ELISA试剂盒测量IFN-γ。在一些实施方式中,在用通过本发明的方法产生的TIL治疗的患者离体的TIL中测量IFN-γ。在一些实施方式中,在用通过本发明的方法产生的TIL治疗的患者的血液中测量IFN-γ。在一些实施方式中,在用通过本发明的方法产生的TIL治疗的患者的血清中测量IFN-γ。

[1558] 在一些实施方式中,与通过其他方法(非图85(特别是例如图85B)中所示的那些方法,例如称为过程1C方法的方法)生产的TIL相比,通过本发明的方法制备的TIL(包括例如图85(特别是例如图85B)所述的那些)显示出增加的多克隆性。在一些实施方式中,明显改善的多克隆性和/或增加的多克隆性指示癌症治疗的治疗功效和/或临床功效增加。在一些实施方式中,多克隆性指T细胞库多样性。在一些实施方式中,多克隆性的增加可以指示就施用本发明的方法产生的TIL而言的治疗功效。在一些实施方式中,与使用除本文所述那些之外的方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)中所示那些之外的方法)制备的TIL相比,多克隆性增加了1倍、2倍、10倍、100倍、500倍或1000倍。在一些实施方式中,与未经治疗的患者和/或通过使用除本文所述那些之外的方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)中所示那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加了1倍。在一些实施方式中,与未经治疗的患者和/或通过使用除本文所述那些之外的方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)中所示那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加了2倍。在一些实施方式中,与未经治疗的患者和/或通过使用除本文所述那些之外的方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)中所示那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加了10倍。在一些实施方式中,与未经治疗的患者和/或通过使用除本文所述那些之外的方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)中所示那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加了100倍。在一些实施方式中,与未经治疗的患者和/或通过使用除本文所述那些之外的方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)中所示那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加了500倍。在一些实施方式中,与未经治疗的患者和/或通过使用除本文所述那些之外的方法(包括例如除图85(特别是例如图85B)中所示那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加了1000倍。

[1559] 2、共同施用方法

[1560] 在一些实施方式中,如本文所述产生的TIL,包括例如源自图85(特别是例如图85B)的步骤A至F中所述方法的TIL,可与一种以上免疫检查点调节剂组合施用,例如下文描述的抗体。例如,靶向PD-1并且可与本发明的TIL共同施用的抗体包括例如但不限于nivolumab(BMS-936558,Bristol-Myers Squibb;Opdivo®),pembrolizumab

(lambrolizumab,MK03475或MK-3475,Merck;Keytruda®),人源化抗PD-1抗体JS001(ShangHai JunShi),单克隆抗PD-1抗体TSR-042(Tesaro,Inc.),Pidilizumab(抗PD-1mAb CT-011,Medivation),抗PD-1单克隆抗体BGB-A317(BeiGene)和/或抗PD-1抗体SHR-1210(ShangHai HengRui),人单克隆抗体REGN2810(Regeneron),人单克隆抗体MDX-1106(Bristol-Myers Squibb),和/或人源化抗PD-1IgG4抗体PDR001(Novartis)。在一些实施方案中,PD-1抗体来自克隆:RMP1-14(大鼠IgG)-BioXcell目录号BP0146。适用于根据本文所述步骤A至F产生的TIL的共同施用方法的其它合适的抗体是美国专利号8,008,449中公开的抗PD-1抗体,其通过引用并入本文。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分特异性结合PD-L1并抑制其与PD-1的相互作用,从而增加免疫活性。任何本领域已知的与PD-L1结合并破坏PD-1和PD-L1之间相互作用并刺激抗肿瘤免疫应答的抗体,均适合用于根据本文所述步骤A至F产生的TIL的共同施用方法。例如,靶向PD-L1并且处于临床试验中的抗体包括BMS-936559(Bristol-Myers Squibb)和MPDL3280A(Genentech)。靶向PD-L1的其他合适的抗体公开于美国专利号7,943,743中,其通过引用并入本文。本领域普通技术人员将理解,任何与PD-1或PD-L1结合、破坏PD-1/PD-L1相互作用并刺激抗肿瘤免疫反应的抗体,均适合用于根据本文所述步骤A至F产生的TIL的共同施用方法。在一些实施方案中,当患者患有仅接受抗PD-1抗体难以治疗的癌症类型时,施用根据步骤A至F产生的TIL组合的受试者被共同施用抗PD-1抗体。在一些实施方案中,当患者患有重构黑色素瘤(refactory melanoma)时,给患者施用TIL与抗PD-1组合。在一些实施方案中,当患者患有非小细胞肺癌(NSCLC)时,给患者施用TIL与抗PD-1组合。

[1561] 3、可选的患者淋巴细胞耗竭预处理

[1562] 在一个实施方式中,本发明包括用TIL群治疗癌症的方法,其中,根据本公开,在输注TIL之前用非清髓性化学疗法对患者进行预处理。在一个实施方式中,本发明包括用TIL群患者的癌症,该患者已用非清髓性化学疗法预先治疗。在一个实施方式中,TIL群通过输注施用。在一个实施方式中,非清髓性化疗是环磷酰胺60mg/kg/天,持续2天(在TIL输注前的第27天和第26天)和氟达拉滨25mg/m^2/天,持续5天(在TIL输注前的第27至23天)。在一个实施方式中,在根据本公开内容的非清髓性化疗和TIL输注之后(第0天),患者每8小时以720,000IU/kg静脉内接受静脉内输注IL-2(阿地白介素,可作为PROLEUKIN商购)至生理耐受性。在某些实施方式中,TIL群与IL-2组合用于治疗癌症,其中,IL-2在TIL群之后施用。

[1563] 实验结果表明,过继转移肿瘤特异性T淋巴细胞之前的淋巴细胞耗竭通过消除调节性T细胞和免疫系统的竞争元件(“细胞因子沉降”)而在提高治疗功效中起关键作用。因此,本发明的一些实施方式在引入本发明的TIL之前对患者使用淋巴细胞耗竭步骤(有时也称为“免疫抑制调节”)。

[1564] 通常,采用施用氟达拉滨或环磷酰胺(活性形式称为马磷酰胺)及它们的组合来实现淋巴细胞耗竭。此种方法描述于Gassner等,Cancer I mmunol I mmunother.2011,60,75-85;Muranski等,Nat.Clin.Pract.Oncol.,2006,3,668-681、Dudley等;J.Clin.Oncol.2008,26,5233-5239和Dudley等,J.Clin.Oncol.2005,23,2346-2357,所有这些文献都通过引用整体并入本文。

[1565] 在一些实施方式中,氟达拉滨以0.5μg/mL至10μg/mL氟达拉滨的浓度施用。在一些实施方式中,氟达拉滨以1μg/mL氟达拉滨的浓度施用。在一些实施方式中,氟达拉滨治疗施

用1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天或更长时间。在一些实施方式中,氟达拉滨以10mg/kg/天、15mg/kg/天、20mg/kg/天、25mg/kg/天、30mg/kg/天、35mg/kg/天、40mg/kg/天或45mg/kg/天的剂量施用。在一些实施方式中,氟达拉滨治疗以35mg/kg/天施用2至7天。在一些实施方式中,氟达拉滨治疗以35mg/kg/天施用4至5天。在一些实施方式中,氟达拉滨治疗以25mg/kg/天施用4至5天。

[1566] 在一些实施方式中,通过施用环磷酰胺获得0.5μg/mL至10μg/mL浓度的马磷酰胺(环磷酰胺的活性形式)。在一些实施方式中,通过施用环磷酰胺获得1μg/mL浓度的马磷酰胺(活性形式的环磷酰胺)。在一些实施方式中,环磷酰胺治疗施用1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天或更长时间。在一些实施方式中,环磷酰胺以100mg/m^2/天、150mg/m^2/天、175mg/m^2/天、200mg/m^2/天、225mg/m^2/天、250mg/m^2/天、275mg/m^2/天或300mg/m^2/天的剂量施用。在一些实施方式中,静脉(即i.v.)施用环磷酰胺。在一些实施方式中,环磷酰胺治疗以35mg/kg/天施用2至7天。在一些实施方式中,环磷酰胺治疗以250mg/m^2/天静脉施用4至5天。在一些实施方式中,环磷酰胺治疗以250mg/m^2/天静脉施用4天。

[1567] 在一些实施方式中,通过将氟达拉滨和环磷酰胺一起施用于患者来进行淋巴细胞耗竭。在一些实施方式中,氟达拉滨以25mg/m^2/天静脉施用且环磷酰胺以250mg/m^2/天静脉施用4天。

[1568] 在一个实施方式中,通过以60mg/m^2/天的剂量施用环磷酰胺持续2天,然后以25mg/m^2/天的剂量施用氟达拉滨持续5天,来进行淋巴细胞耗竭。

[1569] 4、IL-2方案

[1570] 在一个实施方式中,IL-2方案包括高剂量IL-2方案,其中,高剂量IL-2方案包括阿地白素或其生物类似物或变体,其从施用治疗性TIL群的治疗有效份后的第二天开始静脉内施用,其中,每8小时以15分钟静脉推注方式施用0.037mg/kg或0.044mg/kg(患者体重)剂量的阿地白介素或其生物类似物或变体,直至耐受,最多14剂。休息9天后,可以重复这一时间表再使用14剂,总共最多28剂。

[1571] 在一个实施方式中,IL-2方案包括递减型IL-2方案。递减型IL-2方案描述于0'Day等,J.Clin.Oncol.1999,17,2752-61和Eton等,Cancer 2000,88,1703-9,其公开内容通过引用并入本文。在一个实施方式中,递减型IL-2方案包括在6小时内静脉内施用18×10^6IU/m^2,随后在12小时内静脉内施用18×10^6IU/m^2,然后在24小时内静脉内施用18×10^6IU/m^2,然后在72小时内静脉注射4.5×10^6IU/m^2。该治疗周期可以每28天重复一次,最多四个周期。在一个实施方式中,递减IL-2方案在第1天包含18,000,000IU/m^2、在第2天包含9,000,000IU/m^2、在第3和第4天包含4,500,000IU/m^2。

[1572] 在一个实施方式中,IL-2方案包括每1、2、4、6、7、14或21天以0.10mg/天至50mg/天的剂量施用聚乙二醇化IL-2。

[1573] 5、过继性细胞转移

[1574] 过继细胞转移(ACT)是一种有效的免疫治疗形式,涉及将具有抗肿瘤活性的免疫细胞转移到癌症患者体内。ACT是一种治疗方法,涉及体外识别具有抗肿瘤活性的淋巴细胞,将这些细胞大量体外扩增,以及将其注入患癌宿主中。用于过继转移的淋巴细胞可以来自切除肿瘤的基质(肿瘤浸润淋巴细胞或TIL)。可如本文所述制备用于ACT的TIL。在一些实施方式中,例如根据图85(特别是例如图85B)中所述的方法来制备TIL。如果它们经基因工

程改造以表达抗肿瘤T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR),富含混合淋巴细胞肿瘤细胞培养物(MLTC),或使用自体抗原呈递细胞和肿瘤衍生肽克隆,则它们也可来源或来自血液。其中淋巴细胞来源于待输注的患癌宿主的ACT称为自体ACT。美国公开号2011/0052530涉及用于实施过继细胞疗法以促进癌症消退的方法,主要用于治疗患有转移性黑色素瘤的患者,其通过引用整体并入这些方法。在一些实施方式中,可如本文所述施用TIL。在一些实施方式中,TIL可以单剂量施用。这样的施用可通过注射,例如静脉内注射。在一些实施方式中,可以以多剂量施用TIL和/或细胞毒性淋巴细胞。施用可每年一次、两次、三次、四次、五次、六次或六次以上。施用可为每月一次、每两周一次、每周一次或隔天一次。视需要,可继续施用TIL和/或细胞毒性淋巴细胞。

[1575] 6、其他治疗方法

[1576] 在另一个实施方式中,本发明提供了治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效剂量的如上适用的前述任一段中所述的治疗性TIL群。

[1577] 在另一个实施方式中,本发明提供了治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效剂量的如上适用的前述任一段中所述的TIL组合物。

[1578] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段中所述的治疗患有癌症的受试者的方法,对其进行了修改,使得在分别施用如上适用的前述任一段落中所述的治疗有效剂量的治疗性TIL群和TIL组合物之前,已经对受试者进行了非清髓性淋巴细胞耗竭方案。

[1579] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗患有癌症的受试者的方法,对其进行了修改,使得非清髓性淋巴细胞耗竭方案包括以60mg/d^2/天的剂量施用环磷酰胺持续两天然后以25mg/m^2/天的剂量施用氟达拉滨持续五天的步骤。

[1580] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗患有癌症的受试者的方法,对其进行了修改以进一步包括在向受试者施用TIL细胞后的第二天用高剂量IL-2方案治疗受试者的步骤。

[1581] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗患有癌症的受试者的方法,对其进行了修改以使高剂量IL-2方案包括每8小时以15分钟静脉推注方式施用600,000或720,000IU/kg,直至耐受。

[1582] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗患有癌症的受试者的方法,对其进行了修改使得癌症是实体瘤。

[1583] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗患有癌症的受试者的方法,对其进行了修改使得癌症为黑色素瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、人乳头状瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包括头颈鳞状细胞癌(HNSCC))、胶质母细胞瘤(包括GBM)、胃肠道癌、肾癌或肾脏上皮肾细胞癌。

[1584] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗患有癌症的受试者的方法,对其进行了修改使得癌症是黑色素瘤、HNSCC、宫颈癌、NSCLC、胶质母细胞瘤(包括GBM)和胃肠道癌。

[1585] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗患有癌症的受试者的方法,对其进行了修改使得所述癌症是黑色素瘤。

[1586] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗患有

癌症的受试者的方法,对其进行了修改使得所述癌症为HNSCC。

[1587] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗患有癌症的受试者的方法,对其进行了修改使得所述癌症是宫颈癌。

[1588] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗患有癌症的受试者的方法,对其进行了修改使得所述癌症为NSCLC。

[1589] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗患有癌症的受试者的方法,对其进行了修改使得所述癌症是胶质母细胞瘤(包括GBM)。

[1590] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗患有癌症的受试者的方法,对其进行了修改使得该癌症是胃肠道癌症。

[1591] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗患有癌症的受试者的方法,对其进行了修改使得所述癌症是超突变的癌症。

[1592] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗患有癌症的受试者的方法,对其进行了修改使得该癌症为小儿高突变癌症。

[1593] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群,该治疗性TIL群用于治疗患有癌症的受试者的方法中,该方法包括向受试者施用治疗有效剂量的治疗性TIL群。

[1594] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的TIL组合物,该TIL组合物用于治疗患有癌症的受试者的方法中,该方法包括向受试者施用治疗有效剂量的TIL组合物。

[1595] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群或如上适用的前述任一段落中所述的TIL组合物,对其进行了修改使得在向受试者施用治疗有效量的如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群或如上适用的前述任一段落中所述的TIL组合物之前,已对受试者施用非清髓性淋巴细胞耗竭方案。

[1596] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群或TIL组合物,对其进行了修改使得非清髓性淋巴细胞耗竭方案包括以60mg/d^2/天剂量施用环磷酰胺持续两天、然后以25mg/m^2/天的剂量施用氟达拉滨持续五天的步骤。

[1597] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群或TIL组合物,对其进行了修改以进一步包括如下步骤:从给患者施用TIL细胞后的第二天开始用高剂量IL-2方案治疗患者。

[1598] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群或TIL组合物,对其进行了修改使得高剂量IL-2方案包括每8小时以15分钟静脉推注方式施用600,000或720,000IU/kg,直至耐受。

[1599] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群或TIL组合物,对其进行了修改使得癌症是实体瘤。

[1600] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群或TIL组合物,对其进行了修改使得癌症为黑色素瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、人乳头状瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包括头颈鳞状细胞癌(HNSCC))、胶质母细胞瘤(包括GBM)、胃肠道癌、肾癌或肾脏上皮肾细胞癌。

[1601] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性

TIL群或TIL组合物,对其进行了修改使得癌症为黑色素瘤、HNSCC、宫颈癌、NSCLC、胶质母细胞瘤(包括GBM)和胃肠道癌。

[1602] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群或TIL组合物,对其进行了修改使得癌症为黑色素瘤。

[1603] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群或TIL组合物,对其进行了修改使得癌症为HNSCC。

[1604] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群或TIL组合物,对其进行了修改使得癌症是宫颈癌。

[1605] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群或TIL组合物,对其进行了修改使得癌症为NSCLC。

[1606] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群或TIL组合物,对其进行了修改使得癌症是胶质母细胞瘤(包括GBM)。

[1607] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群或TIL组合物,对其进行了修改使得癌症是胃肠道癌症。

[1608] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群或TIL组合物,对其进行了修改使得癌症是超突变的癌症。

[1609] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群或TIL组合物,对其进行了修改使得癌症是小儿超突变癌症。

[1610] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群在治疗受试者的癌症的方法中的用途,包括向受试者施用治疗有效剂量的治疗性TIL群。

[1611] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的TIL组合物在治疗受试者的癌症的方法中的用途,包括向受试者施用治疗有效剂量的TIL组合物。

[1612] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群或TIL组合物在治疗受试者癌症中的用途,包括向受试者施用非清髓性淋巴细胞耗竭方案,然后向受试者施用治疗有效剂量的如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群或TIL组合物。

[1613] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群或TIL组合物的用途,对其进行了修改使得非清髓性淋巴细胞耗竭方案包括以60mg/m^2/天的剂量施用环磷酰胺持续2天、然后以25mg/m^2/天的剂量施用氟达拉滨5天的步骤。

[1614] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的前述任一段落中所述的治疗性TIL群的用途或如上适用的前述任一段落中所述的TIL组合物的用途,对其进行了修改以进一步包括如下步骤:在给患者施用TIL细胞后的第二天开始使用高剂量IL-2方案治疗患者。

[1615] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的上述段落中任一项所述的治疗性TIL群或TIL组合物的用途,对其进行了修改使得高剂量IL-2方案包括每8小时以15分钟静脉推注方式施用600,000或720,000IU/kg,直至耐受。

[1616] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的上述段落中任一项所述的治疗性TIL群或TIL组合物的用途,对其进行了修改使得癌症为实体瘤。

[1617] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的上述段落中任一项所述的治疗性

TIL群或TIL组合物的用途,对其进行了修改使得癌症为黑色素瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、人乳头状瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包括头颈鳞状细胞癌(HNSCC))、胶质母细胞瘤(包括GBM)、胃肠道癌、肾癌或肾脏上皮肾细胞癌。

[1618] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的上述段落中任一项所述的治疗性TIL群或TIL组合物的用途,对其进行了修改使得癌症为黑色素瘤、HNSCC、宫颈癌、NSCLC、胶质母细胞瘤(包括GBM))和胃肠道癌。

[1619] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的上述段落中任一项所述的治疗性TIL群或TIL组合物的用途,对其进行了修改使得癌症为黑色素瘤。

[1620] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的上述段落中任一项所述的治疗性TIL群或TIL组合物的用途,对其进行了修改使得癌症为HNSCC。

[1621] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的上述段落中任一项所述的治疗性TIL群或TIL组合物的用途,对其进行了修改使得癌症是宫颈癌。

[1622] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的上述段落中任一项所述的治疗性TIL群或TIL组合物的用途,对其进行了修改使得癌症为NSCLC。

[1623] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的上述段落中任一项所述的治疗性TIL群或TIL组合物的用途,对其进行了修改使得癌症是胶质母细胞瘤(包括GBM)。

[1624] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的上述段落中任一项所述的治疗性TIL群或TIL组合物的用途,对其进行了修改使得癌症为胃肠道癌症。

[1625] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的上述段落中任一项所述的治疗性TIL群或TIL组合物的用途,对其进行了修改使得癌症是超突变的癌症。

[1626] 在另一个实施方式中,本发明提供了如上适用的上述段落中任一项所述的治疗性TIL群或TIL组合物的用途,对其进行了修改使得癌症是小儿超突变癌症。

[1627] 7、示例性治疗实施方式

[1628] 在一些实施方式中,本公开提供了用肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群治疗癌症的方法,其包括以下步骤:(a)由获自患者的肿瘤碎片或核心物获得第一TIL群;(b)在第一细胞培养基中进行第一TIL群的初始扩增,获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量大至少5倍;其中,第一细胞培养基包含IL-2;(c)使用第二细胞培养基中的髓样人工抗原呈递细胞(髓样aAPC)群快速扩增第二TIL群,获得第三TIL群;其中,从快速扩增开始7天后,第三TIL群的数量比第二TIL群的数量大至少50倍;其中,第二细胞培养基包含IL-2和OKT-3;(d)给癌症患者施用第三TIL群的治疗有效部分。在一些实施方式中,在第二细胞培养基中,IL-2以约3000IU/mL的初始浓度存在,OKT-3抗体以约30ng/mL的初始浓度存在。在一些实施方式中,第一次扩增进行不超过14天的时间。在一些实施方式中,使用透气性容器进行第一次扩增。在一些实施方式中,使用透气性容器进行第二次扩增。在一些实施方式中,在快速扩增中,第二TIL群与aAPC群的比率为1:80至1:400。在一些实施方式中,在快速扩增中,第二TIL群与aAPC群的比率为约1:300。在一些实施方式中,治疗的癌症选自黑色素瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、由人乳头状瘤病毒引起的癌症、头颈癌、肾癌和肾脏上皮肾细胞癌。在一些实施方式中,治疗的癌症选自黑色素瘤、卵巢癌和宫颈癌。在一些实施方式中,治疗的癌症是黑色素瘤。在一些实施方式中,治疗的癌症是卵巢癌。在一些实施方式中,治疗的癌症是宫颈癌。在一些实施方式中,治疗癌症的方法

还包括在给患者施用第三TIL群之前用非清髓性淋巴细胞耗竭方案治疗患者的步骤。在一些实施方式中,非清髓性淋巴细胞耗竭方案包括以下步骤:以60mg/m^2/天的剂量施用环磷酰胺持续两天,然后以25mg/m^2/天的剂量施用氟达拉滨持续五天。在一些实施方式中,高剂量IL-2方案包括每8小时以15分钟静脉推注方式施用600,000或720,000IU/kg阿地白介素或其生物类似物或变体,直至耐受。

[1629] 在一些实施方式中,本公开提供了治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括施用扩增的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),该方法包括:(i)由获自患者肿瘤的细针抽吸物(FNA)或小活检物获得第一TIL群;(ii)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养第一TIL群来进行第一次扩增,产生第二TIL群;其中,在第3天向细胞培养基补充OKT-3;其中,第一次扩增进行约3天至约19天以获得第二TIL群;其中,当第一TIL群来自小活检物时,经过约10天至约19天,第二TIL群包括至少5×10^7个TIL;(iii)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第三TIL群的数量比第二TIL群大至少25倍;其中第二次扩增进行约11天至约14天以获得第三TIL群;其中,第三TIL群是治疗性TIL群;以及(iv)给患者施用治疗有效剂量的第三TIL群。在一些实施方式中,在第二细胞培养基中,IL-2以约3000IU/mL的初始浓度存在,而OKT-3抗体以约30ng/mL的初始浓度存在。在一些实施方式中,使用透气性容器进行第一次扩增。在一些实施方式中,使用透气性容器进行第二次扩增。在一些实施方式中,在快速扩增中,第二TIL群与APC群的比率为1:80至1:400。在一些实施方式中,快速扩增中,第二TIL群与APC群的比率为约1:300。在一些实施方式中,APC是PMBC。在一些实施方式中,小活检物从选自胰腺、黑色素瘤、乳腺和卵巢的肿瘤中获得。在一些实施方式中,治疗的癌症选自胰腺癌、黑色素瘤、乳腺癌和卵巢癌。在一些实施方式中,FNA从选自肺、黑色素瘤、头颈、宫颈、卵巢、胰腺、胶质母细胞瘤、结直肠和肉瘤的肿瘤中获得。在一些实施方式中,治疗的癌症选自肺癌、黑色素瘤、头颈癌、宫颈癌、卵巢癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌和肉瘤。在一些实施方式中,治疗癌症的方法还包括在给患者施用第三群的TIL之前,用非清髓性淋巴细胞耗竭方案治疗患者的步骤。在一些实施方式中,非清髓性淋巴细胞耗竭方案包括以下步骤:以60mg/m^2/天的剂量施用环磷酰胺持续两天,然后以25mg/m^2/天的剂量施用氟达拉滨持续五天。在一些实施方式中,高剂量IL-2方案包括每8小时以15分钟静脉推注方式施用600,000或720,000IU/kg阿地白介素或其生物类似物或变体,直至耐受。

[1630] XVII.示例性实施方式

[1631] 1.一种将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增为治疗性TIL群的方法,包括:

[1632] (i)由来自患者肿瘤的细针抽吸物(FNA)或小活检物获得第一TIL群;

[1633] (ii)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养第一TIL群来进行第一次扩增,产生第二TIL群;其中,在第3天向细胞培养基补充OKT-3,其中,第一次扩增进行约3天至约19天以获得第二TIL群;其中,当第一TIL群来自核心活检物时,经过约10天至约19天,第二TIL群包含至少5×10^7个TIL;以及

[1634] (iii)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第三TIL群的数量比第二TIL群大至少25倍;其中第二次扩增进行约11天至约14天以获得第三TIL群;其中,第三TIL群是治疗性TIL群。

[1635] 2.根据权利要求1所述的方法,其中,所述方法还包括以下步骤:

[1636] (iv)通过用另外的IL-2、另外的OKT-3和另外的APC补充所述第三TIL群的细胞培养基进行另外的第二次扩增,其中,所述另外的第二次扩增进行至少14天,获得比步骤(iii)中所得更大的治疗性TIL群,其中,相对于第三TIL群,所述更大的治疗性TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群。

[1637] 3.根据权利要求2所述的方法,其中,在步骤(iii)之后,将细胞从细胞培养物中取出并在步骤(iv)之前冷冻保存在储存培养基中。

[1638] 4.根据权利要求3所述的方法,其中,在进行步骤(iv)之前解冻所述细胞。

[1639] 5.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,重复步骤(iv)一至四次,以在所述治疗性TIL群中获得足够的TIL,用于治疗有效剂量的TIL。

[1640] 6.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约21天至约33天的时间。

[1641] 7.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约21天至约30天的时间。

[1642] 8.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约21天至约28天的时间。

[1643] 9.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约28天的时间。

[1644] 10.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,来自步骤(iii)或(iv)的细胞表达CD4、CD8和TCRαβ的水平与新鲜收获的细胞相似。

[1645] 11.根据权利要求1所述的方法,其中,APC是外周血单核细胞(PBMC)。

[1646] 12.根据权利要求11所述的方法,其中,在步骤(ii)的第3天至19天中的任一天和/或步骤(iii)的第11天至14天中的任一天,将PBMC添加至细胞培养物中。

[1647] 13.根据权利要求2至12所述的方法,其中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,步骤(iv)中治疗性TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

[1648] 14.根据权利要求13所述的方法,其中,所述效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

[1649] 15.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述APC是人工APC(aAPC)或自体APC。

[1650] 16.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,将所述治疗性TIL群注入患者体内。

[1651] 17.根据权利要求1所述的方法,其中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充OKT-3、IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(ii)中的第一次扩增。

[1652] 18.根据权利要求1所述的方法,其中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(iii)中的第二次扩增。

[1653] 19.根据权利要求2所述的方法,其中,通过向第三TIL群的细胞培养基中进一步补充IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(iv)中的另外的第二次扩增。

[1654] 20.根据权利要求1所述的方法,其中,步骤(i)中的FNA包含至少400,000个TIL。

[1655] 21.根据权利要求1所述的方法,其中,所述核心活检物从选自胰腺、黑色素瘤、乳

腺和卵巢的肿瘤中获得。

[1656] 22.根据权利要求1所述的方法,其中,所述FNA从选自肺、黑色素瘤、头颈、宫颈、卵巢、胰腺、胶质母细胞瘤、结直肠和肉瘤的肿瘤中获得。

[1657] 23.根据权利要求22所述的方法,其中,所述肺肿瘤是非小细胞肺癌(NSCLC),可选地,所述患者先前已经历外科治疗。

[1658] 24.根据权利要求1所述的方法,其中,步骤(i)中的TIL获自FNA。

[1659] 25.根据权利要求1所述的方法,其中,使用25-18号针头获得所述FNA。

[1660] 26.根据权利要求1所述的方法,其中,步骤(i)中的TIL获自核心活检物。

[1661] 27.根据权利要求1所述的方法,其中,使用16-11号针头获得所述核心活检物。

[1662] 28.根据权利要求1所述的方法,其中,重复步骤(iii)一至四次,在治疗性TIL群中获得对于TIL的治疗有效剂量来说足够的TIL。

[1663] 29.根据权利要求28所述的方法,其中,对于治疗有效剂量来说足够的TIL的数量为约2.3×10^{10}至约13.7×10^{10}。

[1664] 30.一种将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增为治疗性TIL群的方法,其中,所述方法包括:

[1665] (i)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养来自患者肿瘤的细针抽吸物(FNA)或小活检物的第一TIL群进行第一次扩增,获得第二TIL群;其中,在第3天向细胞培养基中补充OKT-3;其中,第一次扩增进行约3天至约19天以获得第二TIL群;其中,当第一TIL群来自核心活检物时,经过约10天至约19天,第二TIL群包含至少5×10^{7}个TIL;以及

[1666] (ii)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,获得第三TIL群;其中,第三TIL群的数量比第二TIL群大至少25倍;其中,第二次扩增进行约11天至约14天以获得第三TIL群,其中,第三TIL群是治疗性TIL群。

[1667] 31.根据权利要求30所述的方法,其中,所述方法还包括以下步骤:

[1668] (iii)通过用另外的IL-2、另外的OKT-3和另外的APC补充第三TIL群的细胞培养基进行第三TIL群的另外的第二次扩增,其中,所述另外的第二次扩增进行至少14天,获得比步骤(ii)中所得更大的治疗性TIL群,其中,相对于第三TIL群,所述更大的治疗性TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群。

[1669] 32.根据权利要求31的方法,其中,在步骤(iii)之前,将步骤(ii)来自细胞培养基的细胞取出并冷冻保存在储存培养基中。

[1670] 33.根据权利要求32的方法,其中,在步骤(iii)之前解冻所述细胞。

[1671] 34.根据权利要求30至33中任一项所述的方法,其中,所述APC是人工APC(aAPC)或自体APC。

[1672] 35.根据权利要求30至34中任一项所述的方法,其中,将所述治疗性TIL群注入患者体内。

[1673] 36.根据权利要求30所述的方法,其中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充OKT-3、IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(i)中的第一次扩增。

[1674] 37.根据权利要求30所述的方法,其中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(ii)中的第二次扩增。

[1675] 38.根据权利要求30所述的方法,其中,通过向第三TIL群的细胞培养基中进一步补充IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(iii)中的另外的第二次扩增。

[1676] 39.根据权利要求30所述的方法,其中,步骤(i)中的FNA包含至少400,000个TIL。

[1677] 40.根据权利要求30所述的方法,其中,所述核心活检物从选自胰腺、黑色素瘤、乳腺和卵巢的肿瘤中获得。

[1678] 41.根据权利要求30所述的方法,其中,所述FNA从选自肺、黑色素瘤、头颈、宫颈、卵巢、胰腺、胶质母细胞瘤、结直肠和肉瘤的肿瘤中获得。

[1679] 42.根据权利要求41所述的方法,其中,所述肺肿瘤是非小细胞肺癌(NSCLC),可选地,所述患者先前已经历外科治疗。

[1680] 43.根据权利要求30所述的方法,其中,步骤(i)中的TIL获自FNA。

[1681] 44.根据权利要求30所述的方法,其中,使用25-18号针头获得所述FNA。

[1682] 45.根据权利要求30所述的方法,其中,步骤(i)中的TIL获自核心活检物。

[1683] 46.根据权利要求30所述的方法,其中,使用16-11号针头获得所述核心活检物。

[1684] 47.根据权利要求30所述的方法,其中,重复步骤(ii)一至四次,以在治疗性TIL群中获得对于TIL的治疗有效剂量来说足够的TIL。

[1685] 48.根据权利要求47所述的方法,其中,对于治疗有效剂量来说足够的TIL的数量为约2.3×10^{10}至约13.7×10^{10}。

[1686] 49.根据权利要求30至48中任一项所述的方法,其中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

[1687] 50.根据权利要求49所述的方法,其中,所述效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

[1688] 51.一种治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括施用扩增的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),该方法包括:

[1689] (i)由获自患者肿瘤的细针抽吸物(FNA)或核心活检物获得第一TIL群;

[1690] (ii)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养第一TIL群来进行第一次扩增,产生第二TIL群;其中,在第3天向细胞培养基补充OKT-3,其中,第一次扩增进行约3天至约19天以获得第二TIL群;其中,当第一TIL群来自核心活检物时,经过约10天至约19天,第二TIL群包含至少5×10^{7}个TIL;以及

[1691] (iii)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第三TIL群的数量比第二TIL群大至少25倍;其中第二次扩增进行约11天至约14天以获得第三TIL群;其中,第三TIL群是治疗性TIL群;以及

[1692] (iv)给患者施用治疗有效剂量的第三TIL群。

[1693] 52.根据权利要求51所述的方法,其中,所述方法在步骤(iv)之前还包括以下步骤:通过用另外的IL-2、另外的OKT-3和另外的APC补充第三TIL群的细胞培养基进行另外的第二次扩增,其中,所述另外的第二次扩增进行至少14天,获得比步骤(iii)中所得更大的治疗性TIL群,其中,相对于第三TIL群,所述更大的治疗性TIL群包含增加的效应T细胞和/

或中枢记忆T细胞的亚群。

[1694] 53.根据权利要求51所述的方法,其中,在步骤(ii)之后,将细胞从细胞培养基中取出并在权利要求52所述的另外的第二次扩增之前冷冻保存在储存培养基中。

[1695] 54.根据权利要求51所述的方法,其中,在权利要求52所述的另外的第二次扩增之前解冻细胞。

[1696] 55.根据权利要求51所述的方法,其中,重复步骤(iii)一至四次,以在治疗性TIL群中获得对于TIL的治疗有效剂量来说足够的TIL。

[1697] 56.根据权利要求51至55所述的方法,其中,所述APC是人工APC(aAPC)或自体APC。

[1698] 57.根据权利要求51所述的方法,其中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充OKT-3、IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(ii)中的第一次扩增。

[1699] 58.根据权利要求51所述的方法,其中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(iii)中的第二次扩增。

[1700] 59.根据权利要求52所述的方法,其中,通过向第三TIL群的细胞培养基中进一步补充IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行另外的第二次扩增。

[1701] 60.根据权利要求51所述的方法,其中,步骤(i)中的FNA包含至少400,000个TIL。

[1702] 61.根据权利要求51所述的方法,其中,所述FNA从选自肺、黑色素瘤、头颈、宫颈、卵巢、胰腺、胶质母细胞瘤、结直肠和肉瘤的肿瘤中获得。

[1703] 62.根据权利要求61所述的方法,其中,所述肺肿瘤是非小细胞肺癌(NSCLC),可选地,所述受试者先前已经历外科治疗。

[1704] 63.根据权利要求51所述的方法,其中,步骤(i)中的TIL获自FNA。

[1705] 64.根据权利要求51所述的方法,其中,使用25-18号针头获得所述FNA。

[1706] 65.根据权利要求51所述的方法,其中,步骤(i)中的TIL获自核心活检物。

[1707] 66.根据权利要求51所述的方法,其中,使用16-11号针头获得所述核心活检物。

[1708] 67.根据权利要求51所述的方法,其中,重复步骤(iii)一至四次,以在治疗性TIL群中获得对于TIL的治疗有效剂量来说足够的TIL。

[1709] 68.根据权利要求67所述的方法,其中,对于治疗有效剂量来说足够的TIL的数量为约2.3×10^{10}至约13.7×10^{10}。

[1710] 69.根据权利要求51至68中任一项所述的方法,其中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

[1711] 70.根据权利要求69的方法,其中,所述效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

[1712] 71.根据权利要求51至70中任一项所述的方法,其中,所述癌症选自黑色素瘤、宫颈癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、卵巢癌、肉瘤、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌和非小细胞肺癌。

[1713] 72.一种治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括施用扩增的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),该方法包括:

[1714] (i)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养来自患者肿瘤的细针抽吸物(FNA)或小

活检物的第一TIL群进行第一次扩增,获得第二TIL群,其中,在第3天向细胞培养基中补充OKT-3,其中,第一次扩增进行约3天至约19天以获得第二TIL群,其中,当第一TIL群来自核心活检物时,经过约10天至约19天,第二TIL群包含至少5×10^7个TIL;

[1715] (ii)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,获得第三TIL群;其中,第三TIL群的数量比第二TIL群大至少25倍;其中第二次扩增进行约11天至约14天以获得第三TIL群,其中,第三TIL群是治疗性TIL群;以及

[1716] (iii)给患者施用治疗有效剂量的治疗性TIL群。

[1717] 73.根据权利要求72所述的方法,其中,所述方法在步骤(iii)之前还包括以下步骤:通过用另外的IL-2、另外的OKT-3和另外的APC补充所述第三TIL群的细胞培养基进行另外的第二次扩增,其中,所述另外的第二次扩增进行至少14天,获得比步骤(ii)中所得更大的治疗性TIL群,其中,相对于所述第三TIL群,所述更大的治疗性TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群。

[1718] 74.根据权利要求72所述的方法,其中,在权利要求73所述的另外的第二次扩增之前,将细胞从步骤(ii)中的细胞培养基取出并冷冻保存在储存培养基中。

[1719] 75.根据权利要求74所述的方法,其中,在权利要求73所述的另外的第二次扩增之前解冻细胞。

[1720] 76.根据权利要求74的方法,其中,在步骤(iii)之前解冻细胞。

[1721] 77.根据权利要求72至76中任一项所述的方法,其中,所述APC是人工APC(aAPC)或自体APC。

[1722] 78.根据权利要求72至77中任一项所述的方法,其中,所述APC是外周血单核细胞(PBMC)。

[1723] 79.根据权利要求72至78中任一项所述的方法,其中,将所述治疗性TIL群注入患者体内。

[1724] 80.根据权利要求72的方法,其中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充OKT-3、IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(i)中的第一次扩增。

[1725] 81.根据权利要求72的方法,其中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(iii)中的第二次扩增。

[1726] 82.根据权利要求81所述的方法,其中,通过向第三TIL群的细胞培养基中进一步补充IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行另外的第二次扩增。

[1727] 83.根据权利要求72所述的方法,其中,步骤(i)中的FNA包含至少400,000个TIL。

[1728] 84.根据权利要求72所述的方法,其中,所述核心活检物从选自胰腺、黑色素瘤、乳腺和卵巢的肿瘤中获得。

[1729] 85.根据权利要求72所述的方法,其中,所述FNA从选自肺、黑色素瘤、头颈、宫颈、卵巢、胰腺、胶质母细胞瘤、结直肠和肉瘤的肿瘤中获得。

[1730] 86.根据权利要求85所述的方法,其中,所述肺肿瘤是非小细胞肺癌(NSCLC),可选地,所述受试者先前已经历外科治疗。

[1731] 87.根据权利要求72所述的方法,其中,步骤(i)中的TIL获自FNA。

[1732] 88.根据权利要求72所述的方法,其中,使用25-18号针头获得所述FNA。

[1733] 89.根据权利要求72所述的方法,其中,步骤(i)中的TIL获自核心活检物。

[1734] 90.根据权利要求72所述的方法,其中,使用16-11号针头获得所述核心活检物。

[1735] 91.根据权利要求72所述的方法,其中,重复步骤(ii)一至四次,以在治疗性TIL群中获得对于TIL的治疗有效剂量来说足够的TIL。

[1736] 92.根据权利要求91所述的方法,其中,对于治疗有效剂量来说足够的TIL的数量为约2.3×10^{10}至约13.7×10^{10}。

[1737] 93.根据权利要求72至92中任一项所述的方法,其中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

[1738] 94.根据权利要求93所述的方法,其中,所述效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

[1739] 95.一种将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增为治疗性TIL群的方法,其中,所述方法包括:

[1740] (a)由获自患者肿瘤的细针抽吸物(FNA)或核心活检物获得第一TIL群;

[1741] (b)将第一群加到封闭系统中;

[1742] (c)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养第一TIL群来进行第一次扩增,产生第二TIL群;其中,在第3天向细胞培养基补充OKT-3,其中,第一次扩增进行约3天至约19天以获得第二TIL群;其中,当第一TIL群来自核心活检物时,经过约10天至约19天,第二TIL群包含至少5×10^{7}个TIL;其中,在提供第一透气表面区域的封闭容器中进行第一次扩增,其中,第一次扩增进行约3至14天以获得第二TIL群,其中,第二TIL群的数量比第一TIL群大至少25倍,其中步骤(b)向步骤(c)的过渡在不打开系统的情况下发生;

[1743] (d)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约11天至约14天以获得第三TIL群;其中,第三TIL群是治疗性TIL群,相对于第二TIL群,所述治疗性TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面区域的封闭容器中进行,其中步骤(c)向步骤(d)的过渡在不打开系统的情况下发生;

[1744] (e)收获由步骤(d)获得的治疗性TIL群,其中,步骤(d)向步骤(e)的过渡在不打开系统的情况下发生;以及

[1745] (f)将步骤(e)收获的TIL群转移至输液袋,其中,步骤(e)向步骤(f)的过渡在不打开系统的情况下发生。

[1746] 96.根据权利要求95所述的方法,其中,所述方法还包括以下步骤:使用冷冻保存方法冷冻保存步骤(f)中包含收获的TIL群的输液袋。

[1747] 97.根据权利要求96所述的方法,其中,使用1:1比率的收获的TIL群与CS10培养基进行冷冻保存方法。

[1748] 98.根据权利要求96的方法,其中,所述抗原呈递细胞是外周血单核细胞(PBMC)。

[1749] 99.根据权利要求98的方法,其中,所述PBMC是经辐照且同种异体的。

[1750] 100.根据权利要求98所述的方法,其中,在步骤(c)的第3天至19天中的任一天和/或步骤(d)的第11天至14天中的任一天,将PBMC添加至细胞培养物中。

[1751] 101.根据权利要求95所述的方法,其中,所述抗原呈递细胞是人工抗原呈递细胞

(aAPC)或自体APC。

[1752] 102.根据权利要求95至101中任一项所述的方法,其中,将治疗性TIL群注入患者体内。

[1753] 103.根据权利要求95所述的方法,其中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充OKT-3、IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(c)中的第一次扩增。

[1754] 104.根据权利要求95所述的方法,其中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(d)中的第二次扩增。

[1755] 105.根据权利要求95所述的方法,其中,步骤(a)中的所述FNA包括至少400,000个TIL。

[1756] 106.根据权利要求95所述的方法,其中,所述核心活检物从选自胰腺、黑色素瘤、乳腺和卵巢的肿瘤中获得。

[1757] 107.根据权利要求95所述的方法,其中,所述FNA从选自肺、黑色素瘤、头颈、宫颈、卵巢、胰腺、胶质母细胞瘤、结直肠和肉瘤的肿瘤中获得。

[1758] 108.根据权利要求107所述的方法,其中,所述肺肿瘤是非小细胞肺癌(NSCLC),可选地,所述受试者先前已经历外科治疗。

[1759] 109.根据权利要求95所述的方法,其中,步骤(a)中的TIL获自FNA。

[1760] 110.根据权利要求95所述的方法,其中,使用25-18号针头获得所述FNA。

[1761] 111.根据权利要求95所述的方法,其中,步骤(a)中的TIL获自核心活检物。

[1762] 112.根据权利要求95所述的方法,其中,使用16-11号针头获得所述核心活检物。

[1763] 113.根据权利要求95所述的方法,其中,步骤(e)中的收获使用LOVO细胞处理系统来进行。

[1764] 114.根据权利要求95所述的方法,其中,所述细胞培养基装在选自G容器和Xuri细胞袋的容器中提供。

[1765] 115.根据权利要求95所述的方法,其中,步骤(f)中的输液袋是HypoThermosol输液袋。

[1766] 116.根据权利要求95所述的方法,其中,步骤(a)至(f)进行约21天至约33天的时间。

[1767] 117.根据权利要求95所述的方法,其中,步骤(a)至(f)进行约21天至约30天的时间。

[1768] 118.根据权利要求95所述的方法,其中,步骤(a)至(f)进行约21天至约28天的时间。

[1769] 119.根据权利要求95所述的方法,其中,步骤(a)至(f)进行22天以下。

[1770] 120.根据权利要求96的方法,其中,步骤(a)至(f)和冷冻保存进行22天以下。

[1771] 121.根据权利要求95至120中任一项所述的方法,其中,步骤(e)中收获的治疗性TIL群包含对于TIL的治疗有效剂量来说足够的TIL。

[1772] 122.根据权利要求121所述的方法,其中,对于治疗有效剂量来说足够的TIL的数量为约2.3×10^{10}至约13.7×10^{10}。

[1773] 123.根据权利要求95至122中任一项所述的方法,其中,步骤(b)至(e)在单个容器

中进行;其中,与在超过一个的容器中进行步骤(b)至(e)相比,在单个容器中进行步骤(b)至(e)使得每个切除肿瘤的TIL产量增加。

[1774] 124.根据权利要求95至123中任一项所述的方法,其中,在步骤(d)的第二阶段期间,在不打开系统的情况下将抗原呈递细胞添加到TIL中。

[1775] 125.根据权利要求95至124中任一项所述的方法,其中,相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,所述治疗性TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27+表达、CD28+表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

[1776] 126.根据权利要求95至125中任一项所述的方法,其中,相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,获自第三TIL群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

[1777] 127.根据权利要求95至126中任一项所述的方法,其中,与开放系统相比,降低了微生物污染的风险。

[1778] 128.根据权利要求95至128中任一项所述的方法,其中,将来自步骤(g)的TIL注入患者体内。

[1779] 129.一种治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括施用扩增的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),所述方法包括以下步骤:

[1780] (a)由从受试者切除的肿瘤的细针抽吸物(FNA)或核心活检物获得第一TIL群;

[1781] (b)将第一群加到封闭系统中;

[1782] (c)通过在包含IL-2的细胞培养基中培养第一TIL群来进行第一次扩增,产生第二TIL群;其中,在第3天向细胞培养基补充OKT-3,其中,第一次扩增进行约3天至约19天以获得第二TIL群;其中,当第一TIL群来自核心活检物时,经过约10天至约19天,第二TIL群包含至少5×10^{7}个TIL;其中,所述第一次扩增在提供第一透气表面区域的封闭容器中进行,其中,所述第一次扩增进行约3至14天以获得第二TIL群,其中,所述第二TIL群的数量比第一TIL群大至少25倍,其中步骤(b)向步骤(c)的过渡在不打开系统的情况下发生;

[1783] (d)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7-14天以获得第三TIL群;其中,第三TIL群是治疗性TIL群;相对于第二TIL群,所述治疗性TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群,其中,第二次扩增在提供第二透气表面区域的封闭容器中进行,其中步骤(c)向步骤(d)的过渡在不打开系统的情况下发生;

[1784] (e)收获由步骤(d)获得的治疗性TIL群,其中,步骤(d)向步骤(e)的过渡在不打开系统的情况下发生;以及

[1785] (f)从步骤(e)将收获的TIL群转移至输液袋,其中,步骤(e)向步骤(f)的过渡在不打开系统的情况下发生;

[1786] (g)可选地,使用冷冻保存方法冷冻保存来自步骤(f)的包含收获的TIL群的输液袋;以及

[1787] (h)给患者施用治疗有效剂量的第三TIL群,该第三TIL群来自步骤(g)的输液袋。

[1788] 130.根据权利要求129所述的方法,其中,步骤(e)中收获的治疗性TIL群包含足够的TIL,用于在步骤(h)中施用治疗有效剂量的TIL。

[1789] 131.根据权利要求129或130所述的方法,其中,所述APC是人工APC(aAPC)或自体APC。

[1790] 132.根据权利要求129至131中任一项所述的方法,其中,将所述治疗性TIL群注入患者体内。

[1791] 133.根据权利要求129所述的方法,其中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充OKT-3、IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(c)中的第一次扩增。

[1792] 134.根据权利要求129所述的方法,其中,通过向第二TIL群的细胞培养基中进一步补充OKT-3、IL-15、OX40激动性抗体和/或4-1BB激动性抗体来进行步骤(d)中的第二次扩增。

[1793] 135.根据权利要求129所述的方法,其中,步骤(a)中的FNA包含至少400,000个TIL。

[1794] 136.根据权利要求129所述的方法,其中,所述核心活检物从选自胰腺、黑色素瘤、乳腺和卵巢的肿瘤中获得。

[1795] 137.根据权利要求129所述的方法,其中,所述FNA从选自肺、黑色素瘤、头颈、宫颈、卵巢、胰腺、胶质母细胞瘤、结直肠和肉瘤的肿瘤中获得。

[1796] 138.根据权利要求137所述的方法,其中,所述肺肿瘤是非小细胞肺癌(NSCLC),可选地,所述受试者先前已经历外科治疗。

[1797] 139.根据权利要求129所述的方法,其中,步骤(i)中的TIL获自FNA。

[1798] 140.根据权利要求139所述的方法,其中,使用25-18号针头获得所述FNA。

[1799] 141.根据权利要求129所述的方法,其中,步骤(i)中的TIL获自核心活检物。

[1800] 142.根据权利要求141所述的方法,其中,使用16-11号针头获得所述核心活检物。

[1801] 143.根据权利要求129所述的方法,其中,足够用于在步骤(h)中施用治疗有效剂量的TIL的数量为约2.3×10^{10}至约13.7×10^{10}。

[1802] 144.根据权利要求129所述的方法,其中,所述抗原呈递细胞(APC)是PBMC。

[1803] 145.根据权利要求144所述的方法,其中,在步骤(c)的第3天至19天中的任一天和/或步骤(d)的第9至14天中的任一天,将PBMC加入细胞培养物中。

[1804] 146.根据权利要求129至145中任一项所述的方法,其中,在步骤(h)中施用治疗有效剂量的TIL细胞之前,已给所述患者施用非清髓性淋巴细胞耗竭方案。

[1805] 147.根据权利要求146所述的方法,其中,所述非清髓性淋巴细胞耗竭方案包括以下步骤:以60mg/m^2/天的剂量施用环磷酰胺持续两天,然后以25mg/m^2的剂量施用氟达拉滨持续五天。

[1806] 148.根据权利要求129至147中任一项所述的方法,其中,所述方法还包括如下步骤:在步骤(h)中给患者施用TIL细胞后的第二天开始用高剂量IL-2方案治疗患者。

[1807] 149.根据权利要求148所述的方法,其中,高剂量IL-2方案包括每8小时以15分钟静脉推注方式施用600,000或720,000IU/kg,直至耐受。

[1808] 150.根据权利要求129至149中任一项所述的方法,其中,相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,所述治疗性TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:治疗性TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出

选自下组的一种以上特征:CD27+表达、CD28+表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

[1809] 151.根据权利要求129至150中任一项所述的方法,其中,相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,所述治疗性TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

[1810] 152.一种将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增为治疗性TIL群的方法,所述方法包括:

[1811] (a)由来自患者肿瘤的细针抽吸物(FNA)、小活检物或核心活检物获得第一TIL群;

[1812] (b)通过在包含IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基中培养第一TIL群来进行启动第一次扩增,产生第二TIL群;其中,所述启动第一次扩增在具有第一透气表面区域的容器中进行约1至7天的第一阶段,以获得第二TIL群,其中,第二TIL群的数量大于第一TIL群;

[1813] (c)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、OKT-3和APC进行快速第二次扩增,产生第三TIL群;其中,快速第二次扩增进行约1至约11天的第二阶段以获得第三TIL群;其中,第三TIL群是治疗性TIL群;以及

[1814] (d)收获步骤(c)的治疗性TIL群。

[1815] 实施例

[1816] 现在参考以下实施例描述本文包括的实施方式。提供这些实施例仅用于说明的目的,并且本文包括的公开内容决不应被解释为限于这些实施例,而是应该被解释为包括根据本文提供的教导而变得显而易见的任何和所有变化。

[1817] 实施例1:制备用于PREP和REP过程的培养基

[1818] 本实施例描述了制备组织培养基的程序,该组织培养基用于涉及培养源自多种肿瘤类型的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的方案,所述肿瘤类型包括但不限于转移性黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、卵巢癌、三阴性乳腺癌和肺腺癌。此培养基可用于制备本申请和实施例中描述的任何TIL。

[1819] CM1的制备

[1820] 从冷藏中取出以下试剂,并在37℃水浴中加热它们:(RPMI1640,人AB血清,200mM L-谷氨酰胺)。通过将每种成分添加到适合于要过滤的体积的0.2μm过滤器单元的顶部,根据下表32制备CM1培养基。储存于4℃。

[1821] 表32:CM1的制备

[1822]

成分	最终浓度	最终体积500mL	最终体积1L
RPMI1640	NA	450mL	900mL
人AB血清,热灭活10%	50mL	100mL	
200mM L-谷氨酰胺	2mM	5mL	10mL
55mM BME	55μM	0.5mL	1mL
50mg/mL硫酸庆大霉素	50μg/mL	0.5mL	1mL

[1823] 在使用当天,在37℃水浴中预热所需量的CM1,添加6000IU/mL IL-2。

[1824] 其他补充剂-视需要根据表33。

[1825] 表33:CM1的其他补充剂(视需要)

[1826]

补充剂	储备液浓度	稀释	最终浓度
GlutaMAX™	200mM	1：100	2mM
青霉素/链霉素	10,000 U/mL 青霉素 10,000 μg/mL 链霉素	1：100	100 U/mL 青霉素 100 μg/mL 链霉素
两性霉素 B	250 μg/mL	1：100	2.5 μg/mL

[1827] CM2的制备

[1828] 按照上述第7.3节的要求,从冰箱中取出制备好的CM1或制备新鲜CM1。从冰箱中取出AIM-V®,通过在无菌培养基瓶中混合制备的CM1和等体积的AIM-V®来制备所需量的CM2。使用当天在CM2培养基中添加3000IU/mL IL-2。在使用当天,用3000IU/mL IL-2制成足够量的CM2。在CM2培养基瓶上贴上名称、制备者的姓名缩写、过滤/制备的日期、两周的有效期,在4℃下储存,直至组织培养需要为止。

[1829] CM3的制备

[1830] 在需要使用当天制备CM3。CM3与AIM-V®培养基相同,在使用当天补充3000IU/mL IL-2。通过将IL-2储备溶液直接添加到AIM-V的瓶子或袋子中,制备足以满足实验需要的CM3。轻轻摇匀。加入AIM-V后,立即用“3000IU/mL IL-2”标记瓶子。如果有过量的CM3,请将其储存在4℃的瓶子中,并用培养基名称,制备者的姓名缩写,制备培养基的日期及其有效期(制备后7天)标记。在4℃下储存7天后,丢弃补充有IL-2的培养基。

[1831] CM4的制备

[1832] CM4与CM3相同,另外补充有2mM GlutaMAXTM(最终浓度)。对于每1L的CM3,添加10mL 200mM的GlutaMAX™。通过将IL-2储备液和GlutaMAX™储备液直接添加到AIM-V的瓶子或袋子中,制备足以满足实验需要的CM4。轻轻摇匀。加入AIM-V后,立即用“3000IL/mL IL-2和GlutaMAX”标记瓶子。如果有过量的CM4,将其保存在4℃的瓶子中,用培养基名称“GlutaMAX”及其有效期(制备后7天)标记。在4℃下储存7天后,丢弃补充有IL-2的培养基。

[1833] 实施例2:IL-2、IL-15和IL-21细胞因子混合物的用途

[1834] 本实施例描述了将IL-2、IL-15和IL-21细胞因子与实施例的TIL方法结合使用,所述IL-2、IL-15和IL-21细胞因子用作额外的T细胞生长因子。

[1835] 使用本文所述方法,在一只实验臂中,在IL-2存在的情况下,由结直肠癌、黑色素瘤、宫颈癌、三阴性乳腺癌、肺癌和肾癌肿瘤生长TIL;以及,在另一臂中,在培养开始时用IL-2、IL-15和IL-21的组合代替IL-2。在pre-REP完成时,评估培养物的扩增、表型、功能(CD107a+和IFNγ)和TCR Vβ库(TCR Vβrepertoire)。IL-15和IL-21描述于本文其他地方以及Gruijl等,IL-21promotes the expansion of CD27+CD28+tumor infiltrating lymphocytes with high cytotoxic potential and low collateral expansion of regulatory T cells(IL-21促进CD27+CD28+肿瘤浸润淋巴细胞的扩增,其具有高的细胞毒性潜能和低的调节性T细胞侧支扩增),Santegoets,S.J.,J Transl Med.,2013,11:37(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626797/)。

[1836] 结果显示,相对于仅有IL-2的条件,在多种组织学中观察到在IL-2、IL-15和IL-21处理的条件下,CD4+和CD8+细胞中TIL扩增增强(>20%)。相对于仅使用IL-2的培养物,由IL-2、IL-15和IL-21处理的培养物获得的TIL存在着偏向于具有TCR Vβ库偏斜的主要CD8+

群。与仅用IL-2处理的TIL相比,在用IL-2、IL-15和IL-21处理的TIL中IFNγ和CD107a升高。

[1837] 实施例3:经伽马射线辐照的外周单核细胞的合格单个批次

[1838] 本实施例描述了一种新型简化程序,用于使经γ辐射的外周单核细胞(PBMC,也称为MNC)的单个批次合格,以用作本文所述的示例性方法中的同种异体饲养细胞。

[1839] 每个经辐照的MNC饲养细胞批次均由单个供体制备。在纯化的抗CD3(克隆OKT3)抗体和白介素2(IL-2)存在的情况下,针对每个批次或供体在REP中扩增TIL的能力进行单独筛选。另外,在不添加TIL的情况下测试每批饲养细胞,以验证所接收的γ射线剂量足以使它们复制机能不全。

[1840] 背景

[1841] TIL的REP需要经γ辐射的生长停滞的MNC饲养细胞。饲养层MNC上的膜受体与抗CD3(克隆OKT3)抗体结合,并与REP烧瓶中的TIL交联,从而刺激TIL扩增。用取自各个供体的全血的白细胞单采制备饲养细胞批次。在GMP条件下,将白细胞单采产物在Ficoll-Hypaque上进行离心、洗涤、辐照并冷冻保存。

[1842] 重要的是接受TIL治疗的患者不能注入活的饲养细胞,因为这可能导致移植物抗宿主病(GVHD)。因此,通过对细胞进行伽马射线照射而使饲养细胞生长停滞,导致双链DNA断裂,并在再培养时MNC细胞的细胞活力丧失。

[1843] 评价标准和实验设置

[1844] 以两个标准评价饲养批次:1)它们在共培养中使TIL扩增>100倍的能力,以及2)它们的复制机能不全。

[1845] 使用在直立的T25组织培养瓶中生长的两个原代pre-REP TIL系以mini-REP形式测试饲养细胞批次。针对两个不同的TIL系对饲养细胞批次进行测试,因为每个TIL系在响应REP中的活化后均具有增殖能力。作为对照,与测试批次同时运行大量经辐照的MNC饲养细胞(其在过去已被证明符合上述标准)。

[1846] 为确保在单个实验中测试的所有批次都接受同等测试,可使用相同的pre-REP-TIL系的充足库存来测试所有条件和所有饲养细胞批次。

[1847] 对于所测试的每批饲养细胞,总共有六个T25烧瓶:Pre-REP TIL系#1(2个烧瓶);Pre-REP TIL系#2(2个烧瓶);和饲养细胞对照(2个烧瓶)。对装有TIL系#1和#2的烧瓶评估了饲养细胞扩增TIL的能力。对饲养细胞对照组烧瓶评估了饲养细胞批次的复制机能不全。

[1848] 实验方案

[1849] 第2/3天,解冻TIL系

[1850] 制备CM2培养基。在37℃水浴中加热CM2。制备40mL补充有3000IU/mL IL-2的CM2。保持温热,直至使用。将不含IL-2的20mL预热CM2放入标有所用TIL系名称的两个50mL锥形管中。从LN_2储存中取出两个指定的pre-REP TIL系,将小瓶转移到组织培养室。将小瓶放入37℃水浴中的密封拉链储藏袋中以解冻小瓶,直至残留少量冰。

[1851] 使用无菌移液管,立即将小瓶的内容物转移到准备好的标记的50mL锥形管中的20mL CM2中。使用不含IL-2的CM2清洗细胞至40mL。在400xCF下离心5分钟。吸出上清液,重悬于5mL补充有3000IU/mL IL-2的温热CM2中。

[1852] 一式两份取出小等分试样(20μL),用于使用自动细胞计数器进行细胞计数。记录计数。计数时,将装有TIL细胞的50mL锥形管放入湿润的37℃、5%CO_2的培养箱中,松开盖子

以进行气体交换。测定细胞浓度并在补充有3000IU/mL IL-2的CM2中将TIL稀释至1×10^6细胞/mL。

[1853] 在湿润的37℃培养箱中,视需要在24孔组织培养板中以2mL/孔培养任意数量的孔,直至mini-REP的第0天。在单独的24孔组织培养板中培养不同的TIL系,以避免混淆和潜在的交叉污染。

[1854] 第0天,开始Mini-REP

[1855] 为要测试的饲养细胞批次的数量准备足够的CM2培养基(例如,一次检测4个饲养细胞批次,准备800mL CM2培养基)。等分一部分如上制备的CM2,补充3000IU/mL IL-2,用于细胞培养(例如,一次检测4个饲养细胞批次,准备500mL加有3000IU/mL IL-2的CM2培养基)。

[1856] 单独用每个TIL系进行工作以防止交叉污染,从培养箱中取出带有TIL培养物的24孔板,转移到BSC。

[1857] 使用无菌移液管或100-1000μL移液器和吸头,从要使用的TIL的每个孔中移出约1mL培养基,将其放入24孔组织培养板的未使用孔中。

[1858] 使用新鲜的无菌移液管或100-1000μL移液器和吸头,在孔中混合剩余的培养基和TIL以重悬细胞,然后将细胞悬液转移至标有TIL名称的50mL锥形管,记录体积。

[1859] 用保留的培养基洗涤孔,将该体积转移到相同的50mL锥形管中。以400xCF旋转细胞以收集细胞沉淀。吸出培养基上清液并将细胞沉淀重悬于2-5mL的CM2培养基中,该培养基含有3000IU/mL IL-2,所用体积取决于收获的孔数和沉淀的大小——体积应足以确保浓度>1.3×10^6细胞/mL。

[1860] 使用血清移液器充分混合细胞悬液,记录体积。使用自动细胞计数仪取出200μL进行细胞计数。计数时,将装有TIL细胞的50mL锥形管放入37℃5%CO_2湿润培养箱中,松开盖子以进行气体交换。记录计数。

[1861] 从培养箱中取出含有TIL细胞的50mL锥形管,以1.3×10^6细胞/mL的浓度将其重悬于补充有3000IU/mL IL-2的温热CM2中。将50mL锥形管放回培养箱,松开盖子。

[1862] 对第二TIL系重复以上步骤。

[1863] 在将TIL接种到用于实验的T25烧瓶中之前,将以1:10稀释TIL,终浓度为1.3×10^5细胞/mL,如下所述。

[1864] 制备MACS GMP CD3纯(OKT3)工作溶液

[1865] 从4℃冰箱中取出OKT3的储备溶液(1mg/mL),置于BSC中。在mini-REP的培养基中使用的最终浓度为30ng/mL OKT3。

[1866] 在该实验的每个T25烧瓶中,每20mL需要600ng OKT3;这相当于每20mL需要60μL的10μg/mL溶液,或所有6个烧瓶(测试每个饲养细胞批次)需要360μL。

[1867] 对于每个测试的饲养细胞批次,以10μg/mL的工作浓度制成400μL的1mg/mL OKT3的1:100稀释液(例如,一次测试4个饲养细胞批次,制备1600μL的1:100稀释的1mg/mL OKT3:16μL的1mg/mL OKT3+1.584mL的CM2培养基(具有3000IU/mL的IL-2))。

[1868] 准备T25烧瓶

[1869] 在制备饲养细胞之前,标记每个烧瓶并用CM2培养基填充烧瓶。将烧瓶放入37℃湿润的5%CO_2培养箱中,以保持培养基温热,同时等待添加其余成分。制备饲养细胞后,将成

分添加到每个烧瓶的CM2中。

[1870] 表34:溶液

[1871]

成分	共培养烧瓶中的体积	对照组（仅饲养细胞）烧瓶中的体积
CM2+3000 IU/mL IL-2	18 mL	19 mL
MNC：1.3×10^7/mL（在 CM2 中）+3000 IU IL-2（最终浓度 1.3×10^7/烧瓶）	1 mL	1 mL
OKT3：10 μg（在 CM2 中）+3000 IU IL-2	60 μL	60 μL
TIL：1.3×10^5/mL（在 CM2 中），加有 3000 IU IL-2（最终浓度 1.3×10^5/烧瓶）	1 mL	0

[1872] 制备饲养细胞

[1873] 此方案测试的每批最少需要78×10^6个饲养细胞。通过SDBB冷冻的每1mL小瓶在冷冻时具有100×10^6个活细胞。假设从LN_2储存中解冻后复苏率达到50％,建议每批解冻至少两个1mL饲养细胞小瓶,使每个REP估计有100×10^6个活细胞。或者,如果以1.8mL的小瓶提供,则一个小瓶就可提供足够的饲养细胞。

[1874] 在解冻饲养细胞之前,对于要测试的每个饲养细胞批次,预热约50mL不含IL-2的CM2。从LN_2储存中取出指定的饲养细胞批次小瓶,放入拉链储存袋中,并放在冰上。通过浸入37℃水浴中,将已密封的拉链袋中的小瓶解冻。从拉链袋中取出小瓶,用70％的乙醇喷洒或擦拭,然后将小瓶转移至BSC。

[1875] 使用转移吸管立即将饲养细胞小瓶的内容物转移到50mL锥形管中的30mL温热CM2中。用少量CM2洗涤小瓶,以除去小瓶中的任何残留细胞。在400x CF下离心5分钟。吸出上清液,重悬于4mL温热CM2加3000IU/mL IL-2中。取出200μL,用于使用自动细胞计数器进行细胞计数。记录计数。

[1876] 以1.3×10^7细胞/mL在温热CM2加3000IU/mL IL-2中重悬细胞。将TIL细胞从1.3×10^6细胞/mL稀释至1.3×105细胞/mL。

[1877] 设置共培养

[1878] 将TIL细胞从1.3×10^6细胞/mL稀释至1.3×105细胞/mL。向15mL锥形管中加入4.5mL CM2培养基。从培养箱中取出TIL细胞,使用10mL血清移液器重悬。从1.3×10^6细胞/mL TIL悬液中取出0.5mL细胞,添加到15mL锥形管中的4.5mL培养基中。将TIL储备小瓶放回培养箱。充分混合。对第二TI系重复此操作。

[1879] 将装有预热培养基的培养瓶从培养箱转移到BSC,用于单个饲养细胞批次。通过用1mL移液器吸头上下吸移几次,将混合的饲养细胞混合,然后将1mL(1.3×10^7细胞)转移到该饲养瓶的每个烧瓶中。向每个烧瓶中加入60μL OKT3工作储备液(10μg/mL)。将两个对照瓶放回培养箱。

[1880] 将每个TIL批次的1mL(1.3×10^5)转移至相应标记的T25烧瓶中。将烧瓶返回培养箱,直立培养。直至第五天才扰动。

[1881] 对所有测试的饲养细胞批次重复操作。

[1882] 第5天,培养基更换

[1883] 用3000IU/mL IL-2制备CM2。每个烧瓶需要10mL。用10mL移液器将具有3000IU/mL IL-2的10mL温热CM2转移到每个烧瓶中。将烧瓶放回培养箱,直立培养直至第7天。对所有测试的饲养细胞批次重复操作。

[1884] 第7天,收获

[1885] 从培养箱中移出烧瓶并转移至BSC,注意不要扰动烧瓶底部的细胞层。在不扰动烧瓶底部生长的细胞的情况下,从每个测试烧瓶中取出10mL培养基,从每个对照组烧瓶中取出15mL培养基。

[1886] 使用10mL血清移液管,将细胞重悬于剩余的培养基中并充分混合以破碎任何细胞团。通过移液将细胞悬液充分混合后,取出200μL进行细胞计数。使用适当的标准操作程序以及自动细胞计数设备对TIL进行计数。在第7天记录计数。

[1887] 对于所有测试的饲养细胞批次重复操作。

[1888] 根据下表TT,评估饲养细胞对照组烧瓶的复制机能不全,并评估含有TIL的烧瓶从第0天起的倍数扩增。

[1889] 第7天,饲养细胞对照组烧瓶持续至第14天

[1890] 在第7天完成饲养细胞对照组烧瓶的计数后,向每个对照组烧瓶中加入15mL含有3000IU/mL IL-2的新鲜CM2培养基。将对照组烧瓶放回培养箱,直立培养直至第14天。

[1891] 第14天,饲养细胞对照组烧瓶的不增殖延长

[1892] 从培养箱中移出烧瓶并转移至BSC,注意不要干扰烧瓶底部的细胞层。在不干扰烧瓶底部生长的细胞的情况下,从每个对照烧瓶中移出约17mL培养基。使用5mL血清移液管,将细胞重悬在剩余的培养基中,并充分混合以分解任何细胞团块。记录每个烧瓶的体积。

[1893] 通过移液充分混合细胞悬液后,取出200μL用于细胞计数。使用适当的标准操作程序以及自动细胞计数设备对TIL进行计数。记录计数。

[1894] 对所有测试的饲养细胞批次重复操作。

[1895] 结果和接受标准

[1896] 结果

[1897] γ辐照的剂量足以使饲养细胞复制机能不全。预期所有批次都符合评价标准,并且还证明与第0天相比,REP培养第7天剩余的饲养细胞总存活数减少。

[1898] 预期所有饲养批次都符合REP培养第7天TIL生长100倍扩增的评价标准。

[1899] 预期饲养对照烧瓶的第14天计数继续第7天所见的非增殖趋势。

[1900] 接受标准

[1901] 对于每批饲养细胞,测试的每个重复的TIL系均满足以下接受标准。

[1902] 接受标准为2倍,如下所述(见下表35)。

[1903] 表35:接受标准

[1904]

测试	接受标准
辐照MNC/复制机能不全	在第7天和第14天没有观察到生长
TIL扩增	每个TIL至少扩增100倍(最少1.3×10^{7}个活细胞)

[1905] 评估当在30ng/mL OKT3抗体和3000IU/mL IL-2存在下培养时,辐照剂量是否足以使MNC饲养细胞复制机能不全。通过在REP的第7天和第14天通过自动细胞计数确定的总活细胞计数(TVC),来评估复制机能不全。

[1906] 接受标准是“无生长”,意味着从REP的第0天投入培养的初始活细胞数开始,在第7天和第14天的总活细胞数没有增加。

[1907] 评价饲养细胞支持TIL扩增的能力。根据从REP第0天开始培养至REP第7天活细胞的倍数扩增,来测定TIL生长。在第7天,通过自动细胞计数测得TIL培养物达到最小100倍的扩增(即,大于在REP第0天投入培养的TIL活细胞总数的100倍)。

[1908] 不符合接受标准的MNC饲养批次的应急测试(Contingency Testing)。

[1909] 如果MNC饲养细胞批次不满足上述任何一个接受标准,将采取以下步骤来重新测试该批次,以排除其原因为简单的实验者错误。

[1910] 如果该批次中有两个以上剩余的附属(satellite)测试瓶,则对该批次进行重新测试。如果批次中有一个或没有剩余的附属测试瓶,则根据上面列出的接受标准,该批次不合格。

[1911] 为了合格,所讨论的批次和对照批次必须达到上述接受标准。符合这些标准后,该批次将被发布以供使用。

[1912] 实施例4:经伽马射线辐照的外周血单核细胞的合格单个批次

[1913] 此实施例描述了一种新型简化程序,用于使经γ-辐照的外周血单核细胞(PBMC)的单个批次合格,以用作本文所述的示例性方法中的同种异体饲养细胞。此实施例提供了评价经辐照的PBMC细胞批次用于临床生产TIL批次的方案。每个经辐照的PBMC批次均由单个供体制备。在超过100种鉴定方案的过程中,已经显示,在所有情况下,来自SDBB(圣地亚哥血库)的经辐照的PBMC批次可在REP的第7天使TIL扩增>100倍。该改进的鉴定方案旨在适用于来自SDBB的经辐照的供体PBMC批次,其仍必须进行测试以验证所接收的γ辐照剂量足以使其复制机能不全。一旦证明它们在14天的过程中保持复制机能不全,则认为供体PBMC批次是“合格的”以用于生产TIL临床批次。

[1914] 背景

[1915] 对于TIL的当前标准REP,需要经γ-辐照的生长停滞的PBMC。PBMC上的膜受体与抗CD3(克隆OKT3)抗体结合并与培养物中的TIL交联,从而刺激TIL扩增。由取自各个供体的全血白细胞单采来制备PBMC批次。在GMP条件下,将全血白细胞单采产物在Ficoll-Hypaque上离心、洗涤、辐照并冷冻保存。

[1916] 重要的是接受TIL治疗的患者不能注入活的PBMC,因为这可能导致移植物抗宿主病(GVHD)。因此,通过施用细胞γ-辐照使供体PBMC生长停滞,导致双链DNA断裂,并且再培养时PBMC的细胞活力丧失。

[1917] 评价标准

[1918] 7.2.1经辐照的PBMC批次的评价标准是:它们复制机能不全。

[1919] 实验设置

[1920] 使用直立的T25组织培养瓶,饲养批次以mini-REP形式进行测试,就好像它们与TIL共培养一样。对照批次:已被证明符合7.2.1标准的一批经辐照的PBMC作为对照与试验批次一起进行试验。对于每批测试的经辐照的供体PBMC,用烧瓶进行重复试验。

[1921] 实验方案

[1922] 第0天

[1923] 为每批待测试的供体PBMC制备约90ml的CM2培养基。将CM2在37℃水浴中保持温

热。解冻6×10^6IU/mL IL-2的等分试样。将CM2培养基放回BSC,用70％EtOH擦拭,然后放入罩中。对于每批测试的PBMC,将约60ml的CM2移至单独的无菌瓶中。将IL-2从解冻的6×10^6IU/mL储备溶液加到该培养基,终浓度为3000IU/mL。将该瓶标记为“CM2/IL2”(或类似)以将其与未补充的CM2区分开。

[1924] 制备OKT3

[1925] 从4℃冰箱中取出抗CD3(OKT3)的储备溶液并置于BSC中。在mini-REP的培养基中使用终浓度为30ng/mL的OKT3。用1mg/mL储备溶液制备10μg/mL抗CD3(OKT3)工作溶液。放入冰箱直至需要。

[1926] 对于每个测试的PBMC批次,制备150μL 1:100稀释的抗CD3(OKT3)储备溶液。例如,为了一次测试4个PBMC批次,通过将6μL的1mg/mL储备溶液加入到594μL补充有3000IU/mL IL-2的CM2中,制备600μL的10μg/mL抗CD3(OKT3)。

[1927] 准备烧瓶

[1928] 将每瓶19ml CM2/IL-2加入到标记的T25烧瓶中,制备细胞时将烧瓶置于37℃、湿润的、5％CO_2培养箱中。

[1929] 制备经辐照的PBMC

[1930] 从LN_2储存中取出要测试的PBMC批次的小瓶。在解冻前将它们置于-80℃或保持在干冰上。对于待解冻的每个批次,将30ml CM2(未补充IL-2)放入50ml锥形管中。用待解冻的PBMC的不同批号标记每个管。将管盖紧,且使用前将其置于37℃水浴中。视需要,将50ml锥形管放回BSC,用70％EtOH擦拭,然后放入罩中。

[1931] 从冷藏库中取出样品瓶PBMC,置于37℃水浴中的浮管架中解冻。解冻直至小瓶中残留少量冰。使用无菌转移移液管,将小瓶中的内容物立即转移到50ml锥形管中的30ml CM2中。从管中取出约1ml培养基冲洗小瓶;将冲洗液放回50ml锥形管中。盖紧并轻轻旋转以洗涤细胞。

[1932] 在室温下以400×g离心5分钟。吸取上清液,用1000μl移液管尖端将细胞沉淀再悬浮于1ml温热的CM2/IL-2中。或者,在添加培养基之前,通过沿着空试管架拖动加盖的管再悬浮细胞沉淀。再悬浮细胞沉淀后,用CM2/IL-2培养基将体积调至4ml。记录体积。

[1933] 使用自动细胞计数器取出一小份等分试样(例如100μL)进行细胞计数。根据特定的自动细胞计数器SOP,一式两份进行计数。通常需要在进行细胞计数之前对PBMC进行稀释。建议的起始稀释度为1:10,但这可能会根据所用细胞计数器的类型而有所不同。记录计数。

[1934] 使用CM2/IL-2培养基按步骤7.4.15.2,将PBMC的浓度调节至1.3×10^7个细胞/ml。通过温和地旋转或使用血清移液管上下轻轻吹吸混合均匀。

[1935] 设置培养烧瓶

[1936] 将两个标记的T25烧瓶从组织培养箱放回BSC。将10μg/mL抗CD3/OKT3的小瓶放回BSC。向每个烧瓶中加入1ml 1.3×10^7PBMC细胞悬液。向每个烧瓶中加入60μl10μg/mL抗CD3/OKT3。将带盖的烧瓶放回组织培养箱培养14天,不要扰动。将抗CD3/OKT3小瓶放回冰箱中,直至下一批需要。对每批待评估的PBMC重复此操作。

[1937] 第14天,测量PBMC的不增殖

[1938] 将重复的T25烧瓶放回BSC。对于每个烧瓶,使用新的10ml血清移液管,从每个烧瓶

中取出约17ml,然后小心地拉起剩余的培养基以测量烧瓶中剩余的体积。记录体积。

[1939] 使用相同的血清移液管上下吹吸以混合样品。

[1940] 从每个烧瓶中取出200μL样品进行计数。使用自动细胞计数器计数细胞。对每批被评估的PBMC重复进行这些步骤。

[1941] 结果和接受标准

[1942] 结果

[1943] γ辐照剂量足以使饲养细胞复制机能不全。预期所有批次均符合评价标准,并证明与第0天相比,REP培养第14天剩余的饲养细胞总存活数减少。

[1944] 接受标准

[1945] 每个经辐照的供体PBMC批次均符合以下接受标准:“无生长”——意味着第14天的活细胞总数小于REP第0天培养的初始活细胞数。

[1946] 不符合接受标准的PBMC批次的应急测试

[1947] 如果经辐照的供体PBMC批次不符合上述接受标准,则采取以下步骤重新测试该批次,以排除其失败的原因为简单的实验者错误。如果该批次剩余两个以上的附属小瓶,那么该批次将被重新测试。如果该批次中剩余一个或没有剩余附属小瓶,则根据上文第10.2节的接受标准,该批次失败。

[1948] 为了合格,经过应急测试的PBMC批次的对照批次和相关批次的两个副本均达到接受标准。符合此标准后,该批次将被发布以供使用。

[1949] 实施例5:IL-2储备溶液(CELLGENIX)的制备

[1950] 本实施例描述了将纯化的冻干的重组人白细胞介素2溶解到适合用于进一步的组织培养方案的储备样品中的过程,包括本申请和实施例中描述的所有那些,包括涉及使用rhIL-2的那些。

[1951] 步骤

[1952] 制备0.2%乙酸溶液(HAc)。将29mL无菌水加至50mL锥形管中。将1mL1N乙酸加至50mL锥形管中。通过倒置管2-3次混合。使用Steriflip过滤器过滤灭菌HAc溶液。

[1953] 制备PBS中的1%HSA。在150mL无菌过滤装置中,向96mL PBS中加入4mL 25%HAS储备溶液。过滤溶液。4℃储存。记录制备的每瓶rhIL-2。

[1954] 制备的rhIL-2储备溶液(6×10^6IU/mL终浓度)。每批rh1L-2不同,并且要求在制造商的分析证书(COA)中找到信息,例如:1)每瓶rhIL-2的质量(mg)、2)rhIL-2的比活(IU/mg)和3)推荐的0.2%HAc重溶体积(reconstitution volume)(mL)。

[1955] 通过使用以下等式计算rhIL-2批次所需的1%HSA的体积:

[1956] $$\left(\frac{小管质量(mg)\times 生物活性\left(\frac{IU}{mg}\right)}{6\times10^6\ \frac{IU}{mL}}\right)-HAc体积(mL)=1\%\ HSA体积(mL)$$

[1957] 例如,根据CellGenix的rhIL-2批次10200121COA,1mg小瓶的比活为25x10^6lU/mg。它建议在2mL 0.2%HAc中重溶rhIL-2。

[1958] $$\left(\frac{1mg \times 25 \times 10^6 \frac{IU}{mg}}{6 \times 10^6 \frac{IU}{mL}}\right) - 2mL = 2.167mL\ HSA$$

[1959] 用酒精擦拭IL-2小瓶的橡胶塞。使用连接在3mL注射器上的16G针头,将推荐体积的0.2%HAc注入小瓶中。当撤回针头时,注意不要移动塞子。倒置小瓶3次并旋转直至所有粉末溶解。小心地取下塞子,并放在旁边的酒精擦拭物上。向小瓶中添加计算体积的1%HSA。

[1960] rhIL-2溶液的储存。对于短期储存(<72小时),将小瓶储存在4℃。对于长期储存(>72小时),将小瓶等分成较小的体积并储存在-20℃的冷冻瓶中直至准备使用。避免反复冻结/解冻。制备日期后6个月过期。Rh-IL-2标签包括供应商和目录号、批号、有效期、操作员姓名、浓度和等分试样的体积。

[1961] 实施例6:冷冻保存方法

[1962] 本实施例描述了通过实施例G中所述的简略的封闭程序制备的TIL的冷冻保存方法(使用CryoMed Controlled Rate Freezer,型号7454(Thermo Scientific))。

[1963] 所用设备如下:铝制盒带架(与CS750冷冻袋兼容)、用于750mL袋的冷冻储物盒、低压(22psi)液氮罐、冰箱、热电偶传感器(带状的带式)和CryoStore CS750冷冻袋(OriGen Scientific)。

[1964] 冷冻过程提供以0.5℃速率从成核到-20℃和以1℃/分钟冷却到-80℃最终温度。程序参数如下:步骤1:在4℃下等待;步骤2:1.0℃/min(样品温度)至-4℃;步骤3:20.0℃/min(室内温度)至-45℃;步骤4:10.0℃/min(室内温度)到-10.0℃;步骤5:0.5℃/min(室内温度)到-20℃;步骤6:1.0℃/min(样品温度)至-80℃。

[1965] 实施例7:IL-2、IL-15和IL-21细胞因子混合物的用途

[1966] 本实施例描述了与实施例1至6的TIL方法结合使用作为另外的T细胞生长因子的IL-2、IL-15和IL-21细胞因子的用途。

[1967] 使用实施例1至9的过程,在一只实验臂中,在IL-2存在下,由结直肠癌、黑色素瘤、宫颈癌、三阴性乳腺癌、肺癌和肾癌肿瘤生长TIL;以及,在另一臂中,在培养开始时,用IL-2、IL-15和IL-21的组合代替IL-2。在pre-REP完成时,评估培养物的扩增、表型、功能(CD107a+和IFNγ)和TCR Vβ库。IL-15和IL-21描述于本文其他地方和Gruijl等,IL-21promotes the expansion of CD27+CD28+tumor infiltrating lymphocytes with high cytotoxic potential and low collateral expansion of regulatory T cells(IL-21促进CD27+CD28+肿瘤浸润淋巴细胞的扩增,其具有高的细胞毒性潜能和低的调节性T细胞侧支扩增),Santegoets,S.J.,J Transl Med.,2013,11:37(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626797/)。

[1968] 结果显示,相对于仅有IL-2的条件,在多种组织学中观察到在IL-2、IL-15和IL-21处理的条件下,CD4+和CD8+细胞中TIL扩增增强(>20%)。相对于仅使用IL-2的培养物,从IL-2、IL-15和IL-21处理的培养物中获得的TIL中,存在着偏向于TCR Vβ库偏斜的主要CD8+群。与仅用IL-2处理的TIL相比,在用IL-2、IL-15和IL-21处理的TIL中IFNγ和CD107a升高。

[1969] 实施例8:由细针抽吸物(FNAS)和芯针活检物扩增肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)

[1970] I、背景

[1971] 本实施例提供了与通过细针抽吸或芯针活检获得的肿瘤样品中的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增有关的数据。

[1972] 该研究的目的是开发一种由芯针活检物或细针抽吸物扩增TIL的方法。在某些情况下,从癌症患者(例如肺癌(n=3)、黑色素瘤(n=1)、头颈癌(n=1)、宫颈癌(n=1)、卵巢癌(n=3)、胰腺癌(n=2)、胶质母细胞瘤(GBM)和结直肠癌(n=1))获得3至5个肿瘤样品。

[1973] II、由胰腺癌患者(P7015)的核心活检物扩增的TIL

[1974] 接受胰腺核心活检物用于研究。将一个核心物放入24孔板的一个孔中,总共5孔。当将两个核心物放入两个孔中时,在这些孔中几乎没有观察到生长。三个孔用补充有IL-2的培养基处理,两个孔用补充有含有IL-2、IL-15和IL-21的细胞因子混合物的培养基处理。在单独用IL-2处理的孔中观察到活细胞(图8A),在用细胞因子混合物处理的孔中观察到活细胞(图8B)。用IL-2处理获得约1.3×10^6个活细胞/孔(平均1.2×10^6个活细胞/孔)。用细胞因子混合物处理获得约2.3×10^6个活细胞/孔(平均2.0×10^6个活细胞/孔)。

[1975] 图17A、17B和17C显示了源自胰腺肿瘤的核心活检物的TIL的表型和功能状态。从胰腺肿瘤扩增TIL,在含有IL-2的培养基或补充有细胞培养添加剂的培养基中培养。在补充了IL-2的培养基和含有细胞培养添加剂的培养基中,从胰腺肿瘤扩增TIL(图17D)。图17A显示了CD3+、CD4+、CD8+、CD19+、CD3+/CD56+或CD3/CD56+的细胞百分比。图17B显示与无刺激条件相比,用佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)刺激后,CD4+亚群中CD107a细胞的百分比。图17C显示了由胰腺核心活检物扩增的TIL的功能分析。该图显示了与无刺激条件相比,用佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)刺激后,CD8+亚群中CD107a细胞的百分比。

[1976] 从胰腺核心活检物扩增的大多数细胞是T细胞(CD4+细胞和CD8+细胞)。PMA刺激证明CD8+的脱粒能力(如CD107a+的表达所示),从而表明这些细胞具有功能。与单独的IL-2相比,在用培养添加剂处理的孔中表达CD8+的CD107a+的百分比更高(图17C)。

[1977] III、由宫颈癌患者(C2005)的细针抽吸物扩增的TIL

[1978] 接受宫颈肿瘤用于研究。使用22号针头和注射器从肿瘤中分离出五个细针抽吸物。将每个FNA样品置于24孔板的至少三个孔中。每个样品的两个孔用IL-2处理,每个样品的一个孔用细胞因子混合物(IL-2、IL-15和IL-21)处理。

[1979] 图10A显示在用IL-2处理的FNA中存在CD4+和CD8+T细胞。IL-2处理的孔中平均存在3.45×10^5个活细胞/孔。图10B显示在用细胞因子混合物处理的FNA中存在CD4+和CD8+T细胞。这些孔中平均存在8.69×10^5个活细胞/孔。与IL-2处理的抽吸物相比,IL-2、IL-15和IL-21处理的抽吸物显示出更多的细胞/孔。与IL-2处理的孔(8.58%)相比,混合物处理的孔(20.1%)中的CD8+细胞百分比更高。

[1980] IV、由肺癌患者(L4032)的细针抽吸物扩增的TIL

[1981] 接受三个肺肿瘤用于研究。使用22号针头和注射器从肿瘤中分离出细针抽吸物。一个FNA样品包括1.6×10^6个细胞,其中,28%为活细胞。用补充有(1)单独IL-2或(2)细胞因子混合物的培养基处理两个孔(每个条件)。另外,在24孔板(每个两个孔)中培养肺肿瘤碎片作为对照。在第13天收获细胞,通过FACS分析评估。

[1982] 图11A显示T细胞从用IL-2处理的FNA样品扩增。平均每孔约有4.64×10^5个活细胞。图11B显示T细胞从用含有IL-2、IL-15和IL-21的混合物处理的FNA样品扩增。平均每孔

约有7.75×10^5个活细胞。图11C显示T细胞从用IL-2处理的肺肿瘤碎片扩增。平均每孔约有4.28×10^5个活细胞。

[1983] 接下来,使用快速扩增方案(例如第二次扩增方案或步骤D),扩增由FNA样品培养的TIL。在第14天收获细胞,通过FACS分析评估。图12A显示了用(i)IL-2,(ii)IL-2、IL-15和IL-21和(iii)IL-2、IL-15、IL-21到IL-2处理的FNA样品扩增的TIL的总细胞数。图12A显示,在第二次扩增后,TIL包含CD4+和CD8+T细胞(分别为84.1%和10.3%)。

[1984] V、由肺癌患者(L4033)的细针抽吸物扩增的TIL

[1985] 使用22号针头和注射器从肺肿瘤中分离出细针抽吸物。FNA样品包括5.5×10^6个细胞,其中有76%的活细胞。将一个G-Rex 10烧瓶(每种条件)用含有(1)仅IL-2或(2)细胞因子混合物的培养基处理。另外,在G-Rex 10烧瓶中培养四个肺肿瘤碎片作为对照。在第12天收获细胞,通过FACS分析评估。图13A显示从用IL-2处理的FNA样品获得CD4+T细胞(4.25%)和CD8+T细胞(55.1%)。图13B显示了从用IL-2处理的肿瘤碎片获得CD4+T细胞(7.76%)和CD8+T细胞(54.5%)。

[1986] 接下来,使用快速扩增方案(例如第二次扩增方案或步骤D)扩增由FNA样品培养的TIL。将抽吸物在锥形管中孵育前6天。在第14天收获细胞,通过FACS分析评估。图14显示了由用IL-2处理的FNA样品和肿瘤碎片扩增的TIL的总细胞数。该图显示来自FNA样品的TIL与来自肿瘤碎片的TIL相似地扩增。

[1987] 在类似的实验中,从肺癌患者(L4034)的三个肺肿瘤样品中分离FNA样品。将来自FNA样品的约1.0×10^6细胞在G-Rex 10烧瓶中仅补充有IL-2的培养基中培养15天。作为对照,在G-Rex 10烧瓶中仅补充有IL-2的培养基中培养四个肿瘤碎片。从FNA培养物中几乎没有收获可检测到的细胞。

[1988] VI、由卵巢癌患者(OV8011、OV8012和OV8013)的细针抽吸物扩增的TIL

[1989] 接受三个卵巢肿瘤(OV8011、OV8012和OV8013)进行研究。使用22号针头和注射器从肿瘤中分离出细针抽吸物。

[1990] 来自OV8011的FNA样品包括3.19×10^5个细胞,其中,活细胞为28%。该FNA样品分为四个孔;在含IL-2的培养基中培养两个孔,在含IL-2、IL-15和IL-21的培养基中培养两个孔。OV8012的FNA样品包括8.3×10^5个细胞和11%的活细胞。该FNA样品分为两个孔;一个孔在含有IL-2的培养基中培养,另一孔在含有IL-2、IL-15和IL-21的培养基中培养。OV8013的FNA样品包括1.5×10^5个细胞和7%的活细胞。该FNA样品分为两个孔;一个孔在含有IL-2的培养基中培养,另一孔在含有IL-2、IL-15和IL-21的培养基中培养。从FNA样品未观察到扩增。

[1991] 作为对照,将来自每个肿瘤的四个肿瘤碎片培养在G-Rex 10烧瓶中。一些烧瓶接受仅含有IL-2的培养基,而其他烧瓶接受含有IL-2、IL-15和IL-21的培养基。图15显示了源自在包含(1)单独的IL-2或(2)细胞因子混合物的培养基中培养的源自卵巢肿瘤碎片的细胞的总细胞数。结果表明,卵巢肿瘤在第一次扩增中扩增不佳。

[1992] VII、由黑色素瘤患者(M1101)的细针抽吸物扩增的TIL

[1993] 接受黑色素瘤肿瘤(M1101)用于研究。从肿瘤获得FNA样品。样品包括1.96×10^6个细胞,其中,有65%的活细胞。将样品置于G-Rex 10烧瓶中,并用补充有IL-2的培养基处理。作为对照,将四个黑色素瘤肿瘤碎片置于G-Rex 10烧瓶中,并用补充IL-2的培养基处理。在

第12天收获细胞。图16A显示从用IL-2处理的FNA样品扩增的CD4+T细胞(21.4%)和CD8+T细胞(52.8%)。图16B显示了从用IL-2处理的肿瘤碎片扩增的CD4+T细胞(18.0%)和CD8+T细胞(71.5%)。

[1994] 图18A和18B提供了从核心活检物和细针抽吸物获得的结果的概述。

[1995] VIII、由黑色素瘤患者(M1101)的细针抽吸物扩增的TIL

[1996] 在pre-REP的第11天,在包含抽吸物和碎片(n=2)的烧瓶中进行细胞计数。在第11天(Gen2)收获含有碎片的pre-REP培养物。含抽吸物的pre-REP培养物由于第11天的细胞计数较低,因此继续进行培养。在第18天对抽吸物进行计数,然后在第21天再次计数(图19A)。在第21天,培养物已达到近60×10^{6}个细胞,此时收获细胞并通过流式细胞术评估。显示来自碎片和抽吸物的pre-REP TIL的表型(图19B)和功能(CD107a表达,图19C)是相当的。

[1997] 图19A、19B和19C显示了来自另一名黑色素瘤患者(M1107)的FNA样品的TIL的扩增。图19A显示了扩增期间不同时间的总细胞数。图19B显示了扩增的TIL的表型。图19C显示了从碎片和抽吸物扩增的TIL的功能分析。该图显示了与未刺激条件相比,PMA刺激后CD4+和CD8+亚群中CD107a细胞的百分比。

[1998] 实施例9:由细针抽吸物(FNAS)和芯针活检物的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增

[1999] I.胰腺核心物:数据显示于图20-29。

[2000] 报告了十五种肿瘤(胰腺癌、肺癌、宫颈癌、间皮瘤、结直肠癌)。迄今为止,已接收了37种来自不同组织学的肿瘤样品,包括胰腺癌、宫颈癌、肺癌、口腔癌和食道癌、肉瘤。

[2001] 到达后,将肿瘤破碎并放置在具有IL-2的烧瓶/平板中以进行预快速扩增方案(REP)。pre-REP TIL在经辐照的PBMC、抗CD3抗体(30ng/mL)和IL-2(3000IU/mL)的存在下,在REP方案中进一步繁殖。肺癌和肉瘤pre-REP TIL由4个肿瘤碎片以24孔板格式扩增22天。其他癌症从G-REX TIL中的4个肿瘤碎片扩增长达22天。

[2002] II.可由胰腺癌的核心活检物扩增TIL:数据如图30-37所示。

[2003] 一般结论

[2004] 在P7028和P7031中,生长动力学证明在第11-12天几乎没有细胞,但在第21-28天之间证明了显著扩增。

[2005] 从胰腺核心活检物扩增的大多数细胞是T细胞且表型CD4+。从胰腺肿瘤分离的TIL通常是CD4+。

[2006] 用PMA刺激显示了CD4+脱粒的能力,如通过CD107a+的表达所表明的,表明这些细胞是有功能的,如先前用P7015的研究所显示的。CD107a在源自碎片的TIL中表达相似。

[2007] 在具有与平板结合的抗CD3的再刺激测定中,源自核心物的TIL分泌了显著水平的IFNγ,与源自碎片的TIL类似。

[2008] 广泛的表型证明了在源自肿瘤碎片的TIL中评估的大多数标志物的相似表达,表明从核心物生长的TIL的结果类似于碎片。

[2009] 耗竭/活化小组证明了CD4+细胞中PD-1、Tim3和KLRG1的显著差异以及CD8+细胞中LAG3、Tim3和KLRG1的显著差异。需要进行其他胰腺核心物研究以验证这些发现。

[2010] 一般建议:

[2011] 这些结果表明,除非利用其他“调整策略”促进生长,否则从胰腺核心物(和其他组织学)成功生长TIL的过程可能需要更多的培养时间(超过Gen2的pre-REP要求)(见下文)。

[2012] 基于胰腺核心物中的初步生长数据,建议pre-REP过程为第21-28天,以便获得足够的细胞。

[2013] 对于此过程,应在G-Rex 10或G-Rex 10M的CM1培养基和IL-2/IL-15/IL-21中开始pre-REP。

[2014] 取决于pre-REP细胞计数,应在G-Rex 100M或G-Rex 500M中开始REP。

[2015] G-Rex 500M:如果细胞计数为5×10^7。

[2016] G-Rex 100M:如果细胞计数为$1-5\times10^7$之间。

[2017] 未来的实验将用于确定每个容器中足够的细胞生长所需的最小细胞数。

[2018] 未来的实验将比较在单独的IL-2/IL-15/IL-21或与具有OKT3和饲养细胞的IL-2/IL-15/IL-21中扩增的胰腺核心物的生长、表型和功能。

[2019] 实施例10:使用核心活检物扩增TIL

[2020] 合理性:

[2021] 肿瘤移除/切除并非对所有患者均适当或可行。在这组患者中,核心活检物可为ACT(过继性细胞疗法)的TIL来源。此类核心活检允许对多个病变进行采样,并有可能获得更广泛的TIL库。

[2022] 策略:

[2023] 本实施例提供了由多种组织学的核心活检物扩增TIL,并开发对于由核心活检物生产TIL可行的确定的方法。参见例如图38,其提供了两个示例性过程的图。

[2024] 数据

[2025] 已证明了使用Gen2由活检物(胰腺核心物)扩增TIL的能力,这还表明,从活检物获得的TIL在表型和功能上与从碎片获得的TIL相当。

[2026] 用IL-2/IL-15/IL-21处理七组胰腺核心物(7至10个核心物),并进行pre-REP处理并评估其扩增。三个成功扩增,但是增长变化很大。Pre-REP培养至少需要21-28天才能获得足够数量的细胞(例如图7的步骤A至E需要21-28天)。广泛的表型表明,在来自胰腺肿瘤碎片的TIL中评估的大多数标志物的相似表达。在来自碎片的TIL中CD107a和IFNγ的表达相似。

[2027] 当前方案:

[2028] 在培养的第3天添加OKT3和饲养细胞提高了TIL产量。培养了少量核心物/烧瓶并评估生长(例如培养1至2个核心物)。

[2029] 对1至2个核心活检物(3个胰腺癌、4个黑色素瘤、1个乳腺癌和1个卵巢癌)进行改良的研究规模的过程,包括在第3天添加OKT3+饲养细胞(参见图39-40)。

[2030] • 对TIL进行第二次REP(例如第二次扩增)。

[2031] • 胰腺核心物扩增+/-IL15&21(三重混合物;REP1&REP2;例如第一次扩增和第二次扩增)。

[2032] • 将卵巢核心物处理为+/-OX40(BMS)(n=1,初步数据)。

[2033] • 所有的TIL均进行第二次REP。

[2034] 胰腺

[2035] 在OKT3+饲养细胞的存在下,成功地扩增了来自胰腺核心物的TIL。在第一次扩增的第11-17天之间获得了>50e6个细胞。

[2036] 通常需要两个核心来获取适当的细胞数量。

[2037] 与单独的IL-2相比,将三重混合物(TC:IL-2、IL-15/IL-21)添加到第二REP(先前在IL-2或TC中培养)没有显著改变TIL的扩增。

[2038] 与使用Gen2类似条件生长的核心物相比,在第3天向核心活检物中添加OKT3+饲养细胞未显著改变TIL的表型(记忆、CD27/CD28、耗竭、活化)。通过2个REP扩增的TIL的表型(记忆、CD27/CD28、耗竭、活化)与使用Gen2条件生长的TIL的表型无显著差异。

[2039] CD107a表达随OKT3和饲养细胞的添加无显著变化。通过CD107a诱导评估,通过2个REP扩增的TIL保持了对非特异性刺激的反应能力。

[2040] 通过CD107a诱导评估,通过2个REP扩增的TIL保持了对非特异性刺激做出反应的能力。

[2041] 评估了IFNγ的分泌。当用OKT3刺激时,TIL产生IFNγ。

[2042] 可从来自胰腺癌的核心活检物扩增胰腺TIL。

[2043] P7028和P7031pre-REP实验概述和结果

[2044] 将核心活检物与三重混合物(IL-2/IL-15/IL-21)一起放入G-Rex 10中。

[2045] 第12天评估P7028TIL,继续培养直至第19天。

[2046] 细胞计数:第12天=1.61×10^6个活细胞;第21天=3.49×10^7个活细胞

[2047] 在第12天评估P7028TIL,继续培养直至第27天。

[2048] 细胞计数:第12天=1.52×10^5个活细胞;第27天=1.14×10^7个活细胞

[2049] 黑色素瘤

[2050] 在OKT3+饲养细胞(n=4)的存在下,成功扩增了源自黑色素瘤核心物的TIL。在第一次扩增的第12天,获得>50×10^6个细胞。

[2051] 通常需要一到两个核心物来获取适当的细胞数量。与使用Gen2类似条件的碎片相比,在第3天向核心活检物中添加OKT3+饲养细胞未显著改变TIL的表型(记忆、CD27/CD28、耗竭、活化)。

[2052] 如通过CD107a动员(mobilization)和IFN分泌评估的,通过2个REP扩增的TIL对非特异性刺激有反应。

[2053] 肺

[2054] 在第0天存在IL-2+OKT3+饲养细胞的情况下,由来自肺1个核心物成功扩增了TIL。在第11天获得了>50×10^6个细胞。

[2055] 通过2个REP扩增的TIL的表型(记忆、CD27/CD28、耗竭、活化)与由在培养开始的第3天经OKT3+饲养细胞处理的核心物扩增的TIL略有不同。在第3天处理的核心物中,CD8+/CD4+的比率有所增加。

[2056] 在第0天和第3天培养条件之间观察到CD28、CD69、CD39、CD49a、Tim3和CD101表达略有差异。

[2057] TIL在用抗CD3刺激时产生IFNγ。与第3天OKT3+饲养细胞处理的肺核心物相比,第0天OKT3+饲养细胞处理的肺核心物具有更高的IFNγ水平。

[2058] 如通过CD107a诱导评估的,通过2个REP扩增的TIL保持了对非特异性刺激的响应能力。

[2059] 与第0天OKT3+饲养细胞处理的肺核心物TIL相比,来自第3天OKT3+饲养细胞处理

的肺核心物的CD8+TIL是寡克隆,表明取决于OKT3+饲养细胞的添加时间的不同TCR库。

[2060] 结论

[2061] 在培养的第3天向核心物添加OKT3+饲养细胞显著提高了TIL产量。所有评估的组织学(胰腺癌、黑色素瘤、乳腺癌和卵巢癌)在第一次扩增的11-15天内获得>50×10^6个细胞(REP2开始的阈值)。两个核心物(在所分析的组织学中)足以获取所需的细胞数量。

[2062] 在IL-2+OKT3+饲养细胞存在的情况下,由乳腺的至少2个核心物成功地扩增了TIL,但在单独IL-2的情况下未扩增。在第11天获得了>50×10^6个细胞。一到两个核心物足以获得所需的细胞数量。

[2063] 数据表明,(使用早期的OKT3+饲养细胞)从核心物扩增的TIL的表型和功能类似于在Gen2条件下(仅IL-2)扩增的核心物/碎片。与单独的IL-2相比,在卵巢核心物中添加OX40改善了TIL的扩增。

[2064] 1至2个胰腺核心物在单独的IL-2中无法扩增。

[2065] 将在第3天用碎片+/-OKT3+饲养细胞进行侧面实验(side to side experiment)。TIL在用OKT3刺激时产生IFNγ,且正在进行进一步的实验。在用+/-OX40处理的卵巢核心物中观察到了KLRG1、CD25和PD1的差异(治疗性TIL群)。

[2066] 表型,功能(效价)和TCR库被评估并且正在继续评估中(目前正在进行中)。与使用Gen2类似条件的碎片相比,在第3天向核心活检物中添加OKT3+饲养细胞并未显著改变TIL的表型(记忆、CD27/CD28、耗竭、活化)。如通过CD107a动员和IFNγ分泌评估的,通过2个REP扩增的TIL对非特异性刺激有反应。在乳腺核心物中,通过2-REP扩增的TIL的表型(记忆、CD27/CD28、耗竭、活化)与通过1-REP方法扩增的TIL(即在第一次扩增过程中没有OKT3+饲养细胞)的表型无显著差异。

[2067] 观察到KLRG1和PD1表达的轻微差异。

[2068] 如通过CD107a诱导评估的,通过2个REP扩增的TIL维持了对非特异性刺激的响应能力。

[2069] 进一步的评估将包括在第3天+/-去除核心物,以及将对抗OX40对扩增的TIL的作用进行进一步的评估。

[2070] 实施例11:使用OKT3+饲养细胞由乳腺核心物和卵巢核心活检物扩增TIL:实施例9-10的概述

[2071] 在IL-2+OKT3+饲养细胞存在的情况下,由乳腺的至少2个核心物成功地扩增了TIL,但在单独IL-2的情况下未扩增。在第11天获得>50×10^6个细胞。

[2072] 与单独的IL-2相比,在卵巢核心物中添加OX40改善了TIL的扩增。

[2073] 在乳腺核心物中,通过2-REP扩增的TIL的表型(记忆、CD27/CD28、耗竭、活化)与使用1-REP方法扩增的TIL的表型(即在第一次扩增期间没有OKT3+饲养细胞)无显著差异。

[2074] 观察到KLRG1和PD1表达的轻微差异。

[2075] 在用+/-OX40处理的卵巢核心物(终产物)中观察到了KLRG1、CD25和PD1的差异。

[2076] TIL在用OKT3刺激时产生IFNγ。

[2077] 如通过CD107a诱导评估的,通过2个REP扩增的TIL保持了对非特异性刺激的响应能力。

[2078] 在第3天将OKT3+饲养细胞添加至核心物显著提高了TIL产量。所有评估的组织学

(胰腺癌、黑色素瘤、乳腺癌和卵巢癌)在11-15天内获得>50×10^6个细胞(在Gen2条件下REP开始的阈值)。两个核心物(在所分析的组织学中)足以获取所需的细胞数量。初步数据表明,从核心物(使用早期OKT3+饲养细胞)扩增的TIL的表型和功能类似于在对照条件下扩增的核心物/碎片。

[2079] 实施例12:由针抽吸物扩增TIL

[2080] 策略:

[2081] 为了由多种组织学的针抽吸物扩增TIL,并开发出对于TIL生产可行的确定的过程。初步研究表明,TIL可从在最佳条件下(即直接取自肿瘤活检物)的“一些”抽吸物扩增。

[2082] 在艾欧凡斯(Iovance)使用Gen2条件(即在第3天没有OKT3和饲养细胞),从各种组织的肿瘤活检物中分离出22个抽吸物。在6个肿瘤(1个宫颈癌、2个肺癌和3个黑色素瘤)中观察到了生长。在pre-REP期间分离出的细胞数量远低于50×10^6细胞阈值。

[2083] 另外,已接收10个针抽吸物,包括三个来自黑色素瘤的抽吸物(n-3),和七个来自乳腺癌的抽吸物(n-7)。抽吸物用OKT3和饲养细胞处理。

[2084] 由于初始细胞数小,大多数实验在96孔板中开始。在第11天,所有抽吸物中均获得<50×10^6个细胞。需要几个亚培养物来获得必要数量的细胞。

[2085] 实施例13:从肿瘤核心活检物扩增TIL

[2086] 介绍

[2087] 具有自体肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的过继T细胞疗法(ACT)已证明在转移性黑色素瘤和宫颈癌患者中具有临床疗效。TIL目前由通过手术切除的碎片化肿瘤扩增。不幸的是,患有无法切除的肿瘤的患者目前不符合TIL治疗的条件。如果从医生用于诊断和分期、相关研究和生物标志物分析的小肿瘤样品类型中扩增TIL可行,则TIL治疗将可用于更多的癌症患者。

[2088] 芯针活检物是这种小肿瘤样品的实例。与外科手术切除相比,它是一种廉价、安全、简单且侵入性较小的程序。核心活检使用小切口和针头移除一个小圆柱的肿瘤组织。通常,针头最多可插入切口5次,以切除足量的组织。核心活检样品是完整肿瘤微环境的小样品,因此包含肿瘤细胞、基质和免疫细胞,包括TIL。迄今为止,在黑色素瘤中有一项临床研究,该研究使用了源自芯针活检物的组织来扩增TIL(Ullenhag,G.J.等,Cancer Immunol Immunother,61(5):725-732(2014))。源自手术切除的TIL与源自核心活检物的TIL之间的绝对细胞数和倍数扩增相似。值得注意的是,这项研究中的大多数客观反应(4/5)均使用来自核心活检物的细胞进行治疗。没有进一步的研究证实这些发现。

[2089] 在一些实施方式中,如上所述和在本实施例中,采用2个REP过程来扩增源自核心活检物的TIL。

[2090] 目的

[2091] 本实施例提供了由小肿瘤样品将TIL扩增至临床上合适的数量以用于ACT(过继性细胞转移)的方案。该方案使用胰腺肿瘤、黑色素瘤、乳腺肿瘤和卵巢肿瘤的肿瘤核心活检物。评估扩增的TIL的生长、活力、表型、功能(IFNγ分泌,CD107a动员)和TCR Vβ库(RNA测序)。

[2092] 材料

[2093] 肿瘤核心组织。胰腺、黑色素瘤、乳腺癌和卵巢的肿瘤核心物来自UPMC,Biotheme

和MT组。

[2094] 步骤

[2095] 处理核心物与开始培养

[2096] 从研究联盟(UPMC)和组织采购供应商(Biotheme和MTG集团)获得新鲜切除的肿瘤核心活检物。肿瘤核心活检物在HypoThermosol(Biolife Solutions,Washington,货号101104)(含抗生素)或RPMI 1640(Fisher Scientific,Pennsylvania,货号11875-085)+男性人AB血清(Access Biologics,California,A13012)中运送过夜。

[2097] 在50mL锥形管的顶部使用0.22μM的过滤器,小心缓慢地将包含肿瘤核心活检物的运输容器中的内容物倒入过滤器。核心物保留在过滤器中。通过在核心物上轻轻添加10-20mL HBSS来清洗核心物。

[2098] 从滤膜轻轻取出每个核心物,同时尝试保持核心物完整。使用无菌塑料镊子或轻轻移液(在1mL移液管中约含200μL HBSS),将核心物转移至含有40mL CM2和6000IU/mL IL-2的G-Rex 10。

[2099] 开始REP1(例如启动第一次扩增)

[2100] 在培养的第3天,将OKT3(30ng/mL)(Miltenyi Biotec,Germany,货号170-076-116)和饲养细胞(1:100)添加到G-Rex 10中,添加时不要扰动培养物。

[2101] 每天通过显微镜评估培养物的生长。在添加OKT3+饲养细胞后进行REP1,持续8天,并在第11天结束。在整个培养过程中,细胞保持未触动过的(untouched)。

[2102] 为了计数,取出约30mL培养基,通过上下移液将细胞重悬在剩余的10mL培养基中。将细胞置于50mL锥形管中,在Sorvell Legend XFR离心机和旋转桶(ThermoScientific,CA,货号75003180)中于室温以1500rpm离心5分钟。

[2103] 使用Nexcelom Cellometer K2(Nexcelom,MA)测定细胞和活力计数。

[2104] 如果离心后没有沉淀物,或沉淀物<200μL,则将沉淀物重悬于2mL培养基中进行计数。如果沉淀>200μL,则重悬于5mL CM2培养基中进行计数。

[2105] 在培养开始后的第11天(加入OKT3+饲养细胞后8天)收获实验。评估REP1产品的细胞计数、活力、表型(TIL1、TIL2和TIL3(TIL2和TIL3组用于TIL表面抗原染色)、TIL3)和功能(CD107a(通过CD107a动员评估TIL功能)、IFNγ(WRK LAB)-059))。将剩余的细胞冷冻并储存在液氮中。

[2106] REP2开始(例如第二次快速扩增)

[2107] 对于mini-REP2开始,将1×10^5个细胞放入具有40mL CM2培养基和3000IU/mL IL-2的G-Rex 10中。在培养起始时加入抗CD3(克隆:OKT3,30ng/mL)和饲养细胞(比率为1:100,TIL:饲养细胞)。即使在REP1期间未添加OKT3+饲养细胞,REP2中所有烧瓶均用OKT3+饲养细胞处理。

[2108] 在REP2的第5-7天(过程的第16-18天)进行培养基更换。将G-Rex 10烧瓶中的培养基体积减小至约10mL,用CM2或AimV+3000IU/mL IL-2补充至40mL。

[2109] 在REP2的第11天,如上所述减小体积,将细胞在室温以1500rpm离心5分钟。

[2110] 评估终产物的细胞计数、活力、表型(TIL1、TIL2(TIL2组用于TIL的表面抗原染色,v1和v2)、TIL3和功能(CD107a(通过CD107a动员评估TIL功能,IFNγ)。将其他细胞(1×10^6-5×10^6细胞)沉淀并冷冻以进行RNA测序和分析,其余细胞则冷冻并储存在液氮中。

[2111] 结果和接受标准

[2112] 在用OKT3+饲养细胞处理的烧瓶中,第11天预计REP1的产量>50×10^6。预计REP2期间的倍数扩增不会受到REP1期间添加的OKT3和饲养细胞的影响,且与Gen2REP倍数扩增数量一致。预计源自肿瘤核心活检物且较早暴露于OKT3+饲养细胞的TIL的表型与源自手术切除物(或小活检物)且根据Gen 2过程扩增的TIL的表型相似。

[2113] 实施例14:GEN 3示例性过程

[2114] 本实施例提供了Gen 2和Gen 3过程的比较。此实施例描述了稳健的TIL扩增平台的开发。对Gen 2过程的改进通过减少操作员干预的次数降低了风险并简化了制造过程,减少了制造的总时间,优化了试剂的使用,并促进了灵活的半封闭和半自动化细胞生产工艺,其适用于商业规模的高通量制造。。

[2115] 过程Gen 2和Gen 3TIL由通过手术切除肿瘤并随后离体扩增的个体患者的自体TIL组成。Gen 3过程的启动第一次扩增步骤在白介素2(IL-2)和单克隆抗体OKT3存在下进行细胞培养,该单克隆抗体OKT3靶向经辐射的外周血单核细胞(PBMC)骨架上的T细胞共受体CD3。

[2116] GEN 2TIL产物的制造包括两个阶段:1)Pre-快速扩增(Pre-REP)和2)快速扩增方案(REP)。在Pre-REP期间,将切除的肿瘤切成≤50个各个维度上2-3mm的碎片,然后用含血清(补充有10%HuSAB的RPMI 1640培养基)和6,000IU/mL的白介素-2(IL-2)的培养基培养持续11天。在第11天,收获TIL,将其引入大规模的次代REP扩增。REP包括在5×10^9辐照的同种异体PBMC饲养细胞的共培养物中的来自pre-REP的≤200×10^6的活细胞的活化,该共培养物中加有在5L的CM2(补充有3000IU/mL rhIL-2)中的150μg单克隆抗CD3抗体(OKT3),持续5天。在第16天,将培养体积缩小90%,将细胞部分分成多个G-REX-500烧瓶,其中,≥1×10^9个活的淋巴细胞/烧瓶,用CM4将QS稀释至5L。将TIL再孵育6天。在第22天收获REP,清洗,配制并冷冻保存,然后在-150℃运送到临床部位进行输注。

[2117] GEN 3TIL产物的制造包括三个阶段:1)启动第一次扩增方案;2)快速第二次扩增方案(也称为快速扩增阶段或REP)和3)亚培养分开。为了实现启动第一次扩增TIL增殖,将切除的肿瘤切成≤120个的2-3个mm碎片。在启动第一次扩增的第0天,在3个100MCS容器中的每个容器中,在约100cm^2的表面积上建立一个载有OKT-3的约2.5×10^8个同种异体的经辐射的PBMC饲养细胞的饲养层。肿瘤碎片分布在3个100MCS容器中,每个容器装有500mL含血清的CM1培养基和6,000IU/mL白介素-2(IL-2)和15ug OKT-3,持续7天。在第7天,在3个100MCS容器的每个中,通过将约5×10^8个经同种异体辐照的PBMC饲养细胞(装有OKT-3)的附加饲养细胞层加入肿瘤碎片培养相并用500mL CM2培养基、6,000IU/mL IL-2和30ug OKT-3进行培养,来开始REP。通过将装有OKT3的饲养细胞向100MCS容器的封闭系统流体转移,在同一容器中活化整个启动第一次扩增培养物,可以增强REP的开始。对于GEN 3,TIL按比例扩增或拆分涉及多个工艺步骤,其中,整个细胞培养物通过封闭系统流体转移而扩大到一个更大的容器,然后转移(从100M烧瓶转移到500M烧瓶),并另外添加4L CM4培养基。在第16天收获REP细胞,清洗,配制并冷冻保存,然后在-150℃运送到临床部位进行输注。

[2118] 总言之,Gen 3工艺是更短、更可扩增且易于修改的扩增平台,其将适应于稳健的制造和工艺可比性。

[2119] 表36:示例性的Gen 2和示例性的Gen 3制造过程的比较

[2120]

步骤	过程（Gen 2）	过程（Gen 3）
Pre REP-第0天	至多 50 个碎片/1-G-Rex 100MCS-11天 在 1 L CM1 培养基中 + IL-2 (6000 IU/mL)	整个肿瘤至多 120 个碎片，均匀分到至多 3 个烧瓶。1 个烧瓶：1-60 个碎片 2 个烧瓶：61-89 个碎片 3 个烧瓶：90-120 个碎片 7 天，在 500 mL CM1 培养基中 + IL-2 (6000 IU/mL) 2.5×10^8 个饲养细胞/烧瓶 15ug OKT-3/烧瓶
开始 REP	直接进行 REP-第 11 天- $<200\times10^6$ 个 TIL (1)G-Rex 500MCS，在 5L CM2 培养基中 IL-2 (3000 IU/mL) 5×10^9 个饲养细胞 150ug OKT-3	直接进行 REP-第 7 天-所有细胞 TIL-同一 G-Rex 100MCS 添加 500 CM2 培养基 IL-2 (6000 IU/mL) 5×10^8 个饲养细胞/烧瓶 30ug OKT-3/烧瓶
TIL 增殖或按比例扩增	减少体积，将细胞部分分到至多 5 个 G-REX 500MCS 中 4.5L CM4 培养基+ IL-2 (3000 IU/mL) $\geq 1\times10^9$ 个 TVC/烧瓶 第 16 天分开	每个 G-REX 100MCS(1L)转移至 1 个 G-REX 500MCS 添加 4L CM4 培养基+IL-2 (3000 IU/mL) 按比例扩增，第 9-11 天
收获	第 22 天收获 LOVO-自动细胞洗涤仪	第 16 天收获 LOVO-自动细胞洗涤仪
最终制剂	冷冻保存的产品 在 LN_2 中的 300 IU/mL IL2-CS10， 多个等分试样	冷冻保存的产品 在 LN_2 中的 300 IU/mL IL-2-CS10， 多个等分试样
过程时间	**22 天**	**16 天**

[2121]

[2122] 在第0天,对于两个过程,将肿瘤洗涤3次并且将碎片随机化并分成两个池;每个过程一个池。对于Gen 2过程,将碎片转移到一个装有1L含有6,000IU/mL rhIL-2的CM1培养基的GREX 100MCS烧瓶中。对于Gen 3过程,将碎片转移到一个GRex100MCS烧瓶中,该烧瓶中装有500mL CM1,其中,含有6,000IU/mL rhIL-2、15μg OKT-3和2.5×10^8个饲养细胞。根据每个过程,在Rep开始日的TIL接种发生在不同的日期。对于Gen2过程,其中,G-REX 100MCS烧瓶的体积减少了90％,将收集的细胞悬液转移到新的G-REX 500MCS中,以在第11天开始在含有IL-2(3000IU/mL),再加上5×10^9饲养细胞和OKT-3(30ng/mL)。每个实验方案中,将细胞扩增,并在第16天分到多个GREX 500MCS烧瓶中,GREX 500MCS烧瓶含有具有IL-2(3000IU/mL)的CM4培养基。然后收集培养物,并在每个实验方案的第22天冷冻保存。对于

GEN 3过程,REP的开始发生在第7天,其中,用于REP开始的G-REX 100MCS相同。简而言之,将500mL含有IL-2(6000IU/mL)的CM2培养基和5×10^8个带有30μg OKT-3的饲养细胞加入每个烧瓶中。在第9-11天,扩大了培养规模。将全部体积的G-Re×100M(1L)转移到G-REX 500MCS,然后添加4L含有IL-2(3000IU/mL)的CM4。将烧瓶孵育5天。在第16天收获培养物并冷冻保存。

[2123] 比较三种不同的肿瘤:两种肺肿瘤(L4054和L4055)和一种黑色素瘤肿瘤(M1085T)。

[2124] 预先制备CM1(培养基1)、CM2(培养基2)和CM4(培养基4)培养基,并在4℃下保存L4054和L4055。制备不过滤的CM1和CM2培养基,以比较培养基过滤和不过滤的细胞生长情况。

[2125] 在REP开始和按比例扩增时,将L4055肿瘤的培养基提前在37℃加热多达24小时。

[2126] 结果概述

[2127] 对于获得的总存活细胞,Gen 3落入Gen 2的30%以内。Gen 3终产物在再刺激后表现出更高的INF-γ产生。通过存在的总独特CDR3序列测量,Gen 3终产物表现出增加的克隆多样性。Gen 3终产物表现出更长的平均端粒长度。

[2128] 所得结果

[2129] 细胞计数和活力百分比:

[2130] 根据上述详细描述,在Gen 2和Gen 3过程中进行pre-REP和REP扩增。

[2131] 表37:pre-REP细胞计数。对于每个肿瘤,两个池包含相等数量的碎片。由于肿瘤小,未能达到每个烧瓶的最大碎片数。收集总的pre-REP细胞(TVC),并在Gen2过程的第11天和Gen 3过程的第7天进行计数。为了比较两个pre-REP臂,将细胞计数除以培养物中提供的碎片数,以计算每个碎片的存活细胞的平均值。如下表所示,与Gen 3过程相比,Gen 2过程中每个碎片生长的细胞一直更多。外推计算Gen 3过程的第11天预期的TVC数量,其通过将pre-REP TVC除以7然后乘以11得到。

[2132] 表37:pre-REP细胞计数

[2133]

肿瘤 ID	**L4054**		**L4055***		**M1085T**	
过程	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
pre-REP TVC	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
碎片数量	21	21	24	24	16	16
pre-REP 的平均 TVC/碎片	6.65E+06	2.06E+06	1.12E+06	5.75E+05	7.66E+05	2.18E+05
Gen 3 在 pre REP 第 11 天的外推值	N/A	6.79E+07	N/A	2.17E+07	N/A	5.49E+06

[2134] *L4055:未经过滤的培养基。

[2135] 表38:TIL终产物的总活细胞计数和倍数扩增:对于Gen 2过程和Gen 3过程,对每个过程条件的TVC进行计数,在该过程的每一天中产生活细胞百分比。收获时,收集第22天(Gen 2)和第16天(Gen 3)细胞,建立TVC计数。然后将TVC除以在第0天提供的碎片数,以计算每个碎片的活细胞的平均值。通过用收获TVC除以REP起始TVC来计算倍数扩增。如表所示,比较Gen 2和Gen 3,L4054的扩增倍数相似;在L4055的情况下,Gen 2过程的倍数扩增更

高。具体而言,在这种情况下,在REP开始日之前提前24预热培养基。对于M1085T,在Gen 3中也观察到更高的倍数扩增。外推计算Gen 3过程的第22天预期的TVC数量,其通过将REP TVC除以16然后乘以22得到。

[2136] 表38:TIL终产物的活细胞总数和倍数扩增

[2137]

肿瘤 ID	L4054		L4055		M1085T	
过程	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
碎片#	21	21	24	24	16	16
TVC/碎片（收获时）	3.18E+09	8.77E+08	2.30E+09	3.65E+08	7.09E+08	4.80E+08
REP 开始	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
按比例扩增	3.36E+09	9.35E+08	3.49E+09	8.44E+08	1.99E+09	3.25E+08
收获	6.67E+10	1.84E+10	5.52E+10	8.76E+09	1.13E+10	7.68E+09
倍数扩增收获/REP 开始	468.4	425.9	2056.8	634.6	925.0	2197.2
Gen 3 在 REP 收获第 22 天的外推值	N/A	2.53E+10	N/A	1.20E+10	N/A	1.06E+10

[2138] *L4055:未经过滤的培养基。

[2139] 表39:TIL终产物的活力(%):收获后,将最终TIL REP产物的%活力与发布标准进行比较。Gen 2和Gen 3过程的所有条件均超过70%的活力标准,且各个过程和肿瘤之间相当。

[2140] 表39:REP的活力(%)

[2141]

肿瘤 ID	L4054		L4055		M1085T	
过程	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
REP 开始	98.23%	97.97%	97.43%	92.03%	81.85%	68.27%
按比例扩增	94.00%	93.57%	90.50%	95.93%	78.55%	71.15%
收获	87.95%	89.85%	87.50%	86.70%	86.10%	87.45%

[2142] 表40:Gen 3过程的估计的细胞计数/其他烧瓶。由于每个烧瓶中的碎片数低于最大所需数量,因此针对每个肿瘤在收获日计算出估计的细胞数。该估计基于对临床肿瘤足够大以在第0天接种2或3个烧瓶的期望。

[2143] 表40:Gen 3过程的外推估算的细胞计数至满刻度2和3个烧瓶

[2144]

肿瘤 ID	L4054		L4055		M1085T	
Gen 3 过程	2 个烧瓶	3 个烧瓶	2 个烧瓶	3 个烧瓶	2 个烧瓶	3 个烧瓶
估计收获	3.68E+10	5.52E+10	1.75E+10	2.63E+10	1.54E+10	2.30E+10

[2145] 免疫表型检查

[2146] TIL终产物的表型标志物比较:

[2147] 在Gen 2和Gen 3过程中,三个肿瘤L4054、L4055和M1085T经历了TIL扩增。收获后,

对REP TIL终产物进行流式细胞仪分析,以测试纯度、分化和记忆标志物。对于所有条件,TCR a/b+细胞的百分比均超过90%。

[2148] 与从Gen 2过程收获的TIL相比,从Gen 3过程收获的TIL显示出更高的CD8和CD28表达。Gen 2过程显示出更高百分比的CD4+。参见图3(A,B,C)。

[2149] TIL终产物的记忆标志物比较:

[2150] 与来自Gen 2过程的TIL相比,从Gen 3过程收获的TIL的中枢记忆细胞显示出更高的表达。参见图4(A,B,C)。

[2151] TIL终产物的活化标志物和耗竭标志物比较:

[2152] 在来自两个肿瘤L4054和L4055的TIL中分析活化和耗竭标志物,以比较来自Gen 2和Gen 3TIL扩增过程的最终TIL产物。Gen 2过程和Gen 3过程的活化和耗竭标志物相当。参见图5(A,B);图6(A,B)。

[2153] 再刺激后干扰素γ分泌:

[2154] 在收获日(Gen 2的第22天和Gen 3的第16天),用包被的抗CD3板对L4054和L4055进行TIL再刺激过夜。使用抗CD3、CD28和CD137磁珠对M1085T进行再刺激。在所有条件下再刺激24小时后收集上清液,冷冻上清液。使用相同的ELISA板,通过ELISA评估同时来自两个过程的上清液的IFNγ分析。在分析的三个肿瘤中,观察到Gen 3过程产生的IFNγ更高。参见图7(A,B,C)。

[2155] 培养基中IL-2水平的测量:

[2156] 为比较Gen 2过程和Gen 3过程之间的IL-2消耗,在REP开始、按比例扩增和收获当天,收集肿瘤L4054和L4055的细胞上清液。通过R&D的Quantitate ELISA试剂盒测量细胞培养上清液中IL-2的量。总体趋势表明,与Gen 2过程相比,Gen 3过程中IL-2的浓度保持较高。这可能是由于Gen 3的REP开始时IL-2浓度较高(6000IU/mL),加上整个过程中培养基的残留。参见图8(A,B)。

[2157] 代谢底物和代谢物分析

[2158] 测量代谢底物(例如D-葡萄糖和L-谷氨酰胺)的水平作为总培养基消耗的替代物。测量它们的相互代谢物(reciprocal metabolite),例如乳酸和氨。葡萄糖是培养基中的单糖,线粒体利用它来产生ATP形式的能量。当葡萄糖被氧化时,产生乳酸(乳酸酯是乳酸的酯)。乳酸酯在细胞指数生长期强烈产生。高水平的乳酸酯对细胞培养过程具有负面影响。参见图9(A,B)。

[2159] 在Gen 2和Gen 3过程的REP开始、按比例扩增和收获日收集L4054和L4055的废弃培养基。在第11天、第16天和第22天收集Gen 2的废弃培养基;在第7天、第11天和第16天收集Gen 3的废弃培养基。在CEDEX生物分析仪上分析上清液中葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺、谷氨酰胺和氨的浓度。

[2160] L-谷氨酰胺是细胞培养基制剂中所需的不稳定的必需氨基酸。谷氨酰胺含有胺,并且该酰胺结构基团可以转运氮并将氮输送至细胞。当L-谷氨酰胺氧化时,细胞会产生有毒的氨副产物。为抵消L-谷氨酰胺的降解,在Gen 2过程和Gen 3过程的培养基中添加Glutamax,其在水溶液中更稳定并且不会自发降解。在这两个肿瘤系中,GEN 3臂在整个过程中L-谷氨酰胺和Glutamax减少,氨在整个REP中增加。在Gen 2臂中,观察到恒定浓度的L-谷氨酰胺和Glutamax,并且氨的产量略有增加。GEN 2过程和GEN 3过程在收获日的氨气相

当,并且L-谷氨酰胺降解略有差异。参见图10(A,B,C)。

[2161] 通过Flow-FISH检测端粒重复数:

[2162] 使用Flow-FISH技术测量在Gen 2过程和Gen 3过程下L4054和L4055的端粒重复序列的平均长度。使用端粒PNA试剂盒/FITC从DAKO进行流式细胞术分析,计算相对端粒长度(RTL)。Gen 3显示出与Gen 2相当的端粒长度。

[2163] CD3分析

[2164] 为了确定在每个过程中产生的细胞产物的克隆多样性,针对L4054和L4055收获的TIL终产物进行采样,并通过对T细胞受体的CDR3部分进行测序分析,对其进行克隆多样性分析。

[2165] 表41:L4054的TIL收获细胞产物的Gen 2和Gen 3的共享独特CDR3序列百分比的比较。Gen 3和Gen 2终产物之间共享199个序列,对应地Gen 2的独特CDR3序列的前80%与Gen 3终产物共享97.07%。

[2166] 表41:L4054的Gen 2和Gen 3过程共享的uCDR3序列的比较

[2167]

# uCDR3 (%重叠)	所有 uCDR3		前 80%uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4054	8915	4355 (48.85%)	205	199 (97.07%)
Gen 3-L4054	-	18130	-	223

[2168] 表42:L4055的TIL收获细胞产物的Gen 2和Gen 3的共享独特CDR3序列百分比的比较。Gen 3和Gen 2终产物之间共享1833个序列,对应地Gen 2的独特CDR3序列的前80%与Gen 3终产物共享99.45%。

[2169] 表42:L4055的Gen 2和Gen 3过程共享的uCDR3序列的比较

[2170]

# uCDR3 (%重叠)	所有 uCDR3		前 80%uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4055	12996	6599 (50.77%)	1843	1833 (99.45%)
Gen 3-L4055	-	27246	-	2616

[2171] 预先制备CM1和CM2培养基,不进行过滤,并保持在4℃下直至用于肿瘤L4055,以用于Gen 2过程和Gen 3过程。

[2172] 在Gen 2过程和Gen 3过程的REP起始日,针对肿瘤L4055,将培养基提前在37℃加热24小时。

[2173] 未测量在该过程中收集的上清液中的LDH。

[2174] M1085T TIL细胞计数使用K2Cellometer细胞计数器进行。

[2175] 在肿瘤M1085T上,无法获取样品(例如用于代谢分析的上清液,用于活化和耗竭标志物分析、端粒长度和CD3-TCR vb分析的TIL产物)。

[2176] 结论

[2177] 本实施例在Gen 2过程和Gen 3过程中的功能质量属性、扩增的表型表征和培养基消耗方面比较了3个独立的供体肿瘤组织。

[2178] 针对产生的总活细胞和总有核细胞群的活力,评估了Gen 2和Gen 3pre-REP和REP扩增的比较。Gen 2(22天)和Gen 3(16天)之间,收获日的TVC细胞剂量不相当。Gen 3细胞的剂量低于Gen 2在收获时收集的活细胞总数的约40％。

[2179] 假设第11天而非第7天进行REP收获,第22天而非第16天进行REP收获,计算Gen 3过程的推算细胞数。在两种情况下,与Gen 2过程相比,TVC数更接近,表明早期活化可以使TIL的生长总体上表现更好。表4和5底行。

[2180] 在Gen 3过程的额外烧瓶(2或3)的外推值的情况下,假定处理的肿瘤尺寸更大,并达到所述每个过程所需的最大碎片数。观察到,与第22天的Gen 2过程相比,在Gen 3过程的第16天收获的TVC剂量可达到相似。这一观察结果很重要,表明培养物的早期活化可以在更短的处理时间内实现更好的TIL性能。

[2181] 针对产生的总活细胞和总有核细胞群的活力,评估了Gen 2和Gen 3pre-REP和REP扩增的比较。Gen 2(22天)和Gen 3(16天)之间,收获日的TVC细胞剂量不相当。Gen 3细胞的剂量低于Gen 2在收获时收集的活细胞总数的约40％。

[2182] 就表型表征而言,与Gen 2过程相比,在Gen 3过程中在三个肿瘤上观察到更高的CD8+和CD28+表达。该数据表明,与Gen 2相比,Gen 3过程具有更好的最终TIL产物属性。

[2183] 与Gen 2过程相比,Gen 3过程显示出稍高的中枢记忆细胞。

[2184] 尽管GEN 3过程的持续时间较短,但是Gen 2和Gen 3过程显示出相当的活化标志物和耗竭标志物。

[2185] 在所分析的三个肿瘤中,Gen 3终产物的IFNγ(IFNγ)产生比Gen 2高3倍。此数据表明,与Gen 2过程相比,Gen 3过程产生了功能更强大的TIL产物,这可能是由于Gen 3的CD8和CD28表达更高。表型表征表明,与Gen 2过程相比,Gen 3中三种肿瘤的CD8+、CD28+表达更积极。

[2186] Gen 2和Gen 3的TIL终产物的端粒长度相当。

[2187] Gen 2和Gen 3终产物的葡萄糖和乳酸水平相当,表明Gen 3过程的培养基的营养水平没有受到与Gen 2相比在该过程的每一天中不进行体积减少去除和此过程中整体培养基体积更少的影响。

[2188] 与Gen 2过程相比,Gen 3过程总体减少了将近两倍的处理时间,这将大大降低Gen 3过程扩增的TIL产物的商品成本(COG)。

[2189] IL-2消耗指示Gen 2过程中IL-2消耗的总体趋势,并且在Gen 3过程中,IL-2由于未去除旧培养基而更高。

[2190] Gen 3过程显示了通过CDR3TCRab序列分析测量的更高的克隆多样性。

[2191] 在pre-REP的第0天添加饲养细胞和OKT-3允许使用Gen 3过程提早活化TIL并且总体上具有更好的生长TIL性能。

[2192] 表43描述了与当前的Gen 2过程相比,Gen 3过程的各种实施方式和结果:

[2193] 表43:示例性GEN 3过程

[2194]

步骤	过程 Gen 2	过程 Gen 3
Pre REP-第0天	≤50 个碎片 1X G-Rex 100MCS 1L 培养基 IL-2 (6000 IU/mL) 11 天	≤240 个碎片 ≤60 个碎片/烧瓶 ≤4 个烧瓶 ≤2L 培养基(500 mL/烧瓶) IL-2 (6000 IU/mL) 2.5×10^8 饲养细胞/烧瓶 15μg OKT3/烧瓶
REP 开始	新鲜 TIL 直接进行 REP 第 11 天 ≤200×10^6 活细胞 5×10^9 饲养细胞 G-Rex 500MCS 5L CM2 培养基+ IL-2 (3000 IU/mL) 150μg OKT3	新鲜 TIL 直接进行 REP 第 7 天 活化全部培养物 5×10^8 饲养细胞 30 μg OKT3/烧瓶 G-Rex 100MCS 500 mL 培养基+ IL-2(6000 IU/mL)
TIL 亚培养（sub-culture）或按比例扩增	≤5 G-REX 500MCS ≤1×10 活细胞/烧瓶 5L/烧瓶 第 16 天	≤4 G-REX 500MCS 按比例扩增全部培养物 4L/烧瓶 第 10-11 天

[2195]

收获	第 22 天收获 LOVO-自动细胞洗涤仪 2 个洗涤周期	第 16 天收获 LOVO-自动细胞洗涤仪 5 个洗涤周期
最终制剂	冷冻保存的产物 在 LN_2 中的 300 IU/mL IL2-CS10 多个等分试样	冷冻保存的产物 在 LN_2 中的 300 IU/mL IL-2-CS10 多个等分试样
过程时间	**22 天**	**16 天**

[2196] 提供以上提出的实施例是为了向本领域普通技术人员提供关于如何制备和使用本发明的组合物、系统和方法的实施方案的完整公开和描述，并不意图限制发明人认为是其发明。对于本领域技术人员显而易见的用于实施本发明的上述模式的修改旨在落入所附权利要求的范围内。本说明书中提及的所有专利和出版物表示本发明所属领域的技术人员的技术水平。本公开中引用的所有参考文献均以引用方式并入，其程度如同每篇参考文献已单独地通过引用整体并入。

[2197] 已成功由胰腺肿瘤分离出的核心活检物扩增了TIL。TIL也由某些肿瘤类型的FNA扩增而来。在这项研究中，未观察到卵巢肿瘤(n＝3)和结直肠肿瘤(n＝1)的TIL生长。从肺肿瘤、黑色素瘤和宫颈肿瘤获得的FNA观察到TIL的生长。目前正在进行来自第一次扩增和第二次扩增的TIL群的表型分析和功能分析。该研究的数据表明，pre-REP抽吸物中存在大量CD4+和CD8+T细胞。

[2198] 所有标题和小节名称仅用于清楚和参照目的，并不以任何方式视为限制。例如，本

领域技术人员将理解,根据本文所述本发明的精神和范围,适当地组合来自不同标题和小节的各个方面的有效性。

[2199] 本文引用的所有参考文献通过引用整体并入本文,并且出于所有目的,其程度如同每个单独的出版物或专利申请被明确地和单独地指出通过引用整体并入用于所有目的。

[2200] 在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可对本申请进行许多修改和变化,这对本领域技术人员来说是显而易见的。这里描述的特定的实施方式和实施例仅作为示例提供,并且本申请仅受所附权利要求以及权利要求所赋予的等同物的全部范围的限制。

[0001] 序列表

[0002] <110> 艾欧凡斯生物治疗公司(Iovance Biotherapeutics, Inc.)

[0003] <120> 由细针抽吸物和小活检物扩增TIL

[0004] <130> 116983-5033

[0005] <150> US 62/588,044

[0006] <151> 2017-11-17

[0007] <150> US 62/621,515

[0008] <151> 2018-01-24

[0009] <150> US 62/756,038

[0010] <151> 2018-11-05

[0011] <160> 126

[0012] <170> PatentIn Version 3.5

[0013] <210> 1

[0014] <211> 450

[0015] <212> PRT

[0016] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0017] <220>

[0018] <223> 莫罗单抗的重链

[0019] <400> 1

[0020] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala

[0021] 1 5 10 15

[0022] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr

[0023] 20 25 30

[0024] Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

[0025] 35 40 45

[0026] Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

[0027] 50 55 60

[0028] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

[0029] 65 70 75 80

[0030] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

[0031] 85 90 95

[0032] Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

[0033] 100 105 110

[0034] Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr

[0035] 115 120 125

[0036] Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Gly Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu

[0037] 130 135 140

[0038] Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp

[0039] 145 150 155 160

[0040] Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

[0041] 165 170 175

[0042] Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser

[0043] 180 185 190

[0044] Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser

[0045] 195 200 205

[0046] Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Pro Lys Ser Cys Asp

[0047] 210 215 220

[0048] Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

[0049] 225 230 235 240

[0050] Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

[0051] 245 250 255

[0052] Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

[0053] 260 265 270

[0054] Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

[0055] 275 280 285

[0056] Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

[0057] 290 295 300

[0058] Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

[0059] 305 310 315 320

[0060] Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

[0061] 325 330 335

[0062] Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

[0063] 340 345 350

[0064] Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

[0065] 355 360 365

[0066] Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

[0067] 370 375 380

[0068] Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

[0069] 385 390 395 400

[0070] Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

[0071] 405 410 415

[0072] Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

[0073] 420 425 430

[0074] Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

[0075] 435 440 445

[0076] Gly Lys

[0077] 450

[0078] <210> 2

[0079] <211> 213

[0080] <212> PRT

[0081] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0082] <220>

[0083] <223> 莫罗单抗的轻链

[0084] <400> 2

[0085] Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly

[0086] 1 5 10 15

[0087] Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

[0088] 20 25 30

[0089] Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

[0090] 35 40 45

[0091] Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser

[0092] 50 55 60

[0093] Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu

[0094] 65 70 75 80

[0095] Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr

[0096] 85 90 95

[0097] Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Ala Asp Thr Ala Pro

[0098] 100 105 110

[0099] Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly

[0100] 115 120 125

[0101] Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn

[0102] 130 135 140

[0103] Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn

[0104] 145 150 155 160

[0105] Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser

[0106] 165 170 175

[0107] Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr

[0108] 180 185 190

[0109] Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe

[0110] 195 200 205

[0111] Asn Arg Asn Glu Cys

[0112] 210

[0113] <210> 3

[0114] <211> 134

[0115] <212> PRT

[0116] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0117] <220>

[0118] <223> 重组人IL-2 (rhIL-2)

[0119] <400> 3

[0120] Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu

[0121] 1 5 10 15

[0122] His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr

[0123] 20 25 30

[0124] Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro

[0125] 35 40 45

[0126] Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu

[0127] 50 55 60

[0128] Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His

[0129] 65 70 75 80

[0130] Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu

[0131] 85 90 95

[0132] Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr

[0133] 100 105 110

[0134] Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser

[0135] 115 120 125

[0136] Ile Ile Ser Thr Leu Thr

[0137] 130

[0138] <210> 4

[0139] <211> 132

[0140] <212> PRT

[0141] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0142] <220>

[0143] <223> 阿地白介素

[0144] <400> 4

[0145] Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu

[0146] 1 5 10 15

[0147] Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn

[0148] 20 25 30

[0149] Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys

[0150] 35 40 45

[0151] Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro

[0152] 50 55 60

[0153] Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg

[0154] 65 70 75 80

[0155] Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys

[0156] 85 90 95

[0157] Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr

[0158] 100 105 110

[0159] Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile

[0160] 115 120 125

[0161] Ser Thr Leu Thr

[0162] 130

[0163] <210> 5

[0164] <211> 130

[0165] <212> PRT

[0166] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0167] <220>

[0168] <223> 重组人IL-4

[0169] <400> 5

[0170] Met His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn

[0171] 1 5 10 15

[0172] Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp

[0173] 20 25 30

[0174] Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg

[0175] 35 40 45

[0176] Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr

[0177] 50 55 60

[0178] Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu

[0179] 65 70 75 80

[0180] Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly

[0181] 85 90 95

[0182] Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn

[0183] 100 105 110

[0184] Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys

[0185] 115 120 125

[0186] Ser Ser

[0187] 130

[0188] <210> 6

[0189] <211> 153

[0190] <212> PRT

[0191] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0192] <220>

[0193] <223> 重组人IL-7 (rhIL-7)

[0194] <400> 6

[0195] Met Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val
[0196] 1 5 10 15
[0197] Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly
[0198] 20 25 30
[0199] Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys
[0200] 35 40 45
[0201] Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu
[0202] 50 55 60
[0203] Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu
[0204] 65 70 75 80
[0205] Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln
[0206] 85 90 95
[0207] Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys
[0208] 100 105 110
[0209] Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp
[0210] 115 120 125
[0211] Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn
[0212] 130 135 140
[0213] Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
[0214] 145 150
[0215] <210> 7
[0216] <211> 115
[0217] <212> PRT
[0218] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0219] <220>
[0220] <223> 重组人IL-15 (rhIL-15)
[0221] <400> 7
[0222] Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
[0223] 1 5 10 15
[0224] Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
[0225] 20 25 30
[0226] His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
[0227] 35 40 45
[0228] Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
[0229] 50 55 60
[0230] Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
[0231] 65 70 75 80
[0232] Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
[0233] 85 90 95

[0234] Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
[0235] 100 105 110
[0236] Asn Thr Ser
[0237] 115
[0238] <210> 8
[0239] <211> 132
[0240] <212> PRT
[0241] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0242] <220>
[0243] <223> 重组人IL-21 (rhIL-21)
[0244] <400> 8
[0245] Met Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val
[0246] 1 5 10 15
[0247] Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro
[0248] 20 25 30
[0249] Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys
[0250] 35 40 45
[0251] Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg
[0252] 50 55 60
[0253] Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr
[0254] 65 70 75 80
[0255] Asn Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp
[0256] 85 90 95
[0257] Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser
[0258] 100 105 110
[0259] Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly
[0260] 115 120 125
[0261] Ser Glu Asp Ser
[0262] 130
[0263] <210> 9
[0264] <211> 255
[0265] <212> PRT
[0266] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0267] <220>
[0268] <223> 人4-1BB,肿瘤坏死因子受体超家族,成员9
[0269] (智人(Homo sapiens))
[0270] <400> 9
[0271] Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
[0272] 1 5 10 15

[0273] Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
[0274] 20 25 30
[0275] Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
[0276] 35 40 45
[0277] Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
[0278] 50 55 60
[0279] Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
[0280] 65 70 75 80
[0281] Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
[0282] 85 90 95
[0283] Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
[0284] 100 105 110
[0285] Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
[0286] 115 120 125
[0287] Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
[0288] 130 135 140
[0289] Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
[0290] 145 150 155 160
[0291] Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
[0292] 165 170 175
[0293] Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu
[0294] 180 185 190
[0295] Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
[0296] 195 200 205
[0297] Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
[0298] 210 215 220
[0299] Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
[0300] 225 230 235 240
[0301] Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
[0302] 245 250 255
[0303] <210> 10
[0304] <211> 256
[0305] <212> PRT
[0306] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0307] <220>
[0308] <223> 鼠4-1BB,肿瘤坏死因子受体超家族,成员9
[0309] (小家鼠(Mus musculus))
[0310] <400> 10
[0311] Met Gly Asn Asn Cys Tyr Asn Val Val Val Ile Val Leu Leu Leu Val

[0312] 1 5 10 15

[0313] Gly Cys Glu Lys Val Gly Ala Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln

[0314] 20 25 30

[0315] Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro

[0316] 35 40 45

[0317] Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys

[0318] 50 55 60

[0319] Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr

[0320] 65 70 75 80

[0321] His Asn Ala Glu Cys Glu Cys Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro

[0322] 85 90 95

[0323] Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr

[0324] 100 105 110

[0325] Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn

[0326] 115 120 125

[0327] Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg

[0328] 130 135 140

[0329] Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro

[0330] 145 150 155 160

[0331] Pro Val Val Ser Phe Ser Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu

[0332] 165 170 175

[0333] Gly Gly Pro Gly Gly His Ser Leu Gln Val Leu Thr Leu Phe Leu Ala

[0334] 180 185 190

[0335] Leu Thr Ser Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ile Phe Ile Thr Leu Leu Phe

[0336] 195 200 205

[0337] Ser Val Leu Lys Trp Ile Arg Lys Lys Phe Pro His Ile Phe Lys Gln

[0338] 210 215 220

[0339] Pro Phe Lys Lys Thr Thr Gly Ala Ala Gln Glu Glu Asp Ala Cys Ser

[0340] 225 230 235 240

[0341] Cys Arg Cys Pro Gln Glu Glu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Glu Leu

[0342] 245 250 255

[0343] <210> 11

[0344] <211> 441

[0345] <212> PRT

[0346] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0347] <220>

[0348] <223> 乌托鲁单抗的重链

[0349] <400> 11

[0350] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

[0351] 1 5 10 15

[0352] Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr

[0353] 20 25 30

[0354] Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

[0355] 35 40 45

[0356] Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe

[0357] 50 55 60

[0358] Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

[0359] 65 70 75 80

[0360] Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

[0361] 85 90 95

[0362] Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

[0363] 100 105 110

[0364] Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala

[0365] 115 120 125

[0366] Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

[0367] 130 135 140

[0368] Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

[0369] 145 150 155 160

[0370] Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

[0371] 165 170 175

[0372] Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe

[0373] 180 185 190

[0374] Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr

[0375] 195 200 205

[0376] Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro

[0377] 210 215 220

[0378] Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

[0379] 225 230 235 240

[0380] Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

[0381] 245 250 255

[0382] Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp

[0383] 260 265 270

[0384] Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

[0385] 275 280 285

[0386] Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val

[0387] 290 295 300

[0388] His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

[0389] 305 310 315 320

[0390] Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
[0391] 325 330 335
[0392] Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
[0393] 340 345 350
[0394] Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
[0395] 355 360 365
[0396] Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
[0397] 370 375 380
[0398] Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
[0399] 385 390 395 400
[0400] Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
[0401] 405 410 415
[0402] Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
[0403] 420 425 430
[0404] Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0405] 435 440
[0406] <210> 12
[0407] <211> 214
[0408] <212> PRT
[0409] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0410] <220>
[0411] <223> 乌托鲁单抗的轻链
[0412] <400> 12
[0413] Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
[0414] 1 5 10 15
[0415] Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
[0416] 20 25 30
[0417] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
[0418] 35 40 45
[0419] Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
[0420] 50 55 60
[0421] Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
[0422] 65 70 75 80
[0423] Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
[0424] 85 90 95
[0425] Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
[0426] 100 105 110
[0427] Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
[0428] 115 120 125

[0429] Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
[0430] 130 135 140
[0431] Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
[0432] 145 150 155 160
[0433] Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
[0434] 165 170 175
[0435] Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
[0436] 180 185 190
[0437] Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
[0438] 195 200 205
[0439] Ala Pro Thr Glu Cys Ser
[0440] 210
[0441] <210> 13
[0442] <211> 116
[0443] <212> PRT
[0444] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0445] <220>
[0446] <223> 乌托鲁单抗的重链可变区
[0447] <400> 13
[0448] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
[0449] 1 5 10 15
[0450] Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
[0451] 20 25 30
[0452] Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
[0453] 35 40 45
[0454] Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
[0455] 50 55 60
[0456] Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
[0457] 65 70 75 80
[0458] Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
[0459] 85 90 95
[0460] Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[0461] 100 105 110
[0462] Thr Val Ser Ser
[0463] 115
[0464] <210> 14
[0465] <211> 108
[0466] <212> PRT
[0467] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0468] <220>

[0469] <223> 乌托鲁单抗的轻链可变区

[0470] <400> 14

[0471] Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

[0472] 1 5 10 15

[0473] Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala

[0474] 20 25 30

[0475] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

[0476] 35 40 45

[0477] Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

[0478] 50 55 60

[0479] Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met

[0480] 65 70 75 80

[0481] Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu

[0482] 85 90 95

[0483] Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

[0484] 100 105

[0485] <210> 15

[0486] <211> 6

[0487] <212> PRT

[0488] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0489] <220>

[0490] <223> 乌托鲁单抗的重链CDR1

[0491] <400> 15

[0492] Ser Thr Tyr Trp Ile Ser

[0493] 1 5

[0494] <210> 16

[0495] <211> 17

[0496] <212> PRT

[0497] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0498] <220>

[0499] <223> 乌托鲁单抗的重链CDR2

[0500] <400> 16

[0501] Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

[0502] 1 5 10 15

[0503] Gly

[0504] <210> 17

[0505] <211> 8

[0506] <212> PRT

[0507] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0508] <220>

[0509] <223> 乌托鲁单抗的重链CDR3

[0510] <400> 17

[0511] Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr

[0512] 1 5

[0513] <210> 18

[0514] <211> 11

[0515] <212> PRT

[0516] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0517] <220>

[0518] <223> 乌托鲁单抗的轻链CDR1

[0519] <400> 18

[0520] Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala His

[0521] 1 5 10

[0522] <210> 19

[0523] <211> 7

[0524] <212> PRT

[0525] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0526] <220>

[0527] <223> 乌托鲁单抗的轻链CDR2

[0528] <400> 19

[0529] Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser

[0530] 1 5

[0531] <210> 20

[0532] <211> 11

[0533] <212> PRT

[0534] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0535] <220>

[0536] <223> 乌托鲁单抗的轻链CDR3

[0537] <400> 20

[0538] Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu Ala Val

[0539] 1 5 10

[0540] <210> 21

[0541] <211> 448

[0542] <212> PRT

[0543] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0544] <220>

[0545] <223> 乌瑞鲁单抗的重链

[0546] <400> 21

[0547] Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
[0548] 1 5 10 15

[0549] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
[0550] 20 25 30

[0551] Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[0552] 35 40 45

[0553] Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu
[0554] 50 55 60

[0555] Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
[0556] 65 70 75 80

[0557] Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[0558] 85 90 95

[0559] Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
[0560] 100 105 110

[0561] Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0562] 115 120 125

[0563] Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
[0564] 130 135 140

[0565] Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
[0566] 145 150 155 160

[0567] Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
[0568] 165 170 175

[0569] Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[0570] 180 185 190

[0571] Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
[0572] 195 200 205

[0573] Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
[0574] 210 215 220

[0575] Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
[0576] 225 230 235 240

[0577] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
[0578] 245 250 255

[0579] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
[0580] 260 265 270

[0581] Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[0582] 275 280 285

[0583] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[0584] 290 295 300

[0585] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[0586] 305 310 315 320
[0587] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
[0588] 325 330 335
[0589] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[0590] 340 345 350
[0591] Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
[0592] 355 360 365
[0593] Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[0594] 370 375 380
[0595] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[0596] 385 390 395 400
[0597] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
[0598] 405 410 415
[0599] Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[0600] 420 425 430
[0601] Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[0602] 435 440 445
[0603] <210> 22
[0604] <211> 216
[0605] <212> PRT
[0606] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0607] <220>
[0608] <223> 乌瑞鲁单抗的轻链
[0609] <400> 22
[0610] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0611] 1 5 10 15
[0612] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
[0613] 20 25 30
[0614] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
[0615] 35 40 45
[0616] Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
[0617] 50 55 60
[0618] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
[0619] 65 70 75 80
[0620] Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
[0621] 85 90 95
[0622] Ala Leu Thr Phe Cys Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
[0623] 100 105 110

[0624] Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
[0625] 115 120 125
[0626] Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
[0627] 130 135 140
[0628] Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
[0629] 145 150 155 160
[0630] Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
[0631] 165 170 175
[0632] Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
[0633] 180 185 190
[0634] Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
[0635] 195 200 205
[0636] Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0637] 210 215
[0638] <210> 23
[0639] <211> 120
[0640] <212> PRT
[0641] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0642] <220>
[0643] <223> 乌瑞鲁单抗的重链可变区
[0644] <400> 23
[0645] Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
[0646] 1 5 10 15
[0647] Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
[0648] 20 25 30
[0649] Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
[0650] 35 40 45
[0651] Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
[0652] 50 55 60
[0653] Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro
[0654] 65 70 75 80
[0655] Ser Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
[0656] 85 90 95
[0657] Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
[0658] 100 105 110
[0659] Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Pro
[0660] 115 120
[0661] <210> 24
[0662] <211> 110

[0663] <212> PRT

[0664] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0665] <220>

[0666] <223> 乌瑞鲁单抗的轻链可变区

[0667] <400> 24

[0668] Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

[0669] 1 5 10 15

[0670] Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

[0671] 20 25 30

[0672] Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

[0673] 35 40 45

[0674] Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

[0675] 50 55 60

[0676] Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala

[0677] 65 70 75 80

[0678] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

[0679] 85 90 95

[0680] Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

[0681] 100 105 110

[0682] <210> 25

[0683] <211> 5

[0684] <212> PRT

[0685] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0686] <220>

[0687] <223> 乌瑞鲁单抗的重链CDR1

[0688] <400> 25

[0689] Gly Tyr Tyr Trp Ser

[0690] 1 5

[0691] <210> 26

[0692] <211> 16

[0693] <212> PRT

[0694] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0695] <220>

[0696] <223> 乌瑞鲁单抗的重链CDR2

[0697] <400> 26

[0698] Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser

[0699] 1 5 10 15

[0700] <210> 27

[0701] <211> 13

[0702] <212> PRT

[0703] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0704] <220>

[0705] <223> 乌瑞鲁单抗的重链CDR3

[0706] <400> 27

[0707] Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu

[0708] 1 5 10

[0709] <210> 28

[0710] <211> 11

[0711] <212> PRT

[0712] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0713] <220>

[0714] <223> 乌瑞鲁单抗的轻链CDR1

[0715] <400> 28

[0716] Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

[0717] 1 5 10

[0718] <210> 29

[0719] <211> 7

[0720] <212> PRT

[0721] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0722] <220>

[0723] <223> 乌瑞鲁单抗的轻链CDR2

[0724] <400> 29

[0725] Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

[0726] 1 5

[0727] <210> 30

[0728] <211> 11

[0729] <212> PRT

[0730] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0731] <220>

[0732] <223> 乌瑞鲁单抗的轻链CDR3

[0733] <400> 30

[0734] Gln Gln Arg Ser Asp Trp Pro Pro Ala Leu Thr

[0735] 1 5 10

[0736] <210> 31

[0737] <211> 230

[0738] <212> PRT

[0739] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0740] <220>

[0741] <223> Fc结构域

[0742] <400> 31

[0743] Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

[0744] 1 5 10 15

[0745] Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

[0746] 20 25 30

[0747] Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

[0748] 35 40 45

[0749] Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

[0750] 50 55 60

[0751] Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

[0752] 65 70 75 80

[0753] Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

[0754] 85 90 95

[0755] Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro

[0756] 100 105 110

[0757] Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu

[0758] 115 120 125

[0759] Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn

[0760] 130 135 140

[0761] Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

[0762] 145 150 155 160

[0763] Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

[0764] 165 170 175

[0765] Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

[0766] 180 185 190

[0767] Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

[0768] 195 200 205

[0769] Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

[0770] 210 215 220

[0771] Ser Leu Ser Pro Gly Lys

[0772] 225 230

[0773] <210> 32

[0774] <211> 22

[0775] <212> PRT

[0776] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0777] <220>

[0778] <223> 接头

[0779] <400> 32

[0780] Gly Gly Pro Gly Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
[0781] 1 5 10 15
[0782] Pro Cys Pro Ala Pro Glu
[0783] 20
[0784] <210> 33
[0785] <211> 22
[0786] <212> PRT
[0787] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0788] <220>
[0789] <223> 接头
[0790] <400> 33
[0791] Gly Gly Ser Gly Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
[0792] 1 5 10 15
[0793] Pro Cys Pro Ala Pro Glu
[0794] 20
[0795] <210> 34
[0796] <211> 27
[0797] <212> PRT
[0798] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0799] <220>
[0800] <223> 接头
[0801] <400> 34
[0802] Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys
[0803] 1 5 10 15
[0804] Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
[0805] 20 25
[0806] <210> 35
[0807] <211> 27
[0808] <212> PRT
[0809] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0810] <220>
[0811] <223> 接头
[0812] <400> 35
[0813] Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys
[0814] 1 5 10 15
[0815] Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
[0816] 20 25
[0817] <210> 36
[0818] <211> 29

[0819] <212> PRT

[0820] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0821] <220>

[0822] <223> 接头

[0823] <400> 36

[0824] Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys

[0825] 1 5 10 15

[0826] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

[0827] 20 25

[0828] <210> 37

[0829] <211> 29

[0830] <212> PRT

[0831] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0832] <220>

[0833] <223> 接头

[0834] <400> 37

[0835] Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys

[0836] 1 5 10 15

[0837] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

[0838] 20 25

[0839] <210> 38

[0840] <211> 24

[0841] <212> PRT

[0842] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0843] <220>

[0844] <223> 接头

[0845] <400> 38

[0846] Gly Gly Pro Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ser Asp Lys Thr His Thr

[0847] 1 5 10 15

[0848] Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

[0849] 20

[0850] <210> 39

[0851] <211> 23

[0852] <212> PRT

[0853] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0854] <220>

[0855] <223> 接头

[0856] <400> 39

[0857] Gly Gly Pro Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys

[0858] 1 5 10 15

[0859] Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

[0860] 20

[0861] <210> 40

[0862] <211> 21

[0863] <212> PRT

[0864] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0865] <220>

[0866] <223> 接头

[0867] <400> 40

[0868] Gly Gly Pro Ser Ser Ser Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro

[0869] 1 5 10 15

[0870] Cys Pro Ala Pro Glu

[0871] 20

[0872] <210> 41

[0873] <211> 25

[0874] <212> PRT

[0875] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0876] <220>

[0877] <223> 接头

[0878] <400> 41

[0879] Gly Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Asp Lys Thr His

[0880] 1 5 10 15

[0881] Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

[0882] 20 25

[0883] <210> 42

[0884] <211> 246

[0885] <212> PRT

[0886] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0887] <220>

[0888] <223> Fc结构域

[0889] <400> 42

[0890] Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

[0891] 1 5 10 15

[0892] Ala Gly Asn Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

[0893] 20 25 30

[0894] Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

[0895] 35 40 45

[0896] Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

[0897] 50 55 60

[0898] Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

[0899] 65 70 75 80

[0900] Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

[0901] 85 90 95

[0902] Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

[0903] 100 105 110

[0904] Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

[0905] 115 120 125

[0906] Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

[0907] 130 135 140

[0908] Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys

[0909] 145 150 155 160

[0910] Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

[0911] 165 170 175

[0912] Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

[0913] 180 185 190

[0914] Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

[0915] 195 200 205

[0916] Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

[0917] 210 215 220

[0918] Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

[0919] 225 230 235 240

[0920] Leu Ser Leu Ser Pro Gly

[0921] 245

[0922] <210> 43

[0923] <211> 11

[0924] <212> PRT

[0925] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0926] <220>

[0927] <223> 接头

[0928] <400> 43

[0929] Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

[0930] 1 5 10

[0931] <210> 44

[0932] <211> 12

[0933] <212> PRT

[0934] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0935] <220>

[0936] <223> 接头

[0937] <400> 44

[0938] Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

[0939] 1 5 10

[0940] <210> 45

[0941] <211> 16

[0942] <212> PRT

[0943] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0944] <220>

[0945] <223> 接头

[0946] <400> 45

[0947] Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

[0948] 1 5 10 15

[0949] <210> 46

[0950] <211> 254

[0951] <212> PRT

[0952] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0953] <220>

[0954] <223> 4-1BBL

[0955] <400> 46

[0956] Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro

[0957] 1 5 10 15

[0958] Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val

[0959] 20 25 30

[0960] Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe

[0961] 35 40 45

[0962] Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser

[0963] 50 55 60

[0964] Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp

[0965] 65 70 75 80

[0966] Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val

[0967] 85 90 95

[0968] Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp

[0969] 100 105 110

[0970] Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu

[0971] 115 120 125

[0972] Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe

[0973] 130 135 140

[0974] Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser

[0975] 145 150 155 160
[0976] Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
[0977] 165 170 175
[0978] Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
[0979] 180 185 190
[0980] Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
[0981] 195 200 205
[0982] Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
[0983] 210 215 220
[0984] Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
[0985] 225 230 235 240
[0986] Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
[0987] 245 250
[0988] <210> 47
[0989] <211> 168
[0990] <212> PRT
[0991] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0992] <220>
[0993] <223> 4-1BBL的可溶性结构域
[0994] <400> 47
[0995] Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
[0996] 1 5 10 15
[0997] Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
[0998] 20 25 30
[0999] Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
[1000] 35 40 45
[1001] Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
[1002] 50 55 60
[1003] Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
[1004] 65 70 75 80
[1005] Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
[1006] 85 90 95
[1007] Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
[1008] 100 105 110
[1009] Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
[1010] 115 120 125
[1011] His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
[1012] 130 135 140
[1013] Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala

[1014] 145 150 155 160
[1015] Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
[1016] 165
[1017] <210> 48
[1018] <211> 118
[1019] <212> PRT
[1020] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1021] <220>
[1022] <223> 4B4-1-1版本1的重链可变区
[1023] <400> 48
[1024] Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[1025] 1 5 10 15
[1026] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
[1027] 20 25 30
[1028] Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Val Leu Glu Trp Ile
[1029] 35 40 45
[1030] Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
[1031] 50 55 60
[1032] Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[1033] 65 70 75 80
[1034] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[1035] 85 90 95
[1036] Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
[1037] 100 105 110
[1038] Thr Leu Val Thr Val Ser
[1039] 115
[1040] <210> 49
[1041] <211> 107
[1042] <212> PRT
[1043] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1044] <220>
[1045] <223> 4B4-1-1版本1的轻链可变区
[1046] <400> 49
[1047] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Gln Ser Val Thr Pro Gly
[1048] 1 5 10 15
[1049] Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
[1050] 20 25 30
[1051] Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
[1052] 35 40 45

[1053] Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[1054] 50 55 60
[1055] Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
[1056] 65 70 75 80
[1057] Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro
[1058] 85 90 95
[1059] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1060] 100 105
[1061] <210> 50
[1062] <211> 119
[1063] <212> PRT
[1064] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1065] <220>
[1066] <223> 4B4-1-1版本2的重链可变区
[1067] <400> 50
[1068] Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[1069] 1 5 10 15
[1070] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
[1071] 20 25 30
[1072] Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Val Leu Glu Trp Ile
[1073] 35 40 45
[1074] Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
[1075] 50 55 60
[1076] Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[1077] 65 70 75 80
[1078] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[1079] 85 90 95
[1080] Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
[1081] 100 105 110
[1082] Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
[1083] 115
[1084] <210> 51
[1085] <211> 108
[1086] <212> PRT
[1087] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1088] <220>
[1089] <223> 4B4-1-1版本2的轻链可变区
[1090] <400> 51
[1091] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Gln Ser Val Thr Pro Gly

[1092] 1 5 10 15
[1093] Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
[1094] 20 25 30
[1095] Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
[1096] 35 40 45
[1097] Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[1098] 50 55 60
[1099] Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
[1100] 65 70 75 80
[1101] Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro
[1102] 85 90 95
[1103] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
[1104] 100 105
[1105] <210> 52
[1106] <211> 120
[1107] <212> PRT
[1108] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1109] <220>
[1110] <223> H39E3-2的重链可变区
[1111] <400> 52
[1112] Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
[1113] 1 5 10 15
[1114] Ala His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
[1115] 20 25 30
[1116] Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
[1117] 35 40 45
[1118] Ser Asp Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
[1119] 50 55 60
[1120] Glu Trp Val Ala Asp Ile Lys Asn Asp Gly Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala
[1121] 65 70 75 80
[1122] Pro Ser Leu Thr Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
[1123] 85 90 95
[1124] Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
[1125] 100 105 110
[1126] Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Leu Thr
[1127] 115 120
[1128] <210> 53
[1129] <211> 109
[1130] <212> PRT

[1131] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1132] <220>
[1133] <223> H39E3-2的轻链可变区
[1134] <400> 53
[1135] Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
[1136] 1 5 10 15
[1137] Asp Thr Thr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
[1138] 20 25 30
[1139] Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser
[1140] 35 40 45
[1141] Leu Leu Ser Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Trp Tyr Gln Gln Lys
[1142] 50 55 60
[1143] Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Arg Gln
[1144] 65 70 75 80
[1145] Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
[1146] 85 90 95
[1147] Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
[1148] 100 105
[1149] <210> 54
[1150] <211> 277
[1151] <212> PRT
[1152] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1153] <220>
[1154] <223> 人OX40(智人(Homo sapiens)
[1155] <400> 54
[1156] Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
[1157] 1 5 10 15
[1158] Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
[1159] 20 25 30
[1160] Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
[1161] 35 40 45
[1162] Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
[1163] 50 55 60
[1164] Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
[1165] 65 70 75 80
[1166] Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
[1167] 85 90 95
[1168] Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
[1169] 100 105 110

[1170] Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
[1171] 115 120 125
[1172] Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
[1173] 130 135 140
[1174] Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
[1175] 145 150 155 160
[1176] Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
[1177] 165 170 175
[1178] Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
[1179] 180 185 190
[1180] Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
[1181] 195 200 205
[1182] Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
[1183] 210 215 220
[1184] Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
[1185] 225 230 235 240
[1186] Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
[1187] 245 250 255
[1188] Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
[1189] 260 265 270
[1190] Thr Leu Ala Lys Ile
[1191] 275
[1192] <210> 55
[1193] <211> 272
[1194] <212> PRT
[1195] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1196] <220>
[1197] <223> 鼠OX40(小家鼠(Mus musculus))
[1198] <400> 55
[1199] Met Tyr Val Trp Val Gln Gln Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu
[1200] 1 5 10 15
[1201] Thr Leu Gly Val Thr Ala Arg Arg Leu Asn Cys Val Lys His Thr Tyr
[1202] 20 25 30
[1203] Pro Ser Gly His Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met
[1204] 35 40 45
[1205] Val Ser Arg Cys Asp His Thr Arg Asp Thr Leu Cys His Pro Cys Glu
[1206] 50 55 60
[1207] Thr Gly Phe Tyr Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys
[1208] 65 70 75 80

[1209] Thr Gln Cys Asn His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr
[1210] 85 90 95
[1211] Pro Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg
[1212] 100 105 110
[1213] Gln Asp Ser Gly Tyr Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro
[1214] 115 120 125
[1215] Gly His Phe Ser Pro Gly Asn Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn
[1216] 130 135 140
[1217] Cys Thr Leu Ser Gly Lys Gln Thr Arg His Pro Ala Ser Asp Ser Leu
[1218] 145 150 155 160
[1219] Asp Ala Val Cys Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu
[1220] 165 170 175
[1221] Thr Gln Arg Pro Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Gln Ser Thr Thr Val
[1222] 180 185 190
[1223] Trp Pro Arg Thr Ser Glu Leu Pro Ser Pro Pro Thr Leu Val Thr Pro
[1224] 195 200 205
[1225] Glu Gly Pro Ala Phe Ala Val Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Leu
[1226] 210 215 220
[1227] Ala Pro Leu Thr Val Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Lys Ala Trp
[1228] 225 230 235 240
[1229] Arg Leu Pro Asn Thr Pro Lys Pro Cys Trp Gly Asn Ser Phe Arg Thr
[1230] 245 250 255
[1231] Pro Ile Gln Glu Glu His Thr Asp Ala His Phe Thr Leu Ala Lys Ile
[1232] 260 265 270
[1233] <210> 56
[1234] <211> 451
[1235] <212> PRT
[1236] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1237] <220>
[1238] <223> 他利昔珠单抗的重链
[1239] <400> 56
[1240] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
[1241] 1 5 10 15
[1242] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
[1243] 20 25 30
[1244] Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
[1245] 35 40 45
[1246] Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
[1247] 50 55 60

[1248] Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
[1249] 65 70 75 80
[1250] Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[1251] 85 90 95
[1252] Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
[1253] 100 105 110
[1254] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[1255] 115 120 125
[1256] Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
[1257] 130 135 140
[1258] Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
[1259] 145 150 155 160
[1260] Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
[1261] 165 170 175
[1262] Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[1263] 180 185 190
[1264] Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
[1265] 195 200 205
[1266] Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
[1267] 210 215 220
[1268] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
[1269] 225 230 235 240
[1270] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[1271] 245 250 255
[1272] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
[1273] 260 265 270
[1274] Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[1275] 275 280 285
[1276] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[1277] 290 295 300
[1278] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[1279] 305 310 315 320
[1280] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[1281] 325 330 335
[1282] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[1283] 340 345 350
[1284] Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
[1285] 355 360 365
[1286] Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

[1287] 370 375 380
[1288] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[1289] 385 390 395 400
[1290] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
[1291] 405 410 415
[1292] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[1293] 420 425 430
[1294] His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[1295] 435 440 445
[1296] Pro Gly Lys
[1297] 450
[1298] <210> 57
[1299] <211> 214
[1300] <212> PRT
[1301] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1302] <220>
[1303] <223> 他利昔珠单抗的轻链
[1304] <400> 57
[1305] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[1306] 1 5 10 15
[1307] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
[1308] 20 25 30
[1309] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[1310] 35 40 45
[1311] Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[1312] 50 55 60
[1313] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[1314] 65 70 75 80
[1315] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
[1316] 85 90 95
[1317] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
[1318] 100 105 110
[1319] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
[1320] 115 120 125
[1321] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
[1322] 130 135 140
[1323] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
[1324] 145 150 155 160
[1325] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

[1326] 165 170 175
[1327] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
[1328] 180 185 190
[1329] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
[1330] 195 200 205
[1331] Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1332] 210
[1333] <210> 58
[1334] <211> 118
[1335] <212> PRT
[1336] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1337] <220>
[1338] <223> 他利昔珠单抗的重链可变区
[1339] <400> 58
[1340] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
[1341] 1 5 10 15
[1342] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
[1343] 20 25 30
[1344] Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
[1345] 35 40 45
[1346] Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
[1347] 50 55 60
[1348] Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
[1349] 65 70 75 80
[1350] Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[1351] 85 90 95
[1352] Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
[1353] 100 105 110
[1354] Gln Gly Thr Leu Val Thr
[1355] 115
[1356] <210> 59
[1357] <211> 108
[1358] <212> PRT
[1359] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1360] <220>
[1361] <223> 他利昔珠单抗的轻链可变区
[1362] <400> 59
[1363] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[1364] 1 5 10 15

[1365] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
[1366] 20 25 30
[1367] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[1368] 35 40 45
[1369] Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[1370] 50 55 60
[1371] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[1372] 65 70 75 80
[1373] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
[1374] 85 90 95
[1375] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[1376] 100 105
[1377] <210> 60
[1378] <211> 9
[1379] <212> PRT
[1380] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1381] <220>
[1382] <223> 他利昔珠单抗的重链CDR1
[1383] <400> 60
[1384] Gly Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Trp Asn
[1385] 1 5
[1386] <210> 61
[1387] <211> 13
[1388] <212> PRT
[1389] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1390] <220>
[1391] <223> 他利昔珠单抗的重链CDR2
[1392] <400> 61
[1393] Tyr Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His
[1394] 1 5 10
[1395] <210> 62
[1396] <211> 14
[1397] <212> PRT
[1398] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1399] <220>
[1400] <223> 他利昔珠单抗的重链CDR3
[1401] <400> 62
[1402] Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr
[1403] 1 5 10

[1404] <210> 63
[1405] <211> 8
[1406] <212> PRT
[1407] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1408] <220>
[1409] <223> 他利昔珠单抗的轻链CDR1
[1410] <400> 63
[1411] Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
[1412] 1 5
[1413] <210> 64
[1414] <211> 11
[1415] <212> PRT
[1416] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1417] <220>
[1418] <223> LLIYYTSKLH S
[1419] <400> 64
[1420] Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser
[1421] 1 5 10
[1422] <210> 65
[1423] <211> 8
[1424] <212> PRT
[1425] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1426] <220>
[1427] <223> 他利昔珠单抗的轻链CDR3
[1428] <400> 65
[1429] Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
[1430] 1 5
[1431] <210> 66
[1432] <211> 444
[1433] <212> PRT
[1434] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1435] <220>
[1436] <223> 11D4的重链
[1437] <400> 66
[1438] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1439] 1 5 10 15
[1440] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[1441] 20 25 30
[1442] Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[1443] 35 40 45

[1444] Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val

[1445] 50 55 60

[1446] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

[1447] 65 70 75 80

[1448] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[1449] 85 90 95

[1450] Ala Arg Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

[1451] 100 105 110

[1452] Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

[1453] 115 120 125

[1454] Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly

[1455] 130 135 140

[1456] Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

[1457] 145 150 155 160

[1458] Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

[1459] 165 170 175

[1460] Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

[1461] 180 185 190

[1462] Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser

[1463] 195 200 205

[1464] Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys

[1465] 210 215 220

[1466] Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

[1467] 225 230 235 240

[1468] Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

[1469] 245 250 255

[1470] Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe

[1471] 260 265 270

[1472] Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

[1473] 275 280 285

[1474] Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr

[1475] 290 295 300

[1476] Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

[1477] 305 310 315 320

[1478] Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr

[1479] 325 330 335

[1480] Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

[1481] 340 345 350

[1482] Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
[1483] 355 360 365
[1484] Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
[1485] 370 375 380
[1486] Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
[1487] 385 390 395 400
[1488] Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
[1489] 405 410 415
[1490] Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
[1491] 420 425 430
[1492] Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1493] 435 440
[1494] <210> 67
[1495] <211> 214
[1496] <212> PRT
[1497] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1498] <220>
[1499] <223> 11D4的轻链
[1500] <400> 67
[1501] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[1502] 1 5 10 15
[1503] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
[1504] 20 25 30
[1505] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
[1506] 35 40 45
[1507] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[1508] 50 55 60
[1509] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[1510] 65 70 75 80
[1511] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
[1512] 85 90 95
[1513] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
[1514] 100 105 110
[1515] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
[1516] 115 120 125
[1517] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
[1518] 130 135 140
[1519] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
[1520] 145 150 155 160

[1521] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
[1522] 165 170 175
[1523] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
[1524] 180 185 190
[1525] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
[1526] 195 200 205
[1527] Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1528] 210
[1529] <210> 68
[1530] <211> 118
[1531] <212> PRT
[1532] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1533] <220>
[1534] <223> 11D4的重链可变区
[1535] <400> 68
[1536] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1537] 1 5 10 15
[1538] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[1539] 20 25 30
[1540] Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1541] 35 40 45
[1542] Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
[1543] 50 55 60
[1544] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[1545] 65 70 75 80
[1546] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1547] 85 90 95
[1548] Ala Arg Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[1549] 100 105 110
[1550] Leu Val Thr Val Ser Ser
[1551] 115
[1552] <210> 69
[1553] <211> 107
[1554] <212> PRT
[1555] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1556] <220>
[1557] <223> 11D4的轻链可变区
[1558] <400> 69
[1559] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[1560] 1 5 10 15
[1561] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
[1562] 20 25 30
[1563] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
[1564] 35 40 45
[1565] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[1566] 50 55 60
[1567] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[1568] 65 70 75 80
[1569] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
[1570] 85 90 95
[1571] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[1572] 100 105
[1573] <210> 70
[1574] <211> 5
[1575] <212> PRT
[1576] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1577] <220>
[1578] <223> 11D4的重链CDR1
[1579] <400> 70
[1580] Ser Tyr Ser Met Asn
[1581] 1 5
[1582] <210> 71
[1583] <211> 17
[1584] <212> PRT
[1585] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1586] <220>
[1587] <223> 11D4的重链CDR2
[1588] <400> 71
[1589] Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[1590] 1 5 10 15
[1591] Gly
[1592] <210> 72
[1593] <211> 9
[1594] <212> PRT
[1595] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1596] <220>
[1597] <223> 11D4的重链CDR3
[1598] <400> 72

[1599] Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr
[1600] 1 5
[1601] <210> 73
[1602] <211> 11
[1603] <212> PRT
[1604] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1605] <220>
[1606] <223> 11D4的轻链CDR1
[1607] <400> 73
[1608] Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
[1609] 1 5 10
[1610] <210> 74
[1611] <211> 7
[1612] <212> PRT
[1613] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1614] <220>
[1615] <223> 11D4的轻链CDR2
[1616] <400> 74
[1617] Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
[1618] 1 5
[1619] <210> 75
[1620] <211> 9
[1621] <212> PRT
[1622] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1623] <220>
[1624] <223> 11D4的轻链CDR3
[1625] <400> 75
[1626] Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
[1627] 1 5
[1628] <210> 76
[1629] <211> 450
[1630] <212> PRT
[1631] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1632] <220>
[1633] <223> 18D8的重链
[1634] <400> 76
[1635] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
[1636] 1 5 10 15
[1637] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

[1638] 20 25 30
[1639] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1640] 35 40 45
[1641] Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
[1642] 50 55 60
[1643] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[1644] 65 70 75 80
[1645] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
[1646] 85 90 95
[1647] Ala Lys Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
[1648] 100 105 110
[1649] Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
[1650] 115 120 125
[1651] Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
[1652] 130 135 140
[1653] Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
[1654] 145 150 155 160
[1655] Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
[1656] 165 170 175
[1657] Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
[1658] 180 185 190
[1659] Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
[1660] 195 200 205
[1661] Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
[1662] 210 215 220
[1663] Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
[1664] 225 230 235 240
[1665] Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
[1666] 245 250 255
[1667] Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
[1668] 260 265 270
[1669] Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
[1670] 275 280 285
[1671] Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
[1672] 290 295 300
[1673] Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
[1674] 305 310 315 320
[1675] Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
[1676] 325 330 335

[1677] Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
[1678] 340 345 350
[1679] Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
[1680] 355 360 365
[1681] Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
[1682] 370 375 380
[1683] Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
[1684] 385 390 395 400
[1685] Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
[1686] 405 410 415
[1687] Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
[1688] 420 425 430
[1689] Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
[1690] 435 440 445
[1691] Gly Lys
[1692] 450
[1693] <210> 77
[1694] <211> 213
[1695] <212> PRT
[1696] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1697] <220>
[1698] <223> 18D8的轻链
[1699] <400> 77
[1700] Glu Ile Val Val Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[1701] 1 5 10 15
[1702] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
[1703] 20 25 30
[1704] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
[1705] 35 40 45
[1706] Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
[1707] 50 55 60
[1708] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
[1709] 65 70 75 80
[1710] Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
[1711] 85 90 95
[1712] Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
[1713] 100 105 110
[1714] Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
[1715] 115 120 125

[1716] Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
[1717] 130 135 140
[1718] Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
[1719] 145 150 155 160
[1720] Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
[1721] 165 170 175
[1722] Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
[1723] 180 185 190
[1724] Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
[1725] 195 200 205
[1726] Asn Arg Gly Glu Cys
[1727] 210
[1728] <210> 78
[1729] <211> 124
[1730] <212> PRT
[1731] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1732] <220>
[1733] <223> 18D8的重链可变区
[1734] <400> 78
[1735] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
[1736] 1 5 10 15
[1737] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
[1738] 20 25 30
[1739] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1740] 35 40 45
[1741] Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
[1742] 50 55 60
[1743] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[1744] 65 70 75 80
[1745] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
[1746] 85 90 95
[1747] Ala Lys Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
[1748] 100 105 110
[1749] Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[1750] 115 120
[1751] <210> 79
[1752] <211> 106
[1753] <212> PRT
[1754] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1755] <220>

[1756] <223> 18D8的轻链可变区

[1757] <400> 79

[1758] Glu Ile Val Val Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

[1759] 1 5 10 15

[1760] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

[1761] 20 25 30

[1762] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

[1763] 35 40 45

[1764] Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

[1765] 50 55 60

[1766] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

[1767] 65 70 75 80

[1768] Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr

[1769] 85 90 95

[1770] Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[1771] 100 105

[1772] <210> 80

[1773] <211> 5

[1774] <212> PRT

[1775] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1776] <220>

[1777] <223> 18D8的重链CDR1

[1778] <400> 80

[1779] Asp Tyr Ala Met His

[1780] 1 5

[1781] <210> 81

[1782] <211> 17

[1783] <212> PRT

[1784] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1785] <220>

[1786] <223> 18D8的重链CDR2

[1787] <400> 81

[1788] Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys

[1789] 1 5 10 15

[1790] Gly

[1791] <210> 82

[1792] <211> 15

[1793] <212> PRT

[1794] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1795] <220>
[1796] <223> 18D8的重链CDR3
[1797] <400> 82
[1798] Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val
[1799] 1 5 10 15
[1800] <210> 83
[1801] <211> 11
[1802] <212> PRT
[1803] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1804] <220>
[1805] <223> 18D8的轻链CDR1
[1806] <400> 83
[1807] Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
[1808] 1 5 10
[1809] <210> 84
[1810] <211> 7
[1811] <212> PRT
[1812] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1813] <220>
[1814] <223> 18D8的轻链CDR2
[1815] <400> 84
[1816] Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
[1817] 1 5
[1818] <210> 85
[1819] <211> 8
[1820] <212> PRT
[1821] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1822] <220>
[1823] <223> 18D8的轻链CDR3
[1824] <400> 85
[1825] Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
[1826] 1 5
[1827] <210> 86
[1828] <211> 120
[1829] <212> PRT
[1830] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1831] <220>
[1832] <223> Hu119-122的重链可变区

[1833] <400> 86

[1834] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[1835] 1 5 10 15

[1836] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His

[1837] 20 25 30

[1838] Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val

[1839] 35 40 45

[1840] Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met

[1841] 50 55 60

[1842] Glu Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

[1843] 65 70 75 80

[1844] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[1845] 85 90 95

[1846] Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

[1847] 100 105 110

[1848] Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

[1849] 115 120

[1850] <210> 87

[1851] <211> 111

[1852] <212> PRT

[1853] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1854] <220>

[1855] <223> Hu119-122的轻链可变区

[1856] <400> 87

[1857] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

[1858] 1 5 10 15

[1859] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser

[1860] 20 25 30

[1861] Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

[1862] 35 40 45

[1863] Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

[1864] 50 55 60

[1865] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

[1866] 65 70 75 80

[1867] Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

[1868] 85 90 95

[1869] Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[1870] 100 105 110

[1871] <210> 88

[1872] <211> 5
[1873] <212> PRT
[1874] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1875] <220>
[1876] <223> Hu119-122的重链CDR1
[1877] <400> 88
[1878] Ser His Asp Met Ser
[1879] 1 5
[1880] <210> 89
[1881] <211> 17
[1882] <212> PRT
[1883] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1884] <220>
[1885] <223> Hu119-122的重链CDR2
[1886] <400> 89
[1887] Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Glu
[1888] 1 5 10 15
[1889] Arg
[1890] <210> 90
[1891] <211> 11
[1892] <212> PRT
[1893] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1894] <220>
[1895] <223> Hu119-122的重链CDR3
[1896] <400> 90
[1897] His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr
[1898] 1 5 10
[1899] <210> 91
[1900] <211> 15
[1901] <212> PRT
[1902] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1903] <220>
[1904] <223> Hu119-122的轻链CDR1
[1905] <400> 91
[1906] Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
[1907] 1 5 10 15
[1908] <210> 92
[1909] <211> 7
[1910] <212> PRT

[1911] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1912] <220>
[1913] <223> Hu119-122的轻链CDR2
[1914] <400> 92
[1915] Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
[1916] 1 5
[1917] <210> 93
[1918] <211> 9
[1919] <212> PRT
[1920] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1921] <220>
[1922] <223> Hu119-122的轻链CDR3
[1923] <400> 93
[1924] Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr
[1925] 1 5
[1926] <210> 94
[1927] <211> 122
[1928] <212> PRT
[1929] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1930] <220>
[1931] <223> Hu106-222的重链可变区
[1932] <400> 94
[1933] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
[1934] 1 5 10 15
[1935] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
[1936] 20 25 30
[1937] Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
[1938] 35 40 45
[1939] Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
[1940] 50 55 60
[1941] Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
[1942] 65 70 75 80
[1943] Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1944] 85 90 95
[1945] Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
[1946] 100 105 110
[1947] Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[1948] 115 120
[1949] <210> 95

[1950] <211> 107
[1951] <212> PRT
[1952] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1953] <220>
[1954] <223> Hu106-222的轻链可变区
[1955] <400> 95
[1956] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[1957] 1 5 10 15
[1958] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
[1959] 20 25 30
[1960] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[1961] 35 40 45
[1962] Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[1963] 50 55 60
[1964] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[1965] 65 70 75 80
[1966] Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
[1967] 85 90 95
[1968] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1969] 100 105
[1970] <210> 96
[1971] <211> 5
[1972] <212> PRT
[1973] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1974] <220>
[1975] <223> Hu106-222的重链CDR1
[1976] <400> 96
[1977] Asp Tyr Ser Met His
[1978] 1 5
[1979] <210> 97
[1980] <211> 17
[1981] <212> PRT
[1982] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1983] <220>
[1984] <223> Hu106-222的重链CDR2
[1985] <400> 97
[1986] Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
[1987] 1 5 10 15
[1988] Gly

[1989] <210> 98
[1990] <211> 13
[1991] <212> PRT
[1992] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1993] <220>
[1994] <223> Hu106-222的重链CDR3
[1995] <400> 98
[1996] Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
[1997] 1 5 10
[1998] <210> 99
[1999] <211> 11
[2000] <212> PRT
[2001] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2002] <220>
[2003] <223> Hu106-222的轻链CDR1
[2004] <400> 99
[2005] Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
[2006] 1 5 10
[2007] <210> 100
[2008] <211> 7
[2009] <212> PRT
[2010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2011] <220>
[2012] <223> Hu106-222的轻链CDR2
[2013] <400> 100
[2014] Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr
[2015] 1 5
[2016] <210> 101
[2017] <211> 9
[2018] <212> PRT
[2019] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2020] <220>
[2021] <223> Hu106-222的轻链CDR3
[2022] <400> 101
[2023] Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
[2024] 1 5
[2025] <210> 102
[2026] <211> 183
[2027] <212> PRT

[2028] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2029] <220>
[2030] <223> OX40L
[2031] <400> 102
[2032] Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg
[2033] 1 5 10 15
[2034] Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln
[2035] 20 25 30
[2036] Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser
[2037] 35 40 45
[2038] Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val
[2039] 50 55 60
[2040] Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln
[2041] 65 70 75 80
[2042] Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn
[2043] 85 90 95
[2044] Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu
[2045] 100 105 110
[2046] Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln
[2047] 115 120 125
[2048] Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr
[2049] 130 135 140
[2050] Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu
[2051] 145 150 155 160
[2052] Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
[2053] 165 170 175
[2054] Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
[2055] 180
[2056] <210> 103
[2057] <211> 131
[2058] <212> PRT
[2059] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2060] <220>
[2061] <223> OX40L的可溶性结构域
[2062] <400> 103
[2063] Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu
[2064] 1 5 10 15
[2065] Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu
[2066] 20 25 30

[2067] Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe
[2068] 35 40 45
[2069] Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser
[2070] 50 55 60
[2071] Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val
[2072] 65 70 75 80
[2073] Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys
[2074] 85 90 95
[2075] Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His
[2076] 100 105 110
[2077] Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe
[2078] 115 120 125
[2079] Cys Val Leu
[2080] 130
[2081] <210> 104
[2082] <211> 128
[2083] <212> PRT
[2084] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2085] <220>
[2086] <223> OX40L的可溶性结构域(备选的)
[2087] <400> 104
[2088] Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys
[2089] 1 5 10 15
[2090] Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys
[2091] 20 25 30
[2092] Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile
[2093] 35 40 45
[2094] Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr
[2095] 50 55 60
[2096] Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg Ser Val
[2097] 65 70 75 80
[2098] Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu
[2099] 85 90 95
[2100] Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly
[2101] 100 105 110
[2102] Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
[2103] 115 120 125
[2104] <210> 105
[2105] <211> 120

[2106] <212> PRT
[2107] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2108] <220>
[2109] <223> 008的重链可变区
[2110] <400> 105
[2111] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[2112] 1 5 10 15
[2113] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
[2114] 20 25 30
[2115] Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[2116] 35 40 45
[2117] Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[2118] 50 55 60
[2119] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[2120] 65 70 75 80
[2121] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2122] 85 90 95
[2123] Ala Lys Asp Arg Tyr Ser Gln Val His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
[2124] 100 105 110
[2125] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
[2126] 115 120
[2127] <210> 106
[2128] <211> 108
[2129] <212> PRT
[2130] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2131] <220>
[2132] <223> 008的轻链可变区
[2133] <400> 106
[2134] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
[2135] 1 5 10 15
[2136] Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
[2137] 20 25 30
[2138] Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Ala Gly Gln Ser
[2139] 35 40 45
[2140] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
[2141] 50 55 60
[2142] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[2143] 65 70 75 80
[2144] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr

[2145] 85 90 95

[2146] Tyr Asn His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys

[2147] 100 105

[2148] <210> 107

[2149] <211> 120

[2150] <212> PRT

[2151] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2152] <220>

[2153] <223> 011的重链可变区

[2154] <400> 107

[2155] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

[2156] 1 5 10 15

[2157] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

[2158] 20 25 30

[2159] Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[2160] 35 40 45

[2161] Ser Ser Ile Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Arg Lys Gly

[2162] 50 55 60

[2163] Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

[2164] 65 70 75 80

[2165] Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

[2166] 85 90 95

[2167] Asp Arg Tyr Phe Arg Gln Gln Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

[2168] 100 105 110

[2169] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

[2170] 115 120

[2171] <210> 108

[2172] <211> 108

[2173] <212> PRT

[2174] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2175] <220>

[2176] <223> 011的轻链可变区

[2177] <400> 108

[2178] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

[2179] 1 5 10 15

[2180] Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

[2181] 20 25 30

[2182] Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Ala Gly Gln Ser

[2183] 35 40 45

[2184] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
[2185] 50 55 60
[2186] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[2187] 65 70 75 80
[2188] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
[2189] 85 90 95
[2190] Tyr Asn His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
[2191] 100 105
[2192] <210> 109
[2193] <211> 120
[2194] <212> PRT
[2195] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2196] <220>
[2197] <223> 021的重链可变区
[2198] <400> 109
[2199] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Arg Gly
[2200] 1 5 10 15
[2201] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[2202] 20 25 30
[2203] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[2204] 35 40 45
[2205] Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[2206] 50 55 60
[2207] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[2208] 65 70 75 80
[2209] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2210] 85 90 95
[2211] Ala Lys Asp Arg Tyr Ile Thr Leu Pro Asn Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
[2212] 100 105 110
[2213] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
[2214] 115 120
[2215] <210> 110
[2216] <211> 108
[2217] <212> PRT
[2218] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2219] <220>
[2220] <223> 021的轻链可变区
[2221] <400> 110
[2222] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Val Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

[2223] 1 5 10 15
[2224] Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
[2225] 20 25 30
[2226] Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[2227] 35 40 45
[2228] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
[2229] 50 55 60
[2230] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[2231] 65 70 75 80
[2232] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
[2233] 85 90 95
[2234] Lys Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
[2235] 100 105
[2236] <210> 111
[2237] <211> 120
[2238] <212> PRT
[2239] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2240] <220>
[2241] <223> 023的重链可变区
[2242] <400> 111
[2243] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
[2244] 1 5 10 15
[2245] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[2246] 20 25 30
[2247] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[2248] 35 40 45
[2249] Ser Ala Ile Gly Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Met
[2250] 50 55 60
[2251] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
[2252] 65 70 75 80
[2253] Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[2254] 85 90 95
[2255] Arg Tyr Asp Asn Val Met Gly Leu Tyr Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[2256] 100 105 110
[2257] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[2258] 115 120
[2259] <210> 112
[2260] <211> 108
[2261] <212> PRT

[2262] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2263] <220>
[2264] <223> 023的轻链可变区
[2265] <400> 112
[2266] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[2267] 1 5 10 15
[2268] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
[2269] 20 25 30
[2270] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
[2271] 35 40 45
[2272] Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
[2273] 50 55 60
[2274] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
[2275] 65 70 75 80
[2276] Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
[2277] 85 90 95
[2278] Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[2279] 100 105
[2280] <210> 113
[2281] <211> 119
[2282] <212> PRT
[2283] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2284] <220>
[2285] <223> 重链可变区
[2286] <400> 113
[2287] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[2288] 1 5 10 15
[2289] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[2290] 20 25 30
[2291] Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[2292] 35 40 45
[2293] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[2294] 50 55 60
[2295] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[2296] 65 70 75 80
[2297] Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[2298] 85 90 95
[2299] Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
[2300] 100 105 110

[2301] Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[2302] 115
[2303] <210> 114
[2304] <211> 108
[2305] <212> PRT
[2306] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2307] <220>
[2308] <223> 轻链可变区
[2309] <400> 114
[2310] Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
[2311] 1 5 10 15
[2312] Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
[2313] 20 25 30
[2314] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
[2315] 35 40 45
[2316] Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[2317] 50 55 60
[2318] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
[2319] 65 70 75 80
[2320] Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
[2321] 85 90 95
[2322] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
[2323] 100 105
[2324] <210> 115
[2325] <211> 121
[2326] <212> PRT
[2327] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2328] <220>
[2329] <223> 重链可变区
[2330] <400> 115
[2331] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[2332] 1 5 10 15
[2333] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr
[2334] 20 25 30
[2335] Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
[2336] 35 40 45
[2337] Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Asn Gln Asn Phe
[2338] 50 55 60
[2339] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

[2340] 65 70 75 80
[2341] Met Glu Phe Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[2342] 85 90 95
[2343] Ala Arg Met Gly Tyr His Gly Pro His Leu Asp Phe Asp Val Trp Gly
[2344] 100 105 110
[2345] Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Pro
[2346] 115 120
[2347] <210> 116
[2348] <211> 108
[2349] <212> PRT
[2350] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2351] <220>
[2352] <223> 轻链可变区
[2353] <400> 116
[2354] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Leu Gly
[2355] 1 5 10 15
[2356] Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ala Ala
[2357] 20 25 30
[2358] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
[2359] 35 40 45
[2360] Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
[2361] 50 55 60
[2362] Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
[2363] 65 70 75 80
[2364] Glu Asp Leu Thr Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ile Asn Tyr Pro Leu
[2365] 85 90 95
[2366] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
[2367] 100 105
[2368] <210> 117
[2369] <211> 122
[2370] <212> PRT
[2371] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2372] <220>
[2373] <223> 人源化抗体的重链可变区
[2374] <400> 117
[2375] Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
[2376] 1 5 10 15
[2377] Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
[2378] 20 25 30

[2379] Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
[2380] 35 40 45
[2381] Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
[2382] 50 55 60
[2383] Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
[2384] 65 70 75 80
[2385] Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
[2386] 85 90 95
[2387] Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
[2388] 100 105 110
[2389] Gly His Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[2390] 115 120
[2391] <210> 118
[2392] <211> 122
[2393] <212> PRT
[2394] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2395] <220>
[2396] <223> 人源化抗体的重链可变区
[2397] <400> 118
[2398] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
[2399] 1 5 10 15
[2400] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
[2401] 20 25 30
[2402] Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
[2403] 35 40 45
[2404] Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
[2405] 50 55 60
[2406] Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
[2407] 65 70 75 80
[2408] Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2409] 85 90 95
[2410] Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
[2411] 100 105 110
[2412] Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[2413] 115 120
[2414] <210> 119
[2415] <211> 107
[2416] <212> PRT
[2417] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2418] <220>

[2419] <223> 人源化抗体的轻链可变区

[2420] <400> 119

[2421] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg

[2422] 1 5 10 15

[2423] Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

[2424] 20 25 30

[2425] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

[2426] 35 40 45

[2427] Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

[2428] 50 55 60

[2429] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

[2430] 65 70 75 80

[2431] Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg

[2432] 85 90 95

[2433] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[2434] 100 105

[2435] <210> 120

[2436] <211> 107

[2437] <212> PRT

[2438] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[2439] <220>

[2440] <223> 人源化抗体的轻链可变区

[2441] <400> 120

[2442] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg

[2443] 1 5 10 15

[2444] Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

[2445] 20 25 30

[2446] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

[2447] 35 40 45

[2448] Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

[2449] 50 55 60

[2450] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

[2451] 65 70 75 80

[2452] Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg

[2453] 85 90 95

[2454] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[2455] 100 105

[2456] <210> 121

[2457] <211> 120
[2458] <212> PRT
[2459] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2460] <220>
[2461] <223> 人源化抗体的重链可变区
[2462] <400> 121
[2463] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
[2464] 1 5 10 15
[2465] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ser Asn Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
[2466] 20 25 30
[2467] Asp Met Ser Trp Val Arg Lys Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
[2468] 35 40 45
[2469] Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
[2470] 50 55 60
[2471] Glu Arg Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Lys Thr Leu Tyr
[2472] 65 70 75 80
[2473] Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
[2474] 85 90 95
[2475] Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
[2476] 100 105 110
[2477] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
[2478] 115 120
[2479] <210> 122
[2480] <211> 120
[2481] <212> PRT
[2482] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2483] <220>
[2484] <223> 人源化抗体的重链可变区
[2485] <400> 122
[2486] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[2487] 1 5 10 15
[2488] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
[2489] 20 25 30
[2490] Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
[2491] 35 40 45
[2492] Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
[2493] 50 55 60
[2494] Glu Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[2495] 65 70 75 80

[2496] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2497] 85 90 95
[2498] Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
[2499] 100 105 110
[2500] Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
[2501] 115 120
[2502] <210> 123
[2503] <211> 111
[2504] <212> PRT
[2505] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2506] <220>
[2507] <223> 人源化抗体的轻链可变区
[2508] <400> 123
[2509] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[2510] 1 5 10 15
[2511] Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
[2512] 20 25 30
[2513] Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
[2514] 35 40 45
[2515] Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
[2516] 50 55 60
[2517] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
[2518] 65 70 75 80
[2519] Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
[2520] 85 90 95
[2521] Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
[2522] 100 105 110
[2523] <210> 124
[2524] <211> 111
[2525] <212> PRT
[2526] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2527] <220>
[2528] <223> 人源化抗体的轻链可变区
[2529] <400> 124
[2530] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[2531] 1 5 10 15
[2532] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
[2533] 20 25 30
[2534] Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

[2535] 35 40 45
[2536] Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
[2537] 50 55 60
[2538] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[2539] 65 70 75 80
[2540] Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
[2541] 85 90 95
[2542] Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[2543] 100 105 110
[2544] <210> 125
[2545] <211> 138
[2546] <212> PRT
[2547] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2548] <220>
[2549] <223> 重链可变区
[2550] <400> 125
[2551] Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly
[2552] 1 5 10 15
[2553] Val Gln Ser Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
[2554] 20 25 30
[2555] Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
[2556] 35 40 45
[2557] Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
[2558] 50 55 60
[2559] Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr
[2560] 65 70 75 80
[2561] Tyr Ala Glu Ser Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
[2562] 85 90 95
[2563] Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
[2564] 100 105 110
[2565] Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Trp Gly Glu Val Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
[2566] 115 120 125
[2567] Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
[2568] 130 135
[2569] <210> 126
[2570] <211> 126
[2571] <212> PRT
[2572] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2573] <220>

[2574] <223> 轻链可变区

[2575] <400> 126

[2576] Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His

[2577] 1 5 10 15

[2578] Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

[2579] 20 25 30

[2580] Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Asp

[2581] 35 40 45

[2582] Ile Asn Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro

[2583] 50 55 60

[2584] Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser

[2585] 65 70 75 80

[2586] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser

[2587] 85 90 95

[2588] Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp

[2589] 100 105 110

[2590] Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

[2591] 115 120 125

过程2A：步骤A至E约22天

1. **步骤A**

获得患者肿瘤样品

2. **步骤B**

碎片化和第一次扩增

3至14天

3. **步骤C**

第一次扩增向第二次扩增过渡

不储存，且为封闭的系统

4. **步骤D**

第二次扩增

IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞

封闭的系统

5. **步骤E**

收获步骤D的TIL

封闭的系统

6. **步骤F**

最终制剂和/或转移至输液袋

(可选地冷冻保存)

图1

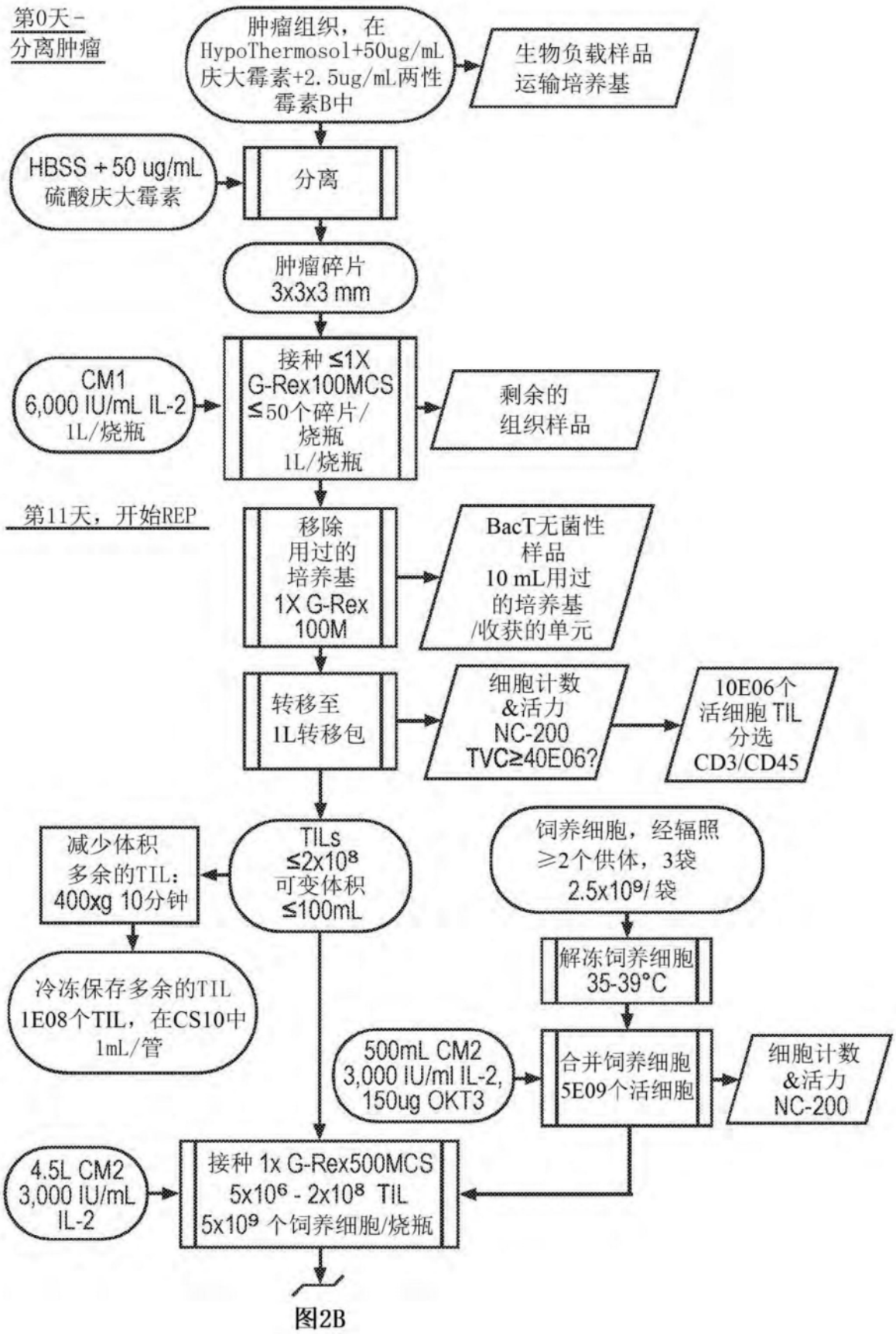

第0天-
分离肿瘤
肿瘤组织，在
HypoThermosol+50ug/mL
庆大霉素+2.5ug/mL两性
霉素B中
生物负载样品
运输培养基
HBSS + 50 ug/mL
硫酸庆大霉素
分离
肿瘤碎片
3x3x3 mm
CM1
6,000 IU/mL IL-2
1L/烧瓶
接种 ≤1X
G-Rex100MCS
≤50个碎片/
烧瓶
1L/烧瓶
剩余的
组织样品
第11天，开始REP
移除
用过的
培养基
1X G-Rex
100M
BacT无菌性
样品
10 mL用过
的培养基
/收获的单元
转移至
1L转移包
细胞计数
&活力
NC-200
TVC≥40E06?
10E06个
活细胞 TIL
分选
CD3/CD45
减少体积
多余的TIL：
400xg 10分钟
TILs
≤2x10⁸
可变体积
≤100mL
饲养细胞，经辐照
≥2个供体，3袋
2.5x10⁹/袋
冷冻保存多余的TIL
1E08个TIL，在CS10中
1mL/管
解冻饲养细胞
35-39°C
500mL CM2
3,000 IU/ml IL-2,
150ug OKT3
合并饲养细胞
5E09个活细胞
细胞计数
&活力
NC-200
4.5L CM2
3,000 IU/mL
IL-2
接种 1x G-Rex500MCS
5x10⁶ - 2x10⁸ TIL
5x10⁹ 个饲养细胞/烧瓶

图2B

图2A

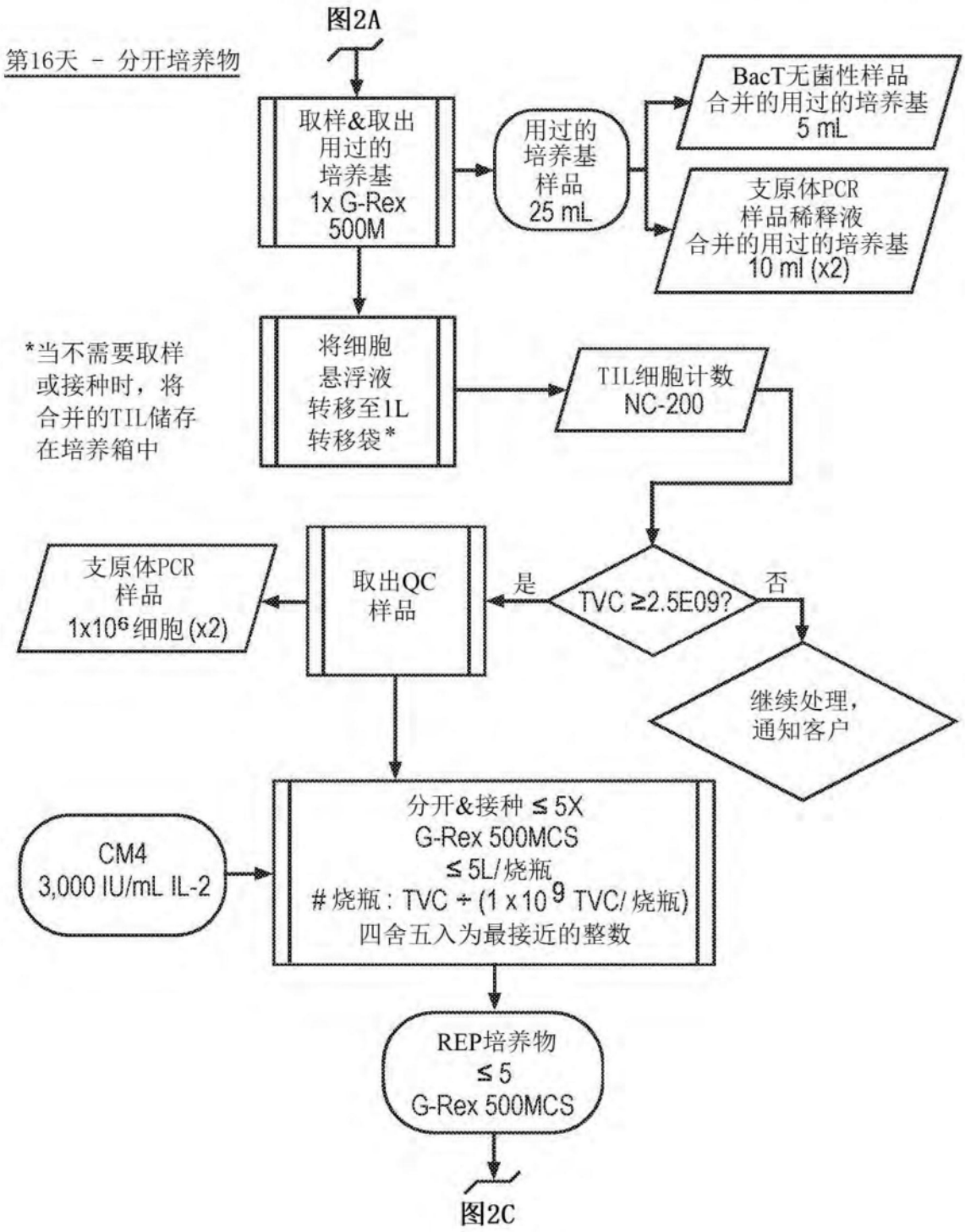


图2A
第16天 - 分开培养物
取样&取出
用过的
培养基
1x G-Rex
500M
用过的
培养基
样品
25 mL
BacT无菌性样品
合并的用过的培养基
5 mL
支原体PCR
样品稀释液
合并的用过的培养基
10 ml (x2)
*当不需要取样
或接种时，将
合并的TIL储存
在培养箱中
将细胞
悬浮液
转移至1L
转移袋*
TIL细胞计数
NC-200
支原体PCR
样品
1x10⁶细胞(x2)
取出QC
样品
是
TVC ≥2.5E09?
否
继续处理，
通知客户
CM4
3,000 IU/mL IL-2
分开&接种 ≤ 5X
G-Rex 500MCS
≤ 5L/烧瓶
烧瓶 : TVC ÷ (1 x 10⁹ TVC/ 烧瓶)
四舍五入为最接近的整数
REP培养物
≤ 5
G-Rex 500MCS
图2C

图2B

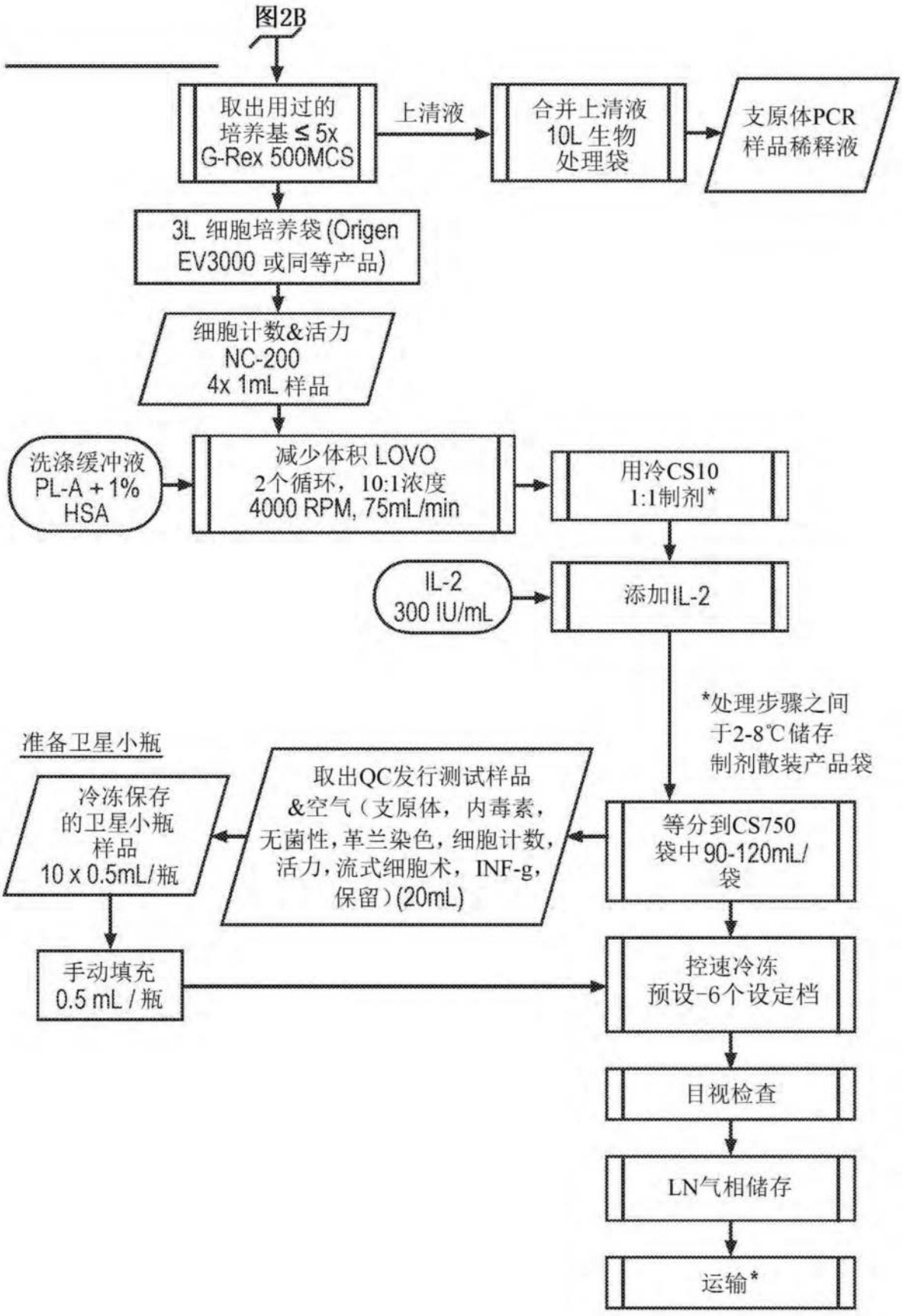


图2B
取出用过的
培养基≤5x
G-Rex 500MCS
上清液
合并上清液
10L 生物
处理袋
支原体PCR
样品稀释液
3L 细胞培养袋(Origen
EV3000 或同等产品)
细胞计数&活力
NC-200
4x 1mL 样品
洗涤缓冲液
PL-A + 1%
HSA
减少体积 LOVO
2个循环，10:1浓度
4000 RPM, 75mL/min
用冷CS10
1:1制剂*
IL-2
300 IU/mL
添加IL-2
*处理步骤之间
于2-8℃储存
制剂散装产品袋
准备卫星小瓶
冷冻保存
的卫星小瓶
样品
10 x 0.5mL/瓶
取出QC发行测试样品
&空气（支原体，内毒素，
无菌性，革兰染色，细胞计数，
活力，流式细胞术，INF-g，
保留）(20mL)
等分到CS750
袋中90-120mL/
袋
手动填充
0.5 mL / 瓶
控速冷冻
预设-6个设定档
目视检查
LN气相储存
运输*

图2C

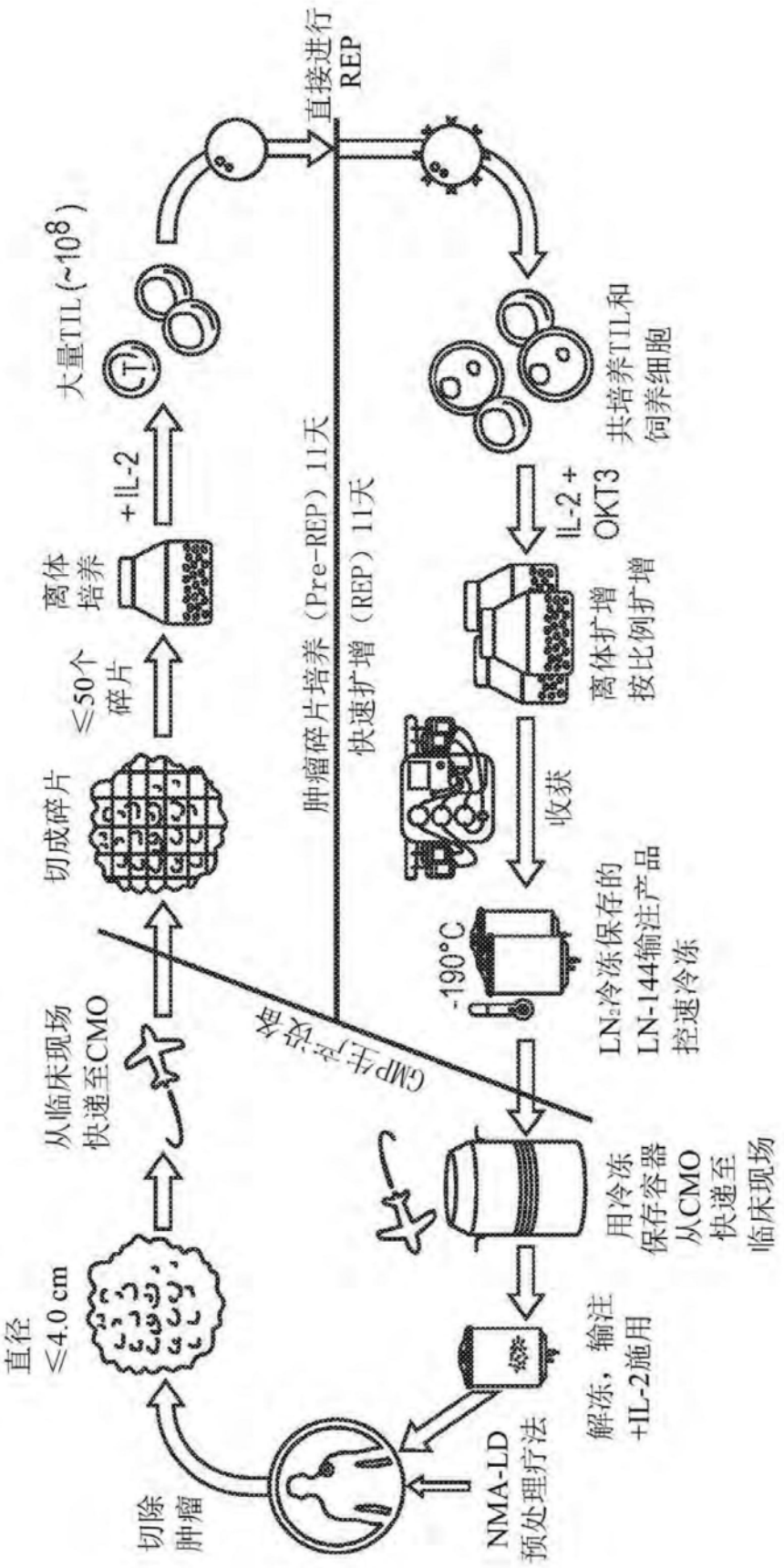

直径
≤4.0 cm
切除
肿瘤
从临床现场
快速至CMO
切成碎片
≤50个
碎片
离体
培养
+IL-2
大量TIL (~10^8)
直接进行
REP
肿瘤碎片培养（Pre-REP）11天
快速扩增（REP）11天
GMP生产设备
NMA-LD
预处理疗法
解冻，输注
+IL-2施用
用冷冻
保存容器
从CMO
快速至
临床现场
-190°C
LN2冷冻保存的
LN-144输注产品
控速冷冻
收获
IL-2 +
OKT3
离体扩增
按比例扩增
共培养TIL和
饲养细胞

图3

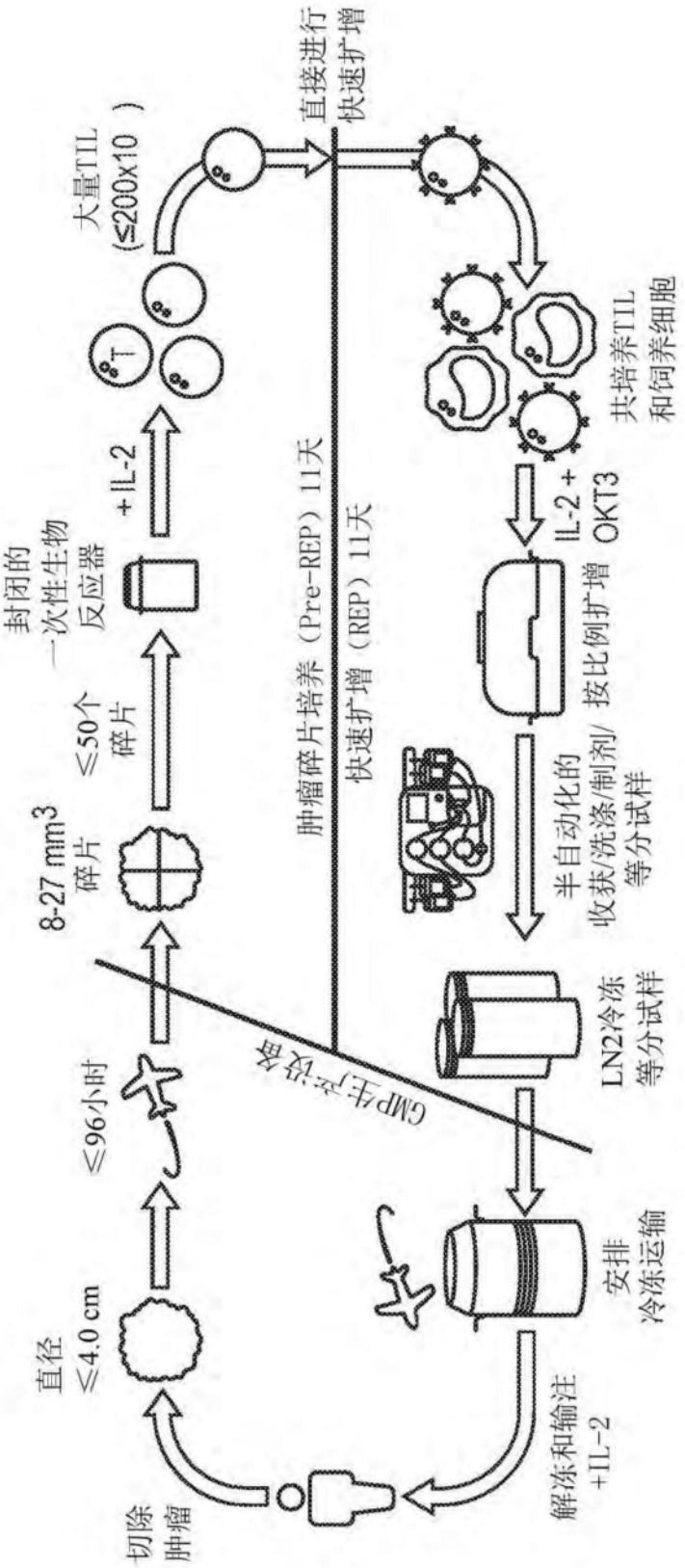

切除肿瘤
直径≤4.0 cm
解冻和输注+IL-2
≤96小时
安排冷冻运输
8-27 mm3碎片
≤50个碎片
封闭的一次性生物反应器
+IL-2
大量TIL(≥200x10)
肿瘤碎片培养（Pre-REP）11天
快速扩增（REP）11天
直接进行快速扩增
GMP生产设备
LN2冷冻等分试样
半自动化的收获/洗涤/制剂/等分试样
按比例扩增
IL-2 + OKT3
共培养TIL和饲养细胞

图4

过程1C：步骤A-E，43-45天	过程2A：步骤A-E，约22天
1. 步骤A 获得患者肿瘤样品	**1.** 步骤A 获得患者肿瘤样品
2. 步骤B 碎片化和第一次扩增 11天至21天	**2.** 步骤B 碎片化和第一次扩增 3天至14天
3. 步骤C 第一次扩增向第二次扩增过渡 可选地储存，直至选择	**3.** 步骤C 第一次扩增向第二次扩增过渡 不储存，且为封闭系统
4. 步骤D 第二次扩增 IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞 可选地重复一次或多次	**4.** 步骤D 第二次扩增 IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞 封闭的系统
5. 步骤E 收获步骤D的TIL	**5.** 步骤E 收获步骤D的TIL 封闭的系统
6. 步骤F 最终制剂和/或转移至输液袋	**6.** 步骤F 最终制剂和/或转移至输液袋 (可选地冷冻保存)

图5

过程步骤	过程1C实施方式	过程2A实施方式	优势
Pre-REP	• 4个碎片/10个GREX-10烧瓶 • 11-21天持续时间	• 40个碎片/1个GREX-100M烧瓶 • 11天持续时间	• 每个烧瓶的肿瘤碎片增加 • 培养时间缩短 • 步骤数目减少 • 适合封闭的系统
Pre-REP向REP过渡	• 冷冻Pre-REP TIL，直到进行表型筛选，然后解冻进行REP（~第30天） • REP需要>40×10^6 TIL	• 在第11天，Pre-REP TIL直接进行REP • REP需要25-200×10^6 TIL	• Pre-REP至REP过程缩短 • 步骤数目减少 • 不用进行表型筛选 • 适合封闭的系统
REP	• 在REP第0天，6个GREX-100M烧瓶 • 在REP第0天，5×106 TIL和5×10^8 PBMC饲养细胞/烧瓶 • 在REP第7天分到18-36个烧瓶中 • 14天持续时间	• 在第11天，1个GREX-500M烧瓶 • 在第11天,25-200×10^6 TIL和5×10^9 PBMC饲养细胞 • 在第16天分到≤6个GREX-500M烧瓶中 • 11天持续时间	• 步骤数目减少 • REP持续时间减短 • 烧瓶之间通过封闭系统转移TIL • 封闭系统更换培养基
收获	• 通过离心收获TIL	• 通过LOVO自动化细胞洗涤系统收获TIL	• 步骤数目减少 • 自动化洗涤细胞 • 封闭的系统 • 洗涤期间的产物损失减少
最终制剂	• 新鲜产品，在Hypothermosol中 • 单个输液袋 • 运输稳定性有限	• 冷冻保存的产品，在Plasmalyte-A+1%HSA和CS10中，储存于LN2中 • 多个等分试样 • 运输稳定性更长	• 运输灵活性 • 患者安排灵活 • 发行检测更及时
总体估计过程时间	• 43-55 天	• 22 天	• 患者周转更快

图6

小型活检过程：版本1 步骤A-E约21-33天
1. 步骤A 获得患者肿瘤样品
2. 步骤B 第一次扩增 1-19天(第3天添加OKT-3和抗原呈递饲养细胞)
3. 步骤C 第一次扩增向第二次扩增过渡 不储存，且为封闭系统
4. 步骤D 第二次扩增 IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞 11-14天 封闭的系统
5. 步骤E 收获步骤D的TIL 封闭的系统
6. 步骤F 最终制剂和/或转移至输液袋 (可选地冷冻保存)

图7A

小型活检过程：版本2 步骤A-E约17-24天
1. 步骤A 获得患者肿瘤样品
2. 步骤B 第一次扩增 3-12天(在第1-3天中任一天添加OKT-3 和抗原呈递饲养细胞)
3. 步骤C 第一次扩增向第二次扩增过渡 不储存，且为封闭系统
4. 步骤D 第二次扩增 IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞 3-12天 封闭的系统
5. 步骤E 收获步骤D的TIL 封闭的系统
6. 步骤F 最终制剂和/或转移至输液袋 (可选地冷冻保存)

图7B

小型活检过程：版本1 步骤A-E约21-33天	小型活检过程：版本2 （基于GEN3的过程） 步骤A-E约17-24天	过程2A 步骤A-E约22天
1. 步骤A 获得患者肿瘤样品	1. 步骤A 1. 获得患者肿瘤样品	1. 步骤A 获得患者肿瘤样品
2. 步骤B 第一次扩增 1-19天(第3天添加OKT-3和抗原呈递饲养细胞)	2. 步骤B 第一次扩增 3-12天(在第1-3天中任一天添加OKT-3和抗原呈递饲养细胞)	2. 步骤B 碎片化和第一次扩增 3-14天
3. 步骤C 第一次扩增向第二次扩增过渡 不储存，且可选地为封闭系统	3. 步骤C 第一次扩增向第二次扩增过渡 不储存，且可选地为封闭系统	3. 步骤C 第一次扩增向第二次扩增过渡 不储存，且为封闭系统
4. 步骤D 第二次扩增 IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞 11-14天 可选的封闭系统	4. 步骤D 第二次扩增 IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞 3-12天 可选的封闭系统	4. 步骤D 第二次扩增 IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞 封闭的系统
5. 步骤E 收获步骤D的TIL 可选的封闭系统	5. 步骤E 收获步骤D的TIL 封闭的系统	5. 步骤E 收获步骤D的TIL 封闭的系统
6. 步骤F 最终制剂和/或转移至输液袋 （可选地冷冻保存）	6. 步骤F 最终制剂和/或转移至输液袋 （可选地冷冻保存）	6. 步骤F 最终制剂和/或转移至输液袋 （可选地冷冻保存）

图7C

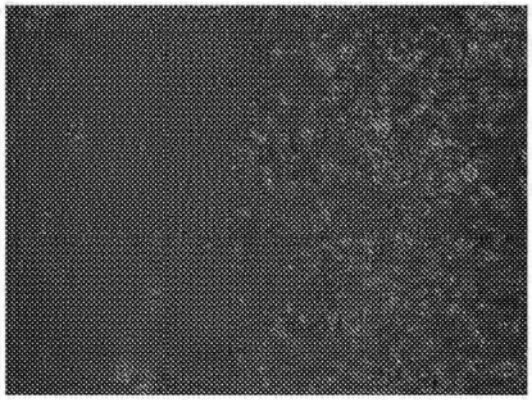


图8A

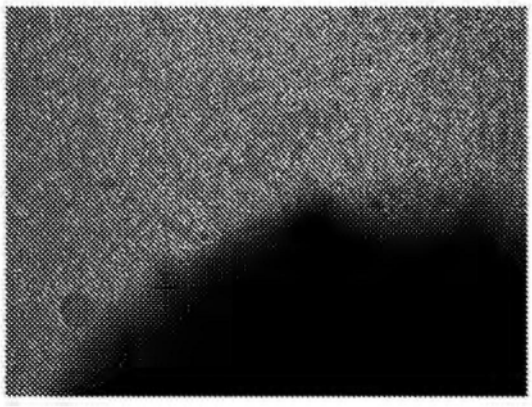


图8B

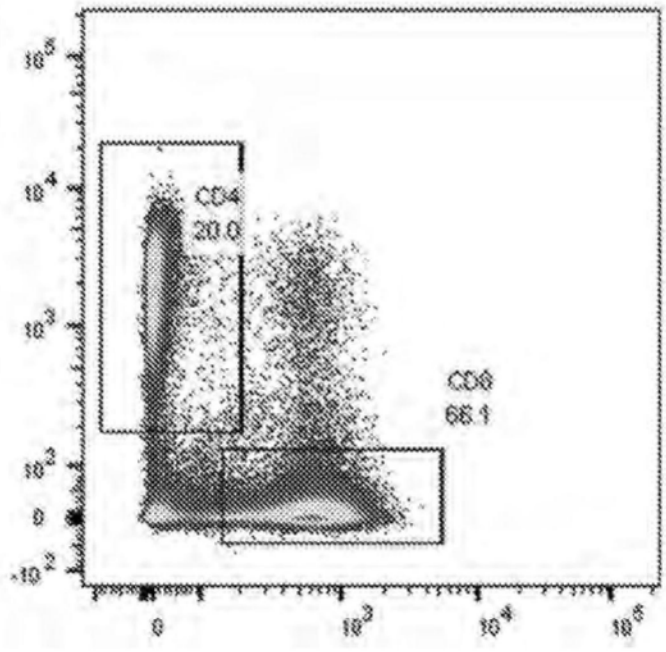


图9A

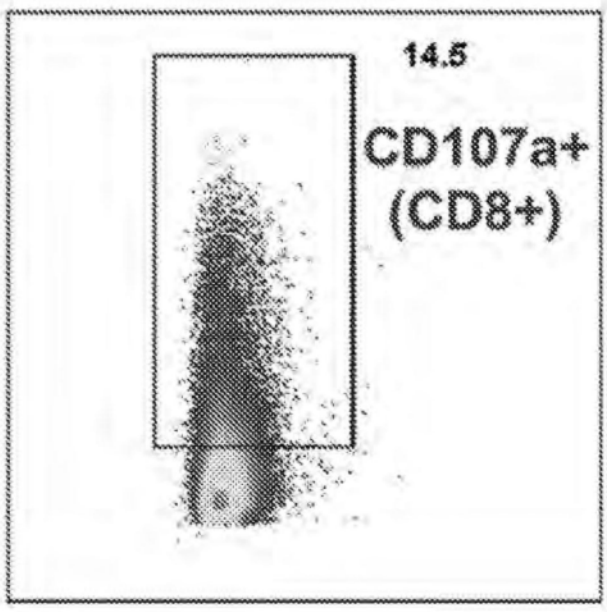


图9B

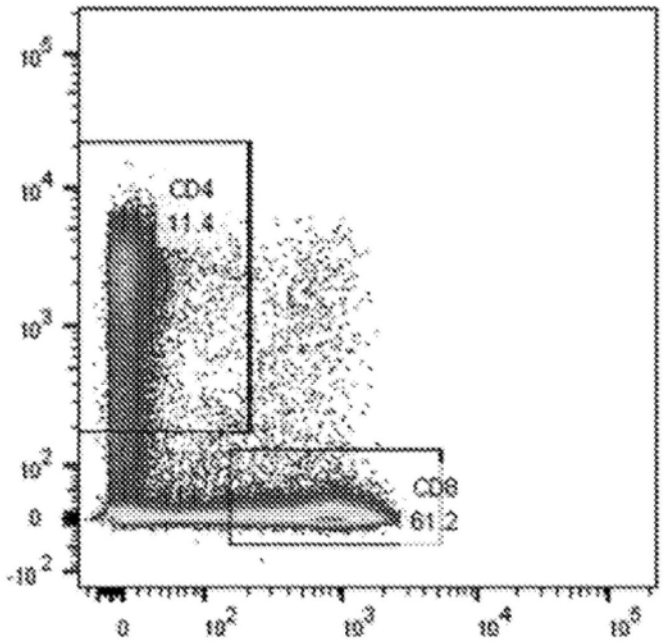


图9C

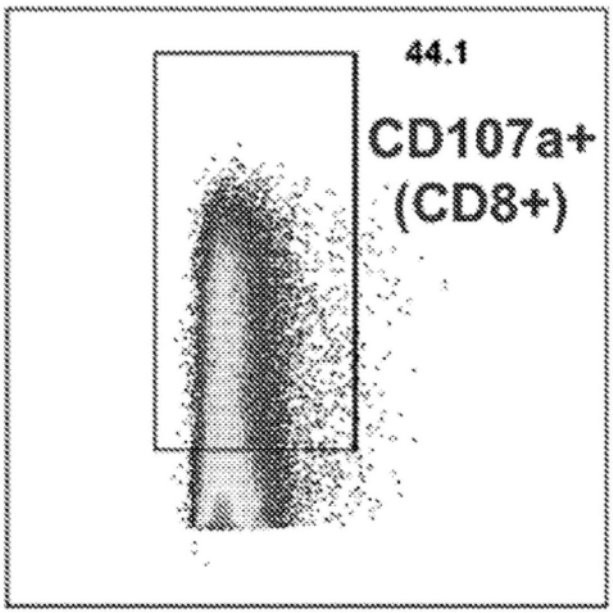


图9D

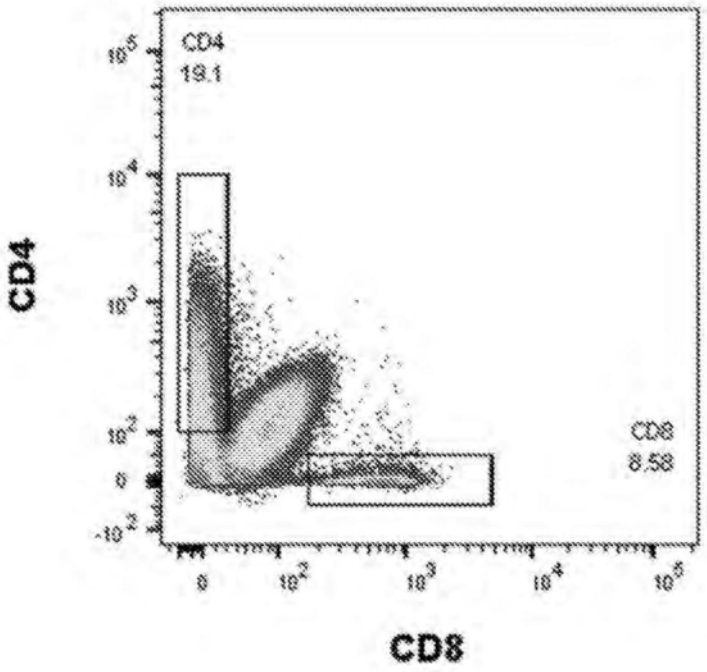


图10A

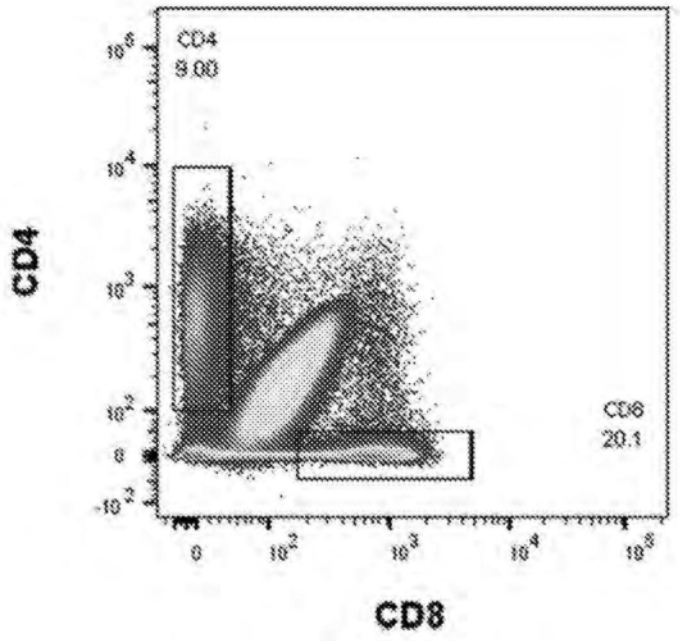


图10B

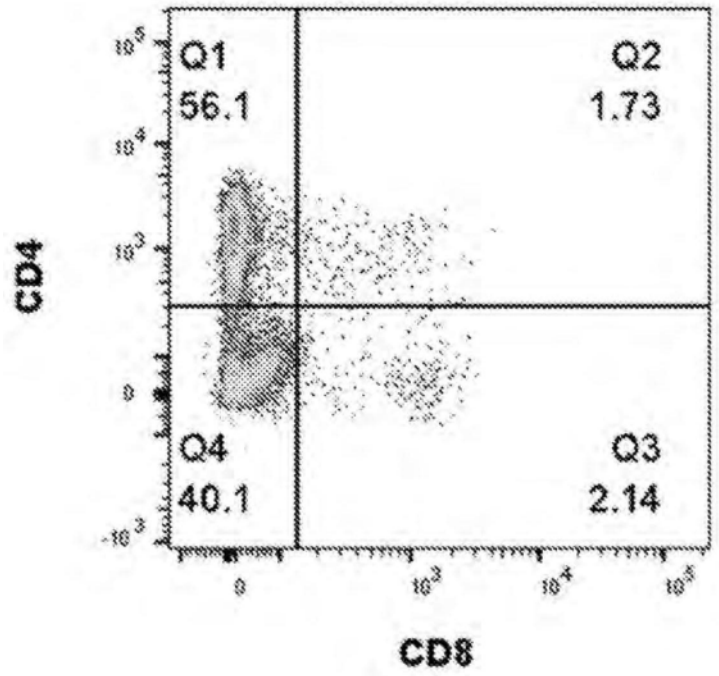

Q1
56.1
Q2
1.73
Q4
40.1
Q3
2.14
CD4
CD8

图11A

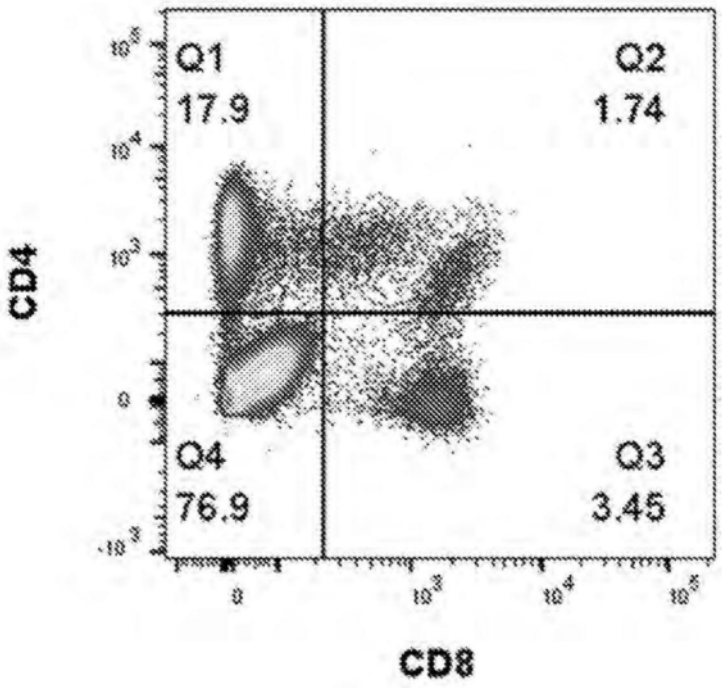

Q1
17.9
Q2
1.74
Q4
76.9
Q3
3.45
CD4
CD8

图11B

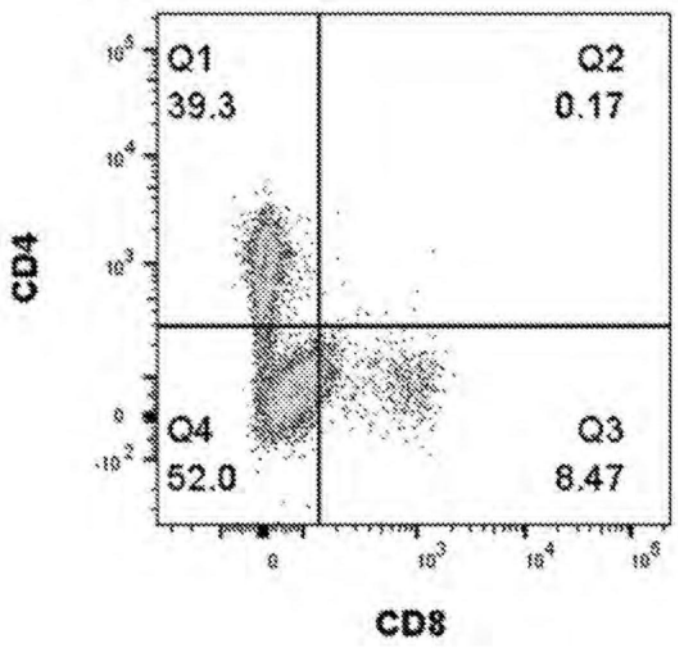

Q1
39.3
Q2
0.17
Q4
52.0
Q3
8.47
CD4
CD8

图11C

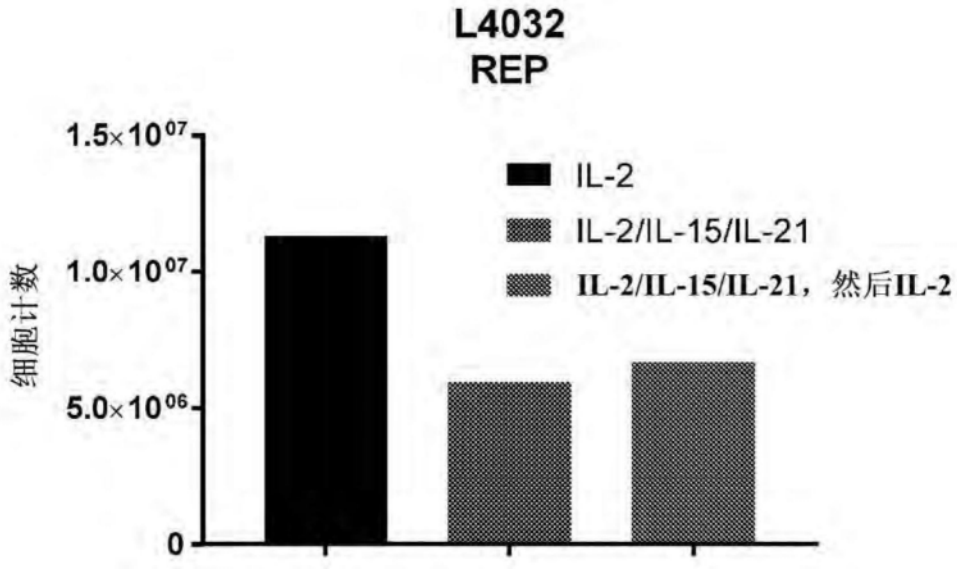

L4032
REP
1.5×10^07
1.0×10^07
5.0×10^06
0
细胞计数
IL-2
IL-2/IL-15/IL-21
IL-2/IL-15/IL-21，然后IL-2

图12A

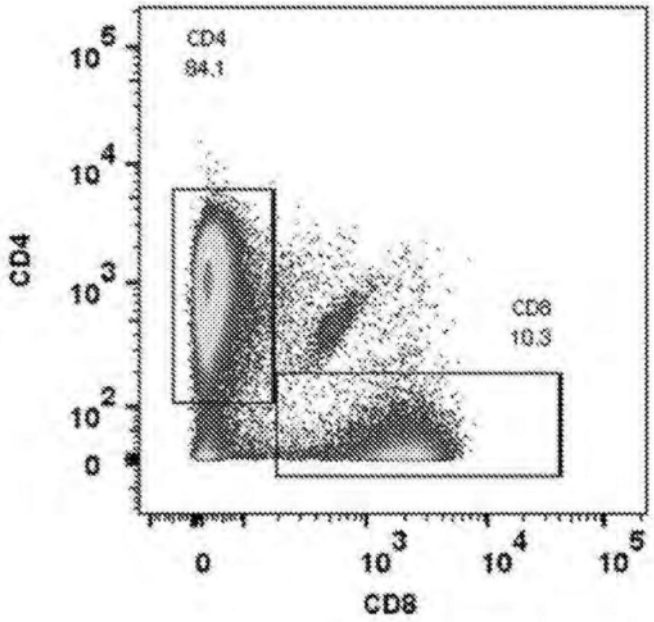

CD4
84.1
CD8
10.3
CD4
CD8
0
10^2
10^3
10^4
10^5

图12B

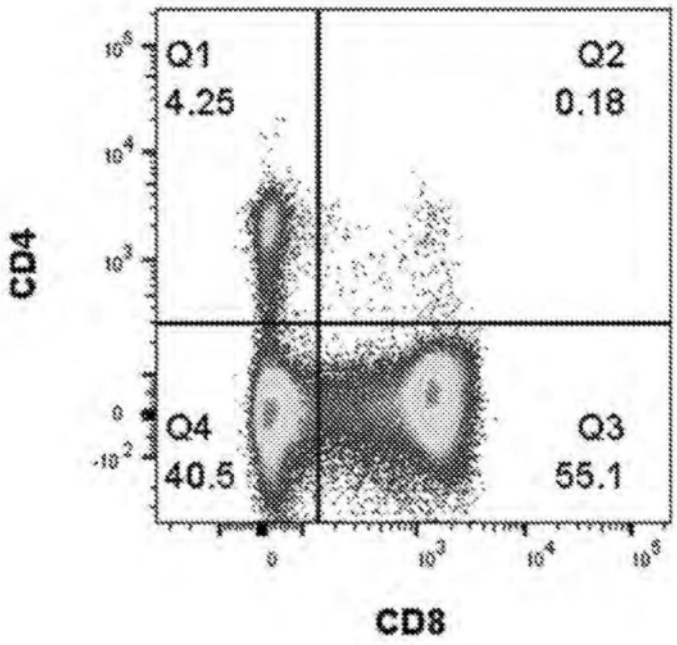

Q1
4.25
Q2
0.18
Q4
40.5
Q3
55.1
CD4
CD8

图13A

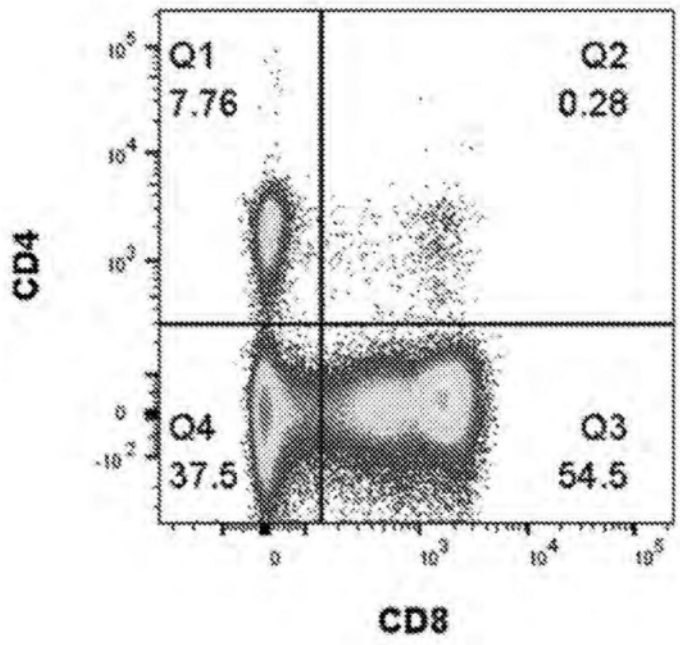

Q1
7.76
Q2
0.28
Q4
37.5
Q3
54.5
CD4
CD8

图13B

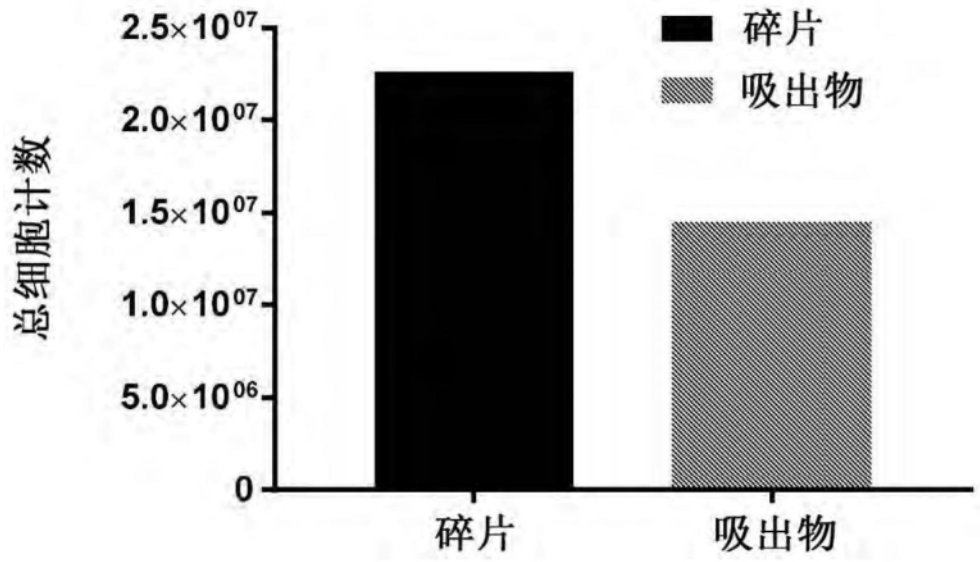

碎片
吸出物
总细胞计数
2.5×10^07
2.0×10^07
1.5×10^07
1.0×10^07
5.0×10^06
0
碎片
吸出物

图14

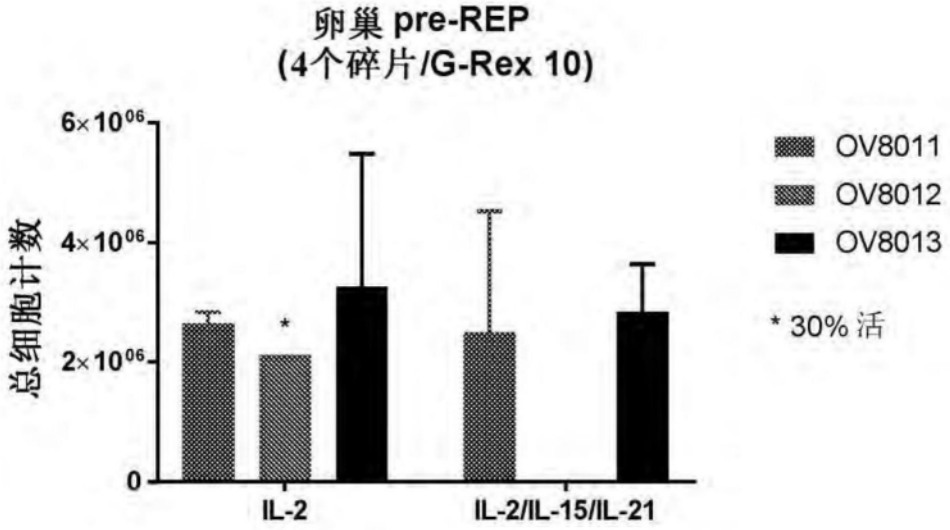

卵巢 pre-REP
(4个碎片/G-Rex 10)
总细胞计数
6×10^06
4×10^06
2×10^06
0
*
IL-2
IL-2/IL-15/IL-21
OV8011
OV8012
OV8013
* 30% 活

图15

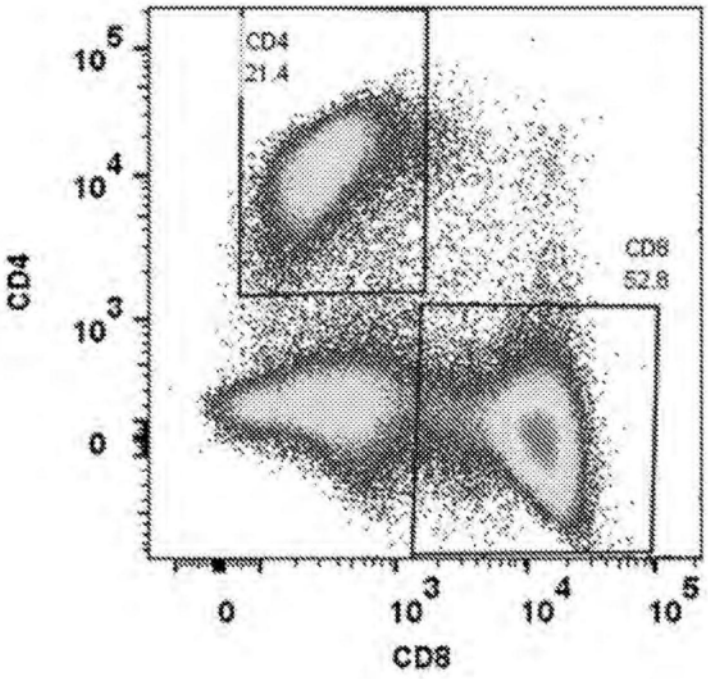

CD4
21.4
CD8
52.8
10^5
10^4
10^3
0
CD4
0
10^3
10^4
10^5
CD8

图16A

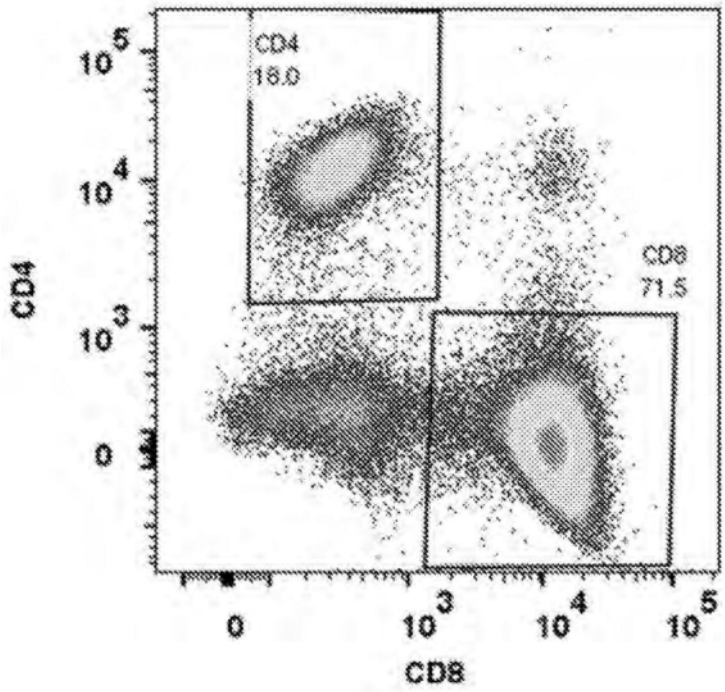

CD4
16.0
CD8
71.5
CD4
CD8
0
10^3
10^4
10^5

图16B

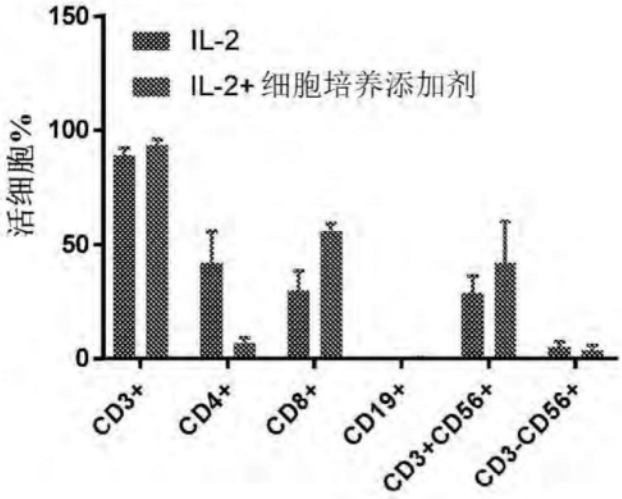

IL-2
IL-2+细胞培养添加剂
活细胞%
150
100
50
0
CD3+
CD4+
CD8+
CD19+
CD3+CD56+
CD3-CD56+

图17A

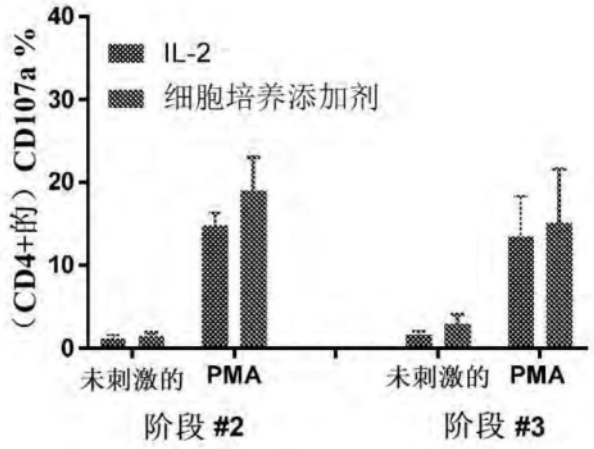

40
30
20
10
0
IL-2
细胞培养添加剂
（CD4+的）CD107a %
未刺激的
PMA
未刺激的
PMA
阶段 #2
阶段 #3

图17B

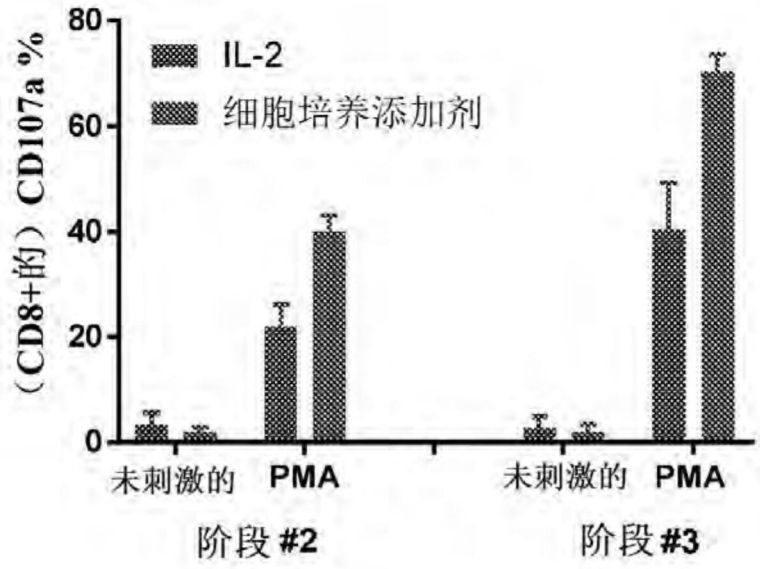

80
60
40
20
0
IL-2
细胞培养添加剂
（CD8+的）CD107a %
未刺激的
PMA
未刺激的
PMA
阶段 #2
阶段 #3

图17C

肿瘤ID	细胞因子	达到阶段#1的天数	阶段#2的接受标准	阶段#2的测定的细胞	阶段#3的接受标准	阶段#3的测定的细胞
Pan-17-004	IL-2 #1	27		116x10^6		培养基失败
	IL-2 #2	27		130x10^6		培养基失败
	细胞培养添加剂#1	14		培养基失败		N/A
	细胞培养添加剂#2	32	28x10^6	102x10^6	100x10^6	148x10^6
Pan-17-007	IL-2	19		未达到进行REP的标准		N/A
	细胞培养添加剂	25		118x10^6		244x10^6
Pan-17-009	IL-2	未达到G-Rex10的标准		N/A		N/A
	细胞培养添加剂	21		105x10^6		144x10^6

图17D

组织学	FNA/活检	初始细胞计数(FNA)	条件	培养天数	最终细胞计数	测定
胰 (P7015)	核 24孔板	N/A	**1个核** 1) IL-2（3孔） 2) IL-2/IL-15/IL-21（2孔） **2个核** 1) IL-2（1孔） 2) IL-2/IL-15/IL-21（1孔）	28天	**1个核** IL-2 平均1.2e6个活细胞/孔 IL-2/IL-15/IL-21 平均2e6个活细胞/孔 **2个核** 未生长	表型 FACS 功能 CD107a
胰 (P7017)	核 24孔板	N/A	**1个核**	N/A	TIL未生长	
胰 (P7019)	核 G-Rex 10	N/A	**6个核**	进行中		
肺 (L4032)	FNA 24孔板	1.6e6细胞(28%活)	1) IL-2（2孔） 2) IL-2/IL-15/IL-21（2孔） +碎片	13天	IL-2 平均4.64e5个细胞/孔，76 %活 IL-2/IL-15/IL-21 平均7.75e5个细胞/孔，94%活	表型 FACS 功能 CD107a (N/A) **REP** （最近收获的）
肺 (L4033)	**FNA** **G-Rex 10**	5.5e6细胞(76%活)	1) IL-2 2) IL-2/IL-15/IL-21 +碎片	12天	IL-2 6.e6, 73 %活 IL-2/IL-15/IL-21 未检测到细胞 （未对此样品进行测定）	表型 FACS 功能 CD107a **REP** （最近收获的）
肺 (L4034)	FNA G-Rex 10	N/A			TIL未生长	未测定

图18A

组织学	FNA/活检	初始细胞计数(FNA)	条件	培养天数	最终细胞计数	测定
结直肠 (CC10024)	FNA 24孔板	8.0e5 活细胞，42%活	1) IL-2（2孔） 2) IL-2/IL-15/IL-21（2孔） 碎片作为对照	27天	TIL未生长	未测定
卵巢 (OV8012)	FNA 24孔板	3.19e5 活细胞，28%活	1) IL-2（2孔） 2) IL-2/IL-15/IL-21（2孔）		TIL未生长	未测定
卵巢 (OV8013)	FNA 24孔板	8.3e5 活细胞，11%活	1) IL-2（2孔） 2) IL-2/IL-15/IL-21（2孔）		TIL未生长	未测定
卵巢 (OV8014)	FNA 24孔板	1.0e5 活细胞，7%活	1) IL-2（1孔） 2) IL-2/IL-15/IL-21（1孔）		TIL未生长	未测定
宫颈 (C2005)	FNA 24孔板	6.84e5 (13%活)	1) IL-2（2孔） 2) IL-2/IL-15/IL-21（2孔） +碎片	21天	IL-2 平均3.45e5个活细胞/孔，39%活 IL-2/IL-15/IL-21 平均8.69e5个活细胞/孔，40%活	表型 FACS 功能 CD107a
黑色素瘤 (M1101)	FNA G-Rex 10	1.96e6 (65%活)	IL-2 (1 G-Rex 10) +碎片	12天	IL-2 3.0e6, 78 %活	表型 FACS 功能 CD107a **REP**（最近收获的）
黑色素瘤 (M1107)	FNA G-Rex 10	2.25e6 (69%活)	IL-2 (2 G-Rex 10) IL-2/IL-15/IL-21 (2 G-Rex) +碎片			进行Pre-REP

图18B

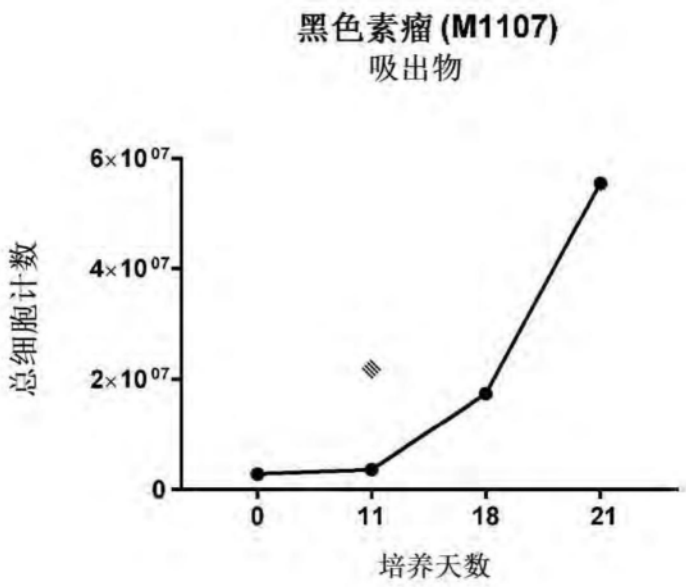

黑色素瘤(M1107)
吸出物
总细胞计数
6×10^07
4×10^07
2×10^07
0
0
11
18
21
培养天数

图19A

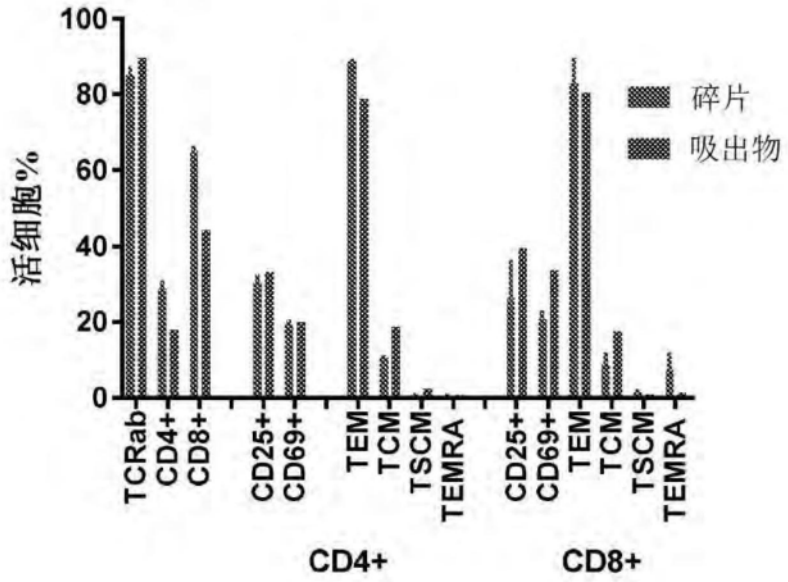

活细胞%
100
80
60
40
20
0
碎片
吸出物
TCRab
CD4+
CD8+
CD25+
CD69+
TEM
TCM
TSCM
TEMRA
CD25+
CD69+
TEM
TCM
TSCM
TEMRA
CD4+
CD8+

图19B

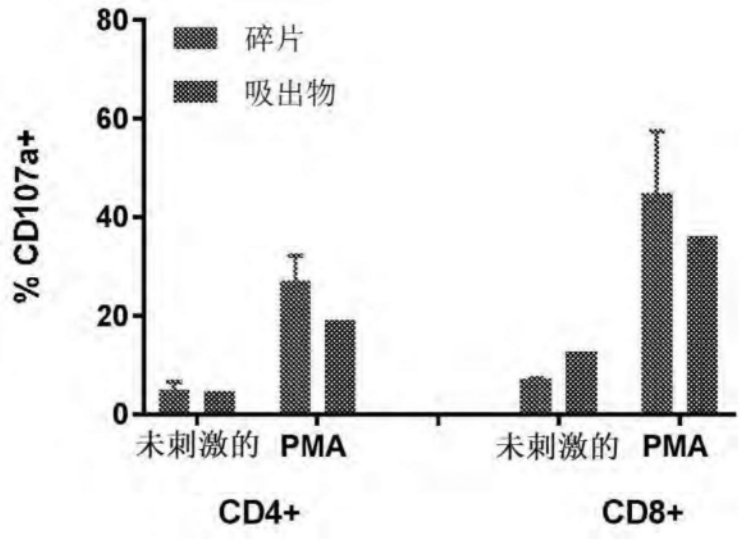


图19C

肿瘤名称	细胞生长	分析
UPMC-3 报告	24孔板: 1) IL-2 vs 2)细胞因子添加剂	细胞生长，活力，表型 CD107a
UPMC-9 报告	扩增不佳	N/A
UPMC-17 报告	培养污染	N/A
UPMC-26	扩增不佳	N/A
UPMC-30	pre-REP 第11天：1.6e6, 40% 活 pre-REP 第18天：3.49e7, 89% 活	细胞生长，活力，表型 CD107a, IFNγ, REP初始化以及分析
UPMC-61	pre-REP 第11天：1.52e5, 66% 活 pre-REP 第18天：1.14e7, 1.14e7, 40% 活	细胞生长，活力，表型 CD107a, IFNγ, REP初始化以及分析
UPMC-59	扩增不佳：	N/A
UPMC-61	pre-REP: 进行中	

图20

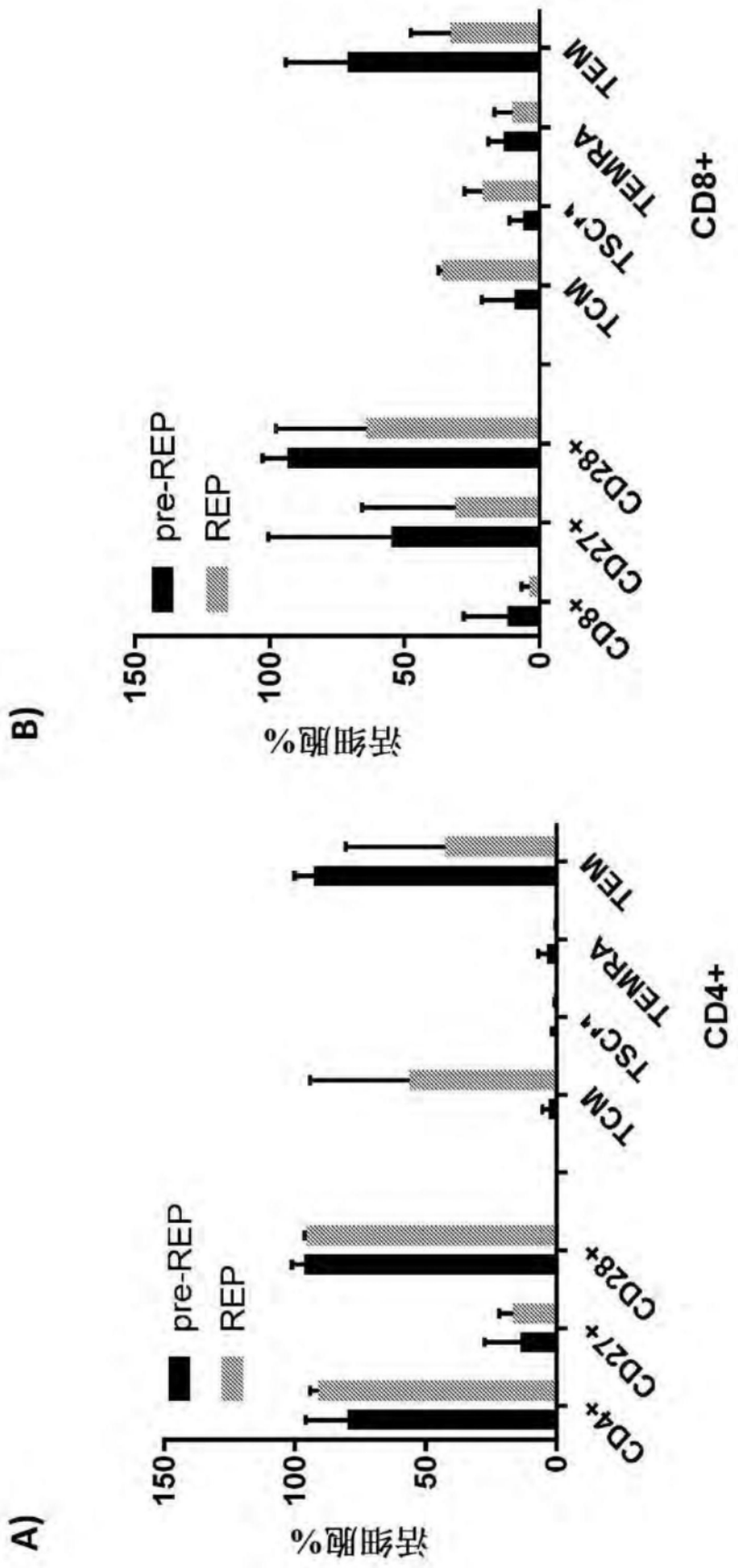

B)
活细胞%
150
100
50
0
pre-REP
REP
CD8+
CD27+
CD28+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD8+
A)
活细胞%
150
100
50
0
pre-REP
REP
CD4+
CD27+
CD28+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD4+

图21

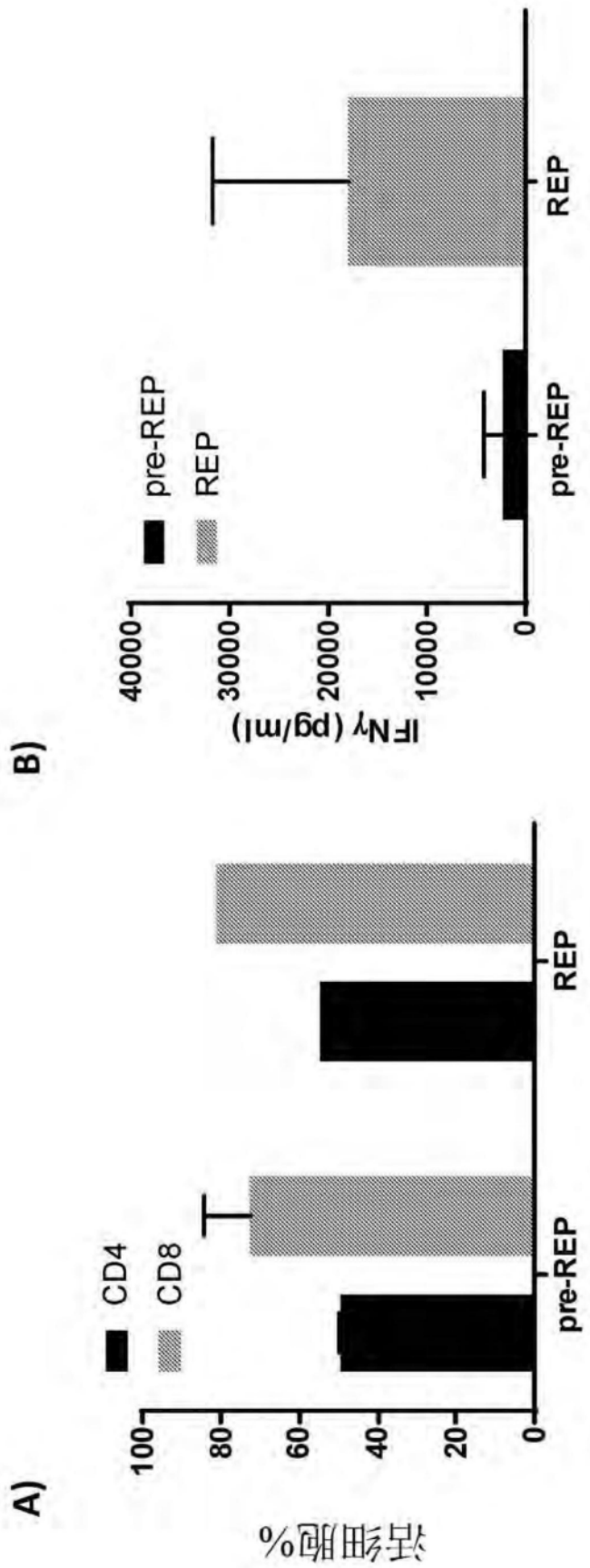

A)
100
80
60
40
20
0
CD4
CD8
pre-REP
REP
活细胞%
B)
40000
30000
20000
10000
0
pre-REP
REP
IFNγ (pg/ml)

图22

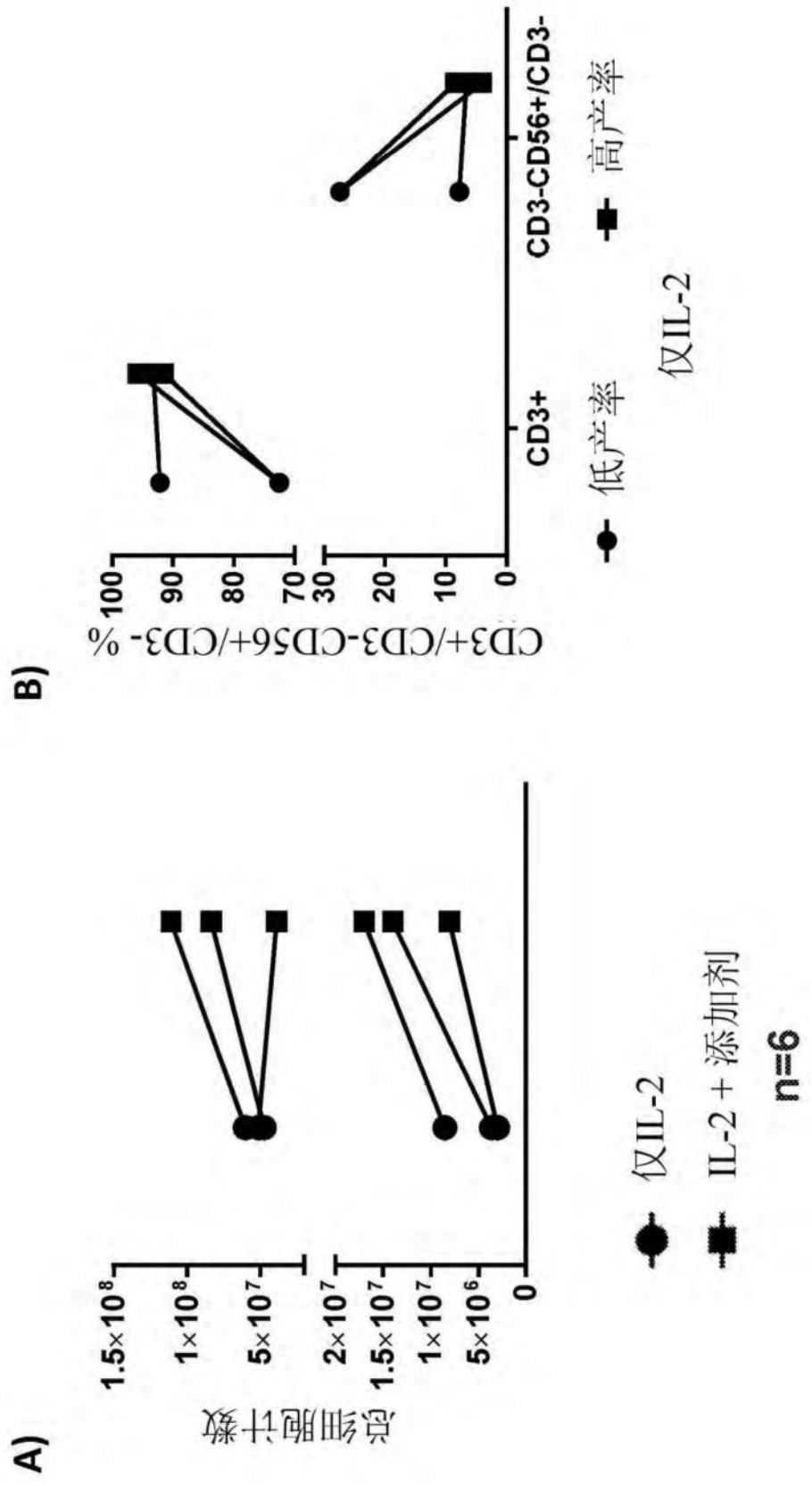

A)
总细胞计数
1.5×10^8
1×10^8
5×10^7
2×10^7
1.5×10^7
1×10^7
5×10^6
0
仅IL-2
IL-2 + 添加剂
n=6
B)
CD3+/CD3-CD56+/CD3- %
100
90
80
70
30
20
10
0
CD3+
CD3-CD56+/CD3-
低产率
高产率
仅IL-2

图23

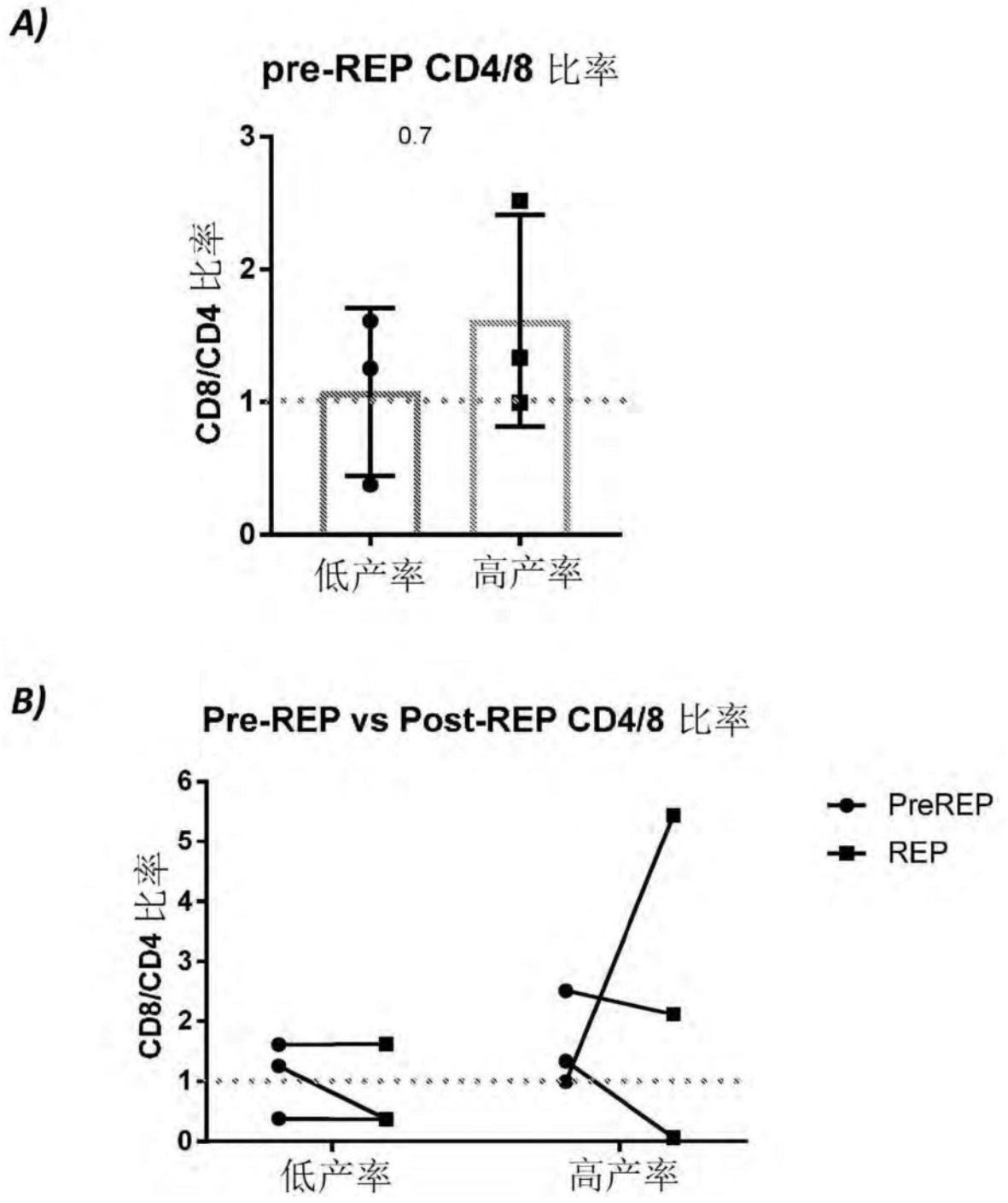

A)
pre-REP CD4/8 比率
0.7
CD8/CD4 比率
3
2
1
0
低产率
高产率
B)
Pre-REP vs Post-REP CD4/8 比率
CD8/CD4 比率
6
5
4
3
2
1
0
低产率
高产率
PreREP
REP

图24

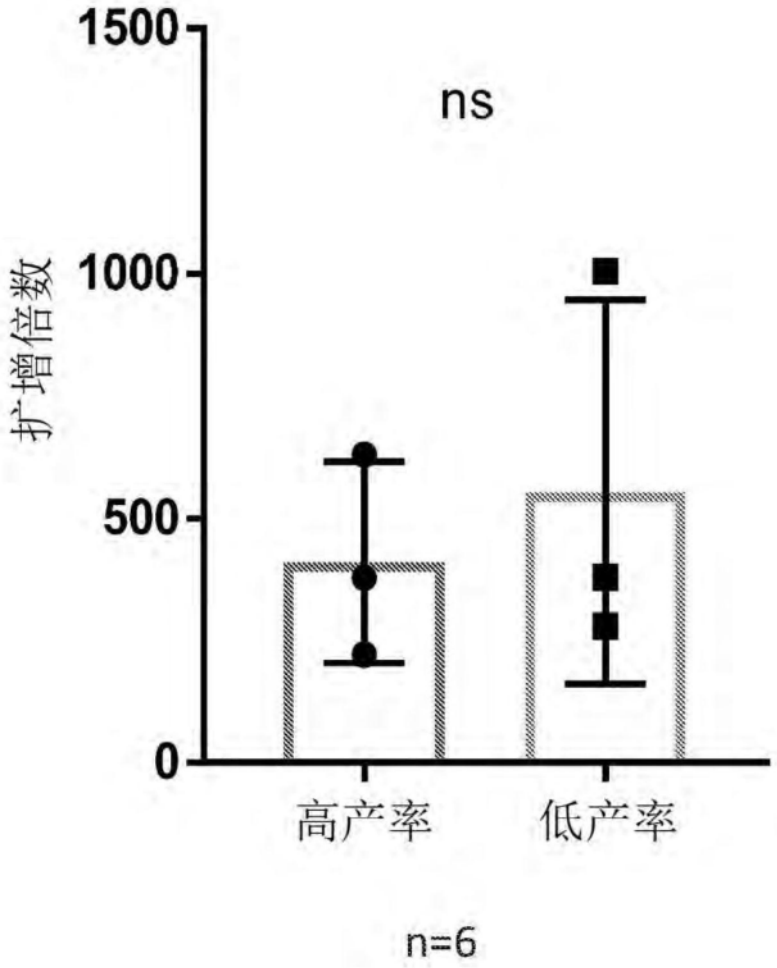


图25

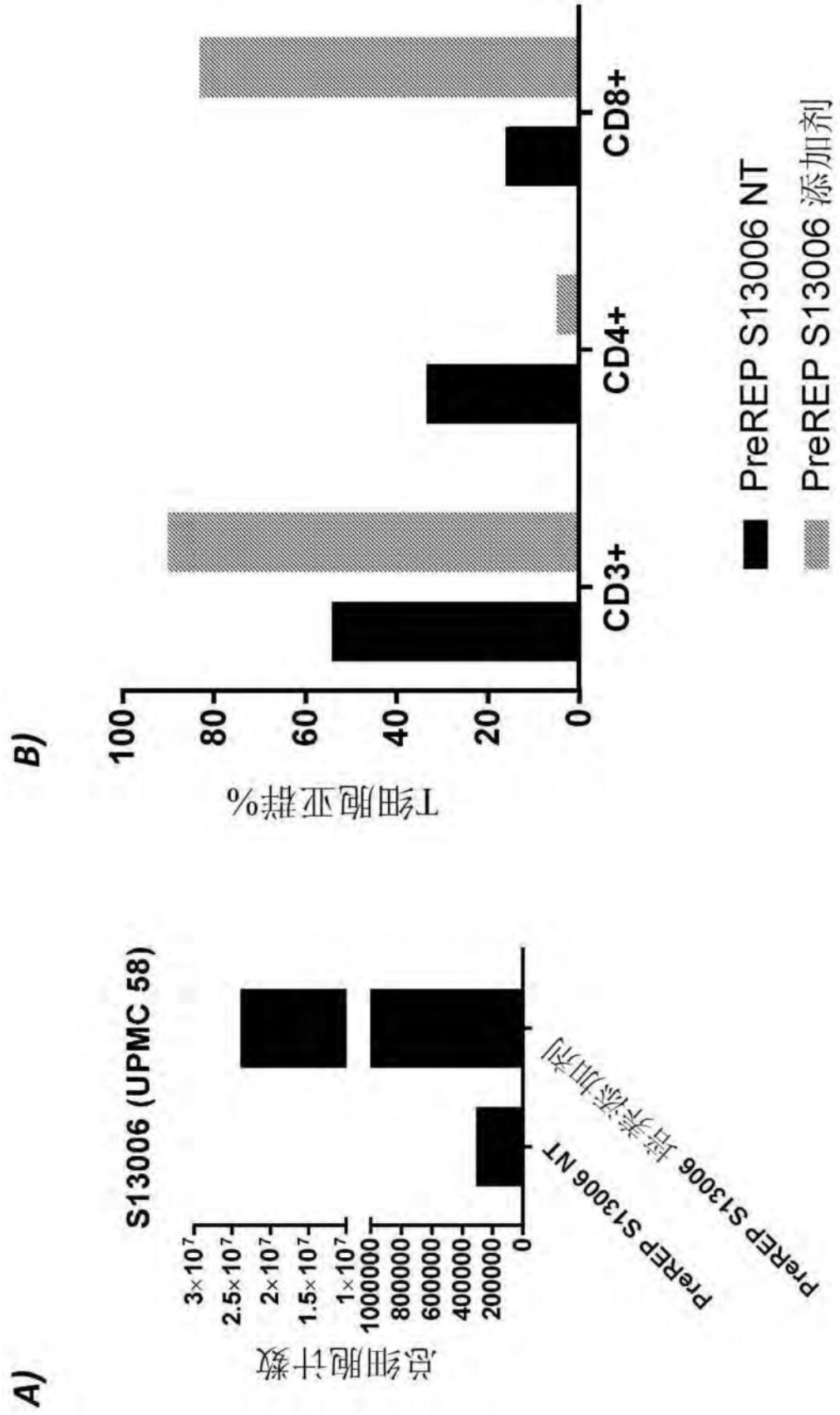

A)
S13006 (UPMC 58)
总细胞计数
3×10^7
2.5×10^7
2×10^7
1.5×10^7
1×10^7
1000000
800000
600000
400000
200000
0
PreREP S13006 NT
PreREP S13006 培养添加剂
B)
T细胞亚群%
100
80
60
40
20
0
CD3+
CD4+
CD8+
PreREP S13006 NT
PreREP S13006 添加剂

图26

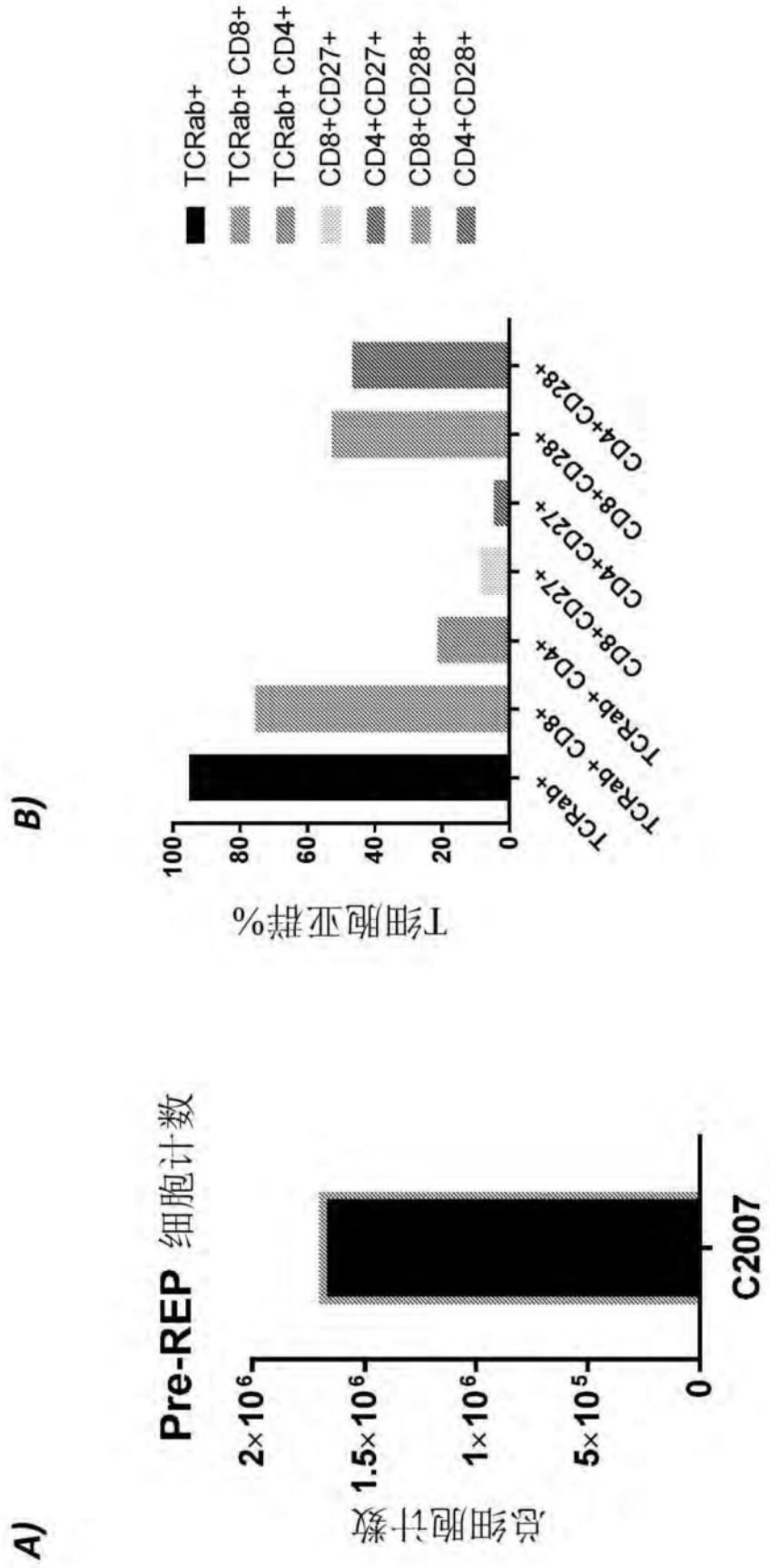

A)
Pre-REP 细胞计数
总细胞计数
2×10^6
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
C2007
B)
T细胞亚群%
100
80
60
40
20
0
TCRab+
TCRab+ CD8+
TCRab+ CD4+
CD8+CD27+
CD4+CD27+
CD8+CD28+
CD4+CD28+

图27

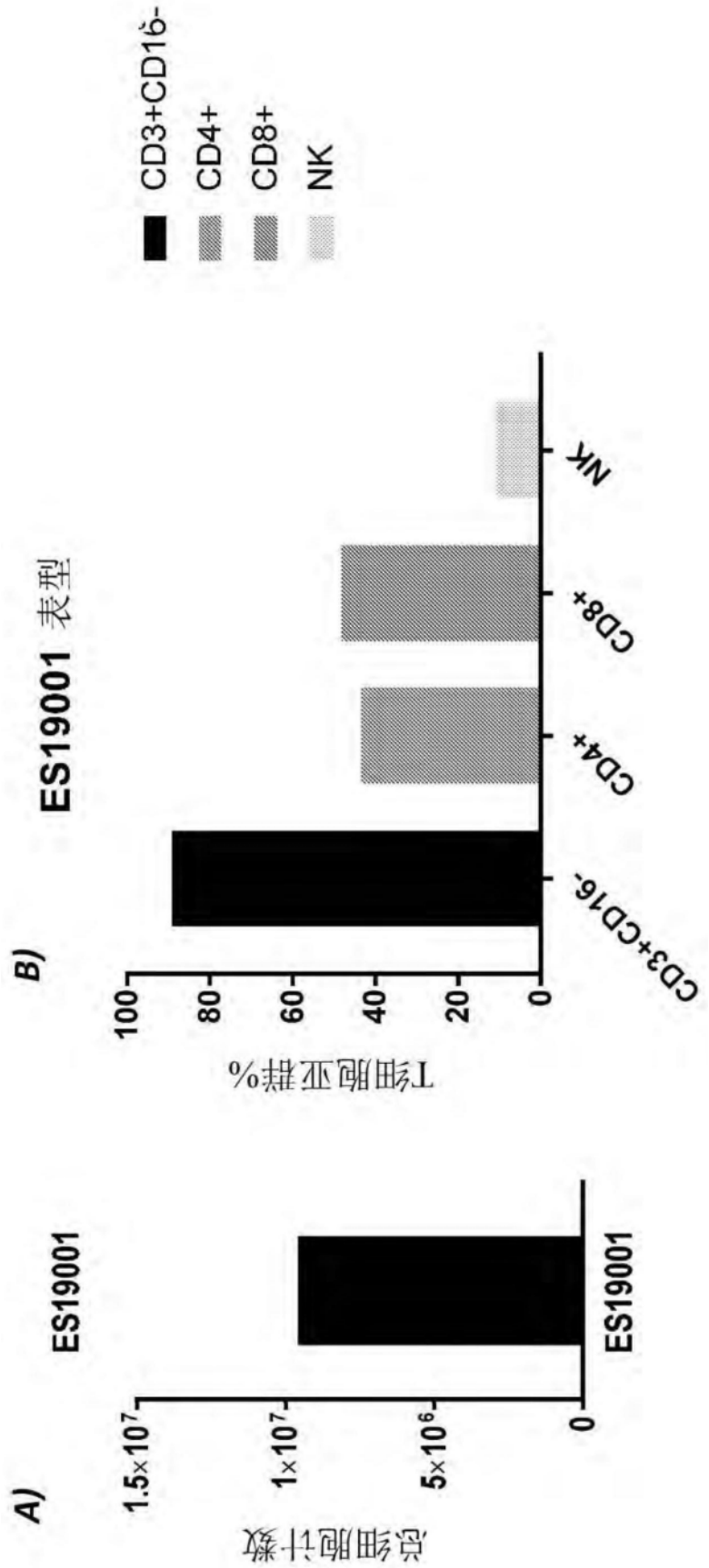

A)
ES19001
总细胞计数
1.5×10^7
1×10^7
5×10^6
0
ES19001
B)
ES19001 表型
T细胞亚群%
100
80
60
40
20
0
CD3+CD16-
CD4+
CD8+
NK
CD3+CD16-
CD4+
CD8+
NK

图28

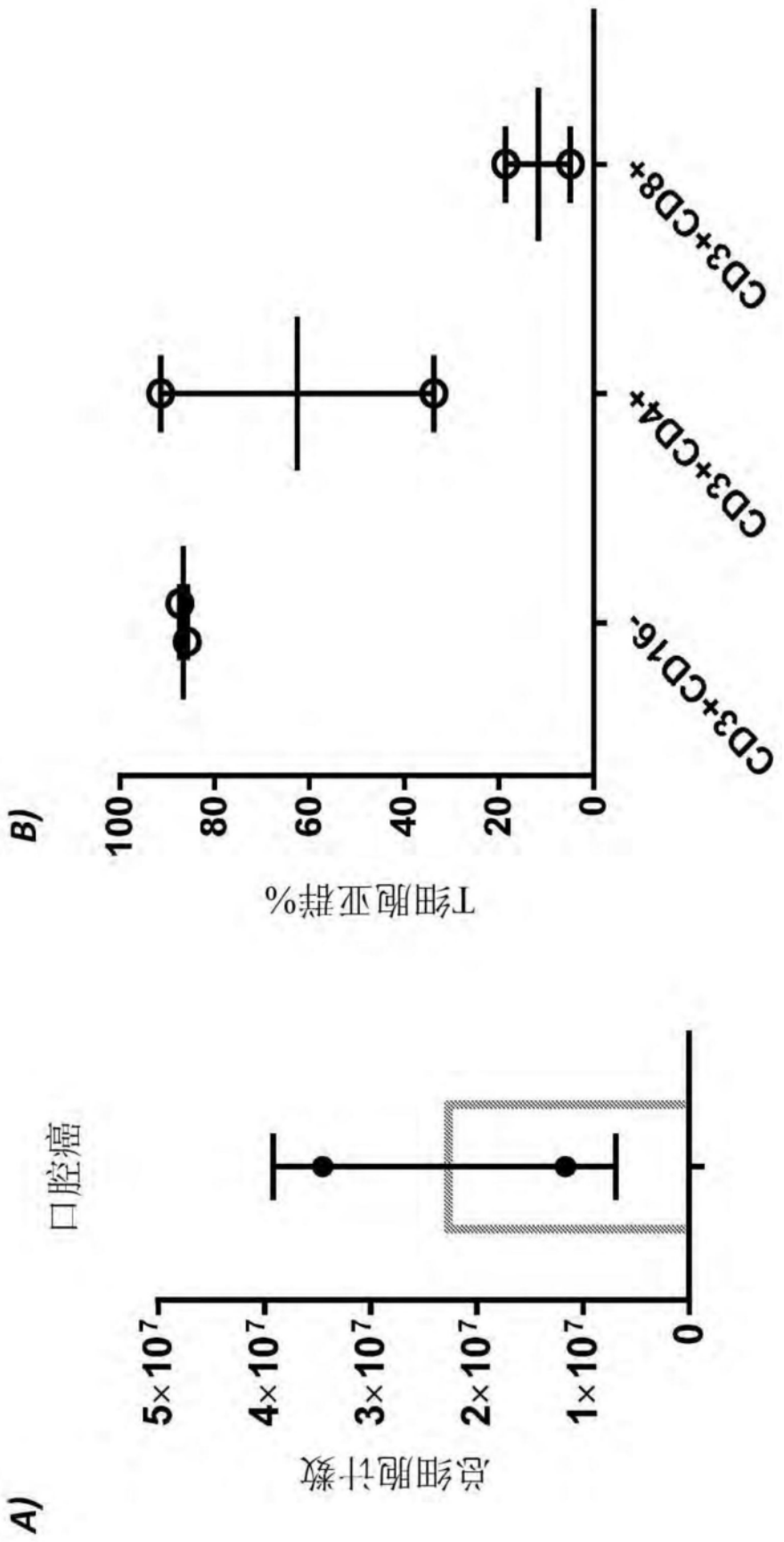

A)
口腔癌
总细胞计数
5×10^7
4×10^7
3×10^7
2×10^7
1×10^7
0
B)
T细胞亚群%
100
80
60
40
20
0
CD3+CD16-
CD3+CD4+
CD3+CD8+

图29

肿瘤名称	细胞生长	分析
UPMC-3 (P7011) 报告	24孔板 ：1) IL-2 vs 2) 细胞因子添加剂	细胞生长，活力，表型 CD107a
UPMC-9 (P7017) 报告	扩增不佳	N/A
UPMC-17 (P7019) 报告	培养污染，丢弃，	N/A
UPMC-26 (P7022)	扩增不佳	N/A
UPMC-30 (P7028)	pre-REP第12天: 1.6e6, 40% 活 pre-REP第21天: 3.49e7, 89% 活	细胞生长，活力，表型， CD107a, IFNγ, REP初始化以及分析
UPMC-61 (P7031)	pre-REP第12天: 1.52e5, 66% 活 pre-REP第28天: 1.14e7, 1.14e7, 40% 活	细胞生长，活力，表型， CD107a, IFNγ, REP初始化以及分析
UPMC-59 (P7033)	扩增不佳	N/A
UPMC-61 (P7034)	pre-REP: 进行中	

图30

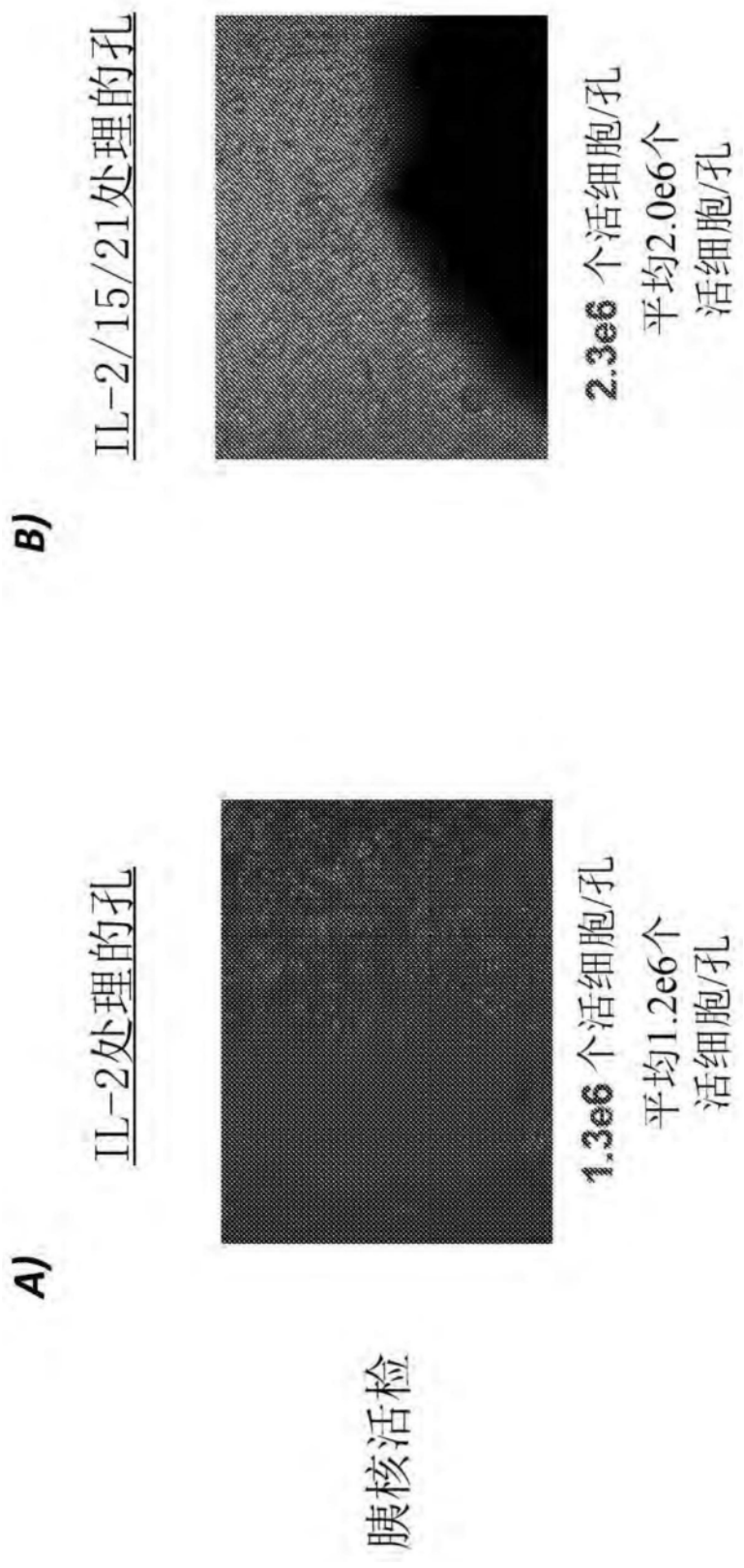

A)
IL-2处理的孔
1.3e6 个活细胞/孔
平均1.2e6个
活细胞/孔
B)
IL-2/15/21处理的孔
2.3e6 个活细胞/孔
平均2.0e6个
活细胞/孔
胰核活检

图31

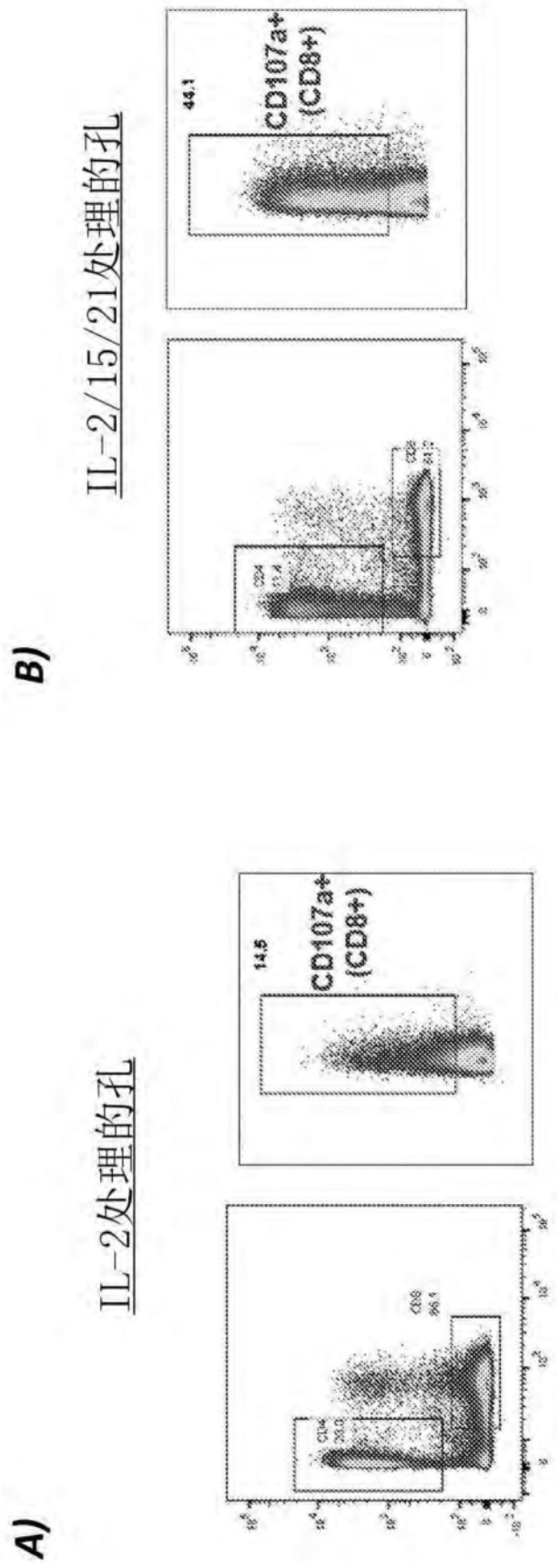


图32

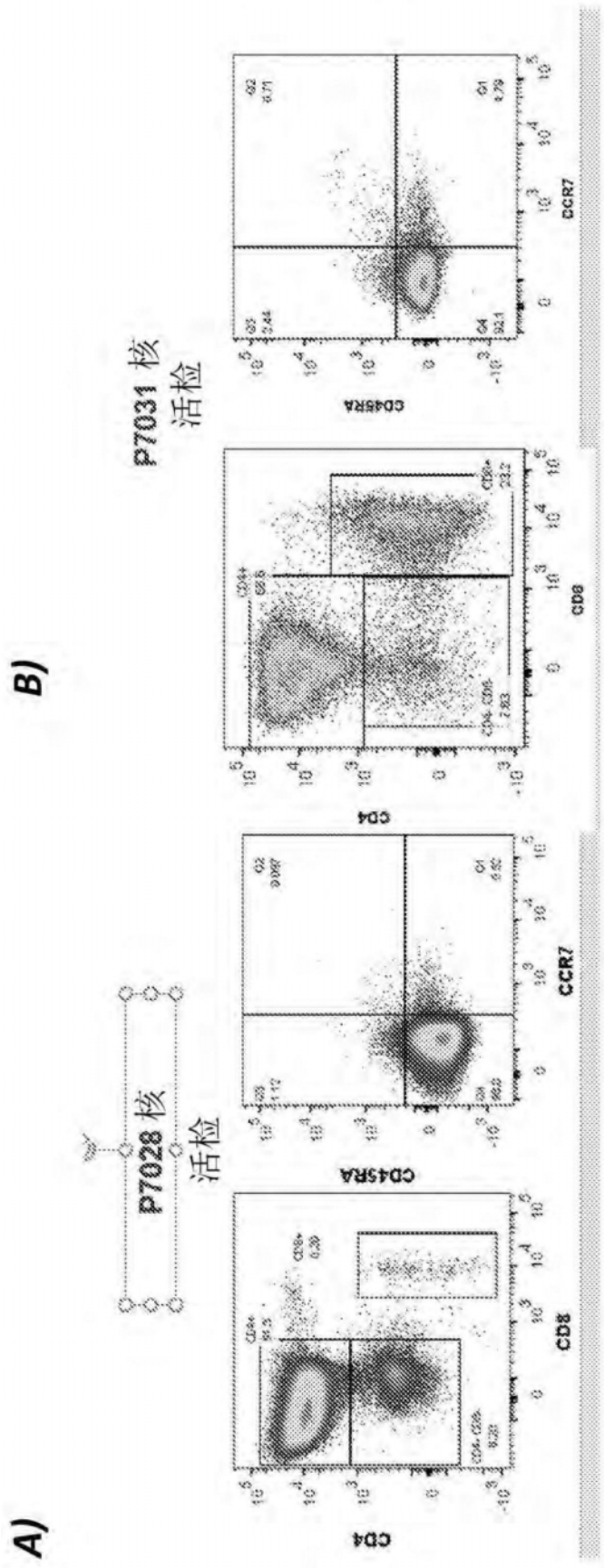

A)
P7028 核
活检
CD4
CD45RA
CD8
CCR7
B)
P7031 核
活检
CD4
CD45RA
CD8
CCR7

图33

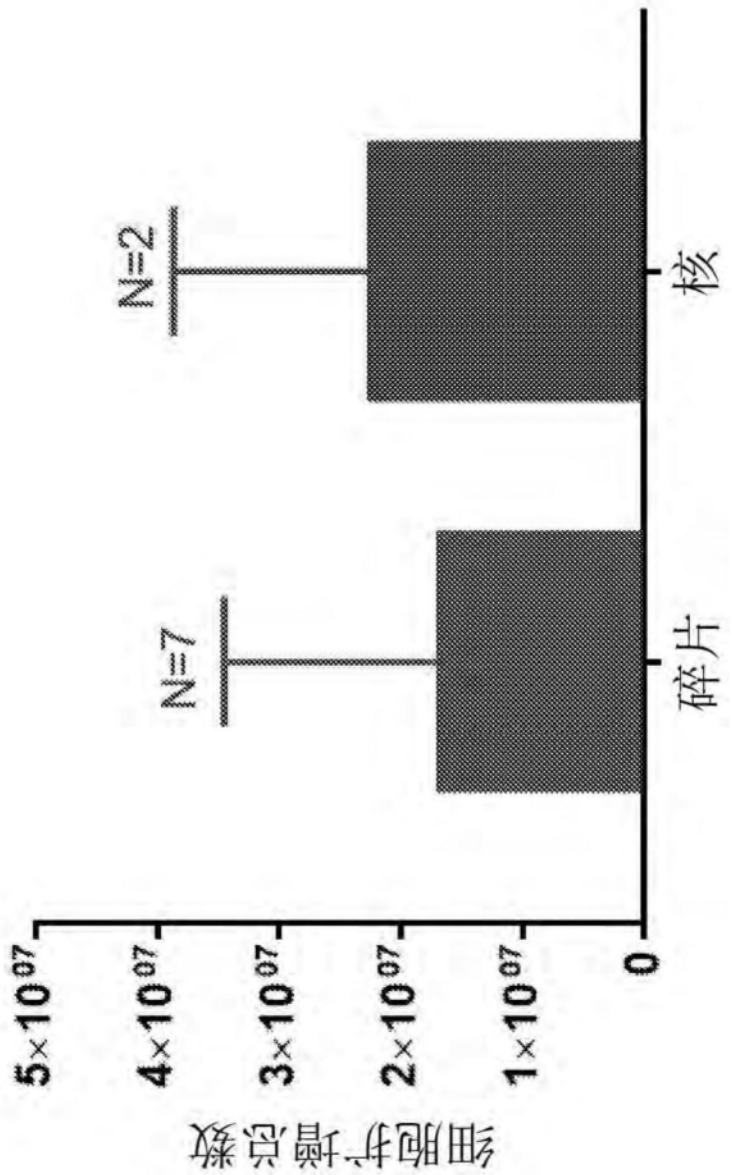


图34

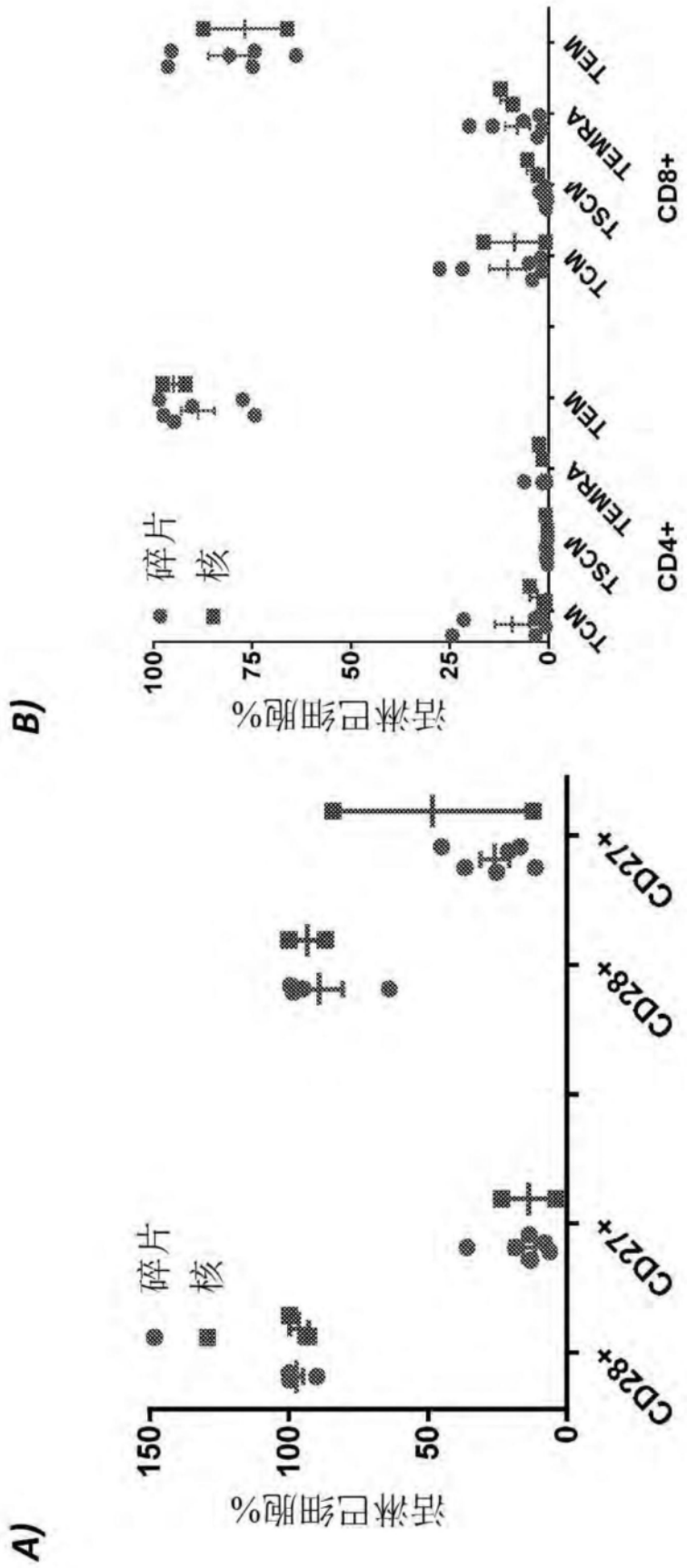

A)
活淋巴细胞%
150
100
50
0
碎片
核
CD28+
CD27+
CD28+
CD27+
B)
活淋巴细胞%
100
75
50
25
0
碎片
核
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD4+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD8+

图35

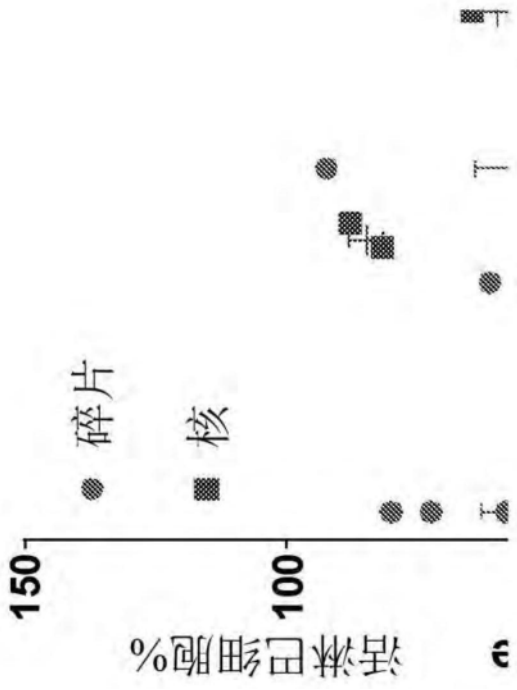


图36

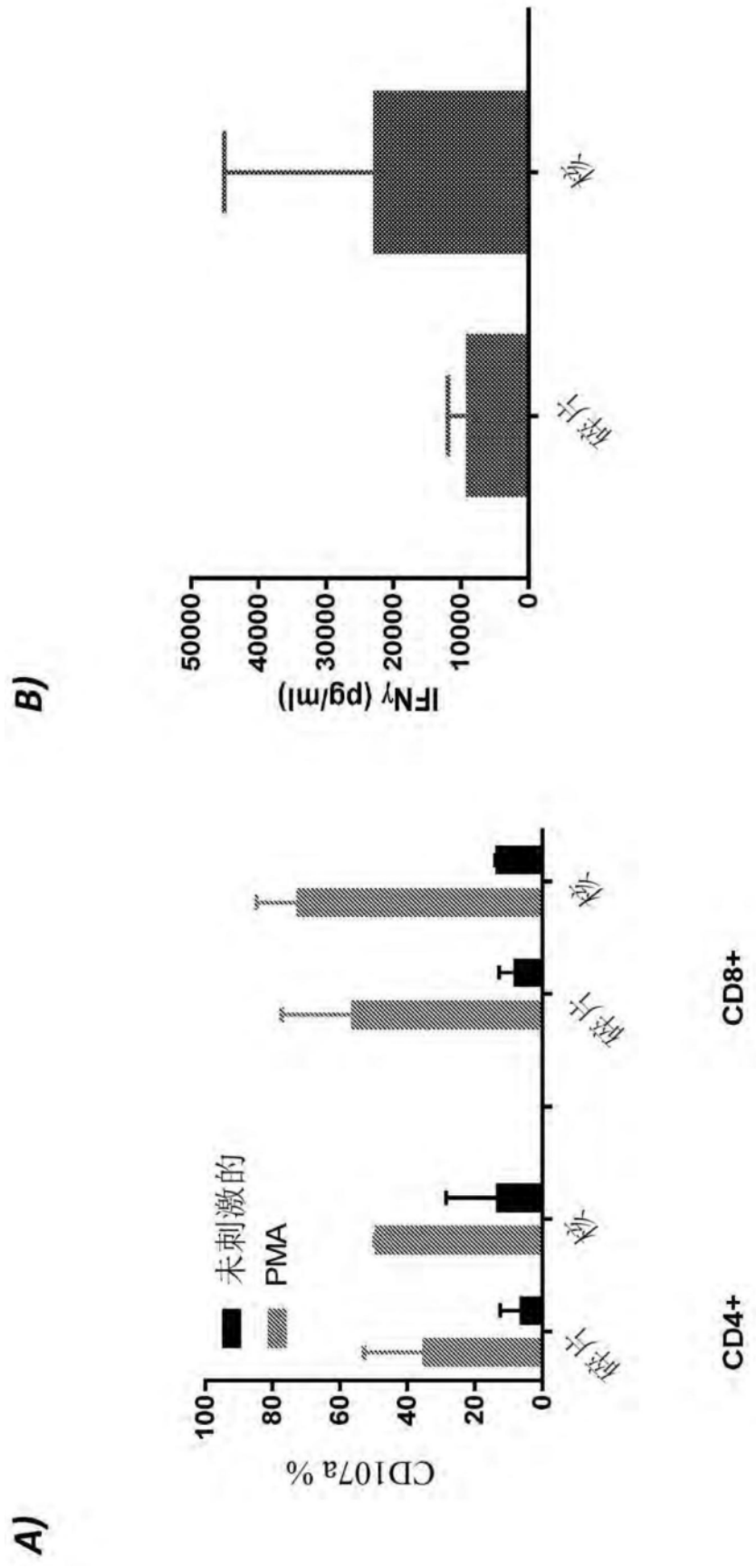

A)
B)
CD107a %
100
80
60
40
20
0
未刺激的
PMA
母体
母体
CD4+
CD8+
IFNγ (pg/ml)
50000
40000
30000
20000
10000
0

图37

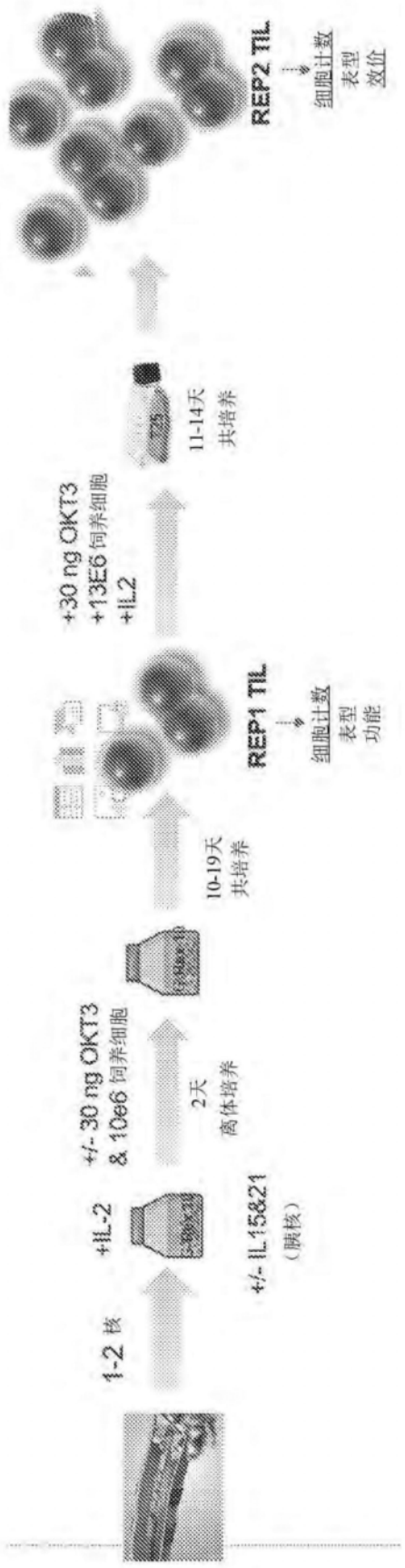

1-2 核
+IL-2
+/- IL15&21
（膜核）
+/- 30 ng OKT3
& 10e6 饲养细胞
2天
离体培养
10-19天
共培养
REP1 TIL
细胞计数
表型
功能
+30 ng OKT3
+13E6 饲养细胞
+IL2
11-14天
共培养
REP2 TIL
细胞计数
表型
效价

图38A

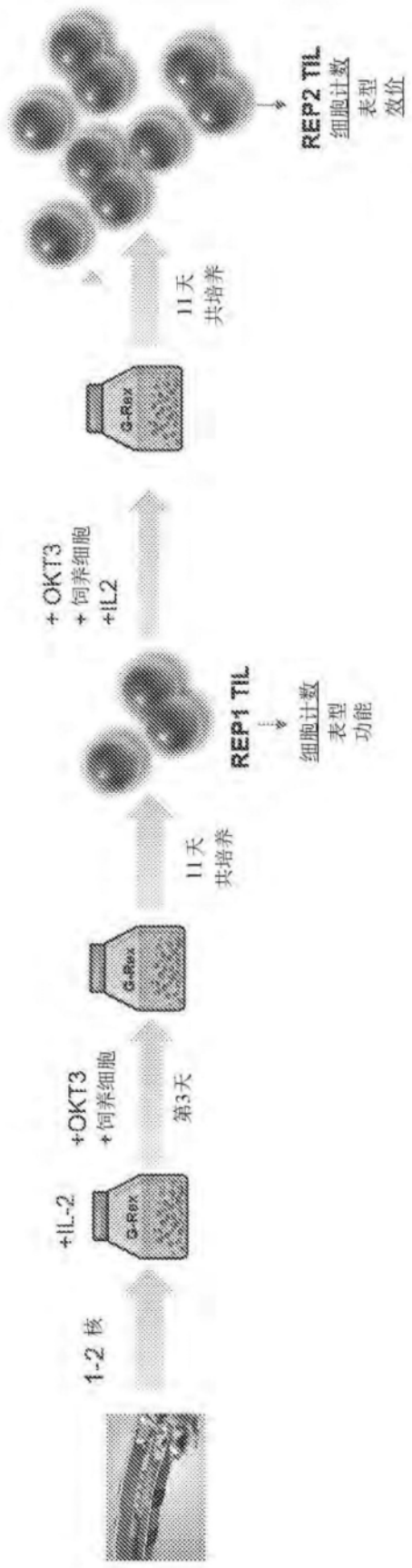

1-2 核
+IL-2
G-Rex
+OKT3
+饲养细胞
第3天
G-Rex
11天
共培养
REP1 TIL
细胞计数
表型
功能
+ OKT3
+ 饲养细胞
+IL2
G-Rex
11天
共培养
REP2 TIL
细胞计数
表型
效价

图38B

	培养条件	核/条件(#)	REP1	REP2
胰 (P7034)	REP1: + TC +OKT3 & 饲养细胞 vs 无 OKT3 & 饲养细胞 REP2: +/- 三重混合物	2（2个条件）	在第17天> 50E6个细胞仅存在OKT3 &饲养细胞	扩增207倍& 162倍 +/- 三重混合物 ~3000 pg/ml IFNγ +/- 三重混合物
胰 (P7037)	REP1: IL2 vs TC REP2: +/- 三重混合物	4（2个条件）	在第11天> 50E6个细胞仅存在OKT3& 饲养细胞+/- TC	扩增207倍& 231倍 +/- 三重混合物 ~1000 pg/ml IFNγ+/- 三重混合物
胰 (P7039)	REP1: TC + OKT3& 饲养细胞, TC 无 OKT3 & 饲养细胞 IL-2 + OKT3& 饲养细胞, IL-2 无 OKT3& 饲养细胞 REP2: +/- TC	2（4个条件）	在第12天> 50E6个细胞 (+/- TC) 仅存在OKT3& 饲养细胞	扩增662倍& 582倍 三重混合物 ~10K & 3K pg/ml IFNγ+/- 三重混合物

图39

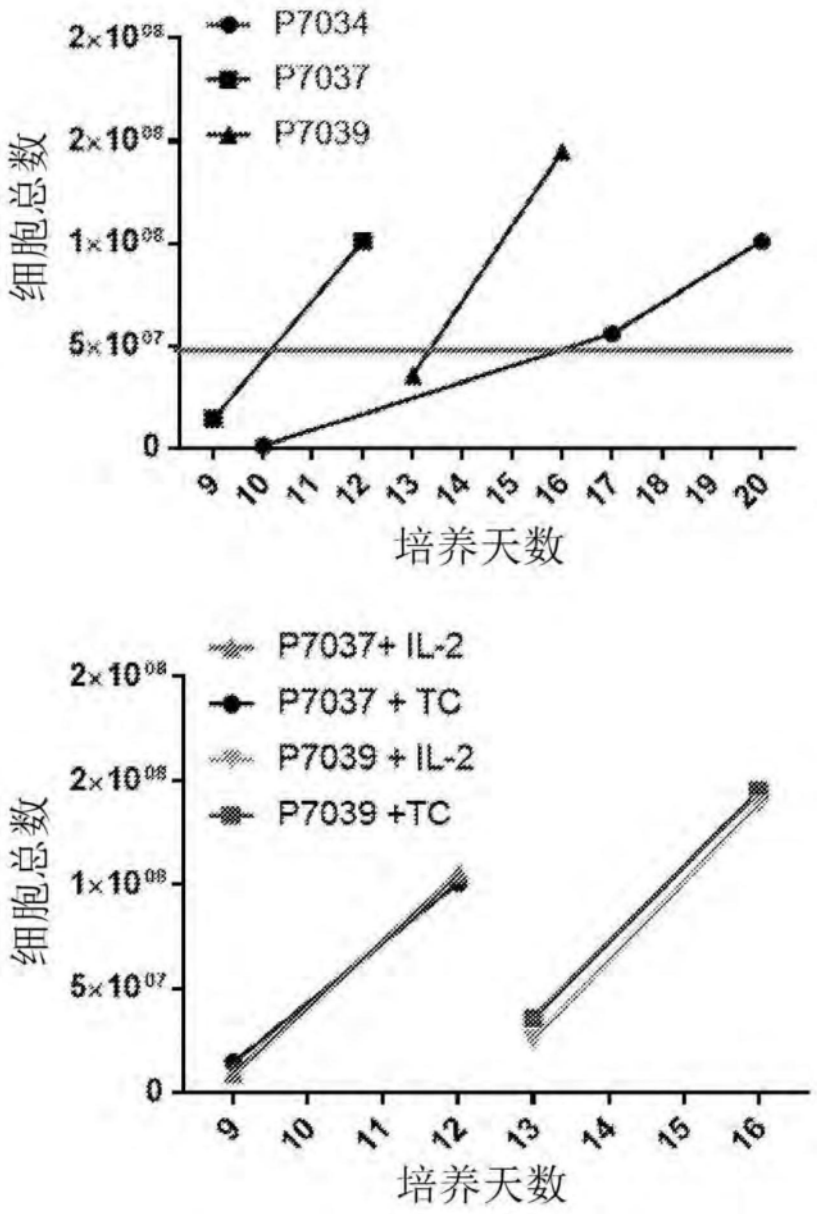

P7034
P7037
P7039
细胞总数
2×10^08
2×10^08
1×10^08
5×10^07
0
9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
培养天数
P7037+ IL-2
P7037 + TC
P7039 + IL-2
P7039 +TC
细胞总数
2×10^08
2×10^08
1×10^08
5×10^07
0
9 10 11 12 13 14 15 16
培养天数

图40

	培养条件	核/条件(#)	REP1	REP2
黑色素瘤(M1114)	REP1: IL2 REP2: IL-2	2	在第11天> 50E6个细胞	扩增215倍 ~1000 pg/ml IFNγ
黑色素瘤(M1115)	REP1: IL2 REP2: IL-2	2	在第12天> 50E6个细胞	扩增662倍 ~3000 pg/ml IFNγ
黑色素瘤(M1118)	REP1: IL-2 REP2: IL-2	1	在第11天> 50E6个细胞	扩增215倍 ~10,000 pg/ml IFNγ
** 黑色素瘤(M1121)	REP1: IL2 REP2: IL-2	1	在第9天50E6 个细胞	扩增155倍 ~2000 pg/ml IFNγ

图41

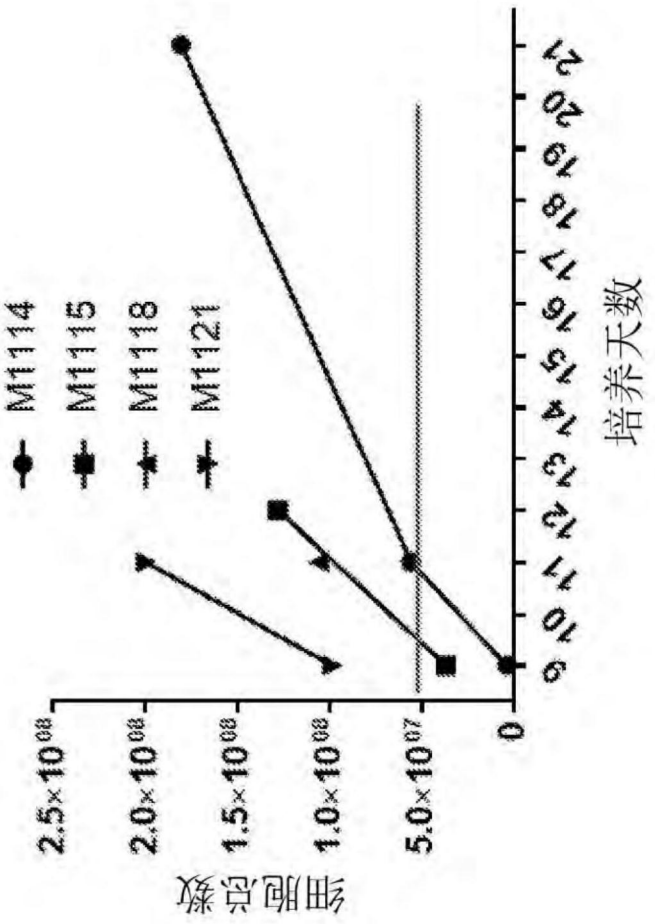

M1114
M1115
M1118
M1121
细胞总数
2.5×10^08
2.0×10^08
1.5×10^08
1.0×10^08
5.0×10^07
0
9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
培养天数

图42

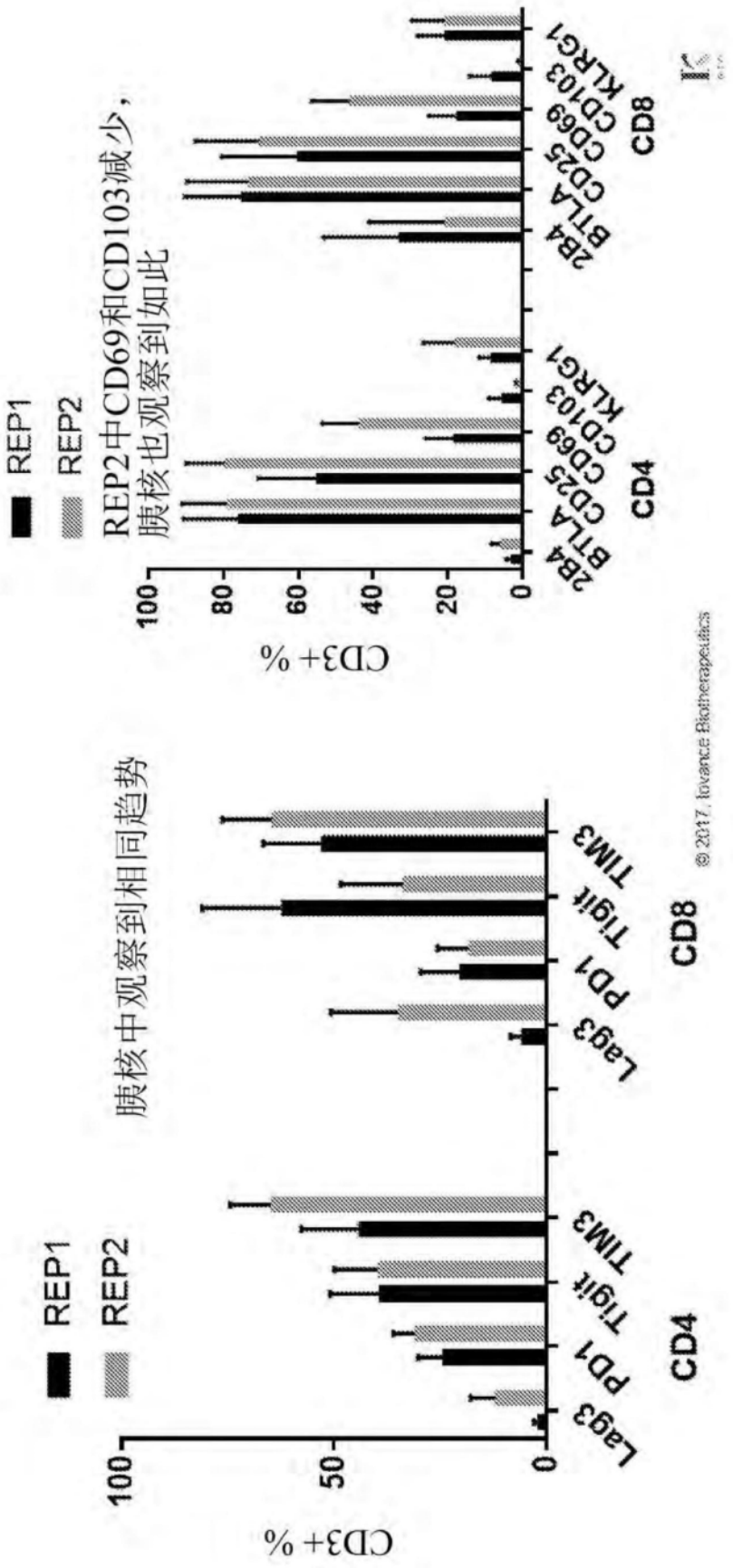

REP1
REP2
胰核中观察到相同趋势
CD3+ %
100
50
0
Lag3
PD1
Tigit
TIM3
CD4
Lag3
PD1
Tigit
TIM3
CD8
REP1
REP2
REP2中CD69和CD103减少，
胰核也观察到如此
CD3+ %
100
80
60
40
20
0
2B4
BTLA
CD25
CD69
CD103
KLRG1
CD4
2B4
BTLA
CD25
CD69
CD103
KLRG1
CD8
© 2017, Iovance Biotherapeutics

图43

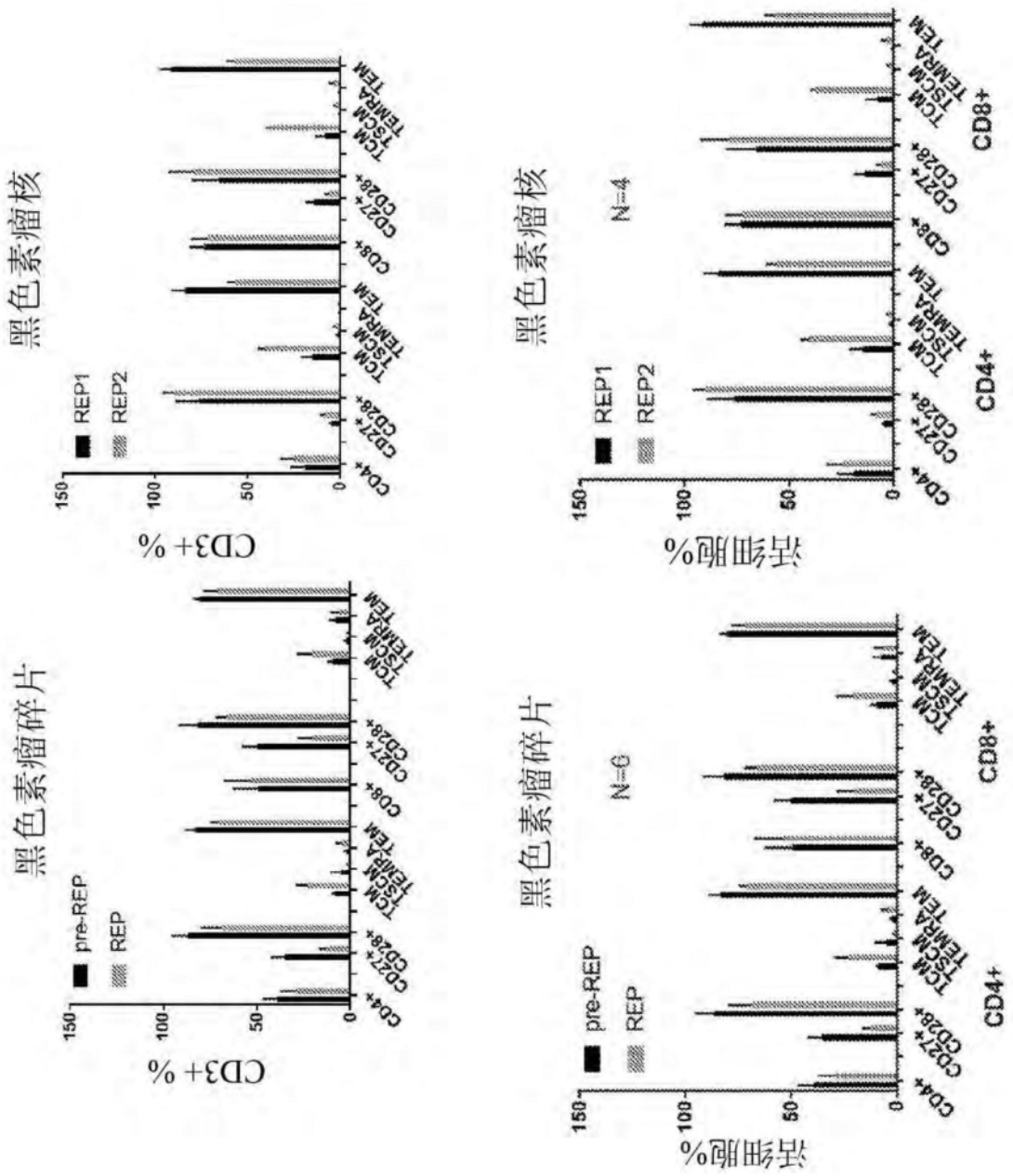

黑色素瘤核
REP1
REP2
CD3+ %
活细胞%
N=4
CD4+
CD8+
黑色素瘤碎片
pre-REP
REP
N=6
CD4+
CD27+
CD28+
CD8+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM

图44

	培养条件	核/条件 (#)	REP1	REP2
乳腺 (EP11032)	REP1: IL2 REP2: IL-2	1 vs 2	>50E6个细胞，第11天	扩增173倍和158倍（1/2个核） ~ pg/ml IFNg
卵巢 (OV8016)	REP1: IL2 +/- OX40 REP2: IL-2 +/- OX40	2	>50E6个细胞，第11天(OX40条件)	进行中

图45

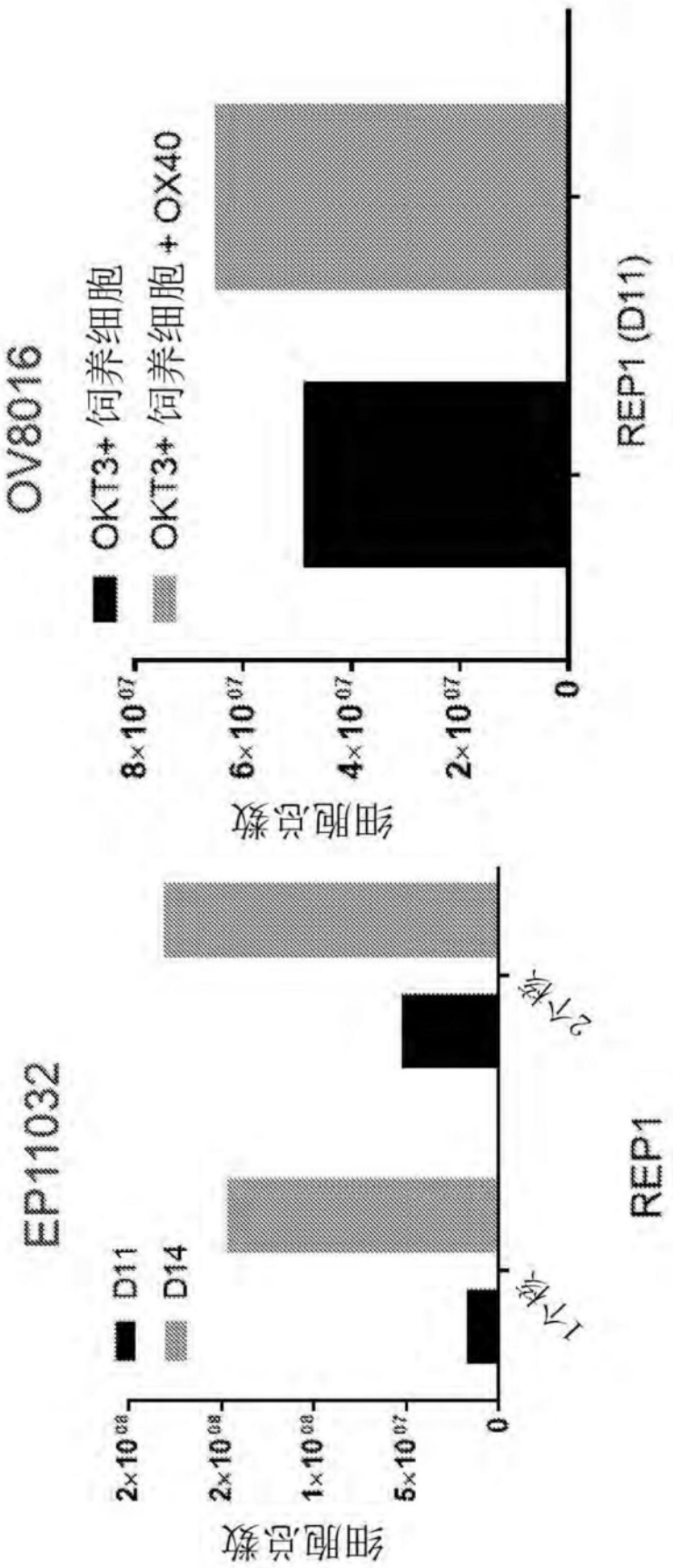

OV8016
OKT3+ 饲养细胞
OKT3+ 饲养细胞 + OX40
细胞总数
8×10^07
6×10^07
4×10^07
2×10^07
0
REP1 (D11)
EP11032
D11
D14
细胞总数
2×10^08
2×10^08
1×10^08
5×10^07
0
1次/次
2次/次
REP1

图46

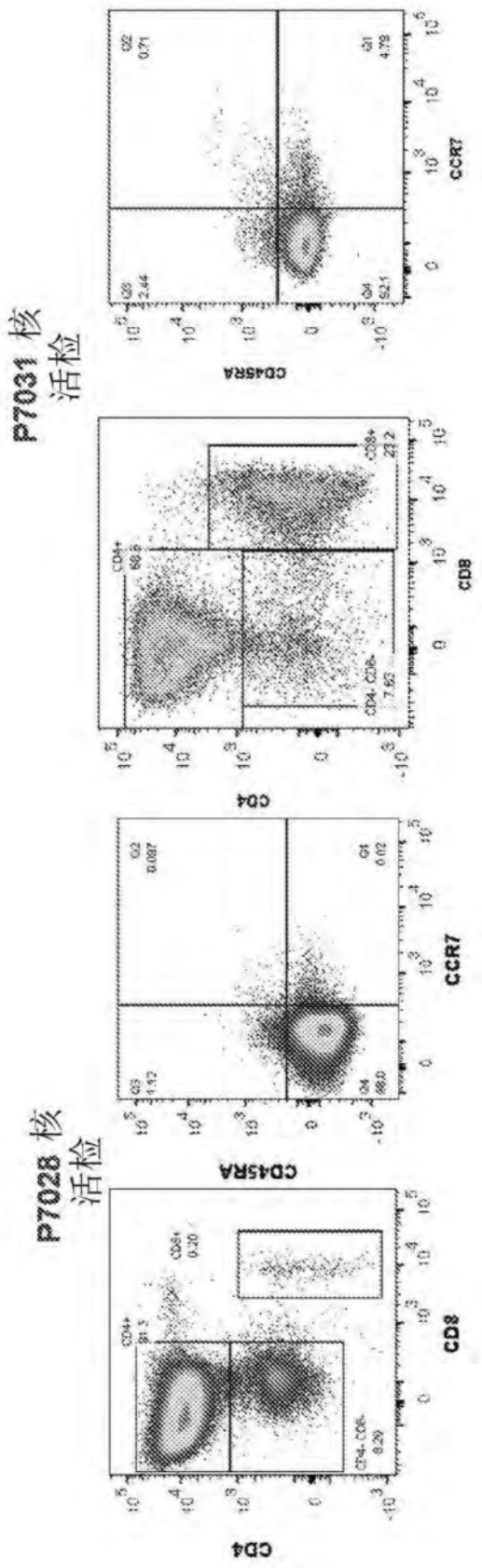


图47

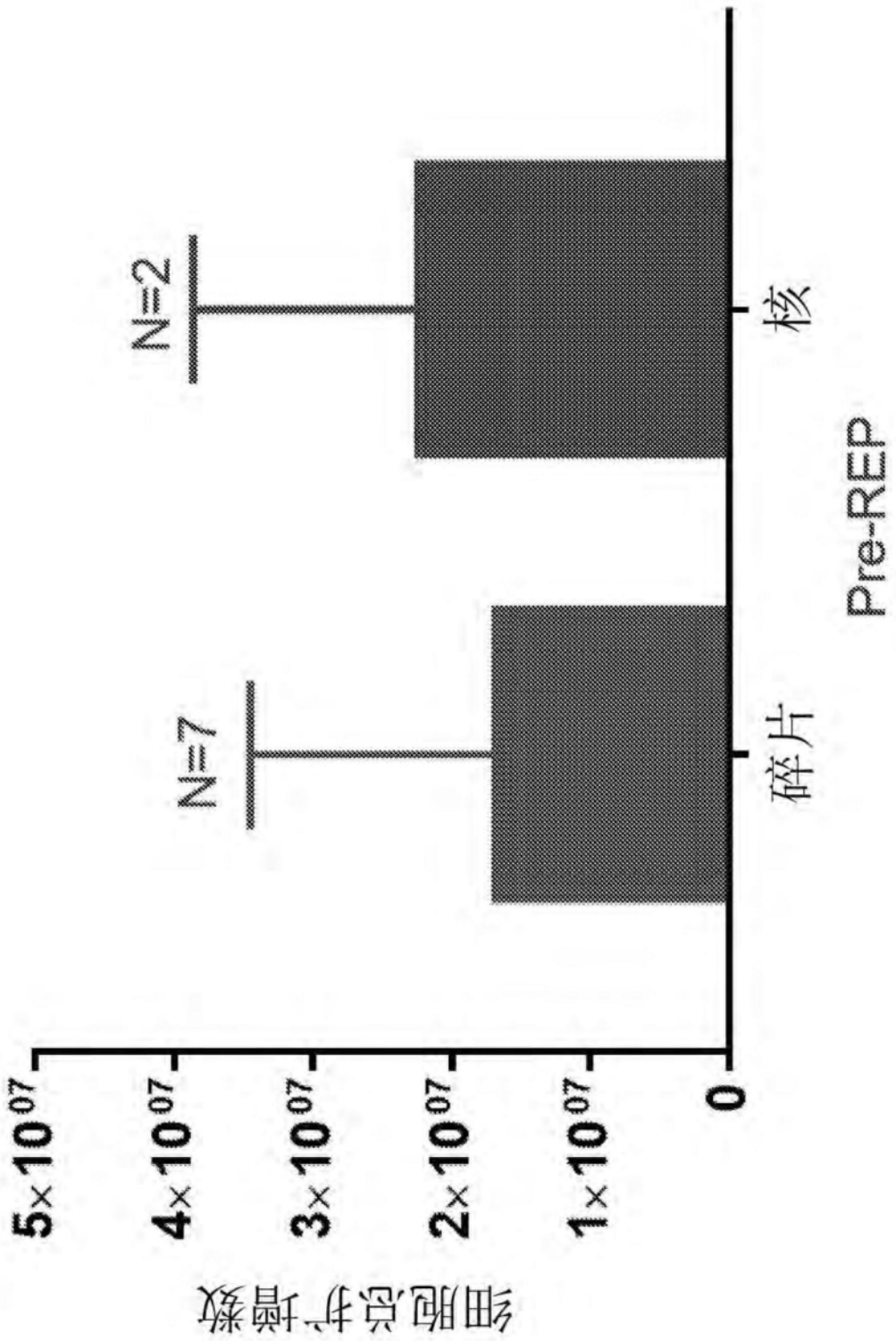


图48

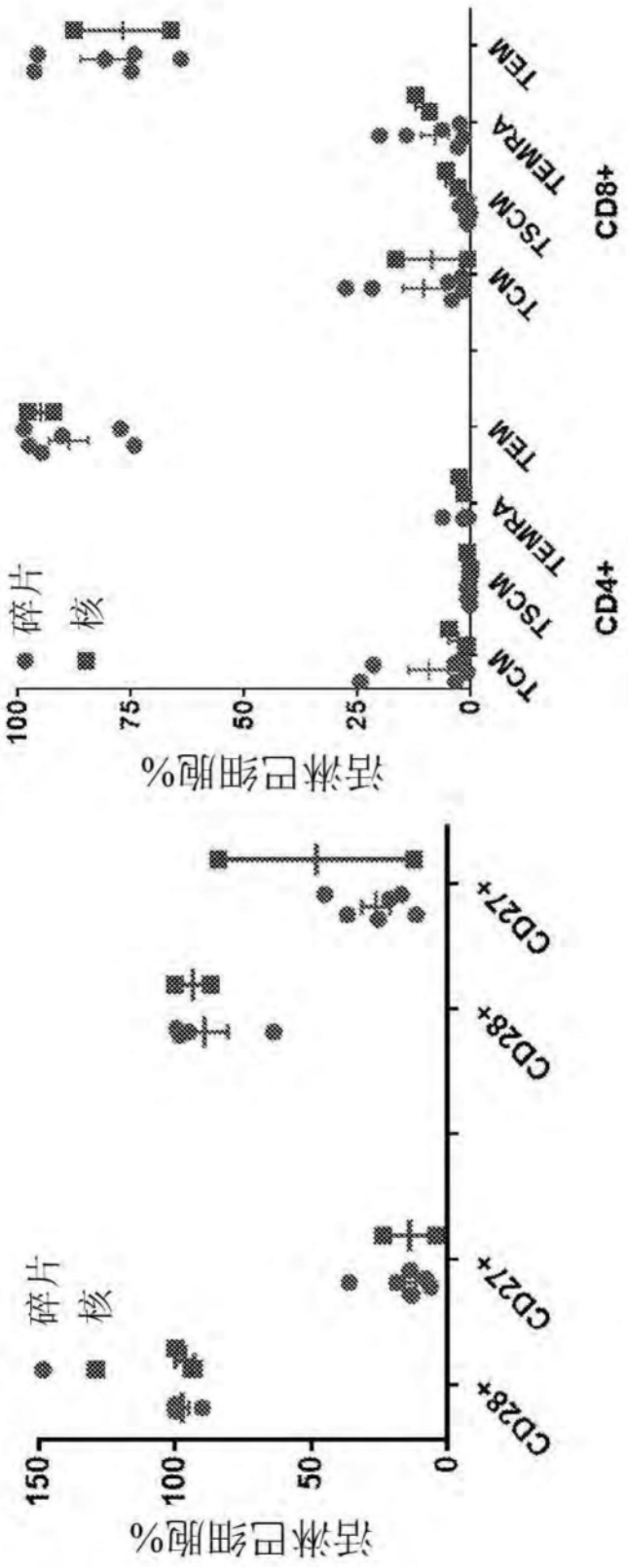

活淋巴细胞%
150
100
50
0
碎片
核
CD28+
CD27+
CD28+
CD27+
活淋巴细胞%
100
75
50
25
0
碎片
核
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD4+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD8+

图49

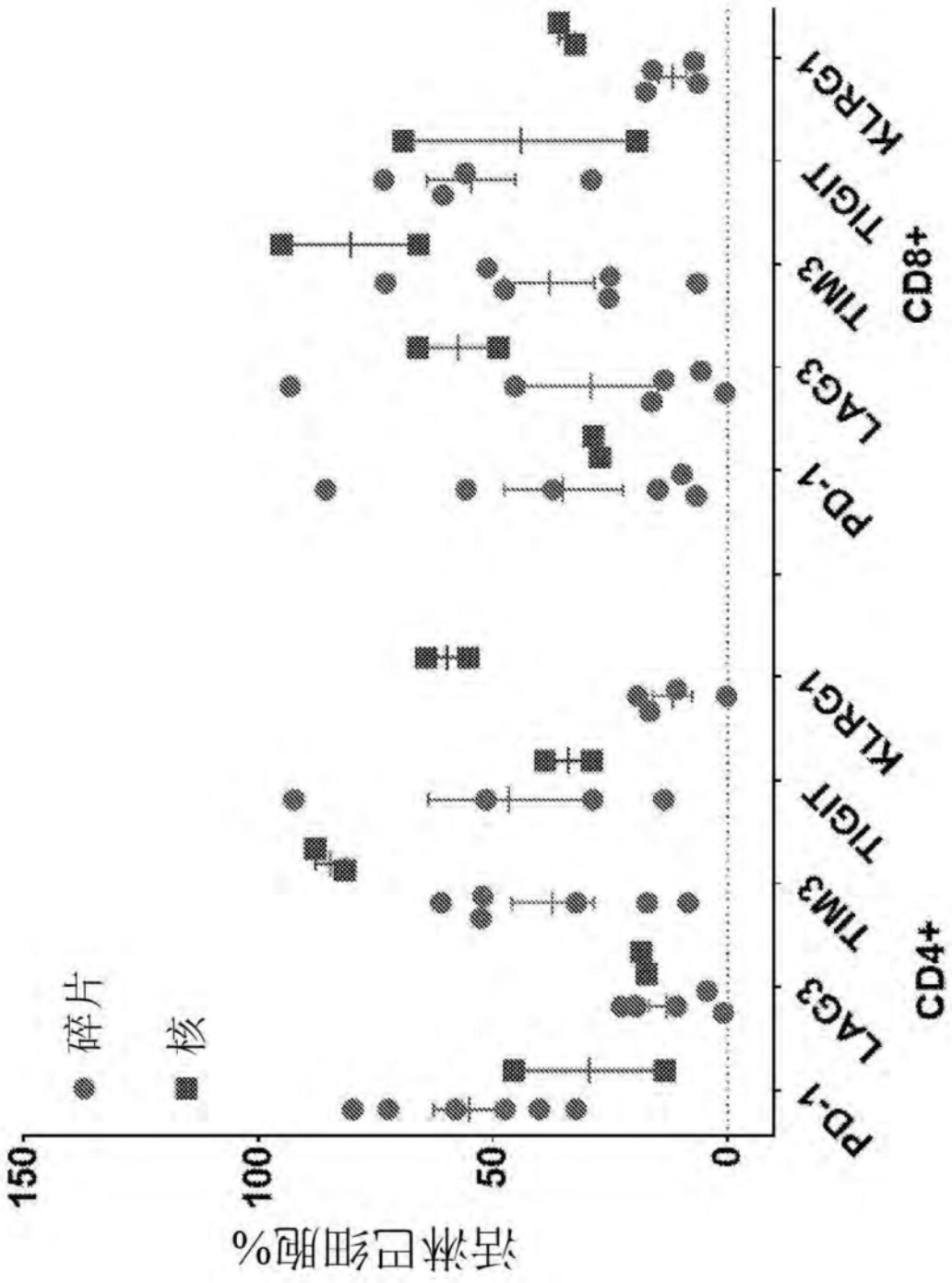

活淋巴细胞%
150
100
50
0
碎片
核
PD-1
LAG3
TIM3
TIGIT
KLRG1
CD4+
PD-1
LAG3
TIM3
TIGIT
KLRG1
CD8+

图50

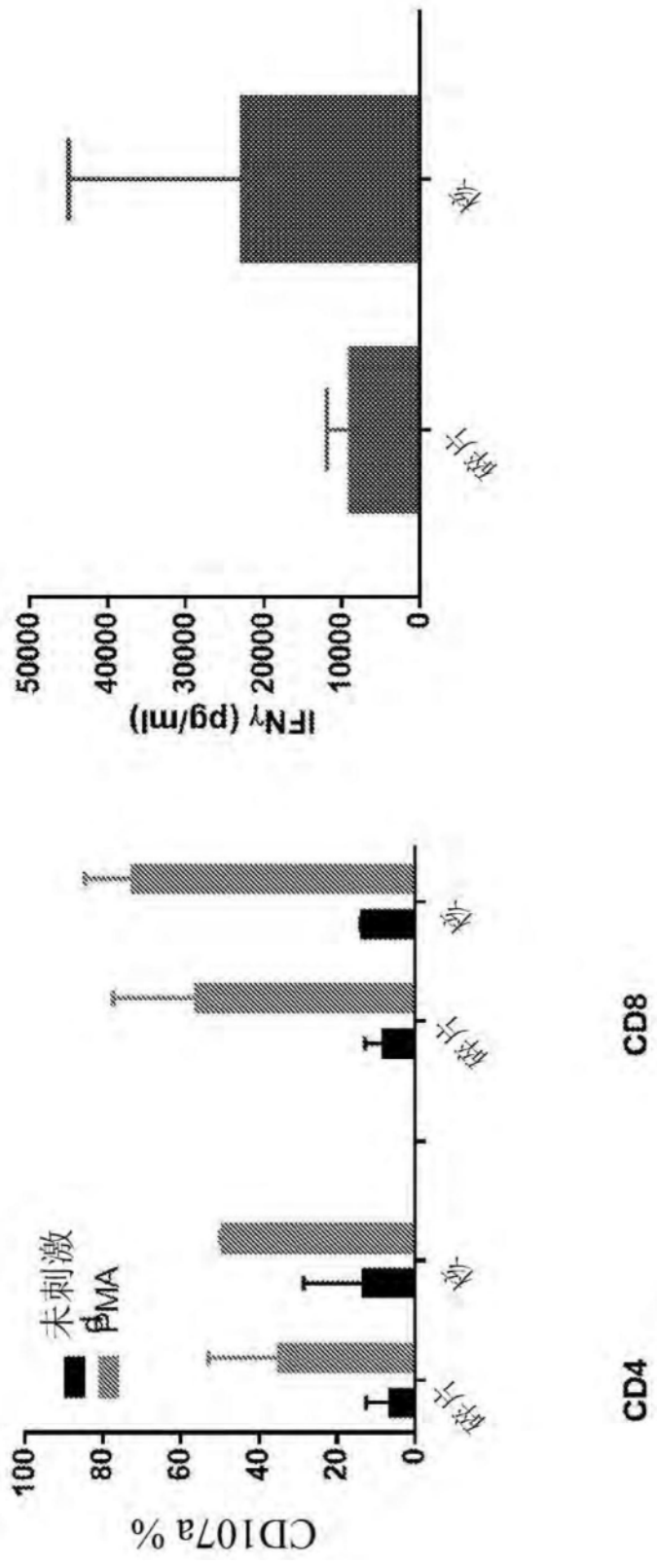

IFNγ (pg/ml)
50000
40000
30000
20000
10000
0
供体
受体
CD107a %
100
80
60
40
20
0
未刺激
PMA
CD4
CD8

图51

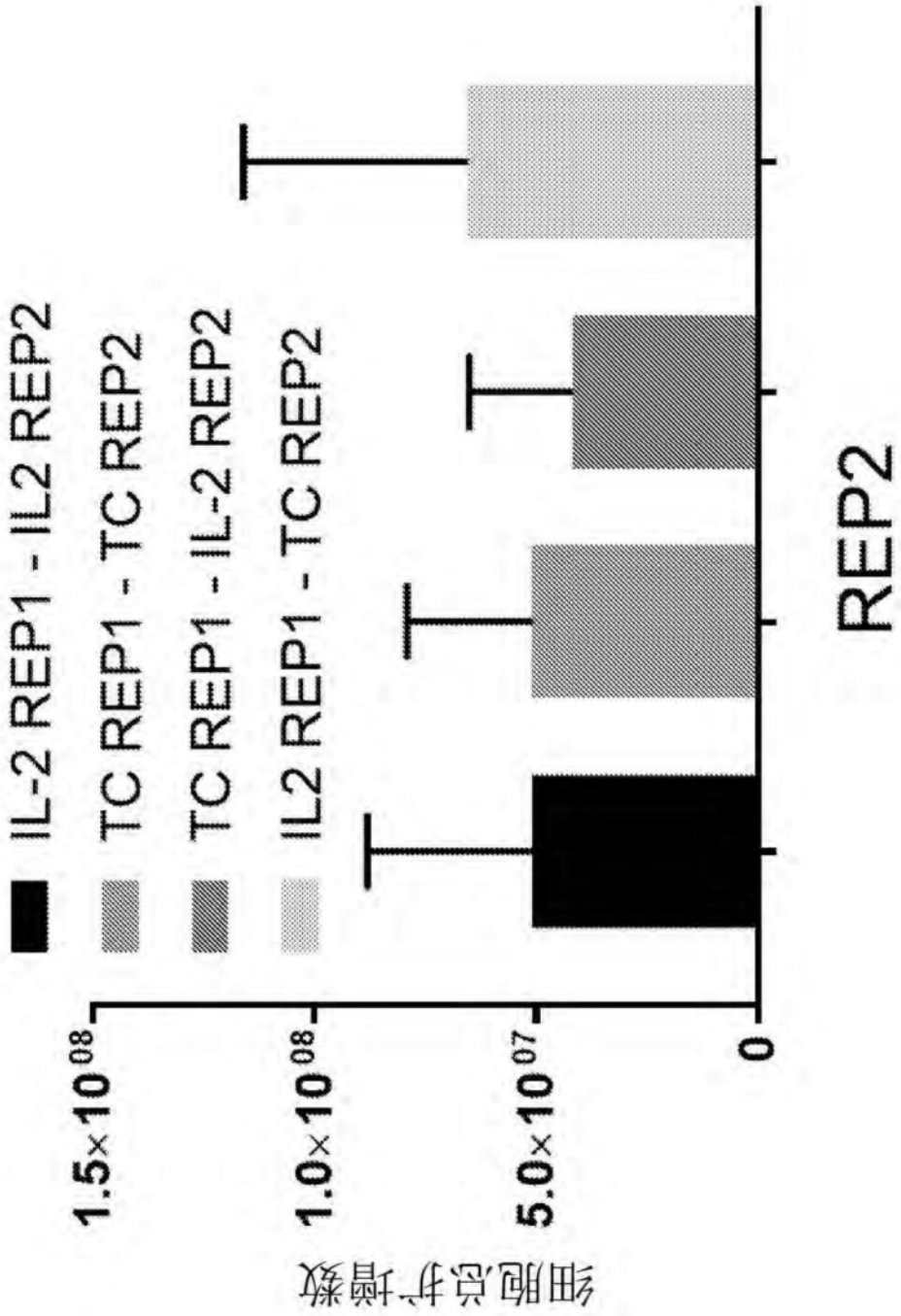

IL-2 REP1 - IL2 REP2
TC REP1 - TC REP2
TC REP1 - IL-2 REP2
IL2 REP1 - TC REP2
1.5×10^08
1.0×10^08
5.0×10^07
0
细胞总扩增数
REP2

图52

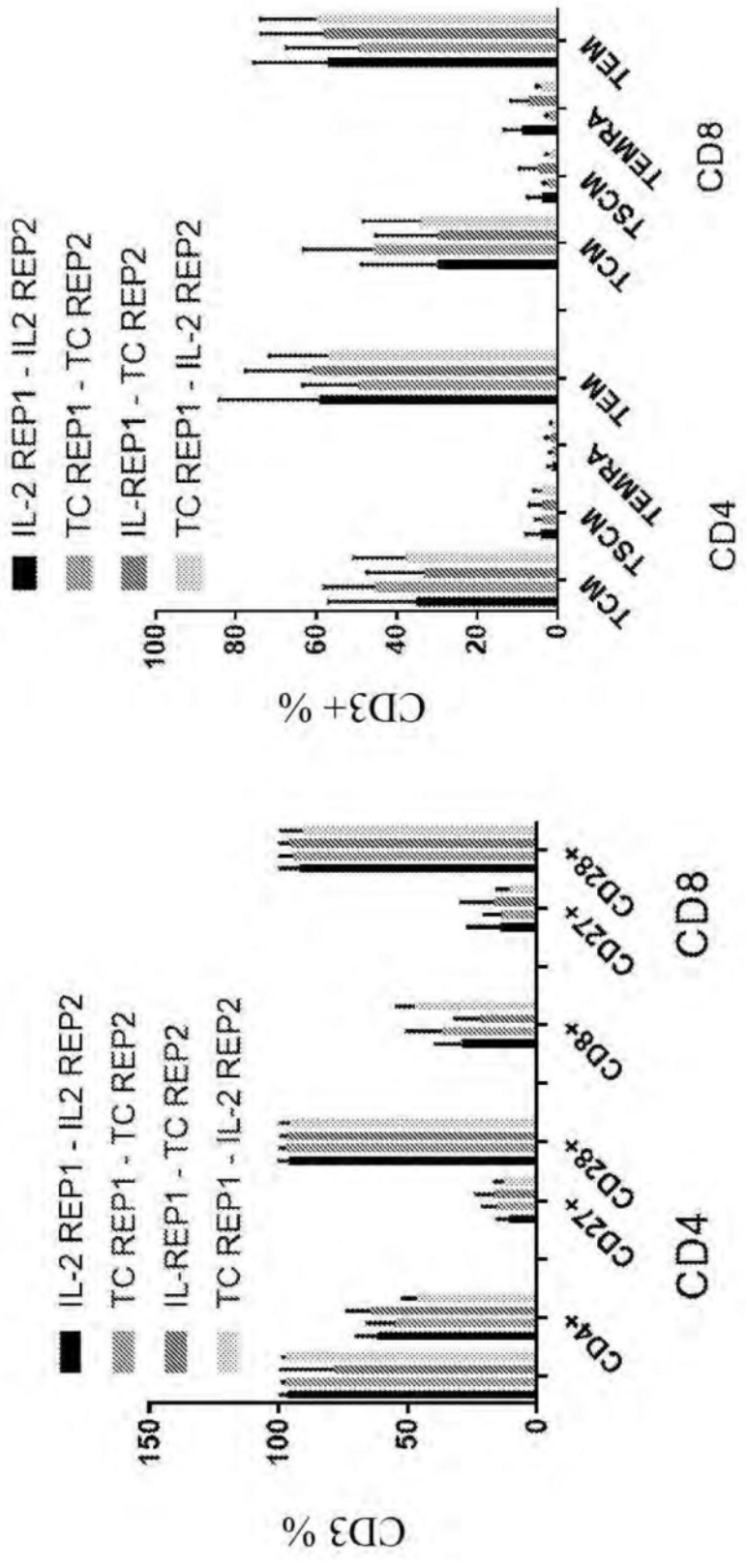

IL-2 REP1 - IL2 REP2
TC REP1 - TC REP2
IL-REP1 - TC REP2
TC REP1 - IL-2 REP2
CD3+ %
100
80
60
40
20
0
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD4
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD8
IL-2 REP1 - IL2 REP2
TC REP1 - TC REP2
IL-REP1 - TC REP2
TC REP1 - IL-2 REP2
CD3 %
150
100
50
0
CD4+
CD27+
CD28+
CD8+
CD27+
CD28+
CD4
CD8

图53

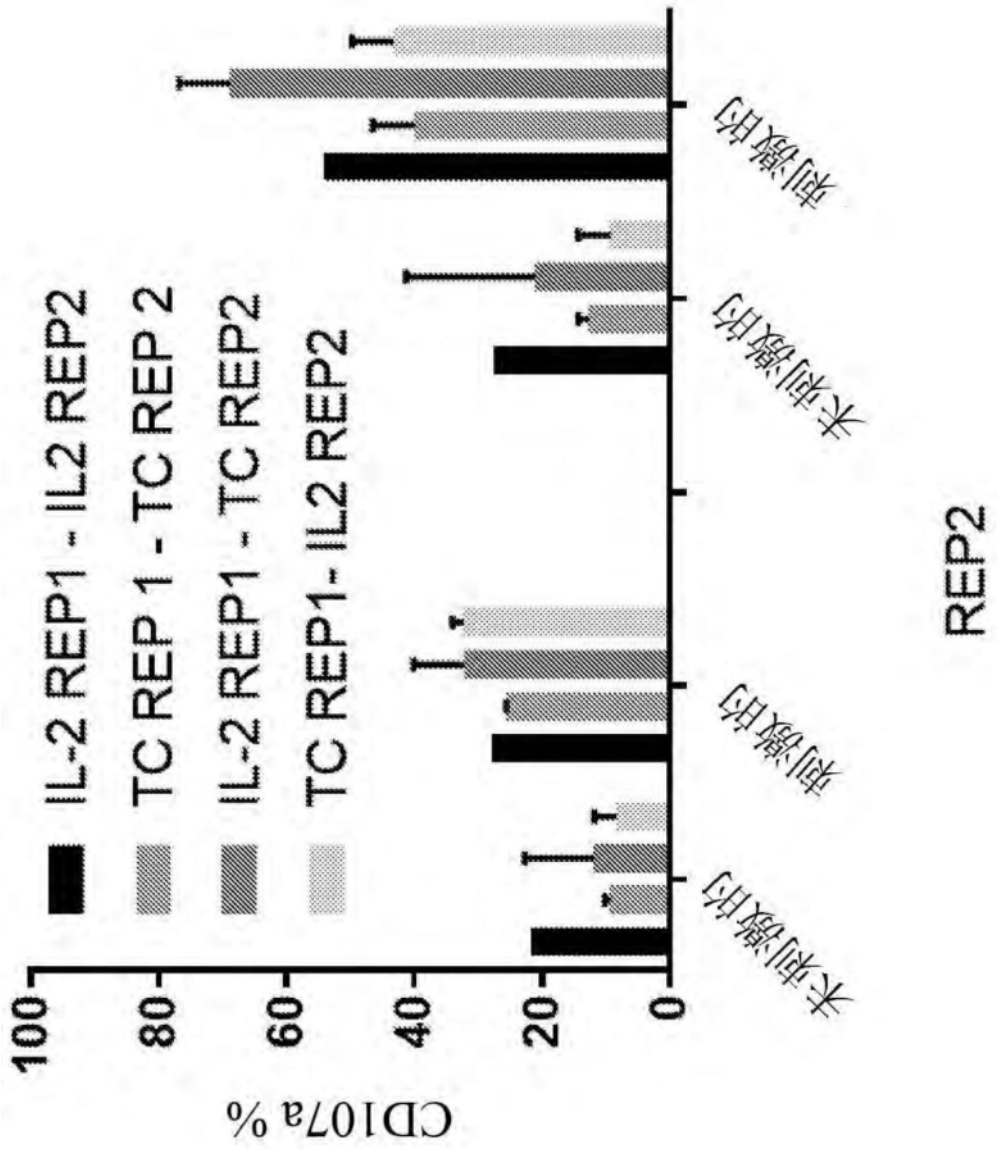

IL-2 REP1 - IL2 REP2
TC REP 1 - TC REP 2
IL-2 REP1 - TC REP2
TC REP1- IL2 REP2
CD107a %
100
80
60
40
20
0
未刺激的
刺激的
未刺激的
刺激的
REP2

图54

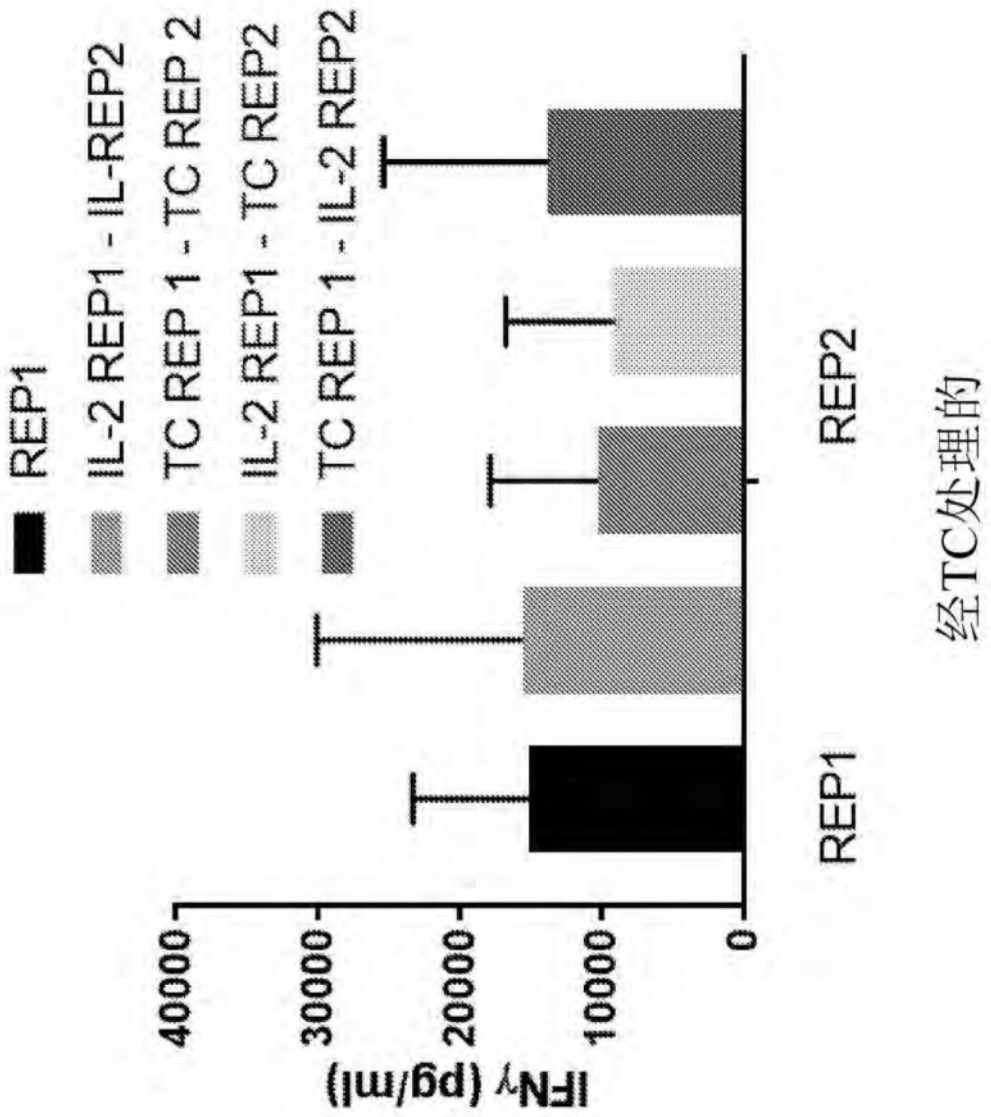

REP1
IL-2 REP1 - IL-REP2
TC REP 1 - TC REP 2
IL-2 REP1 - TC REP2
TC REP 1 - IL-2 REP2
IFNγ (pg/ml)
40000
30000
20000
10000
0
REP1
REP2
经TC处理的

图55

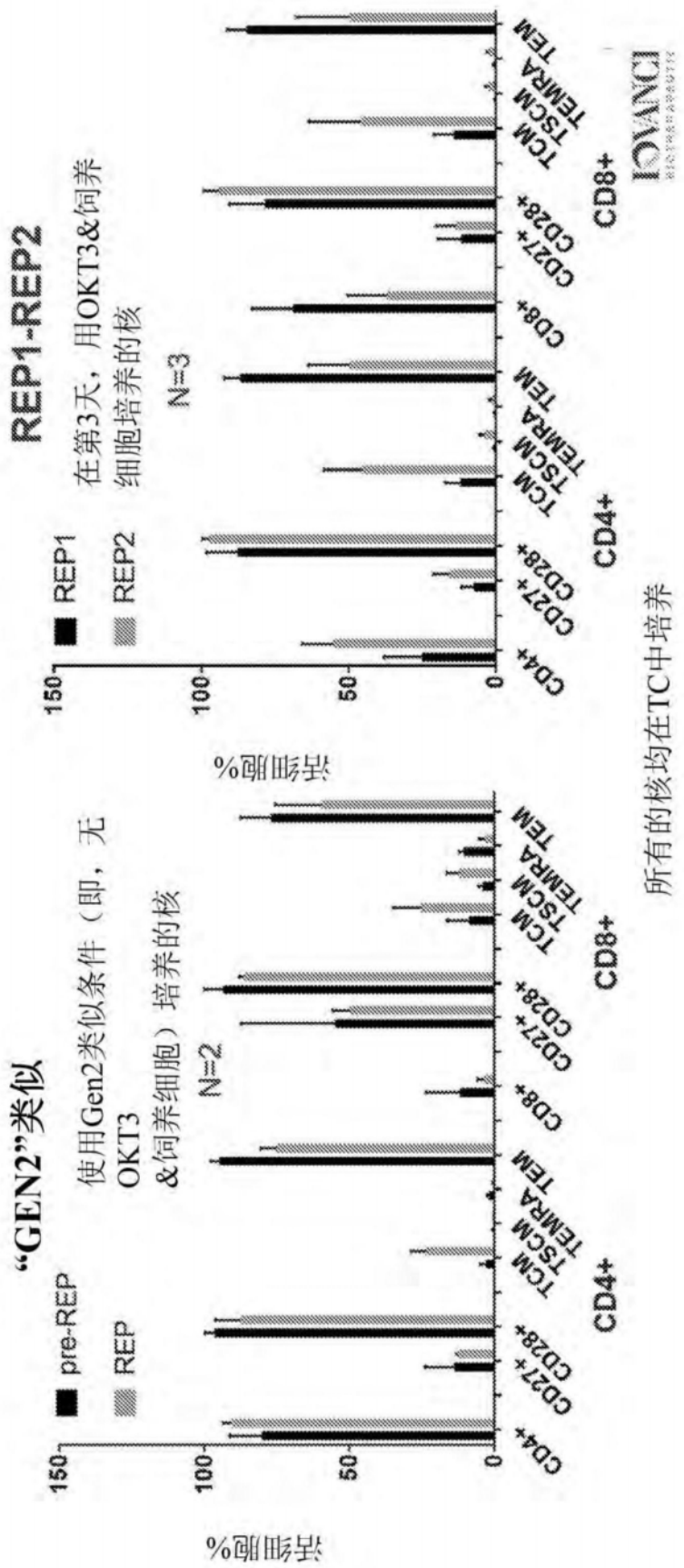

"GEN2"类似
pre-REP
REP
使用Gen2类似条件（即，无OKT3&饲养细胞）培养的核
N=2
REP1-REP2
REP1
REP2
在第3天，用OKT3&饲养细胞培养的核
N=3
活细胞%
CD4+
CD8+
CD4+
CD27+
CD28+
CD8+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
所有的核均在TC中培养
IOVANCI

图56

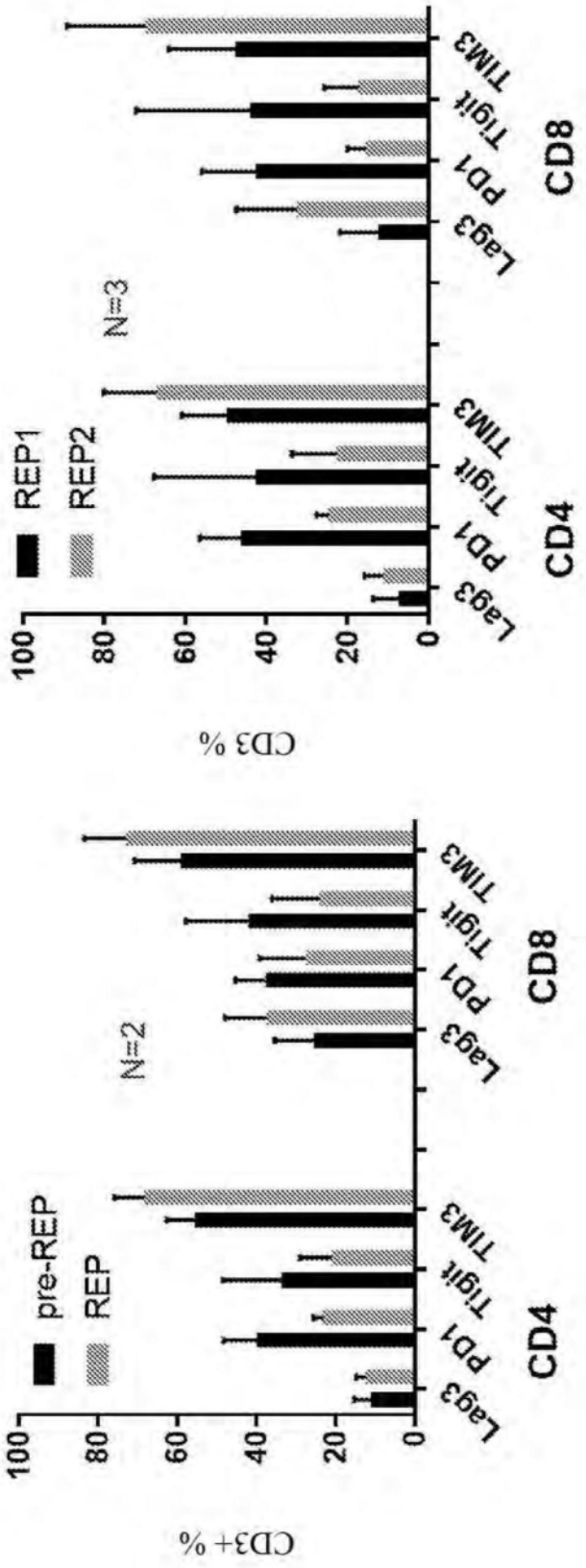

CD3 %
100
80
60
40
20
0
REP1
REP2
N=3
Lag3
PD1
Tigit
TIM3
CD8
CD4
CD3+ %
pre-REP
REP
N=2

图57

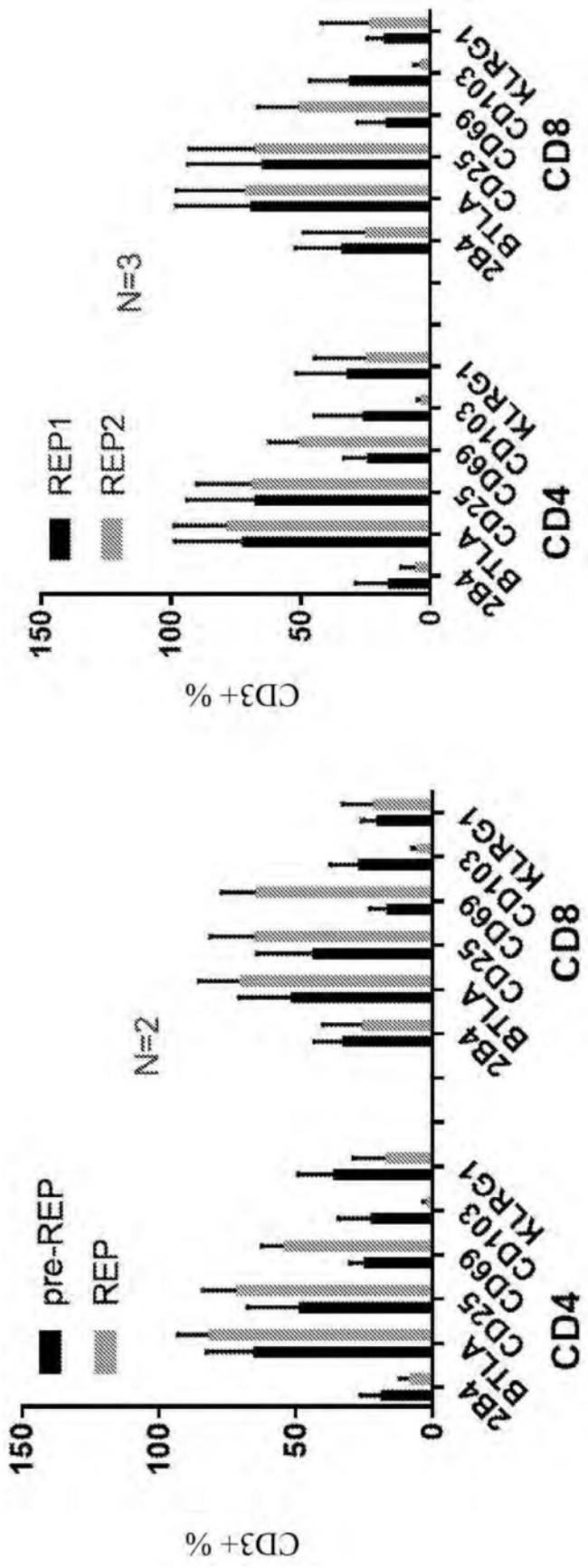

REP1
REP2
N=3
CD3+ %
150
100
50
0
2B4
BTLA
CD25
CD69
CD103
KLRG1
CD4
CD8
pre-REP
REP
N=2

图58

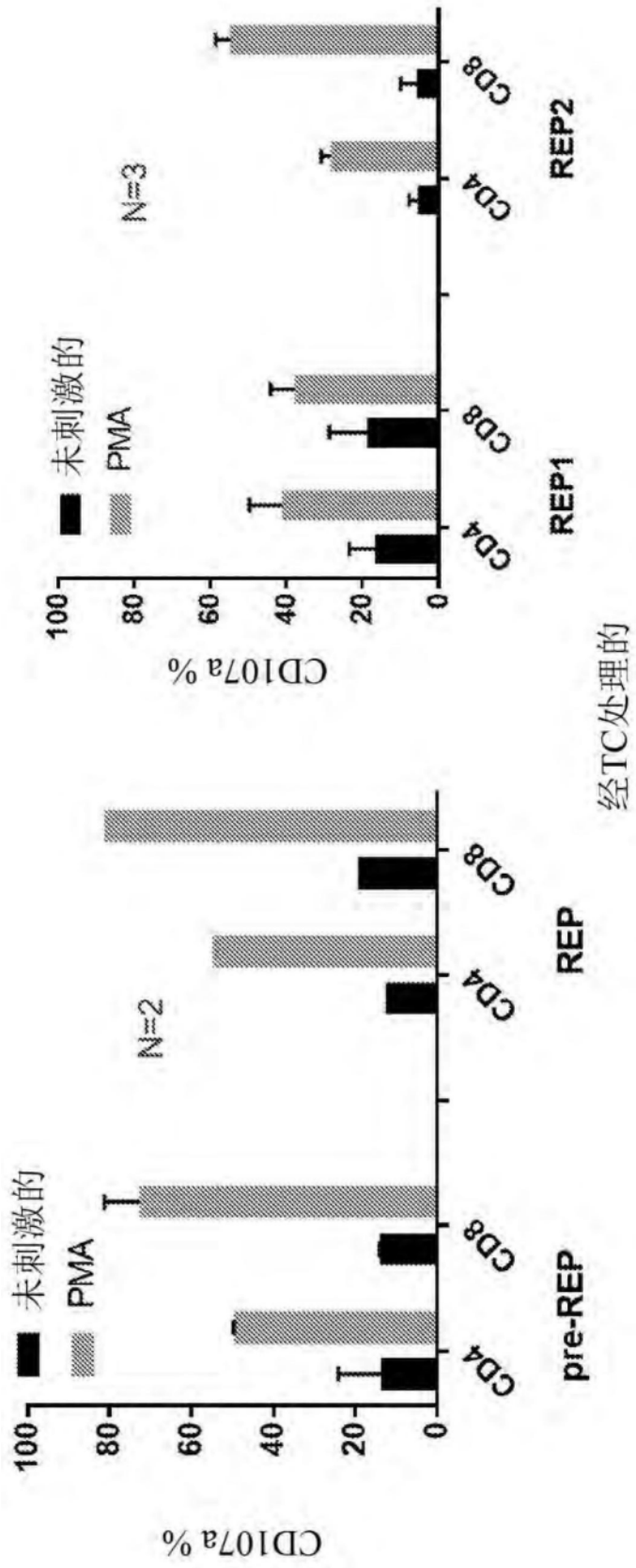

CD107a %
100
80
60
40
20
0
未刺激的
PMA
N=2
CD4
CD8
pre-REP
REP
N=3
REP1
REP2
经TC处理的

图59

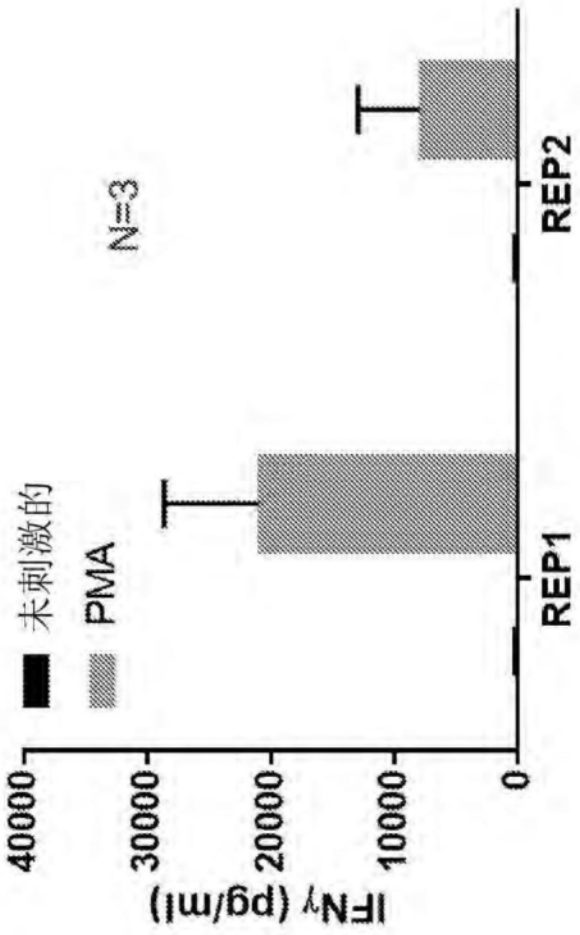


图60

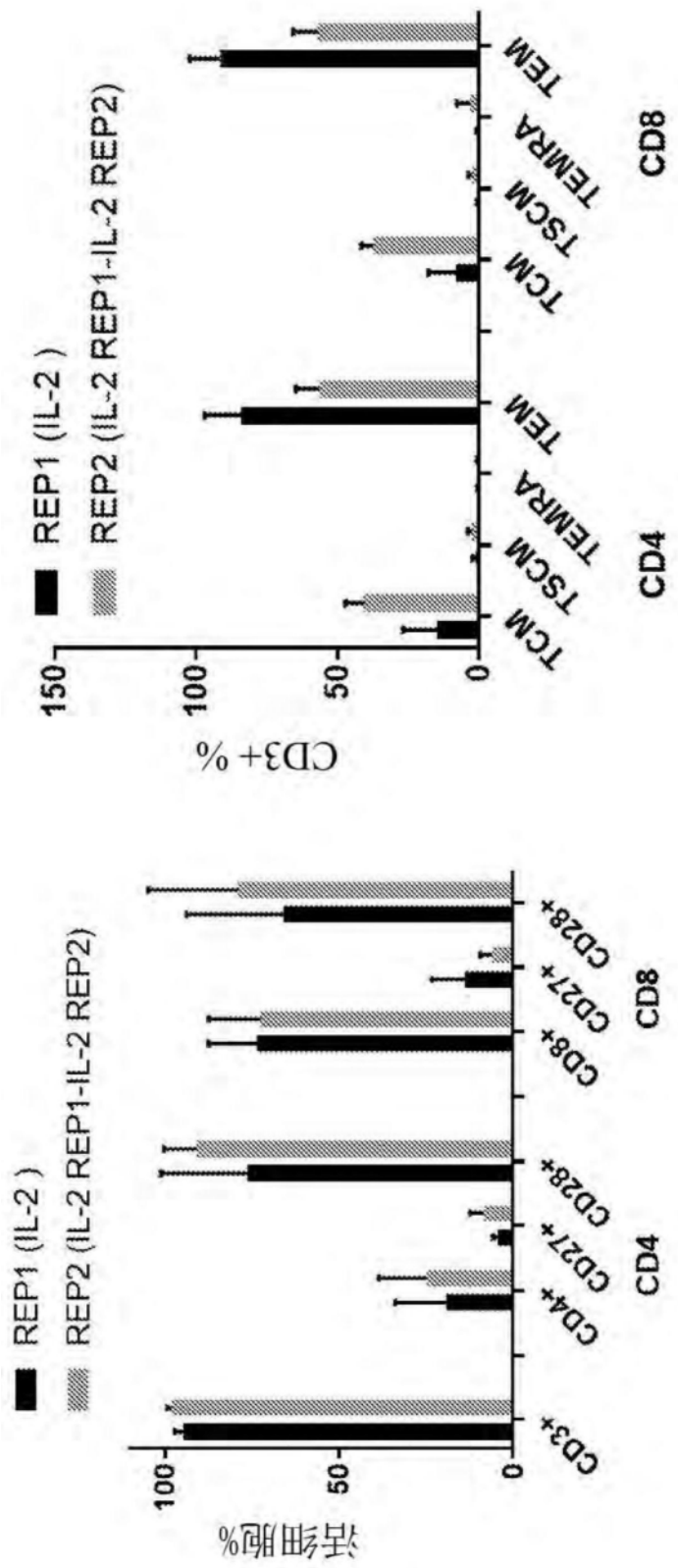

REP1 (IL-2)
REP2 (IL-2 REP1-IL-2 REP2)
CD3+ %
150
100
50
0
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD4
CD8
活细胞%
CD3+
CD4+
CD27+
CD28+
CD8+

图61

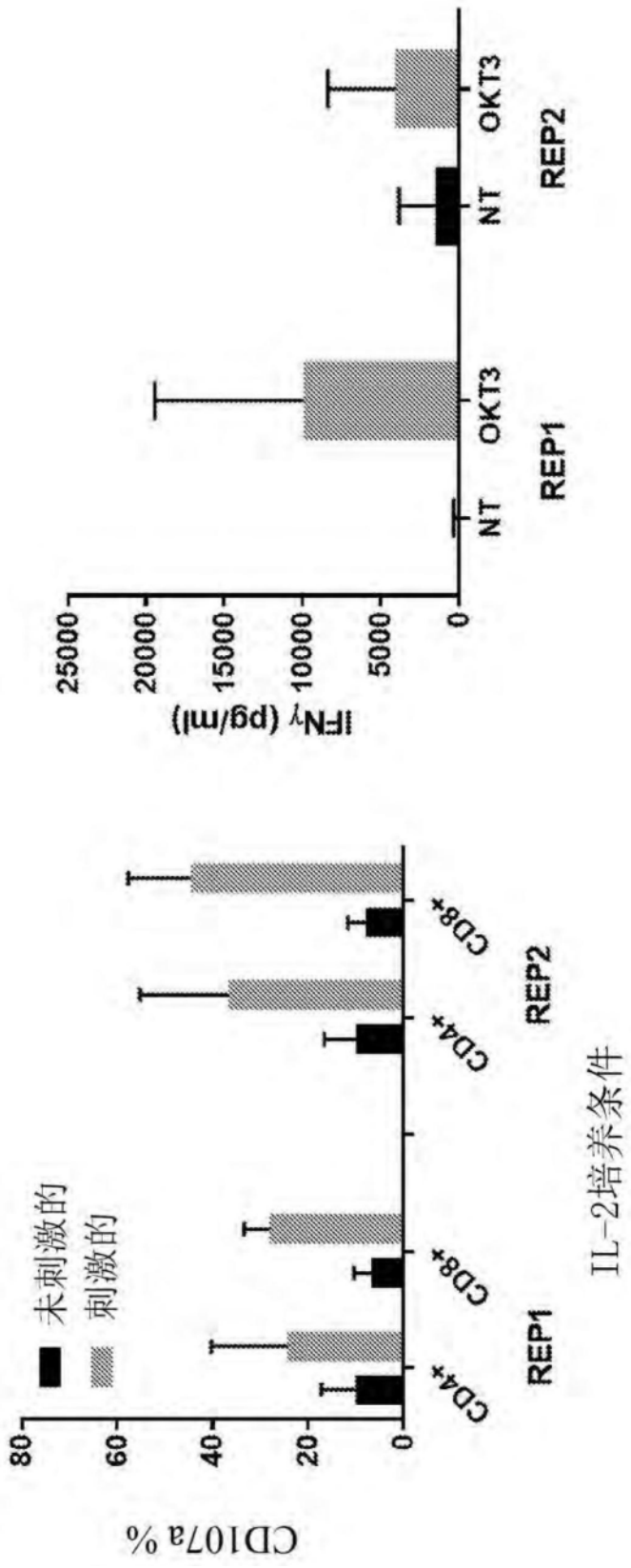

IFNγ (pg/ml)
25000
20000
15000
10000
5000
0
NT
OKT3
NT
OKT3
REP1
REP2
CD107a %
80
60
40
20
0
未刺激的
刺激的
CD4+
CD8+
CD4+
CD8+
REP1
REP2
IL-2培养条件

图62

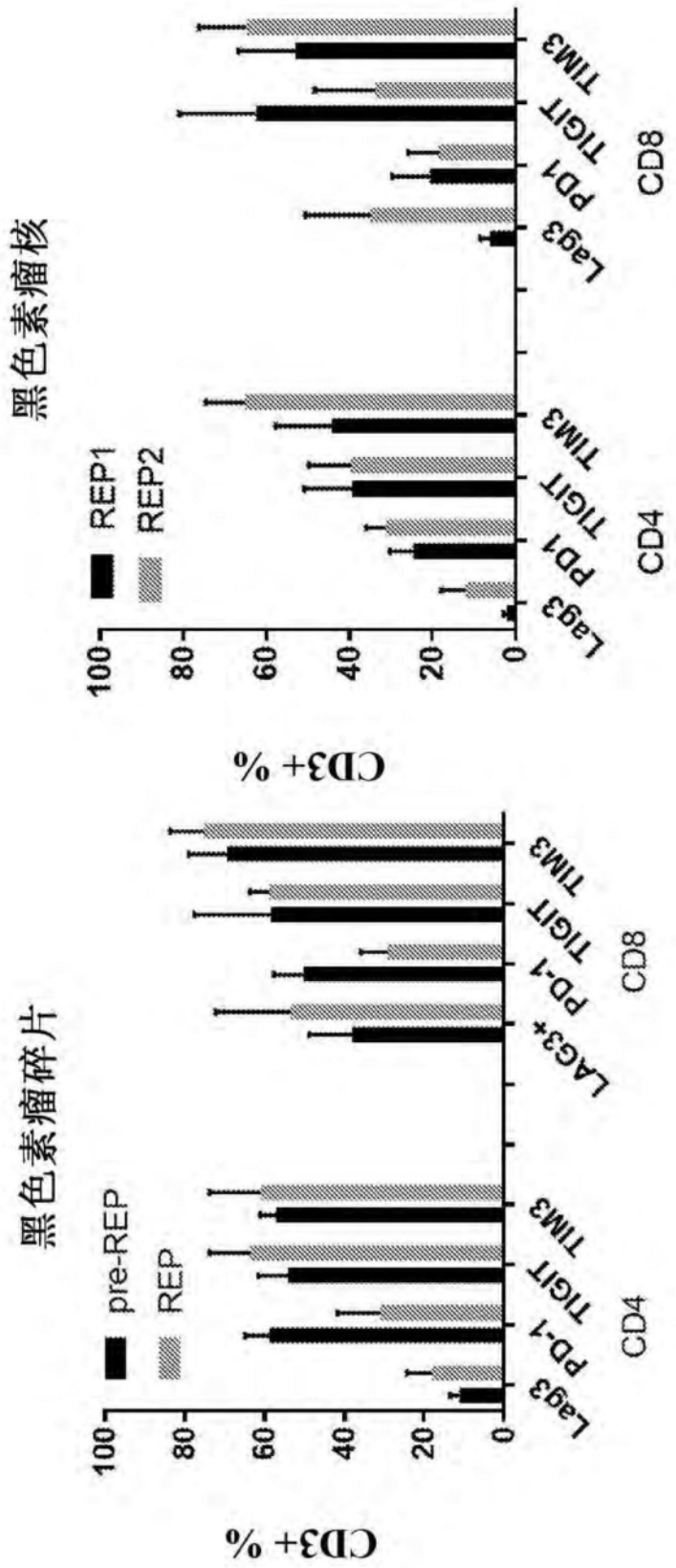

黑色素瘤核
REP1
REP2
CD3+ %
100
80
60
40
20
0
Lag3
PD1
TIGIT
TIM3
CD4
CD8
黑色素瘤碎片
pre-REP
REP
CD3+ %
LAG3+
PD-1

图63

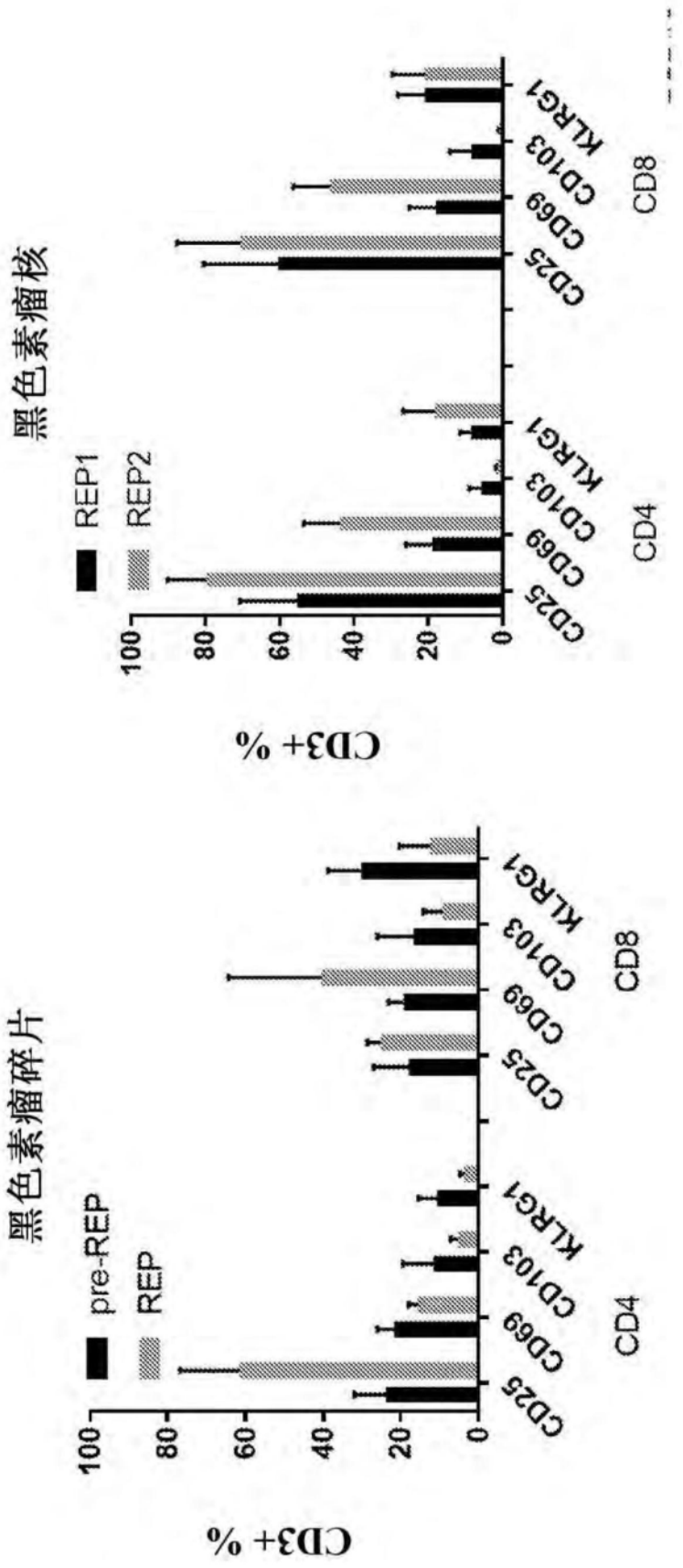

黑色素瘤核
REP1
REP2
CD3+ %
100
80
60
40
20
0
CD25
CD69
CD103
KLRG1
CD4
CD8
黑色素瘤碎片
pre-REP
REP
CD3+ %

图64

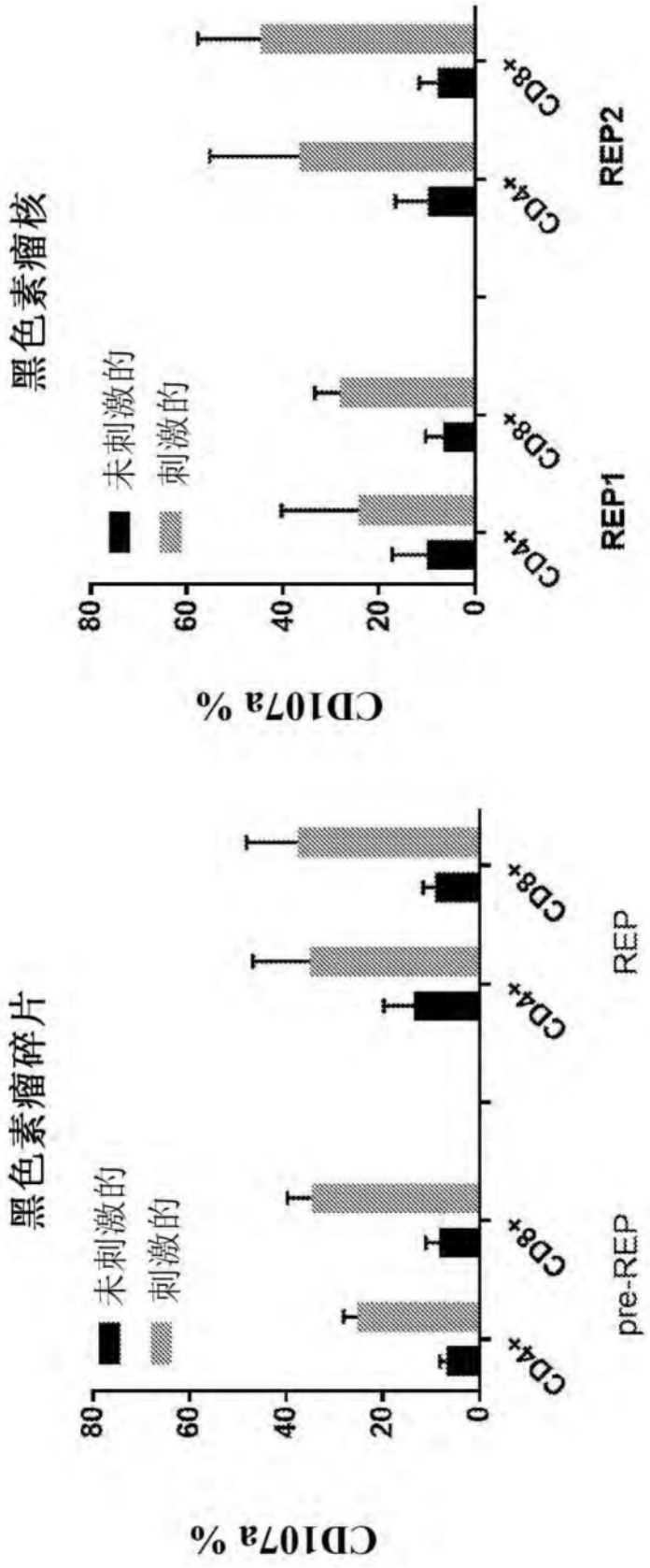

黑色素瘤核
未刺激的
刺激的
CD107a %
80
60
40
20
0
CD4+
CD8+
CD4+
CD8+
REP1
REP2
黑色素瘤碎片
未刺激的
刺激的
CD107a %
80
60
40
20
0
CD4+
CD8+
CD4+
CD8+
pre-REP
REP

图65

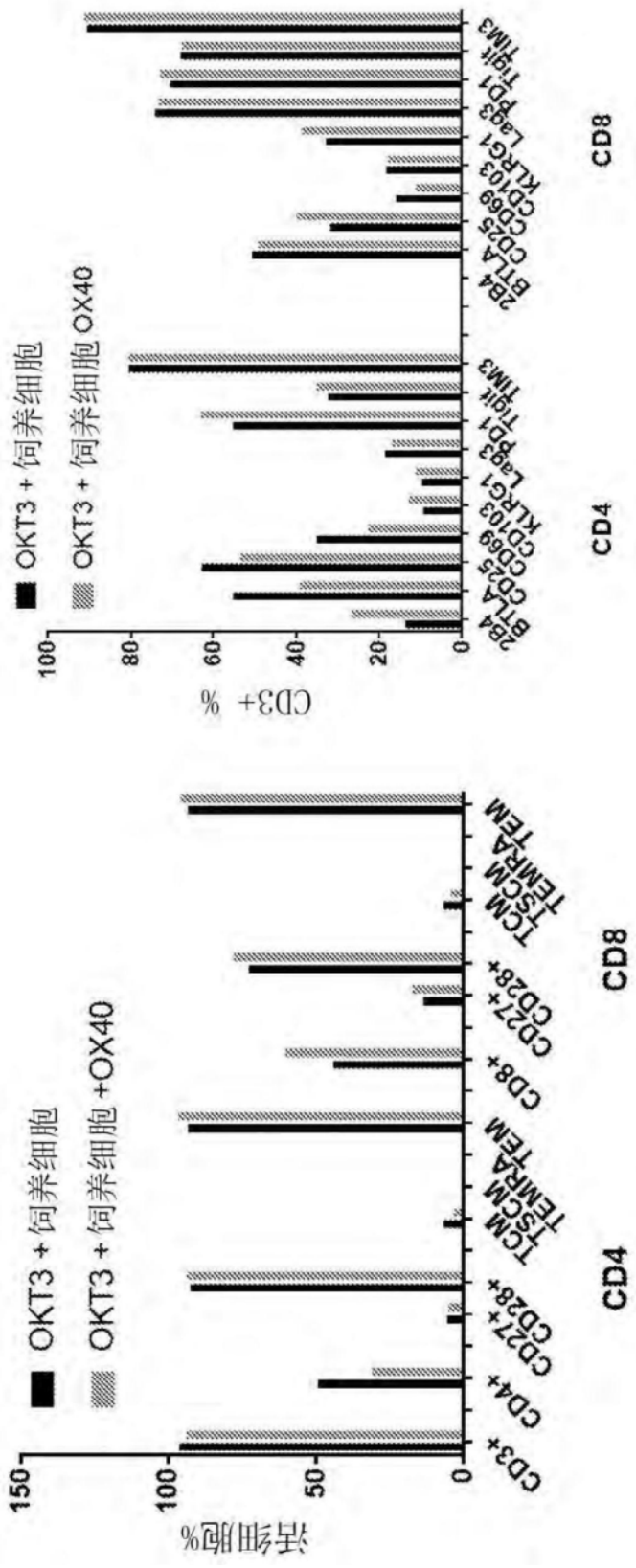

OKT3 + 饲养细胞
OKT3 + 饲养细胞 OX40
CD3+ %
100
80
60
40
20
0
2B4
BTLA
CD25
CD69
CD103
KLRG1
Lag3
PD1
Tigit
TIM3
CD4
CD8
OKT3 + 饲养细胞
OKT3 + 饲养细胞 +OX40
活细胞%
150
100
50
0
CD3+
CD4+
CD27+ CD28+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD8+
CD27+ CD28+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD4
CD8

图66

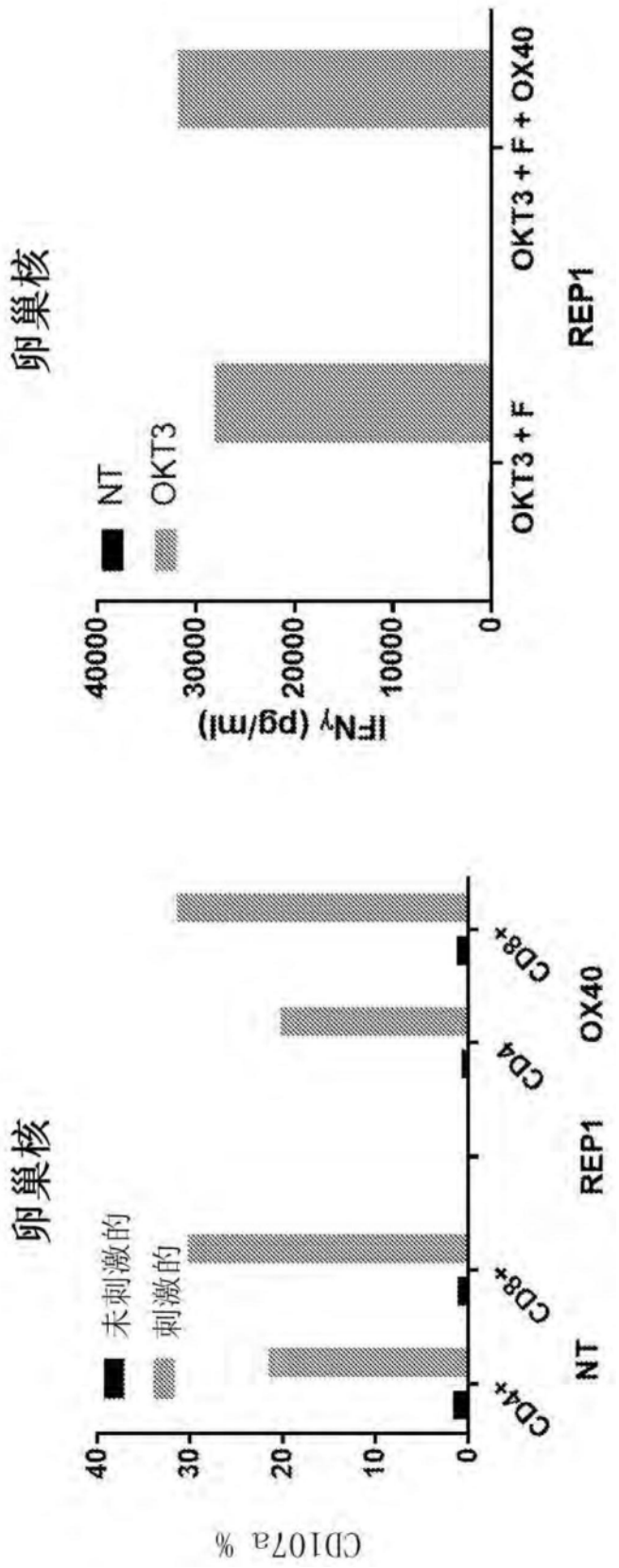

卵巢核
NT
OKT3
IFNγ (pg/ml)
40000
30000
20000
10000
0
OKT3 + F
OKT3 + F + OX40
REP1
卵巢核
未刺激的
刺激的
CD107a %
40
30
20
10
0
CD4+
CD8+
CD4
CD8+
NT
REP1
OX40

图67

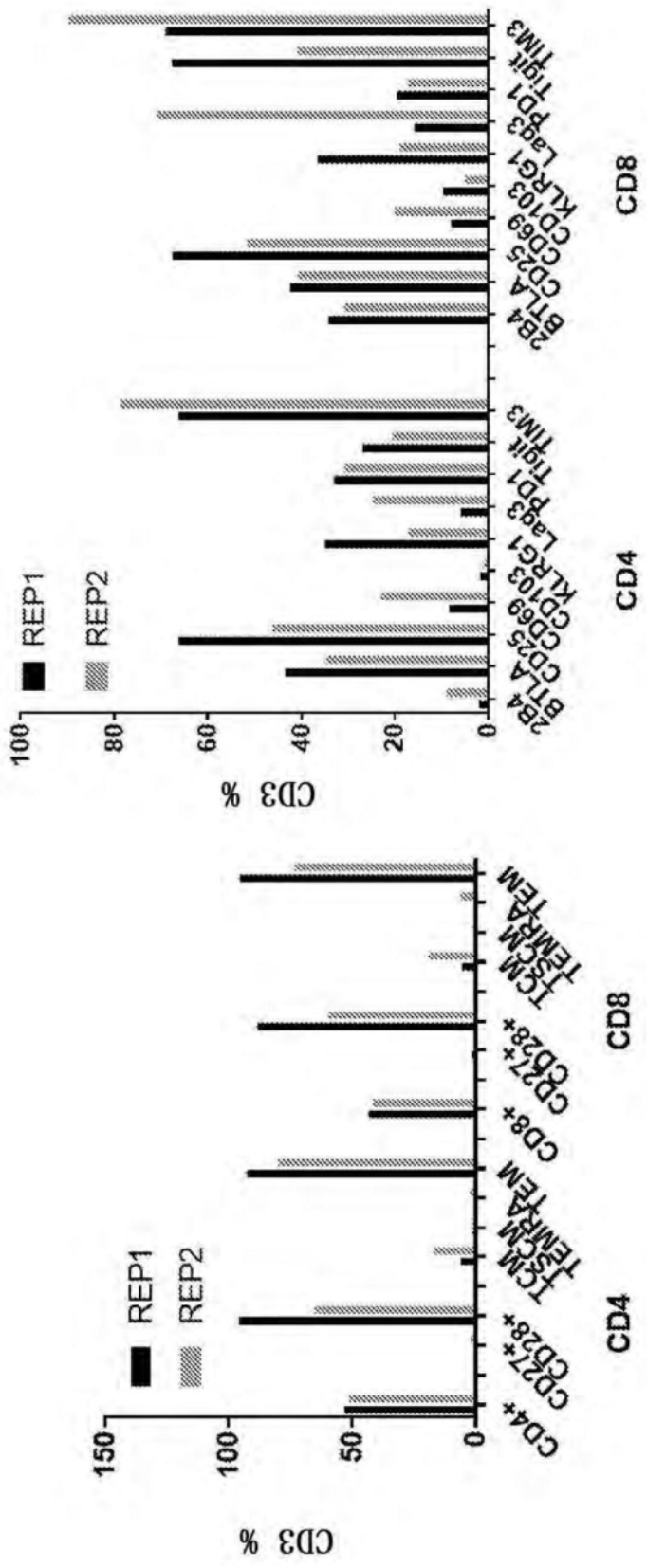

CD3 %
100
80
60
40
20
0
REP1
REP2
2B4
BTLA
CD25
CD69
CD103
KLRG1
La93
PD1
Tigit
TIM3
CD8
CD4
CD3 %
150
100
50
0
CD4+
CD27+ CD28+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD8+
CD27+ CD28+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD8
CD4

图68

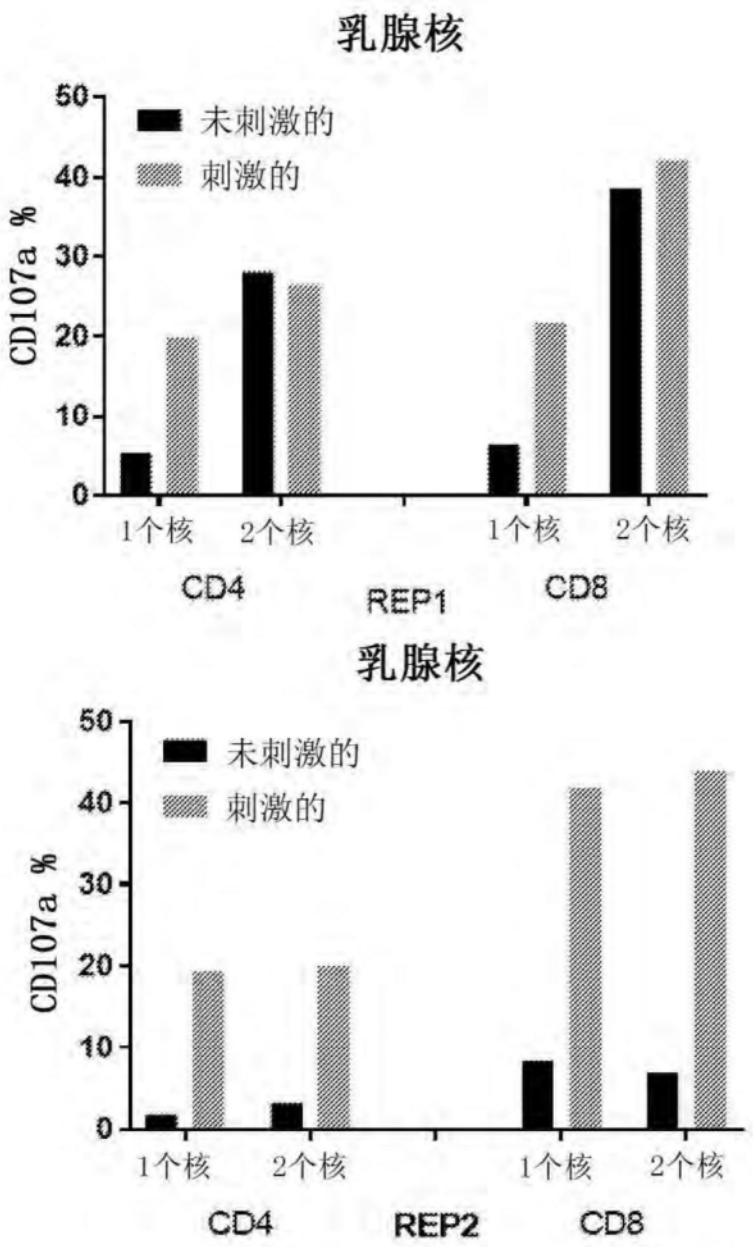

乳腺核
未刺激的
刺激的
CD107a %
50
40
30
20
10
0
1个核
2个核
1个核
2个核
CD4
REP1
CD8
乳腺核
未刺激的
刺激的
CD107a %
50
40
30
20
10
0
1个核
2个核
1个核
2个核
CD4
REP2
CD8

图69A&B

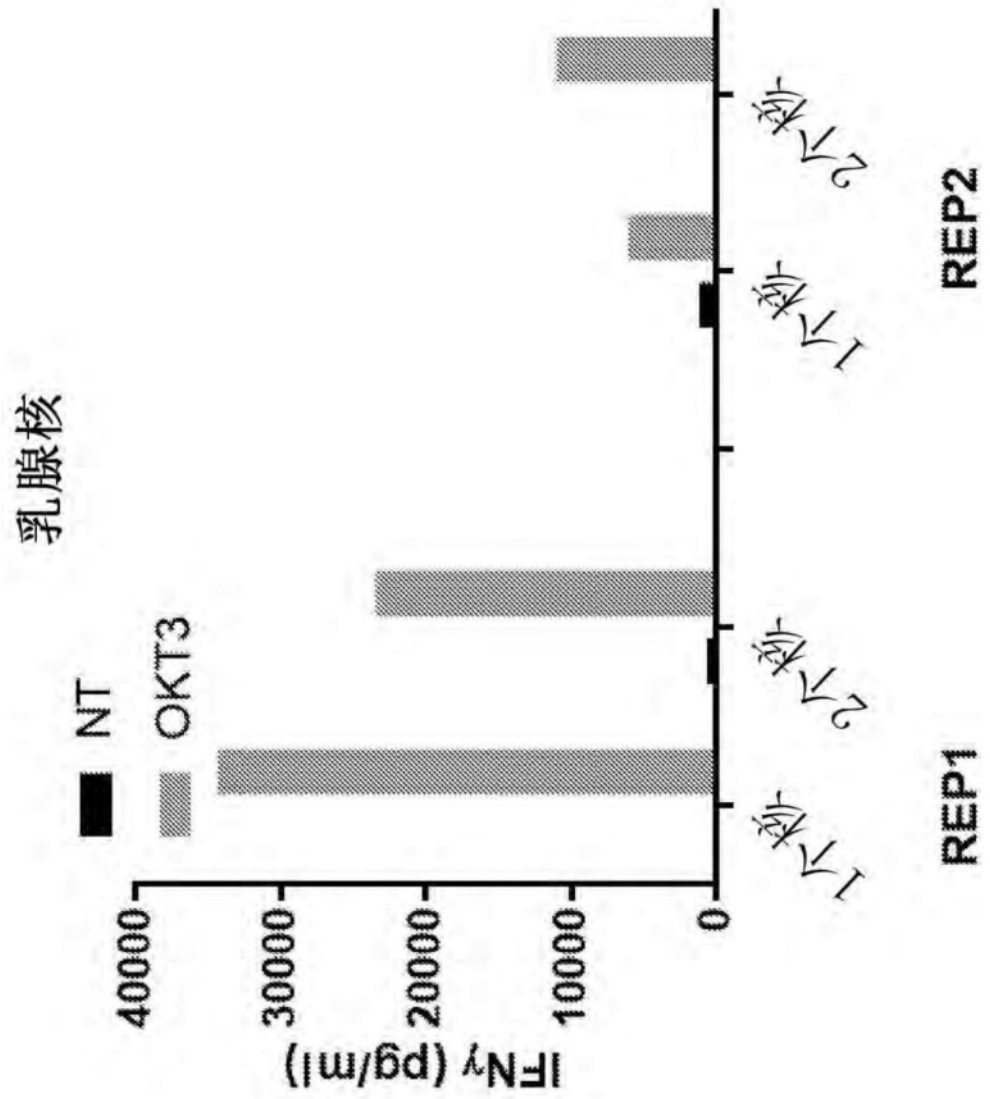

乳腺核
NT
OKT3
IFNγ (pg/ml)
40000
30000
20000
10000
0
效应1
效应2
效应1
效应2
REP1
REP2

图69C

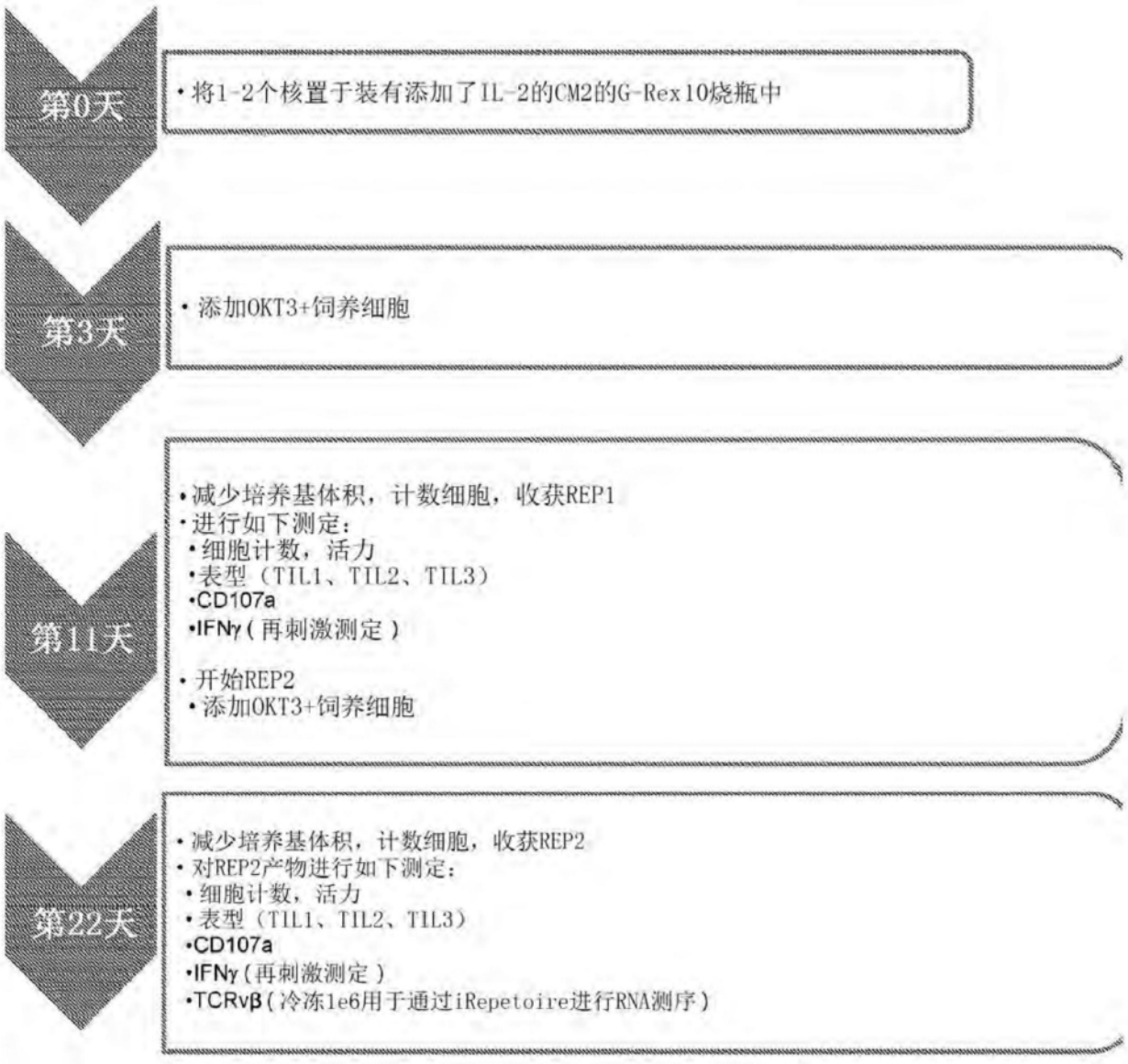

第0天
•将1-2个核置于装有添加了IL-2的CM2的G-Rex10烧瓶中
第3天
•添加OKT3+饲养细胞
第11天
•减少培养基体积，计数细胞，收获REP1
•进行如下测定：
•细胞计数，活力
•表型（TIL1、TIL2、TIL3）
•CD107a
•IFNγ（再刺激测定）
•开始REP2
•添加OKT3+饲养细胞
第22天
•减少培养基体积，计数细胞，收获REP2
•对REP2产物进行如下测定：
•细胞计数，活力
•表型（TIL1、TIL2、TIL3）
•CD107a
•IFNγ（再刺激测定）
•TCRvβ（冷冻1e6用于通过iRepetoire进行RNA测序）

图70

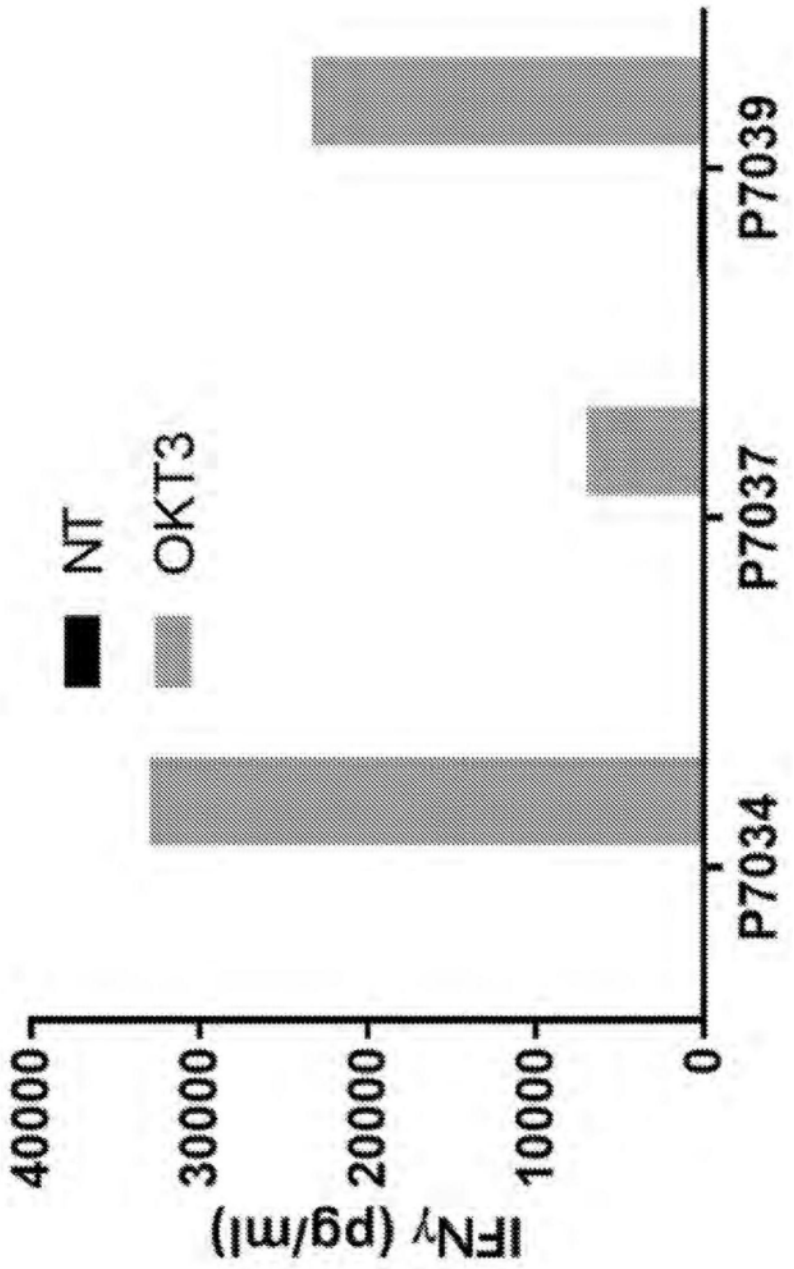

NT
OKT3
P7039
P7037
P7034
0
10000
20000
30000
40000
IFNγ (pg/ml)

图71

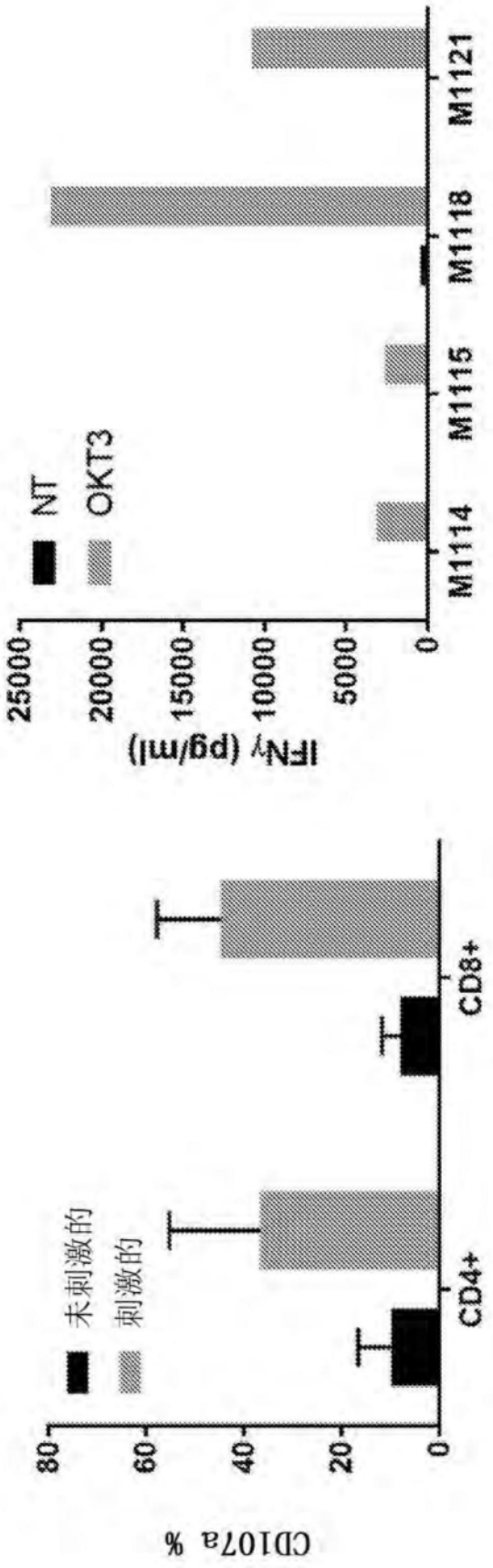

IFNγ (pg/ml)
25000
20000
15000
10000
5000
0
NT
OKT3
M1114
M1115
M1118
M1121
CD107a %
80
60
40
20
0
未刺激的
刺激的
CD4+
CD8+

图72

	培养条件	核/条件 (#)	REP1	REP2
乳腺 (EP11028)	REP1: IL2 REP2: IL-2	1 vs 2	**>50E6** 个细胞，第11天（2个核）	扩增173倍和158倍（1/2个核） **~ 34,0000 和 23,000 pg/ml IFNγ**
乳腺 (EP11045)	REP1: IL-2 (+/- OKT3+feeders) REP2: IL-2 (OKT3+feeders)	2	**>50e6** 个细胞，第11天（OKT3+ 饲养细胞）	1178倍和1920倍 **(+/- OKT3+** 饲养细胞 **REP1)** **~ 99,000 和 45,000 pg/ml IFNγ**
卵巢 (OV8016)	REP1: IL2 +/- OX40 REP2: IL-2 +/- OX40	2	**>50E6** 个细胞，第11天(OX40条件）	扩增1860倍和1540倍（无OX40/OX40） **~ 10,000 和 20,000 pg/ml IFNγ**
卵巢 (OV8031)	REP1: IL2 REP2: IL-2	1(小的核）	1.3e6 个细胞，第11天	扩增400倍 ~ 进行ELISA

图73A

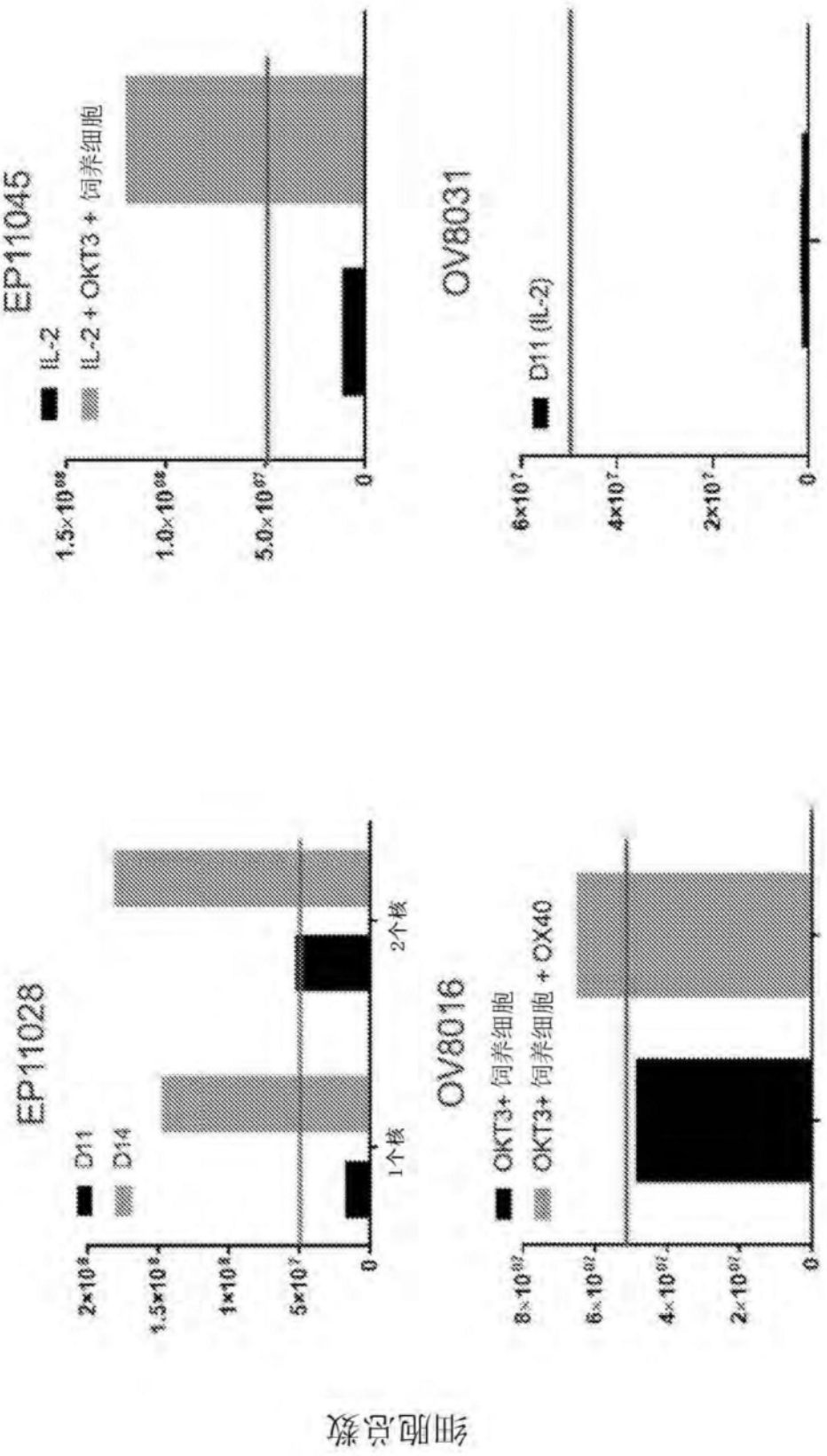

EP11045
IL-2
IL-2 + OKT3 + 饲养细胞
1.5×10⁸
1.0×10⁸
5.0×10⁷
0
OV8031
D11 (IL-2)
6×10⁷
4×10⁷
2×10⁷
0
EP11028
D11
D14
2×10⁸
1.5×10⁸
1×10⁸
5×10⁷
0
1个核
2个核
OV8016
OKT3+ 饲养细胞
OKT3+ 饲养细胞 + OX40
8×10⁶²
6×10⁶²
4×10⁶²
2×10⁶²
0
细胞总数

图73B

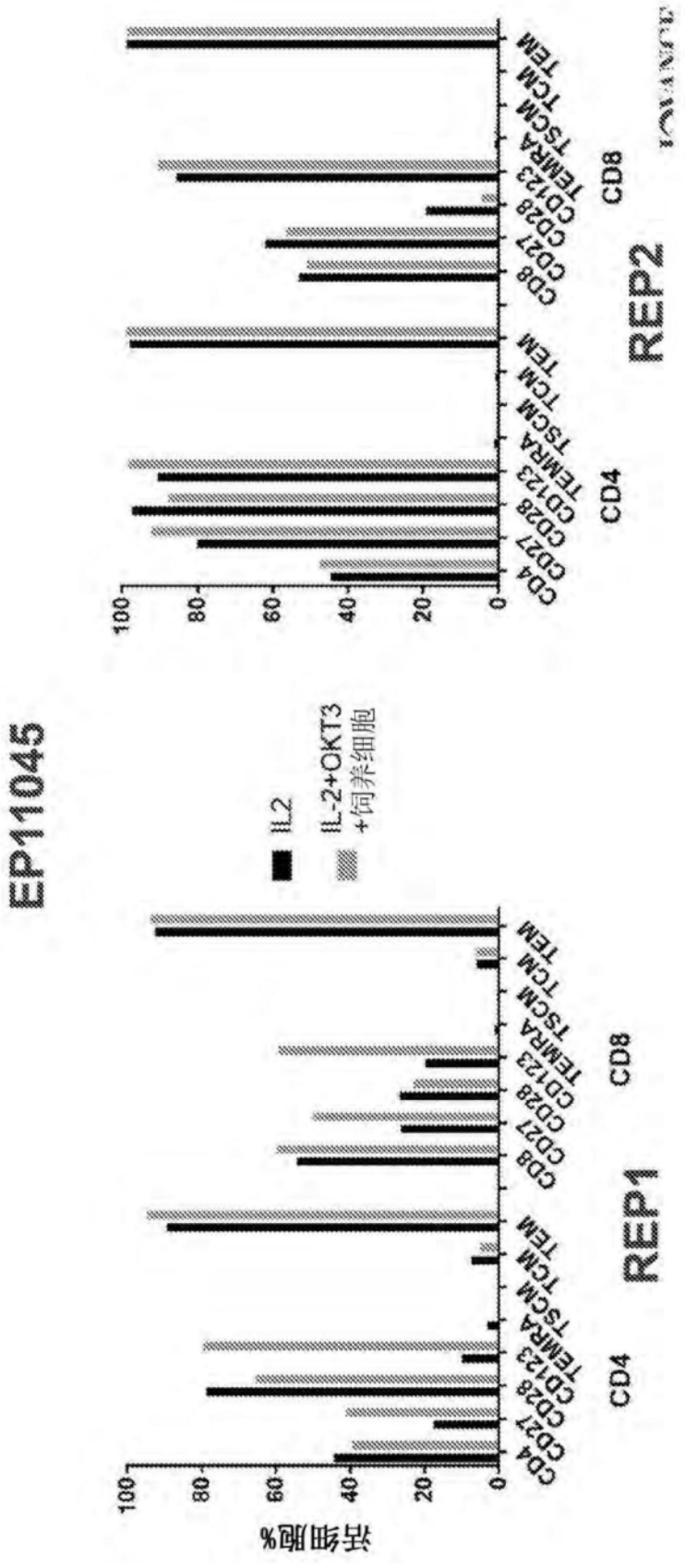

EP11045
IL2
IL-2+OKT3
+饲养细胞
REP1
REP2
CD4
CD8
活细胞%
0
20
40
60
80
100
CD4
CD27
CD28
CD123
TEMRA
TSCM
TCM
TEM
CD8
CD27
CD28
CD123
TEMRA
TSCM
TCM
TEM

图74

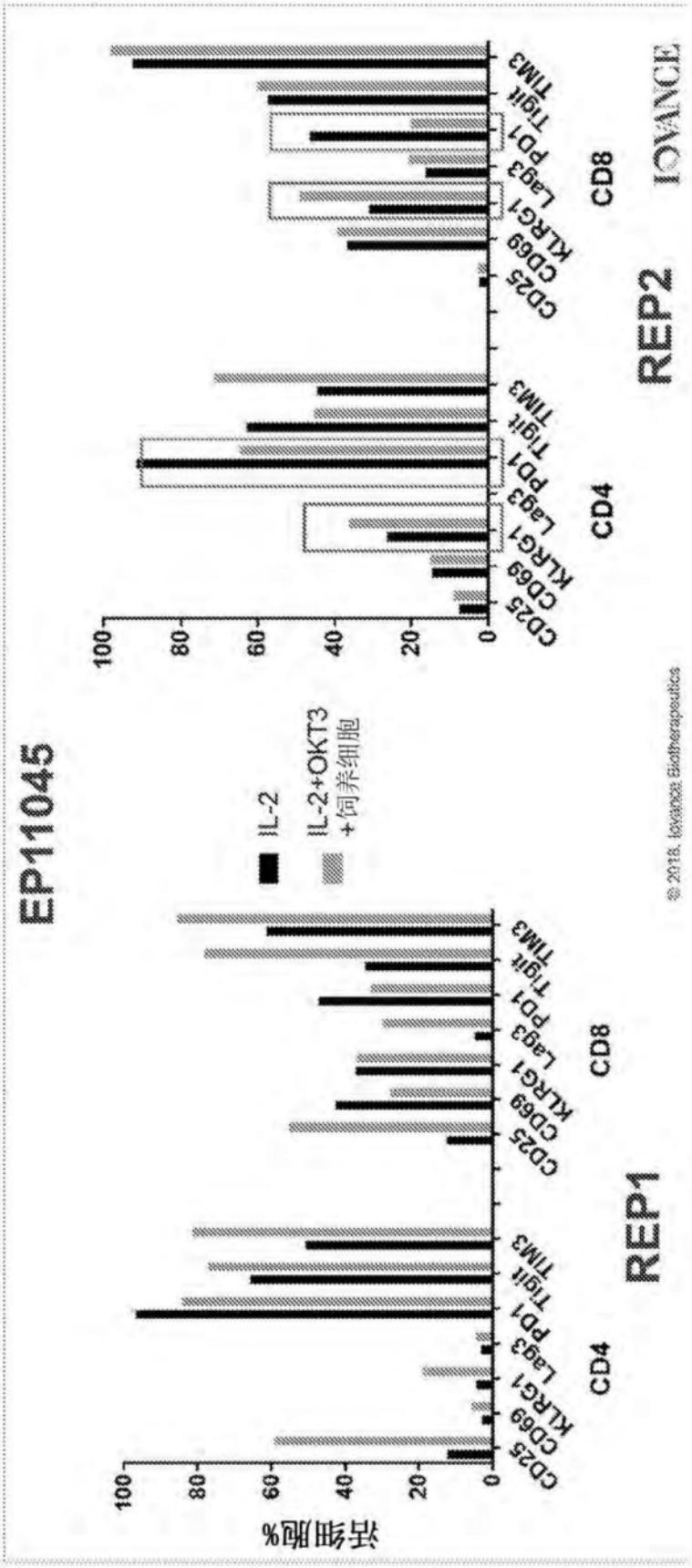

EP11045
IL-2
IL-2+OKT3
+饲养细胞
活细胞%
100
80
60
40
20
0
CD25
CD69
KLRG1
Lag3
PD1
Tigit
TIM3
CD4
CD8
REP1
REP2
IOVANCE
© 2018, Iovance Biotherapeutics

图75

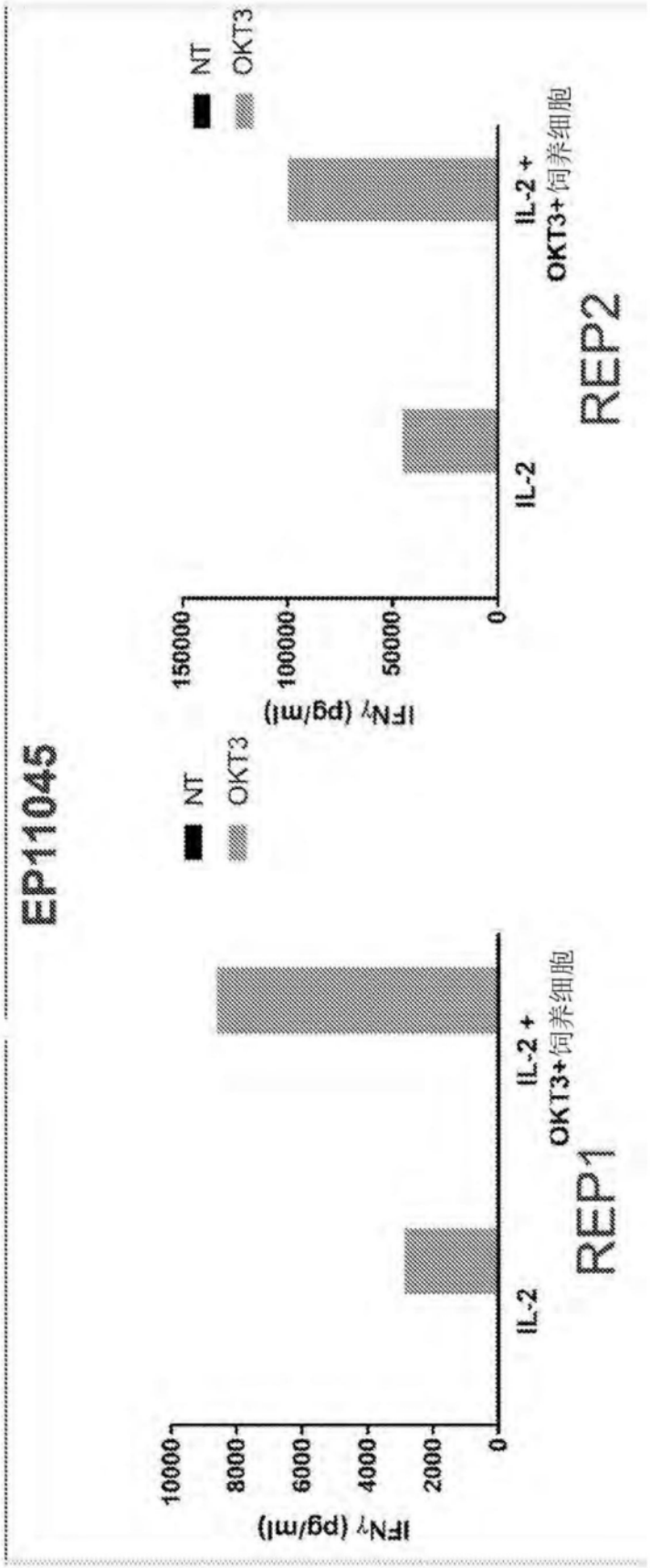

EP11045
REP1
REP2
NT
OKT3
IFNγ (pg/ml)
10000
8000
6000
4000
2000
0
150000
100000
50000
IL-2
IL-2 + OKT3+饲养细胞

图76

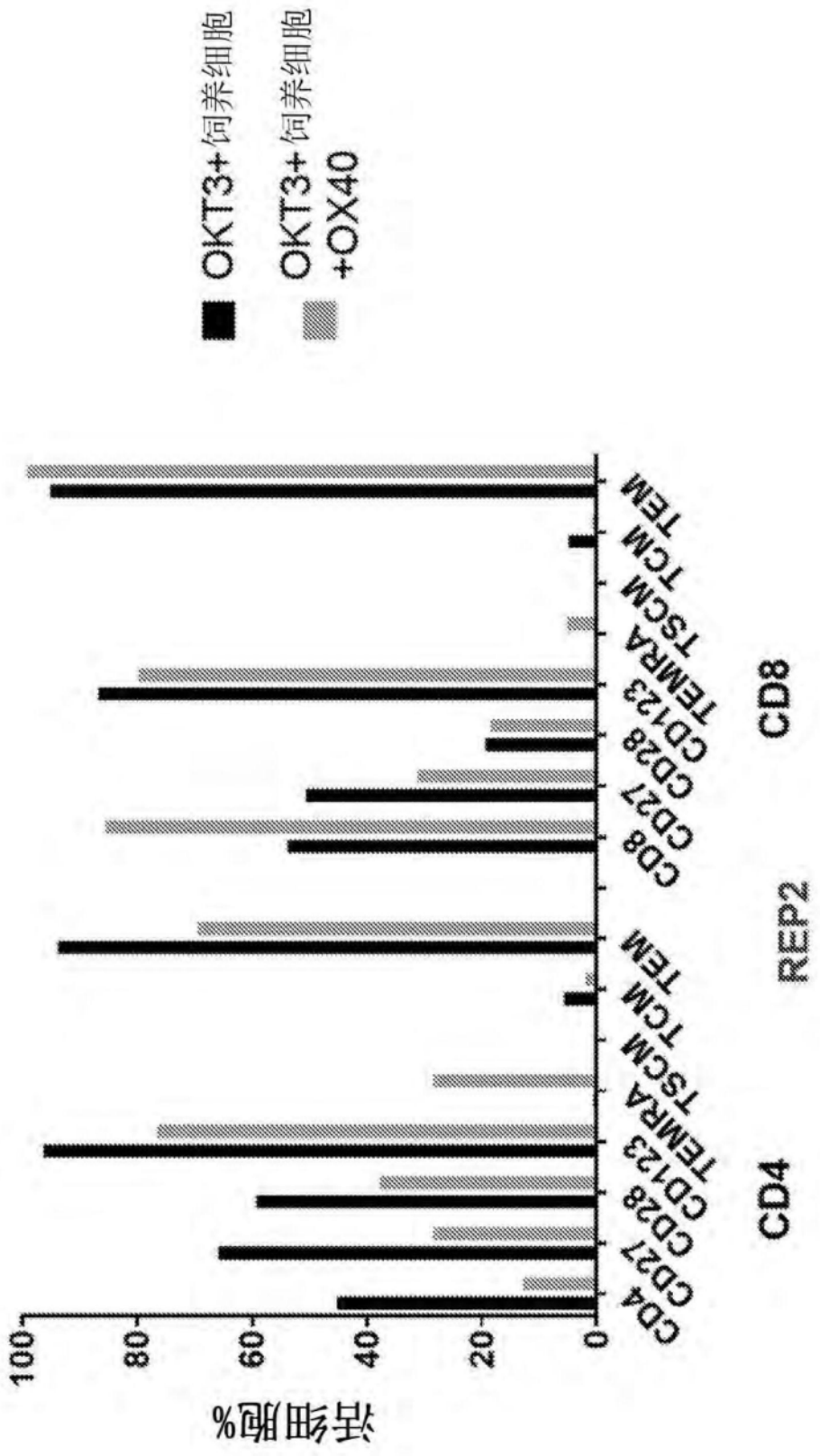

OKT3+饲养细胞
OKT3+饲养细胞 +OX40
活细胞%
100
80
60
40
20
0
CD4
CD27
CD28
CD123
TEMRA
TSCM
TCM
TEM
CD8
CD27
CD28
CD123
TEMRA
TSCM
TCM
TEM
CD4
CD8
REP2

图77

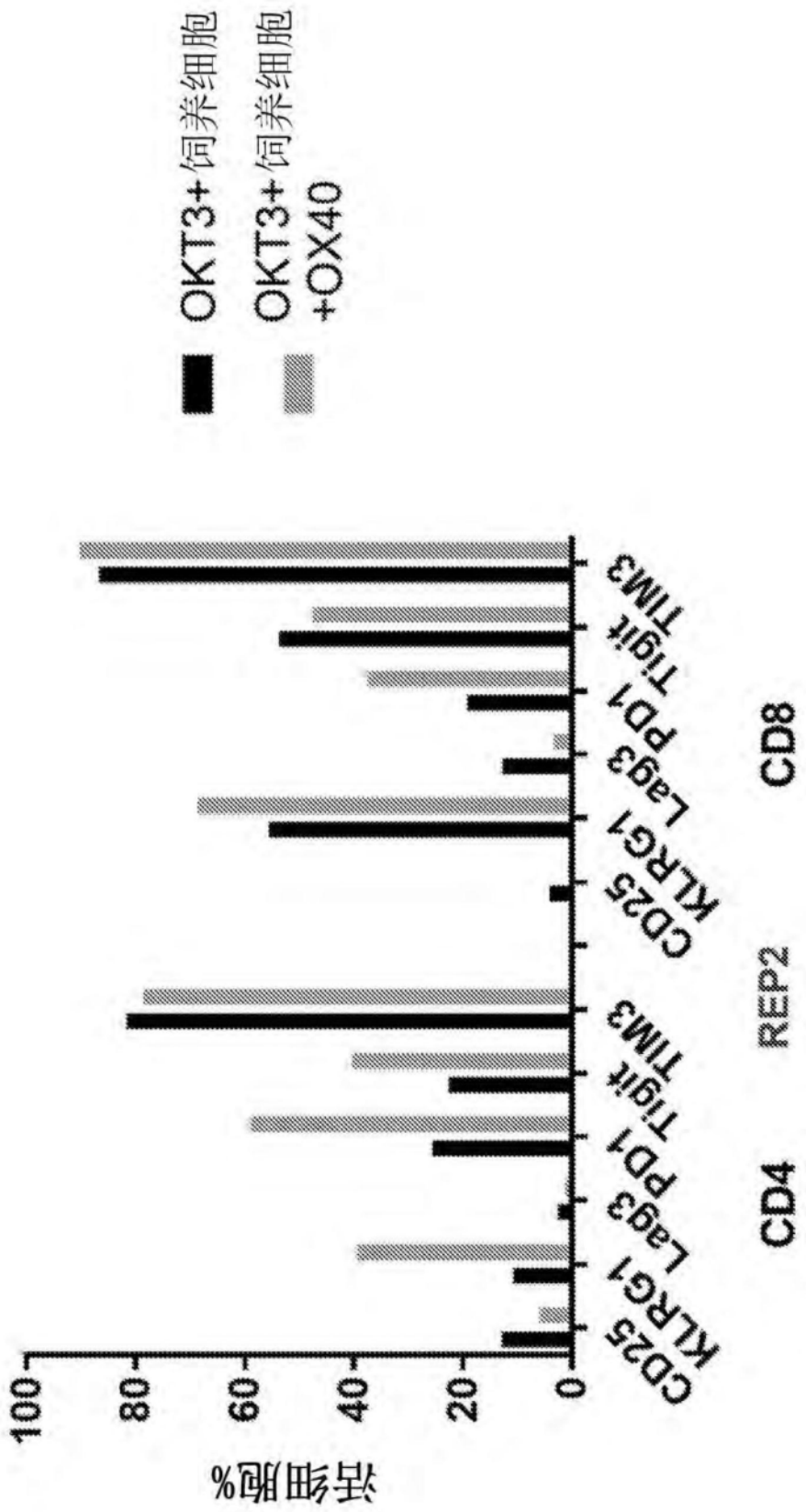

OKT3+饲养细胞
OKT3+饲养细胞 +OX40
活细胞%
100
80
60
40
20
0
CD25
KLRG1
Lag3
PD1
Tigit
TIM3
CD4
REP2
CD25
KLRG1
Lag3
PD1
Tigit
TIM3
CD8

图78

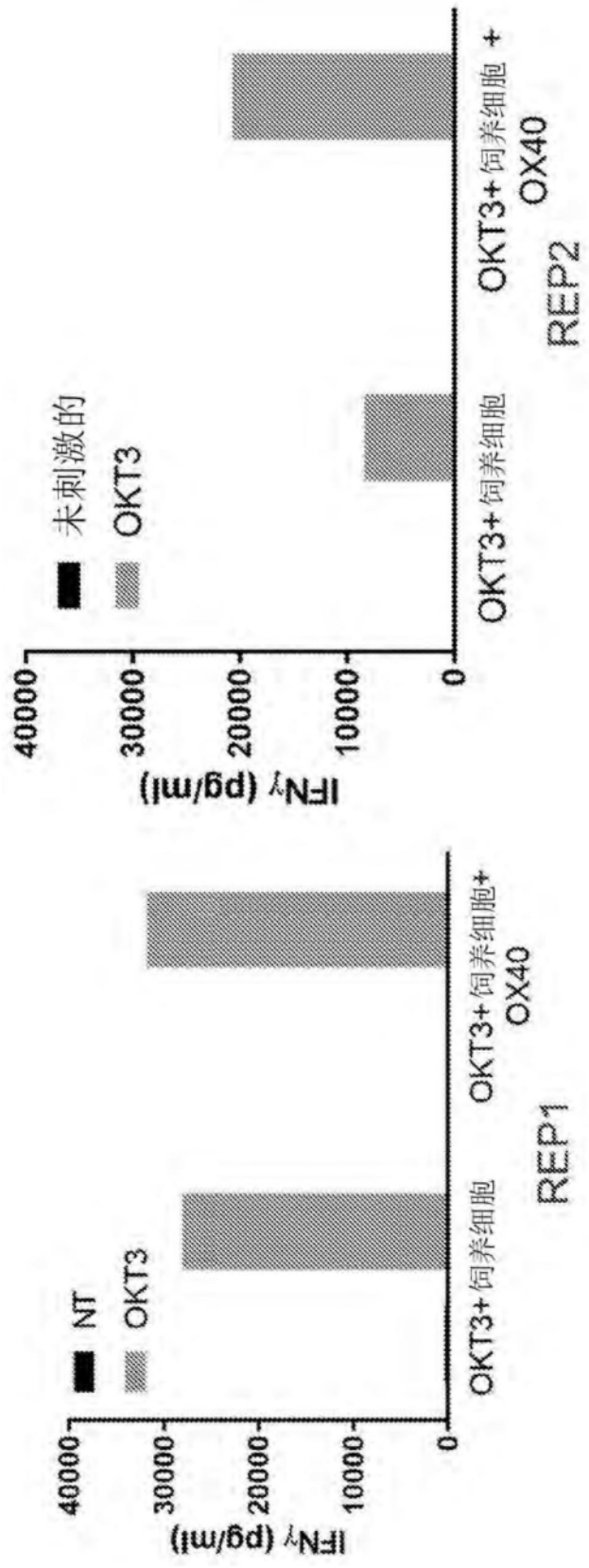

未刺激的
OKT3
NT
OKT3
IFNγ (pg/ml)
40000
30000
20000
10000
0
OKT3+饲养细胞
OKT3+饲养细胞+ OX40
REP1
REP2

图79

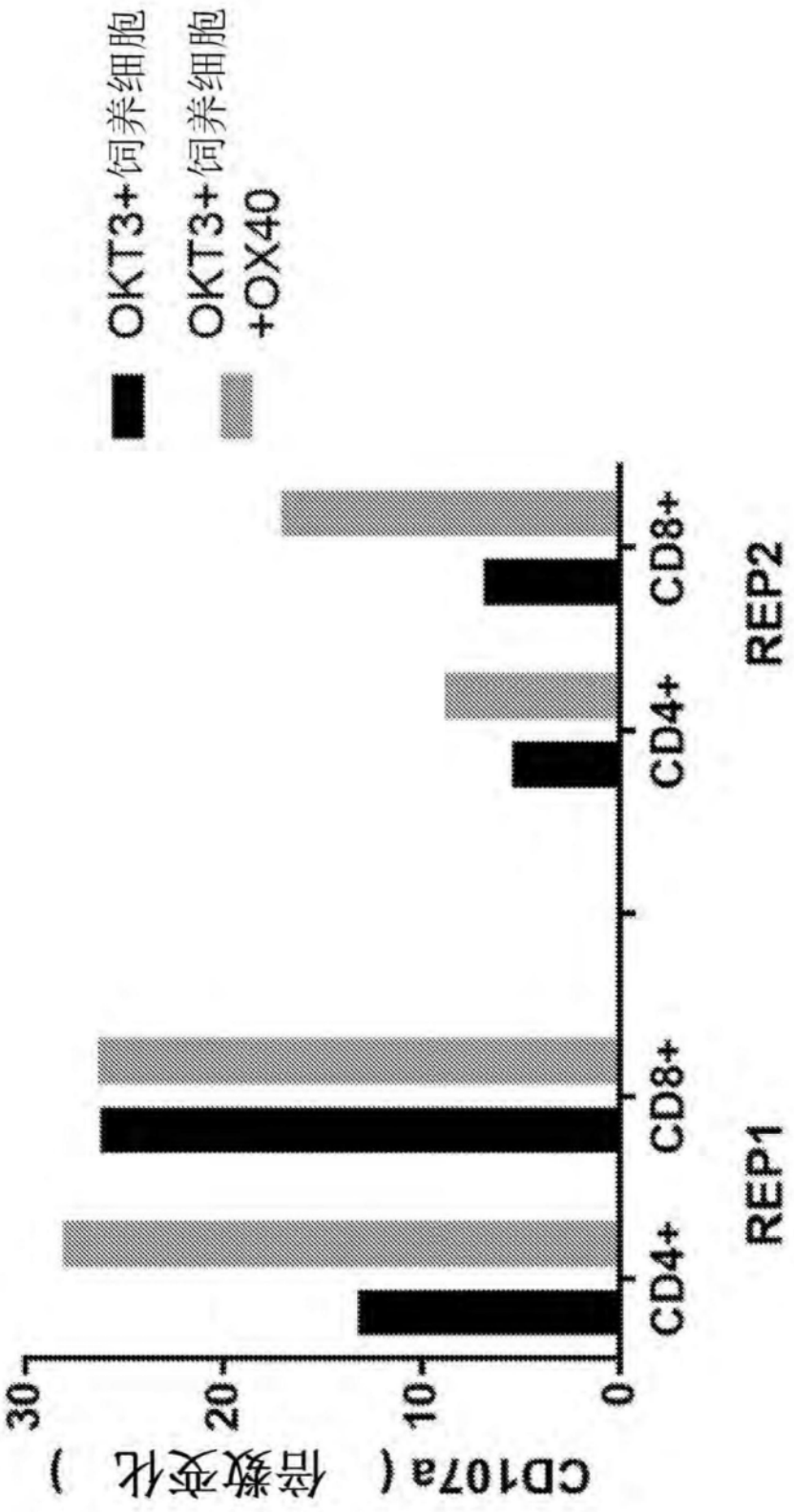

OKT3+饲养细胞
OKT3+饲养细胞
+OX40
CD107a（倍数变化）
30
20
10
0
CD4+
CD8+
REP1
CD4+
CD8+
REP2

图80

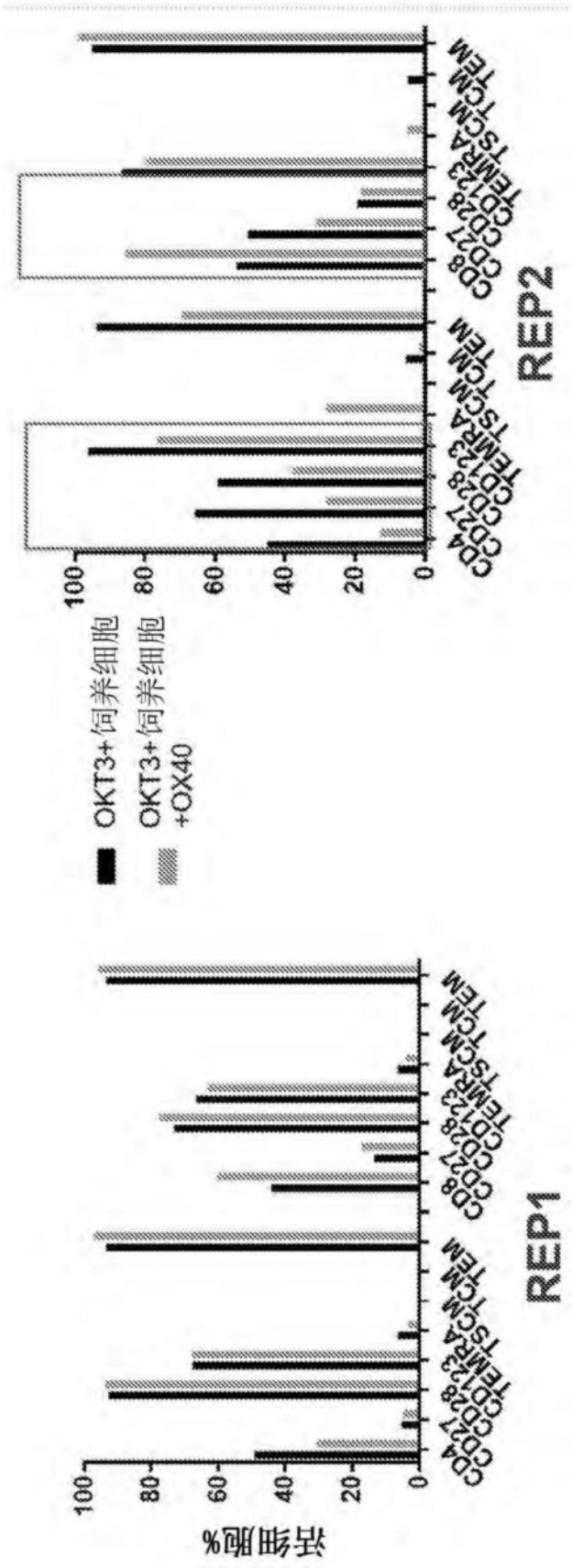

活细胞%
100
80
60
40
20
0
CD4 CD27 CD28 CD127 TEMRA TSCM TCM TEM
CD8 CD27 CD28 CD127 TEMRA TSCM TCM TEM
REP1
REP2
OKT3+饲养细胞
OKT3+饲养细胞 +OX40

图81

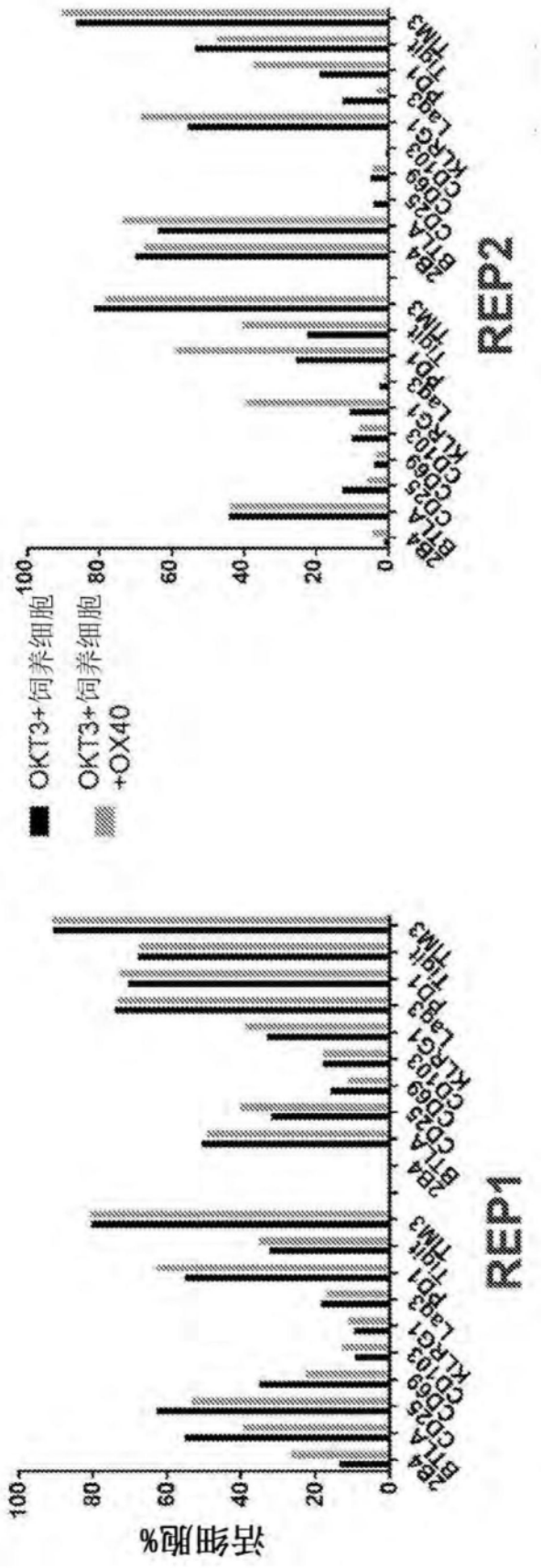

活细胞%
100
80
60
40
20
0
REP1
REP2
OKT3+饲养细胞
OKT3+饲养细胞 +OX40
2B4
BTLA
CD25
CD69
CD103
KLRG1
LAG3
PD1
TIGIT
TIM3

图82

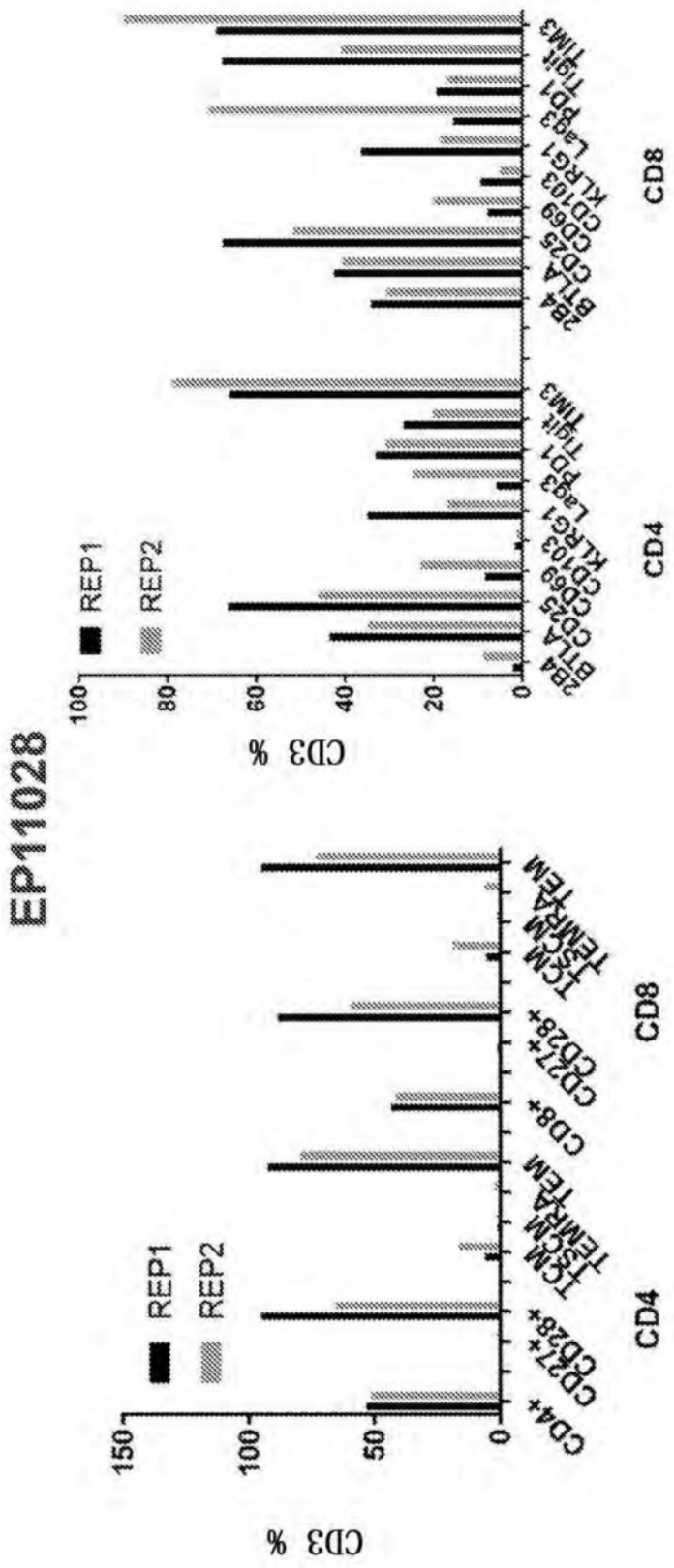

EP11028
REP1
REP2
% CD3
CD4+
CD27+ CD28+
TCM TSCM TEMRA TEM
CD8+
CD27+ CD28+
TCM TSCM TEMRA TEM
CD4
CD8
0
50
100
150
0
20
40
60
80
100
2B4 BTLA CD25 CD69 CD103 KLRG1 Lag3 PD1 Tigit TIM3
2B4 BTLA CD25 CD69 CD103 KLRG1 Lag3 PD1 Tigit TIM3
CD4
CD8

图83

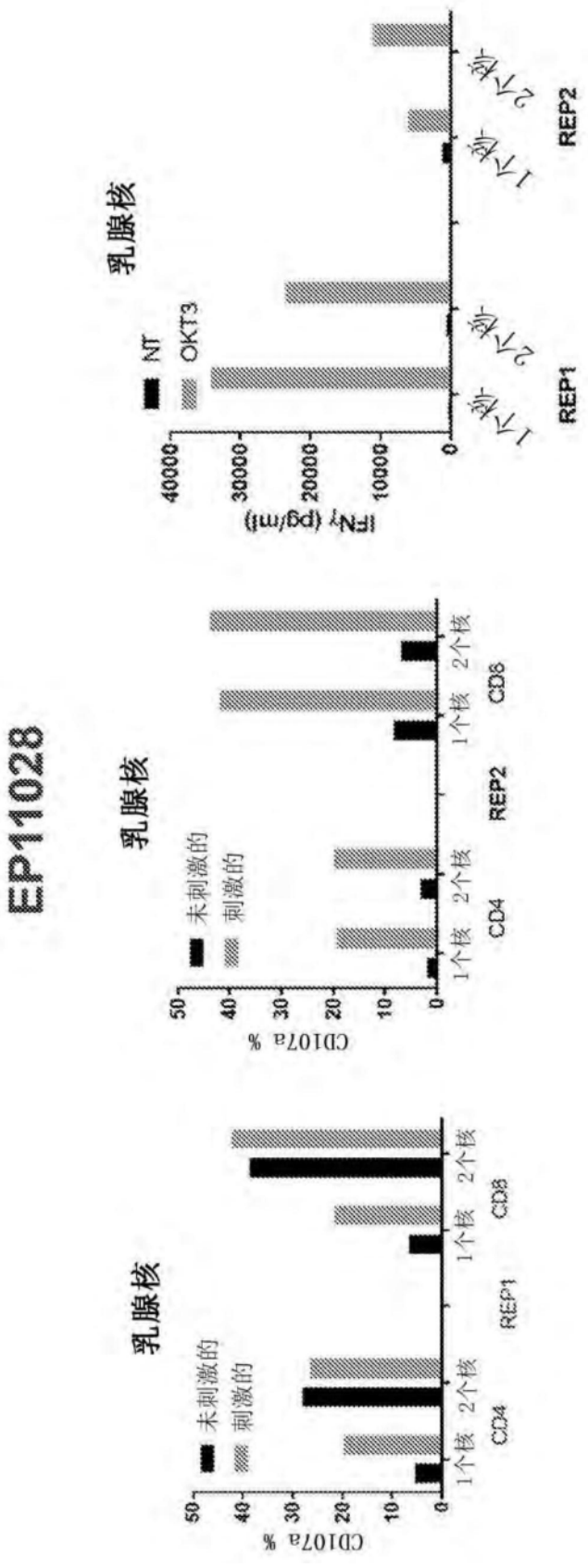

EP11028
乳腺核
未刺激的
刺激的
CD107a %
1个核 2个核
CD4
REP1
CD8
REP2
NT
OKT3
IFNγ (pg/ml)
40000
30000
20000
10000
0
1个核
2个核

图84

过程2A：步骤A-E，约22天	过程GEN 3：步骤A-E，约14-16天
步骤A 获得患者肿瘤样品 （可在步骤B之前可选地冷冻）	步骤A 获得患者肿瘤样品 （可在步骤B之前可选地冷冻）
步骤B 第一次扩增 （物理破碎，至少40个碎片/容器 生长约3天至14天 其中培养基包含IL-2）	步骤B 预备第一次扩增 （物理破碎，至多60个碎片/容器 生长约1天至7天 其中培养基包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞）
步骤C 第一次扩增向第二次扩增过渡 （可选地在步骤B第11天，将步骤B的TIL直接进行步骤D）	步骤C 预备第一次扩增向快速第二次扩增过渡 （在第7天，将步骤B的TIL直接进行步骤D）
步骤D 第二次扩增 （在封闭的容器中，TIL在包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞的生长培养基中生长）	步骤D 快速第二次扩增 （TIL在包含IL-2、OKT-3和2×抗原呈递饲养细胞的生长培养基中生长 第10-11天，按比例扩增，并另外添加IL-2）
步骤E 收获步骤D的TIL （通过封闭的系统收获TIL）	步骤E 收获步骤D的TIL
步骤F 最终制剂和/或转移至输液袋 （可选地冷冻保存）	步骤F 最终制剂和/或转移至输液袋 （可选地冷冻保存）

图85A

小型活检GEN 3过程：步骤A-E，约17-24天

步骤A

获得患者肿瘤样品

（可在步骤B之前可选地冷冻）

步骤B

预备第一次扩增

（物理破碎，至多60个碎片/容器，生长约3天至12天
其中培养基包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞）

步骤C

预备第一次扩增向快速第二次扩增过渡

（在第7-12天，将步骤B的TIL直接进行步骤D）

步骤D

快速第二次扩增

（TIL在包含IL-2、OKT-3和2×抗原呈递饲养细胞的生长培养基中生长
第10-12天，按比例扩增，并另外添加IL-2）

步骤E

收获步骤D的TIL

步骤F

最终制剂和/或转移至输液袋

（可选地冷冻保存）

图85B

小型活检过程：版本2（基于GEN 3的过程） 步骤A-E，约17-24天
步骤A 获得患者肿瘤样品
步骤B 第一次扩增 3-12天（在第1-3天中任何一天添加OKT-3和抗原呈递饲养细胞）
步骤C 第一次扩增向第二次扩增过渡 不储存，可选的封闭系统
步骤D 第二次扩增 IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞 3-12天 可选的封闭系统
步骤E 收获步骤D的TIL 封闭的系统
步骤F 最终制剂和/或转移至输液袋 （ 可选地冷冻保存 ）

图85C

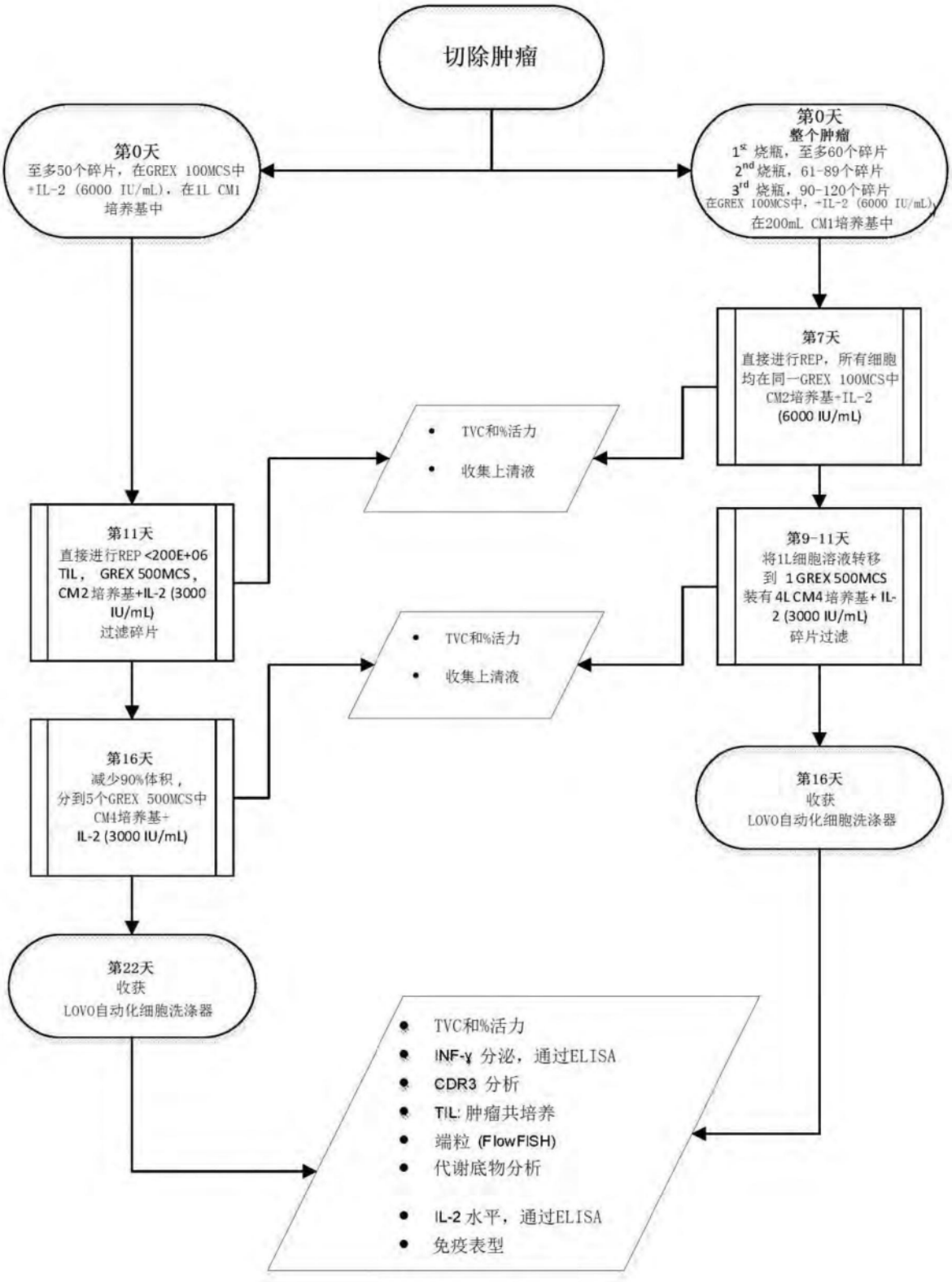
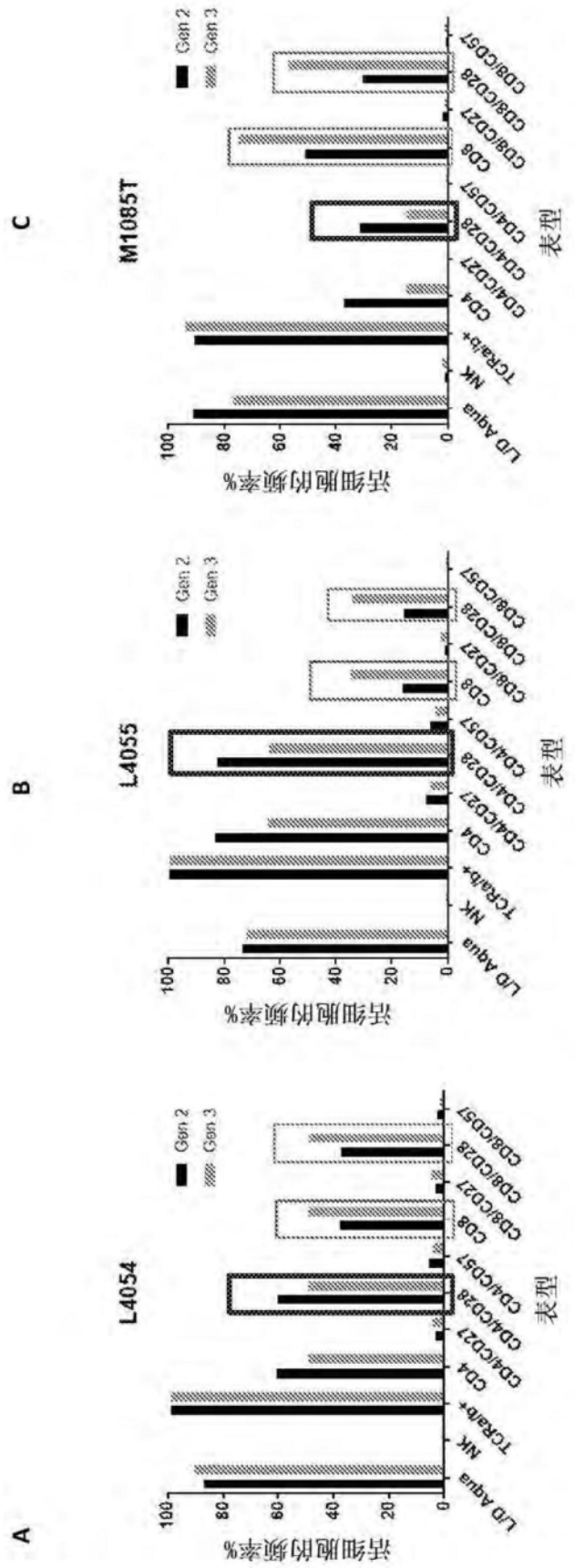
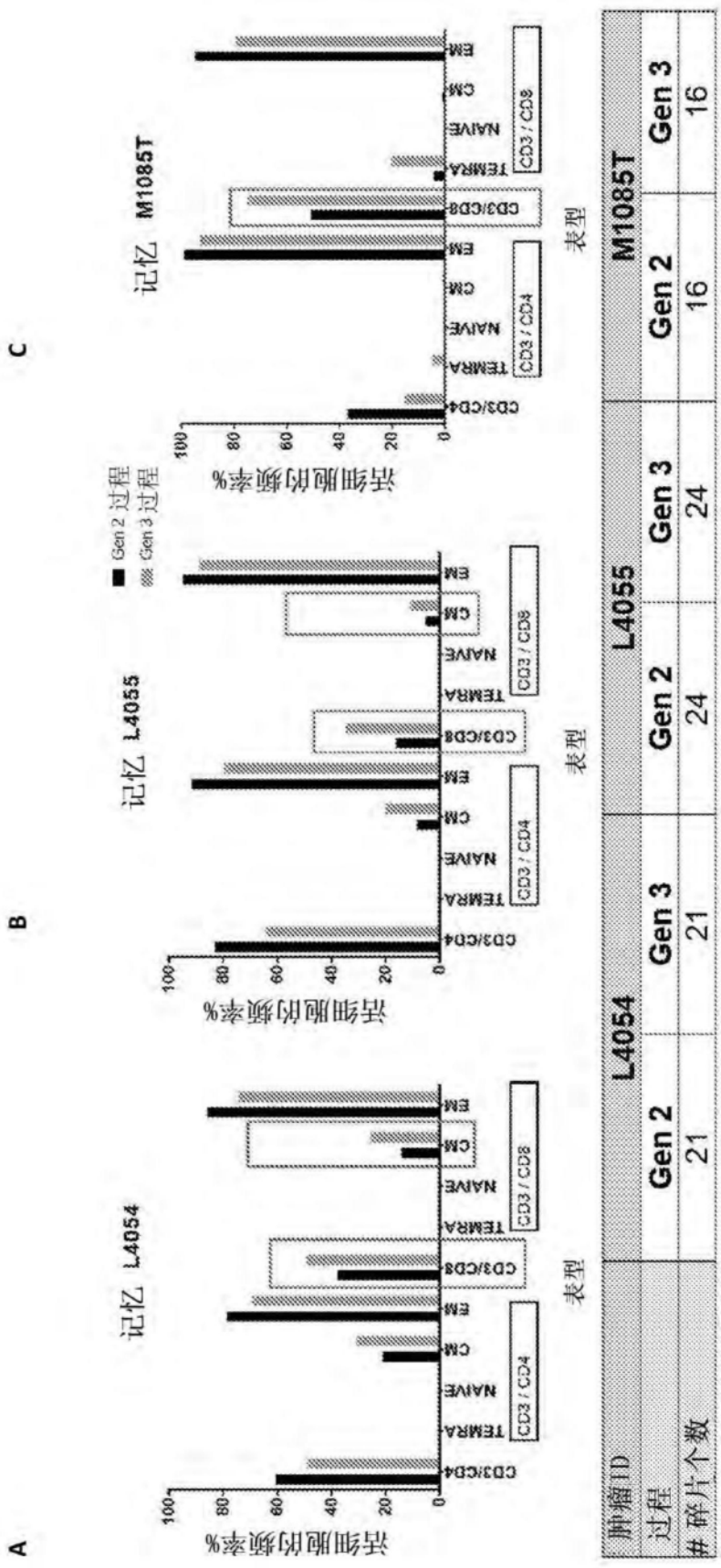

切除肿瘤
第0天
至多50个碎片，在GREX 100MCS中
+IL-2 (6000 IU/mL)，在1L CM1
培养基中
第0天
整个肿瘤
1st 烧瓶，至多60个碎片
2nd 烧瓶，61-89个碎片
3rd 烧瓶，90-120个碎片
在GREX 100MCS中，+IL-2 (6000 IU/mL)
在200mL CM1培养基中
第7天
直接进行REP，所有细胞
均在同一GREX 100MCS中
CM2培养基+IL-2
(6000 IU/mL)
TVC和%活力
收集上清液
第11天
直接进行REP <200E+06
TIL， GREX 500MCS，
CM2培养基+IL-2 (3000
IU/mL)
过滤碎片
第9-11天
将1L细胞溶液转移
到 1 GREX 500MCS
装有4L CM4培养基+ IL-
2 (3000 IU/mL)
碎片过滤
TVC和%活力
收集上清液
第16天
减少90%体积，
分到5个GREX 500MCS中
CM4培养基+
IL-2 (3000 IU/mL)
第16天
收获
LOVO自动化细胞洗涤器
第22天
收获
LOVO自动化细胞洗涤器
TVC和%活力
INF-γ 分泌，通过ELISA
CDR3 分析
TIL: 肿瘤共培养
端粒 (FlowFISH)
代谢底物分析
IL-2 水平，通过ELISA
免疫表型

图86



肿瘤ID	L4054		L4055		M1085T	
过程	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
#碎片个数	21	21	24	24	16	16

图87



肿瘤ID	L4054		L4055		M1085T	
过程	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
# 碎片个数	21	21	24	24	16	16

图88

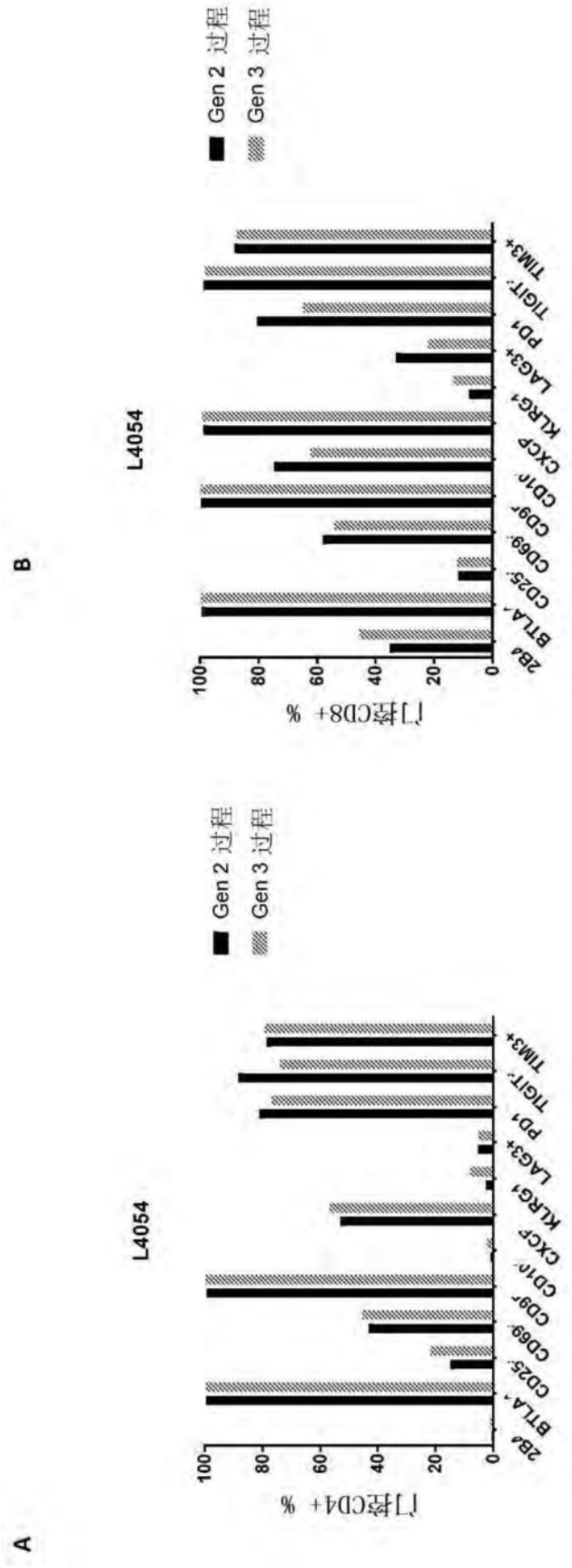

A
B
L4054
L4054
Gen 2 过程
Gen 3 过程
门控CD4+ %
门控CD8+ %
100
80
60
40
20
0
2Ba
BTLA-
CD25-
CD69-
CD9r
CD1r
CXCP
KLRG1
LAG3+
PD1
TIGIT-
TIM3+

图89

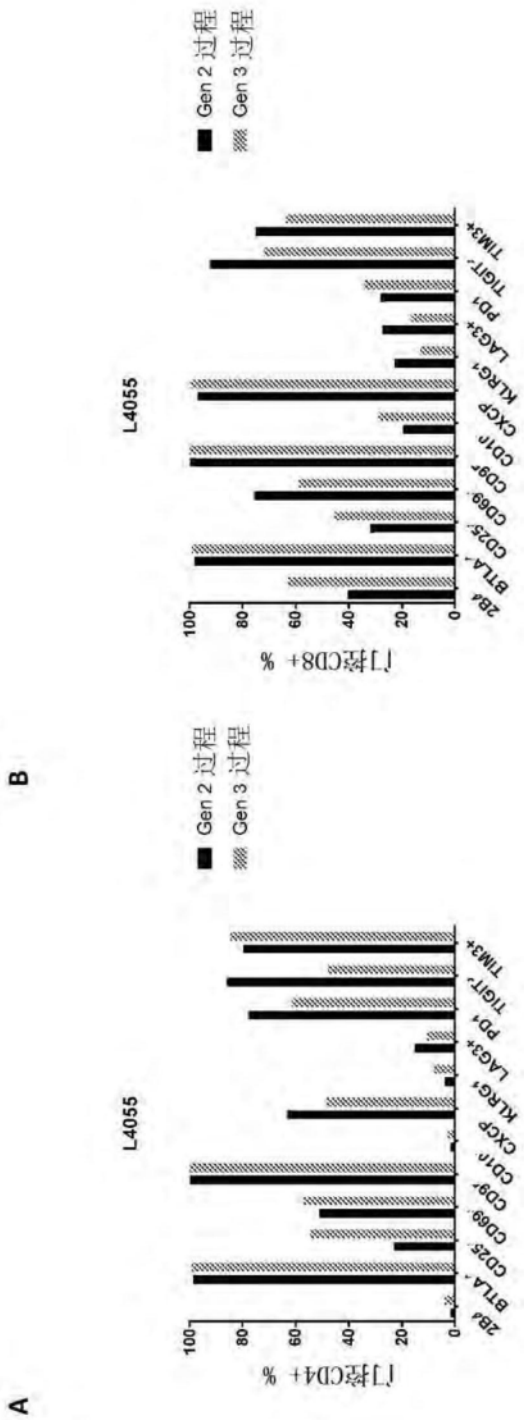

A
B
L4055
L4055
Gen 2 过程
Gen 3 过程
门控CD4+ %
门控CD8+ %
100
80
60
40
20
0
2B4
BTLA
CD25
CD69
CD9
CD1r
CXCP
KLRG1
LAG3+
PD1
TIGIT
TIM3+

图90

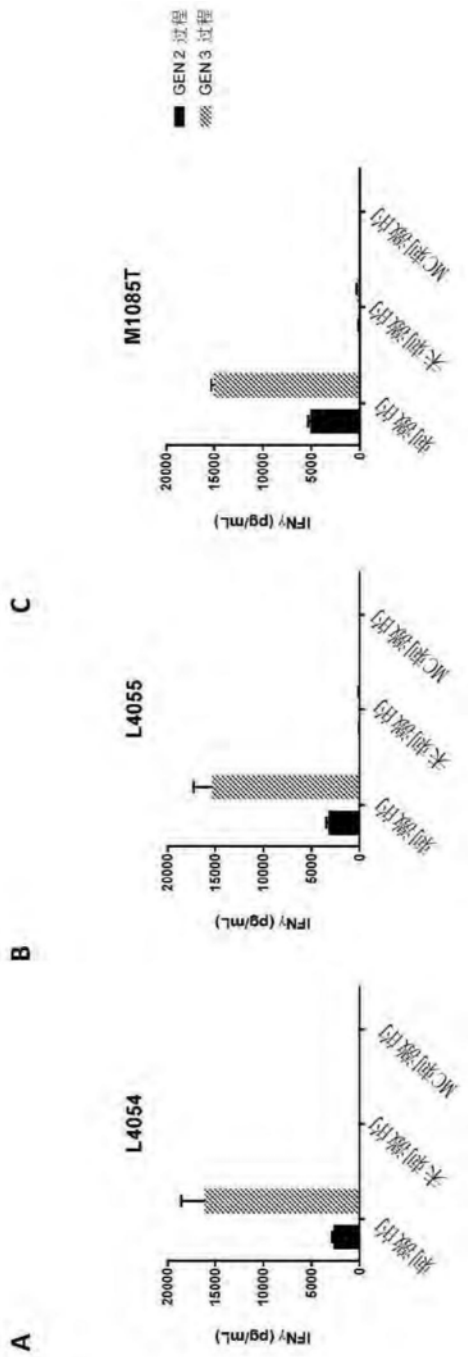

A
B
C
L4054
L4055
M11085T
GEN 2 过程
GEN 3 过程
IFNγ (pg/mL)
20000
15000
10000
5000
0
抑菌剂 (F)
未抑菌剂 (F)
MC 抑菌剂 (F)

图91

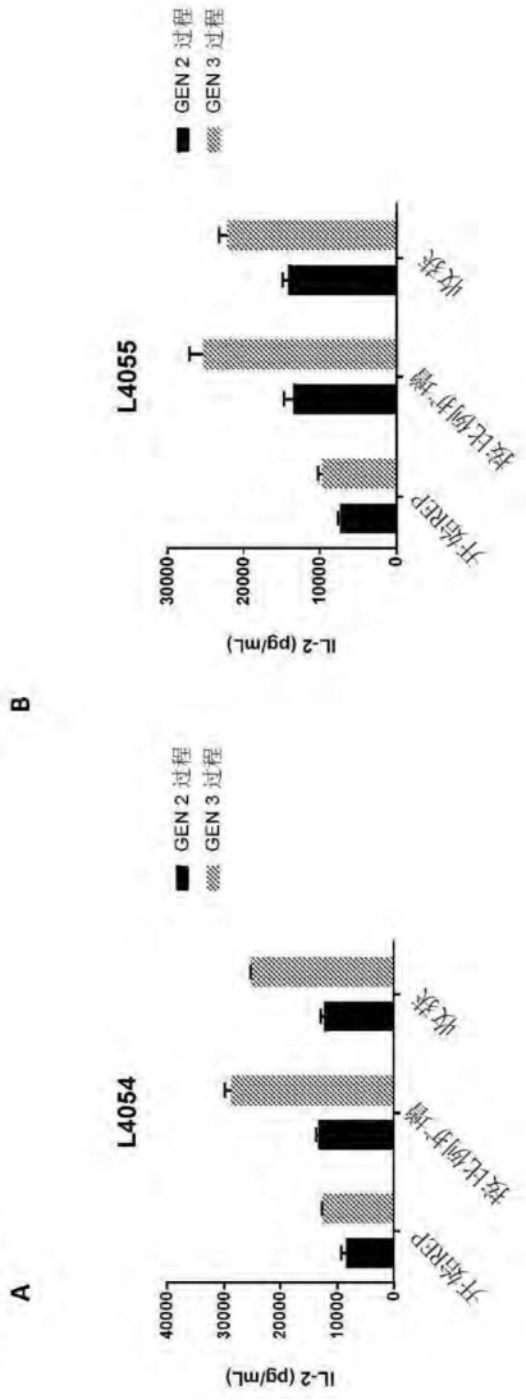

A
L4054
GEN 2 过程
GEN 3 过程
IL-2 (pg/mL)
40000
30000
20000
10000
0
开始REP
投比例扩增
收获
B
L4055
GEN 2 过程
GEN 3 过程
IL-2 (pg/mL)
30000
20000
10000
0
开始REP
投比例扩增
收获

图92

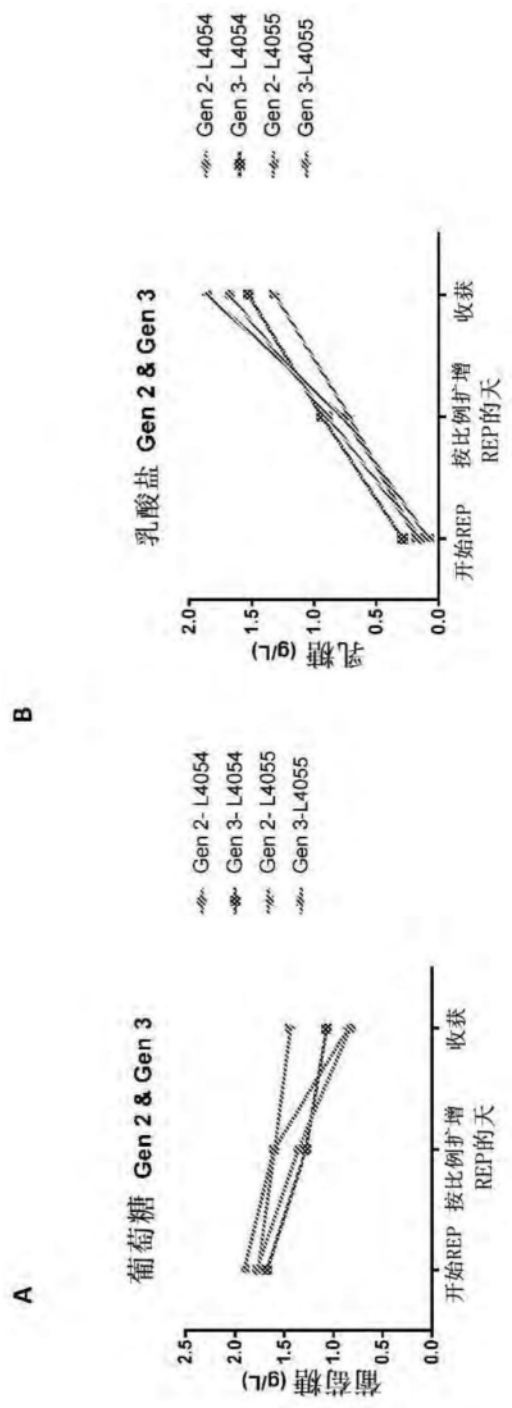
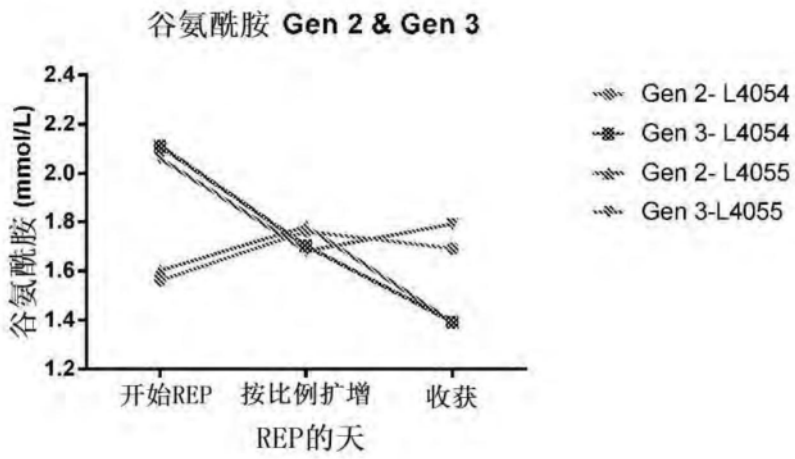
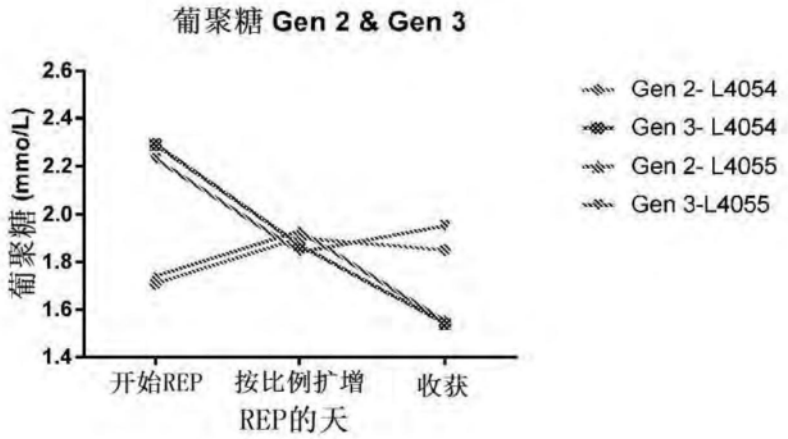

A
葡萄糖 Gen 2 & Gen 3
葡萄糖 (g/L)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
开始REP
按比例扩增
收获
REP的天
Gen 2- L4054
Gen 3- L4054
Gen 2- L4055
Gen 3-L4055
B
乳酸盐 Gen 2 & Gen 3
乳酸盐 (g/L)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
开始REP
按比例扩增
收获
REP的天
Gen 2- L4054
Gen 3- L4054
Gen 2- L4055
Gen 3-L4055

图93

A


谷氨酰胺 Gen 2 & Gen 3
谷氨酰胺 (mmol/L)
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
开始REP
按比例扩增
收获
REP的天
Gen 2- L4054
Gen 3- L4054
Gen 2- L4055
Gen 3-L4055


葡聚糖 Gen 2 & Gen 3
葡聚糖 (mmol/L)
2.6
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
开始REP
按比例扩增
收获
REP的天
Gen 2- L4054
Gen 3- L4054
Gen 2- L4055
Gen 3-L4055

B

C

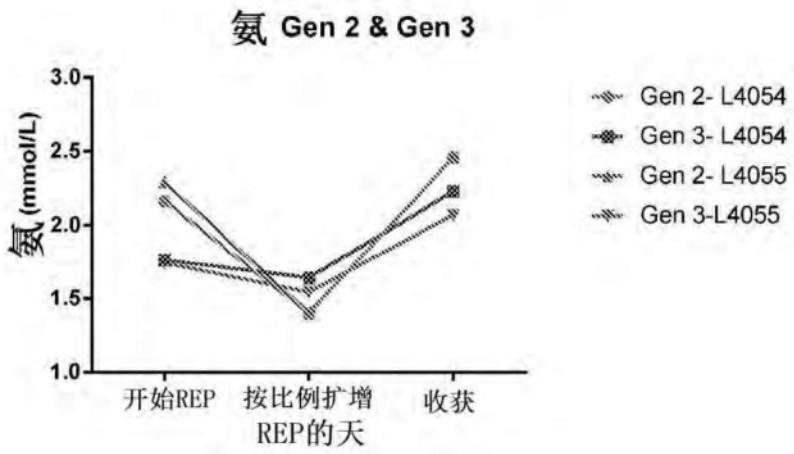

氨 Gen 2 & Gen 3
氨 (mmol/L)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
开始REP
按比例扩增
收获
REP的天
Gen 2- L4054
Gen 3- L4054
Gen 2- L4055
Gen 3-L4055

图94

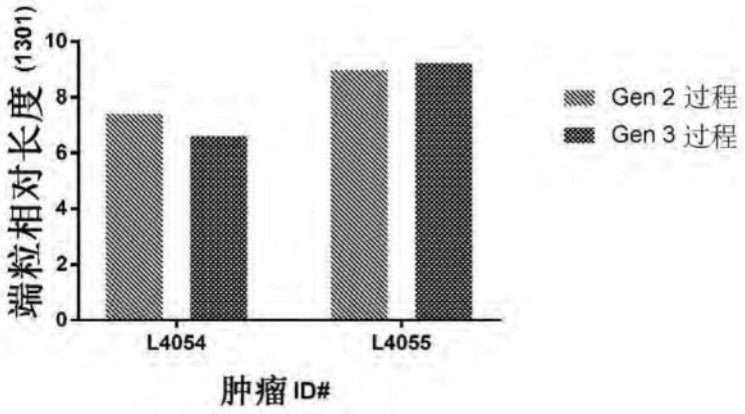

端粒相对长度 (1301)
10
8
6
4
2
0
L4054
L4055
肿瘤 ID#
Gen 2 过程
Gen 3 过程

图95

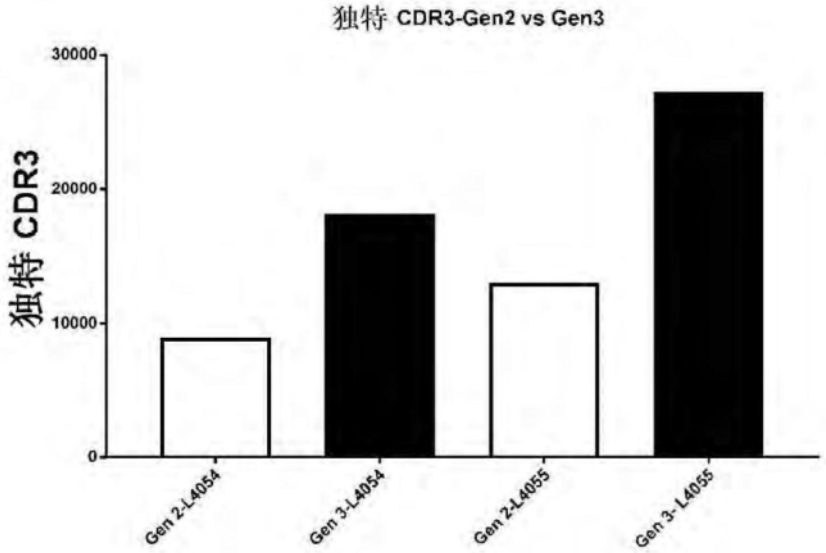


图96

# uCDR3 (% 重叠)	所有uCDR3		前80% uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4054	8915	4355 (48.85%)	205	199 (97.07%)
Gen 3-L4054	-	18130	-	223

* Gen3和Gen2最终产品之间共享199个序列，对应地Gen2的独特CDR3序列的前80%与Gen3最终产品共享97.07%的序列。

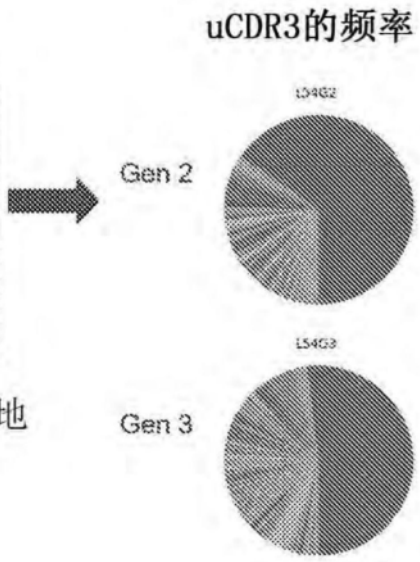
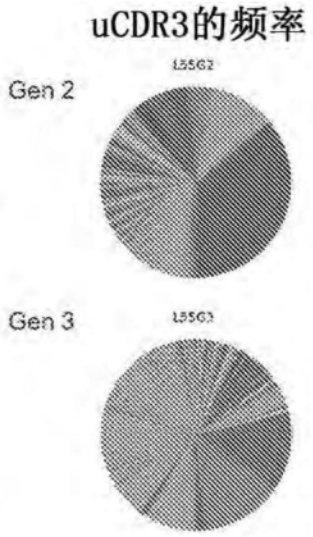


图97

# uCDR3 (% 重叠)	所有uCDR3		前80% uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4055	12996	6599 (50.77%)	1843	1833 (99.45%)
Gen 3-L4055	-	27246	-	2616



- Gen3和Gen2最终产品之间共享1833个序列，对应地Gen2的独特CDR3序列的前80%与Gen3最终产品共享99.45%的序列。

图98

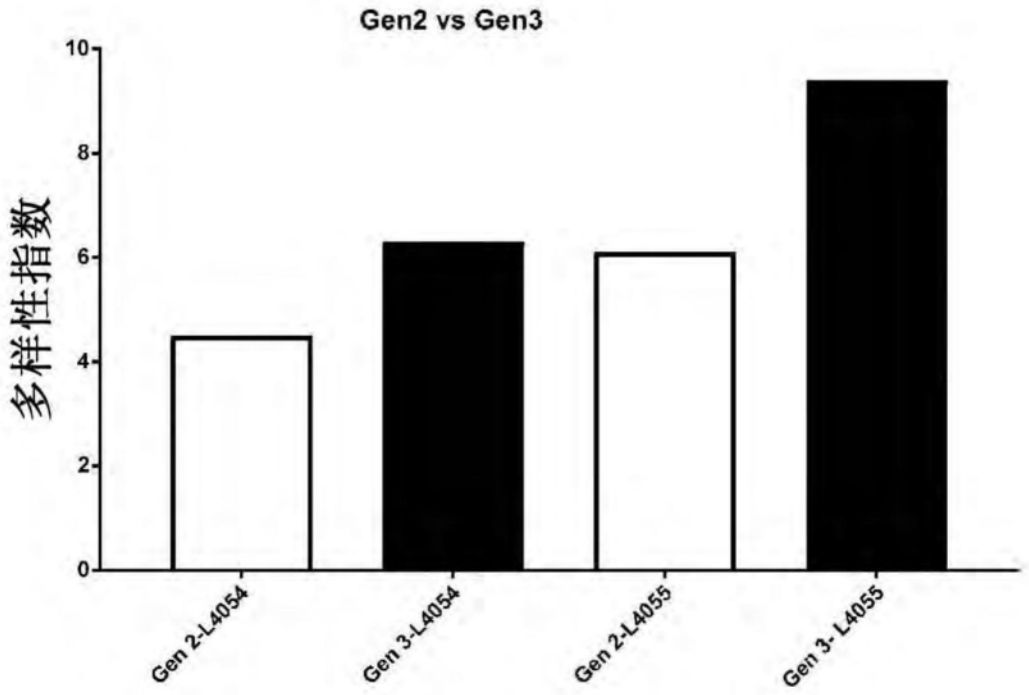


图99

体积 (mL)		计数 1 (个细胞/mL)	计数 2 (个细胞/mL)	计数 3 (个细胞/mL)	平均 (个细胞/mL)	细胞总数 平均*体积
188	总计	2.46E+05	2.28E+05	2.31E+05	2.35E+05	4.42E+07
	活	2.37E+05	2.27E+05	2.26E+05	2.30E+05	4.32E+07
	死	9.26E+03	7.03E+02	4.63E+03	4.86E+03	9.14E+05
	% 活力	96.20%	99.70%	98.00%	97.97%	
188	总计	8.26E+04	8.00E+04	7.66E+04	7.97E+04	1.50E+07
	活	7.60E+04	7.54E+04	6.89E+04	7.34E+04	1.38E+07
	死	6.61E+03	4.63E+03	7.73E+03	6.32E+03	1.19E+06
	% 活力	92.00%	94.20%	89.90%	92.03%	
200	总计	2.44E+04	4.20E+04	1.05E+04	2.56E+04	5.13E+06
	活	1.74E+04	2.80E+04	7.03E+03	1.75E+04	3.50E+06
	死	7.03E+03	1.40E+04	3.48E+03	8.17E+03	1.63E+06
	% 活力	71.20%	66.70%	66.90%	68.27%	

图100

ID	体积 (mL)		计数 1 (个细胞/mL)	计数 3 (个细胞/mL)	计数 2 (个细胞/mL)	平均 (个细胞/mL)	细胞总数 平均*体积
Gen 3 #L4054 第一轮	1000	总计	9.11E+05	1.01E+06	1.08E+06	1.00E+06	1.00E+09
		活	8.60E+05	9.34E+05	1.01E+06	9.35E+05	9.35E+08
		死	5.09E+04	7.49E+04	6.74E+04	6.44E+04	6.44E+07
		% 活力	94.40%	92.60%	93.70%	93.57%	
Gen 3 #L4055 第二轮	1000	总计	8.56E+05	9.04E+05	8.81E+05	8.80E+05	8.80E+08
		活	8.24E+05	8.67E+05	8.42E+05	8.44E+05	8.44E+08
		死	3.17E+04	3.70E+04	3.87E+04	3.58E+04	3.58E+07
		% 活力	96.30%	95.90%	95.60%	95.93%	
Gen 3 #M1085T	200	总计	2.32E+06	2.25E+06		2.29E+06	4.57E+08
		活	1.68E+06	1.57E+06		1.63E+06	3.25E+08
		死	6.41E+05	6.79E+05		6.60E+05	1.32E+08
		% 活力	72.40%	69.90%		71.15%	
Gen 2 #L4054 第一轮	142	总计	1.08E+06	9.84E+05	1.00E+06	1.02E+06	1.45E+08
		活	1.06E+06	9.71E+05	9.79E+05	1.00E+06	1.42E+08
		死	2.05E+04	1.26E+04	2.12E+04	1.81E+04	2.57E+06
		% 活力	98.10%	98.70%	97.90%	98.23%	
Gen 2 #L4055 第二轮	96	总计	2.93E+05	3.05E+05	2.64E+05	2.87E+05	2.76E+07
		活	2.88E+05	2.96E+05	2.55E+05	2.80E+05	2.68E+07
		死	4.72E+03	9.14E+03	8.26E+03	7.37E+03	7.08E+05
		% 活力	98.40%	97.00%	96.90%	97.43%	
Gen 2 #M1085T	200	总计	9.10E+04	5.60E+04		7.35E+04	1.47E+07
		活	8.05E+04	4.21E+04		6.13E+04	1.23E+07
		死	1.04E+04	1.39E+04		1.22E+04	2.43E+06
		% 活力	88.50%	75.20%		81.85%	

图101

ID	体积 (mL)		计数 1 (个细胞/mL)	计数 2 (个细胞/mL)	计数 3 (个细胞/mL	平均 (个细胞/mL)	细胞总数 平均*体积
Gen 3 #L4054 第一轮 -pre LOVO	1243.1	总计	1.40E+07	1.46E+07		1.43E+07	1.78E+10
		活	1.32E+07	1.35E+07		1.34E+07	1.66E+10
		死	8.47E+05	1.12E+06		9.84E+05	1.22E+09
		% 活力	94.00%	92.40%		93.20%	
Gen 3 #L4054 第一轮 -post LOVO	330	总计	6.35E+07	6.07E+07		6.21E+07	2.05E+10
		活	5.72E+07	5.44E+07		5.58E+07	1.84E+10
		死	6.35E+06	6.27E+06		6.31E+06	2.08E+09
		% 活力	90.00%	89.70%		89.85%	

ID	体积 (mL)		计数 1 (个细胞/mL)	计数 2 (个细胞/mL)	计数 3 (个细胞/mL	平均 (个细胞/mL)	细胞总数 平均*体积
Gen 3 #L4055 第二轮 -pre LOVO	1032.6	总计	9.49E+06	1.05E+07		1.00E+07	1.03E+10
		活	8.90E+06	9.79E+06		9.35E+06	9.65E+09
		死	5.85E+05	6.75E+05		6.30E+05	6.51E+08
		% 活力	93.80%	93.60%		93.70%	
Gen 3 #L4055 第二轮 -post LOVO	330	总计	3.31E+07	2.82E+07	3.18E+07	3.07E+07	1.01E+10
		活	2.85E+07	2.46E+07	2.77E+07	2.66E+07	8.76E+09
		死	4.56E+06	3.61E+06	4.12E+06	4.09E+06	1.35E+09
		% 活力	86.20%	87.20%	87.10%	86.70%	

ID	体积 (mL)		计数 1 (个细胞/mL)	计数 2 (个细胞/mL)	计数 3 (个细胞/mL	平均 (个细胞/mL)	细胞总数 平均*体积
Gen 3 #M1085T pre-LOVO	5000	总计	2.26E+06	2.64E+06		2.45E+06	1.23E+10
		活	1.97E+06	2.31E+06		2.14E+06	1.07E+10
		死	2.85E+05	3.30E+05		3.08E+05	1.54E+09
		% 活力	87.40%	87.50%		87.45%	
Gen 3 #M1085T - post LOVO pre CS10 添加	150	总计	6.27E+07	5.44E+07		5.86E+07	8.78E+09
		活	5.50E+07	4.74E+07		5.12E+07	7.68E+09
		死	7.70E+06	6.96E+06		7.33E+06	1.10E+09
		% 活力	87.70%	87.20%		87.45%	

ID	体积 (mL)		计数 1 (个细胞/mL)	计数 2 (个细胞/mL)	计数 3 (个细胞/mL	平均 (个细胞/mL)	细胞总数 平均*体积
Gen 2 #L4054 第一轮	913	总计	3.53E+06	4.30E+06		3.92E+06	3.57E+09
		活	3.35E+06	4.00E+06		3.68E+06	3.36E+09
		死	1.75E+05	3.03E+05		2.39E+05	2.18E+08
		% 活力	95.00%	93.00%		94.00%	
Gen 2 #L4055 第二轮	292	总计	1.29E+07	1.36E+07		1.33E+07	3.87E+09
		活	1.16E+07	1.23E+07		1.20E+07	3.49E+09
		死	1.27E+06	1.23E+06		1.25E+06	3.65E+08
		% 活力	90.10%	90.90%		90.50%	
Gen 2 #M1085T	369	总计	6.75E+06	6.98E+06		6.87E+06	2.53E+09
		活	5.22E+06	5.58E+06		5.40E+06	1.99E+09
		死	1.54E+06	1.40E+06		1.47E+06	5.42E+08
		% 活力	77.20%	79.90%		78.55%	

图102

ID	体积 (mL)		计数 1 (个细胞/mL)	计数 2 (个细胞/mL)	计数 3 (个细胞/mL)	平均 (个细胞/mL)	细胞总数 平均*体积
Gen 2 #L4054 第一轮 -pre LOVO	1385.7	总计	3.55E+07	4.12E+07	4.03E+07	3.90E+07	5.40E+10
		活	3.26E+07	3.73E+07	3.67E+07	3.55E+07	4.92E+10
		死	2.93E+06	3.87E+06	3.59E+06	3.46E+06	4.80E+09
		% 活力	91.70%	90.60%	91.10%	91.13%	
Gen 2 #L4054 第二轮 -post LOVO	330	总计	1.70E+08	1.79E+08	1.68E+08	1.72E+08	5.69E+10
		活	1.49E+08	1.58E+08	1.48E+08	1.52E+08	5.01E+10
		死	2.16E+07	2.04E+07	2.00E+07	2.07E+07	6.82E+09
		% 活力	87.30%	88.60%	88.10%	87.95%	

ID	体积 (mL)		计数 1 (个细胞/mL)	计数 2 (个细胞/mL)	计数 3 (个细胞/mL)	平均 (个细胞/mL)	细胞总数 平均*体积
Gen 2 #L4055 第一轮 -pre LOVO	1968.2	总计	3.15E+07	2.51E+07	2.97E+07	2.88E+07	5.66E+10
		活	2.89E+07	2.25E+07	2.72E+07	2.62E+07	5.16E+10
		死	2.57E+06	2.61E+06	2.52E+06	2.57E+06	5.05E+09
		% 活力	91.80%	89.60%	91.50%	90.97%	
Gen 2 #L4055 第二轮 -post LOVO	330	总计	2.33E+08	1.89E+08	1.53E+08	1.92E+08	6.33E+10
		活	2.03E+08	1.66E+08	1.33E+08	1.67E+08	5.52E+10
		死	3.00E+07	2.24E+07	1.94E+07	2.39E+07	7.90E+09
		% 活力	87.10%	88.10%	87.30%	87.50%	

ID	体积 (mL)		计数 1 (个细胞/mL)	计数 2 (个细胞/mL)	计数 3 (个细胞/mL)	平均 (个细胞/mL)	细胞总数 平均*体积
Gen 2 #M1085T-pre LOVO	N/A	总计				#DIV/0!	#DIV/0!
		活				#DIV/0!	#DIV/0!
		死				#DIV/0!	#DIV/0!
		% 活力				#DIV/0!	
Gen 2 #M1085T - post LOVO pre CS10 添加	150	总计	8.51E+07	9.05E+07		8.78E+07	1.32E+10
		活	7.33E+07	7.79E+07		7.56E+07	1.13E+10
		死	1.18E+07	1.26E+07		1.22E+07	1.83E+09
		% 活力	86.10%	86.10%		86.10%	

对于L4054 Gen2，post LOVO计数外推为4个烧瓶，因为此为本研究的总数。
1个烧瓶被污染了，进行外推，总数=6.67E+10。

图103

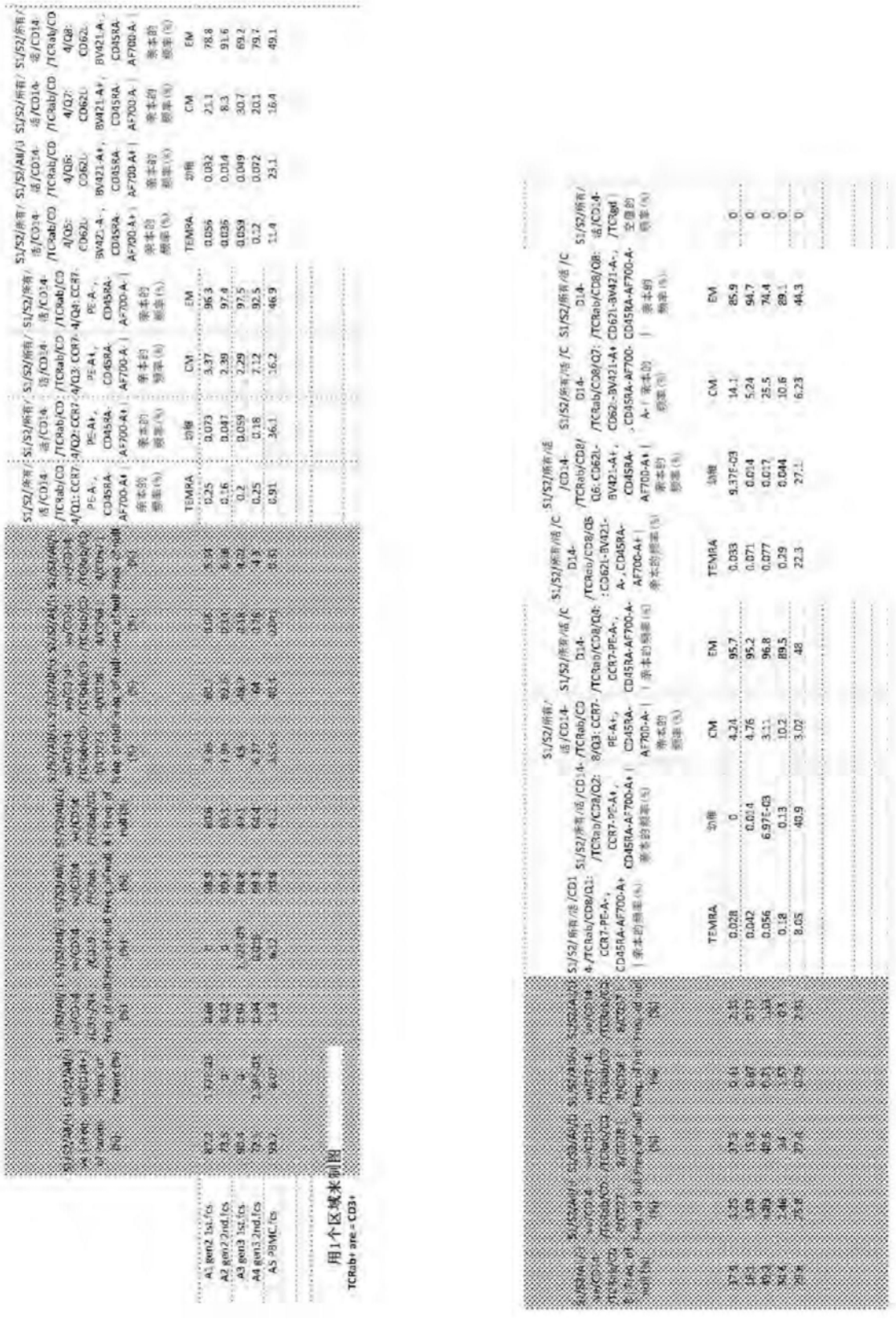

用1个区域来制图
TCRab+ are =CD3+
A1 gen2 1st.fcs
A2 gen2 2nd.fcs
A3 gen3 1st.fcs
A4 gen3 2nd.fcs
A5 98MC.fcs

图104

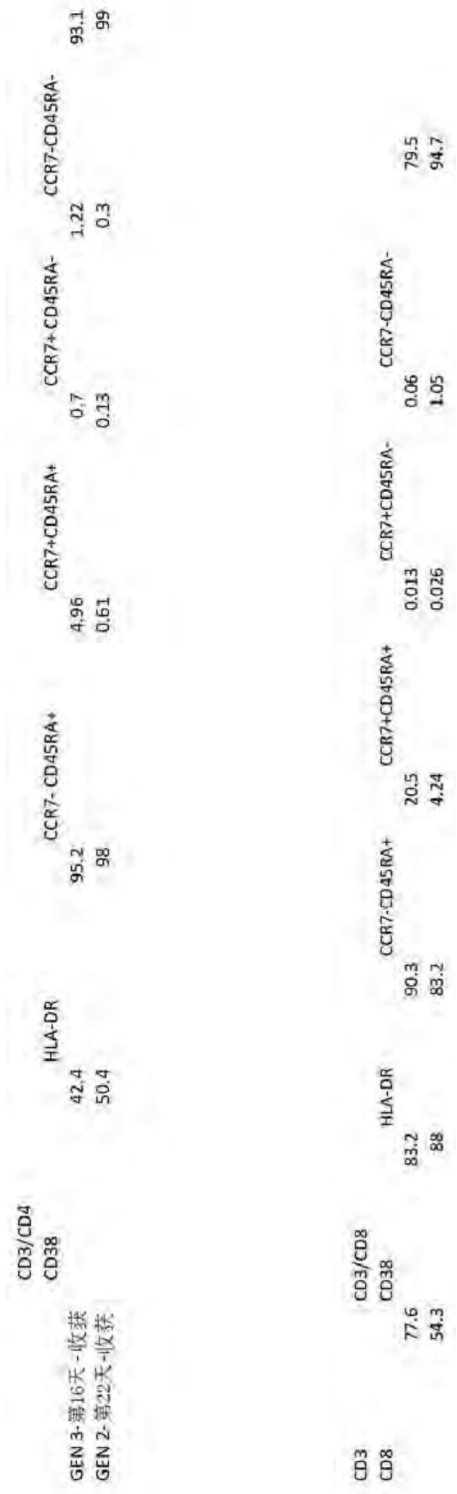
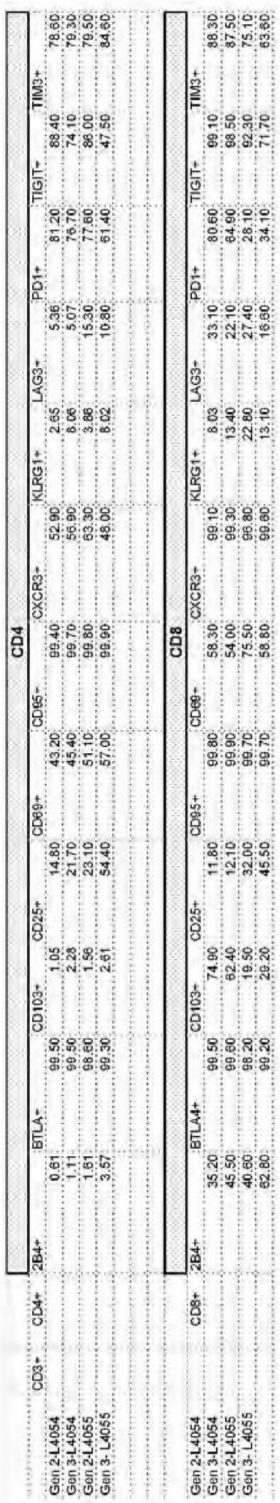

CD3/CD4
CD38
HLA-DR
CCR7- CD45RA+
CCR7+CD45RA+
CCR7+ CD45RA-
CCR7-CD45RA-
GEN 3-第16天 - 收获
42.4
95.2
4.96
0.7
1.22
93.1
GEN 2-第22天-收获
50.4
98
0.61
0.13
0.3
99
CD3/CD8
CD38
HLA-DR
CCR7-CD45RA+
CCR7+CD45RA+
CCR7+CD45RA-
CCR7-CD45RA-
CD3
77.6
83.2
90.3
20.5
0.013
0.06
79.5
CD8
54.3
88
83.2
4.24
0.026
1.05
94.7

图105



	CD4																							
	CD3+	CD4+	2B4+	BTLA-	BTLA4+	CD103+	CD25+	CD69+	CD95+	CXCR3+	KLRG1+	LAG3+	PD1+	TIGIT+	TIM3+
Gen 2-L4054				0.61		99.50	1.05	14.80	43.20	99.40	52.90	2.65	5.36	81.20	88.40	78.80
Gen 3-L4054				1.11		99.50	2.28	21.70	45.40	99.70	56.90	6.06	5.07	76.70	74.10	70.30
Gen 2-L4055				1.61		98.60	1.56	23.10	51.10	99.80	63.30	3.86	15.30	77.60	86.00	76.50
Gen 3- L4055				3.57		99.30	2.61	54.40	57.00	99.90	48.00	8.02	10.80	61.40	47.50	84.60
	CD8																							
	CD3+	CD8+	2B4+	BTLA-	BTLA4+	CD103+	CD25+	CD69+	CD95+	CD69+	CXCR3+	KLRG1+	LAG3+	PD1+	TIGIT+	TIM3+
Gen 2-L4054					35.20	99.50	74.90	11.80	99.80	58.30	99.10	8.03	33.10	80.60	99.10	88.30
Gen 3-L4054					45.50	99.90	82.40	12.10	99.90	54.00	99.30	13.40	22.10	64.90	99.50	87.50
Gen 2-L4055					40.60	98.20	19.50	32.00	99.70	75.50	99.80	22.60	27.40	28.10	92.30	75.10
Gen 3- L4055					62.80	99.20	29.20	45.50	99.70	58.80	99.80	13.10	16.90	34.10	71.70	63.80

图106

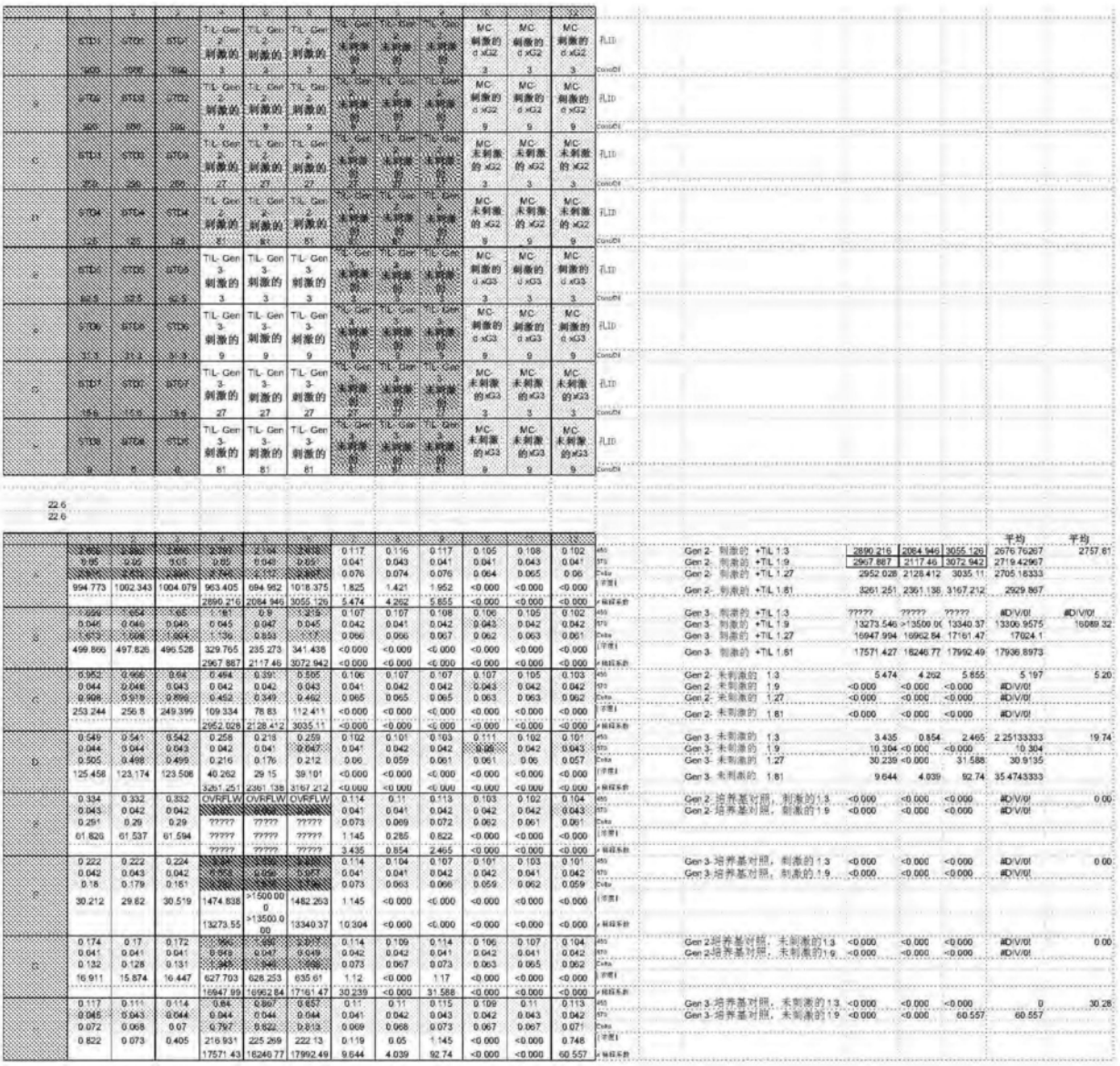


图107

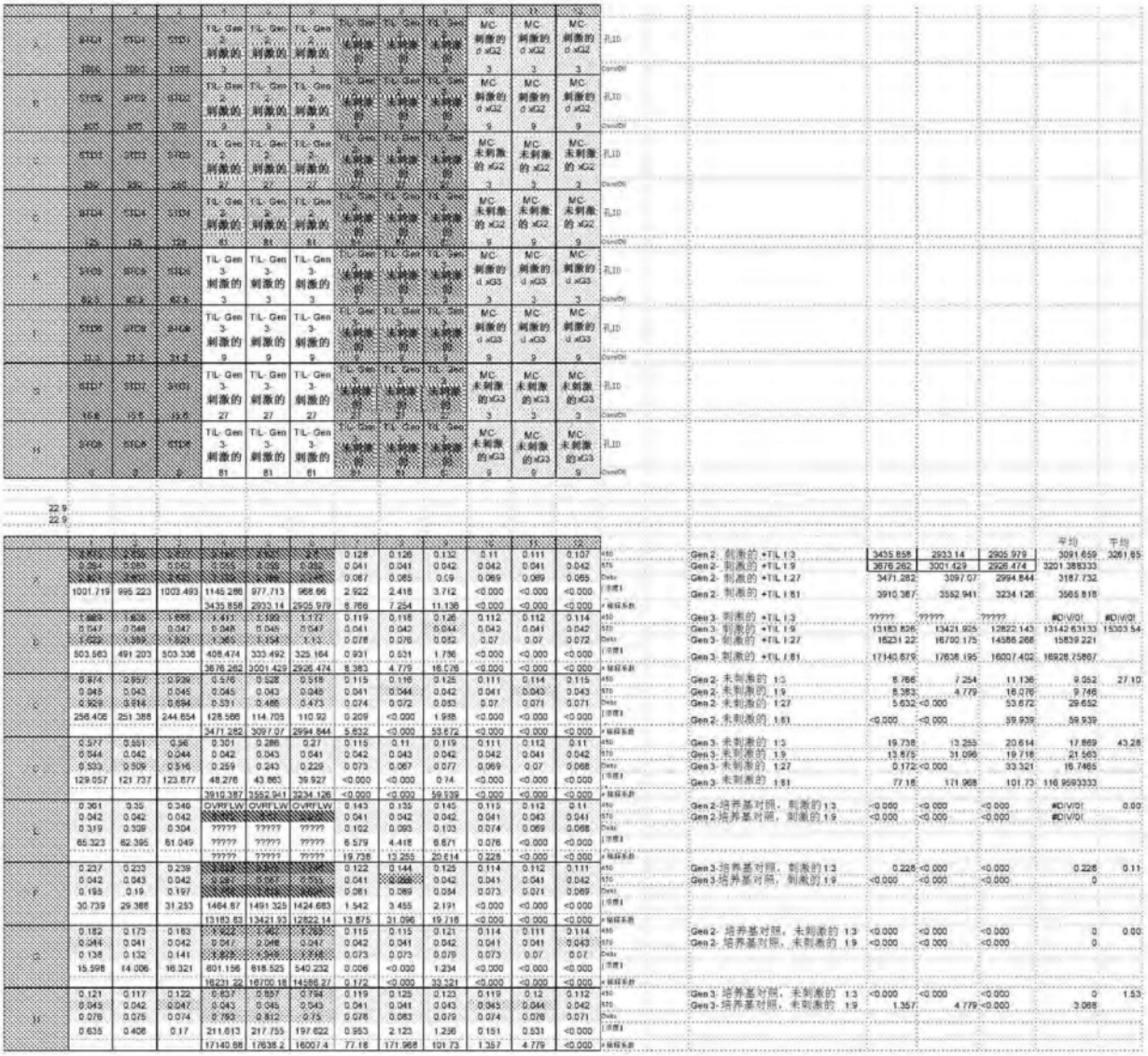


图108

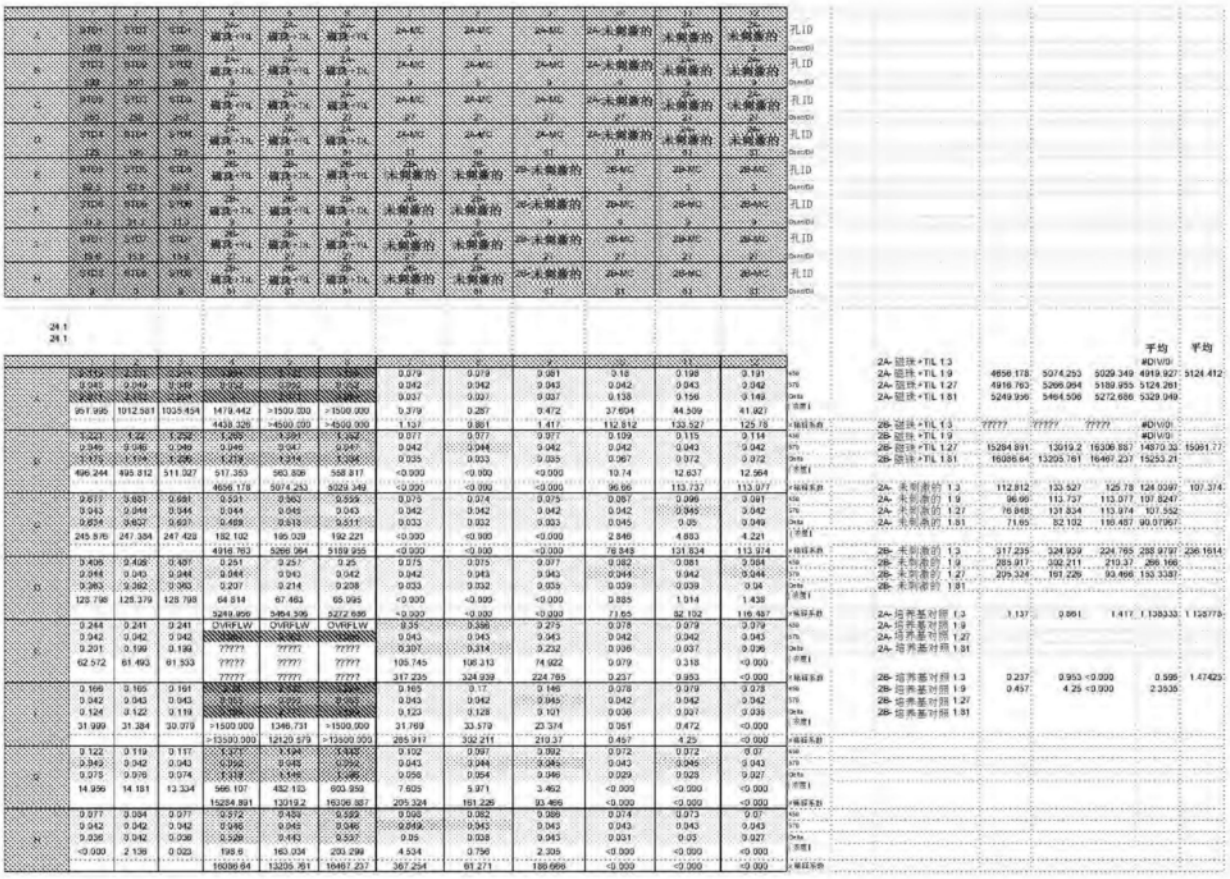


图109

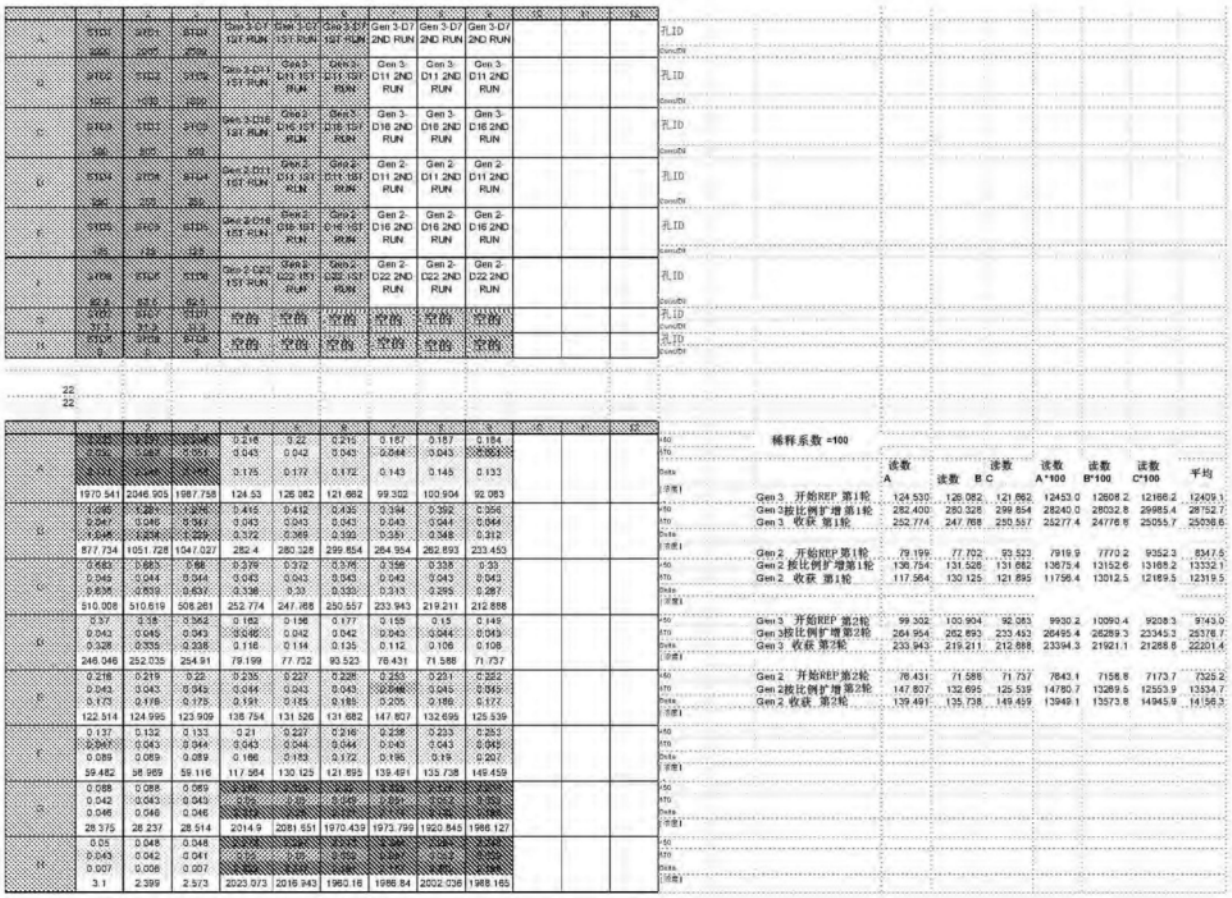


图110

样品编号 #	描述	葡萄糖 (g/L)	乳酸盐 (g/L)	氨 (mmol/L)	谷氨酰胺 (mmol/L)	GlutaMAX (mmol/L)	GlutaMAX-谷氨酰胺 (mmol/L)
1	Gen 2- REP开始第一轮 #L4054	1.78	0.14	2.16	1.56	1.71	0.16
2	Gen 2- 按比例扩增第一轮	1.36	0.89	1.40	1.76	1.90	0.15
3	Gen 2- 收获第一轮 #L4054	0.83	1.68	2.46	1.69	1.85	0.17
4	Gen 3- REP开始第一轮 #L4054	1.68	0.29	1.76	2.11	2.29	0.18
5	Gen 3- 按比例扩增第一轮 #L4054	1.28	0.94	1.64	1.70	1.87	0.16
6	Gen 3- 收获第一轮 #L4054	1.07	1.53	2.23	1.39	1.54	0.14
7	Gen 2- REP开始第二轮 #L4055	1.91	0.08	2.29	1.60	1.74	0.14
8	Gen 2- 按比例扩增第二轮 #L4055	1.61	0.77	1.40	1.78	1.93	0.15
9	Gen 2- 收获第二轮 #L4055	0.85	1.86	2.46	1.39	1.55	0.16
10	Gen 3- REP开始第二轮 #L4055	1.77	0.18	1.74	2.06	2.23	0.17
11	Gen 3- 按比例扩增第二轮 #L4055	1.60	0.72	1.54	1.68	1.84	0.15
12	Gen 3- 收获第二轮 #L4055	1.44	1.32	2.07	1.79	1.95	0.16

图111

	$FIL	S/L/1301 | 几何	S/L/Pt | 几何平均	(FL03-A)
A1 gen2L4054 ne	A1 gen2L4054 neg.fcs	34.5		3.24
A2 gen2L4054 ne	A2 gen2L4054 neg.fcs	34		3.19
A3 gen2L4054 po	A3 gen2L4054 pos.fcs	1834		70.6
A4 gen2L4054 po	A4 gen2L4054 pos.fcs	1872		70.3
A5 gen2L4055 ne	A5 gen2L4055 neg.fcs	31.9		4.23
A6 gen2L4055 ne	A6 gen2L4055 neg.fcs	32.4		4.87
A7 gen2L4055 po	A7 gen2L4055 pos.fcs	1941		88.7
A8 gen2L4055 po	A8 gen2L4055 pos.fcs	1933		91.1
B1 gen3L4054 ne	B1 gen3L4054 neg.fcs	31.2		3.45
B2 gen3L4054 ne	B2 gen3L4054 neg.fcs	31.9		3.39
B3 gen3L4054 po	B3 gen3L4054 pos.fcs	2016		61.3
B4 gen3L4054 po	B4 gen3L4054 pos.fcs	2014		76.2
B5 gen3L4055 ne	B5 gen3L4055 neg.fcs	33.7		6.76
B6 gen3L4055 ne	B6 gen3L4055 neg.fcs	35.4		6.7
B7 gen3L4055 po	B7 gen3L4055 pos.fcs	2158		99.4
B8 gen3L4055 po	B8 gen3L4055 pos.fcs	1938		99.5
平均	-	998		43.3
SD	-	999		41.3

图112

研究	样品	样品ID	种	链	读长	CDR3	独特 CDR3	D50
20180511_ 研究 1_FCA	Gen2-L4054	59990	TRB	h	1181732	1181732	8915	0
20180511_ 研究 1_FCA	Gen3-L4054	59991	TRB	h	1145697	1145697	18130	0
20180511_ 研究 1_FCA	Gen2-L4055	59987	TRB	h	1166465	1166465	12996	0.1
20180511_ 研究 1_FCA	Gen3-L4055	59982	TRB	h	1059985	1059985	27246	0.9

图113

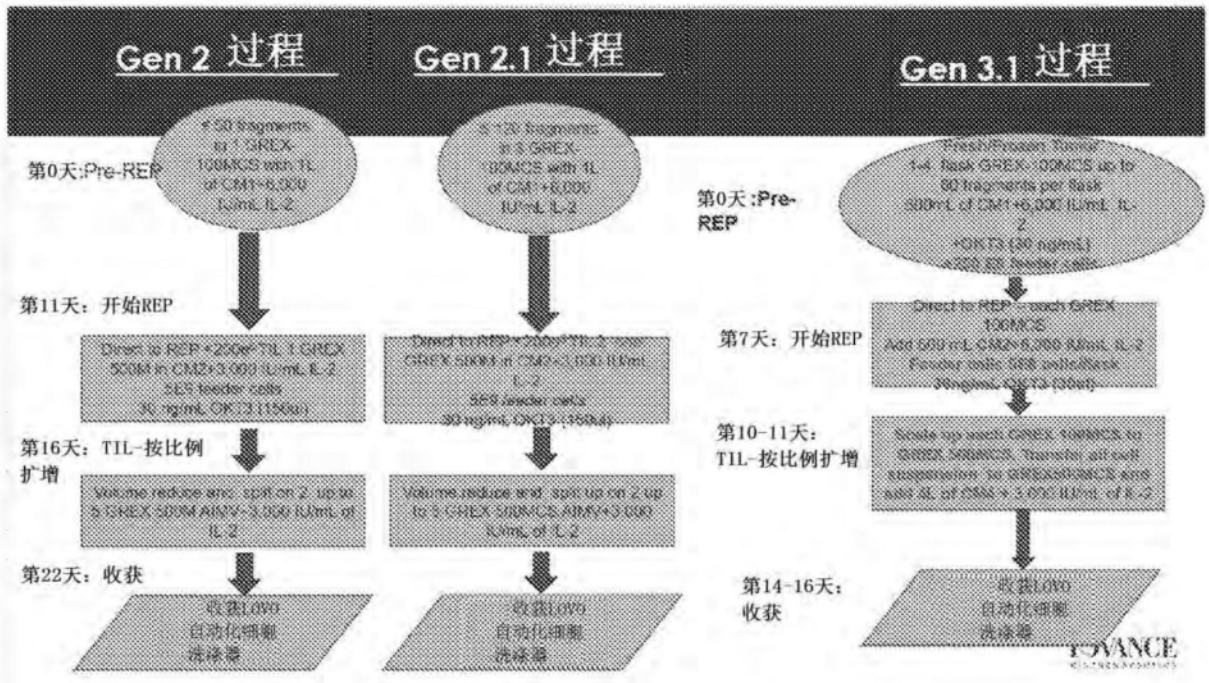


图114

步骤	Gen 2	Gen 2.1	Gen 3.0
Pre REP-第0天	≤50个片段/1 G-Rex 100MCS - 11天	≤180个碎片/1 G-Rex 预制CS4加热培养基 100MCS - 13天	新鲜或冷冻的肿瘤 整个肿瘤，≤30个碎片，至多60个碎片/1个G-Rex 100MCS（至多4个G-Rex） 预制的温热培养基-7天，Pre-REP 饲养细胞 2.5E6个细胞+OKT-3(30ng/mL)
开始REP	直接进行REP - 第11天 - <200 E6 TIL 1 G-Rex 500MCS	直接进行REP - 第15天 - <200 E6 TIL 预制的CM2加热培养基 在1个G-Rex 500MCS中	直接进行REP - 第7天 - 所有细胞TIL - 同一G-Rex100MCS（100MCS至多4 GREX） - 标准培养基或成分明确的培养基。活化饲养细胞，5E6个细胞+OKT-3(30ng/mL)
TIL扩增或按比例扩增	1至5个G-REX 500MCS 第16天分开	2至6个G-REX 500MCS 预制的CM4加热培养基 第16天分开	从G-REX 100MCS转移TIL悬液至G-REX 500MCS，至多4个G-REX 500MCS - 标准培养基或成分明确的培养基（无血清） 在第10或11天按比例扩增
收获	收获，第22天 自动化细胞洗涤器	收获，第22天 自动化细胞洗涤器 (5个洗涤循环)	收获，第14或16天 自动化细胞洗涤器（5个洗涤循环）
最终制剂	冷冻保存的产品 300IU/ml IL-2 CS10 在LN2中 多个等分试样	冷冻保存的产品 300IU/ml IL-2 CS10 在LN2中 多个等分试样	冷冻保存的产品 300IU/ml IL-2 CS10 在LN2中 多个等分试样
过程时间	22天	22天	16天

图115

处理日	条件	Gen 3.1
第0天-开始pre REP	培养基CM1	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	OKT-3 (30ng/mL)	+
	饲养细胞(250 E+06)	+

处理日	条件	Gen 3.1
第7天开始REP	培养基CM2	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	OKT-3 (30ng/mL) 添加，第7天	+
	饲养细胞添加，第7天	500 E06
	饲养细胞总数	750 E+06

处理日	条件	Gen 3.1
第9-11天 按比例扩增	从 G-REX 100MCS 转移 TIL 悬液至 1 G-REX 500MCS (至多 3 GREX 500MCS)	是
第16天-收获	自动化细胞洗涤器	是

图116

过程比较	关键过程变化	益处
Gen 2： Gen 2.1	• 用2个烧瓶代替1个烧瓶开始过程 • 将REP初始饲养细胞层分到2个G-Rex500MCS烧瓶 • 预制培养基，使用前加热	• 最终细胞计数（剂量）可能加倍 TIL谱系增加 • 整个过程处理富余
Gen 2.1： Gen 3.1	• 新鲜或冷冻的肿瘤 • 14-16天过程（从22天） • 减少使用的饲养细胞层总数 • 饲养细胞层和OKT3出现于第0天 • 用碎片开始REP • 100MCS放大到500MCS • 放大到多个pre-REP烧瓶 • 标准培养基，成分明确的培养基（无血清）	• 效价增加 • 表型改善 • 过程时间减少 • 试剂检测减少 • 过程变异性减少 • 试剂明确 • 谱系增加 • 杂质（饲养细胞）减少 • 剂量相当或更高

图117

过程比较	关键过程变化	所需的改善	成功的标准	结果
Gen 2：Gen 3.0	• 14-16天 •用碎片开始REP，至多4个烧瓶 •100MCS扩大到500MCS	• 效价增加 • 表型改善 •过程时间减少	• 效价增加，通过测量INF-g √ • 表型相当 √ • 剂量相当 √ • 纯度相当（饲养细胞）√ • 维持克隆多样性 √	• Gen2效价增加 •CD8细胞的CD28表达改善 • Gen 3.1在第16天达到最大烧瓶容量 • 使用的饲养细胞减少 • 多样性增加

图118

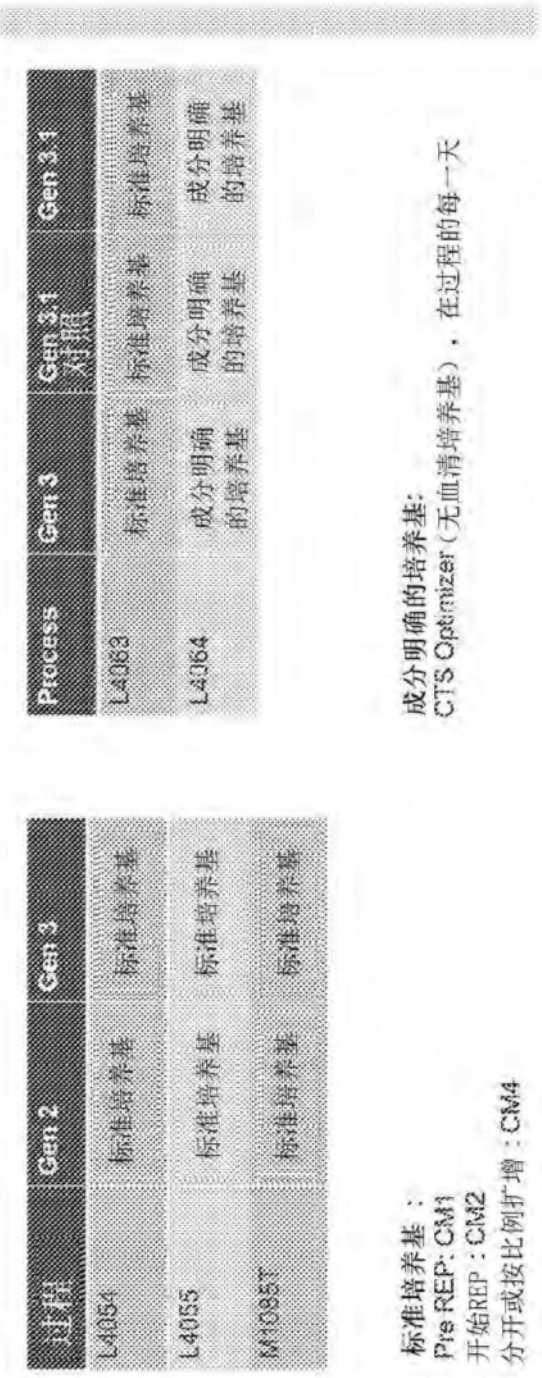
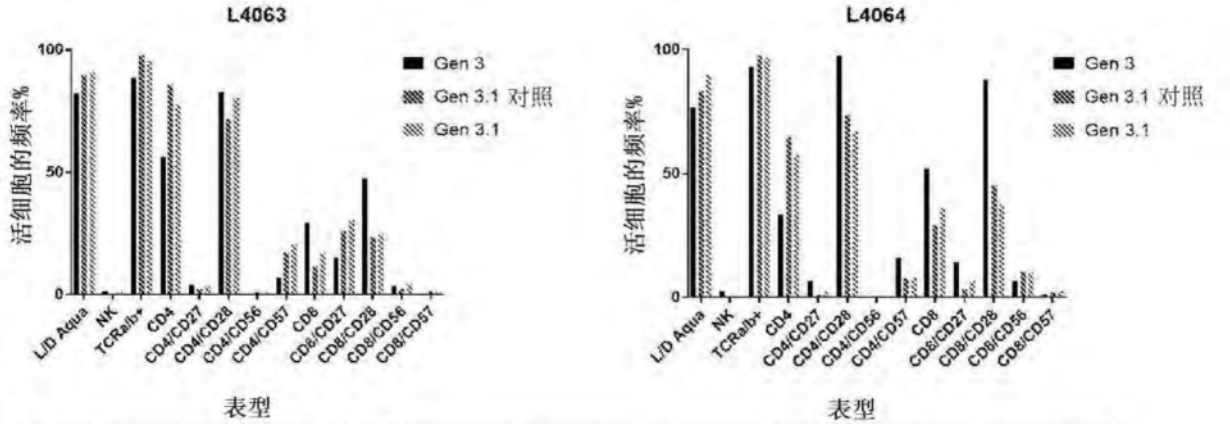
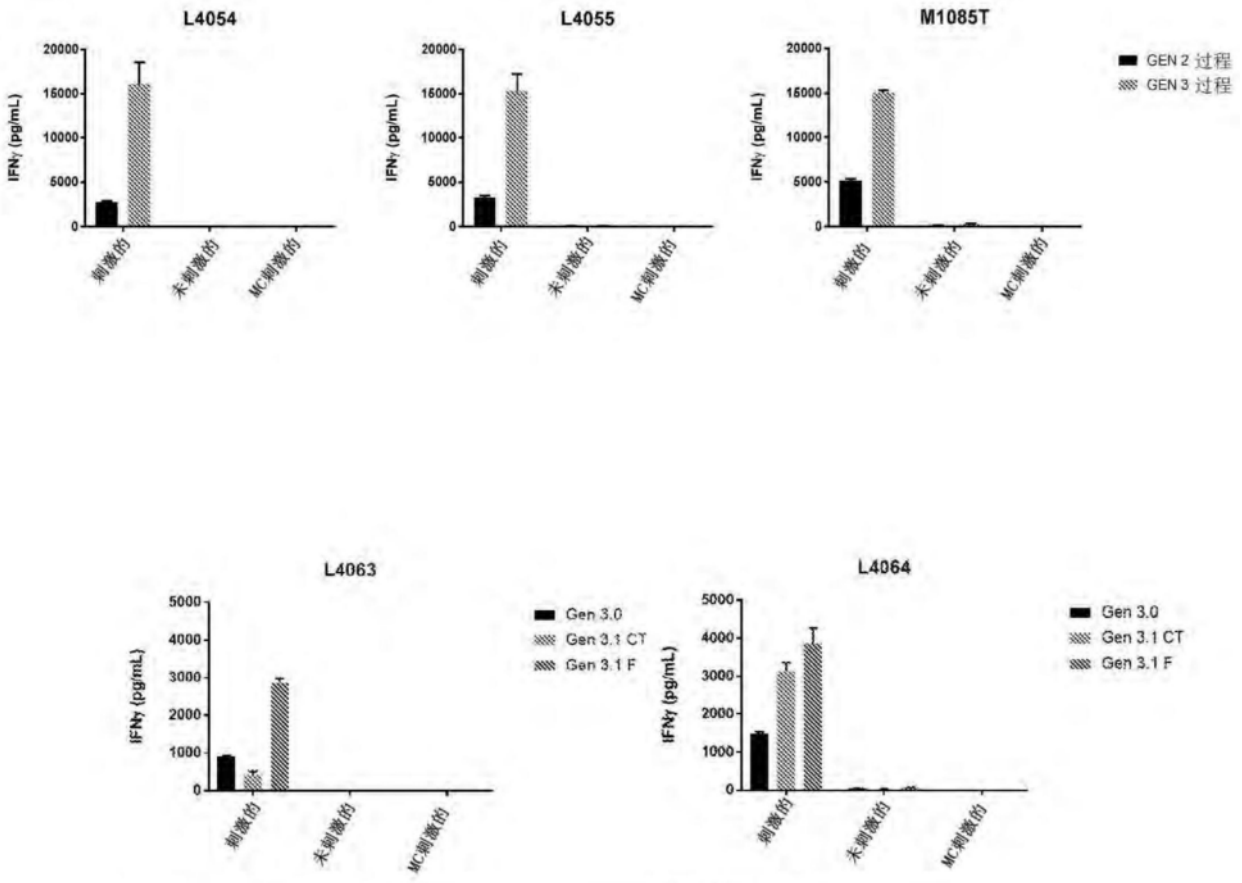

Process
Gen 3
Gen 3.1 对照
Gen 3.1
L4063
标准培养基
标准培养基
标准培养基
L4064
成分明确的培养基
成分明确的培养基
成分明确的培养基
成分明确的培养基:
CTS Optmizer(无血清培养基),在过程的每一天
过程
Gen 2
Gen 3
L4054
标准培养基
标准培养基
L4055
标准培养基
标准培养基
M10853T
标准培养基
标准培养基
标准培养基:
Pre REP: CM1
开始REP:CM2
分开或按比例扩增:CM4

图119



肿瘤ID	L4063 标准培养基			L4064 成分明确的培养基		
过程	Gen 3.0	Gen 3.1 对照	Gen 3.1	Gen 3.0	Gen 3.1 对照	Gen 3.1
# 碎片	53	53	53	21	21	21

图120



标准培养基:

成分明确的培养基

处理日	事件	Gen 3.0	Gen 3.1 CT 对照	Gen 3.1 F
第0天-开始pre-REP	培养基 CM1	500 mL	500 mL	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+	+	+
	OKT-3 碎片	+	+	+
	饲养细胞	-	-	+

图121

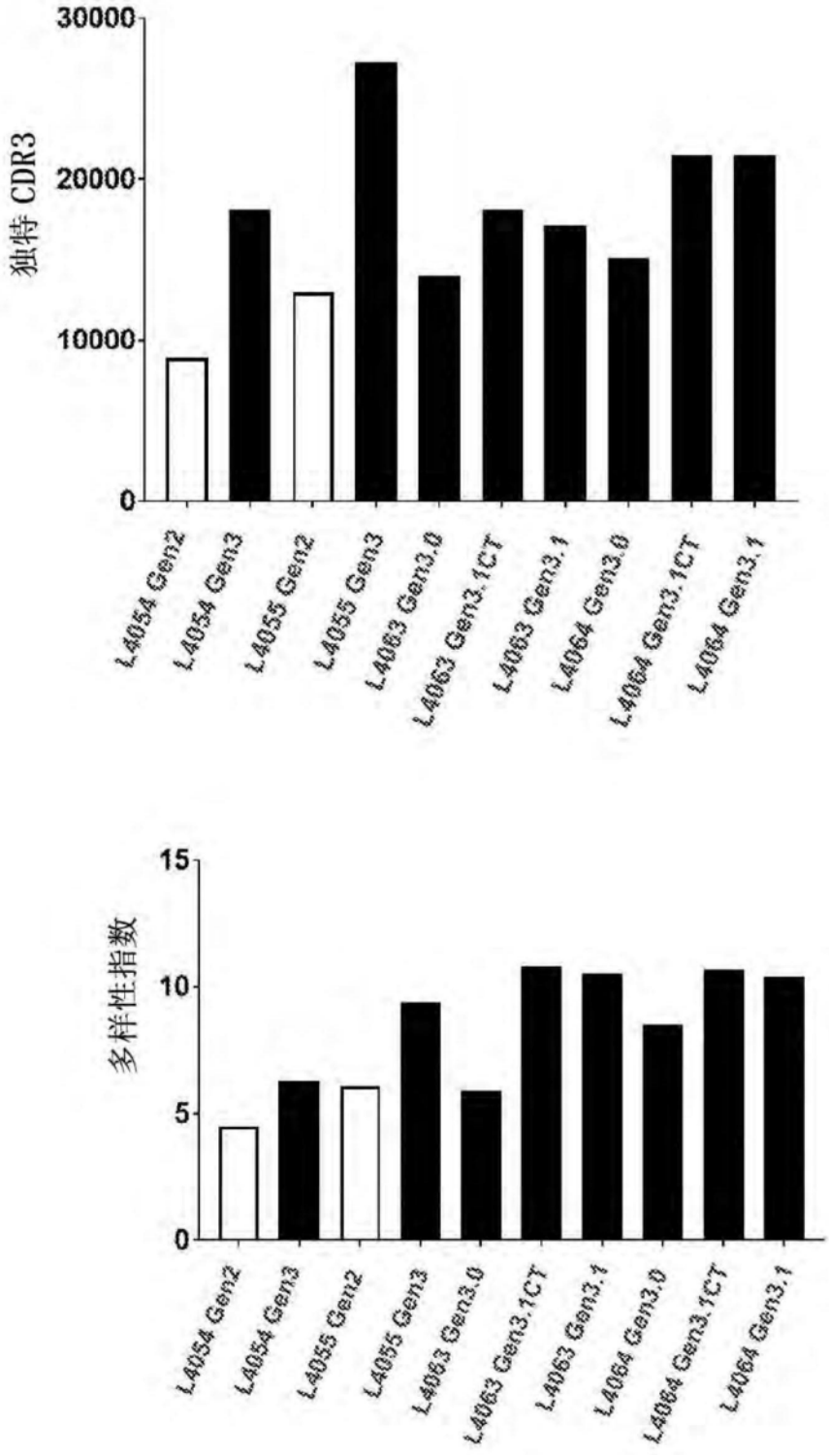

30000
20000
10000
0
独特 CDR3
L4054 Gen2
L4054 Gen3
L4055 Gen2
L4055 Gen3
L4063 Gen3.0
L4063 Gen3.1CT
L4063 Gen3.1
L4064 Gen3.0
L4064 Gen3.1CT
L4064 Gen3.1
15
10
5
0
多样性指数
L4054 Gen2
L4054 Gen3
L4055 Gen2
L4055 Gen3
L4063 Gen3.0
L4063 Gen3.1CT
L4063 Gen3.1
L4064 Gen3.0
L4064 Gen3.1CT
L4064 Gen3.1

图122

第0天的条件	Gen 3.0	Gen 3.1 (对照)	Gen 3.1
培养基	500 mL	500 mL	500 mL
IL-2 (6E+06)	+	+	+
OKT-3 (30ng/mL)	-	+	+
饲养细胞 (250 E+06)	-	-	+

uCDR3的数量 (% 重叠)	所有uCDR			前80%uCDR		
	Gen 3.0	Gen 3.1 对照	Gen 3.1	Gen 3.1	Gen 3.1 对照	Gen 3.1
Gen 3.0	14005	3240 (23)	2959 (21)	1105	1000 (90)	975 (88)
Gen 3.1 对照	-	18149	-	-	2438	-
Gen 3.1	-	-	17181	-	-	2332

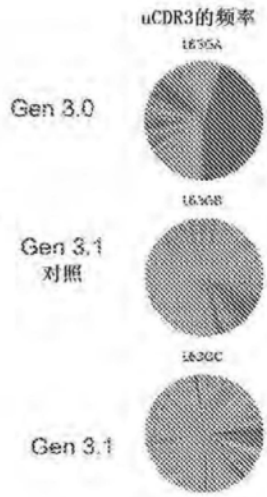


图123

第0天的条件	Gen 3.0	Gen 3.1 (对照)	Gen 3.1
培养基	500 mL	500 mL	500 mL
IL-2 (6E+06)	+	+	+
OKT-3 (30ng/mL)	-	+	+
饲养细胞 (250 E+06)	-	-	+

uCDR3的数量 (% 重叠)	所有uCDR			前80%uCDR		
	Gen 3.0	Gen 3.1 对照	Gen 3.1	Gen 3.0	Gen 3.1 对照	Gen 3.1
Gen 3.0	15107	5486 (36)	5541 (37)	2479	2186 (88)	2163 (87)
Gen 3.1 对照	-	21460	-	-	3247	-
Gen 3.1	-	-	21503	-	-	3264

图124

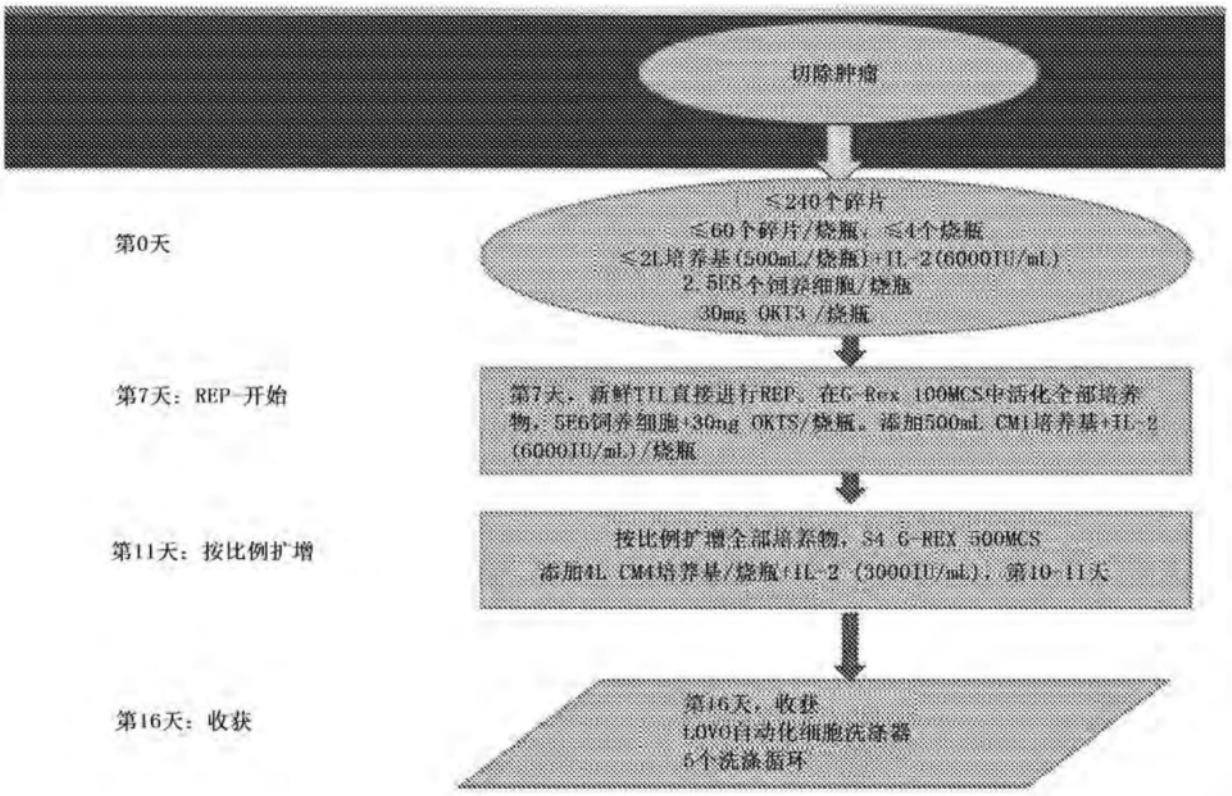

切除肿瘤
≤240个碎片
≤60个碎片/烧瓶，≤4个烧瓶
≤2L培养基(500mL/烧瓶)+IL-2(6000IU/mL)
2.5E8个饲养细胞/烧瓶
30mg OKT3 /烧瓶
第0天
第7天：REP-开始
第7天，新鲜TIL直接进行REP。在G-Rex 100MCS中活化全部培养物，5E6饲养细胞+30mg OKT3/烧瓶。添加500mL CM1培养基+IL-2(6000IU/mL)/烧瓶
第11天：按比例扩增
按比例扩增全部培养物，S4 G-REX 500MCS
添加4L CM4培养基/烧瓶+IL-2 (3000IU/mL)，第10-11天
第16天：收获
第16天，收获
LOVO自动化细胞洗涤器
6个洗涤循环

图125

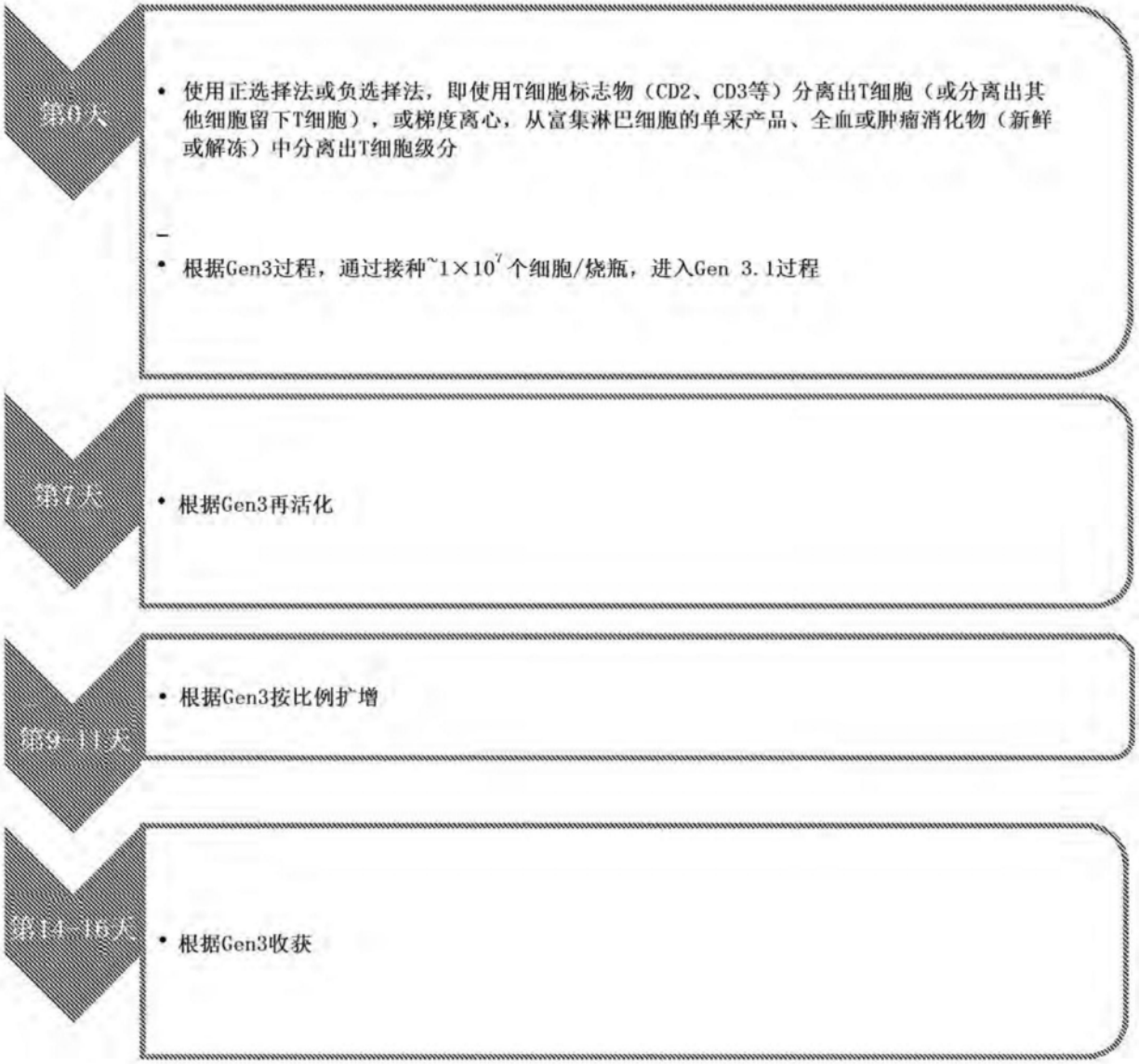

第0天
• 使用正选择法或负选择法，即使用T细胞标志物（CD2、CD3等）分离出T细胞（或分离出其他细胞留下T细胞），或梯度离心，从富集淋巴细胞的单采产品、全血或肿瘤消化物（新鲜或解冻）中分离出T细胞级分
–
• 根据Gen3过程，通过接种~1×10^7个细胞/烧瓶，进入Gen 3.1过程
第7天
• 根据Gen3再活化
第9-11天
• 根据Gen3按比例扩增
第14-16天
• 根据Gen3收获

图126

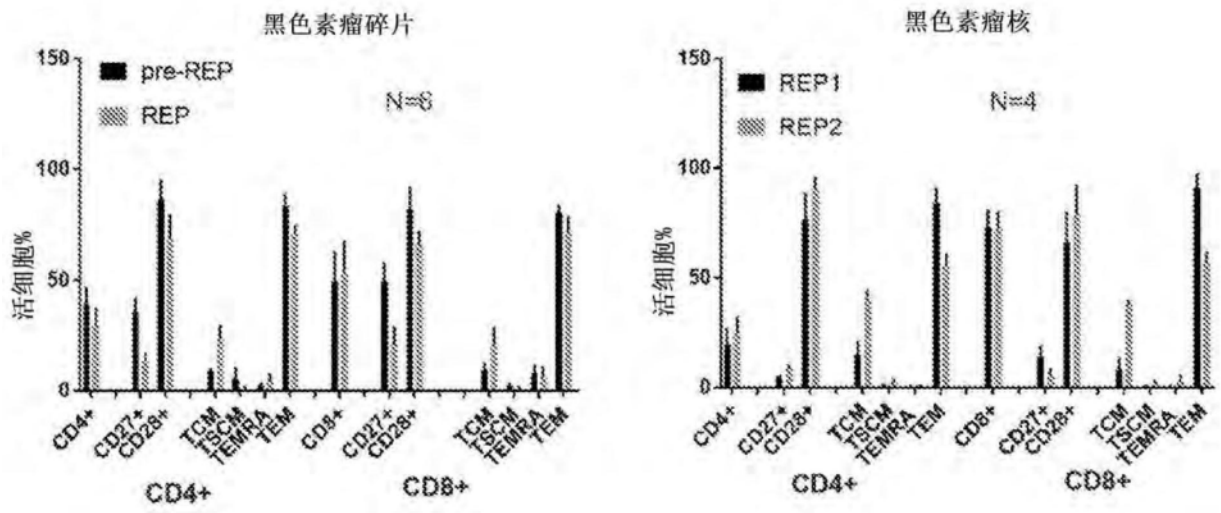

黑色素瘤碎片
pre-REP
REP
N=8
活细胞%
CD4+
CD8+
黑色素瘤核
REP1
REP2
N=4
CD4+
CD8+

图127

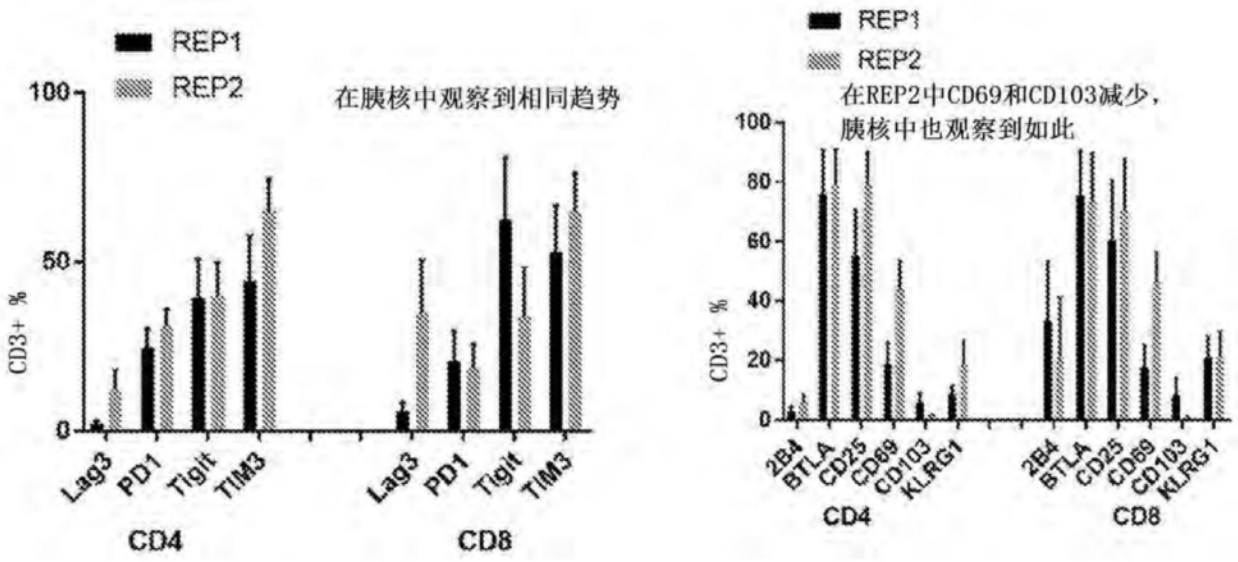

REP1
REP2
在胰核中观察到相同趋势
CD3+ %
Lag3
PD1
Tigit
TIM3
CD4
CD8
在REP2中CD69和CD103减少，
胰核中也观察到如此
2B4
BTLA
CD25
CD69
CD103
KLRG1

图128

	培养条件	核/条件 (#)	REP1	REP2
肺 (L4083)	第0天：添加OKT3+饲养细胞 第3天：添加OKT3+饲养细胞	1	按第0天的条件，在第11天 >50E6个细胞	扩增1157倍（第0天）和925倍（1/2个核） ~10,350 和 7,863 pg/ml IFNγ (分别)

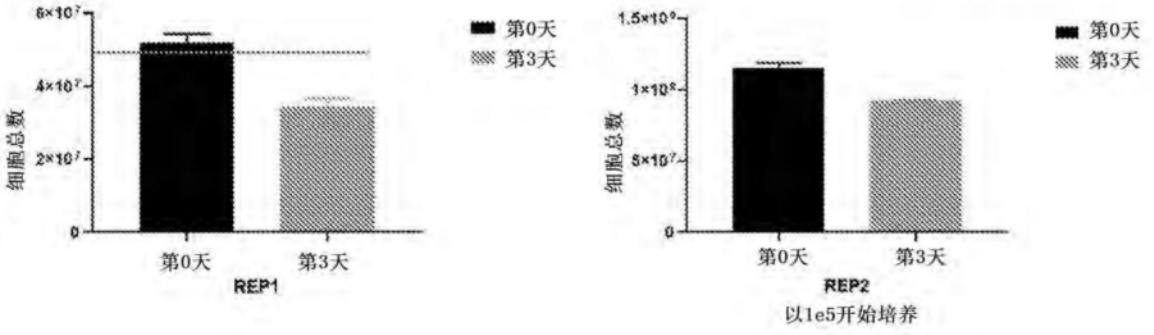


图129

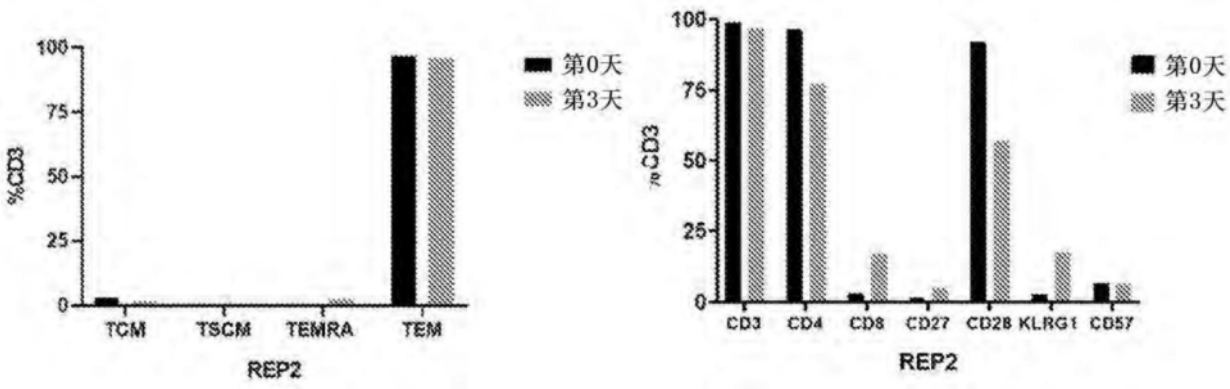


图130

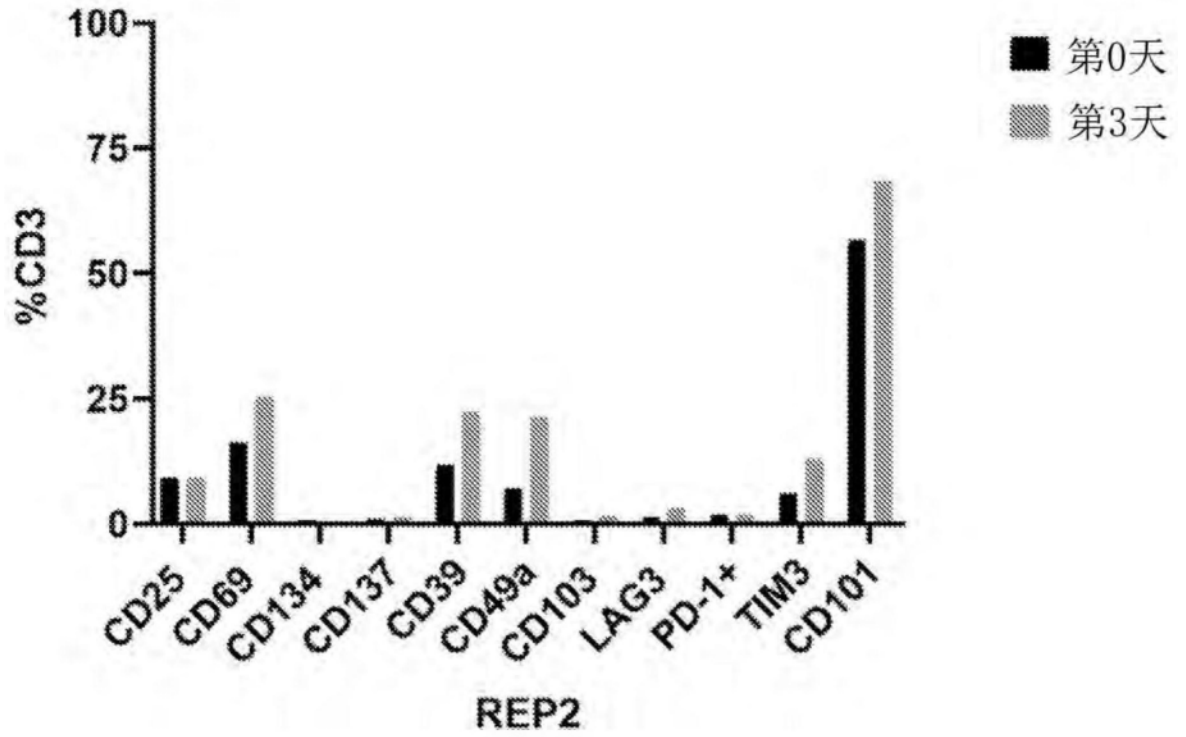

100
75
50
25
0
%CD3
第0天
第3天
CD25
CD69
CD134
CD137
CD39
CD49a
CD103
LAG3
PD-1+
TIM3
CD101
REP2

图131

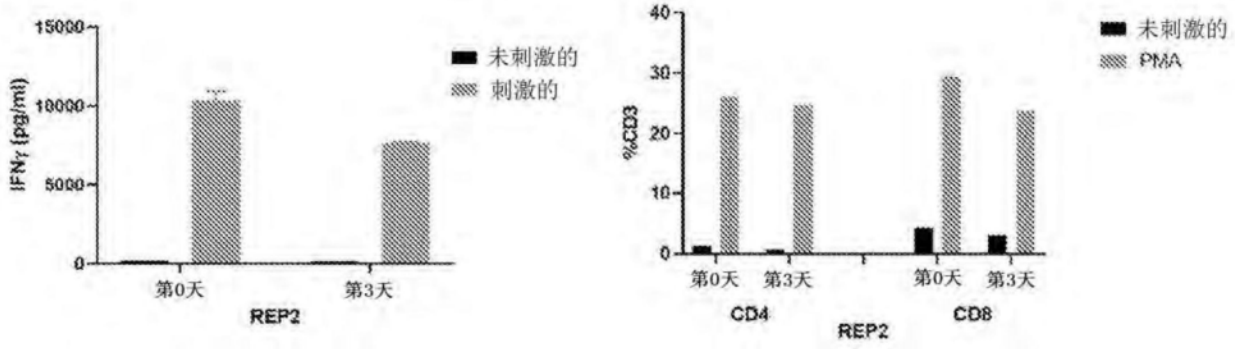

15000
10000
5000
0
IFNγ (pg/ml)
未刺激的
刺激的
第0天
第3天
REP2
40
30
20
10
0
%CD3
未刺激的
PMA
第0天
第3天
第0天
第3天
CD4
CD8
REP2

图132

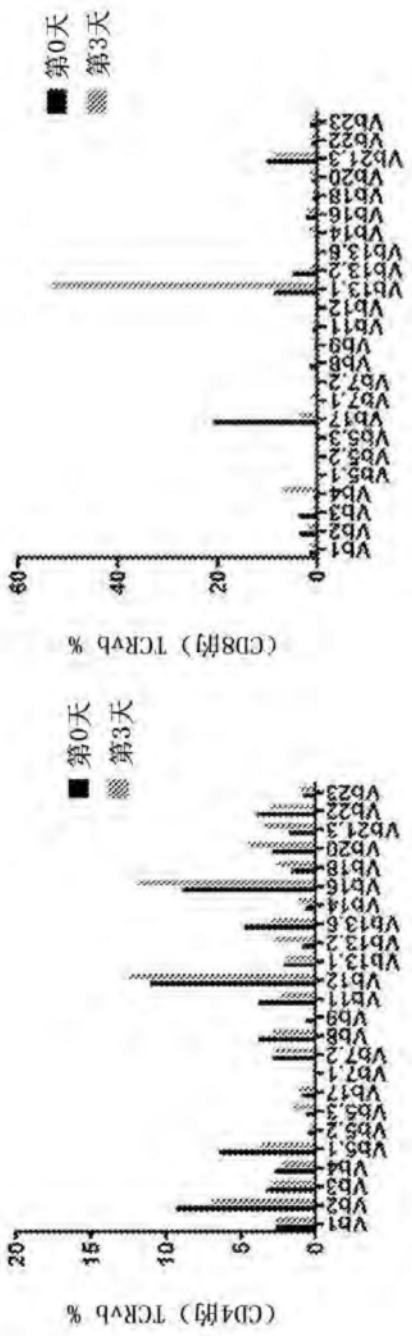

第0天
第3天
(CD8的) TCRVb %
60
40
20
0
Vb1
Vb2
Vb3
Vb4
Vb5.1
Vb5.2
Vb5.3
Vb17
Vb7.1
Vb7.2
Vb8
Vb9
Vb11
Vb12
Vb13.1
Vb13.2
Vb13.6
Vb14
Vb16
Vb18
Vb20
Vb21.3
Vb22
Vb23
第0天
第3天
(CD4的) TCRVb %
20
15
10
5
0

图133